A *Rhizomucor miehei* járomspórás gomba HMG-koenzim A reduktáz génjének molekuláris és funkcionális vizsgálata

Ph.D. értekezés

Készítette:

LUKÁCS GYÖNGYI

Témavezető:

DR. PAPP TAMÁS
Egyetemi adjunktus

Biológia Doktori Iskola

Mikrobiológiai Tanszék

SZTE TTIK

2008
Szeged

TARTALOMJEGYZÉK

TARTALOMJEGYZÉK **2**

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE **4**

BEVEZETÉS **5**

CÉLKITŰZÉSEK **7**

IRODALMI ÁTTEKINTÉS **8**

A *Rhizomucor* nemzetség jellemzése 8
A terpénvegyületek bioszintézise 11
Járomspórás gombák által okozott fertőzések 18
Gombafertőzések kezelése 20
Gombaellenes szerek gátló koncentrációjának meghatározása fonalas gombák esetében 24
Sztatinvegyületek szerkezete és hatása 29
Sztatinvegyületek és gombaellenes szerek metabolizmusa 32

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK **35**

Felhasznált táptalajok 35
Alkalmazott törzsek és plazmidok 36
Módszerek 38
Gomba genomi DNS tisztítása 38
A *Rhizomucor* génkönyvtár amplifikálása 38
HMG-KoA specifikus próba készítése 39
A λ Fix II fágban elkészített *Rhizomucor* génkönyvtár szűrése 39
A fág DNS tisztítása 41
DNS szakaszok izolálása és klónozása 42
RNS tisztítás és reverz transzkripció 44
***Mucor circinelloides* transzformálása** 45
Fluoreszcencia vizsgálata 46
Lovasztatin érzékenység meghatározás 46
A sztatin érzékenység meghatározása mikrotiter lemezen 47
Az amfotericin B és a sztatinok szinergizmusának vizsgálata 48

EREDMÉNYEK **49**

A *Rhizomucor miehei* 3-hidroxi-3-metilglutaril koenzim A reduktáz génjének izolálása 49
A *Xanthophyllomyces dendrorhous hmgR* gén részleges vizsgálata 54
A *R. miehei* HMG-koenzim A reduktáz 55
A *R. miehei hmgR* gén kópiaszámának meghatározása 57
RNS analízis 60
***R. miehei hmgR* gén heterológ expressziója *Mucor circinelloides*-ben** 61
Lovasztatin hatása járomspórás gombákra 68

Lovasztatin hatásának vizsgálata *Rhizomucor* fajokban 68
***R. miehei* és *R. pusillus* izolátumok fajszintű azonosítása lovasztatin érzékenységük alapján** 70
Különböző járomspórás gombák sztatin érzékenységének vizsgálata 73
Az amfotericin B és sztatinok együttes hatása járomspórás gombákra 78

ÉRTÉKELÉS **86**

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS **89**

IRODALOMJEGYZÉK **90**

ÖSSZEFOGLALÓ **102**

SUMMARY **105**

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

CYP	citokróm P oxidáz
DEPC	dietilpirokarbonát
GFP	zöld fluoreszcens fehérje (*green fluorescent protein*)
HMG-KoA	3-hidroxi-3-metilglutaril koenzim A
IPTG	izopropil β-D-tiogalaktopiranozid
ITS	*internal transcribed spacer*
LB	LB táptalaj (*Luria broth*)
LDL	kis sűrűségű lipoprotein (*low density lipoprotein*)
MEA	malátakivonat agar (*malt extract agar*)
MEP	metileritritol 4-foszfát
MIC	minimális gátló koncentráció (*minimal inhibition concentration*)
MOPS	3-(N-morfolino) propánszulfonsav
PCI	fenol-kloroform-izoamilalkohol (*phenol-chlorophorm-isoamylalcochol*)
PCR	polimeráz láncreakció (*polymerase chain reaction*)
PEG	polietilén-glikol
pyrG	orotidin-5-monofoszfát dekarboxiláz
SDS	nátrium-dodecil-szulfát (*sodium dodecyl sulphate*)
SRE	szterol érzékelésért felelős DNS szakasz (*sterol response element*)

BEVEZETÉS

A járomspórás gombák (Zygomycetes) rendszertanilag jól körülhatárolható csoportot alkotnak. Az idetartozó fajok többsége a *Mucorales* rend tagja, ezek főként a talajban, valamint különböző növényi és állati eredetű bomló szerves anyagokon előforduló szaprofita szervezetek. Gyakran vizsgált modellszervezetek, elsősorban különböző szabályzó mechanizmusok, sajátos szexuális folyamataik, vagy éppen a gomba morfogenezis tanulmányozása során. Számos gyakorlati szempontból fontos fajt találunk közöttük. Orvosi szempontból egyes fajok, mint mucormikózist okozó opportunista patogének érdemelnek figyelmet: ezek a fertőzések bár viszonylag ritkák, erősen progresszív és nehezen kezelhető jellegük miatt veszélyesek. Más fajok ipari törzsei extracelluláris enzimek termelőiként, vagy értékes biológiai aktivitással rendelkező vegyületek sztereospecifikus hidroxilálóiként kerülnek ipari felhasználásra.

A Zygomycetes osztály különleges, az alacsonyabbrendű és a magasabbrendű gombák közötti átmeneti jellege, valamint a járomspórás gombák számos citológiai, biokémiai és ökológiai sajátossága egyértelművé teszik, hogy genetikai vizsgálatuk nem váltható ki más gombacsoportok tanulmányozásával.

Az izoprének (pl. szteroidok, karotinoidok, geranilált és farnezilált fehérjék terpén csoportjai) bioszintéziséhez vezető acetát/mevalonát reakcióút meghatározó lépése a 3-hidroxi-3-metilglutaril koenzim-A (HMG-KoA) redukciója mevalonsavvá. A járomspórás gombák esetében ez a reakcióút különösen fontos, mivel zigospóráik (ivaros spóráik) kialakulása összefügg a karotinoid és azon keresztül az izoprén bioszintézissel. Ebben a folyamatban β-karotin köztiterméken keresztül trispórsav keletkezik, amely az ivaros differenciálódásért és spóraképzésért felelős. A HMG-KoA reduktáz enzim regulációja feltehetően ezeket a sajátos ivaros folyamatokat is befolyásolja. Az acetát/mevalonát reakcióúton keletkező karotinoidoknak biotechnológiai jelentősége is van. Egyes karotinoid

termelő gombákat pl. *Blakeslea trispora*-t β-karotin és likopin, másokat pl. *Xanthophyllomyces dendrorhous*-t asztaxantin (a β-karotin oxigenált származéka) előállítására használnak. Az asztaxantin keletkezésében szerepet játszó enzimek, így a HMG-KoA reduktáz azonosítása és vizsgálata lényeges a karotinok gazdaságos és hatékony fermentációjának kidolgozásához.

A HMG-KoA reduktáz szelektív gátlószerei a különböző sztatinok, melyek a nélkülözhetetlen izoprénvegyületek szintéziséhez vezető acetát/mevalonát reakcióút kulcslépésének gátlásával számos biológiai folyamatot befolyásolnak.

CÉLKITŰZÉSEK

Munkánk során célul tűztük ki a járomspórás gombák közé tartozó *Rhizomucor miehei* 3-hidroxi-3-metilglutaril-koenzim A reduktáz (HMG-KoA reduktáz) kódoló génjének (*hmgR*) azonosítását és izolálását. Célunk volt a gén nukleotidsorrendjének és a kódolt fehérje feltételezett aminosavsorrendjének elemzése, valamint a gén kópiaszámának meghatározása. A *R. miehei hmgR* génjének izolálása mellett kísérleteket kezdtünk a *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*anamorf: Phaffia rhodozyma*) asztaxantintermelő gomba *hmgR* génjének azonosítása érdekében, melyhez kapcsolódóan tervezzük a kódolt fehérje más, azonosított HMG-KoA reduktázokkal mutatott hasonlóságának vizsgálatát. A *R. miehei hmgR* gén és az általa kódolt fehérje megismerését célzó kísérletekhez kapcsolódóan vizsgálni kívántuk az enzim kompetitív gátlószerének, a lovasztatinnak a járomspórás gombára kifejtett biológiai hatását.

Tanulmányozni kívántuk továbbá annak a lehetőségét, hogy a *hmgR* gén felhasználásával kialakítható-e egy új transzformációs rendszer járomspórás gombákban.

IRODALMI ÁTTEKINTÉS

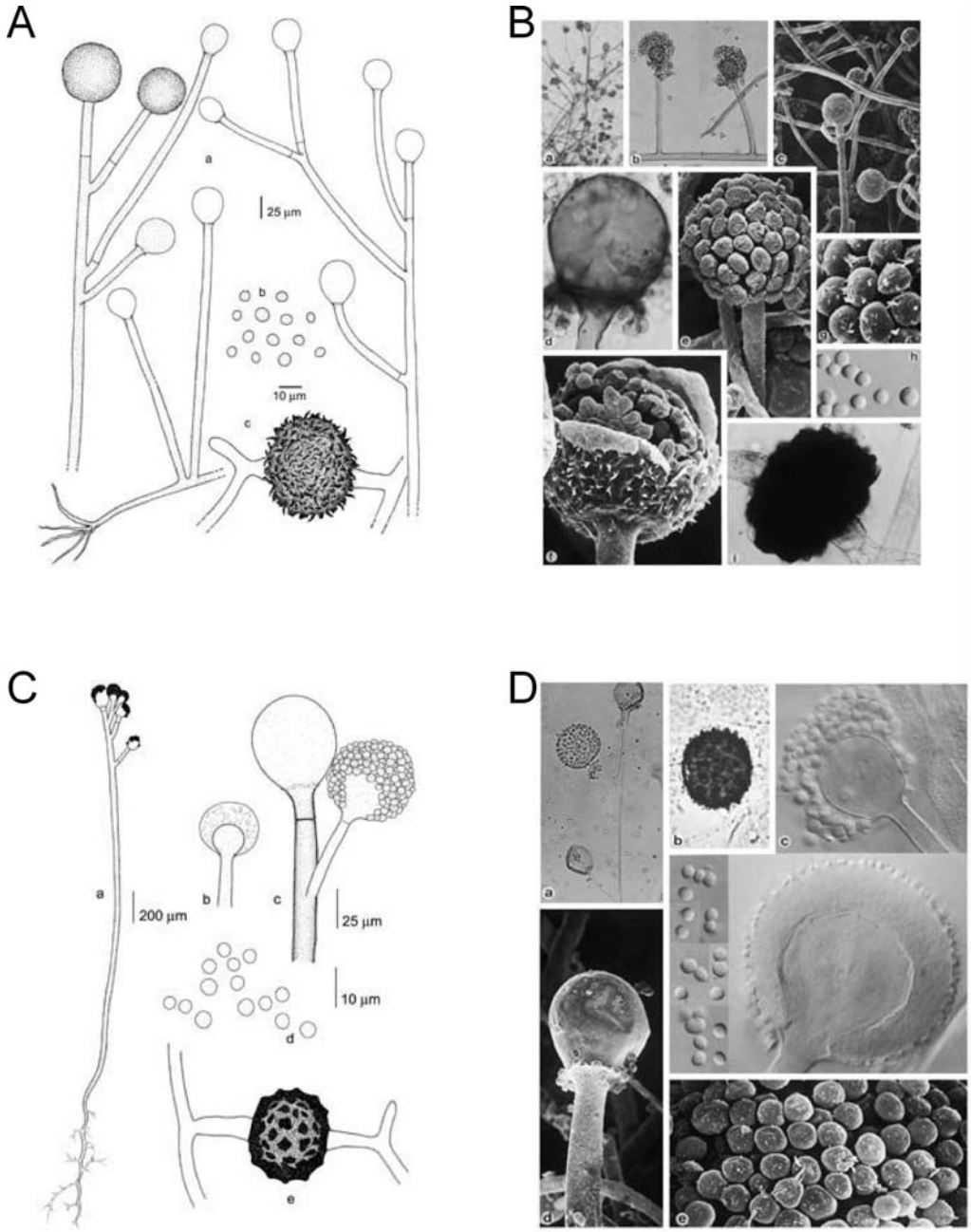
A *Rhizomucor* nemzetség jellemzése

A *Rhizomucor* génusz rendszertanilag a *Zygomycetes* osztályba tartozik. Ebbe a nemzetségbe sorolták az indával (*stolon*), rizoidokkal és sötét színű (barna-fekete) sporangiummal rendelkező termofil „*Mucor*" fajokat. A nemzetség tagjai a sporangiofórok és a sporangiumok alakját tekintve hasonlítanak az *Actinomucor* nemzetségbe tartozó gombákhoz, ám ez utóbbiak mezofilek és zigospóráik sem ismertek (Cooney és Emerson 1964). A *Mucor* génusztól a rizoidok és indák, a *Rhizopus* fajoktól az elágazó sporangiofórok és az apofízis hiánya, az *Absidia* képviselőitől pedig a gömb alakú sporangium és szintén az apofízis hiánya különbözteti meg (1. Táblázat).

1. Táblázat. A *Rhizomucor* nemzetség összehasonlítása a rendszertanilag közel álló *Absidia*, *Rhizopus* és *Mucor* nemzetséggel.

Génusz	*Rhizomucor*	*Absidia*	*Rhizopus*	*Mucor*
rizoid és inda	van	van; gyakran nehezen észlelhető	van	hiányzik
sporangiofór	monopodiális, vagy szimpodiális elágazású; sötétbarna	a végeken elágazó; általában hialin típusú	általában nem elágazó; legtöbbször barna színű	elágazó, vagy nem; leginkább hialin típusú
sporangium	gömb alakú; szürke; fénylő	piriform	gömb alakú; szürke, vagy barna; sokszor fényes	gömb alakú
kolumella	gömbszerű; barna	hemiszférikus, gyakran nyúlványokkal	gömbszerű, vagy kissé elongált	változatos alakú (pl. gömb, piriform)
apofízis	hiányzik, vagy nagyon pici	jelen van; kúp alakú	jelen van (sokszor nem szembetűnő)	hiányzik
sporangiospóra	gömb, vagy gömbszerű; kicsi; sima	gömb alaktól a hengeresig; sima felszínű	leginkább szögletes és barázdált	gömb alaktól a hengeresig
zigospóra	érdes; egyforma szuszpenzorok között találhatók	sima, vagy gyengén érdes; a szuszpenzorok közel egyformák	érdes; egyenlőtlen gömb alakú szuszpenzorok között	érdes; egyforma szuszpenzorok között találhatók

A *Rhizomucor* fajok sporangiofórjai monopodiális, vagy szimpodiális elágazásúak, sötétbarna színűek, végeiken terminális sporangiumokkal. Ez utóbbiak függőleges helyzetűek, gömbölyűek, sötét színűek és spórákkal teltek. A sporangiospórák alakja gömbszerű.



1. Ábra: A *Rhizomucor* fajok jellegzetes morfológiai képletei:
A, *Rhizomucor miehei* (IMI 240410) **a**. sporangiofór; **b**. sporangiospórák; **c**. zigospóra
B, *Rhizomucor miehei* (IMI 240410) **a-c**. sporangiofórok; **d**. kolumella; **e**, **f**. érett sporangium; **g**, **h**. sporangiospórák; **i**. zigospóra. (Nagyítás: **a**. x76; **b**. x256; **c**. x520; **d**. x1600; **e**. x3050; **f**. x2450; **g**. x5000; **h**, **i**. x1600).
C, *Rhizomucor pusillus* (CBS 245.58) **a**. sporangiofór kolumellával és sporangiospórákkal; **b**. fiatal sporangium keresztmetszete; **c**. kolumellák; **d**. sporangiospórák; **e**. zigospóra.

D, *Rhizomucor pusillus* (IMI 226172) **a**. sporangiofór; **b**. zigospóra; **c.** fiatal és érett sporangiumok és sporangiospórák; **d**. kolumella szabad sporangiospórákkal; **e**. sporangiospórák. (Nagyítás: **a**. x320; **b**. x640; **c**. x1600; **d**. x1450; **e**. x4700).
(**Forrás:** *Mucor miehei* Cooney & R. Emerson, 1964, LEG **Képek:** S. de Hoog Literature Hoog, G.S. de 2000, Atlas of clinical fungi: 95-98)

A termofil tulajdonság a *Rhizomucor* génusz fajainak régen felismert jellegzetes sajátossága. Az optimális hőmérséklet ezen gombák fejlődéséhez a 37-40°C (Lindt 1886; Miehe 1907). A *Rhizomucor* fajok ivaros folyamatainak eredménye az erősen pigmentált falú zigospóra, mely létrejöhet heterotallikusan, vagy homotallikusan. A zigospóra morfológiájában mutatkozó különbségek bélyegként szolgálhatnak a fajok elkülönítéséhez. A *Rhizomucor* fajok tipikus morfológiai képletei az 1. Ábrán láthatók.

A korábbi ismeretek szerint a nemzetség három gombafajt foglal magába: ezek a *R. miehei, R. pusillus* és a *R. tauricus* (Schipper 1978). Molekuláris vizsgálatok ma már nem igazolják a *R. tauricus* önálló fajként történő elkülönítését (Vastag és mtsai. 1998; Vágvölgyi és mtsai. 1999) Az idetartozó mikroszkopikus gombák csekély fajszámuk ellenére kiemelkedő gyakorlati jelentőséggel bírnak.

A *R. pusillus* és a *R. miehei*, más járomspórás gombákhoz (pl. *Rhizopus* fajok) hasonlóan, humán és állati mikózisok opportunista patogén kórokozói lehetnek. A járomspórás gombák által kiváltott betegségek, amelyeket gyakran az általánosabb zigomikózis (mucormikózis) elnevezéssel is jelölnek, viszonylag ritkán fordulnak elő. Elsősorban immunszupresszált betegeknél, cukorbetegeknél, egyes leukémiás megbetegedésekben, krónikusan alultáplált gyermekeknél, illetve súlyos égési sérültek esetében okozhatnak gondot (Evans és Gentles 1985). Az utóbbi években azonban fokozott figyelem irányul a járomspórás gombák által okozott mikózisokra. Ennek egyik oka, hogy egyre nagyobb azoknak a betegeknek a száma, akik állapotuk miatt veszélyeztetettek; elsősorban a cukorbetegek, továbbá a valamilyen kórfolyamat (pl. AIDS), vagy terápiás okokból (pl. transzplantáció miatt) immunszupresszált állapotba került betegek száma

növekszik (Smitherman és Peacock 1995). Másik ok, hogy e mikózisok kialakulása esetén a terápiás lehetőségek meglehetősen korlátozottak: ez részben a *Rhizomucor* fajok gyors, a normál testhőmérsékleten optimális feltételeket találó növekedésével, másrészt a gombaellenes hatóanyagok többségével szemben mutatott rezisztenciájával magyarázható. Ennek tudható be, hogy Blitzer és mtsai. felmérése szerint (1980) a rhinocerebrális mucormikózisban megbetegedettek esetében a mortalitás elérte a 63%-ot, amely értéket nagy dózisú amfotericin B kezelés alkalmazásával is csak 58%-ra lehetett csökkenteni.

A *Rhizomucor miehei* nagy jelentőséggel bír egyes biotechnológiai és élelmiszeripari alkalmazásokban. A tejet koaguláló mikrobiális eredetű proteázok között kiemelkedő fontosságú a *R. miehei* savas proteáza.

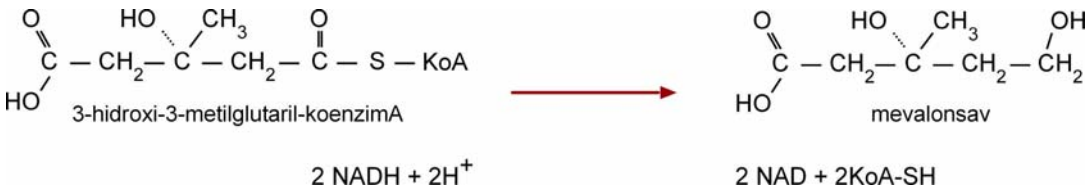
A terpénvegyületek bioszintézise

Az izoprenoidok, más néven terpenoidok izoprénegységek kapcsolódásával felépülő molekulák. Az élővilágban számos fontos anyagcseretermék tartozik az izoprénvázas vegyületek csoportjába. Lehetnek hormonhatású anyagok (gibberellinek, szteroid hormonok, gombák párosodási folyamataiban szerepet játszó ún. mating faktorok), ide tartoznak az élőlények egyes színanyagai (karotinoidok), a sejtmembránok fontos alkotórészei (pl. koleszterin és ergoszterin), de ebbe a molekulacsoportba sorolhatók egyes másodlagos anyagcseretermékek, mint a szeszkviterpének, szeszterterpének, vagy a növényvilágban előforduló triterpén szaponinok. Fontos szerepük van a sejteken belül az egyes fehérjék farnezilációjában és prenilációjában is.

Növényi kloroplasztiszban és baktériumokban létezik egy alternatív, „nem-mevalonát” reakcióút is, az ún. metileritritol 4-foszfát út (MEP), mely izoprénvegyületek keletkezéséhez vezet (Pandian mtsai. 1981, Lichtenhaler mtsai. 1997) piruvátból és gliceraldehid-3-foszfátból (GAP) kiindulva (Rohmer és mtsai. 1993). A „nem-mevalonát” reakcióút első lépése egy transzketoláz típusú reakció, ahol piruvátból és GAP-ból egy szintáz enzim segítségével 1-

deoxi-D-xilulóz-5-foszfát jön létre, amelyből későbbi lépések során keletkezik izopentenil-pirofoszfát. Növényekben a kloroplasztisz eredetű izoprenoid vegyületek, a karotinoidok, a monoterpének (Eisenreich és mtsai. 1997), diterpének (Eisenreich és mtsai. 1996; Schwarz 1994), az izoprén (Zeidler és mtsai. 1997) valamint a klorofill és a plasztokinon prenil oldalláncai (Lichtenthaler és mtsai. 1997) is ezen a reakcióúton keletkeznek.

Más eukarióta szervezetekben, köztük a gombákban ettől eltérően az izoprenoidok szintézisének első lépése a mevalonsav keletkezése. Két egymást követő lépésben a 3-hidroxi-3-metilglutaril koenzim A keletkezése (HMG-KoA szintetáz), majd ennek mevalonsavvá történő redukciója zajlik le. Az utóbbi folyamatot a 3-hidroxi-3-metilglutaril koenzim A reduktáz enzim, egy NADP koenzim segítségével működő oxidoreduktáz katalizálja (2. Ábra).

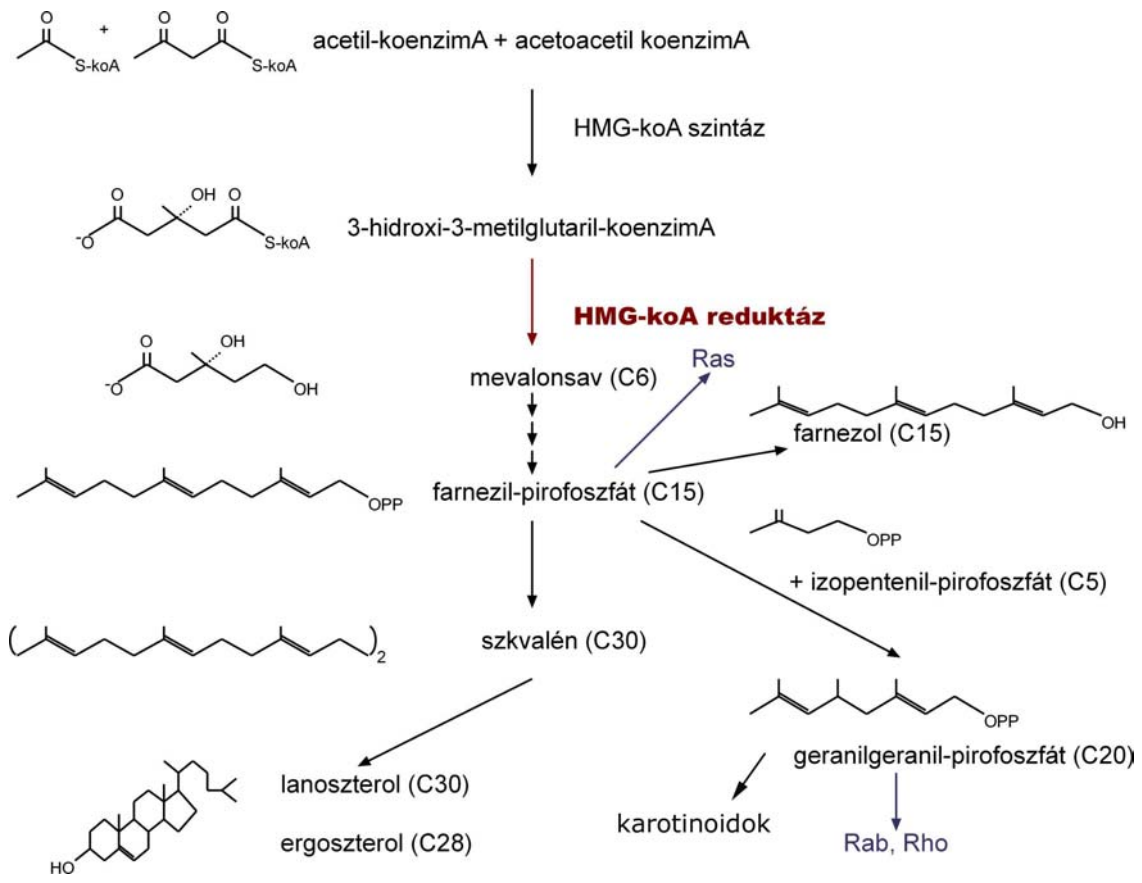


2. Ábra: A HMG-KoA reduktáz által katalizált reakció

Ezt a folyamatot, melynek során az élővilágban a legtöbb izoprénvázas vegyület létrejön a kiindulási molekulák alapján acetát/mevalonát reakcióútnak is nevezik (3. Ábra).

A további lépések során a mevalonsav több lépésben izopentenil pirofoszfáttá alakul, azzá az öt szénatomos vegyületté, amelyből minden izoprénvázas vegyület leszármaztatható. Az izopentenil pirofoszfát dimetilallil pirofoszfáttá alakul át, majd a továbbiakban az izoprénváz újabb izopentenil pirofoszfát egységek kondenzációjával hosszabbodik. Az egyes köztitermékekről ágaznak le a különböző terpének specifikus szintézis útjai: a geranil pirofoszfát (C_{10}) a monoterpének; a farnezil pirofoszfát (C_{15}) a szeszkviterpének, szteroidok és triterpének; a geranilgeranil pirofoszfát (C_{20}) a diterpének és karotinoidok; míg a

geranilfarnezil pirofoszfát (C_{25}) a szeszterterpének és politerpenoidok szintézisének kiindulási vegyülete.



3. Ábra: Az acetát/mevalonát reakcióút

A farnezil pirofoszfát a szkvalén (a szterolbioszintézis köztiterméke) és a geranilgeranil pirofoszfát közös előanyaga. Megfigyelték, hogy a járomspórás gombasejtekben a karotinoidok és a szterolok szintézise elkülönül, és a sejtek különböző készleteket használnak fel a mevalonsavszintézis során. Két 15 szénatomos farnezil pirofoszfát molekulából a szkvalén szintáz enzim segítségével jön létre a 30 szénatomos szkvalén, melyből szkvalén-epoxid köztiterméken keresztül több lépésben lanoszterol képződik. A lanoszterolt ezután a lanoszterol 14-α-demetiláz enzim alakítja a gombák sejtmembránjának fontos alkotórészévé, ergoszterollá. Az azolok csoportjába tartozó antifungális szerek a lanoszterol 14-α-demetiláz enzim gátlásán keresztül fejtik ki gombaellenes hatásukat. Farnezil pirofoszfátból geranilgeranil pirofoszfát köztiterméken

keresztül keletkeznek az egyes gombákban (*Phycomyces*, *Blakeslea*, *Mucor, Xanthophyllomyces, Neurospora)* viszonylag nagy mennyiségben előforduló karotinoidok. Ilyen vegyület a *Xanthophyllomyces dendrorhous* (anamorfja a *Phaffia rhodozyma*) segítségével biotechnológiai úton termeltetett asztaxantin (Johnson 2003; Dufossé és mtsi. 2005; Lukács és mtsai. 2006). Az állatok és az ember nem képesek karotinvegyületeket előállítani, így azok takarmánnyal, illetve táplálékkal jutnak be a szervezetbe. Karotinoidokat az élelmiszer-, a kozmetikai- és a gyógyszeripar, valamint az állattenyésztés (takarmánykiegészítőként) használ fel jelentősebb mennyiségben. Ismert antioxidánsok, újabban daganatos megbetegedésekkel szembeni megelőző és az immunrendszert erősítő hatásukat is kimutatták. Egyes karotinoidok az A-vitamin előanyagaiként részt vesznek a látás és a sejtdifferenciálódás folyamataiban. A karotinszintézis folyamatainak jobb megismerése lehetővé teszi ezek biotechnológiai előállítását.

A járomspórás gombák más eukarióta mikroorganizmusok párosodási hormonjaitól eltérő szexuális feromonrendszerrel rendelkeznek. Zigospóráik (ivaros spórák) kialakulása összefügg a karotinoid szintézissel. Néhány Mucorales rendbe tartozó faj esetében a párosodás (*mating*) során a β-karotin mennyisége megnövekszik, minek következtében a tenyészetek elszíneződnek. Ilyenkor az acetát/mevalonát reakcióúton, β-karotin köztiterméken keresztül egy 18 szénatomszámú ketosav, a trispórsav (*trisporic acid*) keletkezik, amely az ivaros differenciálódásért és szexuális spóraképzésért felelős. A szaporodási képletek kialakulása a trispórsav hormon termelődését követi (Austin és mtsai. 1969). A *Blakeslea trispora* esetében *in vivo* radioaktív mevalonsav jelöléses kísérletekben megfigyelték, hogy az összes radioaktív felhalmozódás 27%-a trispórsav formájában jelent meg (Austin és mtsai. 1969).

Hornby és mtsai. 2001-ben *Candida albicans*-ban azonosították a farnezolt, az első eukarióta *quorum sensing* molekulát. A farnezol, egy szeszkviterpén molekula, mely farnezil

pirofoszfátból keletkezik, bár a keletkezéséért felelős enzimet eddig nem sikerült azonosítani (Hornby és Nickerson 2003). A farnezol szerepet játszik a *C. albicans* élesztő-micélium sejtalak átalakulásában, ezen keresztül a humánpatogén gomba biofilm képzésében és virulenciájában. A farnezolt *Aspergillus nidulans* tenyészethez adva, vagy az *A. nidulans* gombát együtt tenyésztve *C. albicans*-szal, *A. nidulans*ban apoptózis indukálható, így a molekulának feltehetően szerepe van nemcsak a *quorum-sensing* folyamatokban, hanem más fajok kompetitív kizárásában is (Semighini és mtsai. 2006). A farnezil pirofoszfátból létrejövő szterol köztitermékek keletkezését gátolva az acetát/mevalonát reakcióúton, a farnezol mennyisége a gombában megnövekedett (Navarathna és mtsai. 2005, Hornby és mtsai. 2004). A farnezil pirofoszfát szintézisének fokozása HMG-KoA reduktáz túltermelésével *Saccharomyces cerevisiae*-ben növeli a keletkezett farnezol mennyiségét. Ong és mtsai. (2006) kimutatták, hogy a farnezol gátolja a HMG-KoA reduktázt emlős sejtekben. A mevalonsav bioszintézis út egyes termékei gátolják az izoprenoid bioszintézis korai lépéseit, köztük a HMG-KoA reduktáz enzim keletkezését, stabilitását és lebomlását (Goldstein és Brown 1990). Emlős sejtekben megfigyelték, hogy a keletkező koleszterol represszálja azoknak a géneknek a működését, melyek promóter régiójában megtalálható az ún. szterol válasz elem (*sterol response element*, SRE). Ilyen gén a HMG-KoA reduktázt kódoló *hmgR* gén is (Siperstein 1984, Shimans és mtsai. 1997). A *P. blakesleeanus* HMG-KoA szintázt kódoló *hmgS* és HMG-KoA reduktázt kódoló *hmgR* génjének promóterében található egyes szakaszok szerepet játszanak a szterolok érzékelésében és a szterolszintézis szabályozásban (Ruiz-Albert és mtsai. 2002). Emlős sejtekben találtak SRE és SRE-szerű elemeket a farnezil difoszfát szintáz, a szkvalén szintáz, az LDL-receptor és a sejt apoptózis folyamatainak represszora a Bcl-2 esetében is (Varma és mtsai. 2000, Kaur és mtsai. 1998, Dimitroulakos és mtsai. 1999, Kaul és Khosla 2000). A HMG-KoA reduktáz fény (Bhosale 2004) és etanol által aktivált oxidatív anyagcsere hatására indukálható *X. dendrorhous*-ban (Gu és mtsai.

1997), és a tápközegben nagy mennyiségben jelenlevő asztaxantin prekurzorok esetén az asztaxantin termelése fokozható. A jelenség egyik lehetséges magyarázata, hogy a sejt asztaxantin termelésével védekezik a reaktív oxigén gyökökkel szemben (An és Johnson 1990). Mindenesetre a HMG-KoA reduktáz működése központi jelentőségű az asztaxantin termelődése szempontjából.

A farnezil pirofoszfát és geranilgeranil pirofoszfát fontos szerepet játszik számos jelmolekula sejten belüli elhelyezkedéséért és a membránhoz kötött fehérjék szállításáért. A GTP-áz molekulacsaládba tartozó Rho és Ras fehérjék izoprenilációjának gátlása a HMG-koenzim A reduktáz gátlásán keresztül több életfolyamat normális lejátszódását akadályozza. A *ras* gének számos eukarióta szervezetben előfordulnak. Emlős és gomba sejtekben is jelátviteli utakban játszanak szerepet, amelyek olyan fontos sejtszintű folyamatokat irányítanak, mint a sejt fejlődése és osztódása (Boguski és McCormick 1993, Bourne és mtsai. 1990, Ellis és mtsai. 1981, Vojtek és Der 1998, Kataoka és mtsai. 1984, Powers és mtsai. 1984, Som és Kolaparthi 1994). A *ras* homológok befolyásolják a gombasejtek morfogenezisét, ezen keresztül pedig hatást gyakorolnak egyes patogén fajok, pl. a *C. albicans* (Leberer és mtsai. 2001, Yaar és mtsai. 1997), a *Cryptococcus neoformans* (Alspaugh és mtsai. 2005) és az *Aspergillus fumigatus* (Panepinto és mtsai. 2003, Fortwendel és mtsai. 2004, 2005) virulenciájára is (Lengeler és mtsai. 2000). A RasB homológok a RasA csoporttól eltérő módon egy 20 aminosav hosszúságú, ismeretlen funkciójú, erősen konzervált doménnel rendelkeznek. Azokban a gombafajokban fordulnak elő, melyek életciklusuk egy szakaszában fonalas növekedést mutatnak (Fortwendel és mtsai. 2004, 2005). A *ras*B homológ gén deléciója az *A. fumigatus* esetében csökkentette a sugárirányú növekedés mértékét, így feltételezhető, hogy a génnek szerepe van az apikális növekedés során (Fortwendel és mtsai. 2005). A gén deléciója ezenkívül a formint kódoló *sep*A és a szeptint kódoló *asp*B gén deléciójának hatásához hasonló morfológiai elváltozást idézett elő a

gombafonalak elágazódásában. Ez utóbbi gének szintén az apikális növekedés fenntartásáért és a normális elágazódás kialakításáért felelősek *A. nidulans*-ban. A *ras* génnek fontos szerepe van a *Laccaria bicolor* ektomikorrhiza-alkotó gomba növény szimbiontájának (*Pinus resinosa*) felismerésében, a sejt-sejt kapcsolat létrehozásában, fenntartásában, a gomba sejtproliferációjában, végeredményben a Hartig-háló kialakításában és fenntartásában (Sundaram és mtsai. 2001).

A farneziláció szükséges a Ras fehérjék membránban történő elhelyezkedéséhez és működéséhez. *A. nidulans ras* homológ *rasA* gén transzlációja szénforrás hiányában indukálódik, amely egy jelkaszkádot indít el, és a konídiumok csírázásához vezet. A *rasA* gén mutációja az *A. nidulans* korai torzult csírázását okozza (Osherov és mtsai. 2000). Roze és Linz (1998) *Mucor racemosus* járomspórás gombában vizsgálták a Ras fehérjék prenilációjának gátlását, valamint hatását a sejt morfológiai változására. A *M. racemosus* egy dimorf növekedésre képes gomba, mely 3 *ras* génnel rendelkezik. Az M*ras*1, M*ras*2 és M*ras*3 a fonalas növekedés során fejeződik ki, míg átíródásuk az élesztőszerű növekedés során gyenge. A preniláció közvetett, a HMG-KoA reduktáz kompetitív gátlószerével, a lovasztatinnal előidézett, gátlása befolyásolja a Ras fehérjék sejten belüli feldolgozását. Hatására az Mras3 fehérje felhalmozódása gátolt és az Mras1/p20 fehérjekomplex mennyisége csökken. Ezek következményeként a gombanövekedés, valamint a sporangiospórák keletkezésének mértéke szintén csökken. A lovasztatin az apoptotikus folyamatokra jellemző morfológiai és biokémiai változásokat idéz elő a *Mucor* sejtekben, melyek végül a sejtek halálához vezetnek (Roze és Linz 1998). A tápközeghez adott cAMP-vel élesztőszerű (szférikus) növekedést indukálva a gombában apoptózis nem játszódik le, ami arra utal, hogy a sejthalálhoz vezető jelátviteli út aktiválódása összefügg a sejtek morfológiájával.

