A VASFELVÉTELBEN SZEREPET JÁTSZÓ GÉNEK MOLEKULÁRIS JELLEMZÉSE OPPORTUNISTA PATOGÉN JÁROMSPÓRÁS GOMBÁKBAN

Doktori Értekezés

NYILASI ILDIKÓ

TÉMAVEZETŐK: Dr. Vágvölgyi Csaba Tanszékvezető egyetemi docens

> Dr. Papp Tamás Egyetemi adjunktus

BIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA



Szegedi Tudományegyetem Természettudományi és Informatikai Kar Mikrobiológiai Tanszék

> 2008 Szeged

TARTALOMJEGYZÉK

1. Rövidítések jegyzéke	4
2. Bevezetés	7
3. Irodalmi áttekintés	9
3.1. A járomspórás gombák általános jellemzése	9
3.2. A járomspórás gombák által okozott zigomikózisok	9
3.3. Az opportunista gombafertőzések háttere	13
3.4. A vasfelvétel, mint lehetséges virulencia faktor	16
3.4.1. Különböző vasfelvételi mechanizmusok gombákban	16
3.4.2. A vastranszport szerepe az opportunista patogén gombák virulenciájában	20
3.5. A patogenitás genetikai hátterének vizsgálata	24
3.5.1. A járomspórás gombák transzformációs rendszereinek áttekintése	24
3.5.2. Agrobacterium tumefaciens által közvetített transzformáció	28
4. Célkitűzések	32
5. Anyagok és módszerek	33
5.1. A kísérletek során alkalmazott törzsek	33
5.2. Az alkalmazott táptalajok, tápoldatok és tenyésztési körülmények	35
5.2.1. Az alkalmazott táptalajok és tápoldatok	35
5.2.2. Tenyésztési körülmények	36
5.3. Az alkalmazott pufferek, oldatok és reagensek	37
5.4. A kísérletek során használt vektorok, primerek és DNS próbák	39
5.4.1. A kísérletek során használt vektorok	39
5.4.2. A kísérletek során használt primerek	40
5.4.3. A kísérletek során használt DNS próbák	42
5.5. Vizsgálati módszerek	43
5.5.1. Genomi DNS tisztítása	43
5.5.2. DNS gélelektroforézis	43
5.5.3. PCR technikák	43
5.5.4. DNS izolálás agaróz gélből	46
5.5.5. DNS fragmentumok klónozása, plazmid konstrukciók létrehozása	47
5.5.6. Kompetens E. coli sejtek készítése	47
5.5.7. E. coli sejtek transzformációja	48
5.5.8. Kompetens A. tumefaciens sejtek készítése	48

5.5.9. A. tumefaciens sejtek transzformációja	48
5.5.10. DNS hibridizálás	49
5.5.11. DNS szekvenciák meghatározása és analízise	50
5.5.12. Drogrezisztencián alapuló szelekciós körülmények optimalizálása	50
5.5.13. Gomba protoplasztok képzése	50
5.5.14. Gomba protoplasztok PEG-mediált integratív transzformációja	51
5.5.15. A. tumefaciens közvetített transzformáció	51
5.5.16. Mutánsdúsítás	52
5.5.17. Monosporangiális telepek előállítása	53
5.5.18. Fluoreszcens mikroszkópia	53
6. Eredmények és értékelésük	54
6.1. Nagy-affinitású vaspermeázt kódoló gének azonosítása és összehasonlítása	
különböző járomspórás gombákban	54
6.2. Zigomikózisokat előidéző gombák diagnosztizálása az ftr1 szekvenciák alapján	59
6.3. A R. miehei és a R. pusillus nagy-affinitású vaspermeáz génjének izolálása és	
jellemzése	65
6.4. A nagy-affinitású vaspermeáz vizsgálatához szükséges szelekciós és	
transzformációs rendszerek kidolgozása	72
6.4.1. Drogrezisztencián alapuló direkt szelekciós rendszer kidolgozása	72
6.4.2. Az ATMT alkalmazhatóságának vizsgálata járomspórás gombákban	76
6.4.3. Auxotróf markeren alapuló szelekciós rendszer kidolgozása R. pusillus	
esetén	90
6.5. Az izolált <i>ftr1</i> génre alapozott transzformáló vektorok készítése <i>ftr1</i> ⁻ deléciós	
mutáns törzsek létrehozásához	95
7. Összefoglalás	99
8. SUMMARY	102
9. Irodalomjegyzék	106
10. Köszönetnyilvánítás	122
11. Mellékletek	123

1. Rövidítések jegyzéke

AS	acetosziringon
ATCC	American Type Culture Collection, USA
ATMT	Agrobacterium tumefaciens közvetített transzformáció
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CBS	Centraalbureau voor Schimmelcultures, The Netherlands
CCFC	Canadian Collection of Fungal Culture, Canada
DMSO	dimetil-szulfoxid
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav
ELISA	EnzymeLinked ImmunoSorbent Assay
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
FOA	5-fluoro-orotsav
FRR	CSIRO Food Research Culture Collection, Australia
IPTG	izopropil-β-D-tiogalaktopiranozid
ITS	Internal Transcribed Spacer
LB	Left Border (bal oldali T-DNS határoló régió)
MES	2-N-morfolin-etánszulfonsav
MOPS	3-N-morfolin-propánszulfonsav
MUFS	Department of Microbiology and Biochemistry, The
	University of the Orange Free State, South Africa
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NRRL	Agricultural Research Service Culture Collection, USA
OD	optikai denzitás
OMP	orotidin-5'-monofoszfát
PBS	foszfát-pufferelt sóoldat
PCR	polimeráz láncreakció
PEG	polietilén-glikol
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
RB	Right Border (jobb oldali T-DNS határoló régió)
rDNS	riboszómális DNS
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RPM	percenkénti fordulatszám
SDS	nátrium-lauril-szulfát

SOC	Super Optimal broth with Catabolite repression
SON-PCR	Single Oligonucleotide Nested PCR
ssDNS	egyszálú DNS
SZMC	Szeged Microbial Collection, Hungary
TAIL-PCR	Thermal Asymmetric Interlaced PCR
TJM	Dr. Themis J. Michailides, University of California, USA
TRIS	Trisz-(hidroxi-metil)-amino-metán
UHF	UTHSCSA/Fungal Testing Laboratory, USA
WRLCN	Welcome Bacterial Collection, Beckenham, UK
X-gal	5-bromo-4-kloro-3-indolil-β-D-galaktopiranozid
YNB	élesztő nitrogénforrás

Az értekezésben előforduló fontosabb gének jelölései:

Saccharomyces cerevisiae:

ftr1	nagy-affinitású vaspermeáz
arn1-4	sziderofór transzporterek
Candida albicans:	
Caftr1,Caftr2	nagy-affinitású vaspermeáz
Caarn1/Casit1	sziderofór transzporter
Aspergillus fumigatus	5:
ftrA	nagy-affinitású vaspermeáz
Aspergillus nidulans:	
sidA	L-ornithin-N ⁵ -monooxigenáz
gpd	glicerinaldehid-3-foszfát dehidrogenáz
trpC	indol-3-glicerol foszfát szintáz
amdS	acetamidáz
Rhizopus oryzae:	
ftrl	nagy-affinitású vaspermeáz
Mucor circinelloides	
gpd1	glicerinaldehid-3-foszfát dehidrogenáz
leuA	α-izopropilmalát izomeráz
pyrG	orotidin-5'-monofoszfát dekarboxiláz
Rhizomucor pusillus:	
pyr4	orotidin-5'-monofoszfát dekarboxiláz

Agrobacterium tumefaciens:

vir	virulenciáért felelős génkaszkád			
Escherichia coli:				
hph	higromicin B foszfotranszferáz			
Aequorea victoria:				
gfp	zöld fluoreszcens fehérje (green fluorescent protein)			

2. Bevezetés

A járomspórás gombák orvosi, ipari, biotechnológiai és mezőgazdasági szempontból egyaránt nagy gyakorlati jelentőséggel bírnak. Orvosi szempontból egyes fajok, mint zigomikózist okozó opportunista patogének érdemelnek figyelmet. A járomspórás gombák által okozott fertőzések elsősorban immunszupresszált betegeknél, ketoacidózisban szenvedő cukorbetegeknél, egyes leukémiás megbetegedésekben, illetve súlyos égési sérülteknél okoznak problémát. A zigomikózisokra irányuló fokozódó figyelmet nem kizárólag a fertőzések folyamatosan növekvő esetszáma magyarázza. A magas halálozási arány (75–95 %) mellett, a diagnosztikai nehézségek és az a tény, hogy a fertőzéseket kiváltó gombák nagyfokú rezisztenciát mutatnak a legtöbb gombaellenes hatóanyaggal szemben, hangsúlyozza azon munkák jelentőségét, melyek új diagnosztikai és terápiás módszerek lehetőségeit kutatják (RIBES és mtsi. 2000, EUCKER és mtsi. 2001). Jelenleg a molekuláris és szerológiai diagnosztikai módszerek kidolgozása még kísérleti stádiumban van, a lehetséges virulencia faktorok azonosítása és új terápiás célpontok keresése pedig mindössze néhány éve vette kezdetét.

Az elmúlt évek felismerése, hogy a zigomikózis kialakulásának kockázata nagyságrendekkel megnő a szérum tartósan magas vas szintje esetén, illetve a vasat komplexként megkötő egyes gyógyszerekkel (pl. deferoxamin) kezelt betegeknél (BOELAERT és mtsi. 1988). E hatóanyagokat elsősorban dialízisben részesülők kapják a szérum magas vas, illetve alumínium szintjének csökkentése érdekében (FERNÁNDEZ-MARTÍN és mtsi. 1994). A deferoxamin használata és a zigomikózisok előfordulása közötti szoros összefüggés a kutatókat a különböző vasszerzési mechanizmusok részletes vizsgálatára ösztönözte. Klinikai megfigyelések, illetve állatkísérletek alapján bebizonyították, hogy a járomspórás gombák képesek a deferoxamin-kelátolt vas hasznosítására, így a deferoxamin alkalmazása megnöveli a betegek fogékonyságát a járomspórás gombák által okozott fertőzésekre (BOELAERT és mtsi. 1993).

A vas megszerzése a gazdaszervezetben az egyik kulcsfontosságú lépés mind a baktériumok, mind a gombák által okozott fertőzések során. A humán szérumban a mikroorganizmusok számára hozzáférhető szabad vas mennyisége extrém alacsony, mivel annak nagy része a szérum szállítófehérjéihez kötött (GUERINOT 1994). Ennek áthidalására a humán és állati kórokozók számos mechanizmust fejlesztettek ki, melyek segítségével biztosítják a növekedésükhöz szükséges vas megszerzését a gazdaszervezetben. A klinikai és kísérleti megfigyelések során egyértelművé vált, hogy az opportunista patogén gombák

esetében a vasfelvételben szerepet játszó transzport rendszerek fontos virulencia faktorok (WEINBERG 1999).

Mindezek alapján a dolgozat célkitűzése a vas felvételét és transzportját biztosító fehérjéket kódoló gének azonosítása, izolálása és összehasonlítása különböző járomspórás gombákban. Mivel más gombacsoportokkal végzett kísérletek a nagy-affinitású vaspermeáz szerepét tekintik elsődlegesen fontosnak a virulenciában, vizsgálataink főként e gén részletesebb analízisére irányultak. A járomspórás gombák patogenitásának vizsgálatában a legnagyobb hátráltató tényezőt a genetikai módszerek korlátozott alkalmazhatósága jelenti. Ezért célul tűztük ki a patogenezis hátterének vizsgálatához szükséges, a jelenleginél hatékonyabb szelekciós és transzformációs rendszerek kidolgozását is, amelyek a későbbiekben elősegíthetik a nagy affinitású vaspermeáz virulenciában betöltött szerepének tisztázását, és ez által segíthetnek megérteni a járomspórás gombák által okozott fertőzések hátterében zajló biológiai folyamatokat.

3. Irodalmi áttekintés

3.1. A járomspórás gombák általános jellemzése

A járomspórás gombák (*Zygomycota*) rendszertanilag jól körülhatárolt csoportot alkotnak. Alapvető jellegeik a cönocitikus micélium, a kitin és kitozán tartalmú sejtfal és a sporangiumokban ivartalan szaporodással képződő sporangiospórák. A gombacsoport tagjai nevüket a kitartóspóraként is funkcionáló ivaros spóraalakjukról kapták (járomspóra, zigospóra). A közel 900 faj többsége a Zygomycetes osztály Mucorales rendjébe tartozik. Olyan elméleti és gyakorlati szempontból fontos nemzetségek sorolhatók ide, mint az *Absidia, Gilbertella, Micromucor, Mucor, Mortierella, Phycomyces, Rhizomucor* és *Rhizopus*. Ezek a szaprofita szervezetek elsősorban a talajban, illetve különböző növényi és állati eredetű bomló szerves anyagokon fordulnak elő. Az Entomophthorales rend tagjai

A járomspórás gombák gyakorlati jelentősége ipari, biotechnológiai, mezőgazdasági és orvosi területen kiemelkedő. Az élelmiszer- és gyógyszeriparban alkalmazott törzseket extracelluláris enzimek (pl. proteázok, lipázok) termelésére (OUTTRUP és BOYCE 1990, GODTFREDSEN 1990), vagy szteroidvázas vegyületek sztereospecifikus hidroxilálására használják (MADYASTHA és SRIVATSAN 1987). A Mucor, Actinomucor és Rhizopus fajok megtalálhatók számos speciális fermentációval készülő távol-keleti étel starter kultúrájában is (HAN és mtsi. 2001). Nem elhanyagolható szerepük van egyes élelmiszeripari termékek (DEVOYOD 1988) és mezőgazdasági termények károsításában (MICHAILIDES és OGAWA 1985). Egyes fajok, mint zigomikózist okozó opportunista patogének érdemelnek figyelmet (RIBES 2000, WALSH és mtsi. 2004, CHAYAKULKEEREE és mtsi. 2006).

A gyakorlati vonatkozások mellett gyakran tanulmányozott szervezetek. A *Mucor circinelloides* a biológiai kutatások számos területén használt modellorganizmus. A vizsgálatok többek között a gomba dimorf karakterére és a morfogenezis fiziológiai és biokémiai alapjaira (ORLOWSKY 1991, RUIZ-HERRERA 1993), sajátos szexuális folyamataikra és a szex feromonok szerepére (GOODAY 1994), illetve a karotinoidok bioszintézisére (ITURRIAGA és mtsi. 2000, ITURRIAGA és mtsi. 2001) fókuszálnak.

3.2. A járomspórás gombák által okozott zigomikózisok

Habár a gombák nem okoznak járványokat, az utóbbi években egyre nagyobb figyelem irányul rájuk a szisztémás gombafertőzések számának folyamatos emelkedése

miatt. Az eddig megismert mintegy hetvenezer gombafaj közül meglehetősen alacsony azoknak a száma, melyek képesek emberi fertőzést okozni. A gombák számára az emberi szervezet nem optimális élettér, de bizonyos anyagcseretermékeik, enzimeik alkalmassá tehetik őket a fertőzésre. Ez ellen a szervezet főként az immunrendszer mozgósításával védekezik. Az emberi megbetegedéseket okozó mikroszkópikus gombák egy része ún. opportunista kórokozó, azaz csak bizonyos hajlamosító tényezők hatására képes betegséget Egy egészséges szervezet természetes immunitással rendelkezik ezen okozni. gombafertőzések ellen, azonban csökkent immunitású betegek esetén a gazdaszervezet védekező mechanizmusai nem működnek megfelelően. A fertőzés (pl. AIDS), illetve egyéb okok miatt (pl. autoimmunitás) kialakuló immundeficiens állapot és a mesterséges immunszuppresszió az opportunista gombainfekciók legnagyobb rizikófaktora. A fejlett orvosi technikák (pl. csontvelő- és szervátültetés, szteroid kezelés, kemoterápia) hatására az elmúlt egy-két évtizedben többszörösére emelkedett az immunszuppreszált betegek száma, így az opportunista gombainfekciók számának növekedése a fertőzésekre fogékony immunszupresszált betegek számával párhuzamosan növekszik (SINGH 2001, EUCKER és mtsi. 2001). Az antimikrobiális profilaxis széleskörű használata tovább rontja a helyzetet: az antibiotikumok a kompetitív baktérium flóra elpusztításával tovább gyengítik a szervezet védekező rendszereit, másrészt lehetőséget biztosítanak rezisztens törzsek kiszelektálódására is. Az opportunista gombafertőzésekben a Candida és Aspergillus fajok dominálnak, de az utóbbi évtizedben növekvő gyakorisággal írtak le egyéb gombák által okozott kórképeket is, többek között a járomspórás gombák által okozott fertőzéseket (WALSH és GROLL 1999).

A járomspórás gombák által okozott fertőzéseket összefoglaló néven zigomikózisoknak nevezzük. Habár ezek a gombák egészséges szervezetben csupán minimális patogenitást mutatnak, legyengült vagy immunszuppreszált betegeknél heves lefolyású, gyakran halálos kimenetelű fertőzéseket okozhatnak. A fertőzések felosztása a megbetegített szerv/szövet alapján történik, e szerint megkülönböztetünk rhinocerebrális (orrüreg, szem, agy), pulmonáris (tüdő), gasztrointesztinális (gyomor, béltraktus), kután/szubkután (bőr és bőr alatti szövetek) és disszeminált fertőzéseket. Annak ellenére, hogy ezek esetszámban elmaradnak a *Candida* és az *Aspergillus* fajok által okozott megbetegedések mögött, figyelmet érdemel, hogy a zigomikózisok gyakorisága folyamatosan és erőteljesen emelkedik (RIBES 2000). A humán és állati zigomikózisok az *Absidia, Apophysomyces, Basidiobolus, Conidiobolus, Mucor, Cunninghamella, Rhizopus, Rhizomucor, Mortierella, Saksenaea, Cokeromyces* és *Syncephalastrum* nemzetségbe

tartozó gombákhoz köthetők, melyek közül kiemelkednek a *Rhizopus*, *Mucor*, *Absidia* és *Rhizomucor* fajok (RIBES 2000, WHITEWAY és mtsi. 1979, WEITZMAN és mtsi. 1993, CHAYAKULKEEREE és mtsi. 2006). A humán zigomikózisok leggyakoribb kórokozói a *Rhizopus* nemzetségbe tartoznak, közülük is a *Rh. oryzae* váltja ki a legtöbb fertőzést (RIBES 2000, WHITEWAY és mtsi. 1979, SCHOLER 1983).

A zigomikózis kialakulásának kockázata elsősorban cukorbetegség (különösen az ezzel összefüggésben fellépő ketoacidózis), továbbá orvosi beavatkozáshoz kapcsolódó immunszupresszió esetén nő meg (RIBES 2000). A hematológiai betegségek következtében kialakuló neutropénia a disszeminált zigomikózisok rizikófaktora (CUVELIER és mtsi. 1998). Az égési sérülések, illetve az extrém alultápláltság szintén kockázatot jelent a szervezet védekezőképességének meggyengülése miatt. A széles spektrumú antibiotikumok használata a normál flóra eliminálása által szintén növeli a zigomikózisok kialakulásának kockázatát. Sajátos rizikócsoportot képeznek egyes vaskomplexáló hatású gyógyszerekkel (pl. deferoxamin) kezelt dialízises betegek (BOELAERT és mtsi. 1988).

A zigomikózisok többségénél a betegség kialakulását elsődlegesen a környezetben megtalálható sporangiospórák belélegzése okozhatja. A zigomikózisok közel harmadátfelét a rhinocerebrális mikózis formában manifesztálódó betegség teszi ki. A felső légutak megbetegedését követően a fertőzés gyorsan továbbterjed a környező szövetekre, gyakran érinti az arc, az orr és a szájpad területét. A betegség rendkívül progresszív és amennyiben a fertőzés a szemet is eléri, a központi idegrendszer érintettsége (a szemidegen keresztül terjedő kórokozóval) gyakorlatilag elkerülhetetlenné válik (RIBES 2000). A tüdő megbetegedése szintén gyakori, ezt azonban gyakran összetévesztik az Aspergillus okozta fertőzéssel vagy bakteriális pneumóniával. Esetenként fertőzési kapuként nem a légutak szerepelnek, ilyen lehet a bőr és szöveti sérüléseket követően kialakuló zigomikózis (WEITZMAN és mtsi. 1993). Számos esetleírás rögzít katéterezés, illetve injekció beadásának helyén (droghasználat, tetoválás) kialakuló fertőzéseket és ismertek rovarcsípés és égés következtében kialakuló zigomikózisok is (RIBES 2000, SCHOLER 1983). Viszonylag ritkán, de előfordulhat a tápcsatorna fertőződése is, ami főként extrém alultáplált betegeknél, elsősorban gyermekeknél fordul elő. Leírtak spórával szennyezett fogászati eszközök alkalmazásával, fermentált élelmiszerek, illetve sporangiospórával szennyezett gyógynövény-készítmény fogyasztását követően kialakult zigomikózisokat is (RIBES 2000, RIPPON 1974).

A fertőzés elsődleges helyétől függetlenül a szervezetbe került patogén a véredények inváziója után a szervezet bármely pontjára eljuthat (pl. szív, vese, agy), és ott

az adott szerv megbetegedését okozhatja. A hematológiai betegségek következtében kialakuló neutropénia hozzájárulhat disszeminált zigomikózisok kialakulásához, a betegség terjedése elsősorban a légutakból indul. A megbetegedések halálozási aránya 10 (kután fertőzések) és 96-100 % (disszeminált megbetegedés) között változhat a megbetegedés formájától és a beteg állapotától függően (RIBES 2000).

Az Entomophthorales rendbe tartozó *Basidiobolus* és *Conidiobolus* fajok kevésbé progresszív, főképp a bőr szubkután és mukokután rétegeit érintő krónikus fertőzéseket okozhatnak elsősorban trópusi területeken. A fertőzések lokalizáltak, nem terjednek tovább a vérárammal, kialakulásuk kisebb szövetsérülés, rovarcsípés hatására következhet be (RIBES 2000).

Zigomikózisok kialakulása esetén a terápiás lehetőségek korlátozottak: ez részben a járomspórás gombák gyors, a normál testhőmérsékleten optimális feltételeket találó növekedésével, részben a gombaellenes hatóanyagok többségével szemben mutatott nagyfokú rezisztenciával magyarázható. Jelenleg hatékony terápiát csak a fertőzést kiváltó alapbetegség kezelése, gombaellenes antibiotikum terápia és a fertőzött szövet/szerv sebészeti eltávolításának kombinációja jelent (PETERSON és mtsi. 1997, SPELLBERG és mtsi. 2005). A járomspórás gombák elleni standard terápia alapját jelenleg is az 1955-ben felfedezett amfotericin B és annak lipid formulái képezik (VAZQUEZ 2007), azonban alkalmazhatóságát toxicitása jelentősen korlátozza (GALLAGHER és mtsi. 2003). Az azolok többsége nem alkalmazható a zigomikózisok terápiájában, mivel a járomspórás gombák mind in vitro, mind in vivo rezisztensek e gombaellenes hatóanyagokkal szemben (OTCENASEK és BUCHTA 1994, SUN és mtsi. 2002a). Egyes feltételezések szerint a zigomikózisok számának hirtelen emelkedése egyes betegcsoportok körében, éppen az aszpergillózisok kezelésében és az antifungális profilaxisban alkalmazott vorikonazollal szembeni rezisztenciájuk közvetlen következménye (MARTY és mtsi. 2004, SIWEK és mtsi. 2004). Ígéretes kivételként egy új triazol, a posakonazol, in vitro és in vivo (állat és klinikai kísérletekben is) hatásosnak bizonyult járomspórás gombák ellen (SUN és mtsi. 2002b, TOBON és mtsi. 2003). Rhizopus fajokkal végzett in vitro vizsgálatok az 5-fluorocitozint és a kaspofungint szintén hatástalannak találták a járomspórás gombák növekedésének gátlásában (PFALLER és mtsi. 1998).

Invazív gombainfekciók sikeres kezeléséhez elengedhetetlen a korai és pontos diagnózis felállítása. A zigomikózisok diagnózisa jelenleg a biopsziával vett minták és a szöveti léziók mikroszkópos vizsgálatán alapszik (FREIFELD és IWEN 2004). A hifák detektálása alapján azonban a kórokozó gomba faj vagy akár nemzetség szinten általában

nem azonosítható. A megtámadott szervekben, szövetekben a kórokozó gomba jelenléte csak a megfelelő helyről vett minta tenyésztésével igazolható kellő biztonsággal, a tenyésztés a pontos fajazonosításra is megoldást jelenthetne. A vizsgálati anyagok feldolgozása azonban időigényes, a módszerek érzékenysége pedig csekély (SINKÓ 2001). A diagnózisok felállítása sokszor jelentős késéssel illetve gyakran csak a beteg halála után következik be (EUCKER 2001). A diagnózist nehezíti az is, hogy járomspórás gomba fertőzések esetén a szövetmintákban ritkán láthatók hifa elemek, a tenyésztést megelőző szövet homogenizálás során pedig a gombák könnyen elveszítik életképességüket (WALSH és mtsi. 2004).

A járomspórás gombák által okozott infekciók döntő többségét a *Rhizopus* és a *Rhizomucor* nemzetségek tagjai okozzák. Az irodalmi adatok szerint, a *Rh. oryzae* a fertőzésekből leggyakrabban izolált gomba, ugyanakkor, az egyes fajok tényleges klinikai jelentőségével kapcsolatban jelentős a bizonytalanság. A pontos fajmeghatározás idő- és munkaigényes és megfelelő szaktudással rendelkező referencia laboratóriumok meglétét igényli. A klinikai mikrobiológiai gyakorlatban ezért a járomspórás gombák által okozott fertőzések jelentős részét csak zigomikózisként azonosítják pontosabb fajmeghatározás nélkül. A zigomikózisok szerológiai diagnózisára kidolgozott ELISA módszer a szervezet által termelt ellenanyagok rendkívül érzékeny és specifikus kimutatását teszi lehetővé, azonban hasonló antigénjeik miatt a járomspórás gombafajok nem különíthetők el egymástól e módszer segítségével (KAUFMAN és mtsi. 1989). Ígéretesnek tűnnek azonban a nukleinsavak kimutatásán alapuló diagnosztikai módszerek (EINSELE és mtsi. 1997).

A járomspórás gombák által okozott fertőzések aránylag ritkák, azonban ezek száma folyamatosan és párhuzamosan növekszik a fertőzésekre fogékony cukorbeteg és immunszupresszált betegek számával. A fertőzések magas halálozási aránya, a diagnosztikai nehézségek és a fertőzéseket kiváltó kórokozók nagyfokú rezisztenciája a fertőzések molekuláris hátterének részletesebb vizsgálatára ösztönöznek és új diagnosztikai módszerek és hatásosabb antifungális terápiák kidolgozását sürgetik. A legújabb molekuláris biológiai technikák segítségével azonosíthatók a klinikailag fontos gombák virulencia faktorai, melyek új terápiás célpontok illetve diagnosztikai módszerek alapját képezhetik.

3.3. Az opportunista gombafertőzések háttere

A zigomikózisok kialakulásában a gazdaszervezet oldaláról két tényező játszik szerepet: egyrészt a spóracsírázás gátlásának elmaradása, másrészt az intenzív

növekedésnek indult micélium elleni védekező reakció elégtelensége (WALDORF és mtsi. 1984). Egy kompetens szervezetben a fertőzés kezdetekor a makrofágok biztosítják az elsődleges védelmet a szervezetbe jutott spórák fagocitózisa és oxidatív elpusztítása által. A védekezés második szakaszában a neutrofil elemek szerepe a döntő, amelyek kemotaxis révén a növekvő gombafonalakhoz jutva és annak felszínén megtapadva, oxidatív citotoxikus folyamatok révén képesek a hifát károsítani, illetve elpusztítani. A csökkent immunitású betegek esetén általában mindkét védekezési reakció elégtelen. A makrofágok nem megfelelő működésének illetve pusztulásának következtében a spórák csírázása megindul, a neutrofil funkciók hiánya miatt a gombafonalak a mélyebben fekvő szöveteket is megtámadják (DIAMOND és mtsi. 1987, EUCKER 2001). A normál szérum is rendelkezik a spórák csírázását mérsékelten gátló hatással, azonban cukorbetegek esetén ez a gátlás is elmarad. A járomspórás gombák képesek a véredényeket is megtámadni az artériák és vénák trombózisát okozva. A környező szövetek fertőzése egyrészt fekete nekrotikus sejttörmelék kialakulását eredményezi a fertőzés helyén, másrészt a véredények inváziója által a gomba képes szétterjedni a szervezetben. Ennek következtében az elsődleges fertőzés szisztémás megbetegedéssé válik, ami az esetek döntő többségében már halálos kimenetelű (EUCKER 2001).

A jellegzetes kórfolyamat kialakulásában a gazdaszervezet védekező rendszereinek elégtelen működése mellett a kórokozó gomba virulencia faktorainak is fontos szerepe van. Opportunista patogén szervezetek esetében a gombák azon biológiai sajátosságait tekinthetjük virulencia faktoroknak, amelyek adott körülmények között lehetővé teszik, hogy az addig szaprofita módon élő gomba a gazdaszervezetbe jutva fenn tud maradni, és ott kórfolyamat kiváltására képes. Míg a *Candida, Cryptococcus* és *Aspergillus* fajok által okozott mikózisok patogenezisének megértésében jelentős előrelépések történtek az utóbbi évtizedben, a zigomikózisok patogenezisével csupán néhány tanulmány foglalkozik, azok is elsődlegesen a gazdaszervezet védekezési mechanizmusait vizsgálják kevés figyelmet fordítva a kórokozó gomba virulencia faktoraira (WALDORF és mtsi. 1984).

Járomspórás gombáknál az egyik alapvető tényező a termotolerancia: a kórokozóként számon tartott járomspórás fajok gyors, a normál testhőmérsékleten optimális feltételeket találó növekedésre képesek. *C. albicans* esetében bizonyos proteázokról (szekretált aszpartil-proteázok) és lipázokról bizonyították, hogy nagyban hozzájárulnak a gomba virulenciájához (FALLON és mtsi. 1997, GÁCSER és mtsi. 2007). Az extracellulárisan szekretált foszfolipázoknak (mindenekelőtt a foszfolipáz B enzimnek) a szöveti invazivitás biztosításában van kulcsszerepe (GHANNOUM 2000). Proteolítikus,

glükozidikus és lipolítikus enzimeket járomspórás gombák is aktívan termelnek (RIBES 2000). Számos proteáz, lipáz és glükozidáz kódoló gént azonosítottak *Mucor*, *Rhizopus* és *Rhizomucor* fajokban, illetve jellemezték a gének által kódolt enzimeket, de ezek patogenitásban betöltött szerepét részletesen eddig nem vizsgálták. Egy újabb tanulmány 18 patogén járomspórás gomba *in vitro* enzimaktivitásait vizsgálta (Ko és mtsi. 2007). A *Mucor* fajok magas alkohol dehidrogenáz aktivitást mutattak, míg az *Absidia corymbifera* törzsek lipáz aktivitása volt jelentős és számos poliszacharidbontó enzimet termeltek. Oxidáz aktivitást egy törzsben sem detektáltak, azonban az összes törzs intenzív kataláz aktivitást mutatott.

Pár éve fedezték fel, hogy a fertőzésekből izolált Rhizopus törzsek gyakran hordoznak a micéliumon belül egy, a Burkholderia nemzetségbe tartozó endoszimbionta baktériumot (PARTIDA-MARTINEZ és HERTWECK 2005). Később igazolták, hogy a már korábban ismert, a poliketid típusú rhizoxin és a hepatotoxikus rhizonin toxinokat nem a rizs penészesedését okozó gombák, hanem ez a baktérium termeli (PARTIDA-MARTINEZ és mtsi. 2007). Korábbi vizsgálatokban egy rhizonintermelő törzs virulensebbnek bizonyult egerek fertőzésekor más, nem-termelő Rhizopus izolátumoknál (WILSON és mtsi. 1984). Erre épül CHAMILLOS és mtsi. (2007) hipotézise, amely szerint a széleskörű antibakteriális droghasználat multidrog-rezisztens endoszimbionta baktériumokat hordozó járomspórás gombák kiszelektálódásához, illetve a járomspórás gombafertőzések számának növekedéséhez vezetett. Különösen hematológiai elváltozásokban szenvedő, illetve szervátültetett betegek körében, akik közt a zigomikózis az utóbbi időben az aszpergillózis után a második leggyakoribb gombás fertőzéssé vált. IBRAHIM és mtsi. (2008) azonban nem találtak bizonyítékot arra, hogy az endoszimbionta baktérium által termelt toxin lenne felelős a Rhizopus és más járomspórás gombák patogenitásáért. Nem találtak ugyanis különbséget a baktériumot-hordozó és nem-hordozó gombafajok virulenciájában, továbbá az endoszimbionta baktérium antibiotikum kezeléssel történő kiirtása a gombasejtekből nem eredményezte a gombatörzsek virulenciájának csökkenését. Az utóbbi kísérletekben ugyanakkor rhizonintermelő törzseket nem, csak rhizoxintermelőket vizsgáltak, így a rhizonin szerepe a patogenitásban továbbra is fontos kérdés maradt.

Szintén az elmúlt évek felismerése, hogy a zigomikózisok kialakulásának kockázata jelentősen megnő a szérum magas vas szintje esetén, illetve a vasat komplexként megkötő egyes gyógyszerekkel (pl. deferoxamin) kezelt betegeknél. A klinikai és kísérleti megfigyelések során egyértelművé vált, hogy az opportunista patogén járomspórás gombák

esetében a vas felvételében szerepet játszó transzportfehérjék is hozzájárulnak a patogenitáshoz (WEINBERG 1999).

3.4. A vasfelvétel, mint lehetséges virulencia faktor

3.4.1. Különböző vasfelvételi mechanizmusok gombákban

A vas esszenciális tápanyag a legtöbb élő szervezet számára, mivel számos oxidoredukciós folyamat kofaktoraként központi szerepet játszik a sejtek metabolizmusában (BYERS és ARCENEAUX 1998). Habár a természetben nagy mennyiségben található, aerob környezetben a mikroorganizmusok számára nehezen felvehető, oldhatatlan formában van jelen. A szabadon elérhető vas mennyisége az állati és humán gazdaszervezetek szérumában is extrém alacsony. A vas hidrogén-peroxiddal történő reakciója toxikus hidroxilgyökök képződését eredményezi, ami károsíthatja a lipideket, fehérjéket és a DNSt is, így a túlzott mennyiségben jelen lévő vas már káros a sejtek számára (MOYE-ROWLEY 2003). Mivel a vasionok egyszerre esszenciálisak és toxikusak, minden organizmus rendelkezik hatékony enzimrendszerekkel a vas felvételére és szabályozó rendszerekkel a vasfelvétel kontrollálására (EIDE 1997). A membrántranszport folyamatok által a sejtekben egyensúly áll be a biológiai folyamatokhoz szükséges és a sejtek számára már toxikus mennyiségű vas között. A vas a vérszérumban szállítófehérjékhez kötött, a sejtekben pedig raktározott formában található (GUERINOT 1994). Az állati és humán szervezetben a nagyaffinitású vaskötő fehérjék, mint a transzferrin, laktoferrin, hem és ferritin, működése következtében a szövetekben 10⁻¹⁸ M mennyiségű szabad vas található, ami túl alacsony a mikrobiális növekedés biztosításához (BULLEN 1981). A vérszérumban a transzferrin az elsődleges vaskötő fehérje, egészséges egyénekben csak körülbelül 30 %-a telített. Fertőzéskor a nem-specifikus védekezési rendszer csökkenti a transzferrin fehérjék telítettségét, amelyek további vasionok megkötésével jelentősen csökkentik a szabad vas mennyiségét a vérszérumban (BULLEN 1981). Ezáltal a szervezet képes a patogén mikroorganizmusok növekedését korlátozni.

A humán és állati kórokozók azonban számos mechanizmust fejlesztettek ki a vas megszerzésére, hogy biztosítsák a gazdaszervezetben történő növekedésüket. Gyakran ezek egymással párhuzamosan működnek a fertőzés során. Ezen folyamatok, illetve genetikai hátterük baktériumokban jobban, mikroszkópikus gombákban kevésbé feltártak (RATLEDGE és DOVER 2000, HOWARD 1999, HOWARD 2003). A gombák vasfelvételi mechanizmusairól meglévő információink döntő többsége a *Saccharomyces cerevisiae* élesztőgomba tanulmányozásából származik. Számos, a vasfelvételben és transzportjában résztvevő strukturális és szabályozó fehérjét, illetve az ezeket kódoló géneket is azonosították (LESUISSE és LABBE 1994).

A Fe³⁺ redukcióját a sejtfelszíni membránkötött metalloreduktázok (FRE1, FRE2) végzik (GEORGATSOU és ALEXANDRAKI 1994), ezután a Fe²⁺ átjutása a sejtmembránon a nagy-affinitású (más néven reduktív asszimilációs rendszer) vagy a kis-affinitású vastranszport rendszer segítségével is megtörténhet (YUN és mtsi. 2001). A nagy-affinitású vastranszport rendszer két komponense az FTR1 permeáz és a FET3 rézfüggő Fe²⁺-oxidáz (STEARMAN és mtsi. 1996, ASKWITH és mtsi. 1994). A nagy-affinitású rendszer működését az 1. ábra szemlélteti. Rézfüggő Fe²⁺-oxidáz aktivitás hiányában a Fe²⁺ direkt transzportja valósul meg a FET4 által közvetített kis-affinitású vastranszport rendszer segítségével (DIX és mtsi. 1994).





A FET3 egy belső membrán fehérje egy extracelluláris rézfüggő-oxidáz doménnel, az FTR1 a nagyaffinitású vaspermeáz, ami egy transzmembrán fehérje. Az oxidáz egy réztartalmú enzim, ami a Fe²⁺ oxidálása közben a molekuláris oxigént vízzé redukálja, az oxidált Fe³⁺ a vaspermeáz segítségével jut át a sejtmembránon. Az oxidáz és a permeáz kombinált működése a nagy-affinitású vastranszport rendszer specifitásának biztosításához szükséges.

Egyes gombáknál (pl. *Cryptococcus neoformans*) nem-enzimatikus Fe³⁺ redukció is végbemehet kis molekulasúlyú fenolos vegyületek segítségével (NYHUS és mtsi. 1997). Ezen kívül egyes gombák hidroxisavak szekretálásával a környezet savanyodását érik el, amely vasfelhalmozást eredményez a sejtfalban (HOWARD 1999). A kis-affinitású vastranszport és a nem-enzimatikus Fe³⁺ redukció csak olyan környezetben működik, ahol

elegendő vas áll rendelkezésre. Mivel a humán szérumban a mikroorganizmusok számára szabadon elérhető vas mennyisége extrém alacsony, így e mechanizmusok szerepe a virulenciában valószínűleg elhanyagolható.

Számos mikroorganizmus képes kis molekulasúlyú vaskelátoló vegyületek ún. sziderofórok termelésére és szekretálására, melyek nagy affinitással és specifikusan kötik meg a vérben lévő szabad Fe³⁺ ionokat. Termelődésük extrém alacsony vaskoncentrációjú közegben történik. Kémiai felépítésük alapján a mikrobiális sziderofórok többsége katekolát, illetve hidroxamát típusú (VAN DER HELM és WINKELMANN 1994, NEILANDS 1995, RENSHAW és mtsi. 2002, HAAS 2003). A járomspórás gombákból izolált sziderofór ugyanakkor más jellegű, az először Rhizopus-ból azonosított rhizoferrin egy polikarboxilát típusú vegyület (THIEKEN és WINKELMANN 1992). A sziderofórok által megkötött vas felvétele történhet a reduktív asszimilációs rendszeren keresztül, vagy specifikus sziderofór transzport rendszerekkel a teljes sziderofór-vas komplex bekerülhet a gombasejtekbe (LESUISSE és LABBE 1989, HOWARD 2003). A sziderofór transzporterek az MFS (major facilitator superfamily) szupercsaládba tartoznak, az általuk megvalósuló transzport egy energiaigényes, nagymértékben specifikus folyamat. A mikrobák többsége a különböző típusú sziderofórokat különböző transzport rendszerek segítségével hasznosítja. Számos mikroorganizmus rendelkezik olyan sziderofór transzport rendszerekkel is, amelyek más mikroorganizmusok által termelt ún. xenosziderofórok felvételét biztosítják. Habár a S. képes sziderofórok szintézisére, cerevisiae nem mégis négy, különböző szubsztrátspecifitással rendelkező sziderofór transzporterrel rendelkezik: SIT1/ARN3 (LESUISSE és mtsi. 1998), TAF1/ARN2 (HEYMANN és mtsi. 1999), ENB1/ARN4 (HEYMANN és mtsi. 2000a) és ARN1 (HEYMANN és mtsi. 2000b, YUN és mtsi. 2000b). A S. cerevisiae vasfelvételében és transzportjában szerepet játszó fehérjék összefoglalása a 2. ábrán látható.

Mikroszkópikus gombáknál a szérumból történő vasfelvétel egyik lehetséges formája tehát a reduktív asszimilációs rendszer segítségével történő vasfelvétel, másik lehetőség pedig a teljes sziderofór-vas komplexek bejuttatása a gombasejtekbe. Egy harmadik lehetőség a vas felszabadítása különböző vaskötő fehérjékből (pl. hemin), amely mind a reduktív, mind a sziderofórok segítségével történő vasfelvételtől függetlenül működik. Néhány patogén élesztő képes növekedni hem vagy hemoglobin tartalmú tápközegben. A *C. albicans* a Gram negatív baktériumokhoz hasonlóan rendelkezik egy hem-oxigenáz enzimmel, ennek segítségével képes felszabadítani a Fe³⁺ iont vastartalmú hemoglobin degradációs termékekből, mely aztán szubsztrátként szolgál a vasreduktáz számára (SANTOS és mtsi. 2003). *C. neoformans* is képes a hemoglobin és a hem vasforrásként történő hasznosítására *in vitro* kísérletekben, bár a mechanizmus molekuláris háttere még nem ismert (JUNG és KRONSTAD 2008).

A vasfelvétel a vas koncentráció által szabályozott folyamat, *S. cerevisiae* esetén szinte az összes ebben résztvevő gén kifejeződését az Aft1p és az Aft2p transzkripciós aktivátorok irányítják (YAMAGUCHI-IWAI és mtsi. 1995, BLAISEAU és mtsi. 2001). Az Aft1p fehérje konstitutívan fejeződik ki és a target gének promóterében elhelyezkedő YRCACCCR konszenzus szekvenciához kötődve, aktiválja azok kifejeződését.



2. ábra: A vasfelvételében és transzportjában szerepet játszó fehérjék *S. cerevisiae* élesztőgombában. (PHILPOTT és mtsi. 2002).

FIT: a sejtfal mannoproteinjei, a sziderofór-vas komplexeket a sejtfalban ill. a periplazmatikus térben tartják, ezáltal elősegítik a sziderofór-vas komplex sejtmembránon keresztüli felvételét. **FRE1,2,3**: vasreduktázok, szerepük a sziderofór-kötött vas redukálása és felszabadítása a sziderofórról. **FET3/FTR1**: nagy-affinitású vastranszport rendszer, szerepük a Fe^{2+} bejuttatása a sejtbe a sejtmembránon keresztül (FET3 által visszaoxidált Fe^{3+} formában) **FET4**: kis-affinitású vastranszporter, szerepük a FET3 oxidáz működéséhez szükséges réz biztosítása. **ARN1-4**: sziderofór transzporterek, szerepük a Fe^{3+} sziderofór komplexek specifikus felvétele a sejtbe a sejtmembránon keresztül.