Járomspórás gombák által okozott fertőzések

A Mucorales rendbe tartozó fonalas gombák által okozott megbetegedéseket összefoglaló néven zigomikózisnak (korábban mucormikózis) nevezik. Ezek a betegségek az utóbbi években mind nagyobb gyakorisággal fordulnak elő (Jiménez és mtsai. 2002; Ruoppi és mtsai. 2001; Rangel-Guerra és mtsai. 1996; St-Germain és mtsai. 1993). A betegségre hajlamosító tényezők között szerepelnek a különböző vérképzőszervi megbetegedések (Meyer és mtsai. 1972; Gruhn és Sansos 1963), a cukorbetegség (Rangel-Guerra és mtsai. 1985; Sheldon és mtsai. 1959; Reinhardt és mtsai. 1970), súlyos sérülések (Stern és mtsai. 1999; Nash és mtsai. 1971; Rabin és mtsai. 1961), valamint a szerv és csontvelőátültetést követő immunszupresszív kezelések (Funada és Matsuda 1996). Az utóbbi években az orvostudomány fejlődésével növekszik azoknak a beavatkozásoknak a száma, melyek megnövekedett kockázati tényezőt jelentenek gombás fertőzések kialakulásában. Ezek közé tartozik a vérképző szervek őssejtjeinek transzplantációja, a HSCT is (*hematopoetic stem cell transplant*) (Greenberg és mtsai. 2006), melyeknél egyre növekszik a zigomikózisos esetek száma (Marty és mtsai. 2004; Siwek és mtsai. 2004; Marr és mtsai. 2002).

Az opportunista kórokozó gombák, a természetben (elsősorban a talajban) előforduló szaprofita szervezetek, melyek nagy mennyiségben keletkező, kisméretű sporangiospórái a levegőben terjedve könnyen bekerülnek a tüdőbe, és a legyengült szervezetben súlyos megbetegedést okozhatnak. A zigomikózisok különböző formában jelentkezhetnek, megtámadhatnak összefüggő szöveteket, szerveket, mint például a tüdőt, vesét, de előfordulhatnak az emésztőszervrendszerben is. A bőrfelszín sérülése, égési sebek esetén a fertőzés a bőrt és a bőr alatti szöveteket támadja meg, majd bőrléziókat okoz. A gombasejtek véráramba kerülve a szervezetben szétterjedhetnek, és több szervet támadhatnak egyszerre. A fertőzésnek ez a formája a tüdőből indul ki, és a gombasejtek embóliás folyamat következtében kerülnek a véráramba, ahonnan bejuthatnak az agyi területekre is (Berns és

mtsai. 1984, Tedder és mtsai. 1994). A zigomikózisok leggyakoribb formája a rhinocerebrális mucormikózis, amely rendszerint az orrüregekből ered, majd onnan átterjedve az arc más részeire (pl. a szemre) és bekerülve a homloküregbe az agyat is megtámadja (Chakrabarti és mtsai. 2001; Nosari és mtsai. 2000; Rizzato 2004). Ennek a fertőzési formának leggyakoribb oka az elhanyagolt cukorbetegséggel együtt járó ketoacidózis, és a neutropéniás állapot (neutrofil granulociták számának csökkenése), mely kedvező körülményeket teremt a gomba számára a szervezetben történő szaporodásra (Chakrabarti és mtsai. 2001). A járomspórás gombák által előidézett betegségek kezelésének sikere nagymértékben függ a gyors diagnózistól (Nosari és mtsai. 2000). A diagnózis felállítása a legtöbb esetben igen nehéz, a fertőzés első tünetei a láz és az erős köhögés, majd a fertőzés a legyengült szervezetben gyorsan elhatalmasodik. A tüdőben kifejlődő gomba a röntgen radiográfiás és komputer tomográfiás (CT) felvételeken a tüdőaszpergillózis képével egyezik (Kline 1985), míg vérből, köpetből, vagy a légutakból mosással nyert mintákban (*intraalveolaris lavage*) a járomspórás gombák jellegzetes harántfalak nélküli micéliumának kimutatása gyakorlatilag lehetetlen. Az érintett szervek szövettani vizsgálata perjódsavas-Schiff festéssel és Grocott-Gömöri metánamin-ezüstnitrát festéssel történik (Nosari és mtsai. 2000). A biopsziával vett mintában a nem szeptált, szabálytalan elágazódást mutató hifák alapján a járomspórás gombák a szabályos harántfalakkal tagolt aszkuszos gombahifáktól egyértelműen elkülöníthetők (Nosari és mtsai. 2000), de a zigomikózis sajnos legtöbbször csak a beteg halála után igazolt (Eucker és mtsai. 2001). Mindezek alapján látható, hogy a veszélyeztetett betegek (pl.: immunszupresszív terápia) esetében a súlyos mellékhatásokkal járó, preventív antifungális kezelés szükséges. Más esetekben, a betegség hirtelen felbukkanása például sérülés következtében, az antifungális szerekkel, legtöbbször az intraperitoneálisan adott amfotericin B-vel, vagy annak valamely lipid formájával történő kezelés azonnali megkezdése mellett a fertőzött szövetek sebészi úton történő eltávolítása javasolt. Roden és mtsai. (2005)

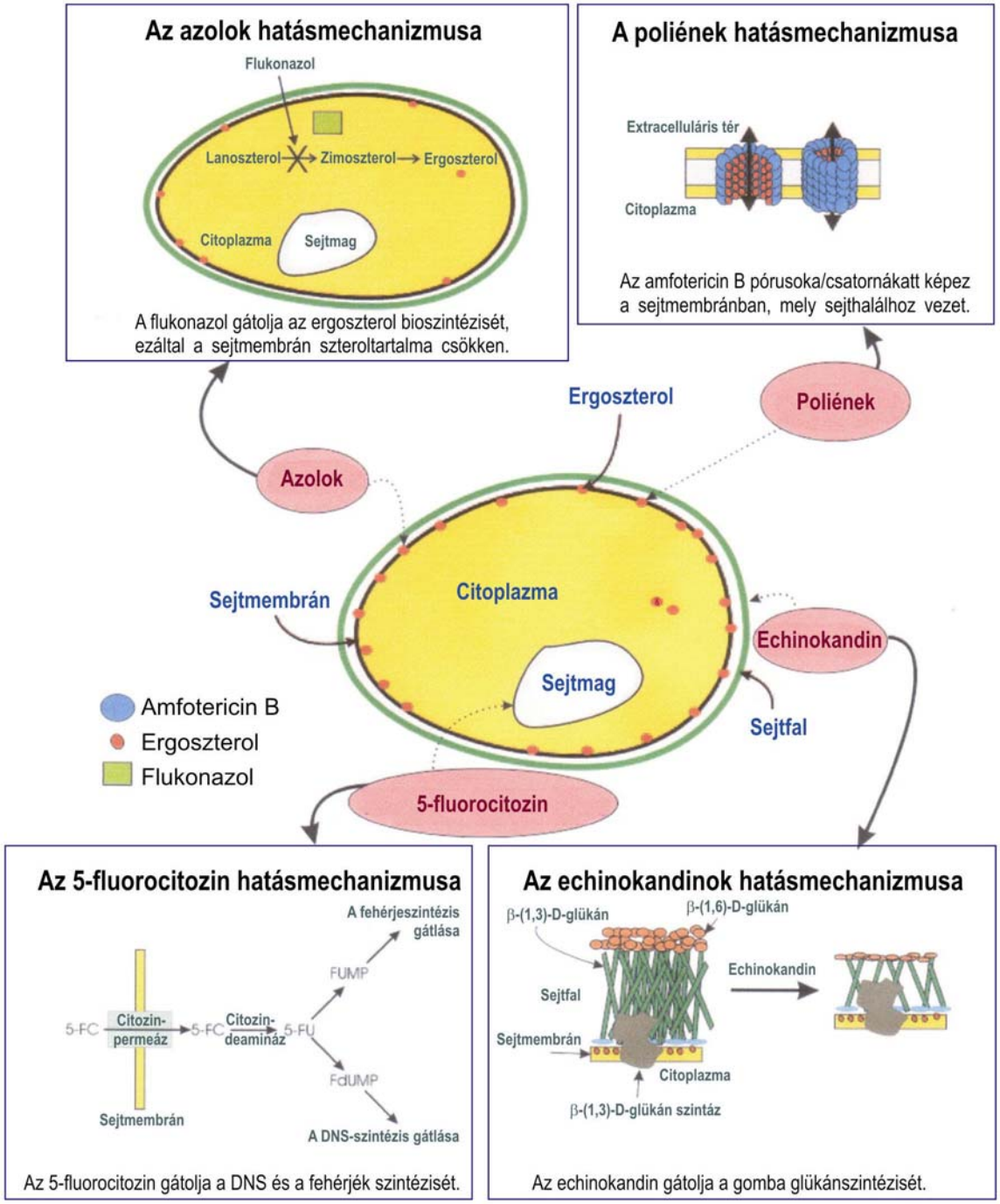
összegyűjtötték az 1885 óta közölt, járomspórás gombák által okozott megbetegedés adatait. A 929 vizsgált esetből a más alapbetegséggel nem rendelkezők 65%-a, a cukorbetegek 56%-a, míg a rákos betegek 34%-a élte túl a fertőzést. A túlélés esélye nagymértékben függött a fertőzés típusától és az érintett szövettől, vagy szervtől: a túlélés bőrfertőzéseknél 90%, rhinocerebrális fertőzésnél 38%, tüdő érintettség esetén 24%, emésztőszervrendszeri formánál 15%, a betegség disszeminált formájában pedig mindössze 4%.

A járomspórás gombák több képviselője ismert opportunista humán kórokozóként, ilyen például az *Absidia corymbifera*, *Rhizomucor* sp., *Mucor* sp., *Rhizopus* sp., *Saksanea vasiformis* (Chakrabarti és mtsai. 2001), de leggyakrabban *Rhizopus* és *Rhizomucor* nemzetségbe tartozó fajok fordulnak elő a mucormikózisos esetekben. A betegség tünetei, lefolyása és a veszélyeztetett betegek szempontjából a különböző Mucorales rendbe tartozó gombák által okozott fertőzések teljesen hasonlóak, de az izolált gombafajok antifungális szerekkel szemben tapasztalt érzékenysége nagymértékben különbözik. Ezen kórokozók sokfélesége miatt a velük szemben alkalmazható szerek, és a fajok gyors és legalább nemzetség szintű azonosításának kutatása elengedhetetlen az érintett betegek kezelése szempontjából. Schwarz és mtsai. (2006) 16 fajhoz tartozó 44 zigomikóta izolátum vizsgálata során a fajok azonosítására alkalmazható ITS szekvenciákon alapuló, PCR alapú diagnosztikai módszert dolgozott ki, mellyel a fajok azonosítása a szövetekből vett mintákból lehetséges.

Gombafertőzések kezelése

A súlyosabb gombafertőzések kezelésére használt első antifungális szer a poliének csoportjába sorolt amfotericin B deoxikolát (AmBD), mely erős antifungális hatása mellett súlyos mellékhatásokkal rendelkezett, ezért kifejlesztették a májra kevésbé toxikus lipidekkel kombinált formáit az AmB lipid komplexet (ABLC), a liposzómás AmB-t (LamB) és az AmB

kolloid diszperzióját (ABCD). Valamennyi amfotericin B molekula antifungális hatása a gomba sejtmembránjában található ergoszterolhoz való kötődésén alapul (4. Ábra).



4. Ábra: Gombaellenes szerek hatásmechanizmusa
(Mukherjee és mtsai. 2005 nyomán)

Más antimikotikumok az imidazolok közé tartozó mikonazol, ketokonazol és a triazolok csoportjába tartozó itrakonazol, vorikonazol és flukonazol. Gombaellenes hatásukat az ergoszterol szintézisének gátlásán keresztül érik el. Néhány jó vízoldékonyságú azolszármazék (pl. flukonazol) előnye a molekula hosszú féléletideje mellett, hogy szájon át is szedhető, hátrányuk viszont számos metabolikus mellékhatásuk. Számos esetben alkalmaztak azolokat zigomikózisok kezelésében, de általában nem voltak kellően hatásosak (Rizzato 2004). Sun és munkatársai 2002-ben több klinikai járomspórás gombaizolátumra tesztelték az újabb fejlesztésű posakonazolt, mely az itrakonazolhoz, vorikonazolhoz és flukonazolhoz képest hatásosabb gátlószernek bizonyult *in vitro* kísérletekben, bár hatása az amfotericin B gátló hatásától a legtöbb esetben elmaradt. Az azóta eltelt néhány évben azonban egyre több *in vitro*, *in vivo* és terápiás alkalmazás is azt mutatja, hogy a *per os* alkalmazható posakonazol áttörést jelenthet a zigomikózisok kezelésében. Barchiesi és munkatársai (2007) *in vivo* egérmodellben tesztelték a posakonazol profilaktikus hatását két járomspórás gombafaj, a *Rhizopus oryzae* és *Absidia corymbifera* fertőzés kivédésére. A *R. oryzae*-vel fertőzött egér valamennyi szervéből sikerült a kórokozót tenyészteni a posakonazol profilaxist követően csakúgy, mint az eddig egyedül hatásos szer az amfotericin B profilaktikus alkalmazását követően (Odds és mtsai. 1998). Az egerekben a fertőzést a sporangiospórák intravénás befecskendezésével idézték elő és arra is kíváncsiak voltak, hogy az így mesterségesen létrehozott disszeminált fertőzés során mely szervekben alakul ki fertőzési góc, hol alakulnak ki a hifák. Megfigyeléseik szerint a *R. oryzae* bejutását követően a hifák leginkább a vesékben és az agyban alakulnak ki. Míg a vesében nagymértékben csökkenthető a fertőzési gócok száma mind amfotericin B, mind pedig posakonazol profilaktikus alkalmazásával, addig az agyban csak az amfotericin B alkalmazásával sikerült ezek számát csökkenteni, bár a kialakult fertőzési területek mérete nem csökkent. *A. corymbifera* esetében posakonazol alkalmazásával valamennyi szerv fertőzésmentes állapotát

sikerült elérni, a kórokozó a szövetmintákból nem volt tenyészthető. Greenberg és munkatársai (2006) 24 esetből 19 betegnél értek el részleges választ, vagy gyógyulást a járomspórás gomba által okozott fertőzés leküzdésében. A kezdeti amfotericin B kezelés után hosszabb ideig alkalmaztak posakonazol kezelést, mely az egyik betegnél több mint ezer napig (!) tartott. A posakonazollal kezelt betegek a szert jól tolerálták, mindössze egy esetben kellett felhagyni a posakonazol alkalmazásával allergiás reakció kialakulása miatt. Az alapbetegség kontrollálása az antifungális kezelés mellett az általuk vizsgált betegeknél is fontos volt a túlélés szempontjából. Az azolok alkalmazhatóságát legtöbbször korlátozza az a tulajdonságuk, hogy metabolizmusuk a máj citokróm P450 rendszerén keresztül valósul meg, így együttes adásuk más, a veszélyeztetett betegek kezelésében alkalmazott drogokkal, például ciklosporinnal súlyos mellékhatások kialakulásához vezet. Az újabb gombaellenes szerek csoportját jelentik az echinokandinok, például a kaszpofungin, melyek az 1,3-β-D glükán szintáz gátlásán keresztül gátolják a gomba sejtfalának szintézisét és növekedését (4. Ábra). Ibrahim és mtsai. (2005) sikeresen azonosította a glükánszintézisért felelős fehérjekomplex egyik alegységét kódoló gént, valamint azonosítottak egy kaszpofungin függő, membránhoz kapcsolódó glükánszintáz aktivitást *Rhizopus oryzae*-ban. Kísérleteikben sikerült javítaniuk a ketoacidózist mutató egérmodellben létrehozott szisztémás *R. oryzae* fertőzés túlélési esélyét kaszpofungin alkalmazásával. A kezelés azonban csak abban az esetben volt sikeres, ha a fertőzést kevés ($5x10^2$) spórával idézték elő. Mindezekből következik, hogy az amfotericin B és különböző lipidformáinak alkalmazása sebészeti beavatkozással együtt továbbra is a zigomikóta fertőzések leghatékonyabb kezelését jelentik (Jiménez és mtsai. 2002). Az amfotericin B kezelést sikerrel alkalmazták a mucormikózis rhinocerebrális típusánál (Mondy és mtsai. 2002; Ruoppi és mtasi. 2001) is. Az amfotericin B súlyosabb mellékhatásai, a láz, az izomgyengeség, a légzési nehézségek mellett a vese károsodása. Néhány újabb tanulmány beszámol arról, hogy az amfotericin B-t, a

mellékhatások csökkentése érdekében más antifungális szerrel kombinálva alkalmazzák (Barchiesi és mtsai. 2007). Kombinációban használják az antibiotikus vegyületeket abban az esetben is, ha valamelyik vegyülettel szemben a kórokozó rezisztenciája alakulhat ki. Szisztémás *Candida* fertőzésekben az amfotericin B-t flucitozinnal együtt alkalmazzák az esetleges flucitozinrezisztencia kialakulásának elkerülésére (Rizzato 2004). A különböző szerek kombinálásának másik előnye lehet a szinergizmus, vagyis az egyes komponensekre külön-külön nem érzékeny organizmusok kombinált kezelésben érzékenyek lehetnek, és a komponensek alkalmazott koncentrációja csökkenthető. Afeltra és mtsai. (2004) az itrakonazol és különböző antimikrobiális hatással nem rendelkező membránaktív anyagok (amilorid, lidokain, lansoprazol, nifedipin, verapamil és flufenazin) *in vitro* szinergizmusát vizsgálták az itrakonazollal szemben rezisztens *Aspergillus fumigatus* növekedésének gátlásában. Elanjikal és mtsai. (2003) sikeresen kezeltek egy invazív aszpergillózisban szenvedő 24 hónapos kislányt az amfotericin B-t kaszpofunginnal kombinálva. Ezek a törekvések különösen fontosak zigomikózisok esetében. Az egyik lehetséges csoportja a kombinációban adható vegyületeknek a sztatinok, melyek a szív és érrendszeri megbetegedésekben koleszterinszint csökkentésére alkalmazott szerek. Több publikációban igazolták a sztatinok fungisztatikus illetve fungicid hatását (Chin és mtsai. 1997; Chamilos és mtsai. 2006).

Gombaellenes szerek gátló koncentrációjának meghatározása fonalas gombák esetében

Az egyes antimikotikumokkal szemben mutatott érzékenység vizsgálatára a *Clinical and Laboratory Standard Institute* (CLSI), korábbi nevén *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLSI) javasol a klinikai gyakorlatban alkalmazható standardizált eljárást. A fonalas- és élesztőgombákra jellemző drogérzékenység vizsgálatának végrehajtására az antifungális érzékenységvizsgálattal foglalkozó albizottság, a *Subcommittee*

on Antifungal Susceptibility Tests javasol eljárásokat, valamint az általa megállapított MIC értékek az irányadók az antifungális szerek klinikai alkalmazásakor.

Az antifungális szerek interakciójának vizsgálata három módszer segítségével végezhető el (Mukherjee és mtsai. 2005):

1. *Checkerboard* titrálás

A leggyakrabban alkalmazott módszer, melynek lényege, hogy 96 mintahelyet (12x8) tartalmazó mikrotiter lemezen a két szer különböző koncentrációit hígítási sorban alkalmazzák, és az egyes mintahelyeken elkészítik a két szer különböző alkalmazott koncentrációinak kombinációját is. Az így előkészített lapra megadott sejtszámot, vagy spóraszámot leoltva, azt adott hőmérsékleten, adott ideig inkubálják, majd a mintahelyek optikai denzitásából következtetnek a növekedésgátlás mértékére. A kapott eredmények alapján a szerek közötti interakció többféle módszerrel is számolható:

- **FIC mutató kiszámítása** (FICI, *non-parametric fractional inhibition concentration index*)

$$\sum FIC = FIC_A + FIC_B = \frac{MIC_{A,komb.}}{MIC_A} + \frac{MIC_{B,komb.}}{MIC_B}$$

ahol,

MIC_A és MIC_B	Az A és B szer önmagában történő alkalmazásakor kapott minimális gátló koncentráció
$MIC_{A,\ komb}$ és $MIC_{B,\ komb}$.	Az A és B szer kombinációban történő alkalmazásakor kapott minimális gátló koncentráció.

Odds és mtsai. (1998) alapján megállapított értékek a kölcsönhatás jellegének megállapítására:

FICI ≤ 0,5	**Szinergizmus**

$0,5 < FICI < 4$	**Nincs kölcsönhatás**
$4 \leq FICI$	**Antagonizmus**

A FIC mutató használatának legnagyobb hátránya, hogy a *checkerboard* titrálás során egyazon lemezen, az egyes mintahelyeken koncentrációtól függően a szerek szinergizmusa, antagonizmusa és az interakció hiánya is megállapítható, amit ezzel a módszerrel nem tudunk figyelembe venni. A módszer további hátránya, hogy a mikrotiter lemezen legtöbbször nem az egyes szerek minimális gátló koncentrációja szerepel, azaz a MIC érték általában két hígítási érték közé esik, amit így FIC index számolásánál nem lehet pontosan figyelembe venni. Mindezek következtében a FICI értéke különböző tanulmányok esetében eltérő lehet.

- **RSM** (*fully parametric response surface model*) Greco és mtsai. (1995)

Greco és munkatársai által javasolt módszer szerint az interakciós koefficiens α értéket az alábbi összefüggés alapján számítják ki.

$$1 = \frac{D_A}{IC_{50,A}\left(\frac{E}{E_{max}-E}\right)^{\frac{1}{m_A}}} + \frac{D_B}{IC_{50,B}\left(\frac{E}{E_{max}-E}\right)^{\frac{1}{m_B}}} + \alpha\frac{D_A D_B}{IC_{50,A}\,IC_{50,B}\left(\frac{E}{E_{max}-E}\right)^{0,5\left(\frac{1}{m_A}+\frac{1}{m_B}\right)}}$$

ahol:

D_A, D_B	A és B vegyület minimális gátló koncentrációja (MIC), a vegyületeket egyedül alkalmazva gátlószerként.
IC_{50}	Az a koncentráció, amellyel 50%-os növekedésgátlás érhető el a gátlószer hiányában mért értékhez képest.
E	Az adott koncentrációnál mért optikai denzitás.
E_{max}	A gátlószer hozzáadása nélkül kapott optikai denzitás (kontroll)

m_A, m_B	A és B szer koncentrációjának függvényében ábrázolt optikai denzitás értékek görbéjéhez illesztett egyenes meredeksége.

A kapott α érték alapján:

$\alpha > 0$ **Szinergizmus**

$\alpha < 0$ **Antagonizmus**

$\alpha = 0$ **Nincs kölcsönhatás**

A módszer hátránya ebben az esetben is az, hogy előfordulhat, hogy az 50%-os gátlást eredményező koncentrációt a mikrotiter lapon nem alkalmazzák. Ezenkívül a módszer bonyolult regresszióanalízisen és matematikai modellezésen alapul, melynek rutinszerű alkalmazása szoftverek hiányában, a klinikai gyakorlatban nem megoldott. A módszer előnyének is számíthat, hogy sok változót vesz figyelembe, azonban az eredmény reprodukálhatósága sok változótól függ, ami a standardizálást nehézkessé teszi.

A két számítási mód közül legtöbbször ezért a FIC értéken alapulót alkalmazzák.

- **Abott-formula:**

A gyakorlatban legegyszerűbben alkalmazható számítási módszer az Abott-képlet (1925) alkalmazása:

$$Ie = D_A + D_B - (D_A x D_B/100)$$

ahol:

D_A; D_B	A és B vegyület adott koncentrációja mellett elért gátlás mértéke a vegyületeket egyedül alkalmazva gátlószerként.
Ie	A gátlószerek önmagukban előidézett gátlása alapján várt együttes gátló hatás

A mért gátlási értékeket (I_0) a számolt értékre vonatkoztatva az együtthatást a következők alapján jellemezhetjük.

$$IR = I_0/Ie$$

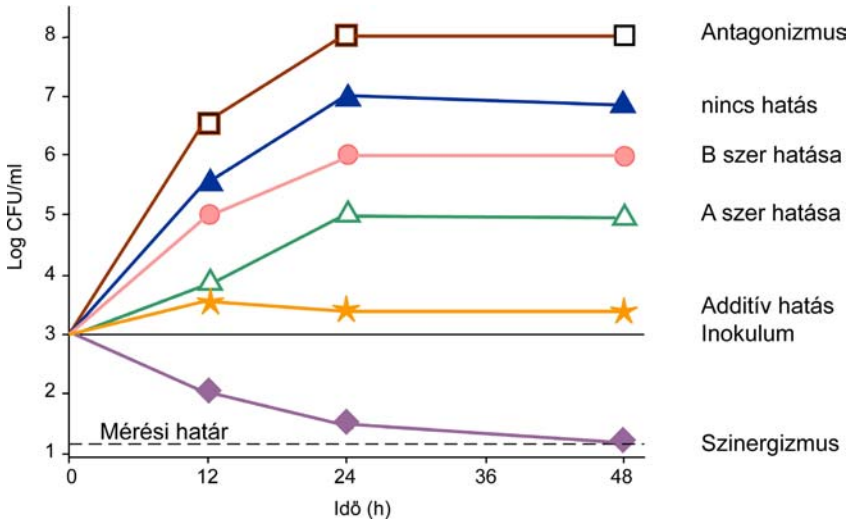
ha IR értéke:

> 1,5	**szinergizmus**
0,5-1,5	**additivizmus**
0,5>	**antagonizmus**

Ennek a számítási módszernek az előnye, hogy valamennyi alkalmazott koncentráció esetében és minden kombinációban kiszámolható, akkor is, ha a pontos MIC értékhez tartozó koncentrációt a leoltás során nem alkalmaztuk.

2. Sejtpusztulási kinetika vizsgálata (*Time-kill method*)

A módszer lényege, hogy különböző koncentrációkban alkalmazva a gombaellenes szert, az adott gombát általában 5×10^5 sejt/ml koncentrációban leoltva inkubálják, majd különböző időpontokban mintát véve a kultúrából azt táptalaj felszínére oltják, és a kifejlődött telepeket számolják (CFU/ml, *colony forming unit*).



5. Ábra: Sejtpusztulási görbék alakulása az alkalmazott szerek kölcsönhatásának vizsgálatában (Mukherjee és mtsai. 2005 nyomán)

Több szer szinergizmusa esetén az inkubációs idő növelésével a képződött telepek száma csökken (5. Ábra). A módszer azonban csak élesztőgombákra alkalmazható megbízhatóan, bár nagy előnye, hogy a gombaellenes szerek farmakodinamikai sajátságaira is következtetni lehet az eredményekből.

3. E-teszt (*Epsilometer test*)

Az AB Biodisk (Solna, Svédország) által gyártott tesztcsík az adott gombaellenes szer különböző koncentrációjú oldatával van átitatva, és egy ennek megfelelő skálával van ellátva. A csíkot a gombával leoltott táplemez felületére helyezik és a gyártó utasításainak megfelelő hőmérsékleten megadott ideig inkubálják. A tesztcsík körül megfigyelhető egy elnyújtott ellipszis alakú gátlási zóna, melynek a csík skálájával való metszéspontja határozza meg a MIC értéket. Különböző szerek kölcsönhatásának vizsgálatánál egy második szer adott koncentrációját hozzák létre a táptalajban, és a kölcsönhatás fajtáját a MIC értékhez viszonyított hígítás léptéke alapján állapítják meg:

Szinergizmus: a MIC érték a skálán 3 hígítási lépcsővel kisebb koncentrációnál jelentkezik

Additív hatás: a MIC érték 2-3 hígítási értékkel csökken

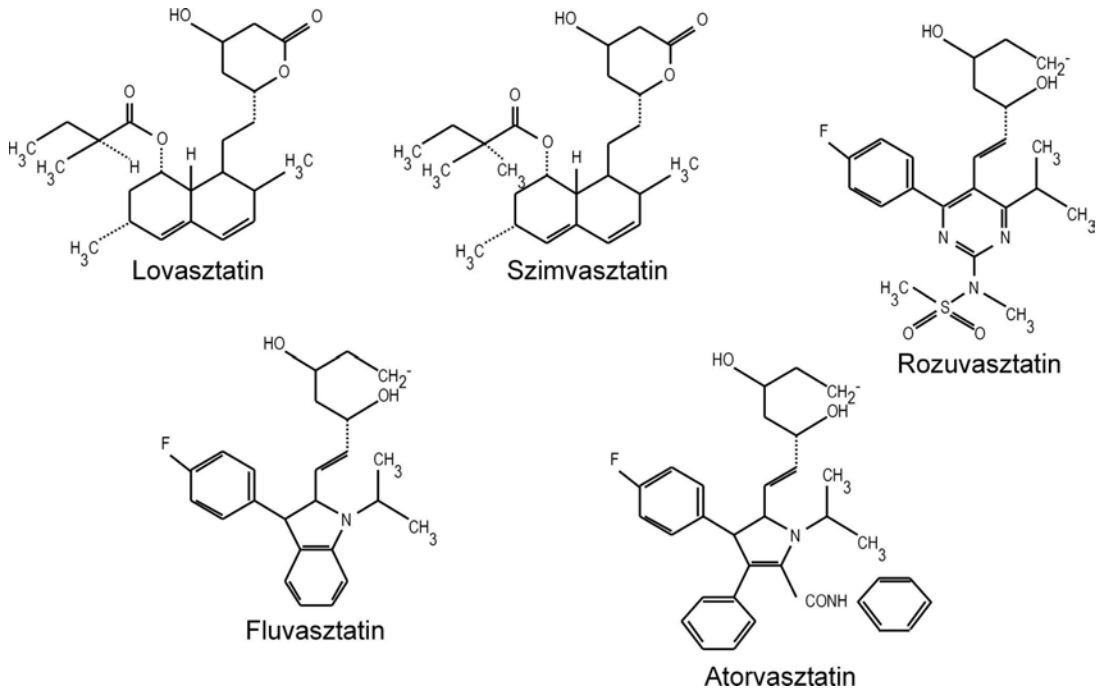
Nincs kölcsönhatás: a MIC érték kevesebb mint 2 hígítási lépcsővel csökken

Antagonizmus: a MIC érték több mint 3 hígítási értékkel növekszik

Sztatinvegyületek szerkezete és hatása

A 3-hidroxi-3-metilglutaril koenzim A reduktáz kompetitív inhibitorai a sztatinok. Az első természetes eredetű sztatinok, a *Penicillium citrinum* általt termelt mevasztatin (kompaktin) (Endo és mtsai. 1977) és egy *Aspergillus terreus* törzs által termelt lovasztatin volt (Monaghan és mtsai. 1979). HMG-KoA reduktáz gátló hatásuk miatt a vér

koleszterinszintjét csökkentik, így a sztatinok máig elterjedt gyógyszerek a szív és érrendszeri megbetegedések kezelésében. Napjainkban több szintetikus formát állítanak elő, melyek nagyobb affinitással kötődnek az enzim katalitikus helyéhez, kevesebb mellékhatással rendelkeznek, így hatékonyabban alkalmazhatók a gyógyászatban (6. Ábra). A sztatinvegyületek közül jelenleg is használják a lovasztatint (Mevacor), szimvasztatint (Vasilip), atorvasztatint (Atorvox), rozuvasztatint (Crestor) és a fluvasztatint (Lescol).



6. Ábra. Néhány gyógyszerként alkalmazott sztatinvegyület kémiai szerkezete.

A sztatinok HMG-szerű csoporttal rendelkeznek, és már nanomoláris koncentrációban kötődnek a HMG-KoA reduktázhoz kiszorítva az enzim természetes szubsztrátját a HMG-KoA-t, mely csak mikromoláris koncentrációban kötődik az enzimhez (István és Deisenhofer 2001). Bár elsősorban a vér koleszterinszintjének csökkentésében alkalmazzák, az izoprénszármazékok szintézisének gátlása révén több sejtfolyamat lejátszódását is befolyásolják. Liao és Laufs (2005) ezeket a sztatinok koleszterol független vagy pleiotróp

hatásaiként gyűjtötte össze. A pleiotróp hatások közé tartozik az endotélsejtek nitrogén-monoxid szintázának (eNOS) aktiválása, az endotelin-1 gátlásán keresztül érfal relaxáció kiváltása, a vérlemezkék aggregációjának és a vér fibrinogénkoncentrációjának csökkentése, ezen kívül a szabadgyökök keletkezésének és a metalloproteinázok szintézisének gátlása, valamint az endotél progenitor sejtek proliferációjának serkentése. Ezen folyamatok összessége a koleszterinszint csökkentése mellett tehát segít a keringés fenntartásában és a szív- és érrendszer regenerálásában. A sztatinok sejtekre gyakorolt hatása a kis GTP kötő fehérjék a Ras és Rho GTP-ázok (RhoA, Cdc42, Rac1) poszttranszlációs módosításán alapul. A Ras fehérjék sejtmembránon keresztül történő átszállításához a fehérje farnezilációja, a Rho fehérjék esetében pedig a geranilgeranilációja szükséges az endotélsejtekben (Yosida és mtsai. 1991). Az ily módon aktívvá váló fehérjék ezután számos fehérje működését befolyásolják (Van Aelst és D'Souza-Schorey 1997, Hall 1998). Sztatinok által kiváltott apoptotikus hatást mutattak ki rákos sejtvonalakban: mezotelióma (Rubins és mtsai. 1998), akut mieloid leukémia (Van de Donk és mtsai 2002), és glióma (Jones és mtsai 1994) sejtekben is.

Az utóbbi tíz évben néhány publikáció beszámolt a sztatinok és valamely antifungális szer együttes alkalmazása során tapasztalt *in vitro* szinergizmusról. Chin és mtsai. (1997) fluvasztatin szinergizmusát vizsgálták két, az azolok csoportjába tartozó gombaellenes szer, a flukonazol és itrakonazol esetében. Kísérleteikben *Candida albicans* és *Cryptococcus neoformans* gombák növekedésének gátlására alkalmazták a vegyületeket. Chamilos és mtsai. (2006) a járomspórás gombák körébe tartozó klinikai izolátumokat vizsgáltak. Megállapították, hogy a lovasztatin *in vitro* szinergizmust mutat vorikonazollal. Kísérleteiket *Rhizopus oryzae, Rhizopus homotallicus, Mucor circinelloides* és *Cunninghamella bertholletiae* fajokkal végezték el. *Drosophila melanogaster* modellben a rovarokat mesterségesen fertőzve *M. circinelloides* és *R. oryzae* egyes izolátumaival azt tapasztalták,

hogy a lovasztatinnal előzőleg kezelt rovarok halálozási rátája 20%-kal csökkent, amikor a lovasztatinos kezelést követően *Mucor* fertőzést indukáltak. *R. oryzae*-vel történt fertőzés során ilyen eltérést nem tapasztaltak, lovasztatin alkalmazásával a rovarok túlélését nem sikerült növelni.

Sztatinvegyületek és gombaellenes szerek metabolizmusa

A sztatinok más gyógyszerekkel kombinációban történő alkalmazhatóságát nagymértékben korlátozzák farmakodinamikai tulajdonságaik. Sztatinok együttes szedése szteroid hormonokkal, kalciumcsatorna-blokkolókkal, paracetamol tartalmú készítményekkel a humán gyógyászatban ellenjavallt, súlyos mellékhatásokat, izomelhalást (*rhabdomyolysis*) okozhat. Ennek oka, hogy mindezek a drogok a vérből a májba kerülve metabolizálódnak, és ott a máj citokróm izoenzimeit gátolják. A citokróm P450 fehérjék csoportja nagy diverzitást mutat, számos kémiai vegyület megkötésére képesek, ám szubsztrátspecifitásuk sokszor átfedi egymást. Az emlősök CYP fehérjéi 26 alcsaládba sorolhatók, melyek közül a CYP2C, CYP2D és CYP3A4 felelős a legtöbb gyógyászatban használt kémiai vegyület metabolizmusáért (Herman 1999). A sztatinok metabolizmusuk alapján három fő csoportba oszthatók (Christians és mtsai. 1998): a lovasztatin, szimvasztatin és az atorvasztatin a CYP3A enzim szubsztrátjai, ezeknek a vegyületeknek több mint 90%-a a májban metabolizálódik. Másik csoportba sorolható a fluvasztatin, amely elsősorban a CYP2C9 szubsztrátja, farmakokinetikáját befolyásolják ezen enzimrendszer gátlószerei és szubsztrátjai (Guengerich 1995; Rendic és Di Carlo 1997). Ennek a vegyületnek toxikus mellékhatásait más CYP inhibitorokkal alkalmazva nem tapasztalták (Garnett 1994, Amorosa 1994). A harmadik csoportba sorolható pravasztatin csak kismértékben metabolizálódik a CYP3A enzimen keresztül, nagyobb részben CYP enzimektől függetlenül metabolizálódik, így a CYP3A enzim gátlása nem okoz emelkedést a plazma pravasztatin szintjében (Neuvonen és

mtsai. 1998), izomkárosító hatást eddig nem detektáltak. A sztatinok által kiváltott izombetegségek oka a HMG-KoA reduktáz dózisfüggő gátlásának a következménye (Smith és mtsai. 1999, Nakai és mtsai. 1997, Pierce és mtsai 1990). A CYP fehérjékhez kötődő szubsztrát molekulák a sztatinok feldúsulását okozhatják a vérben, mely az említett izomkárosodáshoz vezet. A szérum megnövekedett sztatinszintje azonban nem járul hozzá a lipidcsökkentő hatás növeléséhez (Lennernäs és Fager 1997). A különböző sztatinvegyületek eltérő toxicitása részben az eltérő lipofilitással is magyarázható. Az izomra nagyságrendekkel kisebb toxikus hatást mutató hidrofil pravasztatin az izomsejt membránján jóval kisebb mértékben képes átjutni, mint a hidrofób jellegű lovasztatin, vagy a szimvasztatin (Sirtori 1993). Az egyes sztatinok legfontosabb farmakodinamikai tulajdonságait a 2. táblázat foglalja össze (Christians és mtsai. 1998)

2. Táblázat: A sztatinvegyületek farmakodinamikai tulajdonságai

Tulajdonság	Lovasztatin	Szimvasztatin	Pravasztatin	Fluvasztatin	Atorvasztatin
Prodrog	van	van	nincs	nincs	nincs
vér-agy-gát	lakton forma	lakton forma	nem	nem	?
lipofilicitás	lipofil	lipofil	hidrofil	hidrofil	lipofil
dózis (mg/nap)	20-8	10-40	20-4	20-80	2,5-80
Felszívódás (%)	30	60-85	35	98	?
féléletidő (óra)	2,5-15	1,9-15,6	1,3-2,6	0,5-3,1	14
kiválasztás májon keresztül (felszívódó dózis %-a)	62-69	>78	46	68	?
kiürülés vesén keresztül (%)	30	13	20-60	6	<2
foszfoglikoprotein szubsztrát	igen	?	igen	igen	?
CYP szubsztrát	CYP3A	CYP3A	nem	CYP2C9	CYP3A
metabolitok is csökkentik a vér lipidszintjét	igen	igen	nem	nem	igen
szervezetből kikerülő forma	lebontási termék	lebontási termék	változatlanul	lebontási termék	?