Az utóbbi évtizedben a *S. cerevisiae*-n kívül számos egyéb gomba vasszerzési mechanizmusait tanulmányozták és azonosították a folyamatokban résztvevő strukturális és szabályozó fehérjéket és génjeiket. *Schizosaccharomyces pombe* esetében a vastranszportban résztvevő gének promóterében olyan konzervált regulációs elemet azonosítottak (GATA box), mely a gének szabályozásában játszik nélkülözhetetlen szerepet (PELLETIER és mtsi. 2003). A *fep1*⁺ gén által kódolt vasérzékelő transzkripciós

faktor ezekhez a GATA szekvenciához kötődve represszálja a vastranszportban résztvevő gének kifejeződését a környezetben található vas koncentrációjának emelkedésekor (PELLETIER és mtsi. 2002). Számos gombában találtak ehhez hasonló negatív regulátor elemeket (GATA faktorok) és azonosították a fehérjéket kódoló géneket is. Aspergillus nidulans-ban ilyen a srea (OBEREGGER és mtsi. 2001), azonban aktivátorként és represszorként is képes működni a Sful C. albicans-ban és a Cirl C. neoformans-ban (LAN és mtsi. 2004, JUNG és mtsi. 2006). A sziderofór bioszintézisben kulcsfontosságú peptidszintetázokat is leírtak, ezen kívül azonosították az L-ornithin-N⁵-monooxigenázt kódoló gént, ami a hidroxamát típusú sziderofórok bioszintézisének első lépését katalizálja. Ilyenek a sidC és sidA gének A. nidulans-ban (OBEREGGER és mtsi. 2002). A. nidulans-ban három sziderofór-transzportert kódoló gént is azonosítottak (mirA, mirB és mirC), amelyek a gomba által termelt sziderofórok szelektív transzportját biztosítják, azonban nem találtak ftr1 és fet3 ortológ géneket (HAAS és mtsi. 2003). Azt feltételezik, hogy A. nidulans-nál hiányzik a nagy-affinitású vaspermeáz rendszer, mivel a sidA mutáns törzs nem képes alacsony vastartalmú táptalajon növekedni, ami azzal magyarázható, hogy valószínűleg nem rendelkezik egyéb vasfelvevő rendszerrel (EISENDLE és mtsi. 2003). Az opportunista patogén A. fumigatus-nál szintén azonosították a sidA gént, azonban az A. nidulans-tól eltérően a nagy-affinitású rendszer vaspermeázát és oxidázát kódoló ftr1 és fet3 ortológ géneket is találtak (SCHRETTL és mtsi. 2004).

A humán opportunista gombafertőzések egyik leggyakoribb kiváltója, a *C. albicans* esetén is azonosították a vasreduktázt (*cfl1*), a rézfüggő-oxidázt (*Cafet3*), két nagy-affinitású vaspermeázt (*Caftr1*, *Caftr2*) és a sziderofór-permeázt (*Caarn1/Casit1*) kódoló géneket (HAMMACOTT és mtsi. 2000, ECK és mtsi. 1999, ARDON és mtsi. 2001), habár a *C. albicans* a *S. cerevisiae*-hez hasonlóan nem képes sziderofórok szintézisére. *C. albicans* esetén létezik mind a reduktív, mind a sziderofór transzport rendszertől függetlenül működő vasfelvételi útvonal is, ugyanis a gomba képes a hemint illetve a hemoglobint is vasforrásként használni. Az ehhez szükséges feltételezett hem-oxigenázt kódoló *Cahmx1*gént szintén azonosították (SANTOS és mtsi. 2003).

3.4.2. A vastranszport szerepe az opportunista patogén gombák virulenciájában

Számos mutáns törzset állítottak elő, hogy tanulmányozni tudják a vastranszporterek működését, illetve az őket kódoló gének kifejeződését és szabályozását. A vastranszportban résztvevő fehérjéket kódoló gének deléciója vagy kiütése lehetővé tette a virulenciában betöltött szerepük tisztázását is. *C. albicans* törzsek virulencia

vizsgálatakor azt állapították meg, hogy a Cafet3⁻ és a Caarn1⁻ mutáns törzsek nem mutattak csökkent virulenciát (HU és mtsi. 2002), ellenben a Caftr1⁻ mutáns törzs avirulens volt egerek szisztémás fertőzésekor (RAMANAN és WANG 2000). A humán szájnyálkahártyát modellező epitél szövettenyészet Caarn1⁻ mutáns C. albicans sejtekkel történő fertőzése azonban abortív volt (HEYMANN és mtsi. 2002). Ezek az eredmények azt sugallják, hogy a sziderofór felvétel speciálisan az epitél szövetek inváziójakor, a nyálkahártya penetrációjakor szükséges, míg vérben és egyéb szervekben a nagy-affinitású vaspermeáz (CaFTR1) nélkülözhetetlen a szisztémás fertőzés kialakításához. A C. albicans képes vasionok felszabadítására a gazdaszervezetben található vaskötő transzferrinből, ez a vasfelvétel a nagy-affinitású vastranszport rendszer segítségével történik. A CaFTR1 szerepe a szisztémás fertőzés kiváltásában és a transzferrinből történő vasfelvételben azt sugallja, hogy a szisztémás fertőzés során a szervezet transzferrin fehérjéi szolgálhatnak vasforrásként a C. albicans sejtek számára (KNIGHT és mtsi. 2005). LAN és mtsi. (2004) azonosították a vasfelvételben szerepet játszó gének negatív regulátor elemét kódoló Sful gént és megállapították, hogy több száz gén expresszióját befolyásolja a környezetben található alacsony vagy magas vaskoncentráció. Úgy gondolják, hogy a környezet alacsony vaskoncentrációja egyfajta szignálként szolgálhat a blasztospórák számára, hifális növekedésre és a különböző virulencia faktorok expressziójára késztetve őket, ezáltal a vasnak fontos szerepe lehet a kommenzalista-patogén váltásban C. albicans esetén.

Az apatogén *A. nidulans* esetén bizonyították, hogy a sziderofór bioszintézisben szerepet játszó *sidA* gén elengedhetetlenül fontos a gomba növekedéséhez, mivel a *sidA*⁻ mutáns törzs nem képes alacsony vastartalmú táptalajon növekedni (EISENDLE és mtsi. 2003). Az opportunista patogén *A. fumigatus* esetében a *sidA* gén a virulenciában is esszenciális szereppel bír, mivel a *sidA*⁻ mutáns törzs avirulens volt invazív aszpergillózist modellező egér kísérletek során. A nagy-affinitású vaspermeáz (FtrA) inaktiválása által a reduktív asszimilációs rendszer segítségével történő vastranszportot gátolták, az *ftrA*⁻ mutáns törzs azonban a vad típusú törzzsel megegyező virulenciát mutatott (SCHRETTL és mtsi. 2004). Mindezek alapján az *A. fumigatus* virulenciájában a sziderofór bioszintézis szerepét tartják elsődlegesen fontosnak, míg a reduktív vasfelvétel *in vivo* felesleges vagy csak minimális szerepel bír.

A 80'-as évek végén jelentek meg az első közlemények, melyek a zigomikózisok esetszámának ugrásszerű megnövekedését jelezték a deferoxamin kezelésben részesülő betegek között (BOELAERT és mtsi. 1988). Ezt a gyógyszert dialízises betegeknek adták a szérum vastartalmának túlzott megnövekedése esetén. Minél nagyobb mértékben

alkalmazták e vaskelátoló hatású gyógyszereket, annál jobban megnőtt a járomspórás gombák által okozott fertőzések kialakulásának esélye. Klinikai megfigyelések, illetve állatkísérletek alapján bebizonyították, hogy a járomspórás gombák hatékonyan képesek a deferoxamin-kelátolt vas hasznosítására és ez erőteljesen stimulálja növekedésüket (BOELAERT és mtsi. 1993). Külön említést érdemel az a kísérlet, amelyben a mesterségesen megfertőzött állatok deferoxamin-vas komplex jelenlétében az önmagában hatékony amfotericin B alkalmazása mellett is elpusztultak (VAN CUTSEM és BOELAERT 1989). Ismert az a tény, hogy a mikroorganizmusok döntő többsége nem kizárólag a saját maga termelte sziderofór-kötött vas felvételére képes, hanem hasznosíthatja a környezetében (adott esetben: a gazdaszervezetben) meglévő, más mikroorganizmusok által termelt, vagy egyéb oknál fogva ott megjelenő ún. xenosziderofórokat is (HOWARD 1999). Ez utóbbi folyamat a kórokozó járomspórás gombák esetében különösen nagy jelentőségű. A deferoxamin egy bakteriális eredetű, hidroxamát típusú sziderofór, amely hatékonyan képes komplexet képezni a szérumban lévő vasionokkal. Megállapították, hogy veseelégtelenség során olyan farmakokinetikai változások történnek, amelyek a szérumban a deferoxamin tartós felhalmozódását eredményezik. Ez megmagyarázhatja a deferoxamin kezelt dialízises betegek rendkívüli fogékonyságát a járomspórás gombafertőzések iránt (BOELAERT és mtsi. 1993).

A járomspórás gombák által termelt sziderofór(ok)nak elhanyagolható szerepet tulajdonítanak a virulenciában. A polikarboxilát típusú rhizoferrin ugyanis kevésbé hatékony a szérumban lévő vas megkötésében, mint a deferoxamin (BOELAERT és mtsi. 1993), illetve a rhizoferrin által kötött vas képes a szérumban lévő transzport fehérjékhez kapcsolódni és így a gombák számára hozzáférhetetlenné válni. A deferoxamin-kötött vas nem kötődik a transzferrinhez, ezért felvétele a gombasejtekbe akadálytalan (DE LOCHT és mtsi. 1994). A hematológiai rendellenességek terápiájában alkalmazott gyakori transzfúzió, a szérumban jelentkező vaskoncentráció emelkedés miatt, deferoxamin kezelés hiányában is rizikófaktort jelent (MAERTENS és mtsi. 1999). Cukorbetegek ketoacidózisa szintén jelentős kockázati tényező, ugyanis az acidózis következtében csökken a transzferrin vaskötő képessége, ami magas vaskoncentráció kialakulásához vezet (ARTIS és mtsi. 1982). A vasfelvétel mechanizmusát radioaktívan jelölt deferoxaminnal vizsgálva arra a megállapításra jutottak, hogy a vas, a sejtbe történő felvétel előtt, extracellulárisan szabadul fel a deferoxaminról (DE LOCHT és mtsi. 1994). A vas disszociációja a deferoxamin-vas komplexről egy reduktív lépést tartalmazó energiaigényes folyamat, a vas átjutása a sejtmembránon valószínűsíthetően a nagy-affinitású vaspermeáz segítségével valósul meg. A közelmúltban azonosították és klónozták a járomspórás *Rh. oryzae* nagyaffinitású vaspermeázt kódoló génjét (FU és mtsi. 2004) és igazolták, hogy a vashiány az *ftr1* gén expresszióját indukálja, míg elegendő vasforrás mellett az *ftr1* gén nem fejeződik ki. Az eddigi ismeretek összegzése a 3. ábrán látható, mely a vasmetabolizmus központi szerepét támasztja alá a járomspórás gombák által okozott fertőzések kialakulásában. Mivel a járomspórás gombák által termelt sziderofór(ok)nak elhanyagolható szerepet tulajdonítanak a virulenciában, más gombákhoz hasonlóan itt is a nagy-affinitású vaspermeáz szerepe lehet meghatározó a fertőzések során.



3. ábra: A gazdaszervezet járomspórás gombák okozta fertőzésekkel szembeni védekező mechanizmusai (SPELLBERG és mtsi. 2005).

A zigomikózis kialakulásához a járomspórás gombáknak elegendő vasat kell szerezniük a gazdaszervezetből, hogy biztosítani tudják növekedésüket, ezután a gazdaszervezet fagocita védekező mechanizmusainak kijátszásával a véredényekbe jutva képesek a szervezetben szétterjedni. Az ábra A részén egy normál gazdaszervezet látható, melyben a járomspórás gombák elleni elsődleges védekező mechanizmusok a következők: (1) a szérumban lévő vas megkötése speciális vaskötő fehérjék által; (2a) neutrofil granulociták és (2b) szöveti makrofágok általi fagocitózis; (3) az endotél sejtek általi védelem, amelyek az erek tónusát és permeabilitását biztosítják. Mindezen folyamatok együttesen gátolják a fertőzés kialakulását a szövetekben, illetve a fertőzést követő véredény invázió lejátszódását. Az ábra B részén egy fogékony gazdaszervezet látható (pl. ketoacidózisos cukorbetegeknél), melynél a gazdaszervezet védekező mechanizmusai nem működnek megfelelően. (1) A szérum savas pH-jának hatására a szabad vasionok disszociálnak a vaskötő fehérjékről, az elérhető szabad vas hatására gyors gombanövekedés indul meg. (2) A fagocita mechanizmusok defektje nem képes a gombák szaporodását gátolni. Neutropénia esetén a neutrofil granulociták száma csökken, a kortikoszteroid kezelés, a hiperglikémia és a diabetikus ketoacidózis pedig a szöveti makrofágok funkcionális működésképtelenségét okozza. (3) A gombafonalak képesek az endotél sejtekhez kötődni és azok károsítása után a véredényekbe jutnak, majd a szervezetben szétterjedve különböző szervek nekrózisát okozzák.

3.5. A patogenitás genetikai hátterének vizsgálata

3.5.1. A járomspórás gombák transzformációs rendszereinek áttekintése

A járomspórás gombák patogenitásának hátterében álló molekuláris és genetikai folyamatok tanulmányozása hatékony transzformációs rendszerek meglétét igényli, amelyek szükségesek a gének struktúrájának, funkciójának és szabályozásának tanulmányozásához, és egyben lehetőséget biztosítanak új DNS szekvenciák genomba történő bejuttatására is. A mikrobák genetikai manipulációjához szükséges transzformációs rendszerek alapja az exogén DNS bejuttatása a recipiens sejtbe, a DNS-en lévő gének kifejeződése, valamint a bevitt DNS stabil fennmaradása és replikációja. A járomspórás gombák molekuláris vizsgálatát megnehezíti, hogy nem áll rendelkezésre megbízható és általánosan alkalmazható genetikai transzformációs rendszer. A magasabbrendű gombáknál rutinszerűen alkalmazott módszerek itt gyakran nem hatékonyak, ezért patogenitásuk hátteréről csekély információval rendelkezünk (IBRAHIM és SKORY 2006).

A *S. cerevisiae* auxotróf markereken alapuló polietilén-glikol mediált (PEG) transzformációja és az *Escherichia coli* inga vektorok kifejlesztése jelentették a gombák genetikai manipulációjának kezdetét (HINNEN és mtsi. 1978, BEGGS 1978). Az első gomba transzformáció leírása óta eltelt 30 év alatt számos transzformációs módszert dolgoztak ki és nagyszámú élesztő és fonalas gomba sikeres transzformációját publikálták. (FINCHAM 1989, CASAS-FLORES és mtsi. 2004). Ennek ellenére számos gomba esetében a mai napig megoldatlan a stabil genetikai transzformáció megvalósításának kérdése.

Az első járomspórás gomba genetikai transzformációját 1984-ben közölték, ahol *M. circinelloides* leucin auxotrófját sikerült komplementálni a vad típusú *leuA* gént tartalmazó vektorral (VAN HEESWIJCK és RONCERO 1984). Azóta több járomspórás gombafaj transzformációját elvégezték – lásd az 1. táblázatot – a transzformált fajok azonban csak kis részét képezik a járomspórás gombák csoportjának. A legintenzívebben vizsgált járomspórás gomba a *M. circinelloides*, amely a biológiai kutatások kedvelt modellorganizmusa. A vizsgálatok többek között a gomba dimorf karakterére (ORLOWSKY 1991, RUIZ-HERRERA 1993), sajátos szexuális folyamataikra és a szex feromonok szerepére (GOODAY 1994), illetve a karotinoidok bioszintézisére (ITURRIAGA és mtsi. 2000, ITURRIAGA és mtsi. 2001, PAPP és mtsi. 2006) fókuszálnak.

Gombafaj	Transzf. módszer	Szelekció	Fennmaradás	Megjegyzés	Publikáció
	PEG-mediált	neomicin	extrakr. plazmid	-	WÖSTEMEYER és mtsi. 1987
41 - 1-	elektroporáció	neomicin	integráció	<i>rag1</i> elem ¹ linearizált DNS	BURMESTER és mtsi. 1990
Absidia glauca	PEG-mediált	neomicin	extrakr. plazmid	seg1 elem ²	BURMESTER és mtsi. 1992
0	elektroporáció	neomicin	extrakr. plazmid	extrakr. plazmid $\begin{array}{c} gfp \text{ riporter gén}^3\\ ragl^1, segl^2 \text{ elemek} \end{array}$	
	biolisztikus	neomicin	extrakr. plazmid	$gfp ext{ riporter gén}^3$ $rag1 ext{ elem}^1$	BARTSCH és mtsi. 2002
	PEG-mediált	leucin	extrakr. plazmid	extrakr. plazmid -	
	PEG-mediált	leucin	extrakr. plazmid	-	VAN HEESWIJCK és mtsi. 1988
	PEG-mediált	metionin	extrakr. plazmid	ARS ⁴	ANAYA és RONCERO 1991
	PEG-mediált	leucin	integráció	kimozin gén	ARNAU és mtsi. 1991
	PEG-mediált	uracil	extrakr. plazmid	ARS ⁴	BENITO és mtsi. 1992
	PEG-mediált	leucin	extrakr. plazmid	heterológ génexp.	ITURRIAGA és mtsi. 1992
	PEG-mediált	leucin	integráció	linearizált DNS	ARNAU és STROMAN 1993
Mucor circinelloides	biolisztikus	leucin	extrakr. plazmid	ARS ⁴	GONZALES-HERNANDEZ ÉS mtsi. 1997
	PEG-mediált	uracil	extrakr. plazmid -		VELAYOS és mtsi. 1998
	PEG-mediált	uracil	extrakr. plazmid heterológ génexp. ARS ⁴		RUIZ-HIDALGO és mtsi. 1999
	PEG-mediált	leucin	integráció	deléciós kazetta	NAVARRO és mtsi. 2001
	PEG-mediált	leucin	extrakr. plazmid	heterológ génexp.	WOLFF és Arnau 2002
	PEG-mediált	geneticin	extrakr. plazmid	-	APPEL és mtsi. 2004
	ATMT	higromicin B	integráció	heterológ génexp.	NYILASI és mtsi. 2005a
	PEG-mediált	uracil, leucin	extrakr. plazmid	heterológ génexp.	PAPP és mtsi. 2006
	PEG-mediált	leucin karboxin	extrakr. plazmid heterológ génexp. heterológ ARS ⁴		ORTIZ-ALVARADO és mtsi. 2006
Backusella lamprospora	ATMT	higromicin B	integráció	<i>gfp</i> riporter gén ³	NYILASI és mtsi. 2008a
Parasitella simplex	PEG-mediált	neomicin	extrakr. plazmid	-	BURMESTER 1992
	PEG-mediált	kanamicin	extrakr. plazmid	ARS ⁴	REVUELTA és JAYARAM 1986
Phycomyces	PEG-mediált	kanamicin	extrakr. plazmid	-	ARNAU és mtsi. 1988
blakesleeanus	PEG-mediált	kanamicin	extrakr. plazmid	ARS ⁴	SUAREZ és ESLAVA 1988
	PEG-mediált mikroinjekció	geneticin	extrakr. plazmid	extrém instabilitás, mutáns fenotípus	OBRAZTSOVA és mtsi. 2003
DL	PEG-mediált	leucin	integráció	linearizált DNS	WADA és mtsi. 1996
Rhizomucor	PEG-mediált	uracil	integráció		YAMAZAKI és mtsi. 1999
pusitius	PEG-mediált	geneticin	extrakr. plazmid		APPEL és mtsi. 2004
Rhizomucor miehei	ATMT	kanamicin	integráció+ extrakr. plazmid		MONFORT és mtsi. 2003
Mortierella	PEG-mediált	higromicin B	integráció + extrakr. plazmid	rDNS régió	MACKENZIE és mtsi. 2000
alpina	biolisztikus	uracil	integráció	rDNS régió	TAKENO és mtsi. 2004b
	biolisztikus	zeocin	integráció	rDNS régió	TAKENO és mtsi. 2005

1. táblázat: Járomspórás gombákkal történő transzformációs kísérletek összefoglalása.

Gombafaj	Transzf. módszer	Szelekció	Fennmaradás	Megjegyzés	Publikáció
	PEG-mediált	uracil	integráció? extrakr. plazmid	gus riporter gén ⁵	HORIUCHI és mtsi. 1995
Rhizopus oryzae	biolisztikus	uracil	integráció+ extrakr. plazmid	integráció+ lineáris DNS extrakr. plazmid fragmentum	
	ATMT	uracil, acetamid	integráció	-	MICHIELSE és mtsi. 2004
	biolisztikus	uracil	extrakr. plazmid	<i>gfp</i> riporter gén ³	MERTENS és mtsi. 2006
	PEG-mediált	kanamicin	integráció? extrakr. plazmid	-	YANAI és mtsi. 1990
Rhizopus niveus	PEG-mediált	blaszticidin S	extrakr. plazmid	<i>lacZ</i> riporter gén ⁶	YANAI és mtsi. 1991
	PEG-mediált	leucin	extrakr. plazmid	ARS ⁴	LIOU és mtsi. 1992
	PEG-mediált	leucin	extrakr. plazmid	ARS ⁴	TAKAYA és mtsi. 1996

1. táblázat: Járomspórás gombákkal történő transzformációs kísérletek összefoglalása (folytatás). ¹ rag1 – DNS integrációt elősegítő repetitív szekvencia, ² seg1 – az autonóm replikálódó plazmidok mitótikus stabilitását növelő szekvencia, ³ gfp – zöld fluoreszcens fehérjét kódoló gén, ⁴ ARS –autonóm replikációt biztosító szekvencia, ⁵ gus - β -glükuronidázt kódoló gén, ⁶ lacZ - β -galaktozidázt kódoló gén

Habár a járomspórás gombákkal foglalkozó kutatók számos genetikai vizsgálatot végeztek az említett gombafajokkal, bizonyos alap molekuláris biológiai folyamatok, mint pl. a stabil transzformáció és a kettős rekombinációval történő géncsere kérdése még mindig problémát jelent. Ezek egyrészt micéliumuk cönocitikus felépítésének, másrészt annak a sajátosságuknak köszönhető, hogy a transzformáláskor bejuttatott idegen DNS-t többnyire autonóm módon replikálódó plazmidként tartják fenn a sejtekben (IBRAHIM és SKORY 2006). Kevés információ áll rendelkezésünkre ezen gombák rekombinációs és replikációs mechanizmusairól, amelyek meghatározzák a bejuttatott DNS sorsát (SKORY 2002, SKORY 2004, SKORY 2005).

Járomspórás gombák hatékony transzformációs rendszerei leucin, uracil és metionin auxotrófia markerek komplementációján alapulnak. Ezek hátránya, hogy rendelkeznünk kell a transzformálni kívánt gomba megfelelő auxotróf mutáns törzsével. Domináns szelekciós markerként általában bakteriális eredetű, drogrezisztenciát kódoló géneket használnak. Ezek lehetővé teszik a transzformánsok növekedését olyan specifikus antibiotikumok jelenlétében is, amelyek egyébként toxikusak a vad típusú törzsre. Ilyen drogrezisztencián alapuló szelekciós rendszerek alkalmazása számos, különböző rendszertani csoportba tartozó gombafaj transzformációját tette már lehetővé. A domináns szelekciós markerek előnye, hogy nem igénylik a recipiens törzs genotípusának ismeretét, viszont csak az antibiotikumokra érzékeny gombafajok esetén használhatók. A járomspórás gombák azonban a legtöbb antibiotikummal szemben nagyfokú rezisztenciát mutatnak.

P. blakesleeanus esetén kanamicin, *A. glauca* és *P. simplex* esetén pedig neomicin rezisztencián alapuló szelekcióval próbálkoztak, ezek azonban nem biztosítottak stabil transzformációt. *M. circinelloides* esetén sokáig kizárólag auxotróf markereken alapuló szelekciót használtak, mivel ez a gomba különösen rezisztens számos antibiotikummal szemben (VAN HEESWIJCK és mtsi. 1988), azonban nemrég sikeresen alkalmaztak egy geneticin és egy karboxin alapú domináns szelekciós rendszert (APPEL és mtsi. 2004, ORTIZ-ALVARADO és mtsi. 2006). *M. alpina* esetén higromicin alapú szelekciós rendszert, *Rh. niveus* esetén pedig kanamicin és blaszticidin-S rezisztencia markereket alkalmaztak. *Rh. oryzae* esetén acetamid hasznosítást (amdS) biztosító vektorokkal is próbálkoztak, ezt ekkor használták először járomspórás gombák esetén (MICHIELSE és mtsi. 2004).

A járomspórás gombáknál főként a PEG-mediált transzformációt alkalmazzák. Az eljárás fontos lépése a protoplaszt képzés, amely hatékony sejtfal-emésztő enzimeket igényel. A spórákból vagy a hifákból történő protoplaszt képzés a gombák nagy részénél rutin feladat, számos gomba esetén azonban problémás lehet, például a sejteket körülvevő anyagok miatt. A járomspórás gombák kitin és kitozán tartalmú sejtfalát emésztő, kereskedelmi forgalomban lévő enzim hiánya nehezíti a módszer alkalmazhatóságát (JUNG és mtsi. 2000). Néhány éve *A. glauca*-nál sikerrel alkalmazták az elektroporációs módszert protoplasztok transzformálására (SCHILDE és mtsi. 2001) és néhány fajnál megpróbálkoztak a biolisztikus módszerrel is. *M. circinelloides* (GONZALES-HERNANDEZ és mtsi. 1997), *Rh. oryzae* (SKORY 2002, MERTENS és mtsi. 2006) és *A. glauca* (BARTSCH és mtsi. 2002) esetében azonban a cirkuláris DNS bevitele mitótikusan instabil transzformánsokat eredményezett, *M. alpina* esetében (TAKENO és mtsi. 2004b) kis gyakorisággal kaptak stabil, integratív transzformánsokat is.

A legtöbb fonalas gombával ellentétben, ahol a transzformáló plazmidok a genomba integrálódnak, a járomspórás gombákban, a transzformálási módszertől függetlenül, a bevitt idegen DNS csaknem kizárólag extrakromoszómális plazmidként marad fenn a sejtekben. Noha nagy transzformációs gyakoriság érhető el, a plazmidok alacsony kópiaszámban találhatók a sejtekben, melyek nem-szelektív körülmények között gyorsan elvesznek, alacsony mitótikus stabilitást eredményezve (IBRAHIM és SKORY 2006). Az integráció még akkor is igen ritka esemény, ha a plazmid kiterjedt, a gazdagenommal homológ szakaszokat tartalmaz (ARNAU és mtsi. 1991, ARNAU és STROMAN 1993, WADA és mtsi. 1996, YAMAZAKI és mtsi. 1999). *A. glauca*-nál repetitív elemeket tartalmazó vektor (BURMESTER és mtsi. 1990), *M. alpina* esetében homológ riboszómális DNS régiót tartalmazó vektorok (MACKENZIE és mtsi. 2000, TAKENO és mtsi. 2004b), míg *Rh. oryzae*

esetében lineáris fragmentum alkalmazásával értek el integrációt (SKORY 2002). Olyan lineáris DNS fragmentumokkal ugyanis, melyek végükön az integrációt (kettős homológ rekombinációval) irányító szakaszokat hordoznak, a beépülés kikényszeríthető, de ennek gyakorisága viszonylag alacsony marad. Integráció során gyakran megfigyelték a transzformáló DNS csonkolását, kisebb-nagyobb delécióját és átrendeződését is (BURMESTER és mtsi. 1990, YANAI és mtsi. 1990, YANAI és mtsi. 1991, BURMESTER 1992, ARNAU és mtsi. 1991, MACKENZIE és mtsi. 2000, MONFORT és mtsi. 2003). Ennek hátterében egy, a genomot védő mechanizmust sejtenek, ami felismeri és meggátolja az idegen DNS gazdagenomba történő integrációját (OBRAZTSOVA és mtsi. 2003).

M. circinelloides jellemző sajátsága, más járomspórás gombákkal szemben, hogy a nem-rokon szervezetekből származó, heterológ gének is viszonylag jól kifejezhetők benne (ITURRIAGA és mtsi. 1992, RUIZ-HIDALGO és mtsi. 1999, ITURRIAGA és mtsi. 2001, WOLFF és ARNAU 2002, PAPP és mtsi. 2006). Heterológ eredetű gének kifejeződéséhez több *Mucor* gén szabályozó régiója is alkalmas lehet, a legígéretesebbnek a glicerinaldehid-3-foszfát dehidrogenáz gén (*gpd1*) promótere tűnik. Ezt az általában konstitutívan és erősen kifejeződő gént *M. circinelloides* esetén azonosították (EMBL azonosító: AJ293012), és részletesen jellemezték (WOLFF és ARNAU 2002). A későbbiekben a *M. circinelloides gpd1* gén szabályozó régióit más járomspórás gombák transzformációjához is felhasználták (APPEL és mtsi. 2004, PAPP és mtsi. 2006).

3.5.2. Agrobacterium tumefaciens által közvetített transzformáció

A gombák transzformálásának egy új és ígéretes módszere az *Agrobacterium tumefaciens* által közvetített transzformáció (ATMT), amely számos előnnyel rendelkezik a hagyományos módszerekkel szemben. A PEG-közvetített transzformáció fontos lépése a protoplaszt képzés, az ATMT módszerrel azonban a hifák és a csírázó spórák a sejtfal eltávolítása nélkül transzformálhatók. ATMT során a transzformáló DNS integrációja a genomba általában egy kópiában és véletlenszerű helyre történik, így a módszer jól alkalmazható inszerciós mutagenezisre. A módszerrel heterológ szekvenciák is integrálhatók homológ szekvenciákat hordozó vektorok használata nélkül, homológ szekvenciák alkalmazásával azonban célzott integráció is elérhető. Az ATMT hatásfoka többszázszorosa is lehet a protoplaszt-aggregációs módszernek (DE GROOT és mtsi. 1998). Ezen túlmenően, az *A. tumefaciens* nagy molekulasúlyú (150 kb) idegen DNS gazdagenomba történő átvitelére is képes (HAMILTON és mtsi. 1996).

Az ATMT egy természetes növényi transzformációs mechanizmuson alapszik. Az *A. tumefaciens* egy Gram negatív talajlakó baktérium, amely a kétszikű gazdanövényekben tumoros elváltozást okoz. A baktérium rendelkezik egy tumor-indukáló plazmiddal (Ti plazmid), amelyen a tumorképzés indukciójára és a plazmidok átvitelére vonatkozó információk találhatók. A Ti plazmid része, az ún. T-DNS a megfertőzött növényi sejtbe jutva beépül annak genomjába. A növényi genomba történő integrálódás után a T-DNS-ről növényi hormonok expressziója indul meg, melyek a növényi sejt kontrollálatlan növekedését okozzák. Ez a kiindulópontja a tumorképződésnek. A fertőzött növényi szövetek a baktérium növekedését biztosító opinokat termelnek, a Ti plazmidon ezek bioszintézisét és felhasználását biztosító gének is megtalálhatók.



4. ábra: Az Agrobacterium tumefaciens T-DNS transzferének hipotetikus modellje (LI és mtsi. 2000).

A 4. ábrán a T-DNS transzfere látható. A T-DNS képződésében, transzportjában és integrációjában szintén a Ti plazmidon elhelyezkedő virulencia gének (*vir*) ill. azok termékei játszanak fontos szerepet. Ezek expresszióját a sebzett növényi sejtek által szekretált vegyületek, pl. acetosziringon (AS) indukálják (KADO 1991). A növény által kibocsátott fenol származékok inducerként hatnak és a baktériumokat a sebzési pontokhoz

vonzzák. A növényi jelmolekulák felismerésében egy kétkomponensű regulátor rendszer játszik szerepet: a *vir*A gén terméke egy transzmembrán szenzor fehérje, amely AS hatására autofoszforilálódik, majd a *vir*G foszforilálásával továbbítja az intracelluláris jelet a Ti plazmid felé. Az aktivált *vir*G DNS-kötő tulajdonsággal rendelkezik, specifikusan kötődik a többi *vir* gén promóteréhez és transzkripciós aktivátorként indukálja azok kifejeződését. A *vir* gének által kódolt fehérjék különböző funkcióval bírnak, a T-DNS kivágása után biztosítják az egyszálú T-elem védelmét és transzportját a baktérium sejtből a növényi sejtekbe, és szerepet játszanak a növényi genomba történő integrációjában is. A fehérje burkolt T-komplex a növényi sejtbe a sebzéseken keresztül, a sejtmagba a pórusokon keresztül lép be, majd random módon integrálódik a növényi genomba.

A tumor indukcióhoz és az opin bioszintézishez szükséges gének eltávolítása nem befolyásolja a T-DNS régió transzferét. A T-DNS régiót mindkét végén 24 bázisos ismétlődő szekvencia határolja, ezen belül a gének kivághatók és a határoló szekvenciák közé tetszőleges gén illeszthető be, így a tumorképző képességüket elvesztett baktériumok mesterséges génátvitelre használhatók. Az ATMT-hez a Ti plazmid két komponense szükséges: a T-DNS és a *vir* régió. Az ATMT módszer alappillérei az ún. bináris Ti vektorok, ahol külön plazmidon található a T-DNS a transzformálni kívánt génekkel és külön ún. helper plazmidon találhatók a T-DNS átjutását biztosító *vir* gének.

Az ATMT módszert régóta használják növények transzformációjára, a kilencvenes évek végén jelentek meg az első publikációk, melyekben a módszer sikeres megvalósítását közölték gombák esetében is (BUNDOCK és mtsi. 1995, DE GROOT és mtsi. 1998). Az első alkalmazás óta folyamatosan nő azon aszkuszos és bazídiumos gombafajok száma, amelyek az ATMT módszerrel transzformálhatók (2. táblázat). Az ATMT segítségével olyan gombafajok tanulmányozása is lehetővé vált, amelyek tradicionális módszerekkel nehezen vagy egyáltalán nem transzformálhatók (pl.: *Agaricus bisporus, Calonectria morganii, Fusarium circinatum, Helminthosporium turcicum*), vagy ahol a hagyományos módszerek nem eredményeznek stabil DNS integrációt.

Az ATMT lépései hasonlóak a különböző gombafajoknál, azonban a sikeres transzformációhoz és a transzformációs hatékonyság növeléséhez szükség van számos tényező optimalizálására.

Transzformált gombafaj	Törzs	Szelekciós marker	Publikáció
Saccharomyces cerevisiae	Ascomycota	uracil	BUNDOCK és mtsi. 1995
Aspergillus awamori, A. niger, Fusarium venenatum, Trichoderma reesei, Neurospora crassa, Colletotrichum gloeosporioides	Ascomycota	higromicin B	DE GROOT és mtsi. 1998
Kluyveromyces lactis	Ascomycota	uracil	BUNDOCK és mtsi. 1999
Coccidioides immitis	Ascomycota	higromicin B	ABUODEH és mtsi. 2000
Fusarium oxysporum	Ascomycota	higromicin B	MULLINS és mtsi. 2001
Fusarium circinatum	Ascomycota	higromicin B	COVERT és mtsi. 2001
Calonectria morganii	Ascomycota	higromicin B	MALONEK és MEINHARDT 2001
Verticillium fungicola	Ascomycota	higromicin B	AMEY és mtsi. 2001
Agaricus bisporus	Basidiomycota	higromicin B	MIKOSCH és mtsi. 2001
Magnaporthe grisea	Ascomycota	higromicin B	RHO és mtsi. 2001
Mycosphaerella graminicola	Ascomycota	higromicin B	ZWIERS és DE WAARD 2001
Suillus bovinus	Basidiomycota	higromicin B,	HANIF és mtsi. 2002
Histoplasma capsulatum	Ascomycota	higromicin B	SULLIVAN és mtsi. 2002
Monascus purpureus	Ascomycota	higromicin B	CAMPOY és mtsi. 2003
Botrytis cinerea	Ascomycota	higromicin B	ROLLAND és mtsi. 2003
Ophiostoma piceae	Ascomycota	higromicin B	TANGUAY és BREUIL 2003
Helminthosporium turcicum	Ascomycota	higromicin B	DEGEFU és HANIF 2003
Venturia inaequalis	Ascomycota	higromicin B	FITZGERALD és mtsi. 2003
Hebeloma cylindrosporum	Basidiomycota	higromicin B	COMBIER és mtsi. 2003
Phytophthora infestans	Oomycota	geneticin	VIJN és GOVERS 2003
Rhizomucor miehei	Zygomycota	kanamicin	MONFORT és mtsi. 2003
Rhizopus oryzae	Zygomycota	uridin	MICHIELSE és mtsi. 2004
Ceratocystis resinifera	Ascomycota	higromicin B	LOPPNAU és mtsi. 2004
Cryphonectria parasitica	Ascomycota	higromicin B	PARK és Kim 2004
Paracoccidioides brasiliensis	Ascomycota	higromicin B	LEAL és mtsi. 2004
Leptosphaeria maculans	Ascomycota	higromicin B	GARDINER és HOWLETT 2004
Cryptococcus neoformans	Basidiomycota	sztreptotricin	IDNURM és mtsi. 2004
Hypholoma sublateritium	Basidiomycota	higromicin B	GODIO és mtsi. 2004
Tuber borchii	Ascomycota	higromicin B	GRIMALDI és mtsi. 2005

2. táblázat: Néhány ATMT módszerrel transzformált gombafaj (MICHIELSE és mtsi. 2005).

Összefoglalva elmondhatjuk, hogy a járomspórás gombák hatékony transzformációját számos tényező megnehezíti. A cönocitikus micélium, a hatékony szelekciós drogok hiánya, a transzformáló DNS extrakromoszómális állapotban tartásából következő mitótikus instabilitás hátráltatja a járomspórás gombák analízisét és genetikai manipulációját. Az ATMT módszer alkalmazása azonban homológ és heterológ transzformációból származó stabil integratív transzformánsok előállítására is lehetőséget adhat. A transzformációs módszer használata lehetőséget teremthet a járomspórás gombák patogenitásért felelős génjeinek tanulmányozására is.

4. Célkitűzések

Munkánk során célul tűztük ki a nagy-affinitású vaspermeázt kódoló *ftr1* génnel homológ genetikai elemek azonosítását, izolálását és összehasonlítását különböző járomspórás gombákban.

Terveink között szerepelt az *ftr1* génre alapozott diagnosztikai módszer kidolgozása is, melynek segítségével a legfontosabb járomspórás gombák megbízhatóan azonosíthatók.

A járomspórás gombák patogenitásának vizsgálata hatékony transzformációs rendszereket igényel. Ezért célul tűztük ki a genetikai transzformációt lehetővé tevő, a jelenleginél hatékonyabb szelekciós és transzformációs rendszerek kidolgozását, valamint az *Agrobacterium tumefaciens* által közvetített transzformáció alkalmazhatóságának vizsgálatát különböző járomspórás gombák esetében.

Az izolált *ftr1* génre alapozott transzformáló vektorok alkalmazásával célunk volt *ftr1* deléciós mutáns törzsek létrehozása is.

5. Anyagok és módszerek

5.1. A kísérletek során alkalmazott törzsek

Kód	Fajnév	Törzsgyűjteményi szám	Szubsztrát / Eredet	Megjegyzések
Rh18	Rhizopus oryzae	TJM 24B2	Füge / Merced, Kalifornia, USA	<i>Rh. stolonifer-</i> ként kaptuk, RAPD-dal, PCR-RFLP-vel azonosítottuk
Rh24	Rhizopus oryzae	SZMC 0497	Laboratóriumi kontamináció / Szeged, Magyarország	RAPD-dal azonosítottuk
Rh27	Rhizopus microsporus var. oligosporus	NRRL 514	Tempeh / Indonézia	Más törzsgyűjteményekben: CBS 337.62, ATCC 46348
Rh28	Rhizopus oryzae	NRRL 2908	Kínai élesztő / Kína	<i>Rh. tritici</i> típustörzs Más törzsgyűjteményekben: ATCC 52310, CBS 128.08
Rh40	Rhizopus niveus	CBS 403.51	Ismeretlen / Japán	<i>Rh. niveus</i> típustörzs jelenleg <i>Rh. stolonifer</i> -ként van a CBS-ben; ATCC 52312
Rh42	Rhizopus stolonifer var. stolonifer	CBS 347.49	Tempeh / Indonézia	Rhizopus nigricans
Rh45	Rhizopus stolonifer var. reflexus	CBS 320.35	-	CBS párosodási típus teszttörzs <i>Rh. reflexus</i> -ként izolálták, 1984-ig <i>Rh. circinans</i> volt
Rh48	Rhizopus oryzae	CBS 112.07	Ismeretlen / Hollandia	<i>Rh. oryzae</i> típustörzs Más törzsgyűjteményekben: ATCC 56536, NRRL 3133
Rh49	Rhizopus oryzae	CBS 260.28	Kínai élesztő / Kína	Rh. liquefaciens típustörzs
Rh50	Rhizopus oryzae	SZMC 8100	Ismeretlen / USA	Pyr17: NRRL 395 izolátum <i>ura</i> auxotróf mutáns törzse zigomikózis
Rh58	Rhizopus schipperae	CBS 138.95	Mielómás beteg, hörgőváladék / USA	<i>Rh. schipperae</i> típustörzs zigomikózis
Rh59	Rhizopus oryzae	CBS 109.939	Ember, háti bőr lézió / Toronto, Kanada	zigomikózis
Rh60	Rhizopus oryzae	CBS 395.54	Cukorbeteg / USA	zigomikózis
Rh61	Rhizopus oryzae	CBS 146.90	Ember, lágy szájpad / Hollandia	zigomikózis
Rh62	Rhizopus microsporus var. rhizopodiformis	CBS 220.92	Ember, tüdő / Hollandia	zigomikózis
Rh63	Rhizopus microsporus var. rhizopodiformis	CBS 102.277	Rhinocerebrális emberi fertőzés / Ismeretlen	zigomikózis
Rh64	Rhizopus microsporus var. rhizopodiformis	UHF R3053	Disszeminált emberi fertőzés / Texas, USA	zigomikózis
B1	Backusella lamprospora	NRRL 1422	-	-

3. táblázat: A nagy-affinitású vaspermeáz gén (*ftr1*) vizsgálatakor felhasznált járomspórás gomba törzsek.

Kód	Fajnév	Törzsgyűjteményi szám	Szubsztrát / Eredet	Megjegyzések
M4	Mucor plumbeus	ATCC 42423	-	Más törzsgyűjteményekben: CCFC 144780
M15	Mucor rouxii	ATCC 24905	Rizs fermentáció / Ismeretlen	Más törzsgyűjteményekben: CBS 416.77
M16	Mucor circinelloides	FRR 2109	-	-
M20	Mucor circinelloides f. lusitanicus	ATCC 1216b	-	Más törzsgyűjteményekben: CBS 277.49(+), NRRL 3631(-)
M52	Mucor racemosus f. racemosus	NRRL 3640	Ismeretlen / Svájc	Mucor racemosus típustörzs
R15	Rhizomucor miehei	CBS 360.92	Emberi mikózis / Ausztrália	homotallikus
R18	Rhizomucor pusillus	WRLCN(M) 231	Állati mikózis / Ismeretlen	-
S1	Syncephalastrum racemosum	SZMC 2011	-	-

3. táblázat: A nagy-affinitású vaspermeáz gén (*ftr1***) vizsgálatakor felhasznált járomspórás gomba törzsek (folytatás).**

Kód	Fajnév	Törzsgyűjteményi szám	Szubsztrát / Eredet	Megjegyzések
M20	Mucor circinelloides f. lusitanicus	ATCC 1216b	-	Más törzsgyűjteményekben: CBS 277.49(+), NRRL 3631(-)
MS12	Mucor circinelloides f. lusitanicus	SZMC 12082	-	A CBS 277.49(+)izolátum <i>leuA</i> és <i>pyrG</i> mutáns törzse
B1	Backusella lamprospora	MUFS A8	-	-
R18	Rhizomucor pusillus	WRLCN(M) 231	Állati mikózis	-
R18U3	Rhizomucor pusillus	-	-	Rhizomucor pusillus ura auxotróf mutáns törzse

4. táblázat: A transzformációs kísérletek során felhasznált járomspórás gomba törzsek.