Olbricht és mtsai. (1997) a lovasztatin szérumszintjének hússzoros növekedését tapasztalták, ha a lovasztatint az immunszupresszív terápiában alkalmazott ciklosporinnal együtt alkalmazták, míg Kantola és munkatársai (1997) tízszeres szérumszintnövekedést figyeltek meg, ha a lovasztatint itrakonazollal együtt alkalmazták. Több vizsgálat alapján feltételezték, hogy a lovasztatin, szimvasztatin, atorvasztatin és cerivasztatin hasonló mellékhatásai a CYP3A fehérje gátlásához köthetők. A cerivasztatin alkalmazásakor gyakran lépett fel súlyos izomelhaláshoz vezető mellékhatás, ezért a sztatinoknak ezt a képviselőjét 2001-ben kivonták a forgalomból. Dimitroulakos és Yeger (1996) kimutatták, hogy a lovasztatin a foszfoglikoprotein szubsztrátja lehet, így annak gátlása csökkenti a lovasztatin epecsatornákon keresztül zajló kiürülését, ezáltal növeli a szérumszintjét. A foszfoglikoprotein drog efflux pumpaként működik, és egyes rákos sejtek multidrog-rezisztenciájáért felelős (Gottesman és Pastan 1993). Ezek alapján azt feltételezik, hogy a közös metabolikus úton kívül más tényezők is szerepet játszhatnak a káros mellékhatások kialakulásában. Ezt támasztják alá Regazzi és munkatársainak (1993) vizsgálatai, akik a pravasztatint ciklosporin A-val együtt alkalmazva a pravasztatin vérplazmában mért koncentrációjának 5-23-szorosát tapasztalták, bár a pravasztatin nem szubsztrátja a CYP3A-nak. Fischer és mtsai. (1999) a fluvasztatin metabolizmusát vizsgálva megállapították, hogy annak lebontásakor legtöbbször keletkező 5-hidroxi-fluvasztatin eliminációjáért elsősorban a CYP2C9 molekula a felelős, míg más úton történő lebontáskor keletkező származékai a CYP2C9, CYP3A4 és CYP2C8 molekulán keresztül ürülnek ki a vérből. A sztatinvegyületek közül ezidáig a fluvasztatin rendelkezett a legkevesebb drogkölcsönhatásból eredő mellékhatással. Appel és Dingemanse (1996) fluvasztatin esetében nem tapasztaltak klinikai hatást sem más CYP2C9 gátlókkal; a cukorbetegek kezelésében használt tolbutamiddal és gliburiddal, az antikoagulánsként használt warfarinnal, sem a CYP3A gátlószereivel; itrakonazollal és ciklosporin A-val együttesen alkalmazva.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Felhasznált táptalajok

LB-táptalaj (pH 7)	1% NaCl 1% tripton 0,5% élesztőkivonat 1,5% agar
LB+maltóz tápoldat	1% NaCl 1% tripton 0,5% élesztőkivonat 0,2% maltóz 10 mM $MgSO_4$ (pH 7,0)
LB-fedőagar	1% NaCl 1% tripton 0,5% élesztőkivonat 0,7% agaróz 10 mM $MgSO_4$ (pH 7)
Élesztőkivonat-glükóz tápoldat (YEG)	1% glükóz 0,5% élesztőkivonat 1% KH_2PO_4
YNB minimál táptalaj	1% glükóz 0,05%YNB (Yeast Nitrogen Base, Difco) 0,15% $(NH_4)_2SO_4$ 0,15% Na-L-glutaminát (0,05% uracil és/vagy leucin az auxotrófia komplementálásához)
SM puffer	0,58% NaCl 0,2% $MgSO_4 \times 7\ H_2O$ 0,01% zselatin 50 mM Tris/HCl (pH 7,5)
Fág puffer	10 mM $MgSO_4$ 100 mM NaCl 20 mM Tris/HCl (pH 7,5)
20×SSC:	3 M NaCl 300 mM nátrium-citrát (pH 7,0)

Hibridizációs pufferek:

Hibridizációs puffer:	5 × SSC 0,1% N-lauroilsarcosin 0,02% SDS 1% blokkoló reagens (DIG DNA labeling and detection kit; Roche)
1. detektálási puffer (10x-es)	1,5 M NaCl 1 M maleinsav (pH 7,5)
2. detektálási puffer	1,4% blokkoló reagens 1x-es töménységű 1. detektálási pufferben
3. detektálási puffer	0,1 M NaCl 50 mM $MgCl_2$ 0,1 M Tris-HCl (pH 9,5)
LETS puffer	0,1 M LiCl 10 mM EDTA 10 mM Tris/HCl (pH 8,0) 0,5 % SDS

Alkalmazott törzsek és plazmidok

A génklónozási kísérleteket a *Rhizomucor miehei* NRRL 5901 törzsével végeztük. A reprezentatív génkönyvtár elkészítéséhez a λ FIX II fágot (Stratagene) használtuk fel. A fágfertőzés céljára a XL1-Blue MRA (P2) *E. coli* törzset (Stratagene), míg a szubklónozási kísérletek transzformációiban *E. coli* DH5α és TOP10F$^-$ törzseket alkalmaztunk. Ezek a kísérletek a *pBluescript SK+* plazmid segítségével folytak. Az egyéb vizsgálatainkban használt törzseket a 3. Táblázat tartalmazza.

3. Táblázat: A kísérletekben vizsgált gombatörzsek

Azonosító szám	Fajnév	Törzsgyűjtemény kód	Törzs eredete	Szaporodási típus
R2A	*R. pusillus*	NRRL 2543	állati mikózis, Anglia	homotallikus
R4	*R. pusillus*	A-23448	ismeretlen	+
R5	*R. pusillus*	A-23504	ismeretlen	-
R6	*R. miehei*	NRRL 3169	ismeretlen, Kalifornia, USA	homotallikus
R7	*R. pusillus*	NRRL 3310	ismeretlen, India	homotallikus
R8	*R. miehei*	NRRL 5282	borsmenta komposzt, India	homotallikus

R9	*R. miehei*	CBS 370.71	köpet, Hollandia	homotallikus
R10	*R. miehei*	NRRL 5284	rothadó alma, USA	homotallikus
R11	*R. miehei*	NRRL 5901	állati mikózis (tehén, placenta), Dakota, USA	homotallikus
R12	*R. miehei*	NRRL 6303	ismeretlen	homotallikus
R13	*R. pusillus*	A-13100	ismeretlen	-
R14	*R. miehei*	A-18359	ismeretlen	homotallikus
R15	*R. miehei*	CBS 360.92	humán mikózis, Ausztrália	homotallikus
R16	*R. pusillus*	ETH-M4920	trachea váladék, Svájc	ismeretlen
R17	*R. pusillus*	ETH-M4918	komposzt, Svájc	homotallikus
R18	*R. pusillus*	WRL CN(M)231	állati mikózis, Anglia	-
R19	*R. pusillus*	FRR 2490	ismeretlen, Ausztrália	+
R20	*R. pusillus*	IBP M.p./1	ismeretlen, Lengyelország	+
R21	*R. pusillus*	FRR 1652; NRRL 6304	ismeretlen	+
R22	*R. pusillus*	A-19911	gabona	ismeretlen
R23	*R. pusillus*	NRRL 6399	denevér ürülék, India	homotallikus
R24	*R. pusillus*	NRRL 6401	ismeretlen, Kalifornia, USA	ismeretlen
R25	*R. pusillus*	NRRL 3638; NRRL 3639; ATCC 46342	víztartály, Wisconsin, USA	+
R26	*R. pusillus*	CBS 354.68; NRRL 3470; ATCC 16459	kukorica	ismeretlen
R27	*R. pusillus*	CBS 184.67	levélkomposzt, Kalifornia, USA	-
R29	*R. pusillus*	CBS 183.67	lótrágya, Nevada, USA	+
Mw	*Mortierella wolfii*	NRRL 28640	állati mikózis (borjú, tüdő), Új-Zéland	ismeretlen
Rh59	*Rhizopus oryzae*	CBS 109939	humán mikózis (bőr), Kanada	ismeretlen
Rh63	*Rhizopus microsporus var. rhizopodiformis*	CBS 102277	humán mikózis, (rhinocerebrális)	ismeretlen
Ac	*Absidia corymbifera*	SZMC 2010	ismeretlen	ismeretlen
Sr	*Syncephalastrum racemosum*	SZMC 2011	ismeretlen	ismeretlen
P3	*Xanthophyllomyces dendrorhous*	CBS 5908	*Alnus japonica*, Japán	

ATCC: American Type Culture Collection
CBS: Centraalbureau voor Schimmelcultures
NRRL: Agricultural Research Service Culture Collection
FRR: CSIRO Food Research Culture Collection
WRLCN: Welcome Bacterial Collection

Módszerek

Gomba genomi DNS tisztítása

A YEG tápoldatban nevelt (200 rpm, 2 nap, 37°C) gombatörzs micéliumát szűrtük, majd desztillált vízzel átmostuk. A micéliumot fagyasztást követően (-20°C) folyékony nitrogénben, dörzsmozsárban eldörzsöltük. A micéliumhoz LETS puffert adtunk (2,5 ml/1 g micélium), majd 65°C-on 15 percig inkubáltuk, 5 percenként üvegbottal óvatosan megkevertük. Azonos térfogatú PCI (fenol:kloroform:izoamilalkohol; 25:24:1) hozzáadását követően centrifugáltuk (15 000 rpm, 20 perc). A felülúszóhoz 2,5 térfogat etanolt adtunk. Egyórás -70°C-on történő inkubálást követően centrifugáltunk (15 000 rpm, 25 perc), majd a felülúszó eltávolítása után a DNS csapadékot fagyasztva szárítottuk. Ezt követően 0,5 ml vízben oldottuk és 0,5 ml PCI hozzáadása után centrifugáltuk (15 000 rpm, 15 perc), majd a felülúszóhoz 0,5 térfogat CI (kloroform:izoamilalkohol; 24:1) elegyet adtunk. A mintákat ezután ismét centrifugáltuk (15000 rpm, 5 perc). Ezt a lépést megismételtük, majd a felülúszóbhoz 2,5 térfogat 95% etanolt adtunk (-70°C, 1 óra). Centrifugálást követően (15 000 rpm, 15 perc) a DNS csapadékot 70%-os etanollal mostuk, fagyasztva szárítottuk, majd 100 μl desztillált vízben oldottuk.

A *Rhizomucor* génkönyvtár amplifikálása

Az *E. coli* XL1-Blue MRA (P2) rázatott tenyészetet (200 rpm, 37°C) OD_{600nm} = 0,6 eléréséig neveltük LB-maltóz tápoldatban. A centrifugálással (4000 rpm, 10 perc) ülepített sejteket 10 mM Mg_2SO_4-ban vettük fel, majd a fággal való inkubálást követően (30 perc, 37°C) LB fedőagarózzal (42°C) elkeverve LB alaptáptalaj felszínére öntöttük. A 7-8 óra után megfelelő méretűvé váló plakkokból a fágrészecskéket SM pufferrel mostuk ki. A

fágszuszpenziót 5% (v/v) kloroformmal kezeltük, centrifugáltuk majd a felülúszóhoz 3% (v/v) kloroformot adva 4°C-on tároltuk.

HMG-KoA specifikus próba készítése

A PCR reakcióelegy
2 µl DNS (4 µg)
2-2 µl dNTP (2,5 mM)
5-5 µl primer (10 µM)
5 µl $MgCl_2$ (200 µM)
5 µl Taq puffer
0,5 µl Taq polimeráz (2,5 U)
17,5 µl desztillált víz
a mintákra 45 µl steril ásványi olajat rétegeztünk

A PCR reakció körülményei

1 ciklus	2 perc/95°C
35 ciklus	0,5 perc/95°C
	0,5 perc/45°C
	1 perc/72°C
1 ciklus	5 perc/72°C

A felhasznált HMG-KoA reduktáz -specifikus primerek (Corrochano és Avalos 1992)

HMG1F 5' - cgggatcciatggciaciacigargg - 3'
(Pro-Met-Ala-Thr-Thr-Glu-Gly)

HMG2R 5' - cgggatcatrttcaticccat - 3'
(Met-Gly-Met-Asn-Met)

i: A, C, G, T

r: A, G

A λ Fix II fágban elkészített *Rhizomucor* génkönyvtár szűrése

A Rhizomucor génkönyvtár titrálása

Az amplifikált génkönyvtárból 15 µl-t, illetve ebből 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4} hígítási lépcsők azonos térfogatait 150-150 µl XL1-Blue MRA (P2) baktériummal inkubáltunk (30 perc, 37°C), majd fedőagarózzal elkeverve alaptáptalajra öntöttük.

A Rhizomucor génkönyvtár szűrése

A génkönyvtárból a leírt módon csészénként 300-400 plakk megjelenését biztosító mennyiséggel dolgoztunk. A plakkok megjelenése után (7-8 óra) a csészéket 2 órára 4°C-ra helyeztük. Ezt követően a felszínre steril hibridizációs membránt (Amersham, Hybond N+) helyeztünk. A membránokat levegőn 10-20 másodpercig szárítottuk, majd 2 percig 0,5 M NaOH és 1,5 M NaCl keverékében; 5 percig 0,2 M TRIS (pH 7,5) és 2 × SSC keverékében; végül 30 másodpercig 2 × SSC-ben mostuk. A membránokat levegőn szárítottuk, majd 30 másodpercig ultraibolya (UV) fénnyel kezeltük.

Hibridizációs körülmények

A hibridizációs membránt (Amersham, Hybond N+) egy órán át, 68°C-on hibridizációs pufferrel előhibridizáltuk, majd 2,5 ml hibridizációs pufferhez adott 15 µl jelölt DNS próbával hibridizáltuk (12 óra, 68°C). A próba jelöléséhez minden esetben a nem radioaktív digoxigenines jelölést (DIG DNA labeling and dection kit; Roche) alkalmaztuk a gyártó utasításainak megfelelően. A hibridizációs kísérleteket megelőzően a próba DNS egyszálúvá tételét 10 perc 100°C, 10 perc 4°C és 5 perc -20°C-on történő inkubálással biztosítottuk.

A hibridizációt követően a membránt kétszer öt percig 2 × SSC, 0,1% SDS oldattal, majd kétszer tizenöt percig 0,1 × SSC, 0,1% SDS oldattal mostuk 68°C-os hőmérsékleten. Ezt követően az 1. detektáló pufferrel egy percig, majd a 2. detektáló pufferrel 30 percig, majd a 2. pufferhez adott 4 µl antitest konjugátummal újabb 30 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten. Kétszer tizenöt perces mosást (1. puffer, szobahőmérsékleten) követően a színreakcióhoz 3. detektálási pufferhez adott 200 µl előhívó reagenst (NBT+DNF; nitroblue tetrazolium+N,N dimetil-formamid) használtunk a gyártó utasításai szerint.

Southern blot

Az agaróz gélelektroforézist követően a géleket 0,125 M HCl-ban 10 percig mostuk, majd desztillált vizes öblítést követően denaturáló (1,5 M NaCl, 0,5 mM NaOH) oldatba helyeztük. Húsz perces denaturáló kezelést követően a gélt 20 percre neutralizáló (1,5 M NaCl, 0,5 M Trisz-HCl pH 7,5) oldatba tettük. Az így előkezelt gélt 20 × SSC oldat segítségével membránra (Amersham, Hybond N+) blottoltuk. A DNS szakaszokat a membránra UV (1 perc) segítségével rögzítettük. A homológ próbával történő hibridizációt, valamint a jelek detektálását az előzőekben ismertetett módon hajtottuk végre.

A fág DNS tisztítása

Fágok szaporítása baktériumtenyészetben

Öt ml LB+maltóz tápoldatban *E. coli* MRA(P_2) sejteket OD_{600nm} = 0,4-0,5 eléréséig neveltünk 37°C-on, rázatott tenyészetben. Ezután a sejteket centrifugáltuk (4000 rpm, 8 perc), majd 0,4 térfogat 10 mM $MgSO_4$ oldatban felvettük. Ebből megfelelő mennyiséget az SM pufferben 4°C-on tárolt fág megfelelő hígításával 37°C-on 30 percig inkubáltuk. A mintákat ezután 50 ml 37°C-ra előmelegített LB+maltóz tápoldathoz adtuk, majd 6-8 órán keresztül rázattuk (200 rpm, 37°C). A baktériumtenyészet feltisztulását követően 0,01 térfogat kloroformot adtunk és 4°C-on tároltuk.

A fág DNS tisztítása

A fágfertőzés után lizált baktérium tenyészetet (8000 rpm, 10 perc, 4°C) centrifugáltuk, majd a felülúszóthoz 1 µg/ml-es végkoncentrációban RNáz-t és DNáz-t adva 30 percig 37°C-on inkubáltunk. A lizátumhoz ezután 5,8%-os végkoncentrációjú NaCl-ot adva 1 órán át 4°C-on, majd 9,3% PEG_{8000}-et (polietilén-glikolt) adva újabb 1 órán át inkubáltuk 4°C-on. Centrifugálást (10 000 rpm, 20 perc, 4°C) követően a csapadékot 10 ml

(100 ml lizátumra számolva) fág pufferben oldottuk, majd ehhez 100 µl 10% SDS-t és 100 µl 0,5 M EDTA-t (pH 8,0) adtunk, majd 68°C-on 15 percig inkubáltuk. Az elegyhez azonos térfogatú PCI elegyet adtunk, majd centrifugáltuk (12 000 rpm, 5 perc). A PCI kezelést megismételtük. A felső fázishoz azonos térfogatban kloroform:izoamilalkoholt (1:1) adtunk, majd ismét centrifugáltuk (12 000 rpm, 5perc). A felső fázishoz azonos térfogatú 95%-os etanolt adtunk és -70°C-on 20 percig inkubáltuk. Centrifugálást követően (12 000 rpm, 10 perc, 4°C), a csapadékot 70%-os etanollal mostuk, vákuumban szárítottuk és 200 µl desztillált vízben feloldottuk.

DNS szakaszok izolálása és klónozása

DNS tisztítás agaróz gélből

A DNS-t tartalmazó gélrészletet steril szikével vágtuk ki a 0,8% agarózt tartalmazó gélből. A kivágott géldarabból a DNS-t a Fermentas DNA Purification Kit segítségével nyertük ki, majd a továbbiakban ligálási reakciókban használtuk fel.

Ligálás szubklónozási kísérletekben

5 U T4 DNS ligáz enzim (Fermentas MBI)
1 µl T4 DNS ligáz puffer (Fermentas MBI)
1 µl pBluescript SK+ plazmid
7 µl DNS fragment

A ligálást 16 órán keresztül 18°C-on végeztük, majd 10 perces, 65°C-os hőkezeléssel állítottuk le.

Kompetens sejtek készítése

LB tápoldatban nevelt 14 órás *E. coli* tenyészet 3 ml-ét 30 ml LB tápoldatba oltottuk és OD_{600nm} = 0,6 érték eléréséig neveltük. A tenyészet 15-15 ml-ét centrifugáltuk (8000rpm, 5perc, 4°C), majd a sejteket 15-15 ml 100 mM-os, 4°C-os $CaCl_2$ oldatban szuszpendáltuk.

Ismét centrifugáltuk (8000 rpm, 5perc, 4°C), majd a sejteket ismét 15-15ml 100 mM-os, 4°C-os $CaCl_2$ oldatban felszuszpendáltuk, két egyenlő részre osztottuk, majd 1 órás inkubálást követően (4°C) újra centrifugáltuk (8000 rpm, 5 perc). 0,375 ml 100 mM-os $CaCl_2$ és 20% glicerin oldatban történő felszuszpendálás után -70°C-on fagyasztva tároltuk.

Baktériumsejtek transzformálása

Fagyasztva tárolt (–70°C) 200 μl térfogatú kompetens sejtet jégen felolvasztottunk, majd 5 μl ligátumot (plazmidot) adtunk hozzá. Inkubálás után (30 perc, 4°C) 2 percig 42°C-on tartottuk (hősokk) majd 0,5 ml LB hozzáadását követően 37°C-on 1 órán keresztül rázattuk. A sejteket 4 μl IPTG (200 mg/ml) és 40 μl X-gal-t (20 mg/ml) tartalmazó ampicillin tartalmú (100 μg/ml) LB táptalajra szélesztettük. (A felhasznált *E. coli* törzs, DH5α, a kromoszómán hordozza a β-galaktozidáz enzim C-terminálisát kódoló részt, amely önmagában funkcióképtelen. A transzformációhoz használt pBluescript vektor (az antibiotikumrezisztencia gén mellett) a fehérje N-terminális, önmagában szintén működésképtelen α-peptidjét kódolja. E két protein azonban az interallélikus komplementációhoz hasonlóan funkcióképes fehérje komplexet alkot a sejtben, aminek következtében a baktériumsejtek IPTG induktor és X-gal szubsztrát jelenlétében kékek lesznek. Az α-peptidet kódoló génszakasz klónozóhelyeire beépült DNS szakasz azonban inaktiválja azt, így az ilyen plazmidot hordozó baktériumsejtek IPTG és X-gal jelenlétében is fehérek maradnak.

Plazmid DNS tisztítása

Az ampicillin tartalmú (7 μg/ml) LB tápoldatban nevelt transzformáns sejteket centrifugálással (12000 rpm, 2 perc) kiülepítettük, majd a tápoldat eltávolítása után a sejteket 150 μl SolI (5mM glükóz, 25 mM Tris pH 8, 10mM EDTA pH 8, RN-áz 1mg/ml) oldatban

szuszpendáltuk. A mintákhoz 200 µl SolII (0,2 M NaOH, 1% SDS) oldatot adtunk, majd 5 percig jégen inkubáltuk. A sejtek szétesését követően a fehérjék 150 µl 3 M Na-acetát pH 5,2 oldat hozzáadásával kicsapódnak (15 perc, 4°C), így centrifugálással ülepíthetők (12000 rpm, 10 perc). A minták felülúszójából a plazmid DNS alkoholos tisztítást és szárítást követően vízben oldható.

RNS tisztítás és reverz transzkripció

A fagyott (-20°C) micélium 3 grammját folyékony nitrogénben eldörzsöltük, majd 6 ml lízis oldattal (4 M guanidin-izotiocianát; 30 mM Na-acetát pH 5,2; 1 M β-merkaptoetanol) összekevertük és 24 órán keresztül 4°C-on tartottuk. A sejttörmeléket centrifugálással (10 000 rpm, 30 perc, 4°C) kiülepítettük, majd a felülúszót egy ultracentrifugacsőben 3,5 ml CsCl oldatra (5,7 M CsCl; 2 mM EDTA) rétegeztük. A mintákat 20 órán keresztül szögrotorban ultracentrifugáltuk (25 000 rpm, 20°C). A felülúszó eltávolítása után az RNS-t 200 µl 65°C-os DEPC kezelt vízbe visszaoldottuk, majd azonos térfogatú kloroform:butanol 4:1 arányú elegyet hozzáadva és centrifugálva (3000 rpm, 2 perc) tisztítottuk. A tisztítási lépést háromszor megismételtük. Az RNS-t tartalmazó felülúszót végül 96%-os etanolos kicsapás után felhasználásig -70°C-on tároltuk.

Reverz transzkripció PCR

Az RT-PCR kivitelezéséhez az eszközöket kétszer egymás után autoklávban sterileztük, a mintákat pedig DEPC kezelt vízben oldottuk. A reverz transzkripciót a reverz transzkriptáz (Fermentas) segítségével hajtottuk végre, reverz primerként a L22 primert felhasználva. A keletkezett cDNS-ből L20 (5'-cca gca agg ata cgc cga taa-3') és L22 (5'- cac gca cat ctt gtc ggg taa-3') primerek segítségével felszaporítottuk az adott génszakaszt (401 bp), majd a szekvenciáját meghatároztuk.

***Mucor circinelloides* transzformálása**

pLGY1 és pLGY2 vektorok elkészítése

A transzformáló vektorokat pSP73 (Fermentas) alapvektorban készítettük el. A *M. circinelloides* orotidin-5-foszfát dekarboxilázt kódoló *pyrG* gént (Benito és mtsai. 1992, EMBL Acc.No.: M69112) *Pst*I-*Bam*HI enzimes hasítást követően pSP73-ba ligáltuk (pTM7). PLGY1 vektor elkészítéséhez a *Rhizomucor miehei hmgR* gén promóter szakaszát PCR reakcióban felszaporítottuk hmgp1F (5'-cctggtaccgttgacattcaagccagt-3') és hmgp2R (5'-cctctcgaggatgttgaatgccgtgta-3') primerek segítségével. A primerek *Kpn*I és *Xho*I hasítóhelyeket hordoznak melynek hasításával a terméket pPT43+GFP vektorba klónoztuk a zöld fluoreszcens fehérje kódoló szakaszától, valamint a *M. circinelloides gpd* terminális szakaszától 5' helyzetben (Wolff és Arnau 2002, EMBL Acc. No.: AJ293012). Ezt követően a *R. miehei hmgR* gén promótert, a *gfp* gént, és a *M. circinelloides gpd* terminátor szakaszt *Kpn*I-*Sac*I enzimek segítségével pTM7 vektorba klónoztuk (13. Ábra).

A pLGY2 transzformáló vektor (15. Ábra) létrehozásához a teljes *R. miehei hmgR* gént két lépésben ligáltuk pTM7 vektorba. A gén 3' szakaszát *BamH*I és *Cla*I enzimes hasítással, majd 5' szakaszát *Cla*I restrikciós endonukleázzal történő hasítással klónoztuk pTM7 vektorba. A szakaszok megfelelő beépülését enzimes hasítással ellenőriztük.

Protoplasztok készítése

A protoplasztáláshoz a *M. circinelloides* MS12 leucin és uracil auxotróf törzsének sporangiospóráit élesztőkivonatos táptalaj (YEG) felszínére helyezett celofánra oltottuk és 18 órán keresztül szobahőmérsékleten inkubáltuk. A fiatal telepeket ezután 1,5% csigaenzimet (*Helix pomatia gastric juice*) tartalmazó 0,8 M szorbitol oldatba helyeztük. Az oldatot a sejtfal nélküli protoplasztok és szferoplasztok képződéséig (2-3 órán keresztül) szobahőmérsékleten tartottuk. A protoplasztokat ezután steril vattán át, tölcsérben átszűrtük,

majd a szűrletet centrifugáltuk (3500 rpm, 10 perc, 4°C). A kiülepített protoplasztokat 200 µl SMC pufferben (0,8 M szorbitol; 10 mM MOPS pH 6,3; 50 mM $CsCl_2$) vettük fel, majd Bürker kamrában meghatároztuk a protoplasztok számát.

Gombaprotoplasztok transzformálása

Kétszáz µl protoplasztszuszpenzióhoz 20 µl PMC puffert (40% PEG 4000; 0,6 M szorbitol; 10 mM MOPS pH 6,3; 50 mM $CaCl_2$) adtunk, majd hozzáadtuk a transzformációhoz használt plazmid DNS-t (10 µl). A mintákat 30 percig 4°C-on inkubáltuk, majd 2,5 ml PMC puffert adva hozzájuk újabb 25 percig szobahőn tartottuk. A mintákhoz ezután 25 ml SMC puffert adtunk, és centrifugáltuk (3500 rpm, 10 perc, 4°C). A protoplasztokat 2 ml SMC pufferrel mostuk, majd újra centrifugáltuk (3500 rpm, 10 perc, 4°C). A kiülepített sejteket végül 2 ml 0,5% leucint és 0,8 M szorbitolt tartalmazó YNB tápoldatban felvettük és 1% agart tartalmazó fedőagarral azonos összetételű táptalaj felületére öntöttük. A csészéket a protoplasztok regenerációjáig és a transzformáns telepek megjelenéséig szobahőmérsékleten inkubáltuk.

Fluoreszcencia vizsgálata

A gombasejtekbe transzformált *gfp* gén kifejeződését Zeiss Jenalumar fluoreszcens mikroszkóp (excitációs szűrők 2X KP 490 és B 427g, barrier szűrő G-247 és 510 nm dikroikus szűrő) segítségével vizsgáltuk.

Lovasztatin érzékenység meghatározás

A lovasztatinból (Mevacor) metanolban oldva 10 mg/ml koncentrációjú törzsoldatot készítettünk. A lovasztatin és szimvasztatin esetében megvizsgáltuk ezen sztatinok hidrolizált formáinak hatását is.

A táptalajhoz sterilezést követően adtuk a lovasztatint a kívánt koncentrációban, majd a megszilárdult táplemez felületére 3 µl-es cseppben oltottuk le a vizsgált *Rhizomucor* törzsek spóraszuszpenzióját. A cseppek beszárítása után a lemezeket 37 ^{o}C-on inkubáltuk, majd 24 és 48 óra elteltével mértük a képződött telepek átmérőjét. A növekedés mértékét a lovasztatintartalmú csészén mért telepátmérőket a lovasztatint nem tartalmazó csészén mért telepátmérőkhöz viszonyítva határoztuk meg.

A sztatin érzékenység meghatározása mikrotiter lemezen

A törzsek sztatinokkal szembeni érzékenységét egyszerűbb eljárással hatóanyag tartalmú táptalajra oltva, telepátmérő méréssel végeztük el.

A járomspórás gombák sztatin érzékenységét, valamint a fluvasztatinnak és a rozuvasztatinnak amfotericinB-vel fellépő kölcsönhatását mikrotiterlemezen vizsgáltuk.

Kísérleteinkben az alábbi gyógyszerként forgalmazott sztatinvegyületek *in vitro* gombaellenes hatását vizsgáltuk:

- Lescol-R 40 mg, XL-80 mg fluvastatin, (Novartis)
- Vasilip-R 40 mg, 10 mg, 20 mg simvastatin (EGIS)
- Atorvox-R 20 mg , (10 mg, 40 mg) atorvastatin (Richter)
- Crestor-R 10 mg, 20 mg, 40 mg rosuvastatin (AstraZeneca)
- Mevacor-R 40 mg (20 mg) lovastatin (MSD)

A sztatinokat Fenton és mtsai. (1992) szerint alakítottuk a vegyület aktív savas formájává. A járomspórás gombafajok leoltását 12 × 8 mintahelyet tartalmazó mikrotiter lemezen végeztük el (Costar 3599). Az egyes zsebekben 100-100 µl térfogatban alkalmaztuk a sztatinvegyület 200 µl végtérfogatra számított koncentrációjának kétszeresét YEG, vagy M3 (Difco) tápoldatban, majd ehhez 100-100 µl tápoldatban elkészített spóraszuszpenziót oltottunk az egyes fajokból. Az alkalmazott inokulum töménysége 10^5 spóra/ml volt, melyet Bürker-kamra segítségével állítottunk be. Az alkalmazott sztatinkoncentrációk így, 200 µl térfogatban, a következők voltak: 0; 0,04; 0,132; 0,4; 1,2; 3,5; 11; 32; 96 µg/ml. Az így

leoltott lemezt 35°C-on inkubáltuk, majd 18 és 42 óra elteltével, Jupiter HD fotométer (ASYS Hitech GmbH) és DigiRead program (1.2.0.2. verzió) segítségével mértük a mintahelyek optikai denzitását.

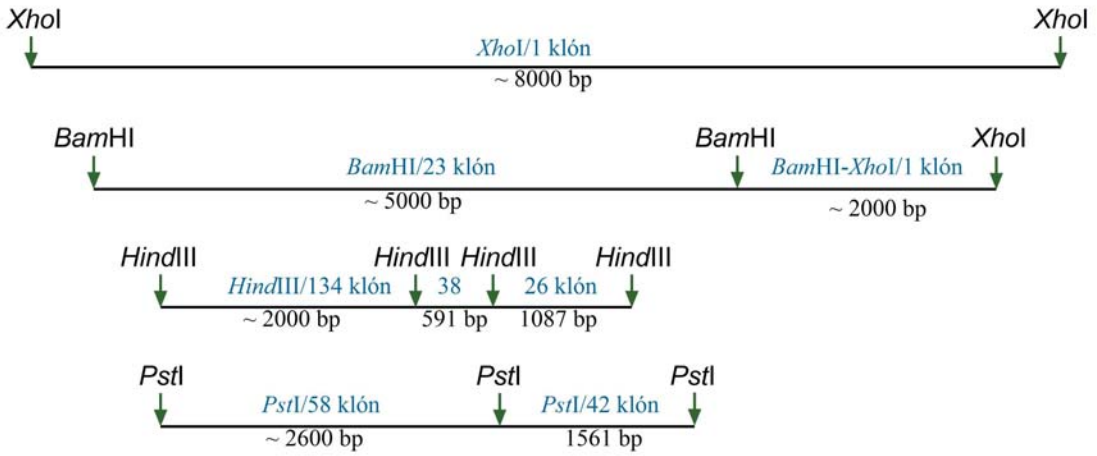
Az amfotericin B és a sztatinok szinergizmusának vizsgálata

A szinergizmus vizsgálatához az amfotericin B (Sigma) CLSI által javasolt koncentrációit (16; 8; 4; 2; 1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,06; 0,03 µg/ml) alkalmaztuk M3 (Difco) tápoldatban a sztatinvegyületek vizsgálatánál leírt módon. Az első mérések alapján a kísérletet az 1 µg/ml-nél kisebb amfotericin B koncentrációkkal megismételtük, majd a két mérés átlaga alapján vizsgáltuk a növekedésgátló hatást. Az esetleges szinergizmus előfordulását az Abott-képlet segítségével vizsgáltuk.

EREDMÉNYEK

A *Rhizomucor miehei* 3-hidroxi-3-metilglutaril koenzim A reduktáz génjének izolálása

A HMG-KoA reduktáz konzervált szakaszaira tervezett degenerált indító szekvenciák (Corrochano és Avalos 1992) segítségével PCR reakcióval felszaporítottuk a gén 3' régiójának egy 314 bp hosszúságú szakaszát. A kapott DNS szakaszt digoxigenines jelölést követően, a HMG-KoA reduktáz gén homológ próbájaként alkalmaztuk a *R. miehei* NRRL 5901-es törzs λ Fix II fágban elkészített genomiális génkönyvtár szűrésére (Vastag és mtsai. 2004). A hibridizációs lépések során 6 fágklónt izoláltunk, melyek tartalmazták a HMG-KoA reduktáz gén próbával homológ szakaszát. Az egyik fágklónt kiválasztva több lépcsős tisztítást követően a fág DNS-ét molekuláris vizsgálatnak vetettük alá. Restrikciós hasítások és hibridizációs kísérletek során megállapítottuk, hogy a kiválasztott λ klón tartalmaz egy körülbelül 8 kb hosszúságú genomi eredetű inzertet. Ezt az inzertet pBluescript vektorba klónoztuk *Xho*I restrikciós endonukleáz segítségével. További restrikciós hasításokat végeztünk *Bam*HI, *Hind*III és *Pst*I enzimekkel, a kapott DNS szakaszokat szintén pBluescript vektorba klónoztuk, majd az inzertek nukleotidsorrendjét T3, T7 és a megismert szekvenciákhoz tervezett specifikus primerek segítségével határoztuk meg (7. Ábra).



7. Ábra: A *Rhizomucor miehei hmgR* génjének szubklónozási lépései.

A szubklónok átfedő szekvenciáit CAP (*contig assembly program*) kontig összerendező program segítségével (http://bioinfo.hkn.hk/) és ismert *hmgR* gének szekvenciájával történő összehasonlítással vizsgáltuk tovább.