Az ATMT során alkalmazott A. tumefaciens törzsek:

- A. tumefaciens AGL1 törzs (LAZO és mtsi. 1991), amely a pTiBo542ΔT helper plazmidot (HOOD és mtsi. 1986) hordozza. Az AGL1 törzs genomja rifampicin és carbenicillin rezisztencia gént hordoz, míg a helper plazmid nem hordoz rezisztencia gént. A transzformálások során az AGL1 törzs pBHt2 bináris vektort (MULLINS és mtsi. 2001) hordozó származékát, az SK561 törzset használtuk.
- A. tumefaciens GV2260 törzs, amely a pTiB6S3∆T helper plazmidot (MCBRIDE és SUMMERFELT 1990) hordozza. A GV2260 törzs genomja rifampicin rezisztencia gént, míg a helper plazmid carbenicillin (ampicillin) rezisztencia gént hordoz.

A. tumefaciens GV3101 törzs, amely a pMP90 helper plazmidot (a pTiC58 származéka; KONCZ és SCHELL 1986) hordozza. A GV3101 törzs genomja rifampicin, míg a helper plazmid gentamicin rezisztencia gént hordoz.

Az utóbbi két törzs csak a virulenciáért felelős régiót tartalmazó helper plazmidokat hordozta, de nem tartalmazott bináris vektorokat. Az általunk létrehozott vektorokat illetve a S. F. COVERT-től kapott pPK2 vektort ezekbe a törzsekbe jutattuk be elektroporációval. A bináris vektorok minden esetben kanamicin rezisztencia gént hordoztak.

A génklónozási munkák során az *E. coli* TOP10F⁻ törzsét használtuk.

5.2. Az alkalmazott táptalajok, tápoldatok és tenyésztési körülmények

5.2.1. Az alkalmazott táptalajok és tápoldatok

A gomba törzsek fenntartásához és szaporításához alkalmazott táptalajok:

Malátás táptalaj (MEA): 1% glükóz; 0,5% malátakivonat; 0,5% élesztőkivonat; 1% KH₂PO₄; 1,5% agar

Élesztő-glükóz táptalaj (YEG): 1% glükóz; 0,5% élesztőkivonat; 2% agar Élesztő-glükóz tápoldat (YEG): 1% glükóz; 0,5% élesztőkivonat

Baktérium törzsek fenntartásához és szaporításához alkalmazott táptalajok:

Luria-féle táptalaj (LB): 1% NaCl; 1% tripton; 0,5% élesztőkivonat; 1,5% agar (pH 7,0) Luria-féle tápoldat (LB): 1% NaCl; 1% tripton; 0,5% élesztőkivonat (pH 7,0) (Mindkét esetben 100 µg/ml ampicillin, 100 µg/ml rifampicin, 25 µg/ml gentamicin vagy 50 µg/ml kanamicin antibiotikummal egészítettük ki az *A. tumefaciens* törzsek megfelelő szelekciójához.)

ATMT során alkalmazott táptalajok:

Indukciós tápoldat (IM): 1x MM sóoldat; 10 mM glükóz; 0,5% glicerin; 40 mM MES Indukciós táptalaj (IM): 1x MM sóoldat; 5 mM glükóz; 0,5% glicerin; 40 mM MES; 1,5% agar

(Mindkét esetben 200 µM acetosziringonnal kiegészítve)

YEG táptalaj: 1% glükóz; 0,5% élesztőkivonat; 2% agar

(a *B. lamprospora* transzformánsok szelekciójához 100 μg/ml higromicin B-vel és 200 μM cefotaximmal, *M. circinelloides* transzformánsok szelekciójához 100 μg/ml higromicin B-vel, 200 μM cefotaximmal, 100 μg/ml bengálvörössel és 3 μg/ml dikloránnal kiegészítve)

Elektroporálás során alkalmazott tápoldat:

SOC tápoldat: 0,05% NaCl; 2% tripton; 0,5% élesztőkivonat; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl₂; 20 mM glükóz (pH 7,0)

PEG-mediált transzformáció során használt táptalajok:

Minimál táptalaj (YNB): 1% glükóz; 0,15% (NH₄)₂SO₄; 0,15% Na-L-glutaminát; 0,05% YNB; 2% agar (amennyiben szükséges 0,05% uracillal vagy 0,05% leucinnal kiegészítve) Élesztő-pepton-glükóz tápoldat (YPG): 0,3% élesztőkivonat; 1% pepton; 2% glükóz Minimál fedőagar (YNB): 1% glükóz; 0,15% (NH₄)₂SO₄; 0,15% Na-L-glutaminát; 0,05% YNB; 1% agar (amennyiben szükséges 0,05% uracillal vagy 0,05% leucinnal kiegészítve) A táptalajokat ozmotikus stabilizátorként 0,8 M szorbitollal egészítettük ki.

Uracil auxotróf mutánsok szelekciójához használt táptalaj:

Minimál táptalaj (YNB): 1% glükóz; 0,15% (NH₄)₂SO₄; 0,15% Na-L-glutaminát; 0,05% YNB; 0,05% uracil; 2 mg/ml FOA; 2% agar

5.2.2. Tenyésztési körülmények

A gomba törzsek fenntartása malátás táptalajon 4°C-on történt, kéthavonkénti átoltással. A gomba törzsek tenyésztése MEA vagy YEG táptalajon történt, *Rh. oryzae*, *Rh. schipperae*, *Rh. microsporus* var. *rhizopodiformis*, *R. miehei* és *R. pusillus* törzsek esetében 37°C-on, a többi gomba izolátum esetében 25°C-on.

A baktériumok tenyésztése a megfelelő antibiotikummal kiegészített LB tápoldatban történt, *E. coli*-t 37°C-on, *A. tumefaciens*-t 28°C-on növesztettük.

A genomi DNS kivonáshoz a tenyészeteket YEG tápoldatban 25°C vagy 37°C hőmérsékleten, 3 napon keresztül rázatva neveltük. Az így kapott micéliumtömeget szűréssel gyűjtöttük, steril desztillált vízzel többször átmostuk, majd fagyasztva tároltuk a későbbi felhasználásig.

Az ATMT során kapott *B. lamprospora* transzformánsokat 100 μ g/ml higromicin B-vel és 200 μ M cefotaximmal kiegészített YEG táptalajon neveltük, míg a *M. circinelloides* (M20) transzformánsok tenyésztése 100 μ g/ml higromicin B-vel, 200 μ M cefotaximmal, 100 μ g/ml bengálvörössel és 3 μ g/ml dikloránnal kiegészített YEG táptalajon történt.
A PEG-közvetített transzformáció során kapott *M. circinelloides* (MS12) transzformánsokat leucinnal (500 μg/ml) kiegészített minimál táptalajon (YNB), négy napig szobahőmérsékleten növesztettük. Esetenként az MS12 törzset komplett táptalajon tenyésztettük (YPG, YEG).

A PEG-közvetített transzformáció során kapott *R. pusillus ftr1*⁻ mutáns törzseket minimál táptalajon (YNB), a *R. pusillus pyr4* mutáns törzseket pedig uracillal kiegészített minimál táptalajon (YNB), négy napig 37°C hőmérsékleten növesztettük.

5.3. Az alkalmazott pufferek, oldatok és reagensek

Genomi DNS tisztításhoz használt anyagok:

Lízis puffer: 50 mM Tris HCl (pH 8,0) ; 20 mM EDTA; 1% Na-lauril-szarkozin PCI: fenol - kloroform - izoamilalkohol 25:24:1 arányú keveréke CsCl grádienshez: 47,75% CsCl; 10 mg/ml bis-benzimid (1,5%-os)

Gélelektroforézishez használt anyagok:

TAE puffer: 40 mM Tris-ecetsav (pH 7,6) ; 1 mM Na₂EDTA
Agaróz gél: 0,8 vagy 1% agaróz TAE pufferben oldva
Etídium-bromid törzsoldat (Sigma): 10 mg/ml desztillált vízben oldva
Mintapuffer: 40% szacharóz; 0,25 M brómfenolkék; 0,2 M EDTA; pH 8
6x DNS mintapuffer (Fermentas)

Kompetens *E. coli* sejtek készítéséhez és transzformációjához használt oldatok: 100 mM CaCl₂ oldat TCM puffer: 10mM Tris (pH 7,5); 10 mM CaCl₂; 10 mM MgCl₂ X-gal: 20 mg/ml dimetilformamidban oldva (Fermentas) IPTG: 20 mg/ml steril desztillált vízben oldva (Fermentas)

Kompetens *A. tumefaciens* sejtek készítéséhez használt oldatok: 10%-os glicerin

<u>A. tumefaciens</u> sejtekből történő plazmid DNS tisztításhoz használt anyagok:
TE puffer: 10 mM Tris (pH 8); 1 mM EDTA
5 M NaCl oldat
10%-os Na-lauril-szarkozin oldat

Lizozim (Reanal): 20 mg/ml törzsoldat

ATMT során alkalmazott anyagok:

2,5x MM sóoldat: 26,6 mM KH₂PO₄; 29,4 mM K₂HPO₄; 6,4 mM NaCl; 5,1 mM MgSO₄.7H₂O; 1,1 mM CaCl₂.2H₂O; 22,3 μM FeSO₄.7H₂O; 9,5 mM (NH₄)₂SO₄
1 M MES: 2-N-morfolin-etánszulfonsav törzsoldat, pH 5,3-ra állítva 5 M KOH-dal
25 mM acetosziringon (Fluka): 3,5-dimetoxi-4-hidroxi-acetofenon törzsoldat desztillált vízben oldva, pH 8-ra állítva 5 M KOH-dal
Cefotaxim (Merck): 50 mM (23,8 mg/ml) törzsoldat steril desztillált vízben oldva

<u>Protoplasztképzéshez és PEG-mediált transzformációhoz használt oldatok:</u>
Protoplasztáló oldat: 100 mM Na-foszfát puffer; 0,8 M szorbitol; 1,5% csigaenzim Na-foszfát-puffer (100mM): 25 mM Na₂HPO₄, 75 mM NaH₂PO₄
SMC puffer: 50 mM CaCl₂; 10 mM MOPS; 0,8 M szorbitol
PMC puffer: 40% PEG 4000; 10 mM MOPS; 0,6 M szorbitol; 50 mM CaCl₂

Baktériumtelep és DNS blottoláshoz illetve hibridizációhoz használt oldatok:

10%-os SDS oldat

Denaturáló oldat: 0,5 M NaOH; 1,5 M NaCl

Neutralizáló oldat: 0,5 M Tris; 1,5 M NaCl; pH 8

20x SSC: 3,0 M NaCl; 0,3 M Na-citrát; pH 7

0,25 M HCl oldat

Hibridizációs puffer: 5x SSC; 0,1% Na-lauril-szarkozin; 0,02% SDS; 1% blokkoló reagens Mosó pufferek: 2x SSC; 0,1% SDS

0,1x SSC; 0,1% SDS

1. detektáló puffer: 0,01 M maleinsav; 0,015 M NaCl; pH 7,5

2. detektáló puffer: 1% blokkoló reagens (Roche) 1. detektálási pufferben

3. detektáló puffer: 0,1 M Tris-HCl; 0,1 M NaCl; 50 mM MgCl₂; pH 9,5

Előhívó oldat: GBX developer and replenisher (Kodak)

Fixáló oldat: GBX fixer and replenisher (Kodak)

Egyéb felhasznált anyagok és reagensek:

Bengálvörös (Fluka): 3',4',5',6'-tetraklór-2',4',5',7'-tetrajód-fluoreszcein-dinátrium só 25 mg/ml törzsoldata steril desztillált vízben oldva

Diklorán (Aldrich): 2,6-dikloro-4-nitroanilin 20 mg/ml törzsoldata acetonban oldva FOA (Fermentas): 5-fluoro-orotsav 100 mg/ml törzsoldata DMSO-ban oldva Alkalikus foszfát antitest-konjugátum (Anti-Digoxigenin-AP Fab fragments, Roche) CDP-Star kemilumineszcens szubsztrát (Roche): 25 mM törzsoldat NBT-BCIP törzsoldat (DIG DNA Labeling and Detection Kit, Roche): nitroblue tetrazolium-klorid és 5-bromo-4-kloro-3-indolilfoszfát toluidin só keveréke Ampicillin (Sigma): 50 mg/ml törzsoldat steril desztillált vízben oldva

Rifampicin (Fluka): 50 mg/ml törzsoldat DMSO-ban oldva

Gentamicin (Sigma): 50 mg/ml törzsoldat desztillált vízben oldva

Higromicin B (Roche): 50 mg/ml törzsoldat PBS-ben oldva

RNáz (Sigma): 10 mg/ml törzsoldat 10 mM Tris-HCl, 15 mM NaCl oldatban

5.4. A kísérletek során használt vektorok, primerek és DNS próbák

5.4.1. A kísérletek során használt vektorok

ATMT-hez:

Az ATMT-t különböző vektorokkal végeztük, melyekben az *E. coli*-ból származó higromicin B foszfotranszferáz gén (*hph*) különféle gomba eredetű promóter és terminális régiók irányítása alatt állt. A plazmidok minden esetben kanamicin rezisztencia gént tartalmaztak a vektort hordozó *A. tumefaciens* törzsek szelekciós markereként.

- A pBHt2 plazmid (a pCAMBIA származéka CAMBIA, Canberra, Ausztrália) esetén a *hph* gén *A. nidulans trpC* promóter által kontrollált, 3' végén a *Cauliflower mosaic virus* poliadenilált vége található (MULLINS és mtsi. 2001).
- A pPK2 plazmid (a pPZP201BK származéka HAJDUKIEWICZ és mtsi. 1994) esetén a *hph* gén *A. nidulans gpd* promóter és *A. nidulans trpC* terminális irányítása alatt áll (COVERT és mtsi. 2001).

A kísérleti munka során összeállított transzformáló plazmidok:

- A pNYI7 plazmid a *hph* gént tartalmazta a *M. circinelloides gpd1* promóter és terminális régiója közé építve pPZP201BK vektorba.
- A pNYI8 plazmid esetén a *hph* kazetta mellé egy zöld fluoreszcens fehérjét kódoló gént (*gfp*) is építettünk, amely szintén a *M. circinelloides gpd1* promóter és terminális régiójának irányítása alatt állt.

- A pNYI9 vektor esetén a *M. circinelloides* orotidin-5'-monofoszfát dekarboxilázt kódoló (*pyrG*) génkazettát építettük a pPZP201BK vektorba.
- A pNYI10 vektor esetén a *pyrG* kazetta mellé a *gfp* gént is beépítettük, amely a *M*.
 circinelloides gpd1 promóter és terminális régiójának irányítása alatt állt.
- A pNYI14 vektor a *R. pusillus ftr1* génkazettába inszertálva tartalmazta a *R. pusillus* orotidin-5'-monofoszfát dekarboxiláz génkazettát (*pyr4*). Ezt a pPZP201BK vektorba építettük.

A plazmidok kanamicin rezisztencia gént tartalmaztak a vektort hordozó *A. tumefaciens* törzsek szelekciós markereként. A pNYI7 és pNYI8 vektort hordozó *A. tumefaciens* törzsekkel vad típusú *M. circinelloides* és *B. lamprospora* törzseket, a pNYI9 és pNYI10 vektort hordozó *A. tumefaciens* törzsekkel *pyrG*⁻ mutáns *M. circinelloides*-t, míg a pNYI14 vektort hordozó *A. tumefaciens* törzsel *pyr4* mutáns *R. pusillus*-t transzformáltunk.

A kísérleti munka során összeállított további plazmidok:

A vektorépítési munkákban a pBluescript SK+ (Stratagene) és a pUC18 (Fermentas) vektorokat használtuk.

- A pNYI6 plazmid esetén a *hph* gént a *M. circinelloides gpd1* promóter és terminális régiója közé építettük pBluescript SK+ vektorba.
- A pNYI4 plazmid esetén a *gfp* gént *M. circinelloides gpd1* promóter és terminális régiója közé építettük pBluescript SK+ vektorba.
- A pNYI11 vektor esetén a *R. pusillus* orotidin-5'-monofoszfát dekarboxiláz génkazettát (*pyr4*) építettük a pBluescript SK+ vektorba.
- A pNYI12 vektorhoz a *R. pusillus pyr4* génkazetta 344 bázispárral rövidebb szakaszát építettük be a pBluescript SK+ vektorba.
- A pNYI13 vektor a *R. pusillus ftr1* génkazettába inszertálva tartalmazta a *R. pusillus pyr4* génkazettát pBluescript SK+ vektorba.

A plazmidok ampicillin rezisztencia gént hordoztak az *E. coli* törzsek szelekciós markereként. A pNYI12 vektorból kihasított mutáns *pyr4* génkazettával vad típusú *R. pusillus*-t, míg a pNYI13 vektorból kihasított *ftr1'-pyr4-ftr1'* fragmentummal *pyr4* mutáns *R. pusillus*-t transzformáltunk.

5.4.2. A kísérletek során használt primerek

Az aláhúzott primer szekvenciák minden esetben a primerek végére helyezett restrikciós hasító helyek szekvenciáit és a restrikciós enzim működéséhez szükséges nukleotidokat

jelentik: *Apa*I-gggccc, *Bam*HI-ggatcc, *Eco*RI-gaattc, *Not*I-gcggccgc, *Pst*I-ctgcag, *Xba*I-tctaga, *Xho*I-ctcgag.

A degenerált primerekben a r=a/g, y=c/t, m=a/c, k=g/t, s=c/g, w=a/t, d=a/g/t, h=a/c/t, n=a/c/g/t nukleotidokat jelölnek.

Az *E. coli*-ból származó *hph* gén amplifikálásához és szekvenálásához használt specifikus primerek:

hph7: 5' tt ttc ctc gag atg cct gaa ctc acc gcg a 3'
hygB3:5' cct gcg gcc gcc tat tcc ttt gcc ctc 3'
hph3: 5' gtg gat atg tcc tgc ggg ta 3'
hph4: 5' ccg ctc gaa gta gcg cgt ct 3'
hph5: 5' gag ctg cat cag gtc gga ga 3'
hph6: 5' ccg tct gga ccg atg gct gt 3'

A gfp gén amplifikálásához használt specifikus primerek:

GFP1/b:	5' <u>tt ttc ctc gag</u> atg gtg agc aag ggc ga 3'
GFP2/b:	5' tt ttc tct aga tta ctt gta cag ctc gt 3'

A *R. pusillus pyr4* génkazetta amplifikálásához és szekvenálásához használt specifikus primerek:

PYR1:	5' <u>tt ttc ctg cag</u> gca gta tga tgt aag ta 3'
PYR2:	5' gat gac gaa ttc act gtt cag cga 3'
PYR3:	5' ggt cgc tga aca gtg aat tcg tca 3'
PYR4:	5' <u>tt ttc ctc gag</u> gcg aat cat cat atc tca 3'
PYR5:	5' <u>ctc gaa ttc</u> cac gat aat gac atc gca 3'
PYR6:	5' cgg aac tga cgg atg cgt t 3'
PYR7:	5' cgt ctc aca ggt gca gcc t 3'

A *Rh. oryzae* és *C. albicans ftr1* génjének konzervált szakaszaira tervezett degenerált primerek:

FTR-A:	5' gg tet ag	<u>a</u> gar	gay	ath	tgg	gar g	gg .	3'	
	(aminosava	k: E	D	Ι	W	Е	G)		
FTR-B:	5' gg ctc ga	<u>g</u> cca	ncc	nar	dat	ngc	rtt	raa	3'
	(aminosava	k: W	G	L	Ι	А	Ν	F)	

A *R. pusillus* és a *R. miehei ftr1* gének meghosszabbításához illetve a promóter és a terminális régiók amplifikálásához használt specifikus primerek:

Inverz PCR-hoz:

FTR-E: 5' gcc ttg gcg agc ttg atc ttc cat 3'

SON PCR-hoz:

SON1:	5' gct tgc gcc tag atg agg 3'
SON2:	5' cca gat cgc cct tct ata ggc 3'
SON3:	5' gat ctg cac tcc tgc agt cg 3'

A R. pusillus ftr1 génkazetta amplifikálásához használt specifikus primerek:

FTR1:	5' ttt gga tcc gcg tct ctg ttt cct tgc 3'
FTR2:	5' tgg ctg cag cct tgg aca taa gac 3'
FTR3:	5' ttt ctc gag gtt acc aca gcc gtc tg 3'
FTR4:	5' <u>tct ggg ccc</u> aat tga cgg gtt cgt gat c 3'

A járomspórás gombafajok PCR alapú diagnosztikájához használt primerek:

- M1: 5' ggg yca aaa gat ygg wtt saa 3'
- M2: 5' gca ama gac ttc cac ckc gat 3'
- Rhm1: 5' gta tca cca tgc ttc ga 3'
- Rhm2: 5' tga tgg atc ctg act cct 3'
- Rhr1: 5' cta gca ctg aaa aga ctg gct 3'
- Rhr2: 5' ggc aga aat gtt taa ttc agg at 3'
- Rho2: 5' gcg gtw gag act ctg tar cya 3'
- Rho3: 5' gat cat gat cac tgc cat 3'
- Rsc1: 5' cct tca aag aca aac tcc aga ag 3'
- Rsc2: 5' cgt ttg tgt caa cat tca 3'
- Rhs1: 5' gtc caa ctt yaa gga aaa gat 3'
- Rhn1: 5' cgc aag agc gtt ctt ctt tca 3'
- Sr1: 5' gaa gac act tag cgc acg ca 3'
- Sr2: 5' cag cgc agg gca atc ata t 3'
- R1: 5' gga aac cga tgc ytt gca 3'
- R2: 5' crt cac crc ctt ctt cgg c 3'

5.4.3. A kísérletek során használt DNS próbák

A pCSN43 (STABEN és mtsi. 1989) plazmidból amplifikált homológ hph génpróba:

hph-p: 1020 bp fragmentum (a teljes hph gén)

NYhph1:	5' <u>cct tct aga</u> atg cct gaa ctc acc gcg 3'
NYhph2:	5' <u>cct gga tcc</u> cta ttc ctt tgc cct cgg 3'

A p15 plazmidból amplifikált homológ gfp génpróba:

gfp-p: 720 bp fragmentum (a teljes gfp gén)

GFP1/b:5' tt ttc ctc gag atg gtg agc aag ggc ga 3'GFP2/b:5' tt ttc tct aga tta ctt gta cag ctc gt 3'

R. pusillus genomi DNS-éből amplifikált homológ ftr génpróba:

ftr-p: 740 bp fragmentum (az ftr1 gén középső része)

FTR-A:	5' <u>gg tct aga</u> gar gay ath tgg gar gg 3'
FTR-B:	5' gg ctc gag cca ncc nar dat ngc rtt raa 3'

5.5. Vizsgálati módszerek

5.5.1. Genomi DNS tisztítása

A különböző járomspórás gombák genomi DNS-ének kivonásához a micéliumot folyékony nitrogénnel dörzsmozsárban elporítottuk. A feltárt micéliumhoz grammonként 2,5 ml lízis puffert adtunk és a homogén állapot eléréséig üvegbottal kevergettük. A lízis elősegítéséhez 15-20 percig 65°C-on inkubáltuk, majd szobahőmérsékletre történő hűtés után centrifugáltuk (8000 g, 10 perc, 4°C). A felülúszóhoz azonos térfogatú PCI-t adtunk, ezután 4°C-on több órán át enyhén rázattuk (45 rpm). Centrifugálás (8000 g, 15 perc, 4°C) után a vizes fázishoz kétszeres térfogatú etanolt adva a DNS-t 30 percig -70°C-on kicsaptuk, majd centrifugálással (8000 g, 20 perc, 4°C) kiülepítettük. A csapadékot vákuum alatt beszárítottuk, majd 200 µl desztillált vízbe visszaoldottuk. A vizes fázist esetenként CsCl grádiens centrifugálással (44000 rpm, 40 óra, 20°C 70.1 Ti rotor/ Beckman C8-70M) tovább tisztítottuk (ITURRIAGA és mtsi. 1992).

5.5.2. DNS gélelektroforézis

A nukleinsavak elválasztására agaróz gélelektroforézist alkalmaztunk. A mintákat 1/5 mennyiségű mintapuffer hozzáadása után 0,8 illetve 1%-os agaróz/TAE gélen elválasztottuk (80 V, 1-1,5 óra). A nukleinsavak detektálása etídium-bromidos festést követően (0,5 µg/ml) UV fényben történt. A fragmentumok méretének meghatározásához 1 kb-os illetve pUC mix molekulasúly markereket (Fermentas) használtunk.

5.5.3. PCR technikák

A kísérleti munka során többféle PCR módszert használtunk. Az amlifikálásokat T3 Thermocycler (Biometra) segítségével végeztük. Génklónozáskor (vektor építéshez) használt PCR amplifikálás körülményei:

1 ciklus	94°C, 3 perc	denaturálás
35 ciklus	94°C, 1 perc	denaturálás
	50-60°C, 1 perc	primer kötődés
	72°C, 1-3 perc	láncszintézis
1 ciklus	72°C, 10 perc	végső láncszintézis

A PCR reakcióelegyek összetétele (25 µl végtérfogatban):

0,4 mM dNTP mix (Fermentas)
1x *Pfu* puffer (Fermentas)
2,5 mM MgSO₄ (Fermentas)
0,4 μM - 0,4 μM specifikus primer
1,25 U *Pfu* DNS polimeráz (Fermentas)
20-50 ng genomi DNS

Az amplifikálás körülményei a transzformánsok spóráiból történő PCR során:

1 ciklus	94°C, 15 perc	denaturálás
1 ciklus	4°C, 2 perc	
30 ciklus	94°C, 1 perc	denaturálás
	54°C, 2 perc	primer kötődés
	70°C, 2 perc	láncszintézis
1 ciklus	70°C, 6 perc	végső láncszintézis

A PCR reakcióelegy összetétele (50 µl végtérfogatban):

0,4 mM dNTP mix (Fermentas) 1x *Dupla-Taq* puffer (ZenonBio) 2,5 mM MgCl₂ (ZenonBio) 0,4 μM - 0,4 μM specifikus primer 2 U *Dupla-Taq* DNS polimeráz (ZenonBio) 10 μl spóra szuszpenzió (10⁸ spóra/ml)

A reakció körülményei a különböző járomspórás gombák *ftr1* génjének degenerált primerekkel történő amlifikálásakor:

1 ciklus	94°C, 3 perc	denaturálás
5 ciklus	94°C, 1 perc	denaturálás
	51°C, 1 perc	primer kötődés
	lassú hőmérséklet emelke	dés (0,14°C/mp 2°C/mp helyett)
	72°C, 2 perc	láncszintézis
30 ciklus	94°C, 1 perc	denaturálás
	51°C, 1 perc	primer kötődés
	72°C, 2 perc	láncszintézis
1 ciklus	72°C, 10 perc	végső láncszintézis

A PCR reakcióelegyek összetétele (25 µl végtérfogatban):

0,4 mM dNTP mix (Fermentas)
1x *Pfu* puffer (Fermentas)
2,5 mM MgSO₄ (Fermentas)
2 μM - 2 μM degenerált primer
1,25 U *Pfu* DNS polimeráz (Fermentas)
20-50 ng genomi DNS

A hph-, gfp- és ftr-specifikus próbák készítésekor alkalmazott körülmények:

1 ciklus	95°C, 3 perc	denaturálás
35 ciklus	95°C, 1 perc	denaturálás
	50-60°C, 1 perc	primer kötődés
	72°C, 1,5 perc	láncszintézis
1 ciklus	72°C, 10 perc	végső láncszintézis

A PCR reakciót a PCR DIG Probe Synthesis kittel (Roche) állítottuk össze a leírások

szerint. A PCR reakcióelegy összetétele (50 µl végtérfogatban):

0,1 mM PCR DIG mix (DIG-11-dUTP-t tartalmaz)
0,1 mM dNTP mix (Fermentas)
1x *Expand High Fidelity* puffer (15 mM MgCl₂-dal kiegészítve)
1 μM - 1 μM specifikus primer
2,6 U *Expand High Fidelity* enzim
20-50 ng plazmid DNS

Az amplifikálás körülményei a *R. pusillus* és a *R. miehei ftr1* gének meghosszabbításakor alkalmazott inverz PCR során:

1 ciklus	94°C, 2 perc	denaturálás
5 ciklus	94°C, 30 mp	denaturálás
	50-60°C, 1 perc	primer kötődés
	68°C, 3 perc	láncszintézis
20 ciklus	94°C, 30 mp	denaturálás
	50-60°C, 1 perc	primer kötődés
	68°C, 3 perc+5mp ciklusonként	láncszintézis
1 ciklus	68°C, 7 perc	végső láncszintézis

Az inverz PCR elvégzése előtt a *R. pusillus* és a *R. miehei* genomi DNS-ét különböző restrikciós enzimekkel (*Xba*I, *Sac*I, *Eco*RV, *Apa*I, *Xho*I) feldaraboltuk, az emésztett DNS-t kloroformmal tisztítottuk, majd centrifugálás után (16000 g, 10 perc, 4°C) a vizes fázisban lévő DNS-t kétszeres mennyiségű etanollal kicsaptuk. 1 óra -70°C-on történő inkubáció után a mintákból a DNS-t centrifugálással (16000 g, 20 perc, 4°C) kiülepítettük. A csapadékot vákuum alatt beszárítottuk, ezután 10 µl desztillált vízben felszuszpendáltuk, majd önmagával ligáltuk 4°C-on 18 órán keresztül 20 µl végtérfogatban. A cirkularizált

DNS-t kloroformos tisztítást követően újra kicsaptuk etanollal, majd centrifugálás és szárítás után desztillált vízben felszuszpendáltuk. Az így kapott DNS mintát használtuk a továbbiakban templátként az inverz PCR során.

A PCR reakcióelegyek összetétele (25 µl végtérfogatban):

0,4 mM dNTP mix (Fermentas)
1x *Pfu* puffer (Fermentas)
2,5 mM MgSO₄ (Fermentas)
0,4 μM - 0,4 μM specifikus primer
0,5 μl *Pfu* DNS polimeráz (Fermentas)
20-50 ng cirkularizált templát DNS

Az amplifikálás körülményei a *R. pusillus* és a *R. miehei ftr1* gének meghosszabbításakor alkalmazott SON-PCR során:

1 ciklus	94°C, 3 perc	denaturálás
5 ciklus	94°C, 30 mp	denaturálás
	53°C, 1 perc	primer kötődés
	72°C, 2,5 perc	láncszintézis
1 ciklus	94°C, 30 mp	denaturálás
	29°C, 3 perc	primer kötődés
	72°C, 2,5 perc	láncszintézis
30 ciklus	94°C, 10 mp	denaturálás
	53°C, 1 perc	primer kötődés
	72°C, 2,5 perc	láncszintézis
1 ciklus	72°C, 7 perc	végső láncszintézis

A PCR reakcióelegyek összetétele (25 µl végtérfogatban):

0,4 mM dNTP mix (Fermentas)
1x *Dupla-Taq* puffer (ZenonBio)
2,0 mM MgCl₂ (ZenonBio)
2 μM - 2 μM specifikus primer
2 U *Dupla-Taq* DNS polimeráz (ZenonBio)
20-50 ng genomi DNS

5.5.4. DNS izolálás agaróz gélből

A PCR és a restrikciós emésztések során kapott DNS fragmentumokat tartalmazó gél részletet steril szikével UV lámpa alatt vágtuk ki a 0,8% agarózt tartalmazó gélből. A kivágott gélből a DNS-t a DNA Extraction Kit (Fermentas) vagy a Gel-MTM Gel Extraction System (Viogene) kit segítségével nyertük ki a gyártó utasításainak megfelelően.

5.5.5. DNS fragmentumok klónozása, plazmid konstrukciók létrehozása

A restrikciós emésztéseket a standard módszerek szerint végeztük (SAMBROOK és mtsi. 1989) mindig az adott körülményekhez optimalizálva. A DNS fragmentumokat általában pBluescript SK+ (Stratagene) vagy pUC18 (Fermentas) vektorokba ligáltuk. A ligálást T4 DNS ligázzal (Fermentas) 16 órán keresztül 18°C-on végeztük, majd 10 perces, 65°C-os hőkezeléssel állítottuk le a reakciót. Vektorépítéshez az InsT/AcloneTM PCR Product Cloning Kit (Fermentas) és a pGEM^R-T Easy Vector System I (Promega) kiteket is használtuk. A plazmid DNS tisztításához a Viogene Mini-MTM Plasmid DNA Extraction System (Viogene), illetve a Viogene Midi-V100TM Plasmid DNA Extraction System (Viogene), a PCR során kapott fragmentumok tisztításához pedig a PCR-MTM Clean Up System (Viogene) kiteket használtuk.

A. tumefaciens esetén a plazmid DNS tisztítását kiegészítettük néhány, az extracelluláris poliszacharidok eltávolítását elősegítő lépéssel. Az antibiotikum tartalmú LB tápoldatban nevelt sejteket centrifugálással (2160 g, 3 perc) ülepítettük, majd a tápoldat eltávolítása után a sejteket 1 ml TE pufferben szuszpendáltuk. A mintákhoz 100 μl 5 M NaCl oldatot, majd vortexelés után 10 μl 10% Na-lauril-szarkozint adtunk. Enyhe összerázás után a sejteket centrifugálással újra kiülepítettük, majd a Viogene Mini-MTM Plasmid DNA Extraction System (Viogene) kit oldataival végeztük el a plazmid tisztítást. A kiülepített sejteket a kitben található lízis pufferrel felszuszpendáltuk, majd a mintákhoz 20 μl lizozim (20 mg/ml) oldatot adtunk, ami elősegítette a baktérium sejtek feltárását. A mintákat 15 percig 37°C-on inkubáltuk, ezután a gyártó utasításai alapján folytattuk a plazmid DNS tisztítását.

5.5.6. Kompetens E. coli sejtek készítése

E. coli TOP10F⁻ törzsének 14 órás LB tápoldatban nevelt tenyészetéből 1 ml-t 100 ml LB tápoldatba átoltva a baktériumokat OD₆₀₀=0,6 érték eléréséig növesztettük (200 rpm, 37°C). A tenyészetet centrifugáltuk (2160 g, 10 perc, 4°C), majd a sejteket azonos mennyiségű 4°C-os, 100 mM-os CaCl₂ oldatban felszuszpendáltuk. Az előbbi műveletet megismételtük, majd a 100 mM-os, 4°C-os CaCl₂ oldatban felvett sejteket 1 órán át jégfürdőben inkubáltuk, ezt követően újra centrifugáltuk (2160 g, 10 perc, 4°C). A kiülepedett sejteket 1/20 térfogatú, 100 mM-os 20% glicerol tartalmú hideg CaCl₂ oldatban szuszpendáltuk fel és 200 µl mennyiségenként Eppendorf csövekbe osztottuk szét, ezeket - 70°C-on fagyasztva tároltuk.

5.5.7. E. coli sejtek transzformációja

A baktériumok transzformációját a SAMBROOK és mtsi. (1989) által ismertetett módon hajtottuk végre. 200 µl fagyasztva tárolt kompetens sejtet jégen felolvasztottunk, majd 5-10 µl ligátumot (plazmidot) és 100 µl TCM puffert adtunk hozzá. Összekeverés után 25 percig jégen inkubáltuk, ezt követően 3,5 perces 37°C-os hősokkot alkalmaztunk, majd a mintákat 10 percig szobahőmérsékleten állni hagytuk. A mintákból különböző mennyiségeket szélesztettünk 100 µg/ml ampicillint tartalmazó LB táptalajra 40 µl IPTG (20 mg/ml, Fermentas) és 40 µl X-gal (20 mg/ml, Fermentas) jelenlétében. A transzformáns sejteket 37°C-on 16-20 óráig tenyésztettük, az inszert DNS-t tartalmazó vektorokat hordozó baktériumokat szín alapján szelektáltuk (fehér telepek).

5.5.8. Kompetens A. tumefaciens sejtek készítése

A. tumefaciens GV2260 és GV3101 törzsének 24 órás LB tápoldatban nevelt tenyészetéből 3 ml-t 300 ml előmelegített LB tápoldatba átoltva a baktériumokat OD₆₀₀=0,5 érték eléréséig növesztettük (200 rpm, 28°C). A tenyészetet 15 percig jégen hűtöttük, majd centrifugáltuk (2160 g, 15 perc, 4°C). A sejteket 10 ml steril desztillált vízben felszuszpendáltuk, majd újra centrifugáltuk. A desztillált vízben történő mosás megismétlése után a sejteket 10%-os glicerinben is mostuk. Centrifugálás (2160 g, 15 perc, 4°C) után a sejteket 3 ml 10%-os glicerinben szuszpendáltuk fel, majd 200 μl mennyiségenként Eppendorf csövekbe osztottuk szét, ezeket -70°C-on fagyasztva tároltuk.

5.5.9. A. tumefaciens sejtek transzformációja

A létrehozott vektorokat *A. tumefaciens* GV2260 illetve GV3101 törzsébe elektroporáltuk. Az *A. tumefaciens* kompetens sejtekhez felolvasztás után 3 ng plazmidot adtunk, majd a baktérium-DNS keveréket előhűtött elektroporáló küvettába (1 mm résszélesség, Epicentre) pipettáztuk át. Az elektroporálást 2,5 kV, 25 μF és 400 Ohm beállítások mellett hajtottuk végre (Elektroporáló készülék: Electro Cell Manipulator BCM-600, BTX Electroporation System). A küvettában lévő mintához rögtön elektroporálás után 1 ml SOC tápoldatot adtunk, majd a tápoldatban elkevert sejteket félkémcsőbe átpipettázva 3 órán keresztül 28°C-on rázattuk. A transzformáns sejteket kanamicinnel kiegészített LB táptalajon szelektáltuk 2 napig 28°C-on történő inkubálás után.

5.5.10. DNS hibridizálás

Baktérium telepek blottolása

Az ampicillinnel kiegészített LB táptalajon nőtt baktérium telepeket tartalmazó Petri-csészéket 2 órára 4°C-ra tettük, majd a felszínükre steril hibridizációs membránt (Hybond-N+, Fluka) helyeztünk (5 perc). Ezt követően a membránt 5 percig 10%-os SDS oldattal átitatott Whatman papírra helyeztük. Ezt követte a denaturáló oldattal (1 perc), majd a neutralizáló oldattal (5 perc) történő Whatman szűrőpapíros kezelés. Végül 5 percre 20x SSC-vel átitatott szűrőpapírra helyeztük a membránt, amelyre levegőn történő szárítás után UV fény segítségével rögzítettük a DNS-t.

DNS blottolás

Az agaróz gélelektroforézist követően a gélt 0,25 M HCl oldatban 10 percig mostuk, majd desztillált vizes öblítést követően denaturáló oldatba helyeztük. 30 perces denaturáló kezelést követően a gélt 30 percre neutralizáló oldatba tettük. Az így előkezelt gélt 16 órán keresztül 20x SSC oldat segítségével blottoltuk a hibridizációs membránra (Hybond-N+, Fluka), majd a DNS-t UV fény (2 perc) segítségével rögzítettük.

Hibridizációs körülmények

A hibridizációs membránt két órán át 68°C-on hibridizációs pufferrel előhibridizáltuk, majd 16 órán át 68°C-on a hibridizációs pufferhez adott jelölt DNS próbával hibridizáltuk (20 ng/ml). A próba jelöléséhez minden esetben digoxigenines jelölést (PCR DIG Probe Synthesis Kit, Roche) alkalmaztunk a gyártó utasításainak megfelelően. A hibridizációs kísérleteket megelőzően a DNS próbát 10 perc 100°C-on, majd 10 perc 4°C-on történő inkubálással denaturáltuk.

A hibridizációs membránt szobahőmérsékleten kétszer 5 percig 2x SSC, 0,1% SDS oldattal, majd 68°C-on kétszer 15 percig 0,1x SSC, 0,1% SDS oldattal mostuk a nem kötődött, jelölt DNS eltávolítása érdekében. Ezt követően a membránt az 1. detektáló pufferrel 1 percig, a 2. detektáló pufferrel 30 percig, majd a 2. detektáló pufferhez adott 1-4 μl alkalikus foszfát antitest-konjugátummal (Roche) újabb 30 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten. Kétszer tizenöt perces 1. detektáló pufferrel történő mosást követően a detektáláshoz a 3. detektáló pufferhez adott 200 μl NBT-BCIP előhívó reagenst (DIG DNA Labeling and Detection Kit, Roche) használtuk. A hibridizációs membránt a színreakció megjelenéséig sötétben inkubáltuk, majd a felesleges előhívó reagenst desztillált vizes mosással eltávolítottuk. A detektálást esetenkét a "CDP-Star"

kemilumineszcens szubsztrát segítségével (Roche) végeztük. A kemilumineszcens szubsztráttal inkubált hibridizációs membránra sötétszobában röntgenfilmet (Kodak) helyeztünk (20 perc-2 óra). A röntgenfilm előhívása gyárilag elkészített előhívó (2 perc) és fixáló oldattal (Kodak) (2 perc) történt.

5.5.11. DNS szekvenciák meghatározása és analízise

A vizsgálatainkban elemzett, klónozott DNS fragmentumok szekvenálása az MTA Szegedi Biológiai Központjában történt, ABI 373 típusú automata szekvenátorral (Applied Biosystem). A DNS szekvenciák ellenőrzése a Chromas program (1.5 verzió, Technelysium) segítségével történt. Az NCBI BLAST 2 programjának segítségével végeztük a nukleotid szekvenciák analízisét, összehasonlítását és a nukleotid szekvenciákból származtatott aminosav szekvenciák megállapítását. A svájci "Expasy" szerver (http://www.expasy.ch) szintén segítségünkre volt a szekvenciák elemzése során. Az azonosított *ftr1* szekvenciákat az EMBL nukleotid szekvencia adatbázisba küldtük el. A nukleotid és aminosav szekvenciák illesztését a CLUSTAL W programmal végeztük (THOMPSON és mtsi. 1994), majd a PHYLIP programcsomag segítségével (FELSENSTEIN 1993) mindkét adatsor alapján filogenetikai analízist végeztünk. Ehhez a nukleotid szekvenciák esetén a parszimónia módszert (FITCH 1971), míg az aminosav szekvenciák esetén a "neighbour-joining" módszert (SAITOU és NEI 1987) használtuk. A genetikai távolságokat a Jones-Taylor-Thornton mátrix (JONES és mtsi. 1992) szerint számoltuk.

5.5.12. Drogrezisztencián alapuló szelekciós körülmények optimalizálása

M. circinelloides f. *lusitanicus* M20 törzs higromicin B által okozott növekedésgátlásának teszteléséhez 10^4 sporangiospórát szélesztettünk különböző koncentrációjú (0, 50, 100, 150 és 200 µg/ml) higromicin B-t tartalmazó YEG (pH 6,5) táptalajra. A kompakt növekedést előidéző koncentráció megállapítása érdekében állandó higromicin B koncentráció (100 µg/ml) mellett változó koncentrációban adtuk a táptalajhoz a bengálvörös és a diklorán keverékét. A bengálvörös koncentrációját 25, 50, 75 és 100 µg/ml, míg a diklorán koncentrációját 1, 2 és 3 µg/ml között változtattuk.

5.5.13. Gomba protoplasztok képzése

M. circinelloides (MS12), *B. lamprospora* (B1) és *R. pusillus* (R18) törzsek MEA táptalajon nevelt 1 hetes tenyészetéről steril desztillált vízzel lemostuk a

sporangiospórákat, majd a spóra szuszpenziókat YEG táptalaj felszínére helyezett celofánkorongokra vittük fel oltó korong segítségével. A tenyészeteket 16-20 órán keresztül inkubáltuk a különböző törzsek növekedéséhez optimális hőmérsékleten. A celofánon nevelt fiatal telepeket protoplasztáló oldatba helyeztük, majd 3 órán át 28°C-on protoplasztáltuk. A sejtfal oldására a protoplasztáló oldathoz saját készítésű, csigagyomorból kivont lítikus enzimet adtunk. A protoplasztokat steril gézen szűrtük, mostuk SMC pufferrel, majd centrifugáltuk (minden protoplaszt centrifugáláshoz: 2160 g, 15 perc, 4°C). Ismételt SMC pufferrel történő mosás után a protoplasztokat újra centrifugáltuk, majd 0,25-1 ml SMC pufferbe vettük fel. Az így előállított protoplasztokat mind a PEG-mediált transzformálás, mind az ATMT során felhasználtuk.

A megfelelő spóraképzés érdekében az általunk előállított *R. pusillus* uracil auxotróf törzset 0,5 mg/ml uracillal kiegészített YNB táptalajon tenyésztettük 37°C-on 5-7 napig. A spórák lemosása után a spóra szuszpenziót uracillal kiegészített YNB táptalaj felszínére helyezett celofánkorongokra oltottuk, majd a telepeket 40 órán keresztül növesztettük 37°C-on. A protoplasztok előállítása az előzőekben leírtak szerint történt.

5.5.14. Gomba protoplasztok PEG-mediált integratív transzformációja

Az általunk alkalmazott módszer VAN HEESWIJK és RONCERO (1984) által leírt PEG-mediált transzformáció módosítása. A micéliumtól megtisztított, SMC pufferrel átmosott protoplasztokat 250 µl SMC pufferbe vettük fel. Ehhez hozzáadtuk a restrikciós emésztéssel linearizált transzformáló DNS-t (kb. 5 µg). A transzformáció elősegítése érdekében 20 µl PMC-t adtunk a protoplaszt-DNS keverékhez, amit, ezt követően 30 percig jégen inkubáltunk. Ezután további 2,5 ml PMC puffert adtunk a protoplasztokhoz, majd azt szobahőmérsékleten 25 percig inkubáltuk. A protoplasztokat 20 ml SMC pufferrel hígítottuk, majd centrifugáltuk. A kiülepedett sejteket 0,8 M szorbitolt tartalmazó YPG tápoldatban regeneráltattuk 25°C-on 30 percig, majd mostuk SMC pufferrel. A kiülepített sejteket 1 ml SMC pufferbe vettük fel és 0,8 M szorbitollal kiegészített YNB fedő agarral összekeverve 0,8 M szorbitolt tartalmazó YNB alaptáptalajokra öntöttük. Az alkalmazott vektortól függően a táptalajokat esetenként kiegészítettük 0,5 mg/ml uracillal vagy leucinnal. A csészéket 4-5 napig inkubáltuk a transzformáns telepek megjelenéséig.

5.5.15. A. tumefaciens közvetített transzformáció

A transzformációs kísérletek alapja a BUNDOCK és HOOYKAAS (1996) által leírt, majd DE GROOT és mtsi. (1998) által módosított protokoll volt. 16 órán keresztül 28°C-on szelektív körülmények között növesztett A. tumefaciens tenyészetből 1 ml-t 20 ml 200 µM acetosziringonnal (AS) kiegészített IM tápoldatba oltottunk és 28°C-on rázatva neveltük az OD₆₆₀=0,6 érték eléréséig. A logaritmikus fázisban lévő A. tumefaciens tenyészetet $(10^{5} - 10^{6})$ összekevertük egyenlő mennyiségű gombaspóra szuszpenzióval sporangiospóra/ml) és a keveréket 200 µM AS tartalmú indukciós táptalajra helyezett celofán korongokra szélesztettük. A logaritmikus fázisban lévő A. tumefaciens tenyészetet 1:5 arányban gomba protoplasztokkal is összekevertük (a protoplaszt képzést a korábban leírt módon végeztük), majd a keveréket 200 µM AS tartalmú és AS-mentes indukciós táptalajra helyezett celofán korongokra öntöttük. 1, 2 és 3 napos 28°C-on történő együtttenyésztés után a celofán korongokat szelekciós táptalajra helyeztük át. Esetenként az együtt-tenyésztést folyékony IM tápoldatban végeztük, ilyenkor 25°C-on 16 órán keresztül inkubáltuk a baktérium sejteket és a protoplasztokat folyamatos rázatás mellett, majd centrifugálás után (2160 g, 15 perc, 4°C) a keveréket szelekciós táptalajra öntöttük. Ez a vad típusú M. circinelloides és B. lamprospora törzsek esetén 100 µg/ml higromicin B-t tartalmazó YEG táptalaj, az uracil mutáns R. pusillus és M. circinelloides törzseknél YNB illetve leucinnal kiegészített YNB táptalaj volt. A szelekciós táptalaj 200 µM cefotaximot is tartalmazott a baktérium elpusztítása érdekében. A csészéket 25°C-on (R. pusillus esetén 37°C-on) inkubáltuk 4-5 napig, a transzformáns telepek megjelenéséig.

5.5.16. Mutánsdúsítás

A pNYI12 plazmiddal transzformált *R. pusillus* protoplasztokat 1 hétig 37°C-on inkubáltuk, ez alatt a táptalajon megjelenő telepek sporangiospórákat képeztek. A mutánsok dúsítása érdekében a desztillált vízzel lemosott sporangiospórákat YNB tápoldatban 12 órán keresztül rázattuk. A tenyészetet steril gézen átszűrtük, hogy megszabaduljunk a csírázásnak indult hifáktól, majd az átszűrt tápoldatot további 12 órán át rázattuk. Ismételt szűréssel eltávolítottuk a növekedésnek induló hifákat, a sporangiospórákat tartalmazó tápoldatot centrifugáltuk (2160 g, 15 perc, 4°C), majd 0,5 mg/ml uracillal kiegészített YNB táptalajra szélesztettük. A táptalajon megjelenő telepekről a sporangiospórákat desztillált vízzel lemostuk, majd azokat 0,5 mg/ml uracillal kiegészített YNB táptalajra szélesztettük. A csészéket 37°C-on inkubáltuk a transzformáns telepek megjelenéséig.

5.5.17. Monosporangiális telepek előállítása

A szelektív táptalajokon nőtt transzformáns telepek heterokariotikusak voltak a cönocitikus micélium miatt. A szelektív táptalajon nőtt telepek spóráit desztillált vízzel lemostuk, majd a spóraszuszpenzióból több lépcsőben tízszeres hígítási sort készítettünk és ezekből szélesztettünk ki szelektív táptalajra. Az egy spórából kinövő transzformáns telepeket többször továbboltottuk szelektív táptalajra annak érdekében, hogy csak transzformáns magokat hordozó telepeket kapjunk.

A transzformánsok mitótikus stabilitásának vizsgálata érdekében néhány transzformáns telepet higromicin B-mentes YEG táptalajon növesztettünk 25°C-on 7 napig. Az egy spórából kinövő telepeken képződött sporangiospórák lemosása után azokat újra higromicin B-mentes YEG táptalajra szélesztettük. 4-5 egymást követő átoltás után a transzformánsokat újra szelektív táptalajra (higromicin B-vel kiegészített YEG) oltottuk.

5.5.18. Fluoreszcens mikroszkópia

A gombasejtekbe transzformált *gfp* gén kifejeződését Zeiss Jenalumar fluoreszcens mikroszkóp segítségével vizsgáltuk. A vizsgálathoz a pNYI8 transzformáns *B. lamprospora* izolátumok sporangiospóráit YEG táptalajra helyezett celofán korongokra vittük fel oltó korong segítségével és 20 órán keresztül szobahőmérsékleten inkubáltuk. A fiatal telepeket tartalmazó celofán darabot steril szikével kivágtuk, róla a micéliumot tárgylemezre helyezett desztillált vízbe mostuk. A mintákat látható és UV fényben is megvizsgáltuk, utóbbi vizsgálatokat a következő beállítások mellett végeztük: 2X KP 490 és B 427 g excitációs szűrők, G-247 barrier szűrő és 510 nm dikroikus szűrő.

6. Eredmények és értékelésük

6.1. Nagy-affinitású vaspermeázt kódoló gének azonosítása és összehasonlítása különböző járomspórás gombákban (NYILASI és mtsi. 2005b).

Nagy-affinitású vaspermeázt kódoló géneket eddig néhány más patogén gombafajból, illetve a kórokozó jellegtől függetlenül, számos más organizmusból klónoztak és jellemeztek. Ezen adatállomány megfelelő feldolgozásával lehetséges volt olyan konzervált régiók meghatározása, amelyek lehetővé tették egy PCR alapú klónozási stratégia megvalósítását (COMPTON 1990). Ennek keretében Rh. oryzae és C. albicans nagy-affinitású vaspermeáz (ftr1) gének (EMBL/NCBI azonosító: AY344587 és AF195775) konzervált szakaszainak összehasonlítása alapján egy degenerált primer párt terveztünk, melynek segítségével 5 különböző járomspórás gomba nemzetséget (Rhizopus, Mucor, Backusella, Rhizomucor és Syncephalastrum) reprezentáló 26 izolátum genomi DNS-éből felszaporítottuk az ftr1 gén középső 585-740 bp hosszúságú szakaszát. A Pfu DNS polimerázzal amplifikált tompa végű fragmentumokat izolálás után EcoRV restrikciós enzimmel linearizált pBluescript SK+ vektorba klónoztuk. A klónozott fragmentumok szekvenciájának meghatározása a pBluescript SK+ vektoron található T3 és T7 primerek segítségével történt. Az amplifikált fragmentumok szekvenciája nagyfokú homológiát mutatott nemzetközi adatbázisokban (NCBI, EMBL) megtalálható gomba ftr1 génekkel. R. miehei, R. pusillus és Syncephalastrum racemosum esetében a fragmentumok 2 intront is tartalmaztak ugyanabban a pozícióban. Az általunk meghatározott 26 nukleotid szekvenciát és az azokból származtatott aminosav szekvenciákat a FU és mtsi. (2004) által közölt Rh. oryzae 99-880 törzs megfelelő régiójával (EMBL/NCBI azonosító: AY3445879) együtt CLUSTAL W program segítségével hasonlítottuk össze (1. és 2. melléklet). Az általunk azonosított részleges ftr1 szekvenciákat az EMBL nukleotid szekvencia adatbázisba küldtük el (5. táblázat).

Munkánk során sziderofór transzport fehérjéket kódoló géneket is próbáltunk azonosítani a különböző járomspórás gombák genomjában. Az *ftr1* génhez hasonlóan degenerált primereket terveztünk a *C. albicans Caarn1* és a *S. cerevisiae arn1-4* gének konzervált régiói alapján. Többféle primert és amplifikációs körülményt teszteltünk, mégsem sikerült *arn* géneket azonosítanunk egyik izolátumban sem. Elképzelhetőnek tartjuk, hogy a járomspórás gombák nem rendelkeznek a sziderofór-vas komplexek felvételét biztosító specifikus transzport rendszerekkel.

EMBL azonosító	Törzs	Szekvencia tartalom	Hossz
AM286198	Rhizopus oryzae CBS 146.90 (Rh61)	ftr1 gén részleges szekvenciája	549 bp
AM286199	Rhizopus oryzae CBS 395.54 (Rh60)	ftr1 gén részleges szekvenciája	549 bp
AM286200	Rhizopus oryzae CBS 109.939 (Rh59)	ftr1 gén részleges szekvenciája	549 bp
AM286201	Rhizopus oryzae NRRL 2908 (Rh28)	ftr1 gén részleges szekvenciája	549 bp
AM286202	Rhizopus oryzae RA 99-880 (Rh50)	ftr1 gén részleges szekvenciája	549 bp
AM286204	Rhizopus stolonifer var. stolonifer CBS 347.49 (Rh42)	ftr1 gén részleges szekvenciája	549 bp
AM286205	Rhizopus niveus CBS 403.51 (Rh40)	ftr1 gén részleges szekvenciája	549 bp
AM286206	Rhizopus stolonifer var. reflexus CBS 320.35 (Rh45)	ftr1 gén részleges szekvenciája	549 bp
AM286207	Mucor circinelloides f. lusitanicus CBS 277.49 (M20)	ftr1 gén részleges szekvenciája	546 bp
AM286208	Mucor racemosus f. racemosus NRRL 3640 (M52)	ftr1 gén részleges szekvenciája	546 bp
AM286209	Mucor plumbeus ATCC 42423 (M4)	ftr1 gén részleges szekvenciája	546 bp
AM286210	Mucor circinelloides FRR 2109 (M16)	ftr1 gén részleges szekvenciája	546 bp
AM286211	Mucor rouxii (Amylomyces rouxii) ATCC 24905 (M15)	ftr1 gén részleges szekvenciája	546 bp
AM286212	Backusella lamprospora NRRL 1422 (B1)	ftr1 gén részleges szekvenciája	546 bp
AM286213	Syncephalastrum racemosum SZMC 2011 (S1)	<i>ftr1</i> gén részleges szekvenciája (3 exon, 2 intron)	668 bp
AM286214	Rhizopus oryzae CBS 112.07 (Rh48)	ftr1 gén részleges szekvenciája	549 bp
AM286216	Rhizopus schipperae CBS 138.95 (Rh58)	ftr1 gén részleges szekvenciája	561 bp
AM286217	Rhizopus schipperae UHF 3053 (Rh64)	ftr1 gén részleges szekvenciája	561 bp
AM286218	Rhizopus microsporus var. rhizopodiformis CBS 220.92 (Rh62)	ftr1 gén részleges szekvenciája	561 bp
AM286219	Rhizopus microsporus var. rhizopodiformis CBS 102.277 (Rh63)	ftr1 gén részleges szekvenciája	561 bp
AM286220	Rhizopus microsporus var. oligosporus NRRL 514 (Rh27)	ftr1 gén részleges szekvenciája	564 bp
AM286221	Rhizopus oryzae SZMC 0497 (Rh24)	ftr1 gén részleges szekvenciája	549 bp
AM286222	Rhizopus oryzae TJM 24B2 (Rh18)	ftr1 gén részleges szekvenciája	549 bp
AM286223	Rhizopus oryzae CBS 260.28 (Rh49)	ftr1 gén részleges szekvenciája	549 bp
AM286224	Rhizomucor pusillus WRLCN(M) 231 (R18)	<i>ftr1</i> gén részleges szekvenciája (3 exon, 2 intron)	698 bp
AM286225	Rhizomucor miehei CBS 360.92 (R15)	<i>ftr1</i> gén részleges szekvenciája (3 exon, 2 intron)	688 bp

5. táblázat: Az EMBL adatbázisba leadott részleges *ftr1* szekvenciák. http://www.ebi.ac.uk/embl/index.html

A járomspórás gombákban azonosított nagy-affinitású vaspermeáz gének összehasonlításakor azt tapasztaltuk, hogy az *ftr1* gén egyaránt tartalmaz konzervált és variábilis régiókat, ezért alkalmas lehet filogenetikai analízisre, illetve a különböző járomspórás gombák faj és faj alatti szinten történő elkülönítésére. Járomspórás gombák rokonsági viszonyai nem teljesen tisztázottak, azonban ezek pontos ismerete fontos a diagnosztikai módszerek kidolgozása és alkalmazása során. Ezért célul tűztük ki a vizsgálatba bevont járomspórás gombafajok filogenetikai kapcsolatainak vizsgálatát az általunk azonosított *ftr1* gén alapján.

A nukleotid és aminosav szekvenciák illesztése után filogenetikai analízist végeztünk, ebbe szintén bevontuk a *Rh. oryzae* 99-880 klinikai izolátumának *ftr1* génszekvenciáját (EMBL/NCBI azonosító: AY344587), külcsoportként pedig a *M. plumbeus ftr1* génjének megfelelő régióit használtuk. Az 5. ábrán az FTR1 részleges fehérje szekvenciák alapján szerkesztett filogenetikai törzsfa látható. Az *ftr1* nukleotid szekvenciák alapján szerkesztett filogenetikai törzsfát nem ábrázoltuk, mivel a két törzsfa hasonló topológiát mutatott.



5. ábra. Az FTR1 részleges fehérje szekvenciák alapján szerkesztett törzsfa. A törzsfa "*neighbour-joining*" módszerrel készült, a "*bootstrap*" analízis értékek %-ban vannak fetüntetve (1000 replikából).

Az általunk készített törzsfák aránylag jó egyezést mutattak a 18S és 28S riboszómális DNS (rDNS) szekvenciák alapján készített törzsfákkal (VOIGT és mtsi. 1999), noha ez utóbbi nem tartalmazott minden általunk vizsgált fajt. A törzsfán három kládot alkotnak a *Rhizopus, Rhizomucor* és *Mucor* izolátumok, valamint az összes csoporttól elkülönülve található a *Rh. microsporus* var. *oligosporus*. A *R. miehei* és a *R. pusillus* törzsek a *S. racemosus* izolátummal alkotnak egy csoportot, akár a 28S rDNS alapján készített fa esetében (VOIGT és mtsi. 1999). A *Mucor* izolátumok egységes csoportot alkotnak, amelybe a *B. lamprospora* is beletartozik. Ez alátámasztja a *Backusella* és *Mucor* nemzetségek közeli rokonságára és monofiletikus eredetére vonatkozó korábbi – morfológiai és filogenetikai munkák alapján megfogalmazott – feltevéseket (O'DONNELL és mtsi. 2001).

A nagy monofiletikus *Rhizopus* kládon belül elkülöníthetők a *Rh. oryzae*, a *Rh. stolonifer*, a *Rh. niveus*, a *Rh. microsporus* var. *rhizopodiformis* és a *Rh. schipperae* csoportjai. A *Rhizopus* nemzetség utolsó átfogó taxonómiai revíziója során SCHIPPER (1984) morfológiai alapon 3 fajcsoportot különböztetett meg, mindössze öt fajba vonva össze az addig áttekinthetetlenül nagyszámú fajleírás alapján létrehozott fajokat. Ezek a *Rh. stolonifer*-csoport (*Rh. sexualis, Rh. stolonifer*), a *Rh. oryzae*-csoport és a *Rh. microsporus*-csoport (*Rh. homothallicus, Rh. microsporus*). A függetlenül leírt fajokat (pl. *Rh. reflexus, Rh. circinans, Rh. niveus*) a taxonómiai revízió után egy faj különböző változataiként tartják számon (pl. *Rh. stolonifer* var. *stolonifer* és *Rh. stolonifer* var. *reflexus*).

A törzsfán a *Rh. oryzae*, a *Rh. stolonifer* és a *Rh. niveus* a többi törzstől elkülönülő csoportot alkot. A CBS 403.51 törzset eredetileg *Rh. niveus* néven írták le, később azonban karakterisztikus morfológiai különbségek hiányában a *Rh. stolonifer* var. *stolonifer* fajba sorolták (SCHIPPER 1984). RAPD markereken alapuló csoportanalízis fajszintű távolságot jelzett valamennyi vizsgált *Rhizopus* izolátumtól (VÁGVÖLGYI és mtsi. 2004), és eredményeink alapján is indokoltnak látjuk a jelenlegi taxonómiai besorolás felülvizsgálatát és a törzs különálló fajként való kezelését. A *Rh. stolonifer* var. *stolonifer* és a *Rh. stolonifer* var. *stolonifer* ís a korábbi vizsgálatok eredményeivel (VÁGVÖLGYI és mtsi. 2004). Az *ftr1* gén viszonylagos filogenetikai konzerváltsága ellenére, az analízisbe bevont 10 *Rh. oryzae* törzs esetén kisebb szekvencia eltéréseket észleltünk. Ennek a heterogenitásnak a magyarázata az lehet, hogy a *Rh. oryzae* egy taxonómiai gyűjtőfaj, amely körülbelül 30 eredetileg különálló

Rhizopus faj egybeolvasztásából keletkezett (SCHIPPER 1984). Eredményeink alapján a *Rh. oryzae*-be összevont fajok pontos taxonómiai státusza nem tekinthető megoldottnak.

A *Rh. microsporus* var. *rhizopodiformis* és a *Rh. schipperae* izolátumok testvér csoportot alkotva jól elkülönülnek a *Rh. oryzae* törzsektől, de közelebb helyezkednek el a többi *Rhizopus* izolátumhoz, mint a *Rh. microsporus* var. *oligosporus*-hoz. A *Rh. schipperae* egy nemrég leírt, termofil *Rhizopus* faj, melynek ez ideig mindössze – a jelen vizsgálatba is bevont – két izolátuma ismert, mindkettőt zigomikózisos betegből izolálták. A *Rh. schipperae* morfológiai sajátosságai és hőmérséklet igénye alapján a *Rhizopus*-ok közül a *Rh. microsporus*-hoz áll legközelebb. Eredményeink igazolják a *Rh. schipperae* és a *Rh. microsporus* var. *rhizopodiformis* közeli rokonságát (a nukleotidok 86 %-a megegyezett), egyben megerősítik, hogy a *Rh. schipperae* izolátumok külön fajt alkotnak.

Érdekes, hogy a *Rh. microsporus* var. *oligosporus* izolátum a többi *Rhizopus*-tól távol, a *Mucor* törzsek által alkotott csoporthoz közel helyezkedik el. A *Rh. microsporus* var. *oligosporus ftr1* szekvenciája aránylag alacsony homológiát mutatott a *Rh. microsporus* var. *rhizopodiformis* izolátumok *ftr1* szekvenciáival, csupán a nukleotidok 70 %-a egyezett meg. Habár korábbi tanulmányokban (VOIGT és mtsi. 1999, VOIGT és WÖSTEMEYER 2001) a *Rh. oryzae* szintén közelebb helyezkedett el a *Rh. stolonifer*-hez, mint a *Rh. microsporus*-hoz, azonban a *Rh. microsporus* var. *oligosporus* izolátum ilyen mérvű elkülönülése a többi *Rhizopus* törzstől nem volt megfigyelhető. Ennek egyik magyarázata lehet, hogy a vizsgált *Rh. microsporus* var. *oligosporus* izolátum a többi *Rh. microsporus* izolátumtól eltérően nem klinikai forrásból származik, ezt a törzset fermentált keleti ételek starter kultúrájából izolálták.

Következtetéseink megerősítik, hogy a járomspórás gombák jelenlegi, morfológiai karakterek alapján létrehozott rendszere mesterségesnek tekinthető és szükségesnek tartjuk az egész gomba csoport taxonómiai rendszerének felülvizsgálatát.

Filogenetikai és molekuláris taxonómiai munkák során leggyakrabban a riboszómális RNS gének (rDNS) összehasonlítását alkalmazzák. Míg a 18S és 28S rDNS szekvenciák a fonalas gombák fajszintű vagy magasabb taxonjainak elkülönítésére használhatók, addig az ITS szekvenciák alapján a gombák faj és nemzetség szintű azonosítása, illetve közeli rokon fajok elkülönítése lehetséges. Járomspórás gombák filogenetikai és evolúciós kapcsolatainak részletes vizsgálatát szintén a 18S és 28S rDNS szekvenciák alapján végezték (VOIGT és mtsi. 1999, O'DONNELL és mtsi. 2001, WHITE és mtsi. 2006).

A gombák összehasonlítására és elkülönítésére azonban a rDNS és ITS régiókon kívül egyes fehérje-kódoló gének, illetve génszakaszok is alkalmasak. Számos járomspórás gombafajból meghatározták az aktin, a transzlációs elongációs faktor-1 α alegységét (TEF) és a DNS függő RNS polimeráz II legnagyobb alegységét kódoló gének szekvenciáit, amelyeket filogenetikai analízisekben használtak fel (VOIGT és WÖSTEMEYER 2001, O'DONNELL és mtsi. 2001, TANABE és mtsi. 2004). Az általunk készített, a nagy-affinitású vaspermeázt kódoló *ftr1* gén alapján szerkesztett filogenetikai törzsfák hasonló topológiát mutattak a 18S és 28S rDNS szekvenciák alapján készített törzsfákkal (VOIGT és mtsi. 1999), ami azt igazolja, hogy az *ftr1* gén alkalmas a járomspórás gombák rokonsági viszonyainak tisztázására.

6.2. Zigomikózisokat előidéző gombák diagnosztizálása az *ftr1* szekvenciák alapján (NYILASI és mtsi. 2005c, NYILASI és mtsi. 2008b)

A diagnosztika, éppúgy, mint az epidemiológiai tanulmányok gyors és megbízható módszereken alapuló fajmeghatározást igényelnek. *In vitro* és *in vivo* kísérletek (SuN és mtsi. 2002a, SuN és mtsi. 2002b) során bebizonyosodott, hogy a különböző járomspórás gombafajok és törzsek gombaellenes szerekkel szembeni érzékenysége nagymértékben eltérhet, így a megfelelő antifungális terápia alkalmazásához szükséges a kórokozó gomba pontos azonosítása. A járomspórás gombák fajszintű azonosítását biztosító módszerek kifejlesztése lehetővé tenné a zigomikózisok epidemiológiájának jobb megértését is. Emellett a *Rh. oryzae, a Rh. niveus, a R. miehei* és a különböző *Mucor* fajokat a fermentációs és biotechnológiai iparban is gyakran alkalmazzák, ezért új faj-meghatározási és tipizálási módszerek kidolgozása biotechnológiai területen is fontos lenne.

Munkánk során kidolgoztunk egy eljárást, amelynek segítségével a legfontosabb járomspórás gombák megbízhatóan azonosíthatók. A nagy-affinitású vaspermeázt kódoló *ftr1* génszekvenciák összehasonlításakor olyan karakterisztikus szekvencia részleteket azonosítottunk, amely régiókra tervezett primerekkel fajspecifikus amplifikációs termékek nyerhetők (1. melléklet). A különböző járomspórás gombafajok PCR alapú diagnosztikájához használt specifikus primerek szekvenciáját, az amplifikált termékek méretét, és a specifikus reakciót biztosító primerek bekötési hőmérsékleteit a 6. táblázatban tüntettük fel. *Rh. stolonifer* és *Rh. niveus* esetén a degenerált FTR-B primert használtuk a fajspecifikus amplifikálások során alkalmazott primer pár egyik tagjaként. Néhány általunk tervezett primer (pl. M1, M2, Rho2, Rhs1, R1 és R2) néhány pozícióban szintén degenerált

volt, annak érdekében, hogy a primerekkel az adott törzs összes izolátumának felszaporítása lehetővé váljon.

PCR primer párok (5'-3')	Meghatározható járomspórás gombafajok	PCR termék mérete (bp)	Bekötési hőm. (°C)
M1: gggycaaaagatyggwttsaa M2: gcaamagacttccacckcgat	Backusella lamprospora Mucor plumbeus Mucor rouxii Mucor circinelloides Mucor racemosus	215	63
Rhml: GTATCACCATGCTTCGA Rhm2: TGATGGATCCTGACTCCT	Rhizopus microsporus var. oligosporus	438	65
Rhr1: CTAGCACTGAAAAGACTGGCT Rhr2: GGCAGAAATGTTTAATTCAGGAT	Rhizopus microsporus var. rhizopodiformis	431	68
Rsc1: CCTTCAAAGACAAACTCCAGAAG Rsc2: CGTTTGTGTCAACATTCA	Rhizopus schipperae	417	60
Rho3: GATCATGATCACTGCCAT Rho2: GCGGTWGAGACTCTGTARCYA	Rhizopus oryzae	465	68
Rhs1: GTCCAACTTYAAGGAAAAGAT FTR-B: GGCTCGAGCCANCCNARDATNGCRTTRAA	Rhizopus stolonifer	434	49
Rhn1: CGCAAGAGCGTTCTTCTTTCA FTR-B: GGCTCGAGCCANCCNARDATNGCRTTRAA	Rhizopus niveus	444	60
Sr1: GAAGACACTTAGCGCACGCA Sr2: CAGCGCAGGGCAATCATAT	Syncephalastrum racemosum	273	64
R1: ggaaaccgatgcyttgca R2: crtcaccrccttcttcggc	Rhizomucor miehei Rhizomucor pusillus	432/441	68

6. táblázat. Az *ftr1* gén fajspecifikus amplifikálásához használt primerek, a primerek bekötési hőmérséklete és az általuk felszaporított fragmentek mérete. R= A,G; Y=C,T; M=A,C; K=G,T; S=C,G; W=A,T; D=A,G,T; N=A,C,G,T

Az általunk kidolgozott módszer alkalmas volt a *Rh. oryzae*, a *Rh. microsporus* var. *rhizopodiformis*, a *Rh. microsporus* var. *oligosporus*, a *Rh. schipperae*, a *Rh. niveus* és a *Rh. stolonifer* törzsek faj szintű elkülönítésére. A *Rh. microsporus* és a *Rh. oryzae* törzsek *ftr1* génjeiben található szignifikáns eltérések lehetővé tették a két közeli rokonságban álló faj elkülönítését is. Az Sr1–Sr2 és a R1–R2 primer párok segítségével a *Rhizomucor* és a *Syncephalastrum* izolátumok nemzetség szintjén azonosíthatók. A *Rhizomucor* és a *Syncephalastrum* fajok a degenerált primerek segítségével is elkülöníthetők, mivel náluk az intronok jelenléte nagyobb amplifikációs terméket eredményez. A *R. miehei* és a *R. pusillus* fajszintű megkülönböztetésére alkalmas szekvencia motívumokat nem találtunk az *ftr1* génben. Hasonlóképp, az M1-M2 primer pár az egész *Mucor-Backusella* csoport többi fajtól való elkülönítését tette lehetővé, faj szintű azonosításra nem volt alkalmas. A 6. ábra A-E részén néhány specifikus PCR amlifikációs mintázata látható. Az adott fajra tervezett primerek csak az adott faj izolátumai esetén eredményeztek amplifikációs terméket, a többi járomspórás gombafaj esetén nem működtek.



6. A: Rh. schipperae-specifikus amplifikálás, 6. B: Rh. microsporus var. rhizopodiformis-specifikus amplifikálás.



6. C: Rh. oryzae-specifikus amplifikálás, 6. D: Rh. microsporus var. oligosporus-specifikus amplifikálás.



6. E: Rh. niveus-specifikus amplifikálás.

6. ábra: Fajspecifikus amplifikálások. A minták sorrendje az A-E ábrán ugyanaz: 1: pUC mix marker, 2: Rh58 (*Rh. schipperae*), 3: Rh64 (*Rh. schipperae*), 4: Rh62 (*Rh. microsporus* var. *rhizopodiformis*), 5: Rh63 (*Rh. microsporus* var. *rhizopodiformis*), 6: Rh27 (*Rh. microsporus* var. *oligosporus*), 7: Rh40 (*Rh. niveus*), 8: Rh61 (*Rh. oryzae*).

Más gombákkal kialakuló keresztreakciók kizárása érdekében a kísérletekbe egy *S. cerevisiae* (CBS 1171), egy *C. albicans* (ATCC 10231) és egy *A. fumigatus* (SZMC 1389) izolátumot is bevontunk. A járomspórás gombák *ftr1* génjére tervezett specifikus primerek semmilyen terméket nem eredményeztek ezen törzsekből. Az eredmények a módszer specifitását igazolták, azaz az általunk tervezett specifikus primerekkel a különböző járomspórás gombák nemcsak egymástól, hanem más opportunista fertőzést okozó gombafajoktól is megkülönböztethetők.

A fajok elkülönítése PCR-RFLP módszerrel is lehetséges volt. Az FTR-A és FTR-B degenerált primer párral felszaporított fragmentumok *Alu*I restrikciós enzimmel történő emésztése a különböző fajok esetében karakterisztikus RFLP-mintázatot eredményezett (7. ábra). A PCR-RFLP során kapott emésztési mintázatokat és az emésztési fragmentumok méretét a 7. táblázatban tüntettük fel.



7. ábra: Az *ftr1* fragmentek *Alu*I restrikciós enzimmel történő emésztése után kapott PCR-RFLP mintázatok.

A) 1: pUC mix marker, 2: Rh62, 3: Rh63, 4: Rh58, 5: Rh64, 6: B1, 7: M15, 8: M16, 9: M4, 10: M20, 11: M52. **B)** 1: Rh27, 2: Rh60, 3: Rh50, 4: Rh61, 5: Rh24, 6: Rh28, 7: Rh48, 8: Rh49, 9: Rh18, 10: Rh59, 11: Rh40, 12: Rh42, 13: Rh45, 14: R15, 15: R18, 16: S1, 17: pUCmix marker.

Az összes *Rhizopus* faj esetében különböző mintázatot észleltünk, míg az azonos fajhoz tartozó izolátumok mintázatai általában megegyeztek. Lényeges megemlíteni, hogy a *Rh. oryzae* izolátumok az FTR1 fehérje szekvenciák alapján szerkesztett törzsfához hasonlóan, itt is további 3 alcsoportra különültek el, amely megerősíti az előzőekben említett heterogenitást. A humán mikózisból izolált Rh61 törzs és az adatbázisban megtalálható RA 99-880 klinikai törzs azonos RFLP mintázatot mutatott. Az A mintázat tehát két klinikai törzsre volt jellemző, míg a B és C mintázat klinikai és nem-klinikai forrásból származó *Rh. oryzae* izolátumok esetén is előfordult. Habár az *fir1* gén filogenetikailag távoli organizmusok esetén is nagymértékben konzervált, a vizsgált *Rh. oryzae* izolátumok *fir1* szekvenciáiban néhány pozícióban kisebb eltéréseket tapasztaltunk. Ez eredményezte a PCR-RFLP során kapott mintázatok különbözőségét is. Újfent hangsúlyoznánk azt a tényt, hogy a *Rh. oryzae* gyűjtőnév alatt körülbelül 30, eredetileg külön fajként leírt *Rhizopus* törzset vontak egybe a nemzetség taxonómiai revíziója során (SCHIPPER 1984). SCHWARZ és mtsi. (2006) szintén 3 csoportot különböztettek meg a *Rh. oryzae* fajok ITS szekvenciáinak analízise során.

A *Rh. schipperae* és a *Rh. microsporus* var. *rhizopodiformis* közeli rokonsága ellenére, a PCR-RFLP során kapott különböző mintázatok szintén a *Rh. schipperae* külön fajként történő kezelésének indokoltságát igazolják. PCR-RFLP segítségével az *ftr1* génen alapuló specifikus PCR-ral nem megkülönböztethető *Mucor* fajok is három csoportra oszthatók, a *R. miehei* és *R. pusillus* fajok pedig faj szinten is elkülöníthetők egymástól. A

specifikus PCR-ral *Rh. stolonifer*-ként azonosított izolátumok PCR-RFLP segítségével faj alatti szinten is megkülönböztethetők.

Faj	Kód	Mintázat	En	nésztési	fragn	entek	x mér	ete	
	Rh60 R.del ^a	A	246, 223	119					
Rh. oryzae	Rh24 Rh28 Rh48 Rh49 Rh50 Rh61	В	469	119					
	Rh18 Rh59	С	469	66, 53					
Rh. microsporus var. oligosporus	Rh27	D	182	135	124	102	39	21	
Rh. schipperae	Rh58 Rh64	F	217	134	128	121			
Rh. microsporus var. rhizopodiformis	Rh62 Rh63	Е	438	162					
Rh. niveus	Rh40	G	365	162	61				
Rh. stolonifer var. stolonifer	Rh42	Н	535	53					
Rh. stolonifer var. reflexus	Rh45	Ι	312, 223	53					
R. miehei	R15	J	186	121	118	108	88	50	45
R. pusillus	R18	K	316	121	108	106	89		
S. racemosum	S1	L	429	170	108				
B. lamprospora M. rouxii M. circinelloides	B1 M15 M16	М	391, 44	86	64				
M. plumbeus	M4	N	279, 156	86	64				
M. circinelloides f. lusitaniae M. racemosus f. racemosus	M20 M52	0	394	103	88				

7. táblázat: A PCR-RFLP során kapott emésztési mintázatok és az emésztési fragmentek mérete. ^aFU és mtsi. (2004) által közölt *Rh. oryzae* 99-880 törzs *ftr1* gén (EMBL/NCBI azonosító: AY3445879)

Mind a specifikus primerek használatán alapuló PCR, mind a PCR-RFLP módszer alkalmas tehát diagnosztikai célokra, mivel általuk gyors és pontos fajmeghatározás végezhető, illetve az egymáshoz közeli rokonságban lévő fajok a módszerek segítségével könnyen elkülöníthetők. A nagy-affinitású vaspermeázt kódoló *ftr1* szekvenciákon alapuló gyors, egyszerű és rutinszerűen alkalmazható módszerek segítséget nyújthatnak a zigomikózisokat leggyakrabban előidéző gombák nemzetség, faj vagy akár törzs szintű diagnosztizálásában.

A DNS alapú diagnosztikai módszerek a klinikailag fontos gombák gyors és pontos azonosítását teszik lehetővé, ezek többsége a riboszómális RNS génszekvenciákon (rDNS) alapul. Bár a járomspórás gombák molekuláris diagnosztikája még kezdeti stádiumban van, történt néhány ígéretes próbálkozás a DNS-alapú fajazonosítására. VOIGHT és mtsi. (1999) egy adatbázist hoztak létre az összes klinikailag fontos járomspórás gombafaj 18S és 28S rDNS szekvenciáiból, és 13 taxon-specifikus primer pár létrehozásával kidolgoztak egy eljárást, amellyel *Mucor*, *Rhizopus*, *Rhizomucor*, *Absidia*, *Cokeromyces*, *Cunninghamella*, *Basidiobolus* és *Conidiobolus* fajok azonosíthatók. KOBAYASHI és mtsi. (2004) sikeresen alkalmaztak egy szélesspektrumú gomba PCR analízist a tüdőt fertőző *Cunninghamella bertholletiae* kimutatására. WU és mtsi. (2003) szintén a 18S rDNS-en alapuló, nemzetség-és fajspecifikus hibridizációs próbákat hoztak létre a különböző gombák – többek között a *Mucor* és *Rhizopus* fajok – detektálására.

Nagyfokú variabilitásának köszönhetően a riboszómális DNS ITS régiói szintén alkalmasak fajazonosításra, illetve a rokon fajok elkülönítésére. NAGAO és mtsi. (2005) egy multiplex PCR analízis során az ITS régiókra tervezett specifikus primerek alkalmazásával öt humán fertőzést okozó *Rhizopus* faj (*Rh. oryzae, Rh. schipperae, Rh. stolonifer* és *Rh. microsporus - Rh. azygosporus*) elkülönítését oldották meg. 16 fajt reprezentáló 54 járomspórás gomba törzs ITS régiójának összehasonlítása alapján SCHWARZ és mtsi. (2006) az ITS szekvencia meghatározást megbízható módszernek találták a gombák faj és nemzetség szintű azonosítására. Kidolgoztak egy ITS és 5,8S rDNS szekvenciákon alapuló módszert, amely alkalmas volt járomspórás gombák azonosítására mesterségesen fertőzött szövetekből is.

A legtöbb ismert DNS-en alapuló fajmeghatározó módszer esetében azonban nem sikerült megoldani a közeli fajok, mint a *Rh. microsporus* és a *Rh. oryzae* vagy a *R. pusillus* és a *R. miehei* elkülönítését (VOIGT és mtsi. 1999). Habár az ITS-RFLP hatékony eszköznek bizonyult a *R. miehei* és *R. pusillus* fajok megkülönböztetésére (VÁGVÖLGYI és mtsi. 1999), az kevésbé használható a fajon belüli polimorfizmus detektálására. Az általunk kidolgozott módszerek megoldást jelenthetnek a közeli fajok elkülönítésének problémájára is: a *Rh. microsporus* és a *Rh. oryzae* törzsek *ftr1* génjeiben található szignifikáns eltérések lehetővé tették a két közeli rokonságban álló faj elkülönítését fajspecifikus primerek segítségével, a szintén közeli rokonságban álló *R. miehei* és *R. pusillus* fajok pedig PCR-RFLP módszer segítségével különíthetők el egymástól. A *Rh. stolonifer* izolátumok *ftr1* szekvenciában meglévő eltérések pedig lehetővé tették fajon belüli is megkülönböztethetők, a *Rh. oryzae* izolátumok *ftr1* szekvenciában meglévő eltérések pedig lehetővé tették fajon belüli

6.3. A *R. miehei* és a *R. pusillus* nagy-affinitású vaspermeáz génjének izolálása és jellemzése (NYILASI és mtsi. 2005d).

Munkánk során egyik célunk a *R. miehei* (CBS 360.92) és a *R. pusillus* (WRLCN(M)231) izolátumok teljes *ftr1* génjének azonosítása és izolálása volt. Ehhez különféle PCR alapú technikákat használtunk. *Rh. oryzae* és *C. albicans* nagy-affinitású vaspermeáz (*ftr1*) génjének (EMBL/NCBI azonosítók: AY344587 és AF195775) konzervált szakaszaihoz tervezett degenerált primerek alkalmazásával PCR-ral felszaporítottuk a *R. miehei* és a *R. pusillus* genomi DNS-éből az *ftr1* gén középső 716, illetve 740 bp hosszúságú szakaszát. Az így meghatározott *ftr1* génszakaszok szekvenciájának ismeretében fordított irányú specifikus primereket terveztünk, majd inverz PCR és SON-PCR módszerekkel felszaporítottuk a két *ftr1* gén további részeit, illetve a promóter és terminális régiókat. A *Pfu* DNS polimerázzal felszaporított tompa végű fragmentumokat izolálás után *Eco*RV restrikciós enzimmel linearizált pBluescript SK+ vektorba, a *Taq* DNS polimerázzal amplifikált fragmentumokat pedig izolálás után pTZ57R/T vektorba (Fermentas) klónoztuk, majd meghatároztuk szekvenciájukat.

Az inverz PCR módszer sematikus ábrázolása a 8. ábrán látható, amely alkalmas a genomi DNS ismert régióival szomszédos upstream és downstream elhelyezkedő, ismeretlen szakaszok felszaporítására (TRIGLIA és mtsi. 1988, OCHMAN és mtsi. 1988). Az eljárás lényege, hogy a genomi DNS-t feldaraboljuk egy olyan restrikciós enzimmel, ami nem hasít az ismert szekvenciájú szakaszban, majd az emésztett fragmentumokat önmagukkal ligáljuk. Az így keletkezett cirkuláris DNS darabok egy része tartalmazza a keresett DNS szakaszt, melyen az ismert szekvencia alapján tervezett, a gén két vége felé irányuló primer pár tagjai a cirkularizáció után már egymás felé néznek, így a primerek közé eső szakasz PCR reakcióval felszaporítható. Munkánk során számos restrikciós enzimet teszteltünk, de csak a *Sac*I, az *Eco*RI és a *Hae*III enzimekkel történő restrikciós emésztés után sikerült amplifikációs termékeket kapnunk az inverz PCR reakciók során.

R. miehei-nél egy 2 kb méretű fragmentumot kaptunk a *Sac*I enzimmel emésztett genomi DNS FTR-E és FTR-F primerekkel történő amplifikálásakor. A szekvencia analízis megerősítette, hogy a felszaporított és klónozott DNS szakasz a *R. miehei ftr1* gén egy részével egyezik meg. A nukleotid szekvencia ismeretében további primereket terveztünk a teljes klónozott fragmentum szekvenálásához, majd az FTR-G és FTR-H primerek segítségével meghatároztuk a *R. miehei ftr1* génjének teljes szekvenciáját, a terminális régióit illetve a promóter régió egy kisebb szakaszát. A promóter régió nagyobb

szakaszának izolálásához további primereket terveztünk (FTR-J és FTR-K), de nem kaptunk specifikus fragmentumot az inverz PCR során.