Ezen kísérletek eredményeként meghatároztuk a HMG-KoA reduktázt kódoló gén teljes szekvenciáját (8. Ábra).

```
ggtggtattgttgacattcaagccagtgcattccgtgggtggtgcaagtgaccagcagcagcaggagcaagg    72
aggcccaggacggttgtctcctgatgaaacgacagaggtggcgaacaaccgtttctcatcctcactctatcc   144
atgacaacaaacgttattccgaacgtgcgtatgcataggagttgtccttcccccaaaaaaagaacagaagca   216
actagctgtttgagtcacgtttgcgttcctgagggtcgtgttgggtggcactaagggaaaatgctgaagtgt   288
ccgctctacttaacaatatatgcgacagttgtcatatgggaccgttaaaacttgttgaaacagataacactg   360
tatgtacgctatttccctttgcaggtagtgtccatagataagctctatgagcgcatcaaataatattgctc   432
caacatcaaaatacatgcatttgggtatgacaaggacgatttgttgcaatctgtggacaatgaaagtgtatt   504
gtatagcaatttgcgaagccaggagctataatagctaaatgagatcgacctttttacgcttaaataaggga   576
agacaaatgcatcgcgcgcccatcttctttgtggattgcccaaacaagactatctggtaggagatcgggtg   648
taaccaacgattgaacgaaggggtcgaatcaaggagcgcggaacagatcacatatatatctgctggaaactc   720
cgtgcactttttttcgttgtgcctctttttctttcattcctcttgcttttatcgggccttccttagggaa   792
acagagaggtacaacataaacgtccactctctctctctctcttcctgaaccgattggaattttaaccaaccg   864
agctgctgtcagagagatatcgtcgtttcaacacaaaacgatagcgttcgacttttaatattactcatctcgc   936
                                M   P   S   S   T   R   I   L   G   T   S     11
atcagggcttacacggcattcaacatc ATG CCC TCC AGC ACT CGC ATT TTA GGA ACC TCT    996
 S   A   F   R   S   Y   S   A   L   V   G   K   G   I   H   H   A   A     29
TCA GCG TTC CGC TCA TAT TCT GCC CTT GTT GGC AAG GGC ATT CAT CAC GCT GCA   1050
 R   L   S   T   R   N   P   I   E   M   F   V   G   V   I   I   L   A     47
CGC TTG TCC ACT CGC AAT CCC ATT GAA ATG TTT GTC GGT GTA ATC ATT CTC GCT   1104
 S   F   S   Y   V   C   L   Y   N   L   A   R   T   S   D   I   F   S     65
TCC TTC AGC TAC GTC TGT CTA TAC AAC CTC GCA CGT ACC TCA GAT ATT TTC TCT   1158
 G   T   N   M   R   L   Y   P   A   T   V   Y   A   P   S   N   G   L     83
GGA ACC AAC ATG CGC TTA TAC CCT GCC ACT GTC TAT GCC CCA AGC AAT GGT CTG   1212
 E   F   S   P   V   D   S   S   F   V   D   K   T   A   Q   K   I   H    101
GAG TTC TCG CCC GTT GAC TCA TCC TTT GTC GAC AAG ACT GCA CAA AAG ATT CAC   1266
 L   R   Q   I   T   V   T   A   E   E   L   Q   D   H   L   S   S   V    119
TTG CGC CAA ATC ACT GTT ACC GCC GAA GAA TTG CAA GAT CAC TTG TCA TCC GTG   1320
 E   R   F   Q   K   Y   L   E   N   D   V   Y   V   P   D   G   T   R    137
GAA CGT TTC CAA AAG TAT CTC GAA AAC GAT GTA TAT GTT CCT GAT GGC ACT CGA   1374
 Q   F   S   Y   S   K   G   L   C   Y   S   T   N   E   N   C   F   S    155
CAA TTC TCA TAC TCT AAA GGC CTG TGC TAC TCG ACC AAC GAA AAC TGC TTC AGC   1428
 A   S   T   D   K   D   T   S   I   L   T   L   S   F   A   F   D   A    173
GCA TCG ACC GAT AAG GAT ACA TCG ATT CTC ACT CTT TCG TTT GCA TTC GAT GCC   1482
 S   N   A   M   R   R   D   L   A   N   Q   W   E   N   K   V   A   K    191
TCC AAC GCT ATG CGC AGA GAC CTT GCC AAC CAG TGG GAA AAC AAG GTT GCA AAG   1536
 L   P   P   G   E   L   V   S   Q   A   Q   Q   G   Y   G   D   N   L    209
CTT CCA CCT GGA GAA CTT GTT TCG CAG GCC CAG CAA GGA TAC GGC GAT AAC TTG   1590
 L   V   W   F   F   I   I   T   R   N   V   V   F   R   L   K   E   L    227
CTT GTT TGG TTT TTC ATC ATT ACA CGA AAT GTC GTT TTT AGA CTC AAG GAA TTG   1644
 I   E                                                                   229
ATT GAG  gtagggacgcgctaacacaatttgctcattacataacgttctcttctcacaaacgttatttcc 1713
                M   A   D   N   V   D   I   I   V   I   L   A   G   Y    243
atttcttgtcctagATG GCT GAC AAC GTT GAT ATT ATC GTC ATT TTG GCT GGC TAT    1770
 I   M   M   I   A   T   F   V   S   L   Y   I   N   M   R   R   M   G    261
ATA ATG ATG ATT GCG ACA TTT GTC TCC TTG TAC ATC AAC ATG CGG AGA ATG GGA   1824
 S   R   Y   T   L                                                       266
TCG CGA TAC ACG TTA G gtaagcagcatttgacagtgactctggaaatcaacattgtttactcatat 1890
                                A   T   A   V   T   V   N   G   L   F    276
atactccccgcatcaaataattttatgatagCC ACC GCC GTT ACT GTC AAT GGC CTG TTT    1950
 S   F   M   L   A   L   L   T   V   H   A   L   G   V   E   P   S   P    294
TCG TTC ATG CTC GCT TTG CTA ACT GTC CAT GCT CTC GGT GTT GAG CCG TCA CCG   2004
 V   V   L                                                               297
GTT GTG TTG GC gtaagttcccgtcattcgtgtaacagcagatagtctgtaaacttacttgcatttcta 2072
  A   E   A   I   P   F   L   V   V   T   V   G   F   E   R   P   Y   K    315
cagA GAA GCT ATC CCG TTT TTG GTA GTT ACT GTT GGA TTC GAA CGC CCC TAT AAG 2127
```

```
 L   T   K   R   V   F   E   Y   S   K   E   A   P   I   T   R   Q   D     333
CTT ACG AAG CGC GTC TTT GAA TAC AGC AAA GAG GCC CCC ATT ACC CGA CAA GAT   2181
 V   R   E   T   I   M   R   A   V   D   A   V   A   L   P   I   A   R     351
GTG CGT GAA ACA ATC ATG CGC GCG GTG GAT GCC GTT GCT CTG CCT ATT GCC CGC   2235
 D   C   V   I   E   I   M   V   L   G   L   G   A   K   S   A   I   V     369
GAC TGT GTG ATC GAA ATC ATG GTC CTC GGC CTT GGC GCC AAA TCT GCG ATA GTC   2289
 G   L   R   E   F   C   V   L   S   A   F   L   L   A   Y   D   V   V     387
GGG CTT CGT GAG TTT TGC GTA CTT TCC GCC TTC TTG CTT GCA TAC GAC GTA GTT   2343
 F   L   F   T   W   Y   T   A   V   L   A   L   K   L   E                 402
TTC TTG TTT ACG TGG TAC ACG GCT GTC TTG GCT CTC AAG CTT GAG  gtttgtttgaa  2399
                                                         L   R   R   I   R   E    408
actcgaatattaactgcacgtggtgctaaccaatttttcattgtctcagCTT CGC AGA ATT CGC GAA  2466
 I   S   G   S   S   K   A   S   S   Q   G   G   A   P   Q   P   S   G     426
ATT AGT GGC TCT AGC AAA GCA TCC TCC CAA GGT GGT GCT CCT CAA CCC TCC GGT   2520
 V   S   F   I   R   K   T   V   V   K   A   L   S   D   D   N   A   A     444
GTG AGC TTC ATC CGC AAG ACT GTC GTC AAG GCG CTC AGT GAT GAC AAT GCT GCA   2574
 G   T   T   T   T   P   Q   D   M   Q   K   S   D   G   F   F   I   G     462
GGA ACC ACG ACG ACA CCC CAA GAT ATG CAA AAA TCA GAT GGT TTC TTC ATT GGC   2628
 H   V   K   L   L   M                                                     468
CAC GTT AAG CTG CTT ATG  gtaggtcctcttgggtgtttgaaatgtttggcaaaagtcctgtgaca  2693
                       I   V   A   F   V   S   M   H   I   F   E   F       480
ctaactttctgcgtgataccagATC GTT GCA TTT GTG TCT ATG CAT ATT TTT GAG TTC     2751
 C   T   A   F   Q   S   G   P   Q   V   D   V   S   Q   P   A   V   S     498
TGC ACT GCT TTC CAG TCT GGA CCT CAG GTC GAT GTT TCA CAA CCA GCA GTA TCT   2805
 S   V   L   S   Q   L   L   Q   E   H   R   A   S   P   H   A   A   K     516
AGC GTT TTA TCG CAG CTC CTG CAA GAA CAC CGC GCG TCG CCG CAC GCA GCC AAG   2859
 P   L   L   V   E   V   F   P   P   L   L   F   R   V   P   S   T   N     534
CCA TTA CTT GTT GAA GTG TTT CCT CCC TTG TTG TTC CGA GTT CCC AGC ACT AAT   2913
 N   G   V   L   P   E   S   I   S   K   T   L   D   A   L   S   E   V     552
AAC GGA GTG TTG CCT GAA TCC ATC TCC AAG ACA TTA GAT GCA CTT TCT GAA GTT   2967
 Y   E   V   Y   V   Q   H   P   V   I   S   K   W   I   T   I   G   L     570
TAC GAA GTC TAC GTC CAG CAC CCA GTT ATC AGC AAA TGG ATT ACC ATT GGC CTC   3021
 C   V   S   L   F   L   N   T   Y   L   F   N   V   A   K   Q   P   K     588
TGT GTA TCA TTG TTC CTC AAC ACT TAT CTG TTC AAT GTC GCC AAG CAA CCC AAA   3075
 Q   I   S   E   K   P   E   A   E   T   V   V   A   P   P   K   P   K     606
CAG ATT TCC GAG AAA CCC GAA GCT GAA ACT GTT GTC GCA CCT CCA AAG CCC AAG   3129
 V   V   A   P   P   P   P   P   A   P   T   G   T   I   R   S   V   D     624
GTT GTC GCT CCG CCG CCT CCT CCT GCT CCC ACC GGC ACA ATT CGT TCC GTG GAT   3183
 E   C   L   A   L   I   K   T   P   E   A   L   N   D   E   E   I   I     642
GAG TGT CTT GCC TTG ATC AAG ACC CCA GAA GCT TTG AAC GAT GAG GAA ATT ATC   3237
 Q   L   V   N   A   G   K   I   A   S   Y   A   L   E   K   M   L   G     660
CAA TTG GTG AAT GCC GGC AAG ATT GCG TCC TAT GCA TTG GAA AAA ATG TTG GGC   3291
 D   M   Q   R   A   V   S   I   R   R   A   L   I   S   R   A   S   V     678
GAT ATG CAG CGC GCT GTT TCT ATC CGA CGG GCT CTG ATT TCC CGT GCT TCG GTC   3345
 T   R   T   L   E   T   S   L   L   P   L   K   D   Y   H   Y   E   K     696
ACC AGG ACT CTT GAG ACT AGC TTG CTC CCT CTC AAG GAC TAT CAT TAC GAA AAA   3399
 V   F   G   A   C   C   E   N   V   I   G   Y   M   P   L   P   L   G     714
GTG TTT GGT GCC TGC TGC GAG AAT GTC ATT GGT TAC ATG CCT CTC CCG TTG GGT   3453
 V   A   G   P   L   N   I   D   G   I   P   T   H   I   P   M   A   T     732
GTT GCG GGT CCC CTG AAC ATT GAT GGC ATT CCT ACA CAC ATT CCC ATG GCG ACG   3507
 T   E   G   C   L   V   A   S   T   A   R   G   C   K   A   I   N   A     750
ACC GAA GGA TGT CTT GTT GCG TCC ACC GCT CGT GGT TGC AAG GCT ATC AAT GCT   3561
 G   G   G   A   T   T   I   V   T   A   D   G   M   T   R   G   P   C     768
GGT GGA GGA GCA ACT ACC ATT GTC ACT GCT GAC GGT ATG ACT CGT GGT CCG TGC   3615
 V   E   F   P   N   I   T   R   A   G   E   C   K   R   W   I   E   N     786
GTT GAG TTT CCC AAC ATC ACC CGT GCT GGC GAA TGC AAG CGC TGG ATT GAA AAC   3669
 E   G   Y   E   V   I   A   D   A   F   N   A   T   S   R   F   A   R     804
GAA GGC TAC GAA GTT ATC GCC GAT GCA TTC AAT GCT ACG TCT CGA TTT GCT CGT   3723
 L   R   K   L   K   V   T   L   A   G   K   L   V   F   I   R   F   S     822
CTG CGT AAA CTC AAG GTT ACT TTG GCT GGC AAG CTG GTG TTT ATC CGA TTC TCG   3777
 T   T   T   G   D   D   M   G   M   N   M   I   S   K   G   C   E   A     840
ACC ACC ACT GGT GAT GAT ATG GGC ATG AAC ATG ATT TCC AAG GGA TGC GAG GCA   3831
 A   L   S   V   L   A   E   E   F   P   D   M   Q   I   I   S   L   S     858
GCA CTA AGT GTG CTT GCC GAA GAG TTC CCT GAT ATG CAG ATC ATT TCA CTT TCC   3885
 G   N   Y   C   T   D   K   K   P   A   V   I   N   W   I   E   G   R     876
GGC AAC TAC TGC ACT GAC AAG AAG CCT GCT GTC ATC AAC TGG ATT GAA GGT CGT   3939
 G   K   S   V   V   A   E   A   I   I   P   G   P   I   V   E   K   V     894
GGC AAG TCT GTT GTT GCA GAA GCT ATT ATC CCT GGC CCA ATT GTT GAA AAG GTA   3993
```

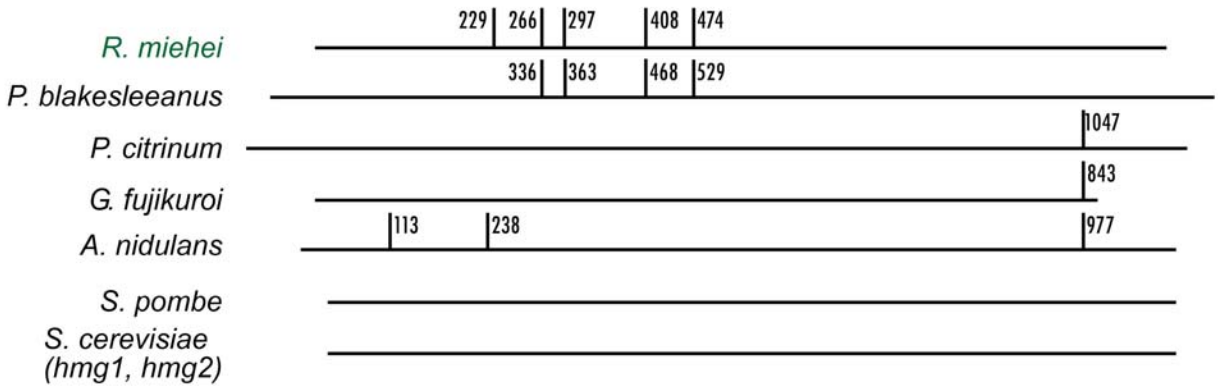
```
 L   K   T   T   V   S   A   L   V   E   L   N   T   S   K   N   L   I     912
CTC AAG ACG ACC GTC TCT GCT TTG GTT GAA CTC AAC ACG AGC AAG AAC TTG ATC   4047
 G   S   A   M   A   G   A   L   G   G   F   N   A   H   A   A   N   I     930
GGC TCA GCT ATG GCT GGC GCT CTT GGT GGT TTC AAT GCT CAC GCA GCA AAC ATT   4101
 L   T   A   I   Y   L   A   A   G   Q   D   P   A   Q   N   V   E   S     948
TTG ACC GCC ATC TAT CTT GCA GCT GGT CAG GAT CCT GCA CAG AAC GTC GAA AGC   4155
 S   N   C   I   T   L   M   K   A   V   N   D   G   K   D   L   H   I     966
TCC AAC TGC ATT ACT CTT ATG AAG GCT GTA AAC GAT GGC AAA GAC TTG CAT ATC   4209
 S   C   T   M   P   S   H   R   K   I   G   T   V   G   G   G   T   I     984
TCT TGT ACC ATG CCC AGC CAT CGC AAG ATT GGG ACA GTG GGT GGT GGC ACT ATC   4263
 L   P   P   Q   Q   A   I   L   D   M   L   G   V   R   G   P   H   P    1002
CTT CCT CCT CAG CAA GCT ATC TTG GAT ATG CTC GGC GTT CGT GGA CCG CAC CCG   4317
 T   N   P   G   D   N   A   R   R   L   A   R   I   I   C   A   A   V    1020
ACG AAT CCC GGA GAT AAT GCT CGA CGA CTT GCA AGA ATC ATT TGC GCC GCT GTC   4371
 M   A   G   E   L   S   L   C   A   A   L   A   A   G   H   L   V   K    1038
ATG GCT GGT GAG CTT TCC TTG TGT GCT GCG CTT GCT GCT GGA CAT TTG GTC AAG   4425
 A   H   M   A   H   N   R   A   T   Q   A   P   A   P   G   S   C   I    1056
GCA CAC ATG GCT CAC AAC CGT GCA ACT CAA GCA CCT GCA CCT GGT AGC TGC ATC   4479
 K   S   *                                                               1059
AAA TCA TAG  aatggaaatttttgtttagttcgcttcgcaaagtttgctaattatctttacaatttttg  4547
tcttcccttgtgtatcgttctaattattttttctgaaaaaaataacaacaaaacttaatctatatttttcc  4619
ctctatcctcctgtaacaatgatgggtggtgtatcttttgattcccaattctttggatcgtttggatctgcc  4691
gagccagccgccaatgcccccgatgccgcaaagcgcataaataccggtcgggcacagggaccagaatatgtc  4763
ggtggaagacctagcggtaccatcgtaccgttccacaaatcgccattcttgtaagcttgttcctgcatcgtg  4835
ttgcgctgcacataatctatcgagaatgcggttcccacgacctttgttgattttcgtcgaaaacgaggcct  4907
cgcaaatgggctgttccgagcaacaatcttgtaaatatcatgacagcgttgcggtgatagtctgatcgat   4977
```

8. Ábra: A *Rhizomucor miehei hmgR* génjének teljes szekvenciája és az általa kódolt feltételezett fehérje aminosavsorrendje (EMBL Database AJ568024)

A gén kódoló szekvenciája mellett azonosítottunk egy 964 nukleotid hosszúságú promótert, amely a start kodontól 126 nukleotidnyi távolságban, *upstream* helyzetben tartalmaz egy pirimidinben gazdag régiót, valamint 45 bp *upstream* helyzetben egy nem tipikus TATA motívumot (TAATATT) (8. Ábra).

A génben öt intront azonosítottunk, melyek mindegyike tartalmazza az intron 5' végén a GT, 3' végén az AT motívumokat. Az intronok viszonylag rövidek, sorrendben 137, 83, 59, 60, 69 bp hosszúságúak. Megállapítható, hogy a gén öt intronja közül az első négy azonos pozícióban található a *Phycomyces blakesleeanus* HMG-KoA reduktáz génjének négy intronjával (9. Ábra). Néhány *Ascomycota* faj *hmgR* szekvenciáit vizsgálva található egy hasonlóan konzervált elhelyezkedésű intron, amely azonban az említett két *Zygomycota* faj intronjától eltérő pozícióban található. Ezek a megfigyelések arra utalnak, hogy az intronok elhelyezkedése a génben bizonyos mértékben konzervált. A *Saccharomyces cerevisiae*,

Schizosaccharomyces pombe, *Candida glabrata* és *Candida albicans hmgR* gének nem tartalmaznak intronokat.



9. Ábra: Néhány gombafaj *hmgR* génjében található intronok elhelyezkedése.
A kódolt fehérjeszekvenciákat Clustal W program segítségével hasonlítottuk össze, az azokat jelképező vonalak hossza arányos a fehérjeszekvenciák hosszával, egymáshoz viszonyított helyzetük pedig a C-terminális régióik konzervált fehérjeszakaszainak egymás alá rendezéséből következik. A számok a fehérjeszekvenciáknak azt az aminosavát jelölik, amelynek kodonja után a génben az intron elhelyezkedik.
(A vizsgált gombafajok: *Rhizomucor miehei*, *Phycomyces blakesleeanus*, *Penicillinum citrinum*, *Gibberella fujikouroi*, *Aspergillus nidulans*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae*)

Az erősen kifejeződő génekre jellemző, hogy többféle kodont használnak, mint a kevésbé kifejeződő gének, így egyazon organizmus esetében is eltérések tapasztalhatók az egyes gének kodonhasználatában. A *R. miehei hmgR* génje esetében minden lehetséges kodon előfordul az aminosavak kódolására, míg mindössze hat olyan kodon található, amely kevesebb, mint 10 %-ban fordul elő az adott aminosavat kódoló lehetséges kodonok között (4. Táblázat). A kodonok harmadik ún. „lötyögő” pozíciójában 66%-ban pirimidinbázis található. A kétféle purin illetve pirimidin bázis használatában a harmadik pozícióban nem figyelhető meg eltérés. T és C bázis esetében 44,5% és 45,5%-ban, A és G esetében 52% és 48% ez az érték. A fonalas gombák körében gyakrabban előforduló TAA stop kodon helyett a *R. miehei hmgR* génjében a TAG stop kodont azonosítottuk.

4. Táblázat: Kodon használat a *R. miehei hmgR* génben. A ***hmgR* a** oszlop az adott kodon előfordulási arányát mutatja az aminosavat kódoló szinonim kodonokhoz viszonyítva, míg a ***hmgR* b** oszlopban az egyes kodonoknak a génben megfigyelhető összes előfordulása van feltüntetve.

Kodon	Aminosav	*hmgR* a	*hmgR* b	Kodon	Aminosav	*hmgR* a	*hmgR* b
TTT	Phe	0.43	19	TAT	Tyr	0.37	10
TTC	Phe	0.57	25	TAC	Tyr	0.63	17
TTA	Leu	0.06	6	TAA	-	0.0	0
TTG	Leu	0.33	33	TAG	-	1.0	1
CTT	Leu	0.28	28	CAT	His	0.37	7
CTC	Leu	0.19	19	CAC	His	0.63	12
CTA	Leu	0.03	3	CAA	Gln	0.57	17
CTG	Leu	0.11	11	CAG	Gln	0.43	13
ATT	Ile	0.56	40	AAT	Asn	0.34	14
ATC	Ile	0.42	30	AAC	Asn	0.66	27
ATA	Ile	0.03	2	AAA	Lys	0.27	13
ATG	Met	1.00	30	AAG	Lys	0.73	35
GTT	Val	0.41	37	GAT	Asp	0.72	28
GTC	Val	0.32	29	GAC	Asp	0.28	11
GTA	Val	0.10	9	GAA	Glu	0.72	38
GTG	Val	0.17	15	GAG	Glu	0.28	15
TCT	Ser	0.19	15	TGT	Cys	0.33	7
TCC	Ser	0.28	22	TGC	Cys	0.67	14
TCA	Ser	0.16	13	TGA	-	0.0	0
TCG	Ser	0.15	12	TGG	Trp	1.0	6
CCT	Pro	0.39	23	CGT	Arg	0.28	14
CCC	Pro	0.31	18	CGC	Arg	0.36	18
CCA	Pro	0.14	8	CGA	Arg	0.20	10
CCG	Pro	0.17	10	CGG	Arg	0.04	2
ACT	Thr	0.38	26	AGT	Ser	0.04	3
ACC	Thr	0.32	22	AGC	Ser	0.19	15
ACA	Thr	0.13	9	AGA	Arg	0.10	5
ACG	Thr	0.16	11	AGG	Arg	0.02	1
GCT	Ala	0.42	46	GGT	Gly	0.34	24
GCC	Ala	0.21	23	GGC	Gly	0.40	28
GCA	Ala	0.27	30	GGA	Gly	0.23	16
GCG	Ala	0.10	11	GGG	Gly	0.03	2

A *Xanthophyllomyces dendrorhous hmgR* gén részleges vizsgálata

A HMG1F és HMG1R primerek (Corrochano és Avalos 1992) segítségével PCR reakcióban felszaporítottuk a *X. dendrorhous* Basidiomycota élesztő *hmgR* génjének egy szakaszát, mely a HMG-KoA reduktáz katalitikus alegységének egy 315 bp hosszúságú részletét kódolja (10. Ábra).

```
 P   M   A   T   T   E   G   C   L   V   A   S   A   S   R   G   C   K      18
CCG ATG GCG ACG ACG GAA GGG TGT TTG GTT GCC AGT GCC AGT CGA GGT TGC AAG     54

 A   I   N   S   G   G   G   A   I   T   V   L   T   A   D   G   M   T      36
GCC ATC AAC TCT GGT GGC GGT GCT ATC ACT GTT CTC ACT GCC GAT GGT ATG ACT    108

 R   G   P   C   V   A   F   E   T   L   E   C   A   G   A   A   K   L      54
CGT GGT CCC TGT GTC GCT TTC GAG ACT CTT GAG TGC GCT GGT GCT GCC AAG CTC    162

 W   L   D   S   E   A   G   Q   D   M   M   K   K   A   F   N   S   T      72
TGG CTC GAC TCT GAA GCT GGT CAG GAT ATG ATG AAG AAG GCT TTC AAC TCA ACC    216

 S   R   F   A   R   L   Q   F   M   K   T   A   L   A   G   T   N   L      90
AGT CGC TTC GCC CGT CTC CAG TTC ATG AAG ACT GCT CTT GCT GGT ACC AAC CTG    270

 Y   I   R   F   K   T   T   T   G   D   A   M   G   M   N                 105
TAC ATT CGA TTC AAG ACC ACC ACC GGT GAC GCT ATG GGC ATG AAC                315
```

10. Ábra: A *Xanthophyllomyces dendrorhous hmgR* gén egy szakaszának nukleotidszekvenciája és a kódolt fehérje feltételezett aminosavsorrendje (EMBL Database AJ884949).

Az azonosított szakasz a továbbiakban – hibridizációs próbaként felhasználva – lehetővé teszi a teljes *X. dendrorhous hmgR* gén szekvenciájának meghatározását és vizsgálatát. A teljes gén izolálását megkezdtük, ezek a vizsgálatok jelenleg is folyamatban vannak. A rövid szakaszon azonosíthatóak voltak a feltételezett aktív hely HMG-KoA kötésért (kék) és NAD(P)H kötésért (zöld) felelős motívumai.

A *R. miehei* HMG-koenzim A reduktáz

Néhány eukarióta szervezetben már ismertek a HMG-KoA reduktáz gén szekvenciájára és a fehérje szerkezetére vonatkozó adatok. Ezek alapján az enzimben megtalálható egy erősen variábilis, az endoplazmatkus retikulumhoz történő kapcsolódást segítő domén, melyet a gén 5' régiója kódol (Anderson és mtsai. 1983; Basson és mtsai. 1988; Liscum és mtsai. 1985; Skalnik és mtsai. 1988; Gil és mtsai. 1985). Feltételezik, hogy ez a régió felelős az enzim regulációjáért. Az enzim állatok és gombák esetében 7-8 (Basson és mtsai. 1988; Croxen és mtsai. 1994; Olender és Simoni 1992; Roitelman és mtsai. 1992), míg növények esetében 2 transzmembrán doménnel rendelkezik (Genschik és mtsai. 1992; Learned és Fink 1989; Nelson és mtsai. 1994). A szíriai aranyhörcsög (*Mesocricetus auratus*)

esetében kimutatták, hogy az első transzmembrán domén tartalmaz egy szignált, amely az enzimet az endoplazmatikus retikulumba irányítja (Olender és Simoni 1992). Az N-terminális hidrofób domén része az úgynevezett szterol érzékelő domén (SDS, *Sterol Sensing Domain*), ez felelős a membrán szterol tartalmának érzékeléséért (Loftus és mtsai. 1997, Brown és Goldstein 1999, Davies és Ioannou 2006) és az enzimszint poszttranszlációs regulációjáért. Az enzim transzlációját, stabilitását és degradációját a terpenoid bioszintézis út köztitermékei szabályozzák (Goldstein és Brown 1990). Pena-Díaz és mtsai. (2004) *Trypanosoma cruzi* és *Leischmania major* HMG-KoA reduktázát vizsgálva megfigyelték, hogy azok fehérjéi nem tartalmaznak N-terminális domént, és az enzim a mitokondriumhoz kapcsoltan helyezkedik el a sejtben. Vaupotic és Plemenitas (2007) a halotoleráns *Hortaea werneckii* gombafajban két HMG-KoA reduktáz izozimet talált, melyek közül az egyik a mitokondriumban, a másik pedig az endoplazmatikus retikulumban helyezkedik el. Az eukarióta HMG-koenzim A reduktázok C-terminális része egy erősen konzervált domén, amely az enzim katalitikus aktivitásáért felelős (Hampton és Rine 1994). Csak a C-terminális domén heterológ expressziója *Escherichia coli*-ban elegendőnek bizonyult az enzimaktivitás kiváltásához (Gil és mtsai. 1985, Dale és mtsai. 1995).

Az általunk izolált gén által kódolt fehérje aminosavsorrendjét ismert HMG-KoA reduktáz szekvenciák segítségével határoztuk meg. A géntermék *in silico* (Tmpred) szerkezetvizsgálatok alapján 7 transzmembrán doménnel rendelkezik. A feltételezett géntermék tartalmazza az enzimre jellemző konzervált aminosav szekvenciákat; a szterol érzékelésért felelős domént a 235-399, valamint a katalitikus aktivitásért felelős domént a 637-1044 pozícióban. A feltételezett katalitikus doménben megtalálható a HMG-koenzim A kötődéséért felelős ENVIGYMPLP (703-712), TTEGCLVA (732-739) és a NAD(P)H kötődésért felelős (DDMGMN (827-831), GTVGGGT (977-983) szakasz. A négy kiemelt szakasz közül kettő a *X. dendrorhous* részlegesen azonosított fehérjeszekvenciájában is

megtalálható. Ennek, valamint a *R. miehei* HMG-KoA reduktáz katalitikus doménjének összehasonlítását más ismert, gomba HMG-koenzim A reduktázok megfelelő régiójával a 11. Ábra mutatja.

```
G. fujikuroi            FGACCENVIGYMPLPVGVAGPLVIDGQSYFIPMATTEGVLVASASRGCKAINSGGGAITV
X. dendrorhous          ------------------------------PMATTEGCLVASASRGCKAINSGGGAITV
A.nidulans HMG1         HGACCENVIGTLPLPLGVAGPLVIDGQSYFIPMATTEGVLVASASRGAKAINAGGGAVTV
S. pombe hmg1           LNACCENVIGYMPLPLGVAGPLIIDGKPFYIPMATTEGALVASTMRGCKAINAGGGAVTV
S. cerevisiae HMG2      FGACCENVIGYMPIPVGVIGPLIIDGTSYHIPMATTEGCLVASAMRGCKAINAGGGATTV
S. cerevisiae HMG1      FGACCENVIGYMPLPVGVIGPLVIDGTSYHIPMATTEGCLVASAMRGCKAINAGGGATTV
P. blakesleeanus        MGACCENVIGYMPIPVGVAGPMNIDGDLIHIPMATTEGCLVASTARGCKAINAGGGASTI
R. miehei               FGACCENVIGYMPLPLGVAGPLNIDGIPTHIPMATTEGCLVASTARGCKAINAGGGATTI

G. fujikuroi            LTADGMTRGPCVAFETLERAGAAKLWLDSEAGQDMMKKAFNSTSRFARLQSMKTALAGTN
X. dendrorhous          LTADGMTRGPCVAFETLECAGAAKLWLDSEAGQDMMKKAFNSTSRFARLQFMKTALAGTN
A.nidulans HMG1         LTGDGMTRGPCVGFPTLARAAAAKVWLDSEEGKSVMTAAFNSTSRFARLQHLKTALAGTY
S. pombe hmg1           LTRDQMSRGPCVAFPDLTRAGRAKIWLDSPEGQEVMKKAFNSTSRFARLQHIKTALAGTR
S. cerevisiae HMG2      LTKDGMTRGPVVRFPTLIRSGACKIWLDSEEGQNSIKKAFNSTSRFARLQHIQTCLAGDL
S. cerevisiae HMG1      LTKDGMTRGPVVRFPTLKRSGACKIWLDSEEGQNAIKKAFNSTSRFARLQHIQTCLAGDL
P. blakesleeanus        VIADGMTRGPCVEFPTILRAAACKLWIEN-EGNDIVTNAFNSTSRFARLRKLKIALAGKL
R. miehei               VTADGMTRGPCVEFPNITRAGECKRWIEN-EGYEVIADAFNATSRFARLRKLKVTLAGKL

G. fujikuroi            LYIRFKTTTGDAMGMNMISKGVEHALSVMANDGGFDDMQIISVSGNYCTDKKAAALNWID
X. dendrorhous          LYIRFKTTTGDAMGMN-------------------------------------------
A.nidulans HMG1         LYIRFKTTTGDAMGMNMISKGVEKALHVMATECGFDDMATISVSGNFCTDKKAAALNWID
S. pombe hmg1           LFIRFCTSTGDAMGMNMISKGVEHALVVMSNDAGFDDMQVISVSGNYCTDKKPAAINWID
S. cerevisiae HMG2      LFMRFRTTTGDAMGMNMISKGVEYSLKQMVEEYGWEDMEVVSVSGNYCTDKKPAAINWIE
S. cerevisiae HMG1      LFMRFRTTTGDAMGMNMISKGVEYSLKQMVEEYGWEDMEVVSVSGNYCTDKKPAAINWIE
P. blakesleeanus        VFIRFSTTTGDAMGMNMISKGCEKALSIITEH--FPDMQIISLSGNYCTDKKPAAINWIE
R. miehei               VFIRFSTTTGDDMGMNMISKGCEAALSVLAEE--FPDMQIISLSGNYCTDKKPAVINWIE

G. fujikuroi            GRGKGVVAEAIIPGEVVRSVLKSDVDSLVELNVAKNLIGSAMAGSVGGFNAHAANIVAAI
X. dendrorhous          ------------------------------------------------------------
A.nidulans HMG1         GRGKSVVAEAIIPGDVVRNVLKSDVDALVELNTSKNLIGSAMAGSLGGFNAHASNIVTAI
S. pombe hmg1           GRGKSVIAEAIIPGDAVKSVLKTTVEDLVKLNVDKNLIGSAMAGSVGGFNAHAANIVTAV
S. cerevisiae HMG2      GRGKSVVAEATIPGDVVKSVLKSDVSALVELNISKNLVGSAMAGSVGGFNAHAANLVTAL
S. cerevisiae HMG1      GRGKSVVAEATIPGDVVRKVLKSDVSALVELNIAKNLVGSAMAGSVGGFNAHAANLVTAV
P. blakesleeanus        GRGKSVVTEAVIPGAIVEKVLKTTVAALVELNISKNLIGSAMAGSVGGFNAHAANILTAI
R. miehei               GRGKSVVAEAIIPGPIVEKVLKTTVSALVELNTSKNLIGSAMAGALGGFNAHAANILTAI

G. fujikuroi            FLATGQDPAQVVESANCITIMKNLNG--ALQISVSMPS-LEVGTLGGGTILEPQGAMLDI
X. dendrorhous          ------------------------------------------------------------
A.nidulans HMG1         FLATGQDPAQNVESSSCITTMKNTNG--NLQIAVSMPS-IEVGTIGGGTILEAQGAMLDL
S. pombe hmg1           YLATGQDPAQNVESSNCITLMDNVDG--NLQLSVSMPS-IEVGTIGGGTVLEPQGAMLDL
S. cerevisiae HMG2      FLALGQDPAQNVESSNCITLMKEVDG--DLRISVSMPS-IEVGTIGGGTVLEPQGAMLDL
S. cerevisiae HMG1      FLALGQDPAQNVESSNCITLMKEVDG--DLRISVSMPS-IEVGTIGGGTVLEPQGAMLDL
P. blakesleeanus        YLATGQDPAQNVESSNCITLMKAVNDTKDLHISCTMPS-IEVGTIGGGTILPPQQSMLDM
R. miehei               YLAAGQDPAQNVESSNCITLMKAVNDGKDLHISCTMPSHRKIGTVGGGTILPPQQAILDM
```

11. Ábra: Néhány HMG-KoA reduktáz katalitikus doménjének összehasonlítása, a fehérjeszekvenciák alapján

A kiemelt szakaszok az enzim katalitikus funkciójában központi szerepet játszó fehérjeszakaszokat jelölik.

A *R. miehei hmgR* gén kópiaszámának meghatározása

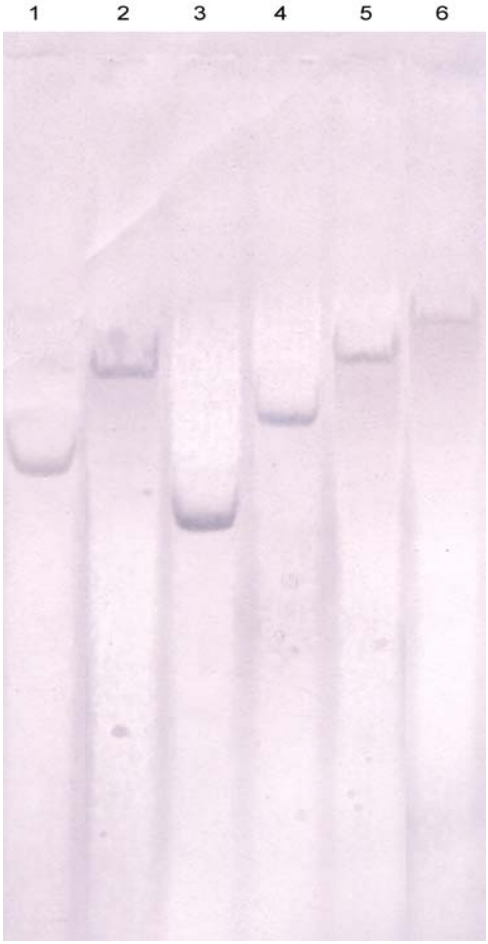
A már vizsgált szervezetek közül az állatok esetében egy, míg a növények és gombák nagy részénél két, illetve több különböző típusú HMG-KoA reduktáz gén fordul elő (Chen és Shapiro 1990; Chin és mtsai. 1984; Gertler és mtsai. 1988; Woodward és mtsai. 1988a,b).