8. ábra: Az inverz PCR technika elve.

Magyarázat: p1, p2: konzervált régiókra tervezett degenerált primerek, ezek segítségével egy kisebb szakasz szekvenciája megismerhető. p3, p4: a degenerált primerekkel ellentétes irányú primerek. A genomi DNS hasítása és a restrikciós fragmentumok cirkularizációja után a p3 és p4, immár egymás felé mutató, primerek közé eső szakasz felszaporítható és klónozás után szekvenálható.

Mivel inverz PCR segítségével a *R. miehei ftr1* gén promóterének csak egy kisebb szakaszát sikerült meghatároznunk, ezért a single oligonucleotide nested (SON) PCR technikát használtuk a *R. miehei* promóter régiójának izolálására. A SON-PCR technika (ANTAL és mtsi. 2004) a thermal asymmetric interlaced (TAIL) PCR-ból (LIU és WHITTIER 1995) fejlődött ki. Ez a módszer szintén az ismert szekvenciájú genomi DNS-t határoló régiók felszaporítását célozza, azonban csak az ismert DNS szakasz egyik oldalával szomszédos régiót amplifikálja egy fordított irányú specifikus primer segítségével. A SON-PCR alkalmazásakor csak egy specifikus primert használnak, ami bizonyos reakció körülmények között képes a specifikusan kötődő primerrel szemben is kötődni aspecifikus módon. A TAIL-PCR-nál alkalmazott szuperciklusok helyett a végig szigorú körülmények között végzett amplifikálás során egyszeri 29°C-os ciklussal és egy lassú hőmérsékletemelkedéssel (ramping) biztosítják a specifikus primer aspecifikus módon történő kötődését a genomi DNS részlegesen komplementer szakaszaihoz. A kísérletek elején az inverz PCR során használt FTR-E, FTR-G és FTR-J primereket használtuk a SON-PCR-hoz is, de nem kaptunk specifikus fragmentumot. Ezután új primereket (SON1, SON2, SON3) terveztünk az ANTAL és mtsi. (2004) által javasolt szempontok szerint, amelyek segítségével sikerült egy 300 bp méretű fragmentumot felszaporítanunk. A felszaporított és klónozott fragmentum szekvencia analízise igazolta, hogy az a *R. miehei ftr1* génjének promóterével egyezik meg.

R. pusillus-nál 2 kb méretű fragmentumot kaptunk az EcoRI enzim által emésztett genomi DNS FTR-E és FTR-F primerekkel történő amplifikálásakor. A szekvencia analízis során kiderült, hogy a felszaporított és klónozott DNS szakasz az R. pusillus ftr1 génjének végét és terminális régióját tartalmazza. A gén nukleotid szekvenciájának ismeretében további primereket terveztünk a klónozott fragmentum teljes szekvenciájának megismeréséhez. Emellett újabb restrikciós enzimekkel feldaraboltuk a R. pusillus genomi DNS-ét, majd a HaeIII enzim által emésztett genomi DNS-t FTR-E és FTR-L primerekkel amplifikáltuk. A felszaporított és klónozott 1200 bp méretű fragmentum a R. pusillus ftr1 gén elejét és promóter régióját, illetve a terminális régió egy részét tartalmazta. A több lépcsőben meghatározott, teljes gént lefedő szekvencia adatokat számítógép szoftver segítségével rendeztük össze, majd a gén teljes szekvenciájának ismeretében új primereket terveztünk az ftr1 gén 5' promóter (FTR1) illetve a 3' terminális (FTR4) régiójára a teljes génkazetta felszaporításának érdekében. A primerek BamHI és ApaI hasító helyeket tartalmaztak, a PCR-ral felszaporított 2253 bp hosszúságú fragmentum, illetve a pBluescript SK+ vektor BamHI és ApaI restrikciós enzimekkel történő emésztése után a teljes *ftr1* génkazettát a linearizált pBluescript SK+ vektorba klónoztuk.

A kísérletek eredményeként tehát, meghatároztuk a *R. miehei* (CBS 360.92) és a *R. pusillus* (WRLCN(M)231) nagy-affinitású vaspermeázt kódoló *ftr1* génjeinek, illetve promóter és terminális régiójának teljes szekvenciáját.

agaa		atag	gcaaa	aagga	attag	gegag	gtgaa	agcto	gttgt	tgtt	gtaa	ataaa	igaag	gatct	tggaa	aaaaa	atcat	72
and a second	acaca	agga	cgaat	ttcto	cggat	ttg	cggaa	aato	g gat	a aga	accga	atate	gtac	gttga	atcga	aacca	agtaa	144
ctga	atgac	cgag	JLLLA	atcgg	gaato	cctga	aget	ggtg	ggaad	caaco	atco	caaag	Jacag	jaaga	aagca	agete	gactt	210
LCag	Jaaya	aya	raati	loogu	Jalya	agero	- gold			ad u			talla	14444		aggai	Jyyaa	200
agag	yyaac atoto	rata	ttatt	rance	acagi	gac	rtata	attar	rcaa	acci	ata	atttt	t+++	rtata	rtato	rtat	ttca	432
cta	attt	aqa	caat	tttt	ttcti	tca	ccaca	atca	rata	atac	agat	caaaa	caat	cago	adcaa	aact	ttta	504
taca	aaaa	ggtca	atct	gata	atcad	qcaqa	aagco	cccc	gcaco	acaco	gcgt	tttt	ccc	atga	ataca	agata	atatt	576
CCC	ccca	aaaa	aagca	ata <mark>t</mark> t	tette	ttc	ctcto	tcto	ttt	cctt	gtt	tccto	atct	aggo	cgcaa	agcaa	acc	646
м	s	Q	D	L	F	D	v	Р	I	F	F	I	I	F	R	Е	т	18
ATG	TCG	CAG	GAC	CTA	TTT	GAC	GTC	CCG	ATC	TTC	TTT	ATT	ATT	TTC	CGC	GAG	ACT	700
т	Е	Α	Α	I	I	v	S	v	L	L	S	F	L	R	K	I	F	36
ACG	GAA	GCA	GCC	ATT	ATC	GTT	TCC	GTC	TTG	CTG	TCC	TTC	\mathbf{TTG}	CGC	AAA	ATC	TTT	754
D	т	т	т	Р	v	Y	K	R	L	R	N	Q	v	W	I	G	S	54
GAT	ACA	ACA	ACA	CCC	GTC	TAC	AAG	CGA	CTA	CGC	AAT	CAA	GTC	TGG	ATA	GGA	AGT	808
A	L	G	Ц	F	1	C	Г	C	L	G	A	A	F	L	A	V	W	72
GCT	CTA	GGG	TTA	TTTT	ATT	TGT	CTC	TGC	A'I''I'	GGT	GCT	GCT	TTC	ATT	GCT	GTC	TGG	862
TAC		CTT		אי	Слт	ATC	TCC	GGC	אי	TCC	CAA	CAT	⊥ אידית	TCC	CAA	CCT	CTC	90
TAC	S	T.	T	A	V	T	M	T	T	v	M	G	T.	100 A	M	T.	R	108
TTC	TCT	TTG	ATT	GCT	GTT	ATT	ATG	ATT	ACT	GTA	ATG	GGT	CTT	GCT	ATG	CTC	CGC	970
т	Е	R	м	0	Е	ĸ	W	ĸ	I	ĸ	L	A	к	A	м	Е	т	126
ACC	GAA	CGT	ATG	CAA	GAA	AAA	TGG	AAG	ATC	AAG	CTC	GCC	AAG	GCC	ATG	GAA	ACC	1024
D	Α	L	Q	R	Е	R	к	т	W	к	v	R	м	Q	R	Y	S	144
GAT	GCT	TTG	CAG	CGC	GAA	CGA	AAA	ACC	TGG	AAG	GTT	CGA	ATG	CAA	CGT	TAC	TCC	1078
F	F	v	L	Р	F	v	т	v	L	R	Е	G	L	Е	Α	v	v	162
TTC	TTC	GTC	TTG	CCT	TTC	GTT	ACT	GTG	CTC	CGT	GAA	GGT	CTT	GAA	GCT	GTC	GTT	1132
F	I	G	G															166
TTC	ATC	GGT	GGT	gta	aagta	agtt	gaaat	igata	acgto	ttta	aatt	ttaco	ctt	cctca	aacto	cagga	aatct	1199
		S		N	V	Q	A	K	S	I	P		A		I	M	G	1053
	- 116 -				JIC (300 I	AAG . T		чте (т	v					AIG (M	JGC	201
TTC	ATC	тст	GGA	тст	CTTC	GTC	CCT	TTC	ATC	<u>א</u> מידיד	TAT.	CGT	CCT	CCT	TCC	ATC		1307
TIC	AIC	TOT	JUA	TOT		UTC.	OOI	TIC	AIC	TT T	TUT	COI	OO I	OOT.	TCC	AIU	CII	
к	т.	R	F	F	F	т	F	s	т	v	т	т.	v	т.	v	Δ	Δ	219
K AAG	L CTT	R CGC	F TTC	F TTC	F TTT	I ATT	F TTC	S TCT	T ACT	V GTC	I ATC	L CTG	Y TAC	L CTC	V GTT	A GCA	A GCC	219 1361
K AAG G	L CTT L	R CGC M	F TTC S	F TTC K	F TTT A	I ATT V	F TTC G	S TCT Y	T ACT F	V GTC E	I ATC Q	L CTG Y	Y TAC A	L CTC W	V GTT N	A GCA Q	A GCC V	219 1361 237
K AAG G GGT	L CTT L CTC	R CGC M ATG	F TTC S TCT	F TTC K AAG	F TTT A GCT	I ATT V GTC	F TTC G GGA	S TCT Y TAC	T ACT F TTT	V GTC E GAA	I ATC Q CAA	L CTG Y TAC	Y TAC A GCT	L CTC W TGG	V GTT N AAC	A GCA Q CAA	A GCC V GTT	219 1361 237 1415
K AAG GGT I	L CTT L CTC G	R CGC M ATG G	F TTC S TCT E	F TTC K AAG A	F TTT A GCT A	I ATT V GTC E	F TTC G GGA E	S TCT Y TAC G	T ACT F TTT G	V GTC E GAA D	I ATC Q CAA V	L CTG Y TAC I	Y TAC A GCT T	L CTC W TGG Y	V GTT N AAC K	A GCA Q CAA V	A GCC V GTT T	219 1361 237 1415 255
K AAG GGT I ATT	L CTT L CTC G GGT	R CGC M ATG G GGT	F TTC S TCT E GAA	F TTC K AAG A GCT	F TTT A GCT A GCC	I ATT V GTC E GAA	F TTC G GGA E GAA	S TCT Y TAC G GGT	T ACT F TTT G GGT	V GTC E GAA D GAT	I ATC Q CAA V GTT	L CTG Y TAC I ATC	Y TAC A GCT T ACA	L CTC W TGG Y TAC	V GTT N AAC K AAG	A GCA Q CAA V GTC	A GCC V GTT T ACC	219 1361 237 1415 255 1469
K AAG GGT I ATT T	L CTT L CTC G GGT A	R CGC M ATG G GGT V	F TTC S TCT E GAA W	F TTC K AAG A GCT H	F TTT A GCT A GCC V	I ATT V GTC E GAA S	F TTC GGA E GAA W	S TCT Y TAC G G G G T G G T	T ACT F TTT G GGT D	V GTC E GAA D GAT P	I ATC Q CAA V GTT E	L CTG Y TAC I ATC L	Y TAC A GCT T ACA N	L CTC W TGG Y TAC V	V GTT N AAC K AAG D	A GCA Q CAA V GTC T	A GCC V GTT T ACC N	219 1361 237 1415 255 1469 273
K AAG GGT I ATT T ACA	L CTT L CTC G GGT A GCT	R CGC M ATG GGT GGT V GTC	F TTC S TCT E GAA W TGG	F TTC K AAG A GCT H CAC	F TTT A GCT A GCC V GTC	I ATT V GTC E GAA S TCC	F TTC GGA E GAA W TGG	S TCT Y TAC GGT GGT GGT	T ACT F TTT GGT GGT D GAT	V GTC E GAA D GAT P CCA	I ATC Q CAA V GTT E GAA	L CTG Y TAC I ATC L TTG	Y TAC A GCT T ACA N AAC	L CTC W TGG Y TAC V GTT	V GTT N AAC K AAG D GAC	A GCA Q CAA V GTC T ACC	A GCC V GTT T ACC N AAC	219 1361 237 1415 255 1469 273 1523
K AAG GGT I ATT T ACA G	L CTT L CTC G G G G G C T G C T G	R CGC M ATG GGT V GTC W	F TTC S TCT E GAA W TGG	F TTC K AAG A GCT H CAC	F TTT A GCT A GCC V GTC	I ATT V GTC E GAA S TCC	F TTC GGA E GAA W TGG	S TCT Y TAC GGT GGT GGT	T ACT F TTT G GGT D GAT	V GTC E GAA D GAT P CCA	I ATC Q CAA V GTT E GAA	L CTG Y TAC I ATC L TTG	Y TAC A GCT T ACA N AAC	L CTC W TGG Y TAC V GTT	V GTT N AAC K AAG D GAC	A GCA Q CAA V GTC T ACC	A GCC V GTT T ACC N AAC	219 1361 237 1415 255 1469 273 1523 275
K AAG GGT I ATT T ACA GGT	L CTT L CTC G GGT GCT G GGT	R CGC M ATG GGT GGT GTC W TG	F TTC S TCT E GAA W TGG	F TTC K AAG GCT H CAC	F TTT A GCT A GCC V GTC	I ATT V GTC E GAA S TCC	F TTC G GGA E GAA W TGG TGG	S TCT Y TAC GGT GGT GGT	T ACT F TTT G GGT D GAT	V GTC E GAA D GAT P CCA	I ATC Q CAA V GTT E GAA	L CTG Y TAC I ATC L TTG	Y TAC A GCT T ACA N AAC	L CTC W TGG Y TAC V GTT	V GTT N AAC K AAG D GAC	A GCA Q CAA V GTC T ACC	A GCC V GTT T ACC N AAC	219 1361 237 1415 255 1469 273 1523 275 1592
K AAG GGT I ATT T ACA GGT	L CTT L CTC G GGT G GCT G GGT Q C A A	R CGC M ATG GGT V GTC W TG I	F TTC S TCT E GAA W TGG TGG	F TTC K AAG A GCT H CAC gtact	F TTT A GCT A GCC V GTC	I ATT V GTC E GAA S TCC S S TCC	F TTC GGA E GAA W TGG TGG	S TCT Y TAC GGT GGT GGT Stcgc G	T ACT F TTT G GGT D GAT	V GTC E GAA D GAT P CCA agctt	I ATC Q CAA V GTT E GAA	L CTG Y TAC I ATC L TTG CCTLS T	Y TAC A GCT T ACA N AAC gcgct	L CTC W TGG Y TAC V GTT taca T	V GTT N AAC K AAG GAC GAC	A GCA Q CAA V GTC T ACC	A GCC V GTT T ACC N AAC X AAC	1361 237 1415 255 1469 273 1523 275 1592 293 1646
K AAG GGT I ATT ACA GGT ACA GGT	L CTT G GGT GGT G GGT G GGT Q CAA	R CGC M ATG GGT V GTC W TG I ATC	F TTC S TCT E GAA W TGG Staas F TTT	F TTC K AAG A GCT H CAC Stact N AAC	F TTT A GCT A GCC V GTC tactt A GCA	I ATT V GTC E GAA S TCC S S C C S S TCC	F TTC GGA E GAA W TGG gatto L TTG	S TCT Y TAC GGT GGT GGT GGT T	T ACT F TTT G GGT D GAT C GCCC W TGG T	V GTC E GAA D GAT P CCA agctt N AAC	I ATC Q CAA V GTT E GAA GAA	L CTG Y TAC I ATC L TTG cctts T ACA	Y TAC A GCT T ACA N AAC JCGCT A GCA	L CTC W TGG Y TAC GTT C C C C C C C C C C C C C C C C C	V GTT N AAC K AAG D GAC aatgt I ATC	A GCA Q CAA V GTC T ACC GGA	A GCC V GTT T ACC N AAC T AAC	219 1361 237 1415 255 1469 273 1523 275 1592 293 1646 311
K AAG GGT I ATT T ACA GGT <u>ag</u> G I ATT	L CTT G GGT GGT GGT GGT Q CAA V GTC	R CGC M ATG GGT V GTC W TG GTC I ATC S	F TTC S TCT E GAA W TGG TGG F TTT Y	F TTC K AAG A GCT H CAC CAC Stact N AAC C TGT	F TTT A GCT A GCC V GTC tactt A GCA GCA	I ATT V GTC E GAA S TCC S GTC S TCC I ATT Y	F TTC G GGA E GAA W TGG Satto L TTG W TGG	S TCT Y TAC G GGT G GGT G GGT I ATT	T ACT F TTT G GGT D GAT C GAT	V GTC E GAA D GAT P CCA QCTA N AAC V GTC	I ATC Q CAA V GTT E GAA GAA S GCT	L CTG Y TAC I ATC L TTG CCTTS ACA I ATT	Y TAC A GCT T ACA N AAC GCG GCA A GCC	L CTC W TGG Y TAC V GTT taca T ACA L	V GTT N AAC K AAG D GAC GAC I ATC V GTC	A GCA Q CAA V GTC T ACC GGA GGA Y	A GCC V GTT T ACC N AAC T ACT M ATG	219 1361 237 1415 255 1469 273 1523 275 1592 293 1646 310
K AAG GGT I ATT T ACA GGT GGT <u>ag</u> G I ATT F	L CTT G GGT G GGT G GGT Q CAA V GTC Y	R CGC M ATG GGT V GTC W TG I ATC S AGC K	F TCT E GAA W TGG TGG F TTT Y TAC E	F TTC K AAG GCT H CAC GCAC Stact N AAC C TGT R	F TTT A GCT A GCC V GTC tactt A GCA GCA GGT K	I ATT V GTC E GAA S TCC gtag I ATT Y TAC R	F TTC G GGA E GAA W TGG Gatto L TTG W TGG A	S TCT Y TAC G GGT GGT GGT I ATT I	T ACT F TTT G GGT D GAT CGCCC W TGG L CTT E	V GTC E GAA D GAT P CCA CCA QCTC N AAC V GTC K	I ATC Q CAA V GTT E GAA GTT AAC A GCT A	L CTG Y TAC I ATC L TTG CCTTS ACA I ATT E	Y TAC A GCT T ACA N AAC GCA A GCC R	L CTC W TGG Y TAC V GTT taca T ACA L CTG G	V GTT N AAC K AAG D GAC AATG I ATC V GTC E	A GCA Q CAA V GTC T ACC GGA GGA Y TAC V	A GCC V GTT T ACC N AAC T ACT M ATG D	219 1361 237 1415 255 1469 273 1523 275 1592 293 1646 311 1700 329
K AAG GGT I ATT T ACA GGT ACA GGT ATT F TTT	L CTT G GGT G GGT G GGT Q CAA V GTC Y TAC	R CGC M ATG GT V GTC W TG S ATC S AGC K AAG	F TCT E GAA W TGG TGG TTT TTT Y TAC E GAA	F TTC K AAG GCT H CAC TAC N AAC C TGT R CGC	F TTT A GCT A GCC V GTC tactt A GCA GCT K AAG	I ATT V GTC E GAA S TCC I ATT Y TAC R CGA	F TTC GGA E GAA W TGG CT TGG A GCT	S TCT Y TAC G GGT GGT GGT I ATT I ATT	T ACT F TTT G GGT D GAT CGAT TGG L CTT E GAG	V GTC E GAA D GAT P CCA CCA AGCC V GTC K AAG	I ATC Q CAA V GTT E GAA CAA AAC A GCT A GCC	L CTG Y TAC I ATC L TTG CCTTG ACA I ACA I ATT E GAG	Y TAC A GCT T ACA N AAC GCA A GCA A GCC R CGC	L CTC W TGG Y TAC V GTT taca T ACA L CTG G GGA	V GTT N AAC K AAG D GAC AATC V GTC E GAA	A GCA Q CAA V GTC T ACC GGA GGA Y TAC V GTT	A GCC V GTT T ACC N AAC tggt T ACT M ATG D GAC	219 1361 237 1415 255 1469 273 1523 275 1592 293 1646 311 1700 329 1754
K AAG GGT I ATT T ACA GGT ATT F TTT E	L CTT G GGT GGT GGT GGT Q CAA V GTC Y TAC I	R GGC M GGT V GTC W TG GTC V TG S AGC S AGC K AAG G	F TTC S TCT E GAA W TGG F TTT Y TAC E GAA D	F TTC K AAG GCT H CAC Stact N AAC C TGT R CGC I	F TTT A GCT A GCC V GTC tactt A GCA GCA GGT K AAG A	I ATT V GTC E GAA S TCC I ATT Y TAC R CGA L	F TTC GGA E GAA W TGG L TTG W TGG A GCT E	S TCT Y TAC G GGT G GGT G GGT I ATT I ATT N	T ACT F TTT G GGT D GAT CTT E GAG A	V GTC E GAA D GAT P CCA CCA CCA S GTC K AAC V GTC K AAG K	I ATC Q CAA V GTT E GAA GAA A AC A GCT A GCC K	L CTG Y TAC I ATC L TTG CCTLC T ACA I ATT E GAG Y	Y TAC A GCT T ACA N AAC GCA A GCC R GCC R CGC V	L CTC W TGG Y TAC V GTT taca T ACA L CTG G GGA D	V GTT N AAC K AAG D GAC AAG C C C C C C C C C C C C C C C C	A GCA Q CAA V GTC T ACC GGA GGA Y TAC V GTT N	A GCC V GTT T ACC N AAC tggt T AAC T M ATG D GAC E	219 1361 237 1415 255 1469 273 1523 275 1592 293 1646 311 1700 329 1754 347
K AAG GGT I ATT GGT ATT F TTT E GAA	L CTT G GGT GGT GGT GGT Q CAA V GTC Y TAC I ATC	R CGC M ATG GGT V GTC W TG GTC S AGC K AAG GGT	F TTC S TCT E GAA W TGG F TTT Y TAC E GAA D GAC	F TTC K AAG GCT H CAC Stact N AAC C TGT R CGC I ATT	F TTT A GCT A GCC V GTC tactt A GCA GGT K AAG A GCC	I ATT V GTC E GAA S TCC I ATT Y TAC R CGA L TTG	F TTC GGA E GAA W TGG U TTG W TGG A GCT E GAG	S TCT Y TAC G GGT G GGT G GGT I ATT I ATT N AAT	T ACT F TTT G GGT D GAT CA TGG L CTT E GAG A GCA	V GTC E GAA D GAT P CCA QCCA AAC V GTC K AAG K AAG	I ATC Q CAA V GTT E GAA GTT AAC A GCT A GCC K AAA	L CTG Y TAC I ATC L TTG CCTTG ACA I ATT E GAG Y TAC	Y TAC A GCT T ACA N AAC GCA A GCC R GCC R CGC V GTC	L CTC W TGG Y TAC V GTT taca T ACA L CTG G GGA D GAC	V GTT N AAC K AAG D GAC AATC V GTC E GAA Q CAG	A GCA Q CAA V GTC T ACC GGA GGA Y TAC V GTT N AAC	A GCC V GTT T ACC N AAC T ACT M ATG D GAC E GAA	219 1361 237 1415 255 1469 273 1523 275 1592 293 1646 311 1700 329 1754 347 1808
K AAG GGT I ATT T ACA GGT ATT F TTT E GAA G	L CTT G GGT GGT G G CAA V GTC Y TAC I ATC I	R CGC M ATG GGT V GTC W TG S ATC S AGC K AAG G GT I	F TGG GAA W TGG F TGG TTT Y TAC E GAA D GAC V	F TTC K AAG GCT H CAC TGT R CGC C TGT R CGC I ATT A	F TTT A GCT A GCC V GTC tactt A GCA GCA GCT K AAG A GCC T	I ATT V GTC E GAA S TCC I ATT Y TAC R CGA L TTG D	F TTC G GGA E GAA W TGG TGG A GCT E GAG V	S TCT Y TAC G GGT GGT GGT I ATT I ATT N AAT K	T ACT F TTT G GGT D GAT C C C T G G G G G G G G G C A C C T E G G G C A C C C C C C C C C C C C C C C	V GTC E GAA D GAT P CCA A GCC K AAC V GTC K AAG K AAG G	I ATC Q CAA V GTT E GAA C GCT A AC C A A C C C C A A A C C A A A C C A C A C A C A C A C A C A C A C A C A C A C A C A C A C A C A C C A C A C C A C C A C C A C C A C C C A C	L CTG Y TAC L ATC L TTG CCTTC ACA I ATT E GAG Y TAC D	Y TAC A GCT T ACA N AAC GCC A GCC R GCC R CGC V GTC I	L CTC W TGG Y TAC V GTT CTG G GGA L CTG G GGA D GAC E	V GTT N AAC K AAG D GAC GAC I ATC V GTC E GAA Q CAG E	A GCA V GTC T ACC GGA Y TAC V GTT N AAC A	A GCC V GTT T ACC N AAC T ACT M ATG D GAC E GAA G	219 1361 237 1415 255 1469 273 1523 275 1592 293 1646 311 1700 329 1754 347 1808 365
K AAG GGT I ATT T ACA GGT ATT F TTT E GAA GGT	L CTT L CTC G G CT G G C A C A C A C A C A C A C C A C A C	R CGC M ATG GGT V GTC W I GTC S ATC S AGC K AAG G GT I ATT	F TTC S TCT E GAA W TGG TTG TTT TTC E GAA D GAC V GTC	F TTC K AAG GCT H CAC C C C TGT R CGC I ATT A GCA	F TTT A GCC V GTC C C C C C C C C C C C C C C C C C C	I ATT V GTC E GAA S TCC C GAA I TTC R CGA L TTG D GAT	F TTC G GGA W TGG V TGG W TGG A GCT E GAG V GTC	S TCT Y TAC G G G G G G G G G G G G T I ATT I N AAT K AAG	T ACT F TTT G GGT D GAT C C T G GAG GAA GCA E GAA	V GTC E GAA D GAT P CCA agcttt N AAC V GTC K AAG K AAG G GCC	I ATC Q CAA V GTT E GAA CGT A AC GCT A GCT K AAA R CGT	L CTG Y TAC I ATC L TTG CCCLCC T ACA I ACA I ATT E GAC Y TAC D GAC	Y TAC A GCT T ACA N AAC GCG GCC GCC C GCC C GCC I ATT	L CTC W TGG Y TAC V GTT CTG G GGA D GAC E GAA	V GTT N AAC K AAG D GAC GAC U GAC GTC E GAA Q CAG E GAA	A GCA Q CAA V GTC T ACC GGA Y TAC Q GTT N AAC A GCA	A GCC V GTT T ACC N AAC T ACT M ATG D GAC E GAA G GGT	219 1361 237 1415 255 1469 273 1523 275 1592 293 1646 311 1700 329 1754 347 1808 365
K AAG GGT I ATT T ACA GGT ATT F TTT E GAA GGT V	L CTT CTC G GGT A GGT GGT Q CAA V CAA V CAA V CAA V CAA V CAA TAC Y	R CGC M ATG GT V GTC W I GT S ATC S ACC K AAG G GT I ATT E	F TTC S TCT E GAA W TGG F TTT Y TAC E GAA GAC C V GTC T	F TTC K AAG GCT H CAC Vtact N AAC C C C C TGT R C GCA I A TT A GCA G	F TTT A GCT A GCC V GTC C C C C C C C C C C C C C C C C C C	I ATT V GTC E GAA S TCC C GAT Y TAC R CGA L TTG D GAT V	F TTC G GGA E GAA W TGG A TGG A C GCG GAG Q GCC S	S TCT Y TAC G G G G G G G G G G G G G T I A TT I N AAT K AAG G G	T ACT F TTT G GGT D GGT C T G GCA C T G GAG GAA E GAA E	V GTC E GAA D GAT P CCA A GCC K AAG GTC K AAG G GCC K	I ATC Q CAA V GTT E GAA CGT A AC GCT A GCC K AAA R CGT K	L CTG Y TAC L TTG CCLL T TG CCLL T ACA I ACA I ACA I ACA I CAC Q C C C C C C C G AC C C C G C G C G C G	Y TAC A GCT T ACA N AAC GCG GCC R GCC R GCC R GCC V GTC I ATT G	L CTC W TGG Y TAC V GTT CTG G CTG G GGA D GAC E GAA V	V GTT N AAC K AAG D GAC U GAC GAC CAG GAA K	A GCA Q CAA V GTC T ACC GGA Y TAC C GGA Y AAC A CA A	A GCC V GTT T ACC N AAC T ACT M ATG D GAC E GAA G GGT *	219 1361 237 1415 255 1469 273 1523 275 1592 293 1646 311 1700 329 1754 347 1808 365 1862 383
K AAG GGT I T ACA GGT ACA GGT ACT F T T T F GAA GGT V GTT	L CTT CTC G GGT GGT GGT CAA V CAA V CAA V CAA V CAA V CAA TAC T C Y GTC C	R CGC M ATG GT V CT GTC W TG S ACC K AAG G GGT I ATT E GAA	F TTC S TCT E GAA W TGG F TTT Y TAC E GAA GAC GAC C V GTC T ACG	F TTC K AAG GCT H CAC Vtact N AAC C C C C C TGT R C GCT C I A TT A GCA GGT	F TTT A GCT V GTC C C C C C C C C C C C C C C C C C C	I ATT V GTC E GAA S TCC U GTA TCC R CGA L TTG CGA L U GAT V GTA	F TTC G GGA E GAA W TGG A TGG A C GCG GAG C C S TCT	S TCT Y TAC G G G G G G G G G G T I A TT I N A A T K A A G G G G G G G G G G G G G G G G G	T ACT F TTT G GGT D GAT CTT E GAG CTT E GAG A CCA E GAA	V GTC E GAA D CCA GCT N AAC V GTC K AAG GGCC K AAG	I ATC Q CAA V GTT E GAA C GCT A A C GCT K AAA R CGT K AAA	L CTG Y TAC L TTG CCLL T TG CCLL T ACA I ACA I ATT E GAC Y CAA	Y TACC A GCT T ACA N AACC A GCC R GCC R CGC C C C C C C T I ATT G GTC I	L CTCC W TGG Y TACC V CTG G GAC CTG G GAC CTG G GAC CTG GAC CTC CTG G CAC CTC CTCC V CTCCCC V CTCCCCCCCCCCCCC	V GTT N AAC K AAG G G C C C C C C C C C C C C C C C C	A GCA Q CAA V GTC T ACC GGA GGA Y TAC V GTT N AAC A GCA	A GCC V GTT T ACC N AAC C S GCT GAA G GGT X TAA	219 1361 237 1415 255 1469 273 1523 275 1592 293 1646 311 1700 329 1754 347 1808 365 1862 383 1916
K AAG GGT I ATT T ACA GGT ATT F TTT E GAA GGT V GTT acct	L CTT L CTC G GGT A GGT CAA V CAA V CAA V CAA V CAA V TAC Y GTC L ATC V GTC	R CGC M ATG G G T V V G T C W T G G T C M T G C K A AGC K A AGC G G T I ATC S AGC C M T G C T C M T G G T C M M G T C M M T G G G T C M T G G T C M M C G T C M M C M T C M M C G T C M M C M M C M M C C T C M M C M M C M M C M M C M M C M M C M M C M M C M M C M M C M M C M M C C M M C M M C M M C M M C C M M C M C M M C M C M C M M C M C M C M C M C M C C M M C C M C M C M C C M C C M C C C M C	F TTC S TCT E GAA W TGG F TTT Y TAC E GAC GAC C V GTC T ACG	F TTC K AAG GCT H CAC V TAC TGT R CGC C C C C C C C TGT R CGC I A TT A GCA G GT tactt	F TTT A GCT A GCC V GTC C C GCC C C C C C C C C C C C C C C	I ATT V GTC E GAA S TCC U U GTA L TTC R CGA L U TTG D GAT V GTA	F TTC G GGA E GAA W TGG A TGG A GCT S TCT tttgi	S TCT Y TAC G GGT G GGT G GGT I ATT I N AAT K AAG G G G G T ttatt	T ACT F TTT G GGT D GGT C TGG C TGG C C T E GAG A E GAA E GAA E GAA	V GTC E GAA D CCA agotti N AAC V GTC K AAG GGC K AAG GCC K	I ATC Q CAA V GTT E GAA GCT A A GCT A A CGT K AAA CGT K AAA	L CTG Y TAC L TTG CCLL T TG CCLL T ACA I ACA I ATT E GAC Y CAA CAA	Y TACC A GCT T ACA N AACC A GCC R CGCC R CGCC V GTC I ATT G GGT ttgtz	L CTCC W TGG Y TACC V CTG G G G CTG G G G C CTG G G C CTG G G C CTC V C T C C T C C V V C T C C V C V	V GTT N AAC K AAG GAC GAC GAC GAC CAG GAA K AAA K CACS CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG	A GCA Q CAA V GTC T ACC GGA GGA Y TAC V GTT N AAC A GCA A GCA	A GCC V GTT T ACC N AAC C S ACT M ATG D GAC E GAA G GGT * TAA	219 1361 237 1415 255 1469 273 1523 275 1592 293 1646 311 1700 329 1754 347 1808 365 1862 383 1916 1986
K AAG GGT I ATT T ACA GGT ATT F TTT E GAA GGT V GTT accd aaac	L CTT L CTC G GGT A GGT Q GGT Q CAA V GTC Y TAC I ATC V GTC C acct ggaaac	R CGC M ATG G G T V V G T C V T G G T C M T G S AGC K AAG G G T I ATC S AGC C K AAG G T T E G C T C M M T G G T C M M T G G T C M M T G G T C M M M G T C M M M G T C M M M G T C M M M G T C M M M G T C M M M M G T C M M M M G T C M M M M M G T C M M M M M G T C M M M M M G T C M M M M M M M M M M M M M M M M M M	F TTC S TCT E GAA W TGG F TTG F TTT Y TAC E GAC GAC V GTC T ACG cttata	F TTC K AAG GCT H CAC C CAC C C C C C C C C C C C C TGT R C GCT I A TT A GCA G GT tacttact	F TTT A GCT A GCC V GTC C GTC C C GCC T ACA P CCG C C C GCC T	I ATT V GTC E GAA S TCC I ATT Y TAC R CGA L TTG D GAT V GTA attai	F TTCC G GGA E GAA W TGG A TGG A GCC S TCT S TCT TCT TCT	S TCT Y TAC G GGT G GGT G GGT I ATT I N ATT N AAT K AAG G G G G T ttatt	T ACT F TTT G GGT D GGT D GGA CTT E GAG GCA E GAA E GAA E GAA	V GTC E GAA D CCA agotti N AAC V GTC K AAG GGC K AAG GGC K AAG	I ATC Q CAA V GTT E GAA GCT A A GCT A A A CGT K AAA CGT K AAA	L CTG Y TAC L TTG CCTL L TTG CCTL T ACA I ATT E GAC Y CAA CAA CCAA	Y TAC A GCT T ACA N AAC GCA A GCC R CGC C C C C C C C T I ATT G GTC I L tgta	L CTCC W TGG Y TACC V CTG GAT L CTG GA CTG GAA D GAC E GAA V GTC CTCC CTCC V	V GTT N AAC K AAG GAC GAC GAC GAC CAG GAA CAG CAG CAG	A GCA Q CAA V GTC T ACC GGA GGA Y TAC V GTT N AAC A GCA A GCA Q CCA Y	A GCC V GTT T ACC N AAC C S ACT M ATG D GAC E GAA G GGT * TAA Sgaag	219 1361 237 1415 255 1469 273 1523 275 1592 293 1646 311 1700 329 1754 347 1808 365 1862 383 1916 1988 2060
K AAG GGT I ATT T ACA GGT I ACA GGT I TTT E GAA G GTT acct acct	L CTT L CTC G GGT A GGT Q CAA V GTC Z ATC I ATC I C ATC C CAA V CAA V CAA V CAA V CAA CAA C CAA C C C C	R CGC M ATG G G T V V G T C V T G G T C S AGC K AAG G G T I ATT E GAA tatt	F TTC S TCT E GAA W TGG G TGG F TTT Y TAC E GAC D GAC V GTC T ACG cttat agate	F TTC K AAG GCT H CAC C CAC C CAC C TGT R CGC C C C C C C C C C C C C C C C C C	F TTT A GCT A GCC V GTC C GCC C GCC T ACA P CCG ttaac tt C GCC T	I ATT V GTC E GAA S TCC I ATT TCC R CGA TTG D GAT V GTA atta	F TTC G GGA E GAA W TGG G G G G G G G G G G G C S TCT C TCT C C S	S TCT Y TAC G G G G G G G G G G G T I N A TT N N A A T K A A G G G T T C C G G T C C G G T C C C G G T C C C C	T ACT F TTT G GGT D GGT D GGT CTT E GAG GCA E GAA E GAA E GAA CCA E	V GTC E GAA D CCA agcti N AAC V GTC K AAG GGC K AAG GGC K AAG	I ATC Q CAA V GTT E GAA GCT A A GCT A A A CGT K AAA CGT K AAA	L CTG Y TAC L TTG CCLL T TTG CCLL T ACA I ATT E GAC Y CAA CCAA CCAA	Y TAC A GCT T ACA N AAC GCA A GCC R CGC C C C C C C C C T I ATT G GTC I L tgta	L CTCC W TGG Y TACC V CTG GTT CTG GAA D GAC GAA V GTC GAA V GTC CTCCC V	V GTT N AAC K AAG GAC GAC GAC CAG GAA CAG CAG CAG CAG	A GCA Q CAA V GTC T ACC GGA Y TAC V V GTT N AAC Q GCA A GCA A GCA A GCA A GCA	A GCC V GTT T ACC N AAC C C GAC GAA G GGT TAA Sgaag C GAC C C GAA	219 1361 237 1415 255 1469 273 1523 273 1646 311 1700 329 1754 347 1808 365 1862 383 1916 1988 2060 2132
K AAG GGT I ATT T ACA GGT ATT F TTT E GAA GGT V GTT accti aaag acti ttaa	L CTT L CTC G GGT A GGT Q CAA V GTC Q CAA V TAC I ATC V GTC I C CCA Q CAA CAA C Q GTC I CAA CAA C Q CAA C C C C C C C C C C C C	R CGC M ATG G GTC V GTC W TG G GTC S AGC K AAG G GT I ATT E GAA tatta tatta	F TTC S TCT E GAA W TGG GTG TTT TTT Y TAC E GAA D GAC V GTC T ACG cttat agatz ccact	F TTCC K AAG GCT H CAC C C C C C C C C C C C C C C C TGT R C GCA I A TTT A GCA G G T G C I Z ATT A CAC C C C C C C C C C C C C C C C	F TTT A GCT A GCC V GTC C GTC C GCC T ACA P CCG ttaac tttgt accac	I ATT V GTC E GAA S TCC Ugtad I ATT Y TAC R CGA L TTG D GAT V GTA attattattatta	F TTC G GGA E GAA W TGG C TTG G G G C C TCG C C S TCT C TCT C C C C C C C C C C C C	S TCT Y TAC G GGT G GGT G GGT I ATT I N ATT N AAT K AAG G GGT ttatt tcaac	T ACT F TTT G GGT D GAT CTT E GAG CTT E GAG CCT E GAG CCT E GAA E GAA E GAA CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA	V GTC E GAA D CCA agcti N AAC V GTC K AAG GGC K AAG GGC K AAG ctttt accct	I ATC Q CAA V GTT E GAA CTT A A GCT A A CCT K AAA CGT K AAA CGT K	L CTG Y TAC I ATC L TTG CCCLC T ACA I ATT E GAC Q CAA CCAA CCAA CCCAA	Y TACC A GCT T ACA N AACC A GCC R GCC R CGCC V GTC I ATT G GTC I CGCT I CGCT C GTC C GTC C CCC C C C C C C C C	L CTCC W TGG Y TACC C C G G G C C G G C C G G C C G G C C G G C C C C C C C V V C T C C V V C T C C V V C V C	V GTT N AAC K AAG D GAC U GAC U GAC C GAA C AG C AG C AG C	A GCA Q CAA V GTC T ACC GGA GGA Y TAC V GTT N AAC A GCA A GCA A GCA A GCA A GCA	A GCC V GTT T ACC N ACC M ATG D GAC E GAA G GGT TAA cgaag catcc cacct	219 1361 237 1415 255 1469 273 1523 293 1646 311 1700 329 1754 347 1806 383 1916 1988 2060 2132 2204
K AAG GGT I ATT T ACA G GGT ATT F TTT E GAA G GGT V GTT acct aaag actt ttaaa	L CTT L CTC G GGT A GGT Q CAA V GTC Q CAA V TAC I ATC V GTC I Cacet i gaaa caataga	R CGC M ATG G G G T C V G G C T C S ATC S ATC S AGC K AAG G G G T I E GAA ttatd ttatd ttatd C G ATG G C C V V S C C C C C C C C C C C C C C C	F TTC S TCT E GAA W TGG G TTG TTT TTT TTT C E GAA D GAC C T TAC GAC T ACG GAC C T C T C T C C C C C C C C C C C C C	F TTCC K AAG GCT H CAC C Stact N AAC C C C C C C C C C C C C TGT R C GCA I A TT A A GCA I C AC C I I ATT A CAC	F TTT A GCT A GCC V GTC C C GCC C C GCC T ACA P CCG C C C G C C C C C C C C C C C C C	I ATT V GTC E GAA S TCC Ugtad I ATT Y TAC R CGA L TTG GAT V GTA attattattatta	F TTC G GGA E GGA W TGG G GAG W TGG G GCT E GAG C C C C C C S TCT TCT TCT TCT	S TCT Y TAC G G G G G G G G G G G G G T I A TT I N A A T N N A A G G G T C G G T I C G G T C G G T C C G G G G G G G G G G	T ACT F TTT G GGT D GGT D GGT CTT E GAG GCA E GAA E GAA E GAA E GAA E GAA E GAA	V GTC E GAA D CCA agct1 N AAC V GTC K AAG GGC K AAG GGC K AAG GGC K C C C A AG GGC C K AAG GGC C C C C A A C C A A C C A A C A A D D C C A A A C C A A A D D C C A A A C C A A A D D C C A A A C C A A A D D C C A A A C C A A A D D C C A A A C C A A A C C A A A C C A A A C C A A A C C A A A C C A A C C A A C C A A C C A A C C A A C C A A C C A A C C C A C C A C C A C C A C C A C C A C C A C C C A C C C A C C C C A C	I ATC Q CAA V GTT E GAA GTT A A GCT A A GCT K AAA CGT K AAA CGT K AAA	L CTG Y TAC I ATC L TTG CCULG T ACA I ATT E GAC GAC Y CAA CCAA CCAA CCAA CCAA CCAA	Y TAC A GCT T ACA N AAC A GCA A GCC R GCC R CGC V GTC I ATT G GTC I CGC I I ATT CGC I I CGC C I I CGC I I CCA CA A CA A	L CTCC W TGG Y TACC C C G G G C C G G C C G G C C G G C C G G C C C G G C C C C C C V V C T C C V V C T C C V V C V C	V GTT N AAC K AAG D GAC U GTC E GAA Q CAG E GAA K AAA K CAG E GAA K	A GCA Q CAA V GTC T ACC GGC GGA Y TAC V GTT N AAC GCA A GCA A GCA A GCA A C GCA C C C C	A GCC V GTT T ACC N AAC T ACC M ATG D GAC E GAA G GAA G GAA G GAA G GAA G GAA C E CAA C C C C C C C C C C C C C C C	219 1361 237 1415 255 1469 273 1523 275 1592 293 1646 311 1700 329 1754 347 1808 365 1862 383 1916 1988 2060 2132 2204 2204 2276
K AAG GGT I ATT T ACA GGT ATT F TTT E GAA GGT GGT V GTT acct aaag actt ttaa aaga ttaa	L CTT L CTC G GGT A GGT Q CAA GCT Q CAA V GTC Y TAC I ATC I GTC Q GTC C acctt C t tacttoo CAA C A CAA C A CAA C CAA C C C C C C	R CGC M ATG G GTC V GTC S ATC S ATC S ATC S AGC K AAG G G GT I I E GAA tatta tatta tatta tatta	F TTC S TCT E GAA W TGG TGG TTT TTT Y TTT C E GAA D GAC V GTC T ACG GTC T ACG C C T T T T T T C C C C C C C C C C C	F TTC K AAG GCT H CAC C C C C C C C C C C C C C C C C C	F TTT A GCCT A GCC V GTC C C GCC C G GCT K AAAG A GCC T ACA A C C C G GCT T C C C G G C C G G C C C G C C C C	I ATT V GTC E GAA S TCC GAA S TCC I TCC R CGA L TTG D TTC CGA L TTG GTA S CGA A L TTG GTA S CGA A S TCC C C A A S S TCC C S S S S C S S S S S S S S S S	F TTC G GGA E GGA W TGG GAG W TGG GAG CT E GAG CTC S TCT TCT TCT TCT TCT CTC S CCC CCC	S TCT Y TAC G GGT G GGT I ATT I ATT N AAT K G GGT CGT CCCAC GGT CCCAC GGT CCCAC CCCCAC CCCCAC CCCAC CCCAC CCCAC CCCAC CCCAC CCCAC CCCCAC CCCAC CCCAC CCCAC C	T ACT F G GGT D GGT D GGT CTT C CTT E GAG CCT E GAG CCT E GAG CCT E GAG CCT E CTT E CTT E CTT E CTT E CTT E CTT E CTT E CTT C CTT C CTT C CTT C C CTT C C CTT C C CTT C C CTT C C CTT C C CTT C C CTT C C CTT C C CTT C C CTT C C CTT C C CTT C C CTT C C CTT C C CTT E C CTT C C CTT C C CTT C C CTT C C CTT C C CTT C C CTT C C CTT C C CTT C C CTT C C CTT C C CTT C C CTT C C CTT C C CTT C C CTT C C CTT C	V GTC E GAA D GAT P CCA agctt N AAC V GTC K AAG G GCC K AAG G GCC K AAG G GCC K AAG G GCC K C AAG C K C C A C C A C A A C A A C A A C A A C A A A C A A A C A A C A A A A C A A A C A A A C A A A A C A A A C A A A C A A A C A A A C A A A C A A C A A C A A C A A C A A C A A C A A C A A C A A C A A C A A C A A C A A C A C A A C A C A A C A C A A C A C A C A C A C A C A C A C A C A C A C A C A C C A C A C C A C C A C C A C C A C C C A C C A C C C A C C A C C A C C A C C A C C A C C A C C C A C C C C A C C C A C C C C A C	I ATC Q CAA V GTT E GAA A AC GCT A A GCT A A GCC K AAA CGT K AAA CGT K AAA CGT K AAA CGT C A AAA A AAA CGT A A A CAA A A A A CAA A A A A A A A A	L CTG Y TAC I ATC L TTG CCCLC T ACT I ACT I E GAG Y TAC Q CAA CCLCC CAA CCLC CAA CCLCC CAA CCLCC CAA CCLCC CAA CCLCC CAA CCLCC CAA CAA	Y TACC A GCT T ACA N AACA A ACA CGC R GCC R GCC R CGCC V GTC GTC GGT C GGT C CGCC C C C C C C C	L CTCC W TGG Y TACC CTG G GAT L CTG G GAC D GAC CTG G GAC V GTCC CTG G GAC V GTCC CTG G GAC CTG G C CTGC V V V V CTCC V V V C V V C TACC V V V V V C TACC V V V C C T C C V V V C C T C C C V V C C C C	V GTT N AAC K AAG D GAC V GAC E GAA Q CAG E GAA Q CAG E CAG E CAG E CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG	A GCA Q CAA V GTC T ACC GGC GGA Y TAC V GTT N AAC Q GCA A GCA A GCA A GCA A C GCA C C C C C	A GCC V GTT T ACC N AAC C S G G G G G G G G G G G G G G G G G	219 1361 237 1415 255 1469 273 1523 275 1592 293 1646 311 1700 329 1754 347 1808 365 1862 383 1916 1988 2060 2132 2204 2204 2204 2204 2204
K AAG GGT I ATT T ACA GGT ATT F TTT E GAA G GTT GTT Q GTT acct ttaa cttf ttaa catc	L CTT L CTC G GGT A GGT Q CAA V CAA V CAA V TAC I ATC I ATC GTC GTC GTC C CAA CAA V CAA CAA CAA CAA CAA CAA CA	R CGC M ATG G GTC V GTC S ATC S ATC S ATC S AGC K AAG G GT I I E GAA ttattattattattattattattattattattattatta	F TTC S TCT E GAA W TGG TGG F TTT T TTC E GAA D GAC V GAC T T ACG GAC T T ACG GAC T C T C T C T C T C C C A A C C C C A A C C C C	F TTC K AAG GCT H CAC C C C C C C C C C C C C C C C C C	F TTT A GCCT C GCC C GTC C GTC C GTC A A GCA G GTC K A A G GCT T A A C G GTC C C G GTC C C G GTC C C C C C C	I ATT V GTC E GAA S TCC I ATT Y TCC R CGA L TTG D TTG Q TTG Q TTG Q TTG Q CGA A L TTG Q CGA CGA C CGA C C C C C C C C C C C C C	F TTC G GGA E GGA W TGG G GAG W TGG GAG C C C C C C C C C C C C C C C C C	S TCT Y TAC G GGT G GGT G GGT I ATT I ATT N AAT K AAG G GGT ttatt tcaac tcaac tcaac tcaac tcaac tcaac tcaac tcaac tcaac tcaac tcaac tcaac tcaac tcaac tcaac G G T I I ATT I I I ATT I I ATT I I I ATT I I ATT I I I ATT I I I ATT I I I I	T ACT F G GGT D GGT D GGT C C T G GAT C C T G GAG GAA GCA E GAA GAA E GAA GAA C C T C T C T C T C C T C C C T C C C T C	V GTC E GAA D CCA GGT V CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA C	I ATC Q CAA V GTT E GAA GTT A AC GCT A A GCT K AAA R CGT K AAA CGT K AAA CCT K	L CTG Y TAC I ATC L TTG CCCLC T ACA I ATT E GAG Y TAC Q CAA CCAA CCAA CCAA CCAA CCAA CCAA	Y TAC A GCT T ACA N AAC GCC R GCC R GCC R GCC V GTC I G GCT G GCT G GCT C GCC T C GCC T C GCC T C GCC T C GCC T C GCC T C C C C	L CTCC W TGG GTT TACC V GTT CTG G GAC EA CTG G GAC EA V GTCC GTC GTCC CTG G GAC EA CTG GAC EA CTG GAC EA CTG GTC CTG CTG V V V V V V V CTACC V V V V V V V V V V V V V V V V V V	V GTT N AAC K AAG D GAC I ATC V CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG	A GCA Q CAA V T ACC GTC G GGA Y TAC V GTT N AAC Q GTT N AAC Q GTT N AAC Q GTT N AAC Q GTT TAC Q Q GTT TAC Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q	A GCC V GTT T ACC N AAC C S G G G G G G G G G G G G G G G G G	219 1361 237 1415 255 1469 273 1523 275 1592 293 1646 311 1700 329 1754 347 1808 362 383 1916 1988 2060 2132 2204 2276 2348 2420 2492
K AAG G G T T AATT T ACA G G G T T T T T T T T T T T T T T T T	L CTT L CTC G GGT A GGT G CAA V CAA V CAA V TAC I ATC I ATC G GGT V GTC C CAA CAA CAA V CAA CAA CAA CAA CAA CA	R CGC M ATG G GTC V GTC V TG S AGC K AAC S GGT I ATT E GAA C CAA C GGT I C CAA C C C C C C C C C C C C C C C C	F TTC S TCT E GAA W TGG TG TTT TTC E GAA D GAC C C C C T T TACC E GAA D C GAC T T TACC E C GAA C G C C T T T C T C T C T C T C T C T C	F TTC K AAG GCT H CAC GCT TGT R CGC I ATT A CGC I ATT A GCA GGT GGT ttcat ttcat ttcat ttcat gcaaa	F TTT A GCT GCC V GTC C GTC C GCC GGT K AAAG A GCC T AAAG A CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG	I ATT V GTC E GAA S TCC I ATT TC CGA L TTG D GAT TTG CGA CGA L TTG O GAT Attai ttca cattai ttca cattai	F TTC G GGA E GGA W TGG G TTG G GTC TTG G GCT E GAG V GTC S TTCT TTCT TTCT TCT TCT TCT C C C C	S TCT Y TAC G GGT G GGT G GGT I ATT N AAT K AAT G G GGT C Caacd C Caacd C C GGT I I ATT N AAT K C C C C C C C C C C C C C C C C C C	T ACT F TTT G GGT D CGCC W TGG GAT CTT E GAG A GAA E GAA E GAA CTT E GAG GAC CTT E GAG CTT E GAG CTT E GAC CTT E CTT E CTT C CTT E CTT C CTT C CTT C CTT C CTT C C CTT C C CTT C C CTT C	V GTCC E GAA D CCA agct1 N AAC CCA M GTCC K AAG GCC K AAG GCC K AAG GCC K AAG C K AAG C K CCA	I ATC Q CAA V GTT E GAA GCT A AC GCT A A GCT K AAA R CGT K AAA CGT K AAA CGT K AAA CGT C K	L CTG Y TAC I ATC L TTG CCCLC T ACA I ATT E GAG Y TAC D GAG Y CAA CCA CAA CCAC CAA CCAC CAA CCAC CAA CCAC CAA CCAC CAAC CAA CAAC CAAC CAAC CAAC CCAAC CACAC CAAC	Y TAC A GCT T ACA N AAC GCA A GCA CGC C CGC V GTC CGC C GCC T G GGT GCG T CGC C CGC T CGC C CGC C CGC C CGC C CGC C CGC C C C C C C C C R C C C C	L CTCC W TGG GT TACC CTG GGT CTG GGAC CTG GGAC CTG GAC CTG GAC CTG GAC CTG GAC CTG CTG CTG CTG CTG CTG CTG CTG CTG CT	V GTT N AAC K AAG D GAC I ATC V GTC E GAA CAG E GAA K AAA CAG CAG E CAG E CAG E CAG E CAG E CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG	A GCA Q CAA V T ACC GTT T ACC GGA T ACC GGA T ACC V GTT N AAC Q GTT N AAC Q GTT N AAC Q GTT Q GTT Q GTT Q GTT C CAA C C A C C A C C A C C A C C C C	A GCC V GTT T ACC N AAC C T ACT M ATG D GAC E GAA G GAA G GAA G GAA C TAA C gaag catcc taataa	219 1361 237 1415 255 1469 273 1523 275 1592 293 1646 311 1700 329 1754 347 1808 365 1862 383 1916 1988 2060 2132 2204 2276 2348 2420 2420 2554
K AAG G G T T AATT T ACA G G G T T T T T T T T T T T T T T T T	L CTT L CTC G GGT A GGT C A C CAA V C CAA V C CAA V TAC I A TC I A TC C C A A C C A A C CAA V C CAA V C CAA C CAA C CAA C C C C	R CGC M ATG G GTC V GTC V TG S AGC K AAC G GT I ATC S AGC K AAG G GT I I E GAA tatatatatatatatatatatatatatatatatatat	F TTC S TCT E GAA W TGG F TTT TTC E GAA D GAC C C C C T T TACC E GAA D GAC T T TACC E C GAA C T C T T T C T C T C T C T C T C T C	F TTC K AAG GCT H CAC GCAC TGT R CGC C TGT R CGC I ATT A GCA GGT GGT ttcat tcat tcat tcat gcaaaaa tcat tcat	F TTT A GCT GCC V GTC C GTC C GCC GGT K AAG A GGT K AAG A C GGT T AAG C C C G C C C C C C C C C C C C C C	I ATT V GTC E GAA S TCC I ATT TC R CGA L TTG D CGA L TTG O GAT S ATT V CGA A L CGA CGA CGA CGA CGA CGA C CGA C C C C C	F TTC G GGA E GGA W TGG G TTG G GTC TTG G GCT E GAG V GTC S TTCT TCT TCT TCT TCT TCT Catac catac catac Catac S CCA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA CAA C	S TCT Y TAC G GGT G GGT G GGT I ATT N AAT K AAT G G GGT C Caac C Caac C C GGT I I ATT N AAT C C G C C C C C C C C C C C C C C C C	T ACT F TTT G GGT D CGCC W TGG GAT CTT E GAG CTT E GAG A CTT E GAG CAC E A GAA CAC E CTT CTT E GAG CAC CTT E CTT C CTT C CTT C CTT C CTT C CTT C C C C C C C C C C C C C C C C C C C C	V GTC E GAA D CCA agct1 N AAC CCA A GGC K AAG GCC K AAG GCC K AAG GCC K AAG C K AAG C K CCA	I ATC Q CAA V GTT E GAA GCT A AC GCT A A GCT K AAA CGT K AAA CGT K AAA CGT K AAA CGT C K AAA CGT C K AAA CCT A CAA CAA C A CAA C A CAA C C CAA C C CAA C C CAA C C C CAA C C C C C C C C CAA C	L CTG Y TAC I ATC L TTG CCCLC T ACA I ATT E GAG Y TAC D GAG Y CAA CCA CCA CCAC CCAC CCAC CCAC C	Y TAC A GCT T A AAC GCA A A GCA A GCA R GCC R GCC R GCC T G GCC T G GCC T C GCC T C GCC T C GCC T C GCC T C GCC T C C C C	L CTCC W TGG GT TACC CTG GGT CTG GGAC CTG GGAC CTG GGAC CTG GAC CTG GAC CTG GAC CTG GAC CTG GAC CTG CTG CTCC CTG CTCC CTG CTCC CTCC	V GTT N AAC K AAG D GAC I ATC V GTC E GAA CAG E GAA CAG E CAG E CAG E CAG E CAG E CAG CAG E CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG	A GCA Q CAA V T ACC GTC G GGA Y TACC V GTT N AAC Q GTT N AAC Q GTT N AAC Q GTT Q GTT Q GTT Q GTT Q GTT C C Q GTC C Q GTC C Q GTC C Q C Q C Q C Q C Q C Q C Q C Q C Q C	A GCC V GTT T ACC N AAC C U AAC AAC AAC G GAA G GAA G GAA G GAA G GAA G GAA C C TAA C Saaag C actcc t actcc C C T ACC ACC C N AAC C C C C C C C C C C C C	219 1361 237 1415 255 1469 273 1523 275 1592 293 1646 311 1700 329 1754 347 1808 365 1862 383 1916 1988 2060 2132 2204 2276 2348 2420 2456 2456 2456 255 255 255 255 255 255 255 2