A növényekben több eltérően szabályozott HMG-KoA reduktázt kódoló gén fordul elő (Stermer és mtsai. 1994), míg emlős sejtekben egyetlen gén kódolja az enzimet (Luskey és Stevens 1985, Helmberg és mtsai. 1990, Chin és mtsai. 1984). *Saccharomyces cerevisiae*-ben (Basson és mtsai. 1988), *Ustilago maydis*-ban (Croxen és mtsai. 1994) valamint számos járomspórás gombában (Burmester és Czempinski 1994) két *hmgR* kópiát azonosítottak. Járomspórás gombákban – amennyiben a gén több kópiában van jelen – az egyazon fajban (pl. *Mucor*, *Rhizopus* vagy *Absidia* fajokban) található két *hmgR* kópia katalitikus doménjének vizsgálata csak kb. 80%-os hasonlóságot mutatott ki, míg a különböző fajokból származó megfelelő kópiák nagyobb mértékben, 91-96%-ban bizonyultak hasonlónak (Burmester és Czempinski 1994; Ruiz-Albert és mtsai. 2002). Lum és munkatársai (1996) megállapították, hogy a *Schizosaccharomyces pombe* hasadó élesztőgomba egyetlen HMG-KoA reduktázt kódoló gént tartalmaz, és géndiszrupciós kísérletekkel igazolták, hogy létfontosságú génről van szó. *Saccharomyces cerevisiae*-ben a *hmgr1* gént (a *hmgR* megfelelője) a lovasztatinnal, a HMG-KoA reduktáz kompetitív inhibítorával, szemben biztosított rezisztencia alapján azonosították (Lum és mtsai. 1996).

A *Gibberella fujikuroi* aszkuszos gombában a micélium narancs színét okozó színanyagok és a gibberellin hormon szintézise ugyancsak az acetát/mevalonát reakcióúton megy végbe. A lovasztatin a HMG-KoA reduktázra gyakorolt hatásán keresztül gátolja az esszenciális terpenoidok szintézisét. A *G. fujikuroi* esetében azonban azt figyelték meg, hogy a lovasztatin csak a gibberellinszintézist gátolta, míg a növekedést és a szterolok szintézisét nem. Ez a faj csak egyetlen HMG-KoA reduktázzal rendelkezik, tehát a különböző kompartmentekben is ugyanaz az enzim működik. Mindezek alapján (Giordano és mtsai. 1999) arra következtettek, hogy *G. fujikuroi*-ban a karotenoidok és szterolok, a gibberellinektől független kompartmentekben szintetizálódnak és ezek különbözőképpen átjárhatóak a HMG-KoA reduktázt kompetitíven gátló lovasztatin számára.

Az általunk izolált *R. miehei* HMG-KoA reduktáz génszekvencia az eddig ismert szekvenciák ismeretében a legnagyobb hasonlóságot egy másik járomspórás gomba, a *Phycomyces blakesleeanus hmgR* szekvenciájával mutatja (Ruiz-Albert és mtsai. 2002). Ez utóbbi gomba esetében egyetlen gént azonosítottak.

A gén kópiaszámának meghatározásához kétféle módszert használtunk. Specifikus primerekkel (L8: 5'-gaa atc atg ttc atg ccc ata-3'; L10: 5'-att ggc ctc tgt gta tca ttg tt-3') egy 803 bp hosszúságú génszakaszt amplifikáltunk PCR segítségével, majd ezt a szakaszt digoxigenines jelölést követően hibridizációs próbaként használtuk (12. Ábra).



12. Ábra: A *Rhizomucor miehei hmgR* kópiaszámának meghatározása

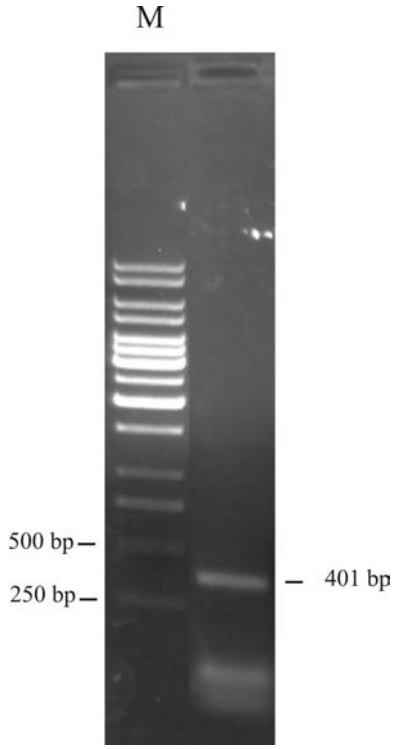
Hibridizációs jel-mintázat a gén konzervált szakaszát (803 bp, L8-L10 primerpár) használva DIG-jelölt próbaként. Az egyes mintahelyeken a *R. miehei* genomiális DNS hibridizációs képe látható 1. *Cla*I (3,5 kb), 2. *EcoR*V (6,2 kb), 3. *Pst*I (2,4 kb), 4. *BamH*I (4,5 kb), 5. *Xho*I (7,5 kb), 6. *Sac*I (9,4 kb) restrikciós enzimekkel történő emésztését követően.

A *R. miehei* genomiális DNS-t a próbában hasítási hellyel nem rendelkező *Cla*I, *EcoR*V, *Pst*I, *BamH*I, *Xho*I és *Sac*I enzimekkel emésztettük. A minták elektroforézissel történő szétválasztását követően a 803 bp hosszúságú próbával Southern hibridizációt végeztünk. Valamennyi restrikciós enzim esetén egyetlen hibridizációs jelet kaptunk, mely arra utal, hogy a *R. miehei* genomban egy HMG-KoA reduktáz gén található.

A kópiaszám meghatározást kvantitatív PCR segítségével is elvégeztük, ahol kontrollként a két *hmgr* kópiát tartalmazó *S. cerevisiae*, illetve az egy *hmgr* kópiát tartalmazó *Schizosaccharomyces pombe* genomiális DNS-ét használtuk fel. Ezek a vizsgálatok is megerősítették azt az eredményünket, hogy mindkét *Rhizomucor* faj csak egy HMG-KoA reduktázt kódoló gént tartalmaz.

RNS analízis

Számos organizmusban egynél több *hmgR* gén fordul elő, azonban ezek kifejeződéséről már kevesebb információ áll rendelkezésünkre. Növények esetében megfigyelték, hogy a különböző kópiák az organizmus különböző fejlődési stádiumában fejeződnek ki és promótereik is különböző módon szabályozódnak (Choi és mtsai. 1992). Az irodalomban nem található utalás arra, hogy a több *hmgR* kópiával rendelkező organizmusokban valamelyik kópia nem működik. A *R. miehei* törzsből izolált RNS mintából reverz transzkripcióval igazoltuk, hogy a klónozott gén mRNS-e jelen van a mintában. A gén első exonjának (L20: 5'-cca gca agg ata cgc cga taa-3') és negyedik exonjának (L22: 5'- cac gca cat ctt gtc ggg taa-3') egyes szakaszaihoz tervezett specifikus primerekkel amplifikáltunk egy 401 bp hosszúságú szakaszt, melynek szekvenciaanalízise alapján megállapítható, hogy nem tartalmazza a feltételezett intronszekvenciákat, tehát a gén valóban kifejeződik. A genomiális DNS-ből származó PCR termék 623 bp hosszúságú, ilyen terméket nem kaptunk. (13. Ábra)



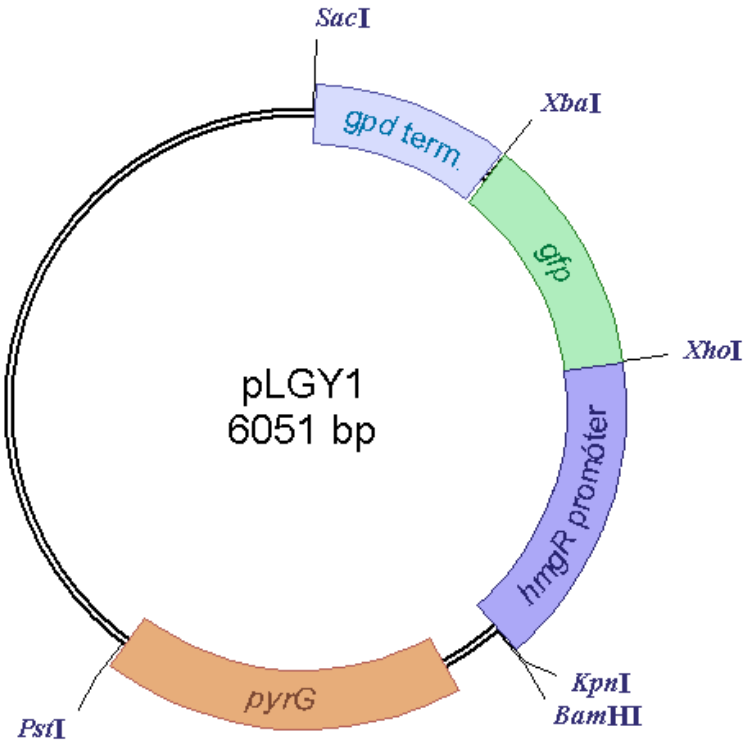
13. Ábra: A *Rhizomucor miehei hmgR* gén mRNS-ének kimutatása reverz transzkripcióval
M:1 kb DNS létra (Fermentas)

***R. miehei hmgR* gén heterológ expressziója *Mucor circinelloides*-ben**

Néhány irodalmi adat beszámol a HMG-KoA reduktáz gén expressziójának hatásáról más organizmusokban. Shimada és munkatársai (1998) sikeresen termeltették túl az enzimet *Candida utilis*-ban, ami a szkvalén szintázt kódoló *ERG9* gén elrontásával együtt a likopin termelés emelkedéséhez vezetett. A *S. cerevisiae* esetében a HMG-KoA reduktáz megemelkedett szintje az endoplazmatikus retikulum membránjának proliferációját idézte elő. Ezt a jelenséget karmellae proliferációnak nevezték (Lum és mtsai. 1996).

Kísérleteinkben a *Mucor circinelloides* kettős auxotróf MS12 törzsét használtuk a *R. miehei hmgR* génjének kifejeztetése céljából. A *M. circinelloides*-ben elvégzett transzformációs kísérletekhez két vektort építettünk (14. és 16. Ábra). A pLGY1 vektor (6051bp) tartalmazza a zöld fluoreszcens fehérjét (*green fluorescent protein*, GFP) kódoló

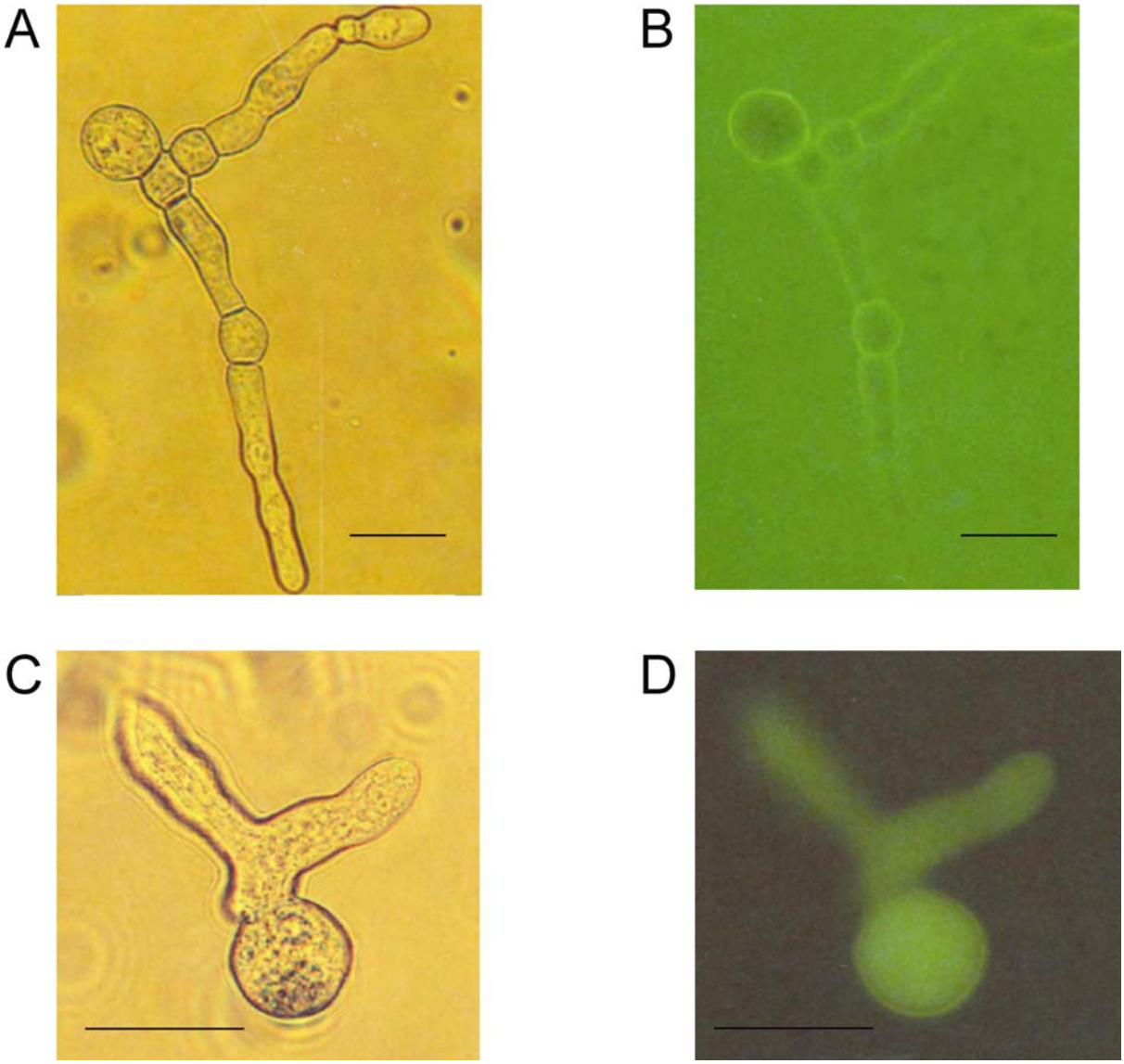
gént (720 bp) az izolált *R. miehei hmgR* gén promóterének (963 bp) irányítása alatt, valamint a *M. circinelloides* gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenáz gén (*gpd1*) terminális régióját (611 bp). Szelekciós markerként a plazmid a *M. circinelloides* az uracil auxotrófiát komplementáló orotidin-5-foszfát-dekarboxilázt kódoló *pyrG* gént tartalmazza.



14. Ábra: A pLGY1 transzformáló vektor

A pLGY1 vektort PEG-indukálta protoplaszt transzformációval juttattuk be *M. circinelloides*-be, majd a képződött transzformánsokat leucin tartalmú YNB táptalajon regeneráltattuk. A transzformáció létrejöttét a *gfp* szekvencia jelenlétének PCR segítségével történő kimutatásával és a PCR termék szekvenciavizsgálatával igazoltuk. A MS12+pLGY1 transzformáns és a kontrollként vizsgált MS12 törzs sporangiospóráit leucinnal kiegészített minimál (YNB+leu), valamint uracilt és leucint tartalmazó minimál (YNB+ura+leu)

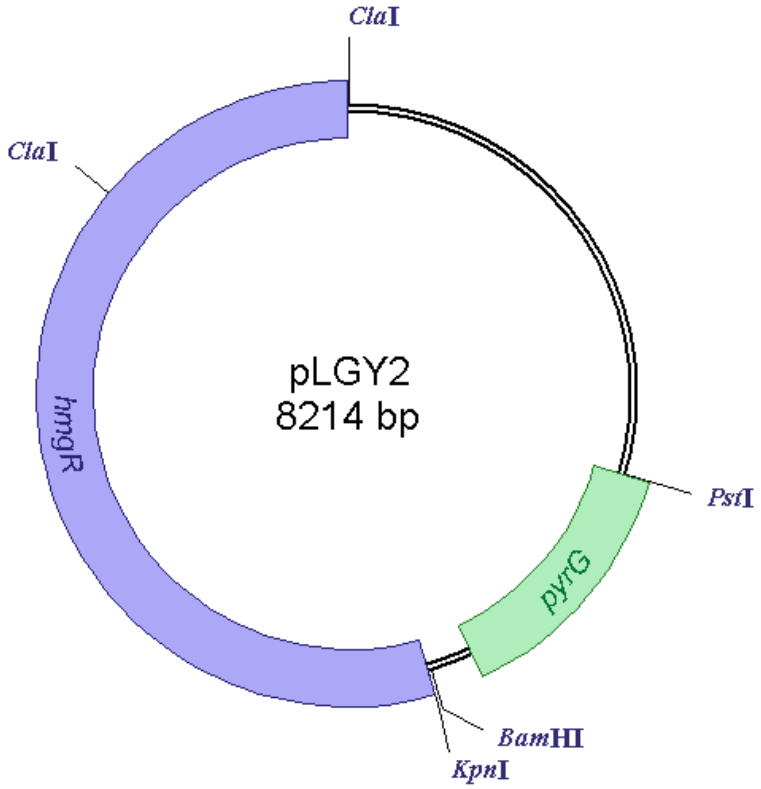
tápoldatban csíráztattuk, majd a kihajtó spórák fluoreszcenciáját UV fényben, fluoreszcens mikroszkópban vizsgáltuk (15. Ábra).



15. Ábra: Az MS12 (A, B) és az MS12+pLGY1 (C, D) törzs csírázó konídiuma: (A, C) látható fényben, (B, D) ultraibolya fénnyel megvilágítva (a vonal mérete 10 μm)

Megállapítható, hogy a transzformált sejtek UV fényben erős fluoreszcenciát mutatnak, míg a kontroll MS12 törzs esetében csak a sejtfalak enyhe autofluoreszcenciája figyelhető meg. A *R. miehei hmgR* gén promótere már a spórák csírázása során működik *M. circinelloides*-ben, a *gfp* gén átírása és a fluoreszcens fehérje (GFP) szintézise megtörténik.

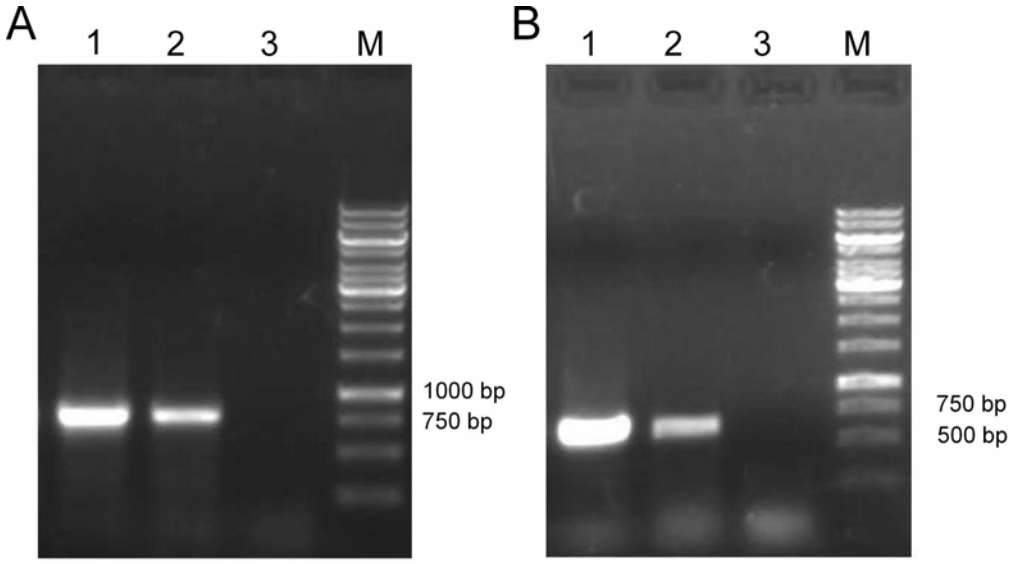
Az MS12 törzs transzformációját elvégeztük a *R. miehei* teljes *hmgR* génjét tartalmazó pLGY2 vektorral is (16. Ábra).



16. Ábra: A pLGY2 transzformáló vektor

A vektor szelekciós markerként ebben az esetben is az uracil auxotrófiát komplementáló *M. circinelloides pyrG* gént hordozta, a *hmgR* gént pedig saját promóterével (642 bp) és terminális régiójával (304 bp) együtt építettük a transzformáló vektorba.

A transzformáció során egy transzformáns törzset sikerült izolálni. A bejuttatott gén jelenlétét PCR segítségével igazoltuk, melyet a *R. miehei hmgR* gén variábilis 5' régiójához tervezett L8 és L10 (803 bp), valamint L20 és L22 (623 bp) primerekkel hajtottunk végre (17. Ábra). A PCR során keletkezett termékek nukleotid szekvenciája teljes egyezést mutatott a *R. miehei hmgR* gén azonos szakaszaival. A kontrollként alkalmazott MS12 *M. circinelloides* törzs DNS-éből egyik szakaszt sem sikerült felszaporítani, a *M. circinelloides hmgR* génje nem tartalmazza az L8, L10, L20 és L22 primerek kötőhelyét.

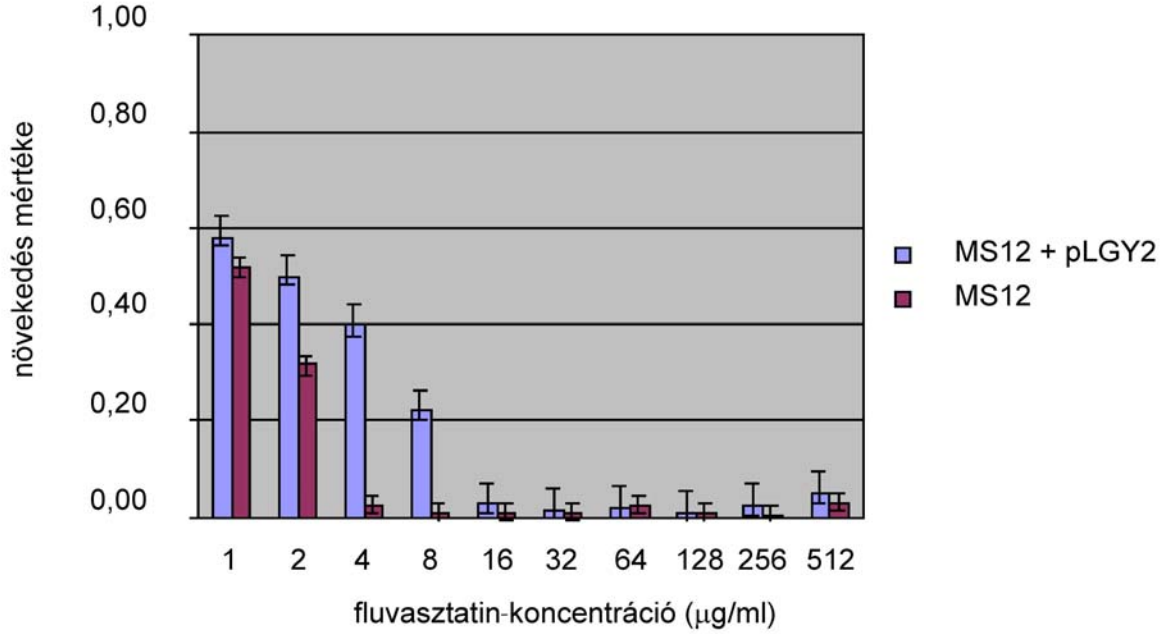


17. Ábra: Az L8-L10 (A) és L20-L22 (B) primerekkel kapott PCR termékek elektroforetikus elválasztása
1- pLGY2 plazmid vektor; **2**- MS12+pLGY2 transzformáns törzs DNS; **3**- MS12 törzs DNS; **M**- 1kb DNS Létra (Fermentas)

A transzformáns MS12+pLGY2 törzs fenotípusát vizsgálva meghatároztuk a HMG-KoA reduktáz szelektív gátlószereivel a szimvasztatinnal és a fluvasztatinnal szemben mutatott rezisztenciáját. *S. cerevisiae* esetében Lum és mtsai. (1996) az egyik HMG-KoA reduktázt kódoló *hmgr1* gént a lovasztatinnal szemben nyújtott rezisztencia alapján azonosították. Kísérleteik alapján feltételezhető, hogy ha egy gombatörzsben a *hmgR* gén megnövelt kópiaszámban van jelen, akkor az ún. géndózishatás révén a törzs sztatin érzékenysége csökken. Cardoza és mtsai. 2007-ben izolálták a *Trichoderma harzianum hmgR* gént. Vizsgálataikban a *hmgR* gén részleges csendesítése csökkent mértékű ergoszterol szintézishez és nagyobb lovasztatin érzékenységhez vezetett.

A sztatin érzékenység meghatározásakor kontrollként a leucin és uracil auxotróf MS12 törzset használtuk. A kísérleteket mikrotiter lemezen végeztük, a fluvasztatint különböző koncentrációban (1-128 μg/ml) adtuk leucinnal kiegészített YNB minimál (MS12+pLGY2 törzs), illetve uracillal és leucinnal kiegészített YNB minimál (MS12) tápoldathoz. A leoltott

lemezeket szobahőmérsékleten inkubáltuk, 48 és 72 órás tenyésztést követően a törzsek növekedésének mértékét a tenyészetek optikai denzitását 620 nm hullámhosszúságú fényben megmérve meghatároztuk. A kapott mérési eredményeket a fluvasztatint nem tartalmazó minták esetén kapott optikai denzitásra vonatkoztattuk (18. Ábra). Az egyes mérőhelyeken mért optikai denzitás értékéből minden esetben levontuk a spórákat nem tartalmazó, adott fluvasztatin-koncentrációjú tápoldat optikai denzitását. A méréseket két-két spórahígításból 3-3 párhuzamos leoltással végeztük el.



18. Ábra: Az MS12 és az MS12+pLGY2 törzs fluvasztatinnal szemben mutatott érzékenysége mikrotiter lemezen, 48 órán keresztül történő inkubálást követően

Megállapíthatjuk, hogy a transzformáns MS12+pLGY2 törzs kevésbé érzékeny a fluvasztatinnal szemben. A kontroll MS12 törzs növekedésének mértéke 4 μg/ml fluvasztatin-koncentrációnál szinte teljesen gátlódott, míg ugyanezen koncentrációnál a transzformáns törzs még 40%-os növekedést mutatott.

A fluvasztatin érzékenység meghatározását más kísérleti rendszerben (nagyobb térfogatban) is megismételtük (3 ml). Ebben az esetben 0, 5, 10, 20, 40, 80, 120, 160, 200

μg/ml fluvasztatin-koncentrációkat alkalmaztunk. Az így leoltott minták optikai denzitása a gombák fonalas növekedése miatt nem mérhető, így azok csak vizuálisan értékelhetők. Három napig tartó tenyésztést követően a továbbra is kontrollként alkalmazott MS12 törzs növekedése 10 μg/ml koncentráció mellett teljesen gátolt volt, míg a transzformáns törzs négyszer nagyobb fluvasztatin-koncentráció esetén is növekedést mutatott. A kísérletet rázatott (170 rpm) és statikus tenyésztéssel is elvégeztük, és mindkét esetben azonos eredményt kaptunk. A tenyésztési időt 7 napig meghosszabbítva a kontroll törzs mintáiban további növekedést nem tapasztaltunk. Az ily módon 7 napig tenyésztett mintákból 100-100 μl mennyiséget szilárd malátás táptalajra szélesztettünk, majd ezeket a csészéket 25 °C-on inkubáltuk. Két napig tartó tenyésztést követően a táptalajon növekedésnek indult telepeket számoltuk (5. Táblázat).

5. Táblázat: Malátás agar táptalajon képződött telepek száma kioltás után

Törzs	A tápoldat fluvasztatin-koncentrációja (μg/ml) a kioltást megelőző inkubálás alatt								
	0	5	10	20	40	80	120	160	200
MS12	200	3	0	0	0	0	0	0	0
MS12+pLGY2	192	20	3	5	1	0	0	0	0

Az így elvégzett kísérlet a pusztulási kinetikai vizsgálatok analógiája. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy az MS12+pLGY2 transzformáns törzset hosszabb ideig 40 μg/ml fluvasztatinnal inkubálva, majd a tenyészetet malátás táptalaj felületére szélesztve képes növekedésnek indulni, míg a kontroll MS12 törzs már 10 μg/ml fluvasztatin alkalmazását követően sem mutatott növekedést. Az is megállapítható ezzel a méréssel, hogy

a gátló anyagnak a rendszerből történő eltávolításával sem képesek a spórák újra növekedésnek indulni (cidikus hatás).

Lovasztatin hatása járomspórás gombákra

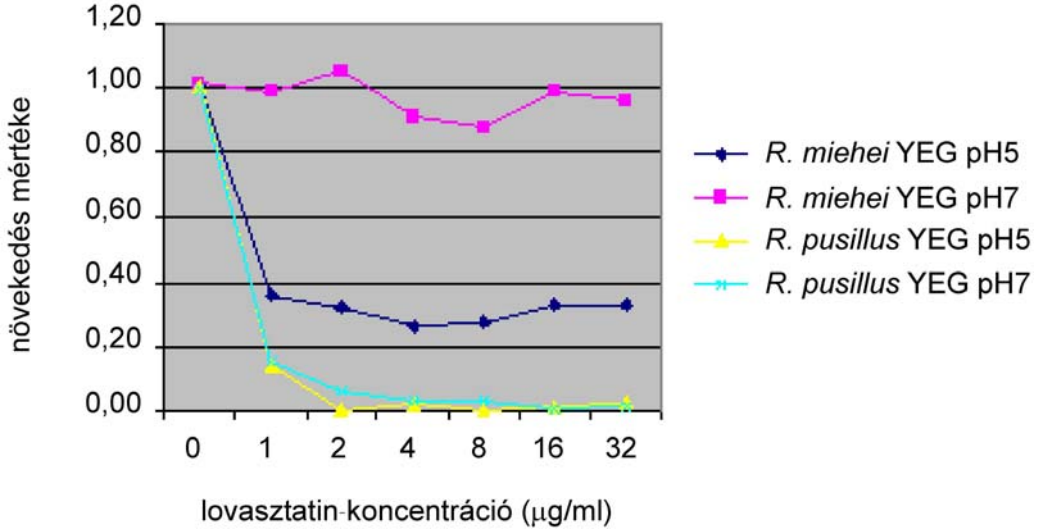
Lovasztatin hatásának vizsgálata *Rhizomucor* fajokban

A lovasztatin (Chemical Abstracts Service regisztrációs szám: 75330-75-5) a HMG-KoA reduktáz kompetitív gátlószere. A klinikai gyakorlatban a vér koleszterinszintjének csökkentésére használt gyógyszer, melyet szív és érrendszeri betegségben szenvedő betegeknél alkalmaznak. A mevalonsav szintézis gátlásán keresztül gátolja a szterolok és karotinoidok szintézisét, a gombában ultrastruktúrális változásokat és a hifanövekedés gátlását idézi elő. Az alkalmazott lovasztatin-koncentrációtól függően a gombában apoptotikus folyamatok indulnak meg, amelyek végül a gomba halálához vezetnek. (Roze és Linz 1998)

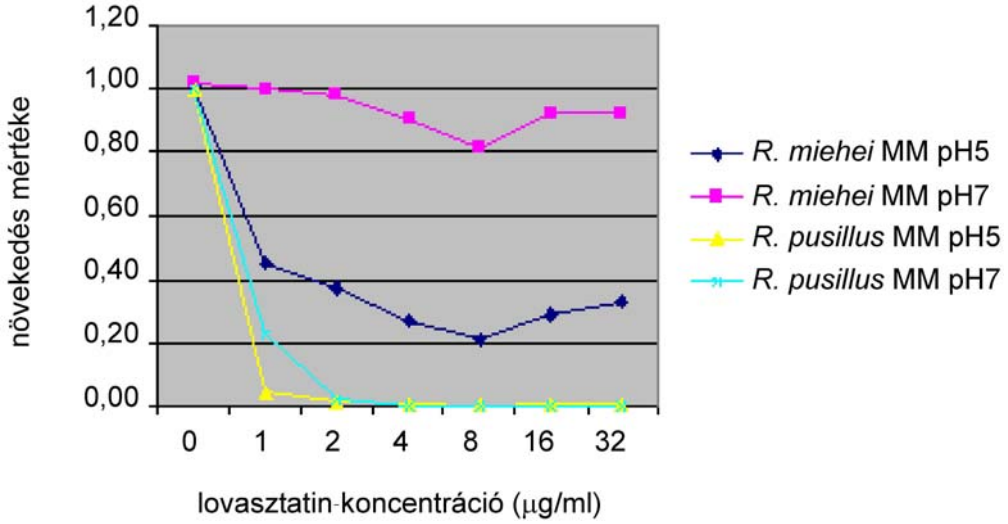
Kísérleteink során célul tűztük ki a *Rhizomucor* fajok rendelkezésünkre álló törzseinek lovasztatinnal szemben mutatott érzékenységének vizsgálatát. A 27 *Rhizomucor* törzs vizsgálata során a két faj esetében jelentős eltérés mutatkozott a fajok lovasztatin érzékenységében. Ezeket a kísérleteket a 2. Táblázatban szereplő 9 *R. miehei* és 18 *R. pusillus* izolátummal végeztük (Schipper 1978; Vastag és mtsai. 1998, 2000).

Első lépésként azonos mennyiségű sporangiospórát pontszerűen leoltva, szilárd tápközegen, különböző pH-n (pH 4-8) vizsgáltuk a lovasztatin gátló hatását. A növekedés gátlását a lovasztatin hiányában tapasztalt növekedéshez viszonyított telepátmérők mérésével határoztuk meg. Kimutattuk, hogy savas pH tartományban (pH 4) a lovasztatin gátló hatása erősebb, mint lúgos körülmények között, valamint, hogy ez a hatás erősebb, ha a sporangiospórákat minimál táptalajra oltjuk (19. A, B Ábra). Minden előzetesen vizsgált körülményben azt tapasztaltuk, hogy a *R. pusillus* izolátumok érzékenyebbek a lovasztatinnal szemben a *R. miehei* izolátumoknál.

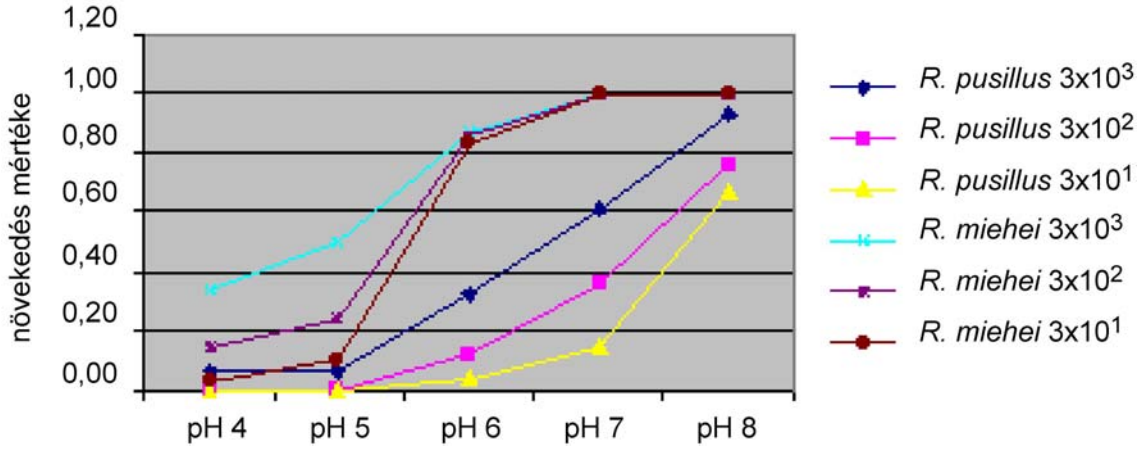
A



B



C



19. Ábra: A, B: A táptalajösszetétel és pH hatása a lovasztatin érzékenység vizsgálatára (YEG: élesztőkivonat/glükóz táptalaj, MM: minimál táptalaj); C: A leoltott spóramennyiség hatása a *Rhizomucor* fajok lovasztatin érzékenységének vizsgálatára

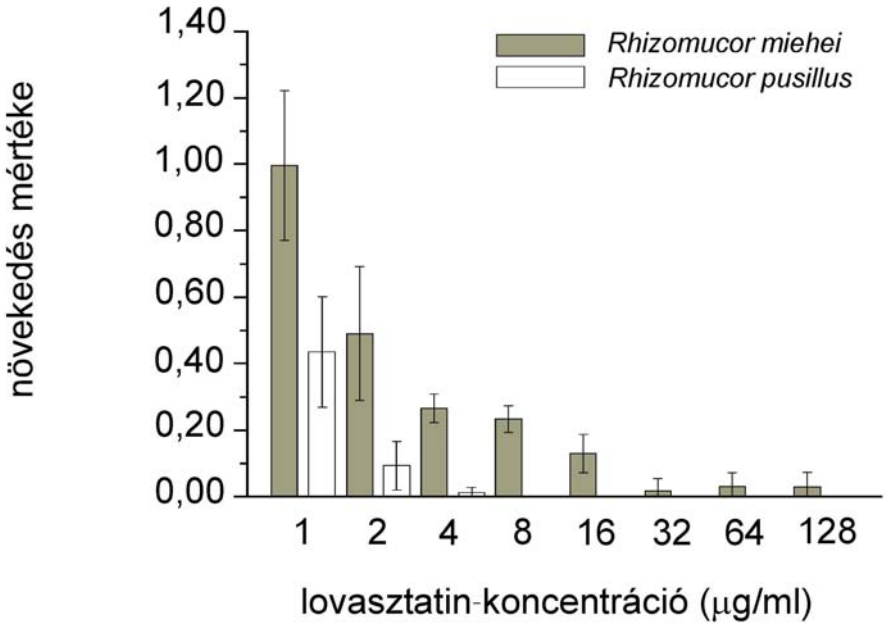
A továbbiakban megvizsgáltuk, hogy amennyiben azonos térfogatban eltérő mennyiségű sporangiospórát pontszerűen oltunk a táptalaj felszínére, ez befolyásolja-e a lovasztatin kiváltotta gátlást. Megfigyeltük, hogy a lovasztatin gátló hatása erősebb volt alacsonyabb spórakoncentráció mellett (19. C Ábra). A két *Rhizomucor* faj közötti érzékenységbeli eltérés ezekben a vizsgálatokban is szembetűnő volt. Ehhez a vizsgálathoz a *R. miehei* és *R. pusillus* esetében is a legkisebb, a legnagyobb és egy közepes rezisztenciát mutató izolátumot választottunk. A 3-3 izolátum spóraszuszpenzióit 8 μg/ml lovasztatint tartalmazó YEG táptalaj felületére oltottuk 3 μl-es cseppekben.