9. ábra: A *R. miehei ftr1* **gén teljes nukleotid és aminosav szekvenciája** A kék betűk a gén kódoló részét, a zöld kisbetűk az intronokat, míg a piros nagybetűk a tripletek által kódolt aminosavakat jelölik. Az intronok 5' és 3' végén található GT és AG motívumokat vastag betűkkel, ill. aláhúzással ábrázoltuk, míg a szabályozó régiókban azonosított jellegzetes szekvencia részleteket szürke kiemeléssel jelöltük.

ggc	cgcgi	tete	tgtti		tgeta	attt	ttta	attga	aagat	ttett	tgag	taaa	agaga	aagta	ataa	aatga	acaag	72 144
aaa	ggagi	tgaat	tttti	ttet	gtget	ctgt	cgca	atat	ctga	tact	ttet	gtct	ttg g a	ata at	tttt	ttcg	cg <mark>caa</mark>	216
tga	tctco	cgcaa	aagga	aacg	gage	gacti	ccgo	ccac	ccat	ca gat	tatg	ctga	tcca	ccgaa	acgc	tcata	accaa	288
aat	gtgto	ctgca	aaago	cttt	gtaca	agaa	agggo	tca	tct g a	ataat	tcag	caga	tccc	cgcg	cctt	gtato	cttgc	360
Cal	Lyrcy	Jaaad	aaa	alali		Luaci	loga	Jaaad	ayaa	M	S	0	D	L	F	D	V	
ctt	cgtc	ttct	tcct	tette	cccad	cccag	ggaco	gagea	atc i	ATG 1	rCG (CAG	GAT (CTC :	- TTT (GAT (GTT	494
Р	I	F	F	I	v	F	R	Е	т	т	Е	Α	Α	I	I	v	S	26
CCG	ATT	TTC	TTT	ATT	GTG	TTC	CGT	GAA	ACT	ACG	GAA	GCA	GCC	ATT	ATC	GTT	TCC	548
v	L	L	S	F	L	R	ĸ	I	F	D	т	S	т	Р	I	Y	ĸ	44
GTG	CTG	CTA	TCT	TTC	CTG	CGC		ATC	TTT	GAT	ACA	AGC	ACA	CCG	ATC	TAC	AAA	602
CGA		R CGC	אי		CTC	TCC	⊥ ∆тъ	GGA	AGC	ACCC		GGG	ם דידים	r T	⊥ ∆דד	TCT		656
COA	I	G	A	A	F	I	A	V	W	Y	T	v	L	N	D	I	W	80
TGC	ATT	GGT	GCA	GCT	TTC	ATT	GCT	GTA	TGG	TAC	ACA	GTT	CTC	AAC	GAT	ATT	TGG	710
G	N	S	Е	D	I	W	Е	G	v	F	S	L	I	A	v	I	м	98
GGA	AAC	TCA	GAA	GAC	ATT	TGG	GAA	GGT	GTC	TTC	TCC	TTG	ATT	GCC	GTA	ATT	ATG	764
I	Т	Α	M	G	L	A	М	L	K	Т	E	R	М	Q	Е	ĸ	W	116
ATC	ACC	GCA	ATG	GGT	CTC	GCT	ATG	CTC	AAG	ACT	GAA	CGT	ATG	CAA	GAA	AAA	TGG	818
A A C	ATC	A A C		A	A A C	A CCT	M ATC	CAA	ACC	CAT	A	TTC		R	CAT	N	R AGA	134 872
T	W	K	v	R	M	0	R	Y	S	F	F	L	L	P	F	I	T	152
ACT	TGG	AAG	GTT	CGC	ATG	CAA	CGA	TAC	TCC	TTC	TTC	CTC	TTG	CCT	TTC	ATC	ACT	926
v	L	R	Е	G	L	Е	А	v	v	F	I	G	G					166
GTC	CTT	CGT	GAA	GGT	\mathbf{CTT}	GAA	GCT	GTC	GTT	TTC	ATC	GGT	GGT	gta	aagto	cgcaa	aacct	983
													v	S	L	N	v	171
ttta	agegg	gaaa	catt	tttgi	ttgtg	gttci	taco	tgag	gaato	cttt	tcta	cat <mark>a</mark>	GTC	TCC	TTG	AAC	GTC	1050
Q	A	K	S	I	P	I	A	A	I	M	G	F	I	С	G	C	L	189
CAA	GCT		TCT	ATT.	v	ATT.	GCT	GCC	ATT.	ATG M	GGT	TTC	ATC	TGT	GGA	TGC	CTC F	207
GTC	GGT	TTC	ATC	 ∆TT	TAC	CGT	GGT	GGT	TCC	ATG	СТС	AAG		CGC	TTC	TTC	TTC	1158
I	F	S	Т	v	I	L	Y	L	v	A	A	G	L	M	S	ĸ	A	225
ATT	TTC	TCC	ACT	GTC	ATC	TTG	TAC	CTC	GTC	GCA	GCC	GGT	CTT	ATG	TCC	AAG	GCT	1212
v	G	Y	F	Е	Q	Y	Α	W	N	Q	v	I	G	G	Е	Α	A	243
GTT	GGA	TAC	TTT	GAG	CAG	TAT	GCT	TGG	AAC	CAA	GTC	ATT	GGT	GGT	GAA	GCC	GCC	1266
E	Е	G	G	D	V	I	A	Y	K	V	T	T	A	V	W	H	V	261
GAA c	GAA	GGC	GGT	GAC	GTG	ATC	GCA	TAC	AAG	GIT	ACC	ACA	GCC	GTC	TGG	CAC	GTC	1320
TCC	TGG	GGT	GAT	CCC	GAA	CTG	AAC	GTA	GAC	ACT	ААТ	GGT	GGC	TG	rt .gad	atati	tacta	1377
100	100	001	0	000	0	010		0	0110			001	Q	I	F	N	A	281
cat	tttt	tgaat	tacta	atcca	agcca	acact	tta	gctca	acaaa	aaato	cttga	ac <u>ag</u>	G CA	A AT	C TT	C AA	C GCC	1444
I	L	G	W	N	N	т	Α	т	I	G	S	I	v	S	Y	C	G	299
ATT	TTG	GGT	TGG	AAC	AAC	ACT	GCA	ACT	ATC	GGT	AGC	ATC	GTC	AGT	TAC	TGT	GGT	1498
Y	W	L	I	V	A	A	A	L	V	Y	M	F	F	K	E	R	K	317
TAC	TGG	CTC	A'TC	GTC	GCA	GCC	GCT	CTA	GTG	TAC	ATG	TTC	TTC	AAG	GAA	CGC	AAG	1552
CGT	A CCT	T ATC	CAG	A A C	CCT	CAC	CCC	CCT	CDD	CTC	CAT	CAA	CAT	CCT	GAC	A	A	1606
L	E	N	A	K	R	F	I	D	0 O	N	E	GAA	V	I	V	GCC	T	353
TTG	GAA	AAC	GCA	AAG	AGA	TTC	ATC	GAC	CAA	AAC	GAA	GGT	GTC	ATT	GTC	GGA	ACC	1660
D	v	к	Е	S	R	D	м	Е	Е	v	D	v	S	н	Р	D	L	371
GAC	GTC	AAG	GAA	TCC	CGT	GAC	ATG	GAA	GAA	GTT	GAT	GTC	TCC	CAT	CCA	GAT	CTG	1714
A	S	G	Е	ĸ	ĸ	Q	Е	I	K	A	*							383
GCA	TCT	GGT	GAA	AAG	AAG	CAA	GAA	ATC	AAA	GCA	TAA	ato	ctat	cata	tcata	atat	tttta	1773
tca	ttag	ttat	catgo	ccta	tatci	ttgo	cgtta	attta	attga	agaaa	aaag	aaaaa	aatg	taga	tatg	tact	tttag	1845
att	gtaca	accg	gtgca	atcci	ccct	gate	JCCCS	agc	caaag	gtct	tttg	aaaca	aacti			aacto	cttct	1917
aata	accai	laca:	ataci	aldt(ycci	acaa	attar	ata	uygga taati	aycta	ayga at t a	LLGCa	acto	JLCA Tacto	ugto	y aat i ntati	aaa ag ataga	1989 2061
tati	tato	at aa	atota	aca	ratat	-+++/	ratas	acy	atati	act:	art.	tata	acco	rcad	rade	racci	raga tagtt	2001
tca	taat	ccca	aacto	catta	acaco	ateta	acat	ccat	ttac	ata	catt	tatta	aget	state	ccat	cdca	gtaga	2205
tac	gcagi	ttgc	gatca	acgaa	accc	gtcaa	attgt	tac	tata	cacat	tggc	c	5.0	5.0		5		2253

10. ábra: A R. pusillus ftr1 gén teljes nukleotid és aminosav szekvenciája

A kék betűk a gén kódoló részét, a zöld kisbetűk az intronokat, míg a piros nagybetűk a tripletek által kódolt aminosavakat jelölik. Az intronok 5' és 3' végén található GT és AG motívumokat vastag betűkkel, ill. aláhúzással ábrázoltuk, míg a szabályozó régiókban azonosított jellegzetes szekvencia részleteket szürke kiemeléssel jelöltük.

Az általunk meghatározott szekvencia *R. miehei* esetén 2671 bp, míg *R. pusillus* esetén 2253 bp hosszúságú. A *R. miehei ftr1* gén intronokkal együtt 1270 bp hosszúságú, a kódoló szakaszok hossza 1149 bp, amely egy 382 aminosavból álló fehérjét határoz meg

(9. ábra). A R. pusillus ftr1 gén intronokkal együtt 1280 bp hosszúságú, az exonok együttes hossza szintén 1149 bp, amely ugyancsak egy 382 aminosavból álló fehérjét kódol (10. ábra). Az intronok, illetve a gén 5' és 3' nem-kódoló régiói a gomba gének általános jellemzőit mutatják. Mindkét génben két intront azonosítottunk, mindegyik tartalmazza az intronok 5' végén általánosan megfigyelhető GT, míg 3' végén az AG motívumokat (BALLANCE 1990). Az intronok viszonylag rövidek, 58-67 bp hosszúságúak, és azonos pozícióban helyezkednek el a két faj esetén. A R. miehei esetében egy 646 nukleotid hosszúságú promóter régiót határoztunk meg, amely tartalmaz egy tipikus TATA motívumot 76 bp upstream helyzetben a start kodontól (TATATTT). A R. pusillus esetében 470 nukleotid hosszúságú promótert azonosítottunk, amely szintén tartalmaz egy tipikus TATA motívumot 96 bp upstream helyzetben a start kodontól (TATATTTT). Mindkét *ftr1* gén promóterében több CAAT motívumot és közvetlenül a start kodontól upstream jellegzetes pirimidingazdag régiót azonosítottunk. Ezen kívül mindkét promóterben több GATA motívumot is találtunk, amelyek a vastranszportban szerepet játszó gének szabályozó régióiban a gének kifejeződését irányító vasérzékelő transzkripciós faktorok kötőhelyéül szolgálnak. R. miehei esetén 755 bp, R. pusillus esetén 503 bp hosszúságú terminális régiót határoztunk meg, ebben 283 ill. 231 downstream helyzetben azonosítottuk a konszenzus AATAAA poliadenilációs szignál szekvenciákat. Ez a szekvencia szinte változatlanul található meg az eukarióta gének 3' régiójában, azonban fonalas gombákban – főleg aszkuszos és bazídiumos gombákban – gyakran hiányzik. Érdekes módon más, járomspórás gombákból azonosított gének 3' régióiban szintén megtalálták ezt a konszenzus szekvenciát. Az általunk azonosított teljes ftrl szekvenciákat az EMBL nukleotid szekvencia adatbázisba küldtük el (8. táblázat).

EMBL azonosító	Törzs	Szekvencia tartalom	Hossz
AM286203	Rhizomucor pusillus WRLCN(M) 231 (R18)	<i>ftr1</i> gén teljes szekvenciája (3 exon, 2 intron + promóter és terminális régiók)	2253 bp
AM286215	Rhizomucor miehei CBS 360.92 (R15)	<i>ftr1</i> gén teljes szekvenciája (3 exon, 2 intron + promóter és terminális régiók)	2671 bp

8. táblázat: Az EMBL adatbázisba leadott teljes ftr1 szekvenciák.
http://www.ebi.ac.uk/embl/index.html

A *R. miehei* és *R. pusillus ftr1* gének nukleotid szinten 86 %-ban, míg aminosav szinten 90 %-ban megegyeztek, azonban az intronok, illetve a promóter és terminális régiók között nem találtunk homológiát. Az FTR1 fehérje a sejtmembránban található és

hat potenciális transzmembrán domént tartalmaz. A nukleotid szekvenciák alapján feltételezett aminosav szekvenciákban azonosítottuk a konzervált REGLE motívumot, amely az egyik transzmembrán doménben helyezkedik el, és fontos szerepe van a vas ionok sejtmembránon keresztüli átjuttatásában (STEARMAN és mtsi. 1996). A *R. miehei* és *R. pusillus ftr1* nukleotid szekvenciákból származtatott FTR1 fehérjeszekvenciák N-terminális és középső régiója nagyfokú homológiát mutatott más, nemzetközi adatbázisokban (NCBI, EMBL) megtalálható gomba FTR1 fehérjékkel, míg a C-terminális régió variábilisabb volt (11. ábra).



11. ábra: *R. miehei* és *R. pusillus* **FTR1 fehérjék összehasonlítása más gomba FTR1 fehérjékkel.** Az ábrán vastag keret jelzi a konzervált REGLE motívumot, ahol a fehérje egy glutaminsavon keresztül közvetlenül képes kapcsolatba lépni a vasionokkal. A vékonyabb keretek azokat a konzervált szakaszokat jelölik, amelyek alapján az FTR-A és FTR-B degenerált primereket terveztük.

A *R. miehei* és *R. pusillus* FTR1 fehérjék a legnagyobb homológiát az adatbázisban megtalálható *Rh. oryzae* FTR1 fehérjével mutatták (74 ill. 73 %), de aránylag nagy hasonlóságot találtunk más fonalas és élesztőgomba fajokból származó FTR1 fehérjékkel is. *S. pombe* FIP1 vaspermeázzal 53 ill. 48 %, *A. fumigatus* és *A. clavatus* FTRA fehérjékkel 51 %, *Pichia pastoris* FTR1 fehérjével mindkét esetben 49 %, *C. albicans* CaFTR1 fehérjével 46 ill. 47 %, *S. cerevisiae* FTR1 fehérjével 45 ill. 46 %, *C. neoformans* CaFTR1 fehérjével 45 ill. 46 %, *Claviceps purpurea* CPIT1 fehérjével 45 ill. 46 %, *Pyrenophora tritici-repentis* plazmamembrán vaspermeázzal és *Phanerochaete chrysosporium* FTR1 fehérjével mindkét esetben 43 % hasonlóságot tapasztaltunk.

Vizsgáltuk a *R. miehei* és *R. pusillus ftr1* gének kodon használatát is (3. és 4. melléklet). Az egyes gének kodon használatában egyazon organizmus esetében is eltérések tapasztalhatók (PUNT és mtsi. 1988). A konstitutívan és erősen kifejeződő gének kodon használata jellegzetes, mivel a rendelkezésre álló 61 aminosav kódoló kodon körülbelül felét használják csak, illetve a kodon használat szigorú szabályokat követ. Ezzel szemben a nem konstitutívan vagy alacsony szinten kifejeződő gének kodon használata nem ilyen egyoldalú, általában az összes rendelkezésre álló kodont használják (GURR és mtsi. 1987).

Mindössze hat olyan kodon van, amely nem fordul elő a *R. miehei ftr1* génben, a *R. pusillus ftr1* génben pedig egy kivételével minden lehetséges kodon megtalálható. Mindkét gombánál a fonalas gombák körében gyakrabban előforduló TAA STOP kodont azonosítottuk. A kodonok harmadik, ún. "lötyögő" pozíciójában, számos gomba génhez hasonlóan, mindkét gombánál 64 %-ban pirimidin bázis található. A harmadik pozícióban a kétféle purin illetve pirimidin bázis használatában nem figyelhető meg preferencia. *R. miehei ftr1* génjében a T és C bázisok aránya 48,6 % és 51,4 % a harmadik pozícióban, *R. pusillus* esetében 45 % és 55 % ez az érték. Az A és G bázisok aránya a harmadik pozícióban mindkét gombánál azonos, 52-53 %, illetve 47-48 %.

A különböző gombafajoknál az *ftr* gének kifejeződése a vaskoncentrációtól függ. A gének expressziója alacsony vaskoncentráció hatására következik be, míg magas vaskoncentráció esetén a gének kifejeződése gátolt. *S. cerevisiae*-ben a vasfelvételben résztvevő gének kifejeződését transzkripciós aktivátorok irányítják, fonalas gombáknál pedig negatív regulátorokat azonosítottak. Járomspórás gombáknál eddig nem találtak ilyen regulátor fehérjéket, de FU és mtsi. (2004) *Rh. oryzae*-ben igazolták, hogy a vashiány az *ftr1* gén expresszióját okozza, míg elegendő vasforrás mellett a gén nem fejeződik ki. A *R. miehei* és *R. pusillus ftr1* gének kodon használata is azt mutatja, hogy ezek nem konstitutívan fejeződnek ki. A promóter szekvenciákban azonosított GATA elemek arra utalnak, hogy a gének kifejeződése a transzkripció szintjén regulált.

6.4. A nagy-affinitású vaspermeáz vizsgálatához szükséges szelekciós és transzformációs rendszerek kidolgozása

6.4.1. Drogrezisztencián alapuló direkt szelekciós rendszer kidolgozása (NYILASI és mtsi. 2003).

A patogén gombák genetikai hátterének vizsgálata hatékonyan működő transzformációs rendszereket igényel. A transzformációs módszerek sikeres
alkalmazásának alapja viszont a transzformánsok szelekcióját biztosító rendszerek megléte. Járomspórás gombáknál a transzformációs rendszerek főként auxotróf markerek komplementációjára épülnek. Elméleti és gyakorlati szempontból is lényeges lenne azonban olyan drogrezisztencia alapú szelekciót biztosító transzformációs rendszer kifejlesztése, amellyel lehetséges vad típusú izolátumok direkt transzformálása. Munkánk során célunk egy higromicin B rezisztencián alapuló, a járomspórás gombáknál általánosan használható direkt szelekciós rendszer megvalósítása volt.

A járomspórás gombákra intenzív radiális növekedés jellemző, az antibiotikumok többsége pedig csak magas koncentrációban gátolja növekedésüket. Annak érdekében, hogy a transzformánsokat szelektálni tudjuk egy antibiotikum jelenlétében, szükséges lehet a hifanövekedés lassítása ill. az antibiotikumra való érzékenység növelése. A gombák érzékenységének növelésére számos módszert alkalmaznak, lehetséges a táptalaj pH-jának módosítása vagy specifikus komponensek hozzáadása a táptalajhoz, amelyek megnövelik a membrán permeabilitását (IBRAHIM és SKORY 2006). Kompakt telepnövekedés eléréséhez általánosan elterjedt alacsony pH-jú táptalajok alkalmazása (pH 3-3,5). A gombasejtek higromicin B-vel szembeni érzékenysége azonban pH függő, alacsony pH-n magasabb higromicin B koncentráció szükséges a növekedésgátláshoz, így az nem kedvező a szelekció során. Járomspórás gombák ételekből és takarmányból való izolálására, illetve az izolált törzsek elkülönítésére dikloránnal és bengálvörössel kiegészített táptalajt használnak (KING és mtsi. 1979; SKAAR és STENWIG 1996). Kísérleteink során ezen komponensek kombinációját használtuk a hifanövekedés visszaszorítására illetve lassítására.

Az *ftr1* gén vizsgálatában alkalmazott *R. miehei* és *R. pusillus* törzsek genetikai háttere kevésbé ismert, ezért vizsgálatainkat először egy vad típusú *M. circinelloides* törzzsel (M20) kezdtük meg. Ez a faj a biológiai kutatások számos területén használt modellorganizmus, genetikailag jól jellemzett és a transzformációs kísérletekben is gyakran alkalmazott gombafaj. Ráadásul 2008 eleje óta a teljes genom szekvenciája is rendelkezésünkre áll (*Mucor Genome Project*; http://mucorgen.um.es/).

A *M. circinelloides* M20 törzs higromicin B által okozott növekedésgátlásának teszteléséhez 10⁴ sporangiospórát szélesztettünk különböző koncentrációjú (0, 50, 100, 150 és 200 µg/ml) higromicin B-t tartalmazó YEG (pH 6,5) táptalajra. Bengálvörös és diklorán mentes táptalaj használatakor még 200 µg/ml higromicin B használata mellett is a kontrollhoz (higromicin B-mentes YEG táptalaj) hasonló mértékű gombanövekedést tapasztaltunk. Ezzel szemben 50 µg/ml higromicin B alkalmazása teljes növekedésgátlást

eredményezett a bengálvörössel (100 μ g/ml) és dikloránnal (3 μ g/ml) kiegészített táptalajon, mivel a bengálvörös és a diklorán nemcsak a telepek méretét és az aeriális hifák termelését csökkentette, hanem megnövelte a gomba higromicin B-vel szembeni érzékenységét is (9. táblázat).

Diklorán (µg/ml)	Bengálvörös (µg/ml)	Higromicin B (µg/ml)	Növekedés
-	-	200	+
3	100	-	+
3	100	25	+
3	100	50	-
3	100	75	-
3	100	100	-

9. táblázat: *M. circinelloides* növekedésének gátlása különböző vegyületekkel kiegészített YEG táptalajon.

A bengálvörös és a diklorán kompakt növekedést előidéző koncentrációjának megállapítása érdekében változó koncentrációban adtuk a táptalajhoz a két vegyület keverékét. Állandó diklorán koncentráció (2 µg/ml) mellett a 20, 30, 40, 50, 75 és 100 µg/ml koncentrációban alkalmazott bengálvörös az egybefüggően növő micéliumból a koncentráció emelésével egyre kompaktabb, rózsaszínű telepek elkülönítését tette lehetővé. Állandó bengálvörös koncentráció (100 µg/ml) mellett alkalmazott diklorán viszont már pontszerű telepeket eredményezett 3 µg/ml diklorán koncentráció felett. Ezek alapján a szelekcióhoz 100 µg/ml bengálvöröst és 3 µg/ml dikloránt tartalmazó YEG táptalajt használtunk, amelyen gyorsan növő, különálló és kompakt gombatelepeket tudtunk létrehozni. Ehhez a táptalajhoz 25, 50, 75 és 100 µg/ml higromicin B antibiotikumot adva, már 50 µg/ml higromicin B alkalmazásakor a gombanövekedés teljes gátlását tapasztaltuk.

A 12. ábrán a bengálvörös és a diklorán koncentrációfüggő növekedésre gyakorolt hatásának érzékeltetése érdekében állandó higromicin B koncentráció (100 μg/ml) mellett változó koncentrációban adtuk a táptalajhoz a bengálvörös és a diklorán keverékét. A bengálvörös koncentrációját 25, 50, 75 és 100 μg/ml, míg a diklorán koncentrációját 1, 2 és 3 μg/ml között változtattuk. Az A ábrán egy vad típusú *M. circinelloides* törzs, míg a B ábrán egy higromicin B rezisztens transzformáns törzs (lásd: 6.4.2. fejezet) növekedése látható. A vad típusú törzs növekedése gátolt a 100 μg/ml higromicin B-vel kiegészített

YEG táptalajon bizonyos bengálvörös és diklorán koncentráció felett, míg a higromicin B rezisztens törzs ezen táptalajon is növekedésre képes.



0, 25, 50, 75, 100 µg/ml bengálvörös

12. ábra: M. circinelloides növekedésének gátlása

A: *M. circinelloides* (M20) vad típusú törzsének növekedése YEG és 100 μg/ml higromicin Bvel és különböző koncentrációjú bengálvörössel (25, 50, 75, 100 μg/ml) és dikloránnal (1, 2, 3 μg/ml) kiegészített YEG táptalajon.

B: *M. circinelloides* M20/A1 transzformáns törzsének növekedése YEG és 100 µg/ml higromicin B-vel és különböző koncentrációjú bengálvörössel (25, 50, 75, 100 µg/ml) és dikloránnal (1, 2, 3 µg/ml) kiegészített YEG táptalajon.

Elmondhatjuk tehát, hogy a diklorán és bengálvörös kombinációjával kiegészített táptalaj alkalmas a higromicin B rezisztens *Mucor* transzformánsok szelektív izolálására. Habár 100 µg/ml bengálvörös és 3 µg/ml diklorán alkalmazása mellett 50 µg/ml higromicin B koncentráció is megfelelőnek bizonyult a transzformálás után kapott rezisztens telepek szelekciójára, a szelekciós körülmények szigorítása érdekében a transzformációs kísérletek során magasabb (100 µg/ml) higromicin B koncentrációt alkalmaztunk.

6.4.2. Az ATMT alkalmazhatóságának vizsgálata járomspórás gombákban (NYILASI és mtsi. 2005a, NYILASI és mtsi. 2008a).

Az ATMT számos előnnyel rendelkezik a hagyományos módszerekkel szemben és hatékony transzformációs eljárást jelenthet a járomspórás gombák körében is. Alkalmazhatóságát több járomspórás gombafajnál is vizsgáltuk. A kísérleteket a *M. circinelloides* (M20) vad típusú törzsével kezdtük meg, a transzformáció során pedig az általunk kidolgozott higromicin B alapú szelekciós rendszert használtuk. A transzformációhoz két bináris rendszerrel rendelkező *A. tumefaciens* törzset használtunk, melyek a pBHt2 és a pPK2 plazmidokat hordozták (13. ábra, MULLINS és mtsi. 2001, COVERT és mtsi. 2001).



13. ábra: A pBHt2 és a pPK2 plazmidok térképe.

A transzformációs kísérletek alapja a BUNDOCK ÉS HOOYKAAS (1996) által leírt, majd DE GROOT és mtsi. (1998) által módosított protokoll volt. Lényege, hogy logaritmikus fázisban lévő *A. tumefaciens* tenyészetet egyenlő mennyiségű gombaspóra szuszpenzióval $(10^5-10^6$ sporangiospóra/ml) kevertünk össze és a keveréket acetosziringon (AS) tartalmú indukciós táptalajra helyezett celofán korongokra szélesztettük. Az AS hatására aktiválódott az *A. tumefaciens* virulenciáért felelős génkaszkádja, ami számos lépés után a transzformálandó DNS szakaszt az *A. tumefaciens* sejtekből a gombasejtekbe juttatta át. Néhány napos együtt-tenyésztés után a celofán korongokat 100 µg/ml bengálvöröst, 3 μg/ml dikloránt és 100 μg/ml higromicin B-t tartalmazó szelekciós táptalajokra tettük, amelyen néhány nap után higromicin B rezisztens telepek jelentek meg. A DE GROOT és mtsi. (1998) által közölt kísérletekben a tenyészeteket nitrocellulóz membránon növesztették, mi a celofánt használtunk erre a célra: az átlátszó celofán korongok alkalmazása a színes táptalajon a transzformáns telepek könnyű felismerését és izolálását tette lehetővé. Az AS jelenléte az indukciós táptalajban esszenciális volt, mivel hiányában, számos más ATMT kísérlethez hasonlóan, nem kaptunk transzformáns telepeket.

Az ATMT módszer egy-két lépésben eltérhet a különböző gombafajoknál, mivel a sikeres transzformációhoz néhány faktor optimalizálása szükséges. Fontos az együtttenyésztés hőmérsékletének és idejének helyes megválasztása. Az alkalmazott hőmérséklet esetünkben is kritikus tényezőnek bizonyult: a transzformáció szempontjából optimális 25°C-on (28°C-nál magasabb hőmérséklet a vir rendszer inaktiválását okozza) a M. circinelloides jóval gyorsabban nőtt, mint az A. tumefaciens, 2 nap inkubáció után teljesen befedte az indukciós táptalajt. A baktérium és a gomba növekedésének összehangolásához az inkubációs hőmérsékletet 25°C-ról 15°C-ra csökkentettük. Az alacsonyabb hőmérséklet mind a gomba, mind a baktérium lassabb növekedését eredményezte, megnövelve így a transzformációhoz szükséges időtartamot. Az eredetileg alkalmazott 1-2 nap helyett minimum 4 nap együtt-tenyésztés volt szükséges a transzformáció lejátszódásához, ennél rövidebb idő alatt nem kaptunk transzformáns telepeket. Négy napnál hosszabb inkubáció azonban a transzformáns telepek számának növekedését okozta (10. táblázat). Habár 5 ill. 6 nap inkubáció után már az IM táptalajon is megindult a *M. circinelloides* növekedése, a celofán korongokat szelekciós táptalajra áthelyezve a gyenge micélium hálózaton új, kompakt transzformáns telepek megjelenését tapasztaltuk.

Gombaspórák száma az IM-en	Inkubáció hossza IM-en (nap)	Higromicin B rezisztens telepek száma
8×10 ³	5	3
0^10	6	31
	4	1
2×10^{3}	5	3
	6	5

10. táblázat: ATMT után megjelenő higromicin B rezisztens M. circinelloides telepek száma.

A heterológ promóterrel irányított *E. coli*-ból származó higromicin B foszfotranszferáz génnel történő transzformáció tehát rezisztens *M. circinelloides* telepek

megjelenését eredményezte. A pBHt2 vektort hordozó *A. tumefaciens* törzzsel végzett transzformáció során több higromicin B rezisztens telepet kaptunk, mint a pPK2 vektort hordozó *A. tumefaciens* törzzsel transzformálva. Mindkét vektorban a *hph* gént *A. nidulans*-ból származó promóter irányította, bár a pBHt2-nél a *trpC*, míg a pPK2 esetén a *gpd* gén promóterét használtuk. A két *A. tumefaciens* törzs eltérő genetikai háttérrel rendelkezett, talán a baktérium törzsek virulenciájában lévő különbségek jelenthetik az eredmények magyarázatát.

A cönocitikus micélium miatt a szelektív táptalajokon izolált transzformáns telepek heterokariotikusak voltak, azaz genetikailag különböző magokat tartalmaztak. A hifák növekedésekor a cönocitikus micéliumban a sejtmagok szegregálnak, így néhány tenyésztési ciklus után homokarionok jönnek létre. Monosporangiális telepek képzéséhez az egy spórából kinövő transzformáns telepeket többször egymás után szelektív táptalajra oltottuk, hogy a telepek csak a *hph* gént hordozó sejtmagokat tartalmazzák. A *hph* gén jelenlétét a transzformáns izolátumokból származó genomi DNS-ben *hph*-specifikus primerekkel végzett PCR reakcióval bizonyítottuk. A transzformánsokból a várt méretű (1020 bp) amlifikációs fragmentumokat kaptuk, a jelölt *hph* próbával történő hibridizációs analízis szintén a rezisztencia gén meglétét bizonyította (14. ábra).



14. ábra: A *hph* gén kimutatása PCR analízissel a transzformáns *M. circinelloides* törzsekből.

A: A *hph*-specifikus primerekkel kapott amplifikációs mintázat agaróz gélelektroforézise; **B:** A transzformánsok hibridizációs analízise *hph*-specifikus próbával. A minták sorrendje: 1: pUC mix marker, 2: pBHt2 plazmid, 3-5: M20/A1, M20/A2 és M20/A3 transzformánsok.

A T-DNS genomba integrálódásának bizonyítását és a beépült kópiák számának meghatározását Southern hibridizációval végeztük. Vad típusú és transzformáns *M. circinelloides* izolátumokból származó genomi DNS-t *NcoI* restrikciós enzimmel emésztettünk (egyszer hasítja a *hph* gént), majd digoxigenin-jelölt *hph* próbával hibridizációs analízist végeztünk. A hibridizációs mintázat igazolta, hogy a *hph* gén egy kópiában integrálódott a transzformáns izolátumok genomjába. A 15. ábrán látható, hogy a vad típusú *M. circinelloides* genomjában nem található meg a *hph* gén, míg a transzformánsok esetén két jelet kaptunk (az M20/A1 transzformánsnál az erős jel két azonos méretű fragmentumnak felel meg), ami az *NcoI* restrikciós enzim által emésztett *hph* génszakaszokat jelölik. Az integráció véletlenszerűen történt, a transzformánsok különböző emésztési mintázata alapján azt feltételezzük, hogy a *hph* gén minden transzformánsban különböző kromoszómális helyre épült be. Hasonló random T-DNS integrációs eseményeket írtak le élesztőknél és számos fonalas gombánál is (DE GROOT és mtsi. 1998, BUNDOCK és mtsi. 2002).



15. ábra: Higromicin B rezisztens *Mucor* **transzformánsok hibridizációs analízise.** Az *Nco*I restrikciós enzimmel emésztett genomi DNS minták jelölt *hph* génnel történő hibridizációja. A minták sorrendje: 1: linearizált pBHt2 plazmid. 2: *M. circinelloides* vad típusú törzs, 3-5: *M. circinelloides* M20/A1, M20/A2 és M20/A3 transzformáns törzsek.

A transzformánsok mitótikus stabilitásának vizsgálata érdekében néhány transzformáns telepet higromicin B-mentes YEG táptalajra oltottunk többször egymás után. A transzformáns izolátumokat újra szelektív táptalajra (higromicin B-vel kiegészített YEG) oltva, azok lassabb növekedést mutattak, majd néhány átoltás után teljesen

elveszítették a rezisztens fenotípust. Hasonló instabilitást tapasztaltunk a végig szelektív táptalajon tenyésztett izolátumoknál is: habár a transzformáns telepek többszöri átoltás után is kinőttek, a telepek egyre lassabb növekedését tapasztaltuk minden átoltás után. A higromicin B rezisztencia gyengülése a bejuttatott hph marker elvesztésével is együtt járt. Többször átoltott transzformáns izolátumokból tisztított DNS-ből egyre nehezebben sikerült a hph gén jelenlétét detektálni a cönocitikus micéliumban egyre kisebb mennyiségben jelenlévő transzformáns magoknak köszönhetően. Hét egymást követő átoltás után a *hph* gént már sem PCR-ral, sem hibridizációval nem tudtuk kimutatni, habár nagy mennyiségű DNS-sel végzett dot-blott esetén sikerült hibridizációs jelet kapnunk a transzformáns mintákból. Ez, az egyre gyengébb növekedést is figyelembe véve, a transzformánsok instabilitását igazolja. Egyes szerzők szerint a cönocitikus micéliummal rendelkező járomspórás gombák genomjába integrálódott DNS stabilitása többszöri sporulációs ciklus lejátszódása után növekszik, mivel spóraképződéskor az allélok szegregációja által olyan sporangiospórák is kialakulhatnak, melyekben az összes sejtmag tartalmazza az integrálódott gént (HORIUCHI és mtsi. 1995). Esetünkben nem ez történt, a transzformáns telepek többszöri átoltás utáni egyre lassabb növekedését, a higromicin B rezisztencia gyengülését és végül a bejuttatott hph marker elvesztését tapasztaltuk.

A transzformáns DNS mintákkal TAIL-PCR analízist is végeztünk az integráció helyének meghatározása érdekében. A TAIL-PCR módszert LIU és WHITTIER (1995) fejlesztették ki, segítségével a növényi vagy gomba genomba integrálódott T-DNS-t határoló kromoszóma régiók felamplifikálhatók az inszert DNS végeire tervezett specifikus primerek alkalmazásával. Kísérleteink során a LIU és mtsi. (1995) által tervezett degenerált, illetve a MULLINS és mtsi. (2001) által tervezett RB-specifikus primerekkel dolgoztunk, a három egymásra épülő amplifikálás paramétereit is az általuk javasolt módon állítottuk be. Sokszori próbálkozásunk ellenére sem kaptunk azonban specifikus PCR terméket, így az integráció helyét nem tudtuk meghatározni. Ennek egyik lehetséges magyarázata az lehet, hogy az ATMT során a T-DNS nagyobb valószínűséggel épül be a gomba genom repetitív szekvenciáiba, ezen régiók amplifikációja viszont nehezen megvalósítható.

Kísérleteinkkel párhuzamosan jelent meg két publikáció, melyekben két másik járomspórás gomba *A. tumefaciens* közvetített transzformálásáról számoltak be: MONFORT és mtsi. (2003) a *R. miehei*, míg MICHIELSE és mtsi. (2004) a *Rh. oryzae* transzformációját végezték el. Habár munkánk során demonstráltuk a *hph* gén integrációját a *M. circinelloides* genomjába, az egymást követő átoltások (7-9 ciklus) során az összes

transzformáns izolátum elveszítette a rezisztens fenotípust. Hasonló instabilitást tapasztaltak MONFORT és mtsi (2003) a R. miehei kanamicin rezisztencián alapuló transzformációja során. Nem-szelektív körülmények között néhány átoltást követően a transzformánsok 0,1 %-a őrizte meg csupán a rezisztenciát, és folyamatos szelekciós nyomás alatt is csak a transzformánsok 35 %-ban maradt meg a szerzett fenotípus. A bejuttatott T-DNS mennyisége olyan alacsony volt, hogy hibridizációs analízissel nem kaptak jelet a transzformáns izolátumok genomi DNS-éből, így az integráció ténye is vitatott maradt. Hasonló eredményeket kaptak M. circinelloides P. blakesleeanus leul génjével történt PEG-mediált heterológ transzformációját követően: már az első ciklus után drasztikusan csökkent a nem-szelektív táptalajon nevelt transzformánsok száma, és a második ciklus után teljesen elveszett a transzformáns fenotípus (ITURRIAGA és mtsi. 1992). Ezzel szemben MICHIELSE és mtsi. (2004) stabil, integratív Rh. oryzae transzformánsokat kaptak az ATMT alkalmazásával. A bejuttatott marker a Rh. niveus uracil auxotrófiát komplementáló pyr4 génje volt. Habár munkánk során M. circinelloides esetében az ATMT-vel spórák transzformálását valósítottuk meg – MONFORT és mtsi. (2003) R. miehei transzformálásakor csírázó spórákat használtak – MICHIELSE és mtsi. (2004) Rh. oryzae transzformációjakor csak protoplasztok alkalmazásakor jártak sikerrel. A különböző eredmények a járomspórás gombák különböző sejtfalösszetételéből adódhatnak. MICHIELSE és mtsi (2004) kétféle transzformáns típust különítettek el: a nyolc vizsgált transzformáns közül két esetben a bejuttatott pyr4 gén kicserélődött a genomban megtalálható pyr4 génnel, hat esetben viszont a T-DNS egy ektopikus genomi lókuszba épült be. Az utóbbi esetben az integráció minden transzformáns izolátum esetében ugyanabban a kromoszómális helyen egy kópiában történt. Ezek az eredmények eltérnek általunk tapasztalt random integrációtól. Az integráció pontos helyének az meghatározásakor ők sem jártak sikerrel: sem TAIL-PCR-ral, sem más PCR alapú módszerrel nem tudták az integrálódott T-DNS szakasszal határos kromoszómális régiókat felszaporítani. Az integrációs helyet határoló szekvenciák direkt klónozása szintén nem vezetett eredményre.

Annak érdekében, hogy a járomspórás gombáknál általánosan alkalmazható, drogrezisztencián alapuló transzformációs rendszert tudjunk kialakítani, a transzformáló plazmid elkészítéséhez szükségünk volt erősen kifejeződő promóter régióra. A glicerinaldehid-3-foszfát dehidrogenáz gén határoló régióit konstitutív és erős kifejeződése miatt számos esetben alkalmazták transzformáló vektorok létrehozására (PUNT és mtsi. 1987). A transzformáció hatásfoka homológ promóter használatakor jobb, mivel az a

szelekciós markerként alkalmazott gén hatékonyabb expresszióját teszi lehetővé. A *M. circinelloides gpd1* génjét azonosították és jellemezték (WOLF és ARNAU 2002), a *gpd1* 5' határoló régiói pedig homológ és heterológ fehérjék irányítására is alkalmasnak bizonyultak (PAPP és mtsi. 2006, APPEL és mtsi. 2004). Munkánk során mi is e gén határoló régióit használtuk a transzformáló vektorok elkészítésekor.

Rendelkezésünkre állt a pPT43 plazmid, amely tartalmazta a *M. circinelloides gpd1* gén 5' és 3' határoló régióit. Specifikus primer párral (hph7 és hygB3) felszaporítottuk a higromicin B foszfotranszferáz (*hph*) gént, amit a pPT43 plazmidba a *gpd1* promóter és terminális régiói közé építettünk *XhoI* és *NotI* restrikciós enzimek segítségével. Az így kialakított kazettát a *XbaI* és *SacI* restrikciós enzimekkel emésztett, COVERT és mtsi. (2001) által készített pPK2 vektorba helyeztük, amelyből előzetesen eltávolítottuk az eredeti *hph* kazettát (pNYI7, 16. ábra).

A pNYI8 vektor esetén a *hph* kazetta mellé *gfp* gént is építettünk, amely szintén a *M. circinelloides gpd1* promóter és terminális régiójának irányítása alatt állt. A specifikus primer párral (GFP1/b és GFP2/b) felszaporított *gfp* gént *Xba*I és *Xho*I restrikciós enzimek segítségével a *M. circinelloides gpd1* gén határoló régiói közé építettük. Az így kialakított kazettát *Sac*I restrikciós enzimmel emésztett pNYI7 vektorba helyeztük létrehozva a pNYI8 vektort (16. ábra). Az elkészített vektorokat *A. tumefaciens* GV2260 és GV3101 törzsekbe elektroporáltuk.



16. ábra. A pNYI7 és a pNYI8 plazmidok térképe.

Az Aequorea victoria medúzából származó GFP – eredeti nevén aequorin – egy biolumineszcens fehérje, ami a látható fény alacsonyabb hullámhosszú összetevőivel megvilágítva fluoreszcens fényt bocsát ki. A GFP-t kódoló gént azonosították és izolálták, ez az expressziós kísérletek hasznos eszközévé vált (CHALFIE és mtsi. 1994). A *gfp* gént különböző fehérjét kódoló génekkel fuzionáltatva az a fehérjének fluoreszcens jelleget kölcsönöz, így lényegében egy *in vivo* fluoreszcens fehérje nyerhető, melynek transzportja, szekréciója, felhalmozódása vagy öröklődése jól nyomon követhető az élő szervezetben a kibocsátott fluoreszcencia által. A *gfp* gént számos prokarióta és eukarióta organizmusban használták riporter génként a vizsgálni kívánt gének promóterével fuzionáltatva. Más riporter génekkel szemben nagy előnye, hogy a *gfp* gén expressziója szubsztrát hozzáadása nélkül is vizsgálható.

Az általunk készített konstrukciók alkalmazásával nagyobb transzformációs gyakoriságot vártunk, mint amit a pBHt2 vektorral kaptunk, mivel a *M. circinelloides gpd1* gén promótere erősebb génkifejeződést tesz lehetővé, mint a korábban használt *A. nidulans*-ból származó promóterek. A *gfp* gén alkalmazásával a transzformáció direkt bizonyítása és a transzformáns magok sorsának követése volt a célunk.

A transzformációs kísérleteket a továbbiakban a *M. circinelloides*-szel közeli rokonságban álló *Backusella lamprospora* B1 (MUFS A8) törzzsel végeztük, mivel ez számos, a transzformáció szempontjából előnyös tulajdonsággal rendelkezett. Egyrészt a *M. circinelloides*nél nagyobb érzékenységet mutatott a higromicin B antibiotikumra: 50 µg/ml higromicin B-vel kiegészített YEG táptalajon a növekedés teljes gátlását tapasztaltuk bengálvörös és diklorán használata nélkül is. Másik előnye, hogy a *B. lamprospora* sporangiospórái egymagvúak, ami lehetővé teszi homokariotikus telepek izolálását közvetlenül a transzformálás után.

Kísérleteink során, a transzformációs hatékonyság növelése érdekében, *B. lamprospora* protoplasztokat transzformáltunk. Az *A. tumefaciens* (pNYI7 vagy pNYI8 vektort hordozó) és a *B. lamprospora* protoplasztok $(1,5 \times 10^8/\text{ml})$ együtt-tenyésztését IM táptalajon és IM tápoldatban is elvégeztük. Mind a szilárd, mind a folyékony IM tápoldatot 200 µM acetosziringonnal és 0,8 M szorbitollal egészítettük ki a *vir* rendszer indukciójának illetve a protoplasztok ozmotikus stabilitásának fenntartása érdekében. A táptalajon történő tenyésztés esetén a táptalajra helyezett celofán korongokon 25°C-on 2 napig inkubáltuk a baktérium sejtek és a gomba protoplasztok keverékét. A *M. circinelloides*-szel ellentétben a *B. lamprospora* protoplasztok növekedése nem indult meg az IM táptalajon 2 nap alatt sem, így az eredetileg javasolt, a *vir* rendszer működése szempontjából ideálisabb 25°C-os

inkubációs hőmérsékletet használtuk. 2 nap után a celofánkorongokat 100 µg/ml higromicin B-vel és 200 µM cefotaximmal kiegészített YEG táptalajra helyeztük és 25°Con inkubáltuk a transzformáns telepek megjelenéséig. A feltételezett transzformáns telepekből monosporangiális izolátumokat hoztunk létre. Az IM tápoldatban történő tenyésztést 25°C-on 16-18 órán keresztül végeztük, majd centrifugálással történő ülepítés után a sejteket szelektív táptalajra vittük.

A pNYI8 plazmidot hordozó *A. tumefaciens*-szel történő transzformáció után higromicin B rezisztens *B. lamprospora* telepeket kaptunk. A telepek erőteljes növekedése miatt a transzformációs hatékonyság meghatározása nem volt lehetséges. Az IM tápoldatban történő inkubáció sokkal előnyösebb volt a transzformánsok izolálása szempontjából, mint a szilárd IM-en történő inkubáció. Az előbbi esetben ugyanis a szelektív táptalajban lévő cefotaxim gátolta az *A. tumefaciens* növekedésének megindulását, míg *a B. lamprospora* növekedni tudott. Szilárd IM-en az *A. tumefaciens* erőteljes növekedést produkált már az együtt-tenyésztés során, a szelektív táptalajban lévő cefotaxim gátolta ugyan a baktérium további növekedését, de a már meglévő vastag baktérium pázsit megnehezítette a szelektív csészén megjelenő transzformáns gombatelepek elkülönítését.

A *hph* és *gfp* gének jelenlétét a feltételezett transzformánsokból származó genomi DNS-ben PCR reakcióval bizonyítottuk. A *hph* gén középső szakaszát felszaporító NYhph3 és NYhph4 primerekkel a várt méretű 623 bp, a teljes *gfp* gént felszaporító GFP1/b és GFP2/b primerekkel pedig 720 bp méretű fragmentumot kaptunk a vizsgált 13 transzformáns törzs DNS-éből, a vad típusú B1 izolátum genomi DNS-ből viszont nem kaptunk amplifikációs termékeket. A bevitt gének felszaporítása közvetlenül a spórákból is lehetséges volt specifikus reakciókörülmények alkalmazása mellett. A PCR-ral felszaporított fragmentumokat pBluescript SK+ vektorba klónoztuk, majd szekvenáltuk. Ez szintén igazolta, hogy a *hph* és *gfp* gének jelen vannak a transzformáns izolátumok genomi DNS-ében.

A *gfp* gén kifejeződésének köszönhetően a transzformáns izolátumok intenzív fluoreszcenciát mutattak (17. ábra). A transzformánsok fluoreszcens mikroszkópos vizsgálata egyrészt a transzformáció lejátszódásának direkt bizonyítását jelentette, másrészt alkalmas volt a transzformáció hatékonyságának vizsgálatára is. A szelekciós táptalajon izolált telepekből származó spórák vizsgálata azt mutatta, hogy szilárd IM alkalmazásakor a transzformáns telepekből származó sporangiospórák 23 %-a mutatott csupán fluoreszcenciát, míg a folyékony tápoldat alkalmazásakor a sporangiospórák 70 %-

a fluoreszkált (mindkét esetben 200 spórát vizsgáltunk). Ennek egyik lehetséges magyarázata az lehet, hogy a folyékony IM-ben történő együtt-tenyésztés a szilárd táptalajjal szemben jobban elősegítette az idegen DNS transzmisszióját. A másik magyarázat alapja az, hogy a folyékony IM tápoldatban történő tenyésztés után a szelektív táptalajon csak transzformáns gombatelepek találhatók, míg a szilárd IM-en történő együtt-tenyésztés után a szelektív csészén a baktérium és sok esetben már az IM táptalajon növekedésnek induló, nem transzformáns gomba hifák is megtalálhatók.



17. ábra: A *gfp* gént hordozó *B. lamprospora* transzformánsok fluoreszcens mikroszkópos vizsgálata. Az A-D ábrák két, pNYI8 vektort hordozó *A. tumefaciens*-szel transzformált *B. lamprospora* hifáit mutatják, az A és C ábrák látható fényben készültek, a B és D ábrákon ugyanezen hifák által kibocsátott fluoreszcencia látható. Az E ábrán a vad típusú *B. lamprospora* törzs látható fényben készült fotóját ábrázoltuk, az F ábrán ugyanezen törzs autofluoreszcenciája látható. (A vonal minden esetben 50 μm távolságot jelöl).

Kísérletünkben a *gfp* gént *M. circinelloides gpd1* gén határoló régiói közé építettük, a *gfp* gén kifejeződése igazolta, hogy a *M. circinelloides gpd1* gén promóter és terminális régiója képes a bevitt heterológ gén transzkripcióját biztosítani a *B. lamprospora* genomjában. A *gfp* riporter gén alkalmazása tehát járomspórás gombák esetén is megvalósítható és hasznos eszköznek tűnik számos molekuláris és sejtbiológiai folyamat tanulmányozásában. Járomspórás gombáknál eddig három publikáció született, melyben a *gfp* gént alkalmazták. SCHILDE és mtsi. (2001), illetve BARTSCH és mtsi. (2002) *A. glauca*ban a *gfp*-t riporter génként használták a transzformáló plazmid expressziójának nyomon követésére. Nemrég MERTENS és mtsi. (2006) heterológ fehérjék hatékony expresszióját biztosító promótereket teszteltek *Rh. oryzae* esetén, melyek működését GFP segítségével vizsgálták. Mivel a *gfp* transzkriptum szintje megfelelt a felhalmozódott GFP fehérje mennyiségének, a fluoreszcencia mértékéből az adott promóter hatékonyságára tudtak következtetni. Habár az ATMT hatékony módszernek bizonyult a *B. lamprospora* transzformálására, a bejuttatott DNS stabilitása kérdéses volt. A *B. lamprospora* egymagvú sporangiospórái ellenére a csak *hph* és *gfp* géneket hordozó magokat tartalmazó telepek eléréséhez szükséges volt a transzformáció után megjelenő telepek többszöri átoltása. Szelektív körülmények között történő tenyésztéskor többszöri átoltás után a transzformáns telepek instabilitását tapasztaltuk: a transzformánsok növekedése a sorozatos átoltásokkal egyre gyengült és a bejuttatott gének egyre gyengébb amplifikációs terméket adtak a PCR analízis során.



18. ábra: A transzformáns *B. lamprospora* izolátumok sporangiospóráiból történő *hph*- és *ftr*-specifikus primerekkel kapott amplifikációs mintázatok.

A: A *hph*-specifikus primerekkel kapott amplifikációs mintázat. 1: pUC Mix marker, 2: pNYI8 plazmid, 3: vad típusú törzs, 4: B1/1 transzformáns, 5: B1/1 transzformáns 1 átoltás után, 6: B1/2 transzformáns, 7: B1/2 transzformáns 1 átoltás után, 8: B1/2 transzformáns 2 átoltás után, 9: negatív kontroll.

B: Az *ftr*-specifikus primerekkel kapott amplifikációs mintázat. 1: pUC Mix marker, 2: vad típusú törzs, 3: B1/1 transzformáns, 4: B1/1 transzformáns 1 átoltás után, 5: B1/2 transzformáns, 6: B1/2 transzformáns 1 átoltás után, 7 B1/2 transzformáns 2 átoltás után, 8: negatív kontroll.

A 18. ábrán a vad típusú és két transzformáns *B. lamprospora* izolátum sporangiospóráiból történő *hph*-specifikus primerekkel kapott amplifikációs mintázat látható. A *hph* fragmentum mennyiségének becslésére párhuzamosan felszaporítottuk az összes izolátumból az egy kópiában megtalálható 601 bp hosszúságú részleges *ftr1* gént is azonos mennyiségű sporangiospórából kiindulva. A 2 transzformáns esetén az átoltások számának növekedésével egyre csökkent a *hph*-specifikus primerekkel kapott amplifikációs termék mennyisége, míg az *ftr*-specifikus primerekkel kapott termék mennyisége állandó volt.

A járomspórás gombák genetikai analízise során az egyik legnagyobb problémát az okozza, hogy a PEG-mediált transzformációval, vagy elektroporálással bejuttatott

transzformáló DNS plazmidokat extrakromoszómális elemként tartják fenn azonosítható replikációs origó, vagy autonóm replikatív elem hiányában is. A bevitt DNS szelektív hiányában gyorsan elvész a transzformánsok mitótikus instabilitását nyomás eredményezve. Habár az integráció kikényszeríthető a kromoszómális targettel homológ szakaszokat tartalmazó lineáris plazmidok alkalmazásával, a transzformációs gyakoriság viszonylag alacsony. Az ATMT módszer segítségével homológ és heterológ szekvenciák is integrálhatók a járomspórás gombasejtek genomjába, azonban heterológ szakaszok esetében az így elért integráció sem bizonyult stabilnak. MICHIELSE és mtsi. (2004) Rh. oryzae ATMT transzformálásakor a pyr4 auxotróf markeren kívül egy domináns szelekciós markert, az A. nidulans acetamid hasznosításért felelős amdS génjét is felhasználták. Sem a PEG-mediált, sem az ATMT módszer használatakor nem kaptak azonban acetamidon növekedni képes transzformáns telepeket. A különböző kísérletek során csak az ATMT és a pyr4 auxotróf szelekciós marker kombinálása eredményezett integratív Rh. oryzae transzformánsokat. Az ATMT által létrejött sikeres integráció egyik lehetséges magyarázata az lehet, hogy nem csupasz DNS-sel, hanem egy DNS-fehérje komplex-szel történt a transzformáció. A lineáris egyszálú T-DNS-hez ugyanis hozzákapcsolódnak a VirD2 és VirE2 DNS-kötő fehérjék, melyek meggátolják a kettősszálú cirkuláris molekulák kialakulását. A VirD2 fehérje jelenléte előnyös az integráció szempontjából is, mivel ennek a fehérjének szerepe van a DNS javításában (BAKO és mtsi. 2003). Ráadásul az egyszálú DNS jobb szubsztrátja az integrációnak.

Járomspórás gombákban feltételezhető egy specifikus genomvédő mechanizmus, amely átrendeződések és deléciók révén eliminálja az exogén DNS-t. Korábbi tanulmányok szintén felvetették ennek a meglétét (OBRAZTSOVA és mtsi. 2003, MONFORT és mtsi. 2003, MICHIELSE és mtsi. 2004). OBRAZTSOVA és mtsi. (2003) *P. blakesleeanus* transzformációjakor azt tapasztalták, hogy az exogén DNS nem csupán eliminálódik a genom védekező mechanizmusai által, hanem az a stresszhez hasonló állapot kialakulását okozza a sejtekben, ami a mutációk számának növekedéséhez, majd végeredményben a sejt halálához vezet. Eredményeink azt sugallják, hogy ez a mechanizmus a Mucorales rendbe tartozó gombák általános sajátsága, azonban különböző hatékonysággal működhet az egyes fajokban. A bejuttatott transzformáló DNS eltérő stabilitása *Mucor, Rhizomucor* és *Rhizopus* fajok esetén ezen mechanizmus hatékonyságának különbözőségét jelzi.

MICHIELSE és mtsi. (2004) arra a megállapításra jutottak, hogy járomspórás gombák stabil, integratív transzformációja csak endogén vagy rokon DNS bevitelével érhető el. Sikeres integráció esetén is gyakran megfigyelték a T-DNS csonkolását: a T-DNS-ben lévő szükségtelen szekvenciák rekombináció útján kivágódtak. A transzformáló DNS csonkolódását, kisebb-nagyobb delécióját és átrendeződését gyakran megfigyelték a PEGmediált transzformáció, az elektroporáció és biolisztikus módszerek alkalmazásakor is. Ennek hátterében szintén a genomvédő mechanizmust sejtik, ami felismeri és eltávolítja a bejuttatott DNS-t, a genom integritásának védelme érdekében (OBRAZTSOVA és mtsi. 2003). Hasonló mechanizmusokat írtak le néhány más gombánál is: ilyen a RIP (Repeat-Induced Point mutation) és a "quelling" Neurospora crassa-nál (CAMBARERI és mtsi. 1991; ROMANO és MACINO 1992), a MIP (Methylation Induced Premeiotically) Ascobolus immersus-nál (RHOUNIM és mtsi. 1992) és a transzkripciós gén csendesítés Phytophtora infestans esetében (VAN WEST és mtsi. 1999). Mivel járomspórás gombákban az exogén DNS-t kezelő mechanizmus molekuláris háttere még nem ismert, további vizsgálatok szükségesek ennek megerősítésére vagy cáfolására. Mindenesetre elmondható, hogy az ATMT az eddigi módszerekhez képest előrelépést jelent, mivel segítségével stabil, integratív transzformánsok nyerhetők (MICHIELSE és mtsi. 2004), azonban a módszer alkalmazhatóságát korlátozza, hogy a genomot védő mechanizmus következtében a transzformáló DNS integrációja csak endogén gének esetén sikeres.



19. ábra. A pNYI9 és a pNYI10 plazmidok térképe

A közeljövőben további transzformációs kísérleteket tervezünk, melyekben a *M. circinelloides leuA* és *pyrG* kettős auxotróf törzsét (MS12) fogjuk használni. Auxotrófián alapuló szelekciós rendszer alkalmazásával ATMT módszerrel a bejuttatott endogén és exogén gének stabilitását szeretnénk vizsgálni. A transzformációs kísérletekhez már elkészítettük az *A. tumefaciens* Ti-plazmidján alapuló, az endogén *pyrG* gént tartalmazó

vektort (pNYI9), ezt *M. circinelloides* MS12 törzsébe juttatva stabil, integratív transzformánsok létrehozása a célunk. A pNYI10 vektor a *pyrG* kazetta mellett a *M. circinelloides gpd1* promóter régiója által vezérelt *gfp* gént is tartalmazza (19. ábra). Ezzel a vektorral párhuzamosan transzformálva az MS12 törzset, a transzformálás és az integráció utáni folyamatokat – mint például az exogén *gfp* eliminálása – szeretnénk majd tanulmányozni.

A transzformációs kísérletek összefoglalásaként elmondhatjuk, hogy járomspórás gombák esetén nagyon nehezen érhető el a transzformáló DNS integrálása a gomba genomjába, illetve az esetlegesen integrálódott DNS stabilitása sok esetben nem kielégítő. Más fonalas gombák – pl. *A. nidulans* és *N. crassa* – esetén a transzformáció leggyakoribb következménye a recipiens sejt genomjának homológ vagy akár heterológ helyeire történő integráció. Aszkuszos gombák esetén a transzformáló DNS homológ hellyel történő génkonverziója szintén megvalósítható (FINCHAM 1989). A genomtól függetlenül replikálódó autonóm plazmidok fenntartása a sejtekben azonban nehezen kivitelezhető autonóm replikációt biztosító (ARS) elemek alkalmazása ellenére is (BALLANCE és TURNER 1985). Ezzel szemben járomspórás gombák esetén a transzformáló plazmidok autonóm replikálódó módon történő fenntartása az elsődlegesen preferált forma (IBRAHIM és SKORY 2006). A szabadon replikálódó plazmidok hasznosak pl. a kópiaszám hatásának vizsgálatakor vagy heterológ fehérjék termeltetésekor. Teljesen alkalmatlanok azonban olyan vizsgálatokban, amikor a genomi DNS célzott elrontása, illetve a génkiütés következményeinek vizsgálata a cél.

Ez idáig egyetlen publikáció létezik, amely sikeres génkiütésről számol be járomspórás gombákban. NAVARRO és mtsi. (2001) olyan vektort készítettek, amely a kiütni kívánt gén (*crgA*) upstream és downstream régióit tartalmazta a *leuA* szelekciós markert szegélyezve. Leucin auxotróf *M. circinelloides* transzformálásakor néhány transzformánsnál a genomi *crgA* gén homológ rekombinációval kicserélődött a *crgA* promóter és terminális régiójával övezett *leuA* génre, így *crgA*⁻ null-mutáns leucin prototróf transzformánsok képződtek. A transzformációs gyakoriság alacsony volt, a 28 transzformánsból mindössze 8 izolátum bizonyult stabilnak. Felénél valóban génkonverzió történt, felénél azonban ektopikus helyen vagy a *leuA* lókuszban játszódott le az integráció. Elmondhatjuk tehát, hogy esetenként megtörténhet a transzformáló DNS integrációja a járomspórás gombák genomjába, ez mégis ritkán következik be és gyakran a transzformáló

6.4.3. Auxotróf markeren alapuló szelekciós rendszer kidolgozása R. pusillus esetén

Kísérleteink révén arra a következtetésre jutottunk, hogy a bakteriális drogrezisztencia génekre épülő szelekció a járomspórás gombák genomvédő mechanizmusának következtében nem használható stabil, integratív transzformánsok előállítására. Célszerűnek tűnt tehát egy, a transzformációs rendszer alapjául szolgáló auxotróf markeren alapuló szelekciós rendszer kidolgozása. A *M. circinelloides* leucin és uracil auxotróf törzse megtalálható a tanszéki törzsgyűjteményben, *R. pusillus* és *R. miehei* törzseknél azonban nem állt rendelkezésünkre auxotróf mutáns törzs. Ezért célul tűztük ki egy, a későbbiekben a transzformációs rendszer alapjául szolgáló orotidin-5'-monofoszfát (OMP) dekarboxilázt kódoló *pyr4*⁻ mutáns *R. pusillus* törzs létrehozását.

A pirimidin bioszintézis egyik utolsó lépését katalizáló OMP-dekarboxiláz az OMP-t uridin-5'-monofoszfáttá alakítja, ami kiindulópontja az uracil és timin nukleotidok szintézisének. Az enzimet kódoló gén mutációja következtében a gomba nem képes a növekedéséhez szükséges uracil előállítására, így minimál táptalajon csak uracil hozzáadásával képes növekedni. Az uracil auxotróf törzs működő OMP-dekarboxilázt kódoló génnel történő transzformálásakor azonban a hibás gén komplementálódik, így a transzformánsok minimál táptalajon is növekedésre képesek.

Járomspórás gombák közül *M. circinelloides, Rh. oryzae* és *M. alpina* esetén állítottak elő uracil auxotróf törzseket. A mutációk kialakulását UV sugárzással (HORIUCHI és mtsi. 1995) vagy kémiai mutagenezissel (BENITO és mtsi. 1992, SKORY 2002, MICHIELSE és mtsi. 2004, TAKENO és mtsi. 2004a) érték el. *R. pusillus* esetén szintén UV mutagenezissel hoztak létre egy α -izopropilmalát izomeráz génben defektes leucin auxotróf törzset (WADA és mtsi. 1996). Mind az UV mutagenezis, mind a mutagén anyagokkal (N-metil-N-nitro-N-nitrozoguanidin) történő kezelés pontmutációk kialakulását idézte elő, egy esetben tapasztaltak csupán egy 54 bázispárnyi deléciót a *pyr4* génben (MICHIELSE és mtsi. 2004).

OMP-dekarboxiláz mutánsok izolálására az 5-fluoro-orotsavon (FOA) alapuló pozitív szelekciós módszert alkalmazzák (BOEKE és mtsi. 1984). A FOA toxikus az uracil prototróf sejtek számára, mivel működő OMP-dekarboxiláz enzimükkel a FOA-t 5-fluorouracillá alakítják át. Az 5-fluoro-uracil egy pirimidin analóg, amely képes a DNS-be és az RNS-be épülni, ezen kívül az 5-fluoro-uracil metabolitja a fluoro-deoxiuridin-monofoszfát a timidilát-szintáz gátlásán keresztül gátolja a DNS szintézist. Ennek következtében az uracil prototróf sejtek nem képesek FOA tartalmú táptalajon növekedni. Az OMP-dekarboxilázt kódoló *pyr4* génben defektes sejtek viszont nem képesek a FOA-t átalakítani, ezáltal a FOA-rezisztens sejtek növekedni tudnak. Ehhez azonban uracil hozzáadását is igénylik. OMP-dekarboxiláz mutánsokat számos gombából izoláltak a FOA-n alapuló pozitív szelekció segítségével, illetve a megfelelő OMP-dekarboxilázt kódoló gént sikeresen alkalmazták különböző gombák transzformációjakor szelekciós markerként homológ és heterológ rendszerek esetén.

Kísérleteink során először mi is UV mutagenezis hatására kialakuló uracil auxotróf törzsek FOA-n történő pozitív szelekciójával próbálkoztunk, azonban a szubletális dózisban alkalmazott UV sugárzás nem eredményezett mutáns telepeket. A kísérletekkel párhuzamosan deléciós kazettákat is létrehoztunk, amellyel célunk a *R. pusillus* genomjában megtalálható *pyr4* gén irányított transzformációval történő elrontása volt.

Az R. pusillus OMP-dekarboxilázt kódoló pyr4 génjének, illetve határoló régióinak szekvenciája az NCBI adatbázisban megtalálható (NCBI azonosító: AB019045). Az ismert szekvencia alapján specifikus primereket terveztünk a teljes pyr4 kazetta izolálásához, melyet két lépésben hajtottunk végre. Először az 5' promóter régióra tervezett PYR1 és a kódoló részre írt PYR2 primerekkel felszaporítottuk a génkazetta 1927 bp-nyi szakaszát. A PYR1 primer PstI restrikciós enzim hasítóhelyét tartalmazta, így a PCR-ral felszaporított fragmentum PstI, illetve a pBluescript SK+ vektor PstI és EcoRV restrikciós enzimekkel történő emésztése után a részleges pyr4 génkazettát a linearizált pBluescript SK+ vektorba klónoztuk. Ezután a kódoló részre írt, a PYR2 primerrel átfedő, de fordított irányú PYR3 primerrel és a 3' terminális régióra tervezett PYR4 primerrel felszaporítottuk a génkazetta maradék 1459 bp hosszúságú szakaszát. A primerek EcoRI illetve XhoI hasító helyeket tartalmaztak, a PCR-ral felszaporított fragmentum és a részleges pyr4 génkazettát tartalmazó pBluescript SK+ vektor EcoRI és XhoI restrikciós enzimekkel történő emésztése után a *pyr4* génkazetta másik részét is beépítettük. A PYR2 és PYR3 primerek tartalmazták az EcoRI restrikciós enzim felismerő helyét, így a két szakasz EcoRI enzimmel történő emésztése majd ligálása után helyreállt a kódoló rész nukleotid sorrendje. A teljes pyr4 gént és határoló régióit tartalmazó vektort pNYI11 plazmidnak neveztük el (20. ábra).

Létrehoztuk a *pyr4* kazetta mutáns változatát is, ekkor olyan primereket (PYR1 és PYR5) használtunk, melyek 1927 bp helyett csak egy rövidebb szakaszt (1571 bp) eredményeznek. Ez a rövidebb fragmentum nem tartalmazta a *pyr4* gén utolsó 34 aminosavat kódoló 102 bp hosszúságú és a terminális rész 254 bp hosszúságú szakaszát. A PCR-ral felszaporított 1571 bp-nyi fragmentum *Pst*I, illetve a pBluescript SK+ vektor *Pst*I és *Eco*RV restrikciós enzimekkel történő emésztése után a hiányos *pyr4* génkazettát a

linearizált pBluescript SK+ vektorba klónoztuk. A génkazetta másik felét az előzőekben leírt módon amplifikáltuk a PYR3 és PYR4 primerekkel, a génkazetta két részletének összeillesztését szintén *Eco*RI enzimes emésztéssel hajtottuk végre. A hiányos *pyr4* gént és határoló régióit tartalmazó vektort pNYI12 plazmidnak neveztük el (20. ábra).



20. ábra: A pNYI11 és a pNYI12 plazmidok térképe. A pNYI11 plazmidon fekete téglalap jelzi azt a részt, amely a pNYI12 plazmidból hiányzik.

A mutáns pyr4 gént tartalmazó fragmentummal irányított transzformációt végeztünk. A deletált részt szegélyező, nagy kiterjedésű homológ szakaszok lehetővé teszik a mutáns és a R. pusillus genomjában megtalálható vad típusú pyr4 allél közötti kettős rekombináció lejátszódását, ami a vad típusú gén mutáns változatra történő kicserélődését eredményezi. Az irányított transzformációt hagyományos PEG-mediált transzformációs módszerrel végeztük. A pNYI12 plazmidból kiindulva PstI és XhoI restrikciós enzimek segítségével kivágtuk a 3030 bp-nyi mutáns pyr4 génkazettát, ezzel párhuzamosan a pBluescript SK+ vektort VspI restrikciós enzimmel két részre hasítottuk, így a pBluescript SK+ vektorral (2961 bp) szinte megegyező méretű pyr4 kazettát gélelektroforézissel el tudtuk különíteni. A tisztított lineáris fragmentumokkal R. pusillus protoplasztokat transzformáltunk. Az uracillal kiegészített táptalajon megjelenő hifák mutáns és vad típusú pyr4 gént hordozó magok keverékét tartalmazták, ezért a FOA-n alapuló szelekció alkalmazása előtt szükséges volt a mutánsok dúsítása és homokariotikus spórák előállítása. A nem-szelektív körülmények közötti sporuláció lehetővé tette az allélok szegregációját, ezáltal olyan sporangiospórák keletkezését, melyek csak mutáns pyr4 gént hordozó magokat tartalmaztak. Az uracillal kiegészített táptalajon képződött sporangiospórákat uracillal és FOA-val kiegészített YNB táptalajra szélesztettük, amelyen néhány nap után FOA-rezisztens telepeket izoláltunk. A 21. ábrán az izolált uracil auxotróf telepek növekedése látható. Míg a vad típusú *R. pusillus* izolátum (C) YNB minimál táptalajon és uracillal kiegészített YNB táptalajon is gyors növekedésre képes, uracillal és FOA-val kiegészített YNB táptalajon a növekedése gátolt. Az uracil auxotróf *R. pusillus* izolátumok (A és B) azonban nem képesek minimál táptalajon növekedni, míg uracillal illetve uracillal és FOA-val kiegészített YNB táptalajon kompakt telepeket képeznek.



21. ábra: *R. pusillus* vad típusú (C) és uracil auxotróf (A, B) törzseinek növekedése különböző táptalajokon.
a: YNB táptalaj, b: 0,5 mg/ml uracillal kiegészített YNB táptalaj, c: 0,5 mg/ml uracillal és 1,5 mg/ml FOA-val kiegészített YNB táptalaj.

Az izolált telepek genomi DNS-éből PYR6 és PYR7 primerekkel felszaporítottuk a *pyr4* kazetta kódoló részt is tartalmazó szakaszát, ami a hiányos részt is tartalmazta. Az integrálni kívánt mutáns *pyr4* gén helyett azonban az összes törzs az eredeti méretű *pyr4* fragmentumot hordozta. A PCR-ral felszaporított fragmentumok szekvencia analízise azt mutatta, hogy minden izolátum esetében csupán pontmutáció történt a *pyr4* génben, és nem a rekombinációval megvalósuló géncsere játszódott le. A mutációs pontok azonosítása érdekében genetikai analízist végeztünk. Háromféle mutációt figyeltünk meg: leggyakrabban bázis inszerció és bázis csere történt, egy esetben pedig bázis kiesést tapasztaltunk. A 9 transzformáns izolátum közül négyben ugyanott volt pontmutáció: a gén

824. pozíciójában G \rightarrow T bázis csere történt, ami a 252. aminosav pozícióban glicin helyett egy stop kodon létrejöttét, így az eredetinél rövidebb, funkcióképtelen fehérje kialakulását eredményezte. Több transzformáns izolátumnál is tapasztaltunk bázis inszerciót, a plusz nukleotidok beépülése a leolvasási keret eltolódását, ezáltal az aminosav szekvencia drasztikus megváltozását eredményezte. Az R18U2 izolátumnál tapasztalt bázis deléció szintén a leolvasási keret eltolódását eredményezte. Az R18U6 izolátumnál a gén 250. pozíciójában lévő G \rightarrow A bázis csere az első intron konszenzus szekvenciájában történt, így az intron kivágódásának elmaradása szintén funkcióképtelen fehérje kialakulását okozta.