***R. miehei* és *R. pusillus* izolátumok fajszintű azonosítása lovasztatin érzékenységük alapján**

Vizsgálataink alapján kidolgoztunk egy módszert a két *Rhizomucor* faj azonosítására. 0,2% tejsavat tartalmazó (pH 4) MEA táptalajt (Fluka) kiegészítettük 1-128 μg/ml lovasztatinnal, majd ezekre oltottuk a törzsek 10^6, 10^5 és 10^4 spórakoncentrációjú szuszpenzióját 3 μl-es cseppek formájában. A minimális gátló koncentrációkat (MIC) 2 napig tartó 37°C-on történő inkubáció után mért telepátmérők segítségével határoztuk meg.

Ezekben a kísérletekben azt tapasztaltuk, hogy a *R. miehei* izolátumok többsége képes volt gyenge növekedésre még 64-128 μg/ml lovasztatin koncentráció mellett is, 3000 leoltott spóra mellett, és mindegyikük jól növekedett 8 μg/ml lovasztatin esetében. Ezzel ellentétben valamennyi *R. pusillus* törzs esetében erős növekedésgátlást tapasztaltunk már 1-2 μg/ml lovasztatin-koncentrációnál, és egyik izolátum sem volt képes növekedésre 4 μg/ml lovasztatin esetében. Kisebb inokulum mennyiség esetében a növekedésgátló hatás kifejezettebb volt, de az érzékenységben mutatkozó különbség a két faj izolátumai között,

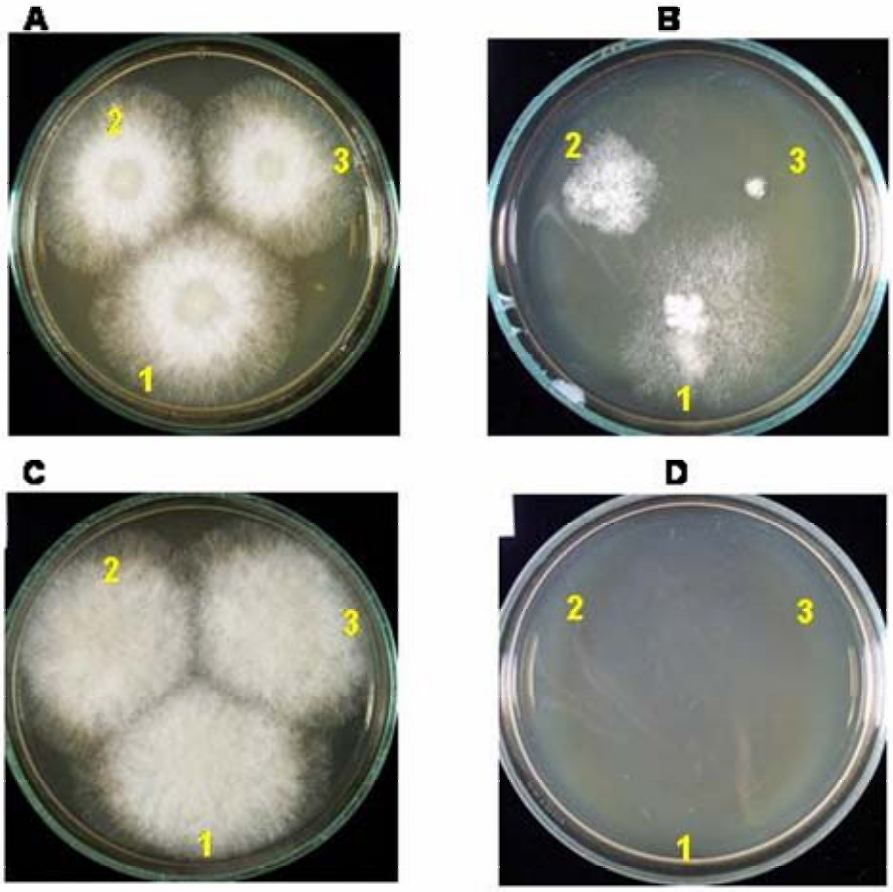
akkor is egyértelmű volt. Három μl-t leoltva a 10^4 spóra/ml szuszpenzióból a *R. pusillus* izolátumok egyike sem növekedett 2 μg/ml lovasztatin-koncentráció felett, amíg csak egyetlen *R. miehei* izolátum nem mutatott növekedést 6 μg/ml lovasztatin jelenlétében (20. Ábra).



20. Ábra: *Rhizomucor* fajok lovasztatin érzékenysége

A különböző pH és táptalajösszetétel alkalmazásával kapott eredményeink azt mutatják, hogy az egyes klinikai fonalas gomba izolátumok antifungális szerekkel szemben mutatott érzékenységének meghatározásakor meghatározó szempont a megfelelő táptalaj, valamint a megfelelő spóraszám megállapítása. Kísérleteink alapján a két faj elkülönítésére használható módszer lényege, hogy 6 μg/ml lovasztatint tartalmazó MEA táptalajra (pH 4) a vizsgált *Rhizomucor* izolátum 10^6 spórakoncentrációjú szuszpenziójából 3 μl mennyiséget cseppben leoltva, két nap 37°C-on történő inkubálást követően a *R. miehei* törzs többé-kevésbé kompakt telepnövekedést mutat, míg a *R. pusillus* izolátum növekedése teljes

mértékben gátolt. A két faj elkülönítése tehát a telepképződés megléte illetve hiánya alapján történik a megadott táptalajon (21. Ábra).



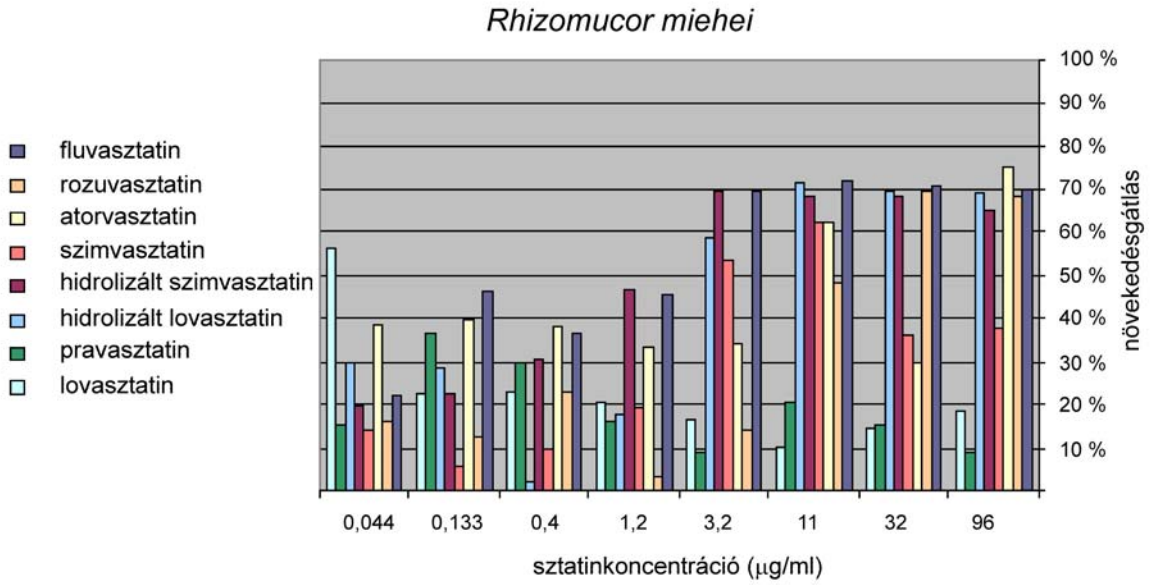
21. Ábra: Az *R. miehei* (A) és *R. pusillus* (C) növekedése MEA táptalajon és 6 µg/ml lovasztatint tartalmazó MEA táptalajon (*R. miehei*, B és *R. pusillus*, D): A sporangiospórákat 3 µl -es cseppek formájában oltottuk a 10^6 (1); 10^5 (2) és 10^4 (3) sporangiospóra/ml koncentrációjú szuszpenziókból.

Kontrollként szükséges az izolátumok leoltása lovasztatinmentes MEA táptalajon. Referencia törzsek alkalmazásával például *R. pusillus* ATCC 46342 és *R. miehei* ATCC 16457 ellenőrizhető a tesztben használt lovasztatin minősége.

Különböző járomspórás gombák sztatin érzékenységének vizsgálata

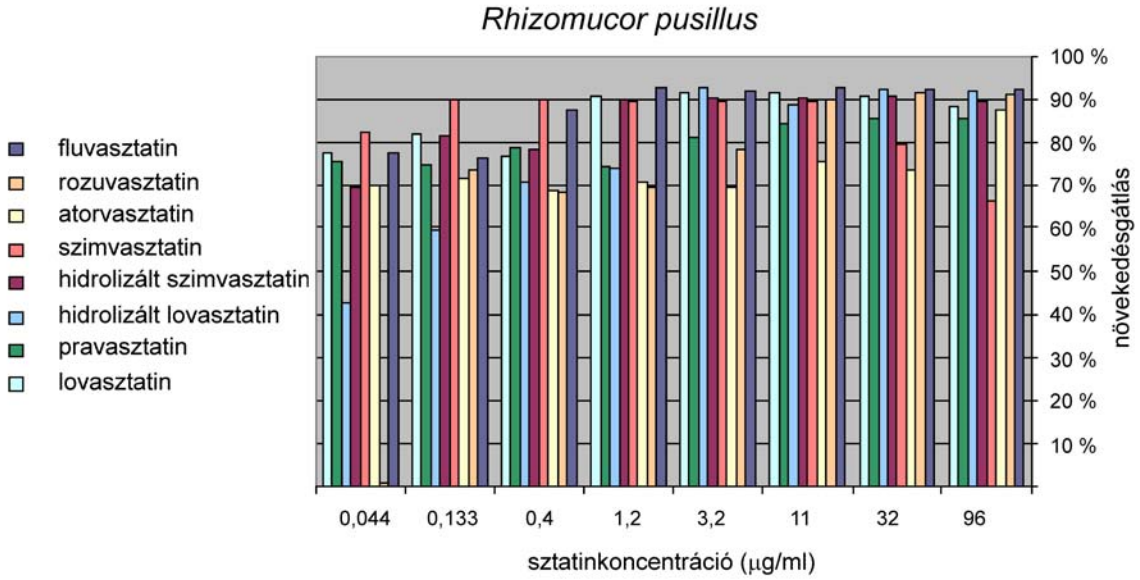
A további kísérleteinkbe a lovasztatin mellett bevontuk a kereskedelemben kapható újabb sztatin típusú vegyületeket is (fluvasztatin, rozuvasztatin, atorvasztatin, szimvasztatin, pravasztatin), melyek hatását más opportunista patogén járomspórás gombák esetében is megvizsgáltuk. Ezeket a kísérleteket 96 mintahelyet tartalmazó mikrotiter lapra oltva M3 tápoldatban 10^5 sporangiospóra koncentráció alkalmazásával végeztük a NCCLSI fonalas gombákra érvényes útmutatásaihoz hasonlóan. A szimvasztatin és a lovasztatin törzsoldatainak elkészítésénél elvégeztük a vegyületek savas hidrolízisét is a Fenton és mtsai. (1992) által leírt módon. Farmakológiai leírások szerint a szimvasztatin és a lovasztatin aktív formáját a gyomorsav hatására létrejövő lakton formává történő átalakulás után veszi fel.

A klinikai minták amfotericin B érzékenységének meghatározásához használt M3 táptalaj összetételét tekintve minimál táptalaj, ennek megfelelően korábbi vizsgálatainkkal összhangban már kisebb alkalmazott koncentrációknál is tapasztaltunk növekedésgátlást (22. Ábra).

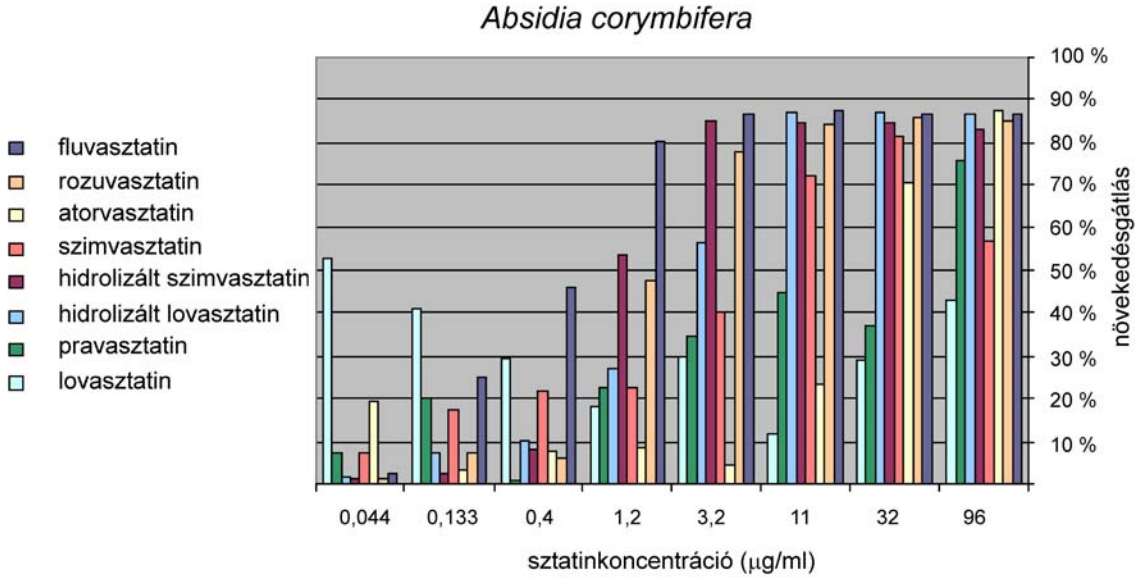


22. Ábra: A *Rhizomucor miehei* sztatin érzékenysége

A két *Rhizomucor* faj esetében (22. és 23. Ábra), a mikrotiter lemezen elvégzett kísérletekben is eltérést tapasztaltunk a fajok sztatin érzékenységében. A *R. miehei* esetében egyik sztatin nagy koncentrációjú alkalmazásával sem sikerült 75%-ot meghaladó növekedésgátlást elérni. A *R. pusillus*-nál viszont a legtöbb sztatinnak már kis koncentrációja is több mint 80%-os növekedésgátlást idéz elő.

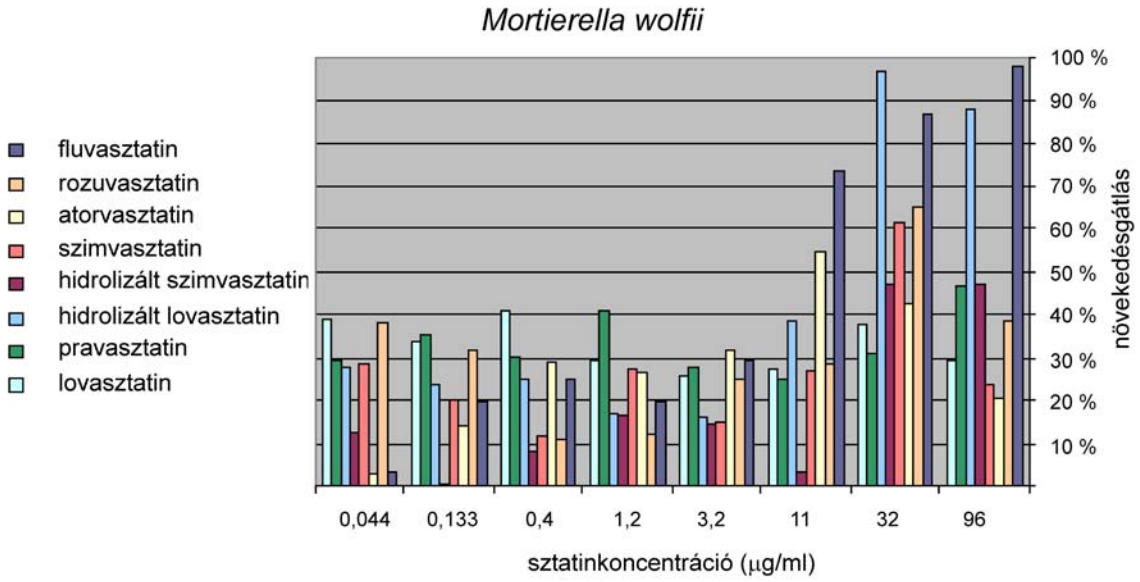


23. Ábra: A *Rhizomucor pusillus* sztatin érzékenysége



24. Ábra: Az *Absidia corymbifera* sztatin érzékenysége

Az *Absidia corymbifera* az alkalmazott leoltási körülmények között gyorsabban növekedett, mint a többi általunk vizsgált járomspórás gomba. A 48 órás inkubációs idő eltelte után mért adatok nem voltak megfelelően értékelhetők az adatok szórása miatt, ezért a továbbiakban a 24 órás adatokat vettük figyelembe a növekedésgátlás meghatározásakor (24. Ábra). A fluvasztatin már 0,4 µg/ml koncentrációban alkalmazva több mit 40%-os, ennek háromszorosa pedig 80%-os növekedésgátlást okozott *A. corymbifera* esetében.

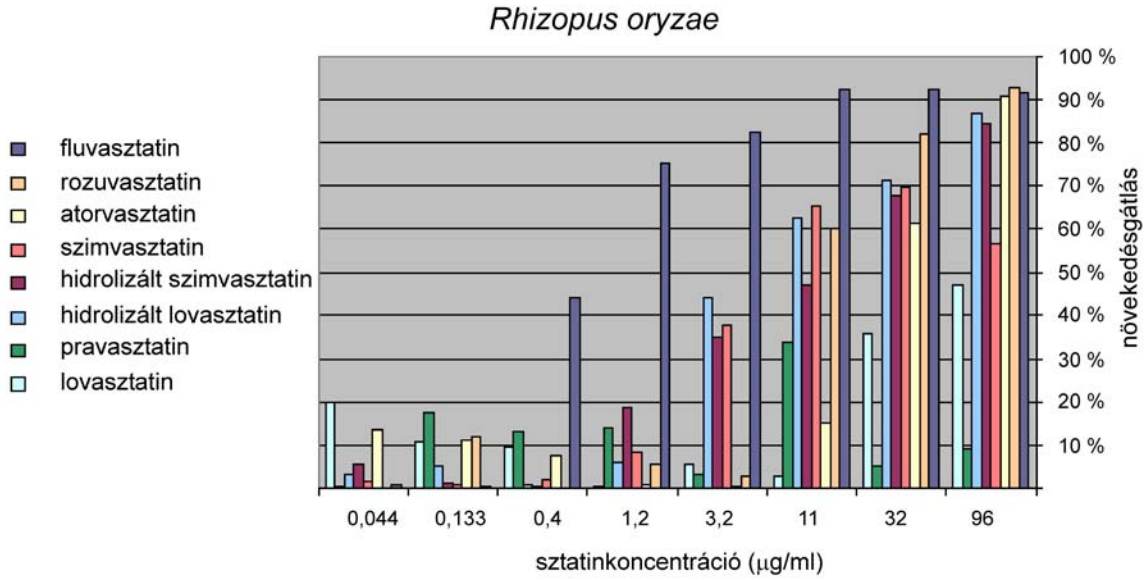


25. Ábra: A *Mortierella wolfii* sztatin érzékenysége

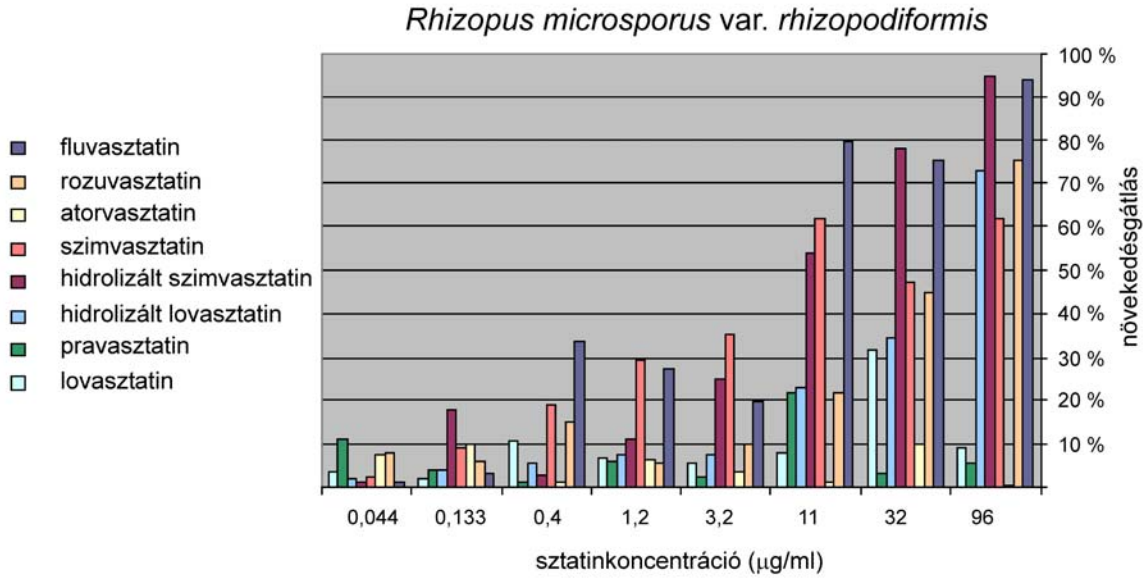
A *Mortierella wolfii* izolátum kevésbé mutatkozott érzékenynek a sztatinvegyületek többségére, azonban a fluvasztatin és a hidrolizált lovasztatin magasabb koncentrációjával (32-96 µg/ml) több mint 80%-os növekedésgátlást idéztünk elő (25. Ábra).

Két *Rhizopus* faj, a *Rhizopus oryzae* és a *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus* klinikai törzsét vizsgálva egyes sztatinvegyületekkel szemben tapasztaltunk érzékenységbeli eltérést (26. és 27. Ábra). A *R. oryzae* növekedése már 0,4 µg/ml fluvasztatin jelenlétében is 40%-kal csökkent, 11 µg/ml fluvasztatinnal pedig több mint 90%-kal gátlódott, míg a növekedésgátlás a fluvasztatin 11-32 µg/ml koncentrációjánál *R. microsporus* var. *oligosporus* esetében nem érte el a 80%-ot. A vizsgált vegyületek közül az atorvasztatin *R.*

microsporus var. *oligosporus* esetében nem mutatott gátló hatást, bár a többi vizsgált járomspórás gomba érzékenynek bizonyult erre a vegyületre is. A 48 órás inkubációs idő alkalmazása az *A. corymbifera*-hoz hasonlóan a *R. oryzae* fajnál is nehezen értékelhető adatokat adott, ezért a faj gyors növekedése miatt ebben az esetben a 24 óra elteltével tapasztalt növekedésgátlást vettük figyelembe.

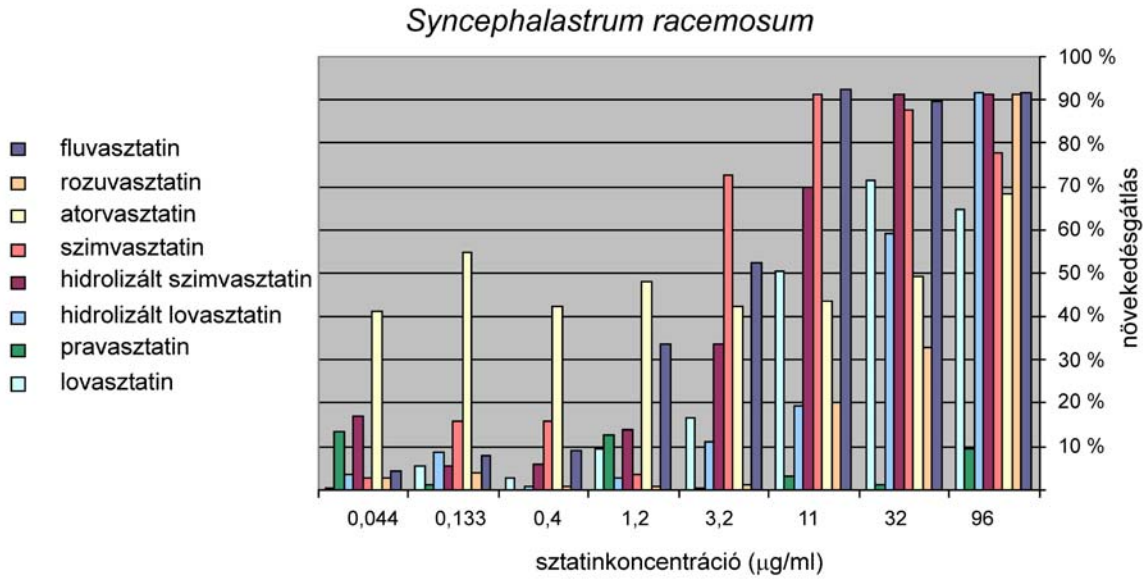


26. Ábra: A *Rhizopus oryzae* sztatin érzékenysége



27. Ábra: A *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis* sztatin érzékenysége

A *Syncephalastrum racemosum* vizsgálatánál azt tapasztaltuk, hogy a többi járomspórás gombától eltérően az atorvasztatin legkisebb alkalmazott koncentrációban (0,044 µg/ml) is több mint 40%-os növekedésgátlást okozott, bár 96 µg/ml-nél sem sikerült 70%-ot meghaladó gátlást elérni (28. Ábra).



28. Ábra: A *Syncephalastrum racemosum* sztatin érzékenysége

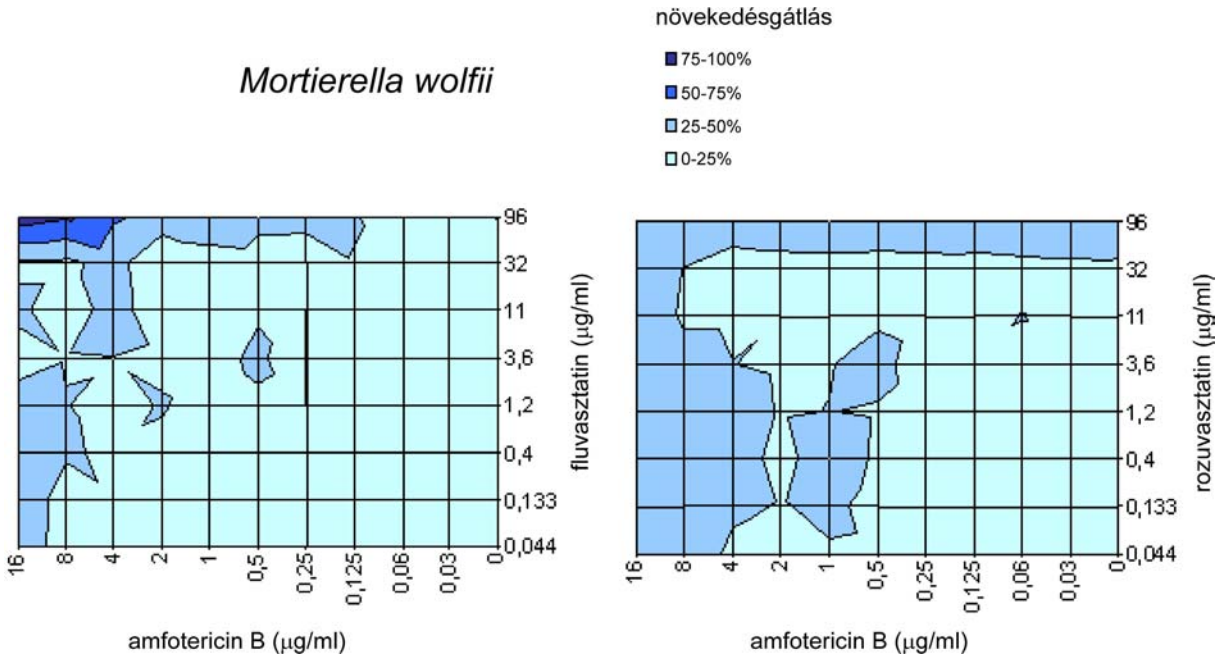
Összefoglalva elmondható, hogy az általunk vizsgált járomspórás gombák mindegyikénél sikerült a sztatinok növekedésgátló hatását kimutatnunk. Az egyes fajoktól, valamint az alkalmazott sztatinoktól függően jelentős eltéréseket tapasztaltunk. A *M. wolfii* valamennyi alkalmazott koncentráció esetén erőteljes rezisztenciát mutatott a sztatinokkal szemben, míg a legérzékenyebbnek a *R. pusillus* fajt találtuk. A sztatinokat növekedésgátló hatásuk alapján nem lehet egyértelműen sorrendbe állítani, a különböző fajok esetében a hatáserősség sorrendje más és más. A különbségek magyarázhatók lehetnek a fajok esetleges sejtfalszerkezeti különbségeivel, a különböző sztatinok eltérő szerkezetük miatt eltérő mértékben juthatnak a sejtekbe. Különbségek lehetnek a fajok HMG-KoA reduktázának szerkezetében is, így az eltérő szerkezetű sztatinok különböző affinitással kötődnek az

enzimhez, és fejtik ki gátló hatásukat. Az érzékenységbeli eltérés magyarázható lehet a *hmgR* gén kópiaszámbeli eltérésével is. Valamennyi faj vizsgálataiból elmondható, hogy a legerősebb növekedésgátló hatással kísérleteinkben a fluvasztatin rendelkezett. A két vizsgált *Rhizopus* faj és a *Mortierella wolffi* izolátumainak növekedése csak nagy koncentrációjú sztatinokkal volt gátolható, de ezeknél is a fluvasztatin hatása volt a legerősebb. Megvizsgáltuk a lovasztatin és a szimvasztatin hidrolizált formájának hatását is. Vizsgálatainkban a szimvasztatinnál nem bizonyult egyértelműen erősebb gátló hatásúnak a szimvasztatin hidrolizált formája, sőt *S. racemosum* törzsnél a nem hidrolizált formával nagyobb növekedésgátlást sikerült elérni. A lovasztatinnál a legtöbb esetben a lovasztatin hidrolizált formája nagyobb gátló hatással rendelkezett, mint a nem hidrolizált forma.

Az amfotericin B és sztatinok együttes hatása járomspórás gombákra

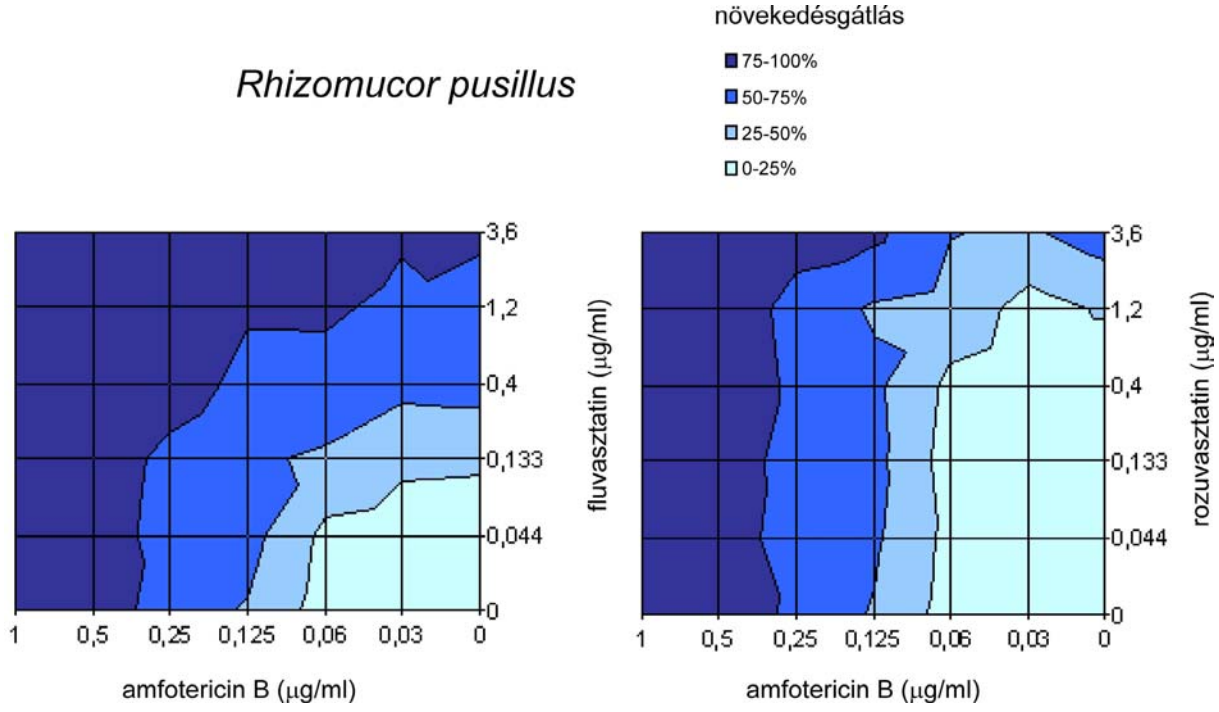
A járomspórás gombák által okozott fertőzések kezelésében legsikeresebben alkalmazott szer az amfotericin B és annak kevesebb mellékhatással rendelkező lipidszármazékai. Az újabb fejlesztésű posakonazol járomspórás gombákkal kapcsolatos gombaellenes hatásáról kevés *in vitro* adat áll rendelkezésünkre. A sztatinok járomspórás gombákra gyakorolt *in vitro* növekedésgátlását látva, megvizsgáltuk az amfotericin B-vel történő együttes alkalmazásának hatását a fluvasztatin és a rozuvasztatin esetében. Valamennyi vizsgált mikroorganizmusnál megvizsgáltuk az amfotericin B (Sigma) CLSI által javasolt koncentrációit (16-0,03 μg/ml), valamint a sztatinok korábban is alkalmazott koncentrációit (96-0,044 μg/ml). Ezután a vizsgálatot megismételtük azon koncentrációk alkalmazásával, melyek ezekben az előkísérletekben gátló hatást mutattak. A vizsgált járomspórás gombák esetében az amfotericin B 1 μg/ml koncentráció felett már jelentős növekedésgátlást okoz (75-100%), ezért a szinergizmus megállapításához az ennél kisebb koncentrációkat vettük figyelembe. Ez alól csak a *Mortierella wolfii* volt kivétel, amelynek növekedését az amfotericin B-nek csak 16 és 8 μg/ml-es koncentrációja tudta gátolni

(kevesebb mint 50%) (29. Ábra). A fluvasztatin legmagasabb alkalmazott koncentrációja (96 µg/ml), 16 és 8 µg/ml amfotericin B-vel együtt adva viszont több mint 75%-os növekedésgátlást okozott. A vizsgált koncentrációknál kapott értékekre az Abott-formulát alkalmazva a fluvasztatin és az amfotericin B kölcsönhatása nem tekinthető szinergizmusnak, a külön-külön mért hatások összeadódnak, additívek.

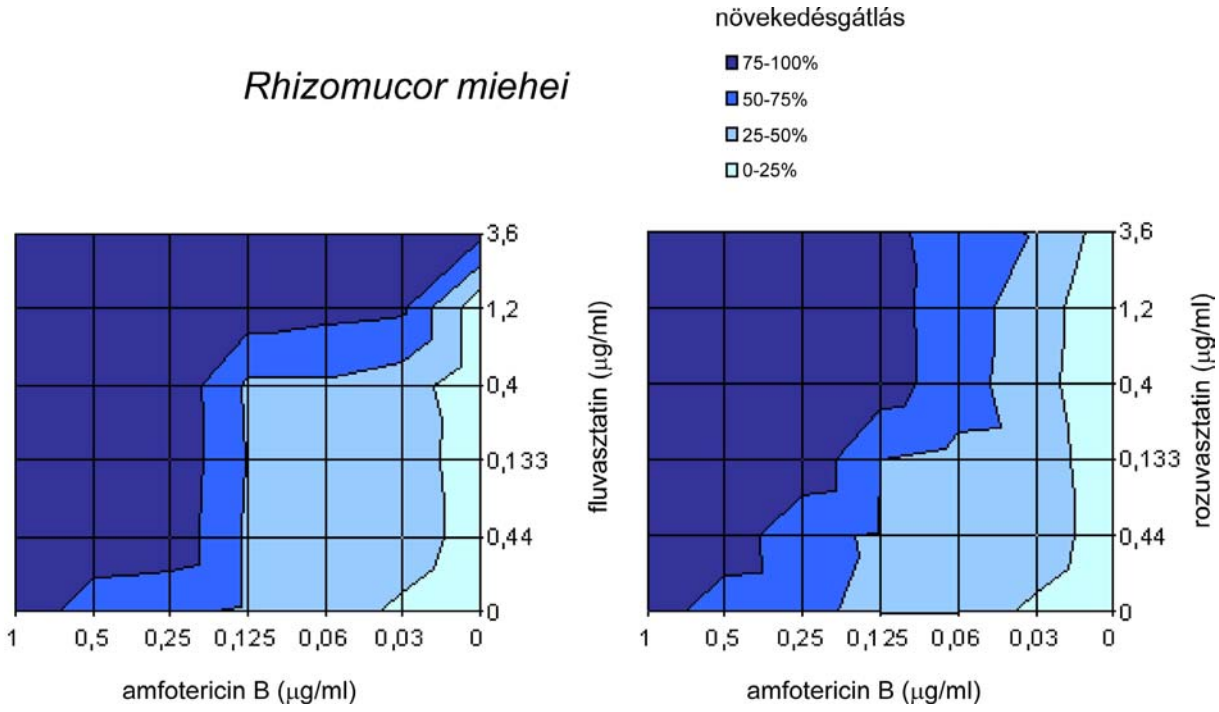


29. Ábra: A *Mortierella wolfii* érzékenységének *in vitro* vizsgálata amfotericin B, fluvasztatin és rosuvasztatin hatására

A két *Rhizomucor* faj vizsgált képviselőiről elmondhatjuk, hogy a fajok amfotericin B érzékenységét tekintve a *R. pusillus* érzékenyebb, már 0,5 µg/ml amfotericin B 90%-os növekedésgátlást okoz, míg ez a koncentráció *R. miehei* esetében csak 60 %-os gátlást okozott (30. és 31. Ábra). A *R. pusillus* esetében 0,125 µg/ml amfotericin B és a legkisebb koncentrációjú fluvasztatin (0,044 µg/ml) több mint 50%-os gátlást eredményez, 1,2 µg/ml fluvasztatin együttes alkalmazásánál pedig 78% gátlást tapasztaltunk. Ezekre az értékekre az Abott-formulát alkalmazva szinergizmusról nem, csak additív hatásról beszélhetünk. Valamennyi vizsgált koncentrációértéknél additivitást mértünk.



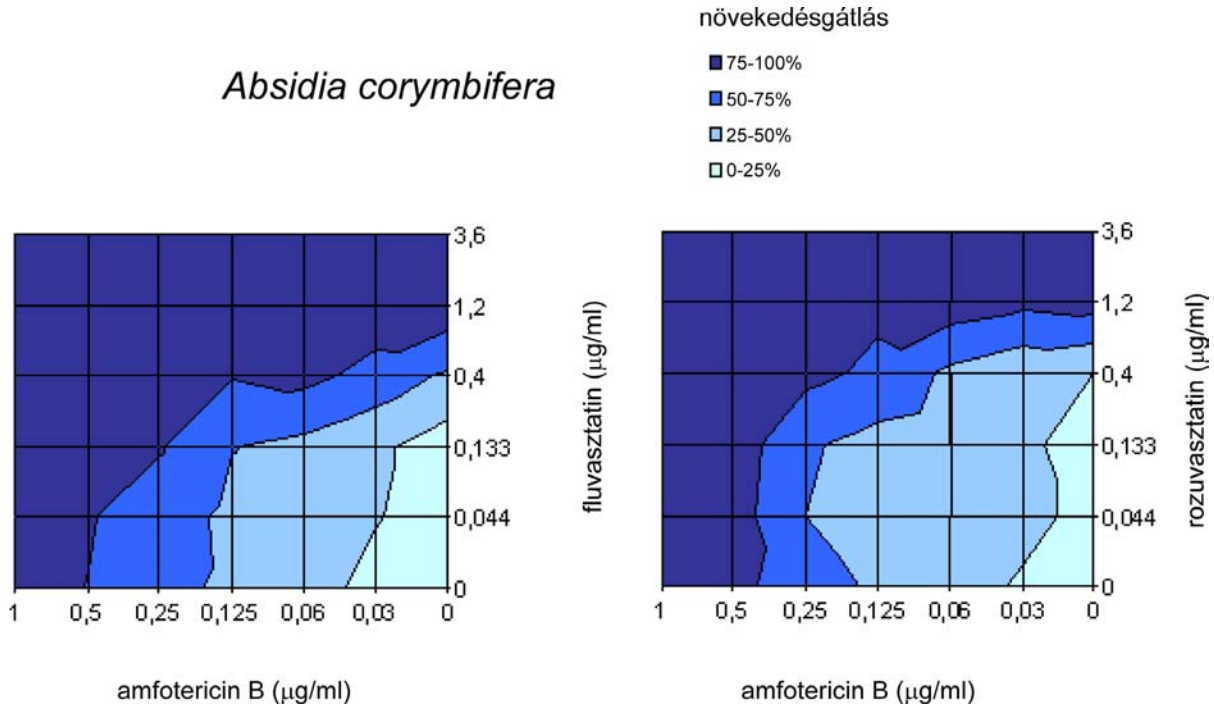
30. Ábra: A *Rhizomucor pusillus* érzékenységének *in vitro* vizsgálata amfotericin B, fluvasztatin és rozuvasztatin hatására.



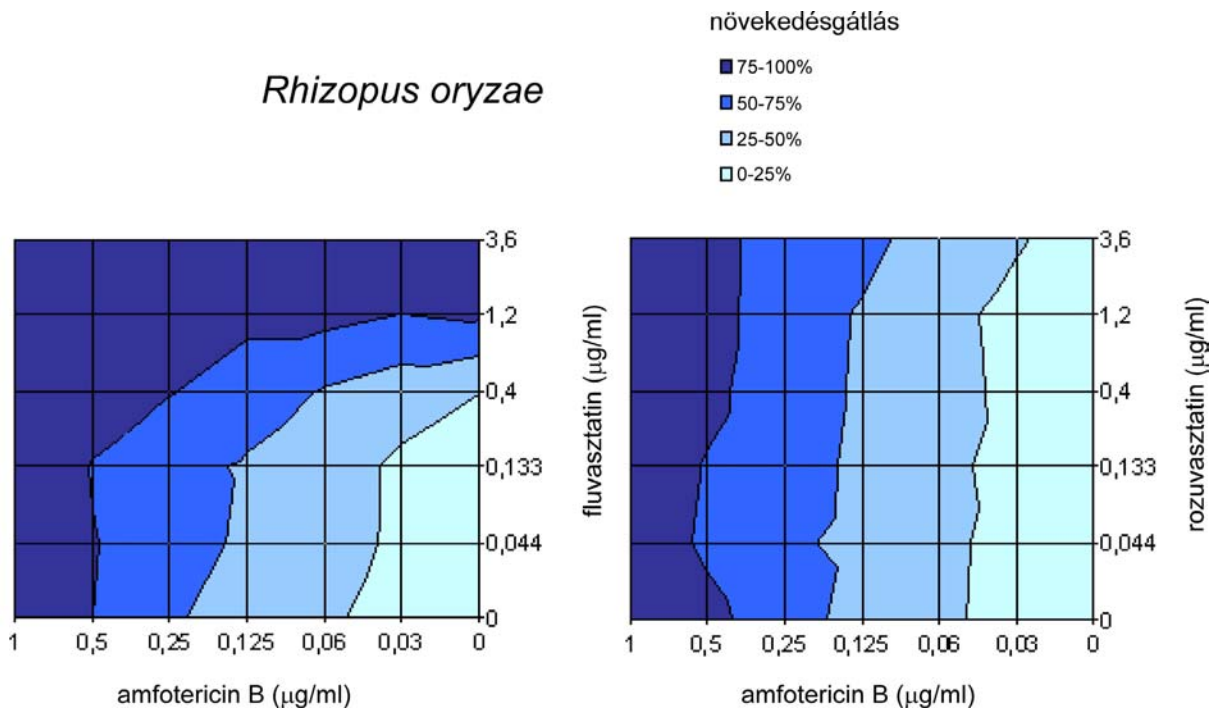
31. Ábra: A *Rhizomucor miehei* érzékenységének *in vitro* vizsgálata amfotericin B, fluvasztatin és rozuvasztatin hatására

Az Abott-formula használatával szinergizmust mutathatunk ki fluvasztatin esetében: 0,03 µg/ml amfotericin B és 0,044-1,2 µg/ml fluvasztatin, valamint 0,03-0,125 µg/ml amfotericin B és 1,2 µg/ml fluvasztatin együtt történő alkalmazásakor. Rozuvasztatinnál szinergizmust mutattunk ki 0,03 µg/ml amfotericin B és 0,044-3,6 µg/ml rozuvasztatin, valamint 0,125-0,5 µg/ml amfotericin B és 0,4-1,2 µg/ml rozuvasztatin együtt történő alkalmazásakor. A többi vizsgált kombinációban additív hatást figyeltünk meg.

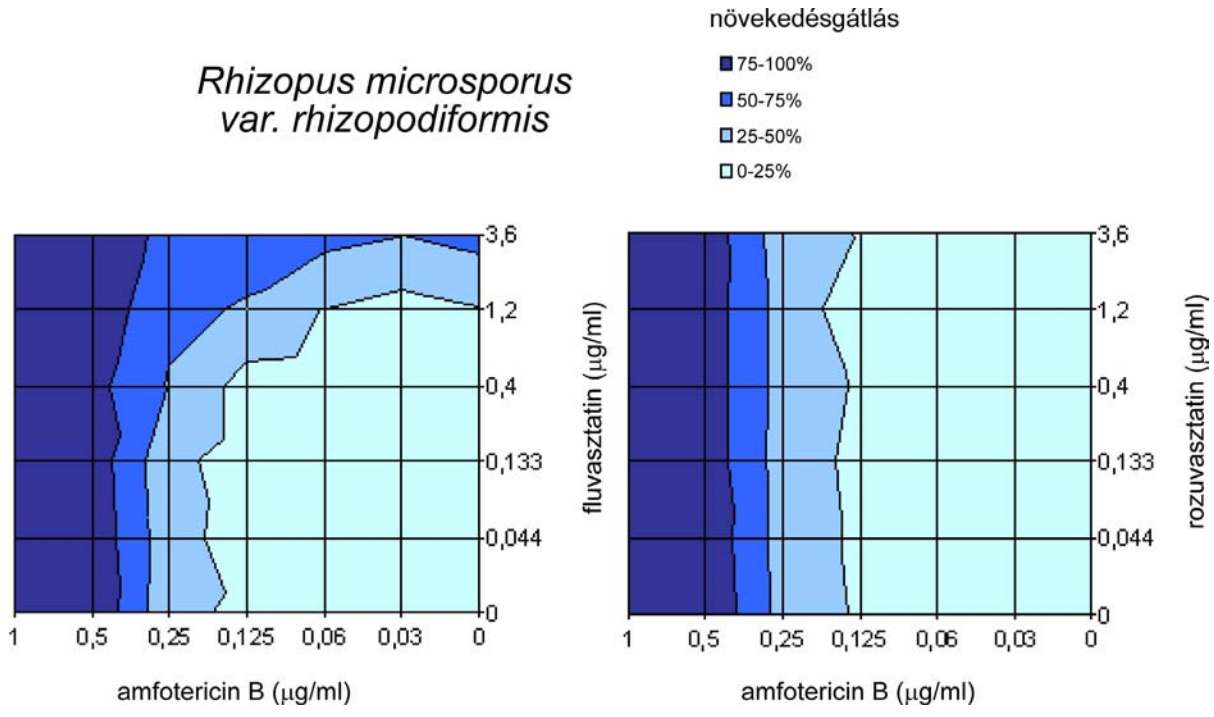
Absidia corymbifera esetében 0,25 µg/ml amfotericin B 57% növekedésgátlást okoz, míg 0,133µg/ml fluvasztatinnal 77%, 0,4 µg/ml fluvasztatinnal 90%-os gátlást eredményez. A 0,25 µg/ml amfotericin B-t 0,4 µg/ml rozuvasztatinnal együtt alkalmazva 82%, 1,2 µg/ml rosuvasztatinnal pedig 88% növekedésgátlást okozott (32. Ábra). Az egyes mérési értékekre Abott-formulát alkalmazva minden esetben additív hatást tapasztaltunk.



32. Ábra: Az *Absidia corymbifera* érzékenységének *in vitro* vizsgálata amfotericin B, fluvasztatin és rozuvasztatin hatására

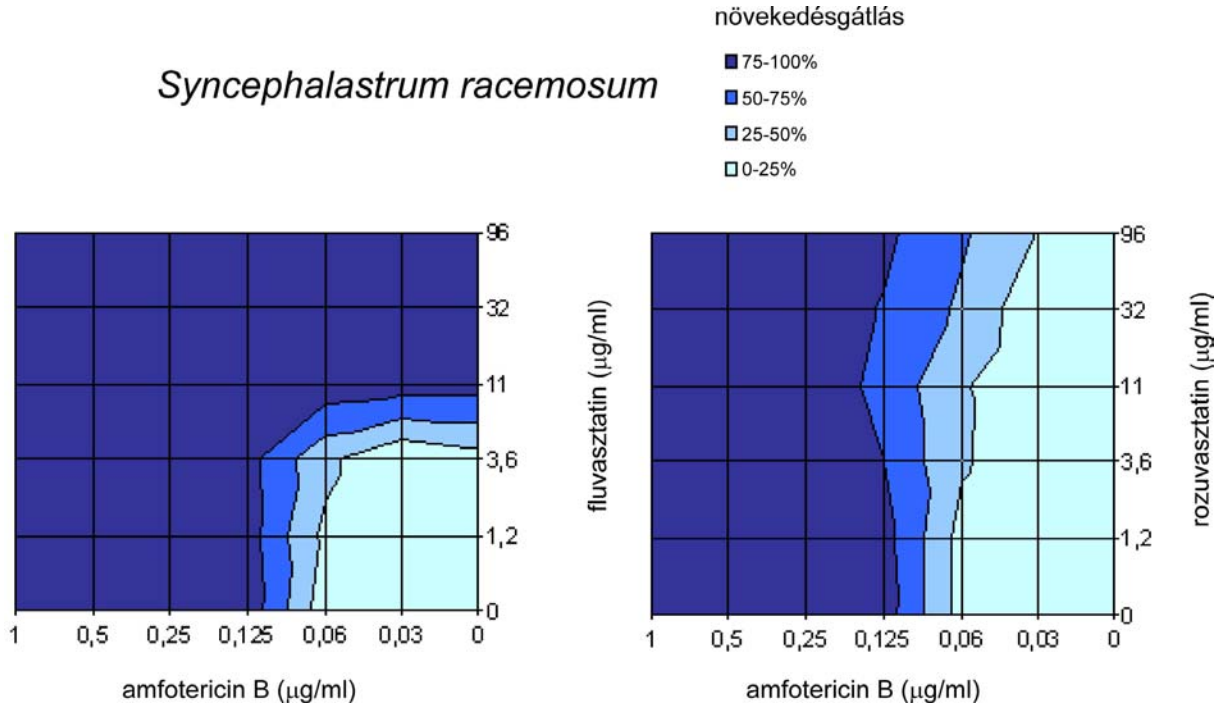


33. Ábra: A *Rhizopus oryzae* érzékenységének *in vitro* vizsgálata amfotericin B, fluvasztatin és rozuvasztatin hatására



34. Ábra: A *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis* érzékenységének *in vitro* vizsgálata amfotericin B, fluvasztatin és rozuvasztatin hatására

A két vizsgált *Rhizopus* fajról elmondhatjuk, hogy amfotericin B-vel szembeni érzékenységük eltérő (33. és 34. Ábra). A *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis* esetében 0,5 µg/ml amfotericin B alkalmazása 75% feletti növekedésgátlást, míg *Rh. oryzae*-nál ez a koncentráció már 95% gátlást okozott. A 0,25 µg/ml amfotericin B *Rh. microsporus* var. *rhizopodiformis* esetében 53%, *Rh. oryzae*-nál csak 30% növekedésgátlást eredményezett. Ehhez az amfotericin B mennyiséghez 1,2 µg/ml fluvasztatint adva *Rh. microsporus* var. *rhizopodiformis* esetében a gátlás 57%-ra növekedett. A vizsgált gátlóvegyületek hatása közötti kölcsönhatás az Abott-formula figyelembevételével mindkét faj esetében additív. A rozuvasztatin alkalmazott alacsony koncentrációi a két *Rhizopus* fajban csak gyenge növekedésgátlást okoztak.



35. Ábra: A *Syncephalastrum racemosum* érzékenységének *in vitro* vizsgálata amfotericin B, fluvasztatin és rozuvasztatin hatására

A *Syncephalatrum racemosum* vizsgált törzsénél azt tapasztaltuk, hogy 0,06 µg/ml amfotericin B 11% gátlást okozott (35. Ábra). Ezzel együtt 3,6 µg/ml fluvasztatint alkalmazva

31% növekedésgátlást okozott. Az amfotericin B kétszeres koncentrációja (0,125 µg/ml) már 90% gátlást eredményez. Az Abott érték kiszámítása után azt tapasztaltuk, hogy az amfotericin B 0,06 µg/ml koncentrációja és 32-96 µg/ml rozuvasztatin együttes alkalmazásakor szinergizmusról, a többi vizsgált esetben pedig additivitásról beszélhetünk.

Összefoglalva elmondhatjuk, hogy az általunk vizsgált járomspórás gombák képviselői *in vitro* körülmények között az amfotericin B-vel szemben érzékenynek mutatkoztak. A *M. wolffii* kivételével minden fajnál több mint 75%-os növekedésgátlás érhető el 1 µg/ml amfotericin B-vel. A két sztatinvegyület különböző koncentrációival együtt alkalmazva a legtöbb esetben a szerek gátló hatása összeadódik, néhány kombinációnál szinergizmust is sikerült kimutatni. Az *in vitro* vizsgálatok eredménye a klinikai alkalmazásnál azonban inkább csak irányadónak tekinthetők, a kezelésnél tapasztalt hatásos dózis egy sor más tényező függvénye (ld.: farmakogenetika, farmakodinamika, farmakokinetika) és a gombafertőzéseknél természetesen függhet a különböző fertőzési módoktól. A különböző sztatinvegyületek farmakodinamikai tulajdonságairól néhány irodalmi adat áll rendelkezésünkre. Negyven mg fluvasztatin beadása után a vérplazma maximális fluvasztatin-koncentrációja 151,7 µg/L volt (Fischer és mtsai. 1999). Pentikainen és mtsai (1992) azonos mennyiségű lovasztatin beadása után 40,4-121,4 µg/L maximális szérumkoncentrációt mutattak ki. Mazzu és mtsai. (2000) 20 mg atorvasztatin esetén 20.9 µg/L 40 mg pravasztatin alkalmazásakor 3.6 µg/L maximális szérumkoncentrációt mértek. Jacobson (2004) 40 mg szimvasztatin, 40 mg pravasztatin és 80 mg atorvasztatin beadását követően sorrendben 6-7 µg/L, 18-64 µg/L és 21-54 µg/L szérumkoncentrációt figyeltek meg. Más kísérletekben különböző sztatinokat valamely más drog együttes alkalmazása szempontjából vizsgáltak annak megállapítására, hogy a szérum sztatinszintjét mennyivel növelik meg. Trivedi és mtsai. (2005) 40 mg rozuvasztatin és 200 mg fenofibrát együttes beadása után 1,8-30 µg/L szérumszintet állapítottak meg. Mindezek alapján feltételezhető,

hogy az egyes sztatinvegyületek 3-150 μg/L koncentrációja érhető el a vérben, amely *in vitro* kísérleteinben a két legkisebb alkalmazott koncentrációnak (0,044-0,133 μg/ml) felel meg. A vérszérum sztatinkoncentrácójának mérése minden közölt esetben arra irányul, hogy a magas koleszterinszint kezelése során az egyes betegekben milyen mellékhatások léphetnek fel, különösen azokban az esetekben, amikor valamely más betegség kezelésére hasonló anyagcsereúton hasznosuló drogot is kap a beteg. Ma már a sztatinok alkalmazásakor ellenjavallt számos, a citokróm P450 enzimrendszeren keresztül lebontásra kerülő, gombaellenes kezelésben tipikusan használt azol adása, de nem található vizsgálat az amfotericin B, vagy lipidszármazékainak sztatinokkal együttes alkalmazásáról. Kísérleteinkből és számos irodalmi adatból is kitűnik, hogy a hagyományosan alkalmazott azolokhoz képest a járomspórás gombák sokkal érzékenyebbek az amfotericin B-re. Amennyiben az amfotericin B eltérő metabolizmusa miatt együtt alkalmazható sztatinokkal, érdemes lenne megvizsgálni a gombás fertőzések kezelésében tapasztalt hatásukat.

ÉRTÉKELÉS

Kísérleteink eredményeként azonosítottuk és jellemeztük a *R. miehei* járomspórás gomba *hmgR* génjét. A megismert DNS szakasz 4977 bp hosszúságú, 1058 aminosavat kódol, és öt intront tartalmaz. Megállapítottuk, hogy a *R. miehei* genomja egy kópiában tartalmazza a kérdéses gént. PCR reakció segítségével azonosítottuk a *X. dendrorhous* élesztőgomba *hmgR* génjének egy 315 bp hosszúságú szakaszát, amely a fehérje katalitikus doménjének egy részét kódolja, és nagy hasonlóságot mutat más, ismert HMG-KoA reduktázokkal. További kísérletekben a teljes *hmgR* gén nukleotidszekvenciája meghatározható, mely lehetőséget nyújt ezen gombafaj asztaxantintermelésének további vizsgálatára és esetlegesen fokozására.

A *R. miehei hmgR* gén 964 bp hosszúságú promóterének, valamint a zöld fluoreszcens protein (GFP) kódoló szakaszának felhasználásával transzformáló vektort készítettünk, mellyel sikeresen transzformáltuk a *M. circinelloides* MS12 törzsét. A transzformált törzset fluoreszcens mikroszkóp segítségével vizsgálva megállapítottuk, hogy a *R. miehei hmgR* génjének promótere működőképes GFP fehérje termelődését teszi lehetővé *M. circinelloides*-ben.

A teljes *R. miehei* eredetű *hmgR* gén felhasználásával készült vektort bejuttatva *M. circinelloides* MS12 törzsébe, a törzs megnövekedett rezisztenciáját figyeltük meg a HMG-KoA reduktáz szelektív gátlószerével, a fluvasztatinnal szemben. A fluvasztatin más sztatinokhoz hasonlóan növekedésgátló hatást fejt ki a gombasejtekben azáltal, hogy a nélkülözhetetlen vegyületek szintéziséhez vezető acetát/mevalonát reakcióút egyik kulcslépését gátolja.

Megvizsgáltuk továbbá a *Rhizomucor* nemzetséghez tartozó két faj, a *R. miehei* és a *R. pusillus* összesen 27 izolátumának lovasztatinnal szembeni érzékenységét, és az érzékenységet esetlegesen befolyásoló körülmények (pH, táptalajösszetétel, spóramennyiség) hatását az *in vitro* vizsgálatokra. Kimutattuk, hogy a két faj lovasztatinnal szemben mutatott

érzékenysége jelentős mértékben eltér. Ennek a tapasztalatnak a felhasználásával kidolgoztunk egy egyszerű tenyésztéses módszert a két faj elkülönítésére. Ez a módszer egyrészt lehetőséget nyújt a két igen közeli rokon faj megkülönböztetésére molekuláris módszerek alkalmazása nélkül, másrészt feltételezi, hogy a két faj más, gombaellenes szerként alkalmazott vegyületekkel szemben is eltérő érzékenységű lehet. Ezek a különbségek sejtszerkezetbeli, vagy valamely részleteiben eddig nem ismert belső enzimrendszerrel kapcsolatos különbséggel magyarázhatók, mely más humán fertőzéseket okozó járomspórás gombák körére is kiterjeszthető. Ehhez kapcsolódóan megvizsgáltuk 7 opportunista patogénként számontartott járomspórás gombafaj, a *R. miehei*, *R. pusillus*, *A. corymbifera*, *M. wolfii*, *S. racemosum*, *Rh. oryzae* és *Rh. microsporus* var. *rhizopodiformis* érzékenységét a jelenleg koleszterinszint-csökkentő gyógyszerként forgalomban lévő sztatinokkal (lovasztatin, szimvasztatin, rosuvasztatin, atorvasztatin, pravasztatin, fluvasztatin) szemben. Ezekben a kísérletekben mindegyik gomba más-más sztatinra volt a legérzékenyebb, és ugyanaz a sztatin különböző mértékű növekedésgátló hatást fejtett ki a különböző fajokban.

A két legerősebb növekedésgátlást okozó anyagot, a fluvasztatint és a rosuvasztatint kiválasztva megvizsgáltuk e vegyületek együttes hatását amfotericin B-vel, mely a járomspórás gombás fertőzésekkel szemben máig leghatékonyabban alkalmazott gombaellenes szer. Ezekben a kísérletekben szinergizmust alig, de additív hatást minden esetben megfigyelhettünk.

Az érzékenységvizsgálatokkal kapcsolatban hangsúlyozni kell, hogy ezekben csak *in vitro* érzékenységet lehet kimutatni, így ezek hatása humán alkalmazás során jelentősen eltérő lehet. A járomspórás gombás fertőzések általában más, igen súlyos betegségekkel kapcsoltan lépnek fel, melyek kezelése során a gombaellenes szerekhez hasonlóan komoly mellékhatásokkal rendelkező szereket alkalmaznak. Ezekből az eredményekből is kitűnik, hogy a veszélyeztetett betegek körében egyre gyakrabban fellépő járomspórás

gombafertőzéseket okozó fajoknak a különböző gombaellenes szerekkel, vagy más vegyületekkel szembeni érzékenysége jelentősen eltérhet, ami meghatározó lehet a kezelés szempontjából.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom témavezetőmnek Dr. Papp Tamásnak a munkámban nyújtott értékes szakmai tanácsokért és a segítségért, amellyel támogatott munkámban.

Köszönöm Dr. Vágvölgyi Csaba professzornak az áldozatos munkát, mellyel lehetővé tette dolgozatom elkészítését, valamint a nélkülözhetetlen szakmai ismereteket.

Hálával tartozom Dr. Ács Klárának és Dr. Vastag Máriának a tanulmányaim kezdetén szerzett gyakorlati ismeretekért és segítségükért.

Köszönöm Nyilasi Ildikónak és Csernetics Árpádnak barátságukat, a szakmai beszélgetéseket és a munkámban nyújtott segítségüket.

Köszönet illeti a 309-es labor minden dolgozóját Heinrich Henriettát, Dr. Kasza Zsoltot, Péteri Zsanettet, Linka Beátát, Takó Miklóst, Dr. Galgóczy Lászlót, Kocsubé Sándort és Dr. Rigó Krisztát a laborban nyújtott segítségükért.

Hálás vagyok Dr. Ferenczy Lajos professzornak és Dr. Kevei Ferenc professzornak, hogy lehetővé tették és segítették munkámat a Mikrobiológiai Tanszéken.

Köszönöm a tanszék többi dolgozójának különösen Dr. Palágyi Andrásnénak és Lele Máriának kedvességüket és munkájukat.

Hálás vagyok szüleimnek, testvéreimnek, barátaimnak, hogy mindenben támogatnak, és türelemmel kitartanak mellettem.

IRODALOMJEGYZÉK

Abott W.S. (1925) A method for computing the effectiveness of an insecticide. *J Econ Entomol* **18**: 265-267.

Afeltra, J., Vitale, R.G., Mouton, J.W. and Verweij, P.E. (2004) Potent synergistic *in vitro* interaction between nonantimicrobial membrane-active compounds and itraconazole against clinical isolates of *Aspergillus fumigatus* resistant to itraconazole. *Antimicrob Agents Chemother* **48** (4): 1335-1343.

Alspaugh, J.A., Davidson, R.C. and Heitman, J. (2005) Morphogenesis of *Cryptococcus neoformans*. *Contrib Microbiol*. Review. **5**: 217-238.

Amorosa L. (1994) Efficacy and safety of fluvastatin in special patient groups. *Clin Cardiol* **17** (suppl 4): IV21-IV27.

An, G. and Johnson, E.A. (1990) Influence of light on growth and pigmentation of the yeast *Phaffia rhodozyma*. *Antonie van Leeuwenhoek*. **57**: 191-203.

Anderson, R.G., Orci, L., Brown, M.S., Garcia-Segura, L.M. and Goldstein, J.L. (1983) Ultrastructural analysis of crystalloid endoplasmic reticulum in UT-1 cells and its disappearance in response to cholesterol. *J Cell Sci* **63**: 1-20.

Appel, S. and Dingemanse, J. (1996) Pharmacokinetic and pharmacodynamic interactions of fluvastatin and their therapeutic implications. *Rev Contemp Pharmacother* **7**: 167–182.

Vojtek, A.B. and Der, C.J. (1998) Increasing Complexity of the Ras Signaling Pathway. *J Biol Chem*. Minireview **273**(32): 19925-19928.

Austin, D.J., Bu'Lock, J.D. and Gooday, G.W. (1969) Trisporic acids: sexual hormones from *Mucor mucedo* and *Blakeslea trispora*. *Nature* (London) **223**: 1178-1179.

Barchiesi, F., Spreghini, E., Santinelli, A., Fothergill, A.W., Pisa, E., Giannini, D., Rinaldi, M.G., Scalise, G. (2007) Posaconazole prophylaxis in experimental systemic zygomycosis. *Antimicrob Agents Chemother* **51**(1): 73-77.

Basson, M.E., Thorsness, M.K., Finer-Moore, J., Stroud, R. and Rine, J. (1988) Structural and functional conservation between yeast and human 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme reductases, the rate-limiting enzyme of sterol biosynthesis. *Mol Cell Biol* **9**: 3797-3808.

Bejarano, E.R. and Cerdá-Olmedo, E. (1992) Independence of the carotene and sterol pathways of *Phycomyces*. *FEBS Lett* **306**(2-3): 209-212.

Benito, E.P., Díaz-Mínguez, J.M., Itturiaga, E.A., Campuzano, E.A., Eslava, A.P. (1992) Cloning and sequence analysis of the *Mucor circinelloides pyrG* gene encoding orotidine-5'-monophosphate decarboxylase: use of *pyrG* for homologous transformation. *Gene* **116**: 59-67.

Berns, J.S., Lederman, M.M., Greene, B.M. (1984) Nonsurgical cure of pulmonary mucormycosis. *Am J Med Sci* **287**(1): 42-44.

Bhosale, P. (2004) Environmental and cultural stimulants in the production of carotenoids from microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol* **63**: 351–361.

Blitzer, A., Lawson, W., Meyers, B.R., Biller, H.F. (1980) Patient survival factors in paranasal sinus mucormycosis. *Laryngoscope* **90**(4): 635-648.

Boguski, M.S. and McCormick, F. (1993) Proteins regulating *Ras* and its relatives. *Nature*. **366**(6456): 643-654.

Bourne, H.R., Sanders, D.A. and McCormick, F. (1990) The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. *Nature*. **348**(6297): 125–132.

Brown, M.S. and Goldstein, J.L. (1999) A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Review. **96**(20): 11041-11048.

Burmester, A. and Czempinski, K. (1994) Sequence comparison of a segment of the gene for 3-hydroxy-methylglutaryl-coenzyme A reductase in zygomycetes. *Eur J Biochem* **220**: 403-408.

Cardoza, R.E., Hermosa, M.R., Vizcaino, J.A., Gonzalez, F., Llobell, A., Monte, E., and Gutierrez, S. (2007) Partial silencing of a hydroxy-methylglutaryl-CoA reductase-encoding gene in *Trichoderma harzianum* CECT 2413 results in a lower level of resistance to lovastatin and lower antifungal activity. *Fung Genet Biol* **44**: 269-283.

Chakrabarti, A., Das, A., Sharma, A., Panda, N., Das, S., Gupta, K.L. and Sakhuja, V. (2001) Ten years' experience in zygomycosis at a tertiary care centre in India. *J Infect* **42**(4): 261-266.

Chamilos, G., Lewis, R.E. and Kontoyiannis, D.P. (2006) Lovastatin has significant activity against Zygomycetes and interacts synergistically with voriconazole. *Antimicrob Agents Chemother* **50**: 96-103.

Chen, H.J. and Shapiro, D.J. (1990) Nucleotide sequence and estrogen induction of *Xenopus laevis* 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase. *J Biol Chem*. **265**(8): 4622-4629.

Chin, D.J., Gil, G. and Russel, D.W. (1984) Nucleotide sequence of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme reductase, a glycoprotein of endoplasmic reticulum. *Nature* (London) **308**: 613-617.

Chin, N-X., Weitzmen, I. and Della-Latta, P. (1997). In vitro activity of fluvastatin, a cholesterol-lowering agent, and synergy with fluconazole against *Candida* species and *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrob Agents Chemother* **41**: 850-852.

Choi, D., Ward, B.L. and Bostock, R.M. (1992) Differential induction and suppression of potato 3-hydroxy-3-methylglutharyl coenzyme A reductase genes in response to *Phytophtora infestans* and to its elicitor arachidonic acid. *Plant Cell* **10**: 1333-1344.

Christians, U., Jacobsen, W. and Floren, L.C. (1998) Metabolism and drug interactions of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors in transplant patients: Are the statins mechanistically similar? *Pharmacol Ther* **80**(1): 1-34.

Cooney, D.G. and Emerson, R. Thermophilic fungi: an account of their biology, activities, and classification. San Francisco/London; W.H. Freeman; 1964. 188 p.

Cooney and R. Emerson, 1964, LEG Image by S. de Hoog Literature Hoog, G.S. de 2000, Atlas of clinical fungi: 95-98.

Corrochano, L.M., Avalos, J. (1992) Cloning a segment of the gene encoding 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in *Phycomyces blakesleeanus* and *Gibberella fujikuroi* by the plymerase chain reaction. *Experimental Mycology* **16:** 167-171.

Croxen, R., Croosey, M.W., Keon, J.P.R. and Hargreaves, J.A. (1994) Isolation of an *Ustilago maydis* gene encoding 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase and expression of a C-terminal-truncated form in *Escherichia coli*. *Microbiol* **140**: 2363-2370.

Dale, S., Arro, M., Becerra, B., Morrice, N.G., Boronat, A., Hardie, D.G., Ferrer, A. (1995) Bacterial expression of the catalytic domain of 3-hydroxy-3-methylglutharyl-CoA reductase (isoform HMGR1) from *Arabidopsis thaliana*, and its inactivation by phosphorylation at Ser577 by *Brassica oleracea* 3-hydroxy-3-methylglutharyl-CoA reductase kinase. *Eur J Biochem* **233**: 506-513.

Davies, J.P. and Ioannou, Y.A. (2006) The role of the Niemann-Pick C1-like 1 protein in the subcellular transport of multiple lipids and their homeostasis. *Curr Opin Lipidol* Review. **17**(3): 221-226.

Dimitroulakos, J., Nohynek, D., Backway, K.L., Hedley, D.W., Yeger, H., Freedman, M.H., Minden, M.D. and Penn, L.Z. (1999) Increased sensitivity of acute myelogenous leukemias to lovastatin-induced apoptosis: a potential therapeutic approach. *Blood* **93**: 1308-1318.

Dimitroulakos, J. and Yeger, H. (1996) HMG-CoA reductase mediates the biological effects of retinoic acid on human neuroblastoma cells: lovastatin specifically targets P-glycoprotein-expressing cells. *Nat Med* **2**(3): 326-333.

Dufossé, L., Galaup, P., Yaron, A., Arad, S.M., Blanc, P., Murthy, C.N.C. and Ravishankar G.A. (2005) Microorganisms and microalgae as sources of pigments for food use: a scientific oddity or an industrial reality? Trends Food Sci Tech **16**: 389-406.

Eisenreich, W., Menhard, B., Hylands, P.J., Zenk, M.H. and Bacher, A. (1996) Studies on the biosynthesis of taxol: the taxane carbon skeleton is not of mevalonoid origin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(13): 6431–6436.

Eisenreich, W., Sagner, S., Zenk, M. H. and Bacher, A. (1997) Monoterpenoid essential oils are not of mevalonoid origin. *Tetrahedron Lett* **38**: 3889–3892.

Elanjikal, Z., Sörensen, J., Schmidt, H., Dupuis, W., Tintelnot, K., Jautzke, G., Klingebiel, T. and Lehrnbecher, T. (2003) Combination therapy with caspofungin and liposomal amphotericin B for invasive aspergillosis. *Pediatr Infect Dis J* **22**(7): 653-656.

Ellis, R.W., Defeo, D., Shih, T.Y., Gonda, M.A., Young, H.A., Tsuchida, N., Lowy, D.R. and Scolnick, E.M. (1981) The p21 *src* genes of Harvey and Kirsten sarcoma viruses originate from divergent members of a family of normal vertebrate genes. *Nature* **292**(5823): 506-511.

Endo, A., Tsujita, Y., Kuroda, M. and Tanzana, K. (1977) The inhibition of cholesterol synthesis, *in vitro* and *in vivo* by ML-236A and ML-236B, competitive inhibitors of HMG-CoA reductase. *Eur J Biochem* **77**: 31-36.

Eucker, J., Sezer, O., Graf, B. and Possinger, K. (2001) Mucormycoses. *Mycoses* Review. **44**(7-8): 253-260.

Evans, E.G.V., Gentles, J.C. Essentials of Medical Mycology. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1985.

Fenton, R.G., Kung, H.F., Longo, D.L. and Smith, M.R. (1992) Regulation of intracellular actin polymerization by prenylated cellular proteins. *J Cell Biol* **117**(2): 347-356.

Fischer, V., Johanson, L., Heitz, F., Tullman, R., Graham, E., Baldeck, J-P. and Robinson W. T. (1999) The 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor fluvastatin: effect on human cytochrome P-450 and implications for metabolic drug interactions. *Drug Metab Dispos* **27**(3): 410-416.

Fortwendel, J.R., Panepinto, J.C., Seitz, A.E., Askew, D.S., Rhodes, J.C. (2004) *Aspergillus fumigatus rasA* and *rasB* regulate the timing and morphology of asexual development. *Fungal Genet Biol* **41**(2): 129-139.

Fortwendel, J.R., Zhao, W., Bhabhra, R., Park, S., Perlin, D.S., Askew, D.S. and Rhodes, J.C. (2005) A fungus-specific *ras* homolog contributes to the hyphal growth and virulence of *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryot Cell* **4**(12):1982-1989.

Funada, H. and Matsuda, T. (1996) Pulmonary mucormycosis in a hematology ward. *Intern Med* **7**: 540-544.

Garnett, W.R. (1994) The pharmacology of fluvastatin, a new HMG-CoA reductase inhibitor. *Clin Cardiol* **17**(suppl. 4): IV3-IV10.

Genschik, P., Criqui, M.C., Parmentier, Y., Marbach, J., Durr, A., Fleck, J. and Jamet. E.(1992) Isolation and characterization of a cDNA encoding a 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase from *Nicotiana sylvestris*. *Plant Mol Biol* **20**(2): 337-341.

Gertler, F.B., Chiu, C.Y., Richter-Mann, L. and Chin, D.J. (1988) Developmental and metabolic regulation of the *Drosophila melanogaster* 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *Mol Cell Biol* **8**(7): 2713-2721.

Gil, G., Faust, JR., Chin, D.J., Goldstein, J.L. and Brown, M.S. (1985) Membrane- bound domain of HMG-CoA reductase is required for sterol-enhanced degradation of the enzyme. *Cell* **41**: 249-258.

Giordano,W., Avalos,J., Fernandez-Martin, R., Cerda-Olmedo, E. and Domenech, C.E.(1999) Lovastatin inhibits the production of gibberellins but not sterol or carotenoid biosynthesis in *Gibberella fujikuroi. Microbiology* **145**: 2997 -3002.

Goldstein, J.L. and Brown, M.S. (1990) Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* **343:** 425-430.

Gottesman, M.M. and Pastan I. (1993) Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu Rev Biochem* **62**: 385-427.

Greco, W.R., Bravo, G. and Parsons, J.C. (1995) The search for synergy: a critical review from a response surface perspective. *Pharmacol Rev* **47**(2): 331-385. Review.

Greenberg, R.N., Mullane, K., van Burik, J.A., Raad, I., Abzug, M.J., Anstead, G., Herbrecht, R., Langston, A., Marr, K.A., Schiller, G., Schuster, M., Wingard, J.R., Gonzalez, C.E., Revankar, S.G., Corcoran, G., Kryscio, R.J. and Hare, R. (2006) Posaconazole as salvage therapy for zygomycosis. *Antimicrob Agents Chemother* **50**(1): 126-133.

Gruhn, J.G. and Sanson J. (1963) Mycotic infections in leukemic patients at autopsy. *Cancer* **16**: 61-73.

Gu, W.L., An, G.H. and Johnson, E.A. (1997) Ethanol increases carotenoid production in Phaffia rhodozyma, *J Ind Microbiol Biotechnol* **19**: 114–117.

Guengerich, F.P. (1995) Human cytochrome P450 enzymes. In: Cytochrome P450: Structure, mechanism and biochemistry 2nd edn. Pp. 473-535. Ortiz de Montellano, P.R. (ed.) Plenum Press, New York.

Hall, A. (1998) Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* **279**: 509-514.

Hampton, R.Y. and Rine, J. (1994) Regulated degradation of HMG-CoA reductase, an integral membrane protein of the endoplasmatic reticulum in yeast. *J Cell Biol* **125**: 299-312.

Helmberg, A., Fässler, R., Geley, S., Jöhrer, K., Kroemer, G., Böck, G. and Kofler R. (1990) Glucocorticoid-regulated gene expression in the immune system. Analysis of glucocorticoid-regulated transcripts from the mouse macrophage-like cell line P388D1. *J Immunol* **145**(12): 4332-4337.

Herman, R.J. (1999) Drug interactions and the statins. *CMAJ.* Review. **161**(10): 1281-1286.

Hornby, J.M., Jensen, E.C., Lisec, A.D., Tasto, J.J., Jahnke, B., Shoemaker, R., Dussault, P. and Nickerson, K.W. (2001) Quorum sensing in the dimorphic fungus *Candida albicans* is mediated by farnesol. *Appl Environ Microbiol* **67**: 2982-2992.

Hornby, J.M., Kebaara, B.W. and Nickerson, K.W. (2003) Farnesol biosynthesis in *Candida albicans*: cellular response to sterol inhibition by zaragozic acid B. *Antimicrob Agents Chemother* **47**(7): 2366-2369.

Hornby, J.M. and Nickerson, K.W. (2004) Enhanced production of farnesol by *Candida albicans* treated with four azoles. *Antimicrob Agents Chemother* **48**(6): 2305-2307.

Ibrahim, A.S., Bowman, J.C., Avanessian, V., Brown, K., Spellberg, B., Edwards, J.E. Jr. and Douglas, C.M. (2005) Caspofungin inhibits *Rhizopus oryzae* 1,3-beta-D-glucan synthase, lowers burden in brain measured by quantitative PCR, and improves survival at a low but not a high dose during murine disseminated zygomycosis. *Antimicrob Agents Chemother* **49**(2): 721-727.

Istvan, E.S. and Deisenhofer, J. (2001) Structural mechanism for statin inhibition of HMG-CoA reductase. *Science* **292**: 1160-1164.

Jacobson, T.A. (2004) Comparative pharmacokinetic interaction profiles of pravastatin, simvastatin, and atorvastatin when coadministered with cytochrome P450 inhibitors. *Am J Cardiol* **94**(9): 1140-1146.

Jiménez, C., Lumbreras, C., Paseiro, G., Loinaz, C., Romano, D.R., Andrés, A., Aguado, J.M., Morales, J.M., del Palacio, A., García, I. and Moreno, E.(2002) Treatment of *Mucor* infection after liver or pancreas-kidney transplantation. *Transplant Proc* **34**(1): 82-83.

Johnson, E.A. (2003) *Phaffia rhodozyma*: colorful odyssey. Int Microbiol **6**:169-174.

Johnson, E.M., Szekely, A. and Warnock, D.W. (1998) *In-vitro* activity of voriconazole, itraconazole and amphotericin B against filamentous fungi. *J Antimicrob Chemother* **42**(6): 741-745.

Jones, K.D., Couldwell, W.T., Hinton, D.R., Su, Y., He, S., Anker, L. and Law, R.E. (1994) Lovastatin induces growth inhibiton and apoptosis human malignant glioma cells. *Biochem Biophys Res Commun* **205**: 1681-1687.

Kantola, T., Kivistö, K. and Neuvonen P. (1997) Effect of itraconazole on the pharmacokinetics of atorvastatin. *Clinical Pharm Ther* **64**(1): 58-65.

Kataoka, T., Powers, S., McGill, C., Fasano, O., Strathern, J., Broach, J. and Wigler, M. (1984) Genetic analysis of yeast RAS1 and RAS2 genes. *Cell* **37**(2): 437-445.

Kaul, D. and Khosla, V.K. (2000) Molecular basis of 'cholesterol feedback lesion' in CNS tumors. *Neurol India* **48**: 174–177.

Kaur, M., Kaul, D. and Sobti, R.C. (1998) Receptor-Ck-dependent regulation of genes involved in the cell cycle. *Mol Cell Biochem* **181**(1-2): 137-142.

Kline, M.W. (1985) Mucormycosis in children: review of the literature and report of cases. *Pediatr Infect Dis* **4**(6): 672-676.

Learned, R.M. and Fink, G.R. (1989) 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase from *Arabidopsis thaliana* is structurally distinct from the yeast and animal enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(8): 2779-2783.

Leberer, E., Harcus, D., Dignard, D., Johnson, L., Ushinsky, S., Thomas, D.Y. and Schroppel, K. (2001) Ras links cellular morphogenesis to virulence by regulation of the MAP kinase and cAMP signalling pathways in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Mol Microbiol* **42**(3): 673-687.

Lengeler, K.B., Davidson, R.C., D'souza, C., Harashima, T., Shen, W.C., Wang, P., Pan, X., Waugh, M. and Heitman J. (2000) Signal transduction cascades regulating fungal development and virulence. Review. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**(4): 746-785.

Lennernäs, H. and Fager, G. (1997) Pharmacodynamics and pharmacokinetics of the HMG-CoA reductase inhibitors: similarities and differences. *Clin Pharmacokinet* **32**: 403-425.

Liao, J.K. and Laufs, U. (2005) Pleiotropic effects of statins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **45**: 89-118.

Lichtenthaler, H.K., Rohmer, M. and Schwender, J. (1997) Two independent biochemical pathways for isopentenyl diphosphate and isoprenoid biosynthesis in higher plants. *Physiol Plant* **101**: 643-652.

Lindt, W. (1886) Mitteilungen über einige neue pathogene Shimmelpilze. *Arch Exp Pathol Pharmakol* **21**: 269–298.

Liscum, L., Finer-Moore, J., Stroud, R.M., Luskey, K.L., Brown, M.S. and Goldstein J.L. (1985) Domain structure of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase, a glycoprotein of the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **260**(1): 522-530.

Loftus, S.K., Morris, J.A., Carstea, E.D., Gu, J.Z., Cummings, C., Brown, A., Ellison, J., Ohno, K., Rosenfeld, M.A, Tagle, D.A., Pentchev, P.G. and Pavan, W.J. (1997) Murine model of Niemann-Pick C disease: mutation in a cholesterol homeostasis gene. *Science* **277**(5323): 180-181.

Lum, P.Y., Edwards, S. and Wright. R. (1996) Molecular, fuctional and evolutionary characterization of the gene encoding HMG-CoA reductase in fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* **12**: 1107-1124.

Luskey, K.L. and Stevens, B. (1985) Human 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. Conserved domains responsible for catalytic activity and sterol-regulated degradation. *J Biol Chem* **260**(18): 10271-10277.

Marr, K.A., Carter, R.A., Boeckh, M., Martin, P. and Corey L. (2002) Invasive aspergillosis in allogeneic stem cell transplant recipients: changes in epidemiology and risk factors. *Blood* **100**(13): 4358-4366.

Marty, F.M., Cosimi, L.A. and Baden, L.R. (2004) Breakthrough zygomycosis after voriconazole treatment in recipients of hematopoietic stem-cell transplants. *N Engl J Med* **350**(9): 950-952.

Mazzu, A.L., Lasseter, K.C., Shamblen, E.C., Agarwal, V., Lettieri, J. and Sundaresen, P. (2000) Itraconazole alters the pharmacokinetics of atorvastatin to a greater extent than either cerivastatin or pravastatin. *Clin Pharmacol Ther* **68**: 391–400.

Meyer, R.D., Rosen, P. and Armstrong, D. (1972) Phycomycosis complicating leukemia and lymphoma. *Ann Intern Med* **77**(6): 871-879.

Miehe, H. Die Selbsterhitzung des Heus. Eine biologische Studie. Jena, Germany: Gustav Fischer Verlag; 1907.

Monaghan, R.L., Alberts, A.W., Hoffman, C.H. and Albers-Schonberg, G.: Hypocholesteremic fermentation products and process of preparation. US 4,231,938 (1979)

Mondy, K.E., Haughey, B., Custer, P.L., Wippold, F.J. 2nd, Ritchie, D.J., Mundy, L.M. (2002) Rhinocerebral mucormycosis in the era of lipid-based amphotericin B: case report and literature review. *Pharmacotherapy* Review. **22**(4):519-526.

Mukherjee, P.K., Sheehan, D.J., Hitchcock, C.A., and Ghannoum, M.A. (2005) Combination treatment of invasive fungal infections. *Clin Micr Rev* **18**(1): 163-194.

Nakai, A., Nishikata, M., Uchida, T., Ichikawa, M. and Matsuyama, K. (1997) Enhanced myopathy following administration of hypolipidemic agents under urethane anesthesia. *Biol Pharm Bull*. **20**(1): 104-106.

Nash, G., Foley, F.D., Goodwin, M.N. Jr., Bruck, H.M., Greenwald, K.A., and Pruitt, B.A. Jr. (1971) Fungal burn wound infection. *JAMA* **215**(10): 1664-1666.

Navarathna, D.H., Hornby, J.M., Hoerrmann, N., Parkhurst, A.M., Duhamel, G.E. and Nickerson, K.W. (2005) Enhanced pathogenicity of *Candida albicans* pre-treated with subinhibitory concentrations of fluconazole in a mouse model of disseminated candidiasis. *J Antimicrob Chemother* **56**(6):1156-1159.

Nelson, A.J., Doerner, P.W., Zhu, Q., and Lamb, C.J. (1994) Isolation of a monocot 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase gene that is elicitor-inducible. *Plant Mol Biol* **25**(3): 401-412.

Neuvonen, P.J., Kantola, T. and Krivistö, K.T. (1998) Simvastatin but not pravastatin, is very susceptible to interact with the CYP3A inhibitor itraconazole. *Clin Pharmacol Ther* **63**:322-341.

Nosari, A., Oreste, P., Montillo, M., Carrafiello, G., Draisci, M., Muti, G., Molteni, A. and Morra E. (2000) Mucormycosis in hematologic malignancies: an emerging fungal infection. *Haematologica* **85**(10): 1068-1071.

Odds, F.C., Van Gerven, F., Espinel-Ingroff, A., Bartlett, M.S., Ghannoum, M.A., Lancaster, M.V., Pfaller, M.A., Rex, J.H, Rinaldi, M.G. and Walsh, T.J. (1998) Evaluation of possible correlations between antifungal susceptibilities of filamentous fungi in vitro and antifungal treatment outcomes in animal infection models. *Antimicrob Agents Chemother* **42**(2): 282-8.

Olbricht, C., Wanner, C., Eisenhauer, T., Kliem, V., Doll, R., Boddaert, M., O'Grady, P., Krekler, M., Mangold, B. and Christians U. (1997) Accumulation of lovastatin, but not pravastatin, in the blood of cyclosporine-treated kidney graft patients after multiple doses. *Clin Pharmacol Ther* **62**(3): 311-321.

Olender, E.H. and Simon RD.(1992) The intracellular targeting and membrane topology of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase. *J Biol Chem* **267**(6): 4223-4235.

Ong, T.P., Heidor, R., de Conti, A., Dagli, M.L. and Moreno, F.S. (2006) Farnesol and geraniol chemopreventive activities during the initial phases of hepatocarcinogenesis involve similar actions on cell proliferation and DNA damage, but distinct actions on apoptosis, plasma cholesterol and HMGCoA reductase. *Carcinogenesis* **27**(6): 1194-1203.

Osherov, N., Mathew, J. and May, G.S. (2000) Polarity-defective mutants of *Aspergillus nidulans. Fungal Genet Biol* **31**(3): 181-188.

Pandian, S., Saengchjan., S. and Raman, T.S. (1981) An alternative pathway for the biosynthesis of isoprenoid compounds in bacteria. *Biochem J* **196**(3): 675–681.

Panepinto, J.C., Oliver, B.G., Fortwendel, J.R., Smith, D.L., Askew, D.S. and Rhodes, J.C. (2003) Deletion of the *Aspergillus fumigatus* gene encoding the Ras-related protein RhbA reduces virulence in a model of Invasive pulmonary aspergillosis. *Infect Immun* **71**(5): 2819-2826.

Pena-Díaz, J., Montalvetti, A., Flores, C-L., Constan, A., Hurtado-Guerreo, R., De Souza, W., Gancedo, C., Ruiz-Perez, L.M. and Gonzales-Pacanowska, D. (2004) Mitochondrial Localization of the mevalonate pathway enzyme 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase in the Trypanosomatidae. *Mol Biol of the Cell* **15**: 1356-1363.

Pentikainen, PJ, Saraheimo, M, Schwartz, JI, Amin, RD, Schwartz, MS, Brunner-Ferber, F, Rogers, JD (1992**)** Comparative pharmacokinetics of lovastatin, simvastatin and pravastatin in humans. *J Clin Pharmacol* **32**: 136-140

Pierce, L.R., Wysowski, D.K. and Gross, T.P. (1990) Myopathy and rhabdomyolysis associated with lovastatin-gemfibrozil combination therapy. *JAMA* **264**(1): 71-75.

Powers, S., Kataoka, T., Fasano, O., Goldfarb, M., Strathern, J., Broach, J. and Wigler, M. (1984) Genes in *S. cerevisiae* encoding proteins with domains homologous to the mammalian ras proteins. *Cell* **36**(3): 607-612.

Rabin, E.R., Lundberg, G.D. and Mitchell, E.T. (1961) Mucormycosis in severely burned patients. Report of two cases with extensive destruction of the face and nasal cavity. *N Engl J Med* **264**: 1286-1289.

Rangel-Guerra, R., Martinez, H.R. and Saenz, C. (1985) Mucormycosis. Report of 11 cases. *Arch Neurol* **42**: 578-581.

Regazzi, M.B., Iacona, I., Campana, C., Raddato, V., Lesi, C., Perani, G., Gavazzi, A. and Viganò M. (1993) Altered disposition of pravastatin following concomitant drug therapy with cyclosporin A in transplant recipients. *Transplant Proc* **25**(4): 2732-2734.

Reinhardt, D.J., Kaplan, W. and Ajello, L. (1970) Experimental cerebral zygomycosis in alloxan-diabetic rabbits I. Relationship of temperature tolerance of selected *zygomycetes* to pathogenicity. *Infect Immun* **2**(4): 404-413.

Rendic, S. and DiCarlo, F.J (1997) Human cytochrome P450 enzymes: a status report summarizing their reactions substrates, inducers and inhibitors. *Drug Metab Rev* **29**: 413-580.

Rizzato, G (2004) Fungal infections in transplant recipients: the role of liposomal amphotericin B in the era of new antifungal drugs. Sarcoidosis Vasculitis And Diffuse Lung Diseases 21 (suppl. 1): 3-20.

Roden, M.M., Zaoutis, T.E., Buchanan, W.L., Knudsen, T.A., Sarkisova, T.A., Schaufele, R.L., Sein, M., Sein, T., Chiou, C.C., Chu, J.H., Kontoyiannis, D.P. and Walsh T.J. (2005) Epidemiology and outcome of zygomycosis: a review of 929 reported cases. *Clin Infect Dis* **41**(5):634-653. Review.

Rohmer, M., Knani, Simonin, M.P., Sutter, B. and Sahm, H. (1993) Isoprenoid biosynthesis in bacteria: a novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate. *Biochem J* **295**(2): 517–524.

Roitelman, J., Olender, E.H., Bar-Nun, S., Dunn, W.A. Jr. and Simoni, R.D. (1992) Immunological evidence for eight spans in the membrane domain of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase: implications for enzyme degradation in the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* **117**(5): 959-973.

Roitelman, J. and Simoni, R.D. (1992) Distinct sterol and nonsterol signals for the regulated degradation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase. *J Biol Chem* **267**(35): 25264-25273.

Roze, L.V. and Linz J.E. (1998) Lovastatin triggers an apoptosis-like cell death process in the fungus *Mucor racemosus*. *Fungal Genet Biol* **25**(2): 119-133.

Rubins, J.B., Greatens, T., Kratzke, R.A., Tan, A.T., Polunovsky, V.A. and Bitterman, P. (1998) Lovastatin induces apoptosis in malignant mesothelioma cells. *Am J Respir Crit Care Med* **157**: 1616-1622.

Ruiz-Albert, J., Cerda-Olmedo, E., Corrochano, L.M. (2002) Genes for mevalonate biosynthesis in *Phycomyces. Mol Genet Genomics*. **266**(5): 768-777.

Ruoppi, P., Dietz, A., Nikanne, E., Seppa, J., Markkanen, H. and Nuutinen, J. (2001) Paranasal sinus mucormycosis: a report of two cases. *Acta Otolaryngol* **121**(8): 948-952.

Schipper, M.A.A. (1978). On the genera *Rhizomucor* and *Parasitella*. *Stud Mycol* **17**: 53-71.

Schwarz, M.K. (1994) Terpen-Biosynthese in *Ginkgo biloba*: Eine überraschende Geschichte. PhD Thesis, ETH Zürich, Switzerland

Semighini, C.P., Hornby, J.M., Dumitru, R., Nickerson, K.W. and Harris, S.D. (2006) Farnesol-induced apoptosis in *Aspergillus nidulans* reveals a possible mechanism for antagonistic interactions between fungi. *Mol Microbiol* **59**(3): 753-764.

Sheldon, W.H. (1959) Subclinical pneumocystis pneumonitis. *AMA J Dis Child* **97**(3): 287-297.

Shimada, H., Kondo, K., Fraser, P.D., Miura, Y., Saito, T. and Misawa, N. (1998) Increased carotenoid production by the food yeast *Candida utilis* through metabolic engineering of the isoprenoid pathway. *Appl Environ Microbiol* **64**(7): 2676-2680.

Shimans, A., Horton, J.D., Shimomura, L., Hammer, R.E., Brown, M.S. and Goldstein, J.L. (1997) Isoform Ic of sterol regulatory binding protein is less active than isoform Ia in livers of transgenic mice in culture. *J Clin Invest* **99**: 846-854.

Siperstein, M.D. (1984) Role of cholesterogenesis and isoprenoid synthesis in DNA replication and cell growth. *J Lipid Res* **25**: 1462-1468.

Sirtori, C.R. (1993) Tissue selectivity of hydroxymethylglutary coenzyme A (HMG CoA) reductase inhibitors. *Pharmacol Ther* **60**: 431-459.

Siwek, G.T., Dodgson, K.J., de Magalhaes-Silverman, M., Bartelt, L.A., Kilborn, S.B., Hoth, P.L., Diekema, D.J. and Pfaller, M.A. (2004) Invasive zygomycosis in hematopoietic stem cell transplant recipients receiving voriconazole prophylaxis. *Clin Infect Dis* **39**(4):584-587.

Skalnik, D.G., Narita, H., Kent, C., Simoni, R.D. (1988) The membrane domain of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase confers endoplasmic reticulum localization and sterol-regulated degradation onto beta-galactosidase. *J Biol Chem* **263**(14): 6836-6841.

Smith, D.H., Neutel, J.M., Weber, M.A. (1999) Comparisons of the effects of different long-acting delivery systems on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of diltiazem. *Am J Hypertens* **12**(1): 1030-1037.

Smitherman, K.O. and Peacock, J.E. Jr. (1995) Infectious emergencies in patients with diabetes mellitus. *Med Clin N Am* **79**: 53-77.

Som, T., Kolaparthi, V.S. (1994) Developmental decisions in *Aspergillus nidulans* are modulated by Ras activity. *Mol Cell Biol*. **14**(8): 5333-5348

Stermer, B.A., Bianchini, G.M. and Korth, K.L. (1994) Regulation of HMG-CoA reductase activity in plants. *J Lipid Res* Review **35**(7):1133-1140.

Stern, L.E. and Kagan, R.J. (1999) Rhinocerebral mucormycosis in patients with burns: case report and review of the literature. *J Burn Care Rehabil* **20**(4): 303-306.

St-Germain, G., Robert, A., Ishak, M., Tremblay, C., Claveau, S. (1993) Infection due to *Rhizomucor pusillus*: report of four cases in patients with leukemia and review. *Clin Infect Dis* **16**: 640-645.

Sun, Qiu N., Fothergill, A.W., McCarthy, D.I., Rinaldi, M.G. and Graybill, J.R. (2002) In vitro activities of posaconazole, itraconazole, voriconazole, amphotericin B and fluconazole against 37 clinical isolates of zygomycetes. *Antimicrob Agents Chemother* **46**: 1581-1582.

Sundaram, S., Kim, S. J., Suzuki, H., Mcquattie, C. J. Hiremath, S. T. and Podila, G. K. (2001) Isolation and characterization of a symbiosis-regulated ras from the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor*. *Mol Plant-Microbe Interact* **14**(5): 618–628.

Schwarz, P., Bretagne, S., Gantier, J-C., Garcia-Hermoso, D., Lortholary, O., Dromer, F. and Dannaoui, E. (2006) Molecular identification of *Zygomycetes* from culture and experimentally infected tissues. *J Clin Microbiol* **44**(2): 340–349.

Tedder, M., Spratt, J.A., Anstadt, M.P., Hegde, S.S., Tedder, S.D. and Lowe, J.E. (1994) Pulmonary mucormycosis: results of medical and surgical therapy. *Ann Thorac Surg* Review. **57**(4): 1044-1050.

Trivedi, R.K., Kallem, R.R., Mullangi, R. and Srinivas, N.R. (2005) Simultaneous determination of rosuvastatin and fenofibric acid in human plasma by LC-MS/MS with electrospray ionization: assay development, validation and application to a clinical study. *J Pharm Biomed Anal* **39**(3-4): 661-669.

Vágvölgyi Cs., Vastag M., Ács K. and Papp T. (1999) *Rhizomucor tauricus*: a questionable species of the genus. *Mycol Res* **103**: 1318-1322.

Van Aelst, L. and D'Souza-Schorey, C. (1997) Rho GTPases and signaling networks. *Genes Dev* **11**: 2295-2322

Van de Donk, N.W.C.J., Kamphuis, M.M., Lokhorst, H.M. and Bloem, A.C. (2002) The cholesterol lowering drug lovastatin induces cell death in myeloma plasma cells. *Leukemia* 16: 1362-1371.

Van den Ende, H. (1968) Relationship between sexuality and carotene synthesis in *Blakeslea trispora*. *J Bacteriol* **96**(4): 1298-1303.

Varma, N., Varma, S., Kaul, D. (2000) Expression of receptor-Ck and SREBP genes in mononuclear cells from acute leukemia patients. *Leuk Res* **24**(11): 913-916.

Vastag M., Kasza Z., Acs K., Papp T., Schwab H., Vágvölgyi C. (2004) Cloning and sequence analysis of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene from the *zygomycetes* fungus *Rhizomucor miehei*. *Antonie Leeuwenhoek* **86**(2): 111-119.

Vastag M., Papp T., Kasza Z., Vágvölgyi C. (2000) Intraspecific variation in two species of *Rhizomucor* assessed by random amplified polymorphic DNA analysis. *J Basic Microbiol* **40**(4): 269-277.

Vastag M., Papp T., Kasza Z. and Vágvölgyi C. (1998). Differentiation of *Rhizomucor* species by carbon source utilization and isoenzyme analysis. *J Clin Microbiol* **36**: 2153-2156.

Vaupotic, T. and Plemenitas, A. (2007) Osmoadaptation-dependent activity of microsomal HMG-CoA reductase in the extremely halotolerant black yeast *Hortaea werneckii*. *FEBS Lett* **581**: 3391-3395.

Vojtek, A.B. and Channing, J.Ders (1998) Increasing complexity of the Ras signaling pathway. *J Biol Chem* **273**: 19925-19928.

Wolff AM, Arnau J, (2002) Cloning of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-encoding genes in *Mucor circinelloides* (Syn. *racemosus*) and use of the *gpd*1 promoter for recombinanrt protein production. *Fungal Genet Biol* **35**: 21-29.

Woodward, H.D., Allen, J.M., Lennarz, W.J. (1988a) 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase of the sea urchin embryo. Deduced structure and regulatory properties. *J Biol Chem* **263**(34): 18411-18418.

Woodward, H.D., Allen, J.M., Lennarz, W.J. (1988b) 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in the sea urchin embryo is developmentally regulated. *J Biol Chem* **263**(5): 2513-2517.

Yaar, L., Mevarech, M. and Koltin Y. (1997) A *Candida albicans* RAS-related gene (CaRSR1) is involved in budding, cell morphogenesis and hypha development. *Microbiology* **143** (9): 3033-44.

Yoshida, Y., Kawata, M., Katayama, M., Horiuchi, H., Kita, Y. and Takai Y., (1991) A geranyl-geranyltransferase for RhoA p21 distinct from the farnesyltransferase for ras p21S. *Biochem Biophys Res Commun* **175:** 720-728.

Zeidler, J.G., Lichtenthaler, H.K., May, H.U., Lichtenthaler, F.W. (1997) Is isoprene emitted by plant synthesized via the novel isopentenyl pyrophosphate pathway? *Z Naturforsch C* **52**: 15–23.

ÖSSZEFOGLALÓ

A járomspórás gombákhoz (*Zygomycota*) tartozó *Mucorales* rendbe sorolt nemzetségek (*Absidia*, *Cunninghamella*, *Mucor*, *Rhizomucor*, *Rhizopus)* orvosi, ipari, biotechnológiai és mezőgazdasági szempontból egyaránt nagy jelentőségűek. A termofil *Rhizomucor* nemzetségbe tartozó fajok (*R. pusillus, R. miehei*, *R. tauricus*), kiemelkedő gyakorlati jelentőségűek. A *R. pusillus* és a *R. miehei* humán és állati mikózisok opportunista patogén kórokozói. Az általuk kiváltott betegségek, elsősorban immunszupresszált betegeknél, ketoacidózisban szenvedő cukorbetegeknél, egyes leukémiás megbetegedésekben, illetve súlyos égési sérülteknél okoznak gondot.

Munkánk célja a *Rhizomucor* nemzetségbe tartozó *R. miehei* 3-hidroxi-3-metilglutaril koenzim A (HMG-KoA) reduktáz génjének részletes molekuláris és funkcionális elemzése.

A HMG-KoA reduktáz az izoprénvázas vegyületek bioszintézisét biztosító acetát/mevalonsav (AMV) reakcióút kezdeti meghatározó lépését katalizálja az eukarióta sejtekben. A járomspórás gombákban az AMV út különleges jelentősége, hogy szerepet játszik sajátos, egyetlen más mikroszkópikus gomba párosodási (*mating*) hormonjára sem hasonlító feromonjuk, a trispórsav bioszintézisében. A trispórsavon kívül számos másodlagos metabolit (pl. karotinoidok, gombatoxinok) bioszintézisének első lépését is ez az enzim katalizálja. Az AMV reakcióút valamennyi eukarióta sejtben kulcsfontosságú, hiszen ezen keresztül szintetizálódnak a szterolvázas vegyületek is (pl. koleszterol). Hasonlóképpen jelentős, hogy ez a reakcióút teszi lehetővé azon prenil egységek létrejöttét, amelyek kapcsolódása számos fehérje esetében szükséges a megfelelő biológiai funkció betöltéséhez. A különböző karotinvegyületek szintetikus előállítása mellett nagy jelentőségű a természetes eredetű és biotechnológiai úton előállított termékek felhasználása az élelmiszeriparban, kozmetikai iparban és gyógyászatban. A *X. dendrorhous* élesztőgomba az asztaxanthin

előállítására leggyakrabban alkalmazott mikroorganizmus, így az acetát/mevalonát reakcióút tanulmányozása ebben a szervezetben különösen fontos. Kísérleteink során megkezdtük a gombában előforduló *hmgR* gén azonosítását.

A HMG-KoA reduktáznak több szelektív inhibitora ismert (pl. koninginsav és a különböző sztatinok). A sztatinok (pl. lovasztatin, szimvasztatin) ma széles körben alkalmazott gyógyszerhatóanyagok a vér koleszterinszintjének csökkentésére, és újabb kutatások vizsgálták más, az emberi szervezet élettani folyamataiban betöltött szerepüket is.

Az elvégzett kísérletek során:

- λ Fix II fágban elkészített genomiális génkönyvtár szűrésével és HMG-KoA reduktáz génszekvenciák alapján tervezett degenerált primerekkel amplifikált homológ próba alkalmazásával sikerült azonosítanunk, majd pBluescript vektorba klónoznunk a *R. miehei* HMG-KoA reduktáz génjét.
- A teljes izolált gén nukleotidszekvenciáját meghatároztuk (4977 bp), konszenzus szekvenciák segítségével a génben öt intront azonosítottunk, és a kódolt fehérje feltételezett aminosavsorrendjét (1058) meghatároztuk.
- Meghatároztuk a *X. dendrorhous hmgR* génjének egy 315 bp hosszúságú szakaszát, mely 105 aminosavat kódol a fehérje katalitikus aktivitásért felelős szakaszán.
- Megvizsgáltuk, hogy a gén milyen hasonlóságot mutat egyes mikroszkópikus gombák (*S. cerevisiae*, *S. pombe*, *U. maydis*), illetve más eukarióta szervezetek HMG-KoA reduktáz génjeivel.
- Southern-hibridizáció segítségével megállapítottuk, hogy a *R. miehei* faj genomjában egy HMG-KoA reduktáz gén található.
- Az izolált *R. miehei hmgR* gén promóterének és a zöld fluorescens fehérje (GFP) szekvenciájának felhasználásával transzformáló vektort készítettünk, melyet *M.*

circinelloides járomspórás gombába juttattunk be. A sikeres transzformáció eredményeként *M. circinelloides*-ben GFP termelődését detektáltuk.

- Az izolált gén felhasználásával transzformációs vektort készítettünk, melyet *M. circinelloides* járomspórás gombába transzformálva megállapítottuk, hogy a *R. miehei hmgR* gén hozzájárult a *M. circinelloides* fluvasztatin rezisztenciájának növekedéséhez.
- Meghatároztuk 27 *Rhizomucor* nemzetségbe tartozó izolátum lovasztatin érzékenységét. A kapott eredmény alapján kidolgoztunk egy egyszerű tenyésztésen alapuló eljárást a két *Rhizomucor* faj elkülönítésére lovasztatin érzékenységük alapján.
- Meghatároztuk továbbá hét, orvosi szempontból fontos járomspórás gomba (*R. miehei*, *R. pusillus*, *A. corymbifera*, *M. wolfii*, *S. racemosum*, *Rh. oryzae*, *Rh. microsporus* var. *rhizopodiformis*) sztatinokkal szemben mutatott érzékenységét.
- Kísérleteket végeztünk annak megállapítására, hogy a rozuvasztatin és fluvasztatin amfotericin B-vel történő együttes alkalmazása során milyen mértékben gátolt az opportunista patogénként ismert járomspórás gombák növekedése. Az amfotericin B a járomspórás gombák által okozott fertőzések jelenleg is alkalmazott, egyik leghatékonyabb eszköze. Vizsgálatainkban néhány esetben a szerek között fellépő szinergizmust, a legtöbb esetben pedig additív hatást figyeltünk meg.

SUMMARY

Members of the fungal order *Mucorales* have biotechnological importance in the biotransformation of steroids, the production of organic acids (like lactic acid) or proteins such as rennin-like aspartic proteases and in the fermentation of food, especially soy protein (e.g. soy souce, tempeh). In addition they produce an array of vitamin-like compounds like carotenoids. Some species of the orders *Entomophtorales* and *Mucorales*, e.g. *Absidia*, *Mortierella*, *Rhizomucor*, *Rhizopus* and others (Ribes et al. 2000), can be agents of opportunistic infections in human and animals. Healthy humans are generally unaffected, but those with weakened immunity are at risk of infection. The major risk factors are diabetic ketoacidosis; deferoxamine treatment to manage an iron overload; cancer and its therapy; solid organ or bone marrow transplantations; and extreme malnutrition or neutropenia.

The aim of our study was to isolate and characterize the 3-hydroxy-3-methilglutaryl-coenzyme A reductase (HMG-CoA reductase) encoding gene of the practically important zygomycete fungus *Rhizomucor miehei*. The enzyme product of the *hmgR* gene catalyses the production of mevalonate. This is a rate-limiting step of the acetate/mevalonate pathway leading to isoprenoid synthesis. During the mating of *Zygomycetes*, formation of the sexual structures is induced by the trisporic acid, a compound synthesized through the same acetate/mevalonate pathway. The enzyme catalyses the first step of the biosynthesis of sterol compounds and other terpenoid-type secunder metabolites (for example the carotenoids). The acetate/mevalonate pathway provides prenil groups for the appropriate function of many indispensable protein of the cell. Various carotenoid compounds are produced synthetically while some natural and microbial sources are also available for industrial purposes. The red-yeast *X. dendrorhous* is often used for the biotechnological production of astaxanthin, therefore the investigation of acetate/mevalonate pathway in this organism is important. The aim of our experiments was to begin the characterization of the *hmgR* gene of this fungus.

Statins inhibits growing in fungi via the inhibition of the mevalonate production, which is the rate-limiting step of acetate/mevalonate pathway leading to isoprenoid biosynthesis.

Statins (e.g. lovastatin, simvastatin), the selective inhibitors of HMG-CoA reductase, are used as cholesterol lowering agent in human diseases. Recently, pleiotropic effects of statins in human illnesses are extensively investigated.

As a result of our experiments:

- Degenerated PCR primers were designed to the most conserved region of *hmgR* genes, and the resulted PCR fragment was used as homologous probe for screening the lambda Fix II phage library of *R. miehei* genome. The *R. miehei hmgR* gene was identified and cloned into pBluescript vector.
- The entire gene sequence (4977 bp) was determined. Five introns were found in the *hmg*R gene and a putative 1058 amino acids correspond to the nucleotide sequence.
- A partial sequence (315 bp) of *X. dendrorhous hmgR* gene encoding 105 aminoacids was determined.
- The similarity of *R. miehei hmgR* gene with those of other fungi and eukaryotes was investigated.
- It was revealed/proved by Southern-blot experiment that *R. miehei* contains one *hmgR* gene.
- The green fluorescent protein (*gfp*) gene driven by the promoter region of *R. miehei hmgR* gene was successfully transformed into *Mucor circinelloides*. The promoter of *R. miehei hmgR* gene permits the production of GFP in the transformant cells as it was proved by fluorescence microscopy.
- A vector harbouring the entire *hmgR* gene of *R. miehei* was also introduced to the zygomycete fungus *M. circinelloides*. The yielded transformant was shown to have

better tolerance of fluvastatin, which is a competitive inhibitor of HMG-CoA reductase.

- Furthermore, the susceptibility to lovastatin of 27 isolates of *R. miehei* and *R. pusillus* was investigated. A simple and reliable method for species-level differentiation, based on the significantly higher sensitivity of *R. pusillus* to lovastatin than that of *R. miehei*, was elaborated. It is supposed that besides the susceptibility to lovastatin, the two *Rhizomucor* species are different in their susceptibility to other antifungal compounds also. The molecular background of the different sensitivities of the two species is not yet known.
- In other experiments the susceptibility to various statins of 7 opportunistic pathogen species, *R. miehei*, *R. pusillus*, *Absidia corymbifera*, *Mortierella wolfii*, *Syncephalastrum racemosum*, *Rhizopus oryzae*, *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis*, was tested.
- The synergy of fluvastatin and rosuvastatin with amphotericin B was also tested. Amphotericin B is one of the most effective antifungal agents against zygomycoses. In some combination, synergy and in the majority of cases, additivity was detected in our experiments.