A transzformációs kísérletek során létrejött uracil auxotróf izolátumok kialakulását több tényező is eredményezhette. Egyik lehetséges magyarázat, hogy a transzformáció során lejátszódó rekombinációs események nem eredményezték ugyan a bejuttatott DNS integrálódását, azonban megnövelték a pontmutációk kialakulásának esélyét. Másik magyarázat az lehet, hogy az esetlegesen integrálódott DNS szakasz а javítómechanizmusok hatására kivágódott, azonban a javítása nem volt tökéletes, néhány pontban mutációk maradtak a génben. Harmadik magyarázat pedig az, hogy spontán mutáció történt, a mutáns magok pedig a többszöri sporulációs ciklus és a mutánsdúsítás során sikeresen kiszelektálódtak. Ennek némileg ellentmond, hogy UV mutagenezis során nem kaptunk auxotróf mutáns telepeket. Korábban ismertettük az integratív transzformálás nehézségeit, így nem meglepő, hogy a pyr4 gén transzformációval történő elrontása nem vezetett eredményre. Rh. oryzae-nél szintén nem sikerült a mutáns pyr4 allél homológ rekombinációval történő integrálása a genomi pyr4 lókuszba (MICHIELSE és mtsi. 2004).

A FOA alapú pozitív szelekció csak az uracil bioszintézisben defektes izolátumok izolálását teszi lehetővé. FOA-rezisztens fenotípust azonban nem csak az OMP-dekarboxilázt kódoló *pyr4* gén mutációja, hanem az orotát foszforibozil transzferázt kódoló génben történő mutáció is okozhat. TAKENO és mtsi. (2004a) MNNG hatására kialakuló *M. alpina* uracil auxotróf törzsek FOA-n történő pozitív szelekciójakor csak az orotát foszforibozil transzferázt kódoló *ura5* génben defektes törzsek megjelenését figyelték meg. Kísérletünkben az OMP-dekarboxilázt kódoló *pyr4* gént tartalmazó cirkuláris plazmiddal történő transzformálás komplementálta a mutáns *pyr4* gént, amely transzformáns telepek megjelenését eredményezte uracil mentes YNB táptalajon és egyben igazolta, hogy a mutáció az uracil anyagcsere enzimei közül az általunk vizsgált OMP-dekarboxilázt kódoló *pyr4* génben történt. Az izolált uracil auxotróf *R. pusillus* törzsek többszöri átoltás után is stabilak voltak, ezek közül egyet kiválasztottunk és azzal dolgoztunk a későbbi kísérletek során (R18U3).

6.5. Az izolált *ftr1* génre alapozott transzformáló vektorok készítése *ftr1*⁻ deléciós mutáns törzsek létrehozásához

A funkcionális genomika egyik fő célja a vizsgált fehérjék funkciójának megállapítása, illetve feltételezett szerepének igazolása. Ennek egyik lehetséges módja a fehérjét kódoló gén specifikus elrontása célzott mutagenezissel, majd a mutáns fenotípus vizsgálata. A feltételezett virulencia faktor vizsgálatakor összehasonlítják a gomba fertőzőképességét az adott faktor megléte, illetve hiánya esetén. Az azonosított gén kifejeződésének vizsgálata patogén és nem patogén feltételek között szintén számos információval szolgálhat.

Munkánk hosszú távú célja az *ftr1* gén által kódolt nagy-affinitású vaspermeáz *R*. *pusillus* patogenitásában betöltött szerepének meghatározása, amely elősegítheti a járomspórás gombák által okozott fertőzések hátterében zajló biológiai folyamatokat megértését. A nagy-affinitású vaspermeáz szerepének tisztázásához *ftr1*⁻ deléciós mutáns törzsek létrehozását terveztük. Az *ftr1* gén deléciójához az izolált *ftr1* génre alapozott transzformáló vektorokat készítettünk, amelyek a *R. pusillus ftr1* génbe inszertálva tartalmazták a *pyr4* szelekciós markert (22. ábra).



22. ábra. Az *ftr1* gén elrontásához épített pNYI13 vektor és az abból kihasított *ftr1'-pyr4-ftr1'* lineáris fragmentum, illetve a pNYI14 vektor térképe.

A deléciós kazettákat a pNYI11 plazmid (20. ábra) felhasználásával készítettük el. Az FTR1-FTR2 primerekkel felszaporított, az *ftr1* gén elejét és promóter régióját lefedő fragmentumot a pNYI11 plazmidba a *pyr4* kazetta elé építettük *Bam*HI és *Pst*I restrikciós enzimek segítségével. Az FTR3-FTR4 primerekkel felszaporított, az *ftr1* gén végét és terminális régióját lefedő fragmentumot pedig a *pyr4* kazetta mögé építettük *Xho*I és *Apa*I restrikciós enzimek segítségével (pNYI13). Az *ftr1'-pyr4-ftr1'* kazettát ATMT-hez alkalmas bináris vektorba is áthelyeztük (pNYI14). Ehhez *Spe*I és *Kpn*I restrikciós enzimek segítségével a teljes deléciós kazettát kihasítottuk a PNYI13 plazmidból és olyan pNYI7 vektorba helyeztük, amelyből előzetesen eltávolítottuk a *hph* kazettát. A transzformációs rendszerek alapjául az endogén *pyr4* génen alapuló szelekciós rendszer, illetve az általunk létrehozott *pyr4* mutáns *R. pusillus* törzs szolgált (R18U3).

A pNYI13 vektorból *SpeI* és *ApaI* restrikciós enzimekkel kihasítottuk a deléciós kazettát, majd a lineáris fragmentumot PEG-mediált transzformációval juttattuk be a R18U3 törzsbe. A pNYI14 vektort *A. tumefaciens* GV3101 törzsébe elektroporáltuk, majd a vektort hordozó törzzsel transzformáltuk a R18U3 törzset. Kísérleteink során a PEG-mediált transzformáció alkalmazásakor nem kaptunk transzformáns telepeket, ugyanakkor az ATMT módszer alkalmazásakor néhány uracil prototróf telepet izoláltunk a szelektív táptalajon. A transzformánsokból szelektív körülmények közötti nevelés után genomi DNS-t izoláltunk, majd PCR és hibridizációs analízist végeztünk az integráció igazolása érdekében. Az *ftr1* gén kiütésének bizonyítása további vizsgálatokat igényel, ezek a kísérletek jelenleg is folyamatban vannak. Mindenesetre elmondhatjuk, hogy az ATMT módszert sikeresen alkalmaztuk *R. pusillus* esetében is.

A zigomikózis vizsgálatára különböző állati modelleket alkalmaznak, a kísérletek a gombák patogeneziséről, a diagnosztikai lehetőségekről, a betegség kezeléséről és megelőzéséről szolgálhatnak hasznos információkkal (KAMEI 2000). Az *ftr1*⁻ deléciós mutáns *R. pusillus* törzs virulenciájának vizsgálata szisztémás fertőzést modellező egér kísérletekkel oldható meg. A mutáns törzs virulenciájának csökkenése vagy teljes megszűnése az *ftr1* gén által kódolt nagy-affinitású vaspermeáz szerepét igazolná a szisztémás fertőzés kiváltásában.

Munkánkkal párhuzamosan jelentek meg azok a publikációk, amelyben azonosították a *Rh. oryzae* nagy-affinitású vaspermeázt kódoló génjét (FU és mtsi. 2004), és vizsgálták az általa kódolt transzport fehérje virulenciában betöltött szerepét (LIN és mtsi. 2007). Az RNS interferencia módszerét használva gátolták az *ftr1* gén kifejeződését, ezáltal gátolták a nagy-affinitású vaspermeázt a vastranszportban játszott funkciójának betöltésében. Az *ftr1*-expresszióban gátolt transzformáns törzs a vad típusúhoz képest csökkent virulenciát mutatott disszeminált fertőzést modellező diabetikus ketoacidózisban

szenvedő egerek fertőzésekor. Fontosnak tartjuk megjegyezni, hogy *Rh. oryzae* esetén nem vezettek eredményre az *ftr1* gén célzott elrontására irányuló kísérletek. Ráadásul egy bizonyos idő után az RNSi-transzformáns törzsek virulenciája is helyreállt, mivel az episzómálisan fenntartott RNSi plazmidok elvesztek a transzformáns törzsekből.

Miután bebizonyosodott, hogy a szérum emelt szintű vaskoncentrációja közvetlenül hozzájárul a járomspórás gombák virulenciájához, a szervezet vasmentesítésére olyan vaskelátoló vegyületeket kezdtek használni, amelyek a deferoxaminnal ellentétben nem képesek vasionokat biztosítani a járomspórás gombák számára. Nemrég jelent meg két publikáció, amelyekben a deferiprone és a deferaszirox zigomikózisok elleni lehetséges terápiás alkalmazását vizsgálták (IBRAHIM és mtsi. 2006, IBRAHIM és mtsi. 2007). Miután a vasfelvételi mechanizmusok részletes tanulmányozása igazolta, hogy mind a sziderofórok, mind a nagy affinitású vaspermeáz, mind az ezek kifejeződését reguláló szabályozó elemek jelentős szerepet tölthetnek be a patogén gombák virulenciájában, a vastranszport rendszerek működésének gátlásával vagy éppen azok kihasználásával lehetséges lenne új gombaellenes terápiák kifejlesztése. In vivo egérkísérletek során mind a deferiprone, mind a deferaszirox terápia hatékony volt a járomspórás gombák okozta fertőzésekkel szemben. A deferaszirox már kis koncentrációban alkalmazva fungicid hatást mutatott 28 klinikai járomspórás gomba izolátum ellen. Az *ftr1* gén promóterét *gfp* génnel fuzionálták, annak érdekében, hogy vizsgálni tudják a fehérje expresszióban végbemenő változásokat különböző feltételek között. Ennek segítségével igazolták, hogy a deferaszirox a szervezetben található szabad vasionok megkötése által gátolja a zigomikózisok döntő többségét okozó Rhizopus növekedését a szervezetben. Állatkísérletekben a deferaszirox a zigomikózisok jelenlegi terápiájában alkalmazott amfotericin B-hez hasonló hatékonyságot mutatott, használata megnövelte a cukorbeteg és neutropéniás egerek túlélési arányát. Amfotericin B-vel kombinálya szinergisztikus hatást mutatott, ez különösen az agyi szövetekben volt szembetűnő, ahol a kombinált alkalmazás hatására jelentősen csökkent a hifák burjánzása a monoterápiákhoz képest. Mivel az amfotericin B nem képes a vér-agy gáton átjutni, a főként rhinocerebrális megbetegedést okozó járomspórás gombák ellen a deferaszirox és az amfotericin B kombinált alkalmazása kiemelkedő jelentőségű lehet. A deferaszirox kezelés ráadásul a gazdaszervezet védekező mechanizmusainak működését is fokozta. A vaskelátoló vegyületek alkalmazása tehát egy ígéretes, új terápiás stratégiát jelenthet a járomspórás gombafertőzések kezelésére.

A különböző fonalas gomba genomok szekvenálása gyors ütemben halad, így a szekvencia adatok hónapról-hónapra növekvő számban érhetők el a nukleotid adatbázisokban (EMBL/GenBank). Jelenleg 3 járomspórás gomba, a *P. blakesleeanus* (http://genome.jgi-psf.org/Phybl1/Phybl1.home.html), a *Rh. oryzae* (http://www. broad.mit.edu/annotation/genome/rhizopus_oryzae/Home.html) és a *M. circinelloides* (http://mucorgen.um.es/) teljes genom szekvenciája ismert. A különböző gének szekvenciájának ismerete rendkívül hasznos a genetikai és molekuláris vizsgálatok során. A genom szekvenciák, illetve a rekombinációs és replikációs mechanizmusok ismeretében felgyorsulhatnak a patogenitás genetikai hátterét feltérképező molekuláris vizsgálatok is.

A vasfelvételi mechanizmusok részletes tanulmányozása számos gombafaj esetén igazolta, hogy mind a sziderofórok, mind a nagy affinitású vaspermeáz/oxidáz rendszer, mind az ezek kifejeződését reguláló szabályozó elemek jelentős szerepet tölthetnek be a patogén gombák virulenciájában. A különböző vastranszport rendszerek tanulmányozása nagyban hozzájárulhat ahhoz, hogy megértsük a járomspórás gombák patogenitásának hátterét, illetve a vastranszport rendszerekre épülő terápiás és diagnosztikai módszerek új fejezetet nyithatnak a járomspórás gombák által okozott fertőzések kezelésében is.

7. Összefoglalás

A járomspórás gombák opportunista patogénként immunszuppreszált betegeknél heves lefolyású és gyakran halálos kimenetelű fertőzéseket okozhatnak. Az elmúlt évek felismerése, hogy a zigomikózis kialakulásának kockázata jelentősen megnő tartósan magas vas szérumszint esetén, illetve a vasat komplexként megkötő egyes gyógyszerekkel (pl. deferoxamin) kezelt betegeknél, mivel a gombák képesek felvenni és hasznosítani a deferoxamin által megkötött vas ionokat. A klinikai és kísérleti megfigyelések során egyértelművé vált, hogy járomspórás gombák esetében a vas felvételében szerepet játszó transzport fehérjék fontos virulencia faktoroknak tekinthetők. Munkánk célja a vas felvételét és transzportját biztosító fehérjéket kódoló gének azonosítása volt. Mivel korábbi kísérletek a nagy-affinitású vastranszport rendszer szerepét tekintik elsődlegesen fontosnak a virulenciában, vizsgálataink főként e gén részletesebb analízisére irányultak.

Célul tűztük ki:

- A nagy-affinitású vaspermeázt kódoló *ftr1* génnel homológ genetikai elemek azonosítását, klónozását és összehasonlítását különböző járomspórás gombákban.
- Az *ftr1* génre alapozott, gyors és rutinszerűen alkalmazható diagnosztikai módszer kidolgozását.
- A patogenitás hátterének vizsgálatához szükséges genetikai transzformációt lehetővé tevő szelekciós és transzformációs rendszerek kidolgozását, valamint az ATMT alkalmazhatóságának vizsgálatát járomspórás gombákban.
- Az izolált *ftr1* génre alapozott transzformáló vektorok alkalmazásával *ftr1*⁻ deléciós mutáns törzsek létrehozását.

Munkánk során felszaporítottuk, klónoztuk és meghatároztuk 5 különböző nemzetségbe (*Rhizopus, Mucor, Backusella, Rhizomucor* és *Syncephalastrum*) tartozó 26 járomspórás gomba izolátum *ftr1* génjének részleges szekvenciáját. A felszaporított termékek mérete 585 és 740 bázis között változott. Az *ftr1* nukleotid és az azokból származtatott aminosav szekvencia adatokat az EMBL nukleotid szekvencia adatbázisba küldtük el. Az általunk meghatározott nukleotid és az azokból származtatott aminosav szekvenciák alapján filogenetikai elemzést végeztünk. Az általunk készített törzsfák jó egyezést mutattak a 18S és 28S rDNS szekvenciák alapján készített törzsfákkal. Az eredmények alapján indokoltnak látjuk a járomspórás gombák jelenlegi, morfológiai

karaktereken alapuló taxonómiai rendszerének felülvizsgálatát. Igazoltuk a *Rh. schipperae*, egy újonnan leírt termofil faj, és a *Rh. microsporus* var. *rhizopodiformis* közeli rokonságát, egyúttal megerősítettük a *Rh. schipperae* izolátumok különálló fajként való kezelésének szükségét. Eredményeink szintén alátámasztják a *Rh. niveus* külön fajként való kezelésének indokoltságát.

Kidolgoztunk egy diagnosztikai eljárást, amelynek segítségével számos gyakorlati jelentőségű járomspórás gomba megbízhatóan azonosítható. A nagy-affinitású vaspermeázt kódoló ftr1 génszekvenciák összehasonlításakor olyan karakterisztikus szekvencia részleteket azonosítottunk, amely régiókra tervezett primerekkel fajspecifikus amplifikációs termékek nyerhetők. Az általunk kidolgozott módszer alkalmas a Rh. oryzae, a Rh. microsporus var. rhizopodiformis, a Rh. microsporus var. oligosporus, a Rh. schipperae, a Rh. niveus és a Rh. stolonifer törzsek faj szintű elkülönítésére, míg a Rhizomucor, Syncephalastrum és Mucor izolátumok nemzetség szintjén azonosíthatók. A vizsgált fajok elkülönítését PCR-RFLP módszer alkalmazásával is megvalósítottuk: a degenerált primerekkel felszaporított fragmentumok AluI restrikciós enzimmel történő emésztése a különböző fajok esetében karakterisztikus RFLP-mintázatot eredményezett. Az ftr1 génen alapuló specifikus PCR-ral nem megkülönböztethető Mucor fajok PCR-RFLP segítségével három csoportra oszthatók, a R. miehei és R. pusillus fajok pedig faj szinten elkülöníthetők egymástól. A Rh. oryzae és a Rh. stolonifer izolátumok faj alatti szinten is azonosíthatók.

R. miehei és *R. pusillus* fajok esetén meghatároztuk az *ftr1* gének teljes szekvenciáját és szekvencia adatokat nyertünk a gének további, nem kódoló részeiről is. A transzport fehérjét kódoló géneket izoláltuk és jellemeztük. A felderített szekvencia *R. miehei* esetén 2671 bp, *R. pusillus* esetén pedig 2253 bp hosszúságú. A *R. miehei ftr1* gén intronokkal együtt 1270 bp, míg a *R. pusillus ftr1* gén intronokkal együtt 1280 bp hosszúságú. A kódoló szakaszok hossza mindkét *ftr1* génnél 1149 bp, amelyek 382 aminosavból álló fehérjéket határoznak meg. Mindkét génben két intront azonosítottunk. A gének kódoló szekvenciája mellett egy 646 bp (*R. miehei*) és egy 470 bp (*R. pusillus*) hosszúságú terminális régiót is meghatároztunk. A gének promóterében jellegzetes TATA, CAAT és GATA motívumokat, a terminális régióban pedig poliadenilációs szignált azonosítottunk. Az általunk azonosított teljes *ftr1* szekvenciákat szintén az EMBL nukleotid szekvencia adatbázisba küldtük el.

A patogenitás hátterének és a nagy-affinitású vaspermeáz virulenciában betöltött szerepének vizsgálatához különböző szelekciós és transzformációs rendszereket teszteltünk. Kidolgoztunk egy, a járomspórás gombáknál alkalmazható higromicin B rezisztencián alapuló direkt szelekciós módszert. A diklorán és bengálvörös kombinációjával kiegészített YEG táptalaj alkalmas volt a higromicin B rezisztens M. circinelloides transzformánsok izolálására. A bengálvörös és a diklorán nemcsak a telepek méretét és az aeriális hifák termelését csökkentette, hanem megnövelte a gomba higromicin B-vel szembeni érzékenységét is. A higromicin B rezisztencián alapuló szelekció alkalmazásával megvalósítottuk a M. circinelloides A. tumefaciens által közvetített transzformációját (ATMT). Az ATMT eljárását optimalizáltuk, majd a módszert alkalmaztuk más járomspórás gombákra is (B. lamprospora, R. pusillus). Az ATMT során nyert transzformánsok esetében PCR analízissel igazoltuk a bevitt gének jelenlétét a transzformánsok genomi DNS-ében, hibridizációs analízissel pedig igazoltuk, hogy a T-DNS a transzformánsok genomjába egy kópiában és véletlenszerű helyekre épült be. A. tumefaciens Ti plazmidján alapuló vektorkonstrukciókat hoztunk létre, amelyekben a transzformálni kívánt gének kifejeződését M. circinelloides gpd1 promóter és terminális régiói biztosították. A szelekciót biztosító hph gén mellett a gfp gént is beépítettük a pNYI8 vektorba, amelynek expressziója lehetővé tette a transzformáció direkt bizonyítását. A higromicin B rezisztens transzformánsok által mutatott intenzív fluoreszcencia igazolta, hogy a M. circinelloides gpd1 gén szabályozó régiói képesek a bejuttatott heterológ gén transzkripcióját biztosítani.

A közeljövőben tervezzük az uracil és leucin auxotróf *M. circinelloides* ATMT transzformálásának megvalósítását is, célunk a bejuttatott endogén és exogén gének stabilitásának vizsgálata, illetve a transzformálás és az integráció utáni folyamatok tanulmányozása. A transzformációs kísérletekhez elkészítettük az *A. tumefaciens* Ti plazmidján alapuló, a *M. circinelloides pyrG* génjét tartalmazó pNYI9, illetve a *pyrG* és *gfp* gént tartalmazó pNYI10 vektorokat.

Kidolgoztunk egy genetikai transzformációt lehetővé tevő uracil auxotrófián alapuló szelekciós rendszert is és létrehoztunk egy *pyr4* mutáns *R. pusillus* törzset. A transzporter enzim patogenitásban betöltött szerepének vizsgálatához az általunk azonosított és izolált *ftr1* gén szekvencia alapján a gén elrontását lehetővé tevő vektorokat állítottunk elő, melyek az *ftr1* génbe inszertálva tartalmazták a szelekciót biztosító *pyr4* marker gént. Az általunk készített deléciós vektorokkal megvalósítottuk a *R. pusillus* ATMT transzformációját.

8. SUMMARY

Zygomycetous fungi have been reported as agents of severe and frequently fatal opportunistic infections in immunocompromised patients. Patients with elevated levels of available serum iron who are treated with the iron chelator deferoxamine (to remedy the iron overload conditions) have an increased susceptibility to invasive zygomycosis in consequence of the efficient iron uptake by the fungal cells. Siderophores and iron-transport proteins have therefore been suggested to play an important role in the fungal virulence because the acquisition of iron in the host organism is a crucial pathogenetic event. The aim of this study was a detailed molecular and functional analysis of genes encoding iron transport proteins in zygomycetous fungi. Based on clinical and experimental observations, one of the iron transport proteins, high-affinity iron permease (*ftr1*), is thought to be critical for the virulence, so our work was mainly focused on the investigation of this gene.

We set the following aims:

- Identification, cloning and comparison of genetic elements in zygomycetous fungi homologous with the high-affinity iron permease gene.
- Elaboration of rapid and routinely applicable species and strain identification methods based on the *ftr1* gene.
- Development of selection and transformation methods, which are essential for the investigation of the genetic background of the fungal pathogenesis. Investigation of the applicability of the *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation (ATMT) method in Zygomycetes.
- Construction of transforming vectors based on the isolated *ftr1* gene and generation of *ftr1*⁻ deleted mutant strains with gene disruption.

In the course of our work, *ftr1* fragments were amplified from twenty-six zygomycetous strains representing five different genera (e.g. *Rhizopus*, *Rhizomucor*, *Syncephalastrum*, *Mucor* and *Backusella*). Degenerated primers were designed on the basis of *Rh. oryzae* and *C. albicans ftr1* gene sequences. The sizes of the amplification products varied between 585 and 740 bp. The nucleotide and the deduced amino acid sequences were determined and all sequence data obtained in the study have been deposited in the EMBL nucleotide sequence database. The nucleotide and the deduced protein sequences of

the amplified *ftr1* fragments were aligned and compared using the Clustal W program and a phylogenetic analysis was carried out. The phylogenetic trees calculated from these sequences were in good agreement with the phylogenies based on 18S and 28S rDNA sequences. Our results supported the need of the revision of the presently used taxonomic system of the Zygomycetes, which based on mainly morphological characters. The close relationship between *Rh. schipperae*, a newly described, thermophilic *Rhizopus* species and *Rh. microsporus* var. *rhizopodiformis* was verified; at the same time the need to handle *Rh. schipperae* as a separate species was confirmed. Our results also supported the need to handle *Rh. niveus* as a representative of a separate species.

An identification method based on PCR amplification of the high-affinity iron permease 1 gene was described. A partial fragment of the *ftr1* gene was used to generate a sequence dataset in order to find characteristic motifs applicable for oligonucleotide design. Species-specific PCR primer pairs were established and amplification methods were tested for the rapid and accurate detection of clinically important Zygomycetes. *Rh. oryzae, Rh. microsporus* var. *rhizopodiformis, Rh. microsporus* var. *oligosporus, Rh. schipperae, Rh. niveus* and *Rh. stolonifer* isolates could be identified at the genus level with this method. All of the species were differentiated by PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) analysis. Amplification products obtained with the degenerated primers were digested with *AluI* restriction enzyme yielding fragment patterns characteristic of the species studied. *Mucor* species undistinguishable with specific PCR could be divided to three subgroups, while *R. miehei* and *R. pusillus* isolates could be distinguished at the species level. Moreover, *Rh. oryzae* and *Rh. stolonifer* isolates could be identified to three subgroups, while *R. miehei* and *R. pusillus* isolates could be distinguished at the species level with this method.

The entire *ftr1* gene in *R. miehei* and *R. pusillus* were identified and the promoter and terminal regions of these genes were also determined. The whole *ftr1* genes have been cloned and analyzed: a 2671 bp long sequence in *R. miehei* and a 2253 bp long sequence in *R. pusillus* was determined. These sequences contain the 1270 and 1280 bp long open reading frames, respectively. Both ORFs encode a 382 amino acid long protein. Besides the coding regions 646 bp (*R. miehei*) and 470 bp (*R. pusillus*) long promoter regions and 755 bp (*R. miehei*) and 503 bp (*R. pusillus*) long terminal regions were determined as well. The whole nucleotide and the deduced amino acid sequences also have been deposited in the EMBL nucleotide sequence database. The codon usage of the *R. miehei* and the *R. pusillus ftr1* genes was also investigated, and we concluded that the two *ftr1* genes are not constitutive genes. GATA elements were identified in the promoter of the genes, which also indicate this establishment.

Different selection and transformation methods were tested for the investigation of the background of the pathogenesis and the role of the high-affinity permease in the fungal virulence. Conditions for a new direct selection system based on hygromycin B resistance have been elaborated. The selective medium supplemented with rose bengal and dichloran was suitable for the isolation of the hygromycin B resistant M. circinelloides transformants. Our experiments revealed that a combination of these compounds not only reduced the colony size and suppressed the production of aerial hyphae in *Mucor* but also increased the sensitivity of the fungus to this antibiotic. The genetic transformation of the zygomycetous fungus M. circinelloides with the ATMT method was worked out using the selection based on hygromycin B resistance. Several factors of a successful transformation were optimized and the method was adapted to other zygomycetous fungi as well (such as B. lamprospora and R. pusillus). The presence of the introduced genes in the genome of the transformants was verified by polymerase chain reaction and Southern hybridization: the latter analyses revealed the single copy integration of the transforming sequence in the host genome. In each transformant, the hygromycin B resistance (hph) gene was integrated in different chromosomal sites. Binary vectors based on the Ti plasmid of the A. tumefaciens were constructed. Transforming plasmids carried the hph and the green fluorescent protein (gfp) genes, both genes were placed under the control of the promoter and terminator regions of the *M. circinelloides gpd1* gene. The expression of the *gfp* gene served direct evidence for the successful transformation. The hyphae of the transformants exhibited intensive fluorescence, indicating that regulator sequences of the M. circinelloides gpd1 gene were able to ensure the transcription of the introduced heterologous gene.

Currently, transformation experiments of a *M. circinelloides* uracil and leucin auxotrophic mutant using ATMT method are proceeding to investigate the possibility of the construction of stable integrative transformants by this method. We are planning the investigation of the stability of the introduced endogenous and exogenous genes and the study of the processes following the transformation and the integration events. Transforming vectors using the Ti plasmid of the *A. tumefaciens* were constructed, in which the *pyrG* gene of *M. circinelloides* and the *gfp* gene were inserted.

A selection method based on uracil auxotrophy was elaborated and uracil auxotrophic *R. pusillus* strains harbouring mutations in the *pyr4* gene were created. Vectors

based on the isolated *ftr1* genes were constructed to investigate the role of the high-affinity iron permease in the virulence of *R. pusillus*. For disruption of the genomic *ftr1* gene, transforming vectors containing the *pyr4* gene previously inserted into the *ftr1* gene were constructed and the *A. tumefaciens* mediated transformation of *R. pusillus* was carried out.

9. IRODALOMJEGYZÉK

- ABUODEH RO, ORBACH MJ, MANDEL MA, DAS A, GALGIANI JN (2000) Genetic transformation of *Coccidioides immitis* facilitated by *Agrobacterium tumefaciens*. J Infect Dis 181: 2106–2110.
- AMEY RC, ATHEY-POLLARD A, BURNS C, MILLS PR, BAILEY A, FOSTER GD (2002) PEGmediated and *Agrobacterium*-mediated transformation in the mycopathogen *Verticillium fungicola*. Mycol Res 106: 4-11.
- ANAYA N AND RONCERO MI (1991) Transformation of a methionine auxotrophic mutant of *Mucor circinelloides* by direct cloning of the corresponding wild type gene. Mol Gen Genet 230: 449–455.
- ANTAL ZS, RASCLE C, FÈVRE M, BRUEL C (2004) Single oligonucleotide nested PCR: a rapid method for the isolation of genes and their flanking regions from expressed sequence tags. Curr Genet 46: 240-246.
- APPEL KF, WOLFF AM, ARNAU J (2004) A multicopy vector system for genetic studies in *Mucor circinelloides* and other zygomycetes. Mol Genet Gen 271(5): 595-602.
- ARDON O, BUSSEY H, PHILPOTT C, WARD D, DAVIS-KAPLAN S, VERRONEAU S, JIANG B, KAPLAN J (2001) Identification of a *Candida albicans* ferrichrome transporter and its characterization by expression in *Saccharomyces cerevisiae*. J Biol Chem 276: 43049-43055.
- ARNAU J, MURILLO FJ, TORRES-MARTINEZ S (1988) Expression of Tn5-derived kanamycin resistance in the fungus *Phycomyces blakesleeanus*. Mol Gen Genet 212: 375–377.
- ARNAU J, JEPSEN LP, STROMAN P (1991) Integrative transformation by homologous recombination in the zygomycete *Mucor circinelloides*. Mol Gen Genet 225: 193–198.
- ARNAU J AND STROMAN P (1993) Gene replacement and ectopic integration in the zygomycete *Mucor circinelloides*. Curr Genet 23: 542–546.
- ARTIS WM, FOUNTAIN JA, DELCHER HK, JONES HE (1982) A mechanism of susceptibility to mucormycosis in diabetic ketoacidosis: transferrin and iron availability. Diabetes 31: 1109-1114.
- ASKWITH C, EIDE D, VAN HO A, BERNARD PS, LI L, DAVIS-KAPLAN S, SIPE DM, KAPLAN J (1994) The *FET3* gene of *S. cerevisiae* encodes a multicopper oxidase required for ferrous iron uptake. Cell 76: 403–410.
- BAKO L, UMEDA M, TIBURCIO AF, SCHELL J, KONCZ C (2003) The VirD2 pilot protein of *Agrobacterium*-transferred DNA interacts with the TATA box-binding protein and a nuclear protein kinase in plants. Proc Natl Acad Sci USA 100: 10108–10113.
- BALLANCE DJ (1990) Transformation systems for filamentous fungi and an overview of fungal gene structure. In: Leong SA and Berka RM (Eds) Molecular Industrial Mycology, Dekker, New York, pp 1-29.
- BALLANCE DJ AND TURNER G (1985) Development of a high-frequency transforming vector for *Aspergillus nidulans*. Gene 36: 321-331.
- BARTSCH S, SCHIMEK C, WÖSTEMEYER J (2002) Microprojectile bombardment as a reliable method for transformation of the mucoralean fungus *Absidia glauca*. Mycoscience 43: 213-217.

- BEGGS JD (1978) Transformation of yeast by a replicating hybrid plasmid. Nature 275: 104-109.
- BENITO EP, DIAZ-MINGUEZ JM, ITURRIAGA EA, CAMPUZANO V, ESLAVA AP (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.
- BLAISEAU PL, LESUISSE E, CAMADRO JM (2001) Aft2p, a novel iron-regulated transcription activator that modulates, with Aft1p, intracellular iron use and resistance to oxidative stress in yeast. J Biol Chem 276: 34221-34226.
- BOEKE JD, LACROUTE F, FINK GR (1984) A positive selection for mutants lacking orotidine-5'-phosphate decarboxylase activity in yeast: 5-fluoro-orotic acid resistance. Mol Gen Genet 197: 345-346.
- BOELAERT JR, VAN ROOST GF, VERGAUWE PL, VERBANCK JJ, DE VROEY C, SEGAERT MF (1988) The role of deferoxamine in dialysis associated mucormycosis: report of three cases and review of the literature. Clin Nephrol 29: 261–266.
- BOELAERT JR, DE LOCHT M, VAN CUTSEM J, KERRELS V, CANTINIEAUX B, VERDONCK A, VAN LANDUYT HW, SCHNEIDER YJ (1993) Mucormycosis during deferoxamine therapy is a siderophore-mediated infection: *in vitro* and *in vivo* animal studies. J Clin Investig 91: 1979–1986.
- BULLEN JJ (1981) The significance of iron in infection. Rev Infect Dis 3: 1127–1138.
- BUNDOCK P, DENDULKRAS A, BEIJERSBERGEN A, HOOYKAAS PJJ (1995) Transkingdom T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to *Saccharomyces cerevisiae*. EMBO J 14: 3206-3214.
- BUNDOCK P AND HOOYKAAS PJJ (1996) Integration of *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA in the *Saccharomyces cerevisiae* genome by illegitimate recombination. Proc Natl Acad Sci USA 93: 15272-15275.
- BUNDOCK P, MROCZEK K, WINKLER AA, STEENSMA HY, HOOYKAAS PJ (1999) T-DNA from *Agrobacterium tumefaciens* as an efficient tool for gene targeting in *Kluyveromyces lactis*. Mol Gen Genet 261: 115–121.
- BUNDOCK P, VAN ATTIKUM H, DULK-RAS A, HOOYKAAS PJ (2002) Insertional mutagenesis in yeasts using T-DNA from *Agrobacterium tumefaciens*. Yeast 19: 529–536.
- BURMESTER A, WÖSTEMEYER A, WÖSTEMEYER J (1990) Integrative transformation of a zygomycete, *Absidia glauca*, with vectors containing repetitive DNA. Curr Genet 17: 155–161.
- BURMESTER A, WÖSTEMEYER A, ARNAU J, WÖSTEMEYER J (1992) The *SEG1* element: a new DNA region promoting stable mitotic segregation of plasmids in the zygomycete *Absidia glauca*. Mol Gen Genet 235: 166-172.
- BURMESTER A (1992) Transformation of the mycoparasite *Parasitella simplex* to neomycin resistance. Curr Genet 21: 121–124.
- BYERS BR AND ARCENEAUX JEL (1998) Microbial iron transport: iron acquisition by pathogenic microorganisms. Metal Ions Biol Syst 35: 37–66.
- CAMBARERI EB, SINGER MJ, SELKER EU (1991) Recurrence of repeatinduced point mutation (RIP) in *Neurospora crassa*. Genetics 127: 699–710.

- CAMPOY S, PEREZ F, MARTIN JF, GUTIERREZ S, LIRAS P (2003) Stable transformants of the azophilone pigment-producing *Monascus purpureus* obtained by protoplast transformation and *Agrobacterium*-mediated DNA transfer. Curr Genet 43: 447-452.
- CASAS-FLORES S, ROSALES-SAAVEDRA T, HERRERA-ESTRELLA A (2004) Three decades of fungal transformation: novel technologies. Methods Mol Biol 267: 315-325.
- CHALFIE M, TU Y, EUSKIRCHEN G, WARD WW AND PRASHER DC (1994) Green fluorescent protein as a marker for gene expression. Science 263: 802-805.
- CHAMILOS G, LEWIS RE, KONTOYIANNIS DP (2007) Multidrug-resistant endosymbiotic bacteria account for the emergence of zygomycosis: a hypothesis. Fung Genet Biol 44: 88–92.
- CHANG YC, SEGAL BH, HOLLAND SM, MILLER GF AND KWON-CHUNG KJ (1998) Virulence of catalase-deficient *Aspergillus nidulans* inp47^{phox-/-} mice. J Clin Invest 101: 1843-1850.
- CHAYAKULKEEREE M, GHANNOUM MA AND PERFECT JR (2006) Zygomycosis: the reemerging fungal infection. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 25: 215-229.
- COMBIER JP, MELAYAH D, RAFFIER C, GAY G, MARMEISSE R (2003) Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation as a tool for insertional mutagenesis in the symbiotic ectomycorrhizal fungus Hebeloma cylindrosporum. FEMS Microbiol Lett 220: 141–148.
- COMPTON T (1990) Degenerate primers for DNA amplifications. In: Innis MA, Gelfand, DH, Sninsky, JJ, White TJ (Eds) PCR Protocols: A guide to methods and applications. Academic Press, London, pp 39-45.
- COVERT SF, KAPOOR P, LEE M, BRILEY A, NAIRN CJ (2001) Agrobacterium tumefaciensmediated transformation of *Fusarium circinatum*. Mycol Res 105: 259-264.
- CUVELIER I, VOGELAERS D, PELEMAN R, BENOIT D, VAN MARCK V, OFFNER F, VANDEWOUDE K, COLARDYN F (1998) Two Cases of Disseminated Mucormycosis in Patients with Hematological Malignancies and Literature Review. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 17: 859–863.
- DEGEFU Y AND HANIF M (2003) Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of *Helminthosporium turcicum*, the maize leafblight fungus. Arch Microbiol 180: 279–284.
- DE GROOT MJA, BUNDOCK P, HOOYKAAS PJJ, BEIJERSBERGEN AGM (1998) Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of filamentous fungi. Nature Biotechnol 16: 839-842.
- DE LOCHT MD, BOELAERT JR, SCHNEIDER Y-J (1994) Iron uptake from ferrioxamine and from ferrirhizoferrin by germinating spores of *Rhizopus microsporus*. Biochem Pharmacol 47: 1843–1850.
- DEVOYOD JJ (1988) Microbial accidents in cheese making due to *Mucor*. Microbiologie-Aliments-Nutrition 6: 25-29.
- DIAMOND RD, KRESICKI R, EPSTAIN B AND JAO W (1987) Damage to hyphal forms of fungi by human leukocytes in vitro: a possible host defense mechanism in aspergillosis and mucormycosis. Am J Pathol 91: 313-328.
- DIX DR, BRIDGHAM JT, BRODERIUS MA, BYERSDORFER CA, EIDE DJ (1994) The *FET4* gene encodes the low affinity Fe(II) transport protein of *Saccharomyces cerevisiae*. J Biol Chem 269: 26092–26099.
- ECK R, HUNDT S, HÄRTL A, RUEMER E, KÜNKEL W (1999) A multicopper oxidase gene from *Candida albicans*: cloning, characterization and disruption. Microbiology 145: 2415–2422.
- EIDE D (1997) Molecular biology of iron and zinc uptake in eukaryotes. Curr Opin Cell Biol 9: 573-577.
- EINSELE H, HEBART H, ROLLER G, LOFFLER J, ROTHENHOFER I, MULLER CA, BOWDEN RA, VAN BURIK J, ENGELHARD D, KANZ L AND SCHUMACHER U (1997) Detection and identification of fungal pathogens in blood by using molecular probes. J Clin Microbiol 35: 1353-1360.
- EISENDLE M, OBEREGGER H, ZADRA I, HAAS H (2003) The siderophore system is essential for viability of *Aspergillus nidulans*: functional analysis of two genes encoding L-ornithine N⁵-monooxygenase (*sidA*) and a nonribosomal peptide synthetase (*sidC*). Mol Microbiol 49: 359-375.
- EUCKER J, SEZER O, GRAF B, POSSINGER K (2001) Mucormycoses. Mycoses 44: 253-260.
- FALLON K, BAUSCH K, NOONAN J, HUGUENEL E AND TAMBURINI P (1997) Role of aspartic proteases in disseminated *Candida albicans* infection in mice. Infect Immun 65(2): 551-556.
- FELSENSTEIN J (1993) PHYLIP. Phylogeny Inference Package. University of Washington, Seattle.
- FERNÁNDEZ-MARTÍN JL, MENÉNDEZ-FRAGA P, CANTEROS MA, DÍAZ-LÓPEZ JB, CANNATA-ANDÍA JB (1994) Binding of aluminium to plasma proteins: comparative effect of desferrioxamine and deferiprone (L1). Clin Chim Acta 230: 137-145.
- FINCHAM JRS (1989) Transformation of fungi. Microbiol Rev 53: 148–170.
- FITCH WM (1971) Toward defining the course of evolution: minimum change for a specified tree topology. Systematic Zoology 20: 406-416.
- FITZGERALD AM, MUDGE AM, GLEAVE AP, PLUMMER KM (2003) *Agrobacterium* and PEG-mediated transformation of the phytopathogen *Venturia inaequalis*. Mycol Res 107: 803–810.
- FREIFELD AG, IWEN PC (2004) Zygomycosis. Semin Respir Crit Care Med 25: 221–232.
- FU Y, LEE H, COLLINS M, TSAI H-F, SPELLBERG B, EDWARDS JE, KWON-CHUNG KJ, IBRAHIM AS (2004) Cloning and functional characterization of the *Rhizopus oryzae* high affinity permease (*rFTR*) gene. FEMS Microbiol Lett 235: 169-176.
- GÁCSER A, STEHR F, KRÖGER C, KREDICS L, SCHÄFER W AND NOSANCHUK JD (2007) Lipase 8 affects the pathogenesis of *Candida albicans*. Infect Immun 75(10): 4710-4718.
- GALLAGHER CG, ASHLEY ESD, DREW RH, PERFECT JR (2003) Antifungal pharmacotherapy for invasive mould infections. Expert Opin Pharm 4: 147-164.
- GARDINER DM AND HOWLETT BJ (2004) Negative selection using thymidine kinase increases the efficiency of recovery of transformants with targeted genes in the filamentous fungus *Leptosphaeria maculans*. Curr Genet 45: 249–255.

- GEORGATSOU E AND ALEXANDRAKI D (1994) Two distinctly regulated genes are required for ferric reduction, the first step of iron uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol Cell Biol 14: 3065–3073.
- GHANNOUM MA (2000) Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. Clin Microbiol Rev 13(1): 122–143.
- GODIO RP, FOUCES R, GUDINA EJ, MARTIN JF (2004) Agrobacterium tumefaciensmediated transformation of the antitumor clavaric acid-producing basidiomycete *Hypholoma sublateritium*. Curr Genet 46: 287–294.
- GODTFREDSEN SE (1990) Microbial lipases. In Fogarty WM, Kelly CT (Eds) Microbial enzymes and biotechnology, 2nd ed., Elsevier, London, UK, pp 255-274.
- GONZALEZ-HERNANDEZ GA, HERRERA-ESTRELLA L, ROCHA-RAMIREZ V, RONCERO MIG, GUTIERREZ-CORONA JF (1997) Biolistic transformation of *Mucor circinelloides*. Mycol Res 101: 953–956.
- GOODAY GW (1994) Hormones in mycelial fungi. In: Wessels JGH, Meinhardt F (Eds) The Mycota, vol. 1. Springer-Verlag, Berlin, pp 401-411.
- GRIMALDI B, DE RAAF MA, FILETICI P, OTTONELLO S, BALLARIO P (2005) Agrobacteriummediated gene transfer and enhanced green fluorescent protein visualization in the mycorrhizal ascomycete *Tuber borchii*: a first step towards truffle genetics. Curr Genet 48(1): 69-74.
- GUERINOT ML (1994) Microbial iron transport. Annu Rev Microbiol 48: 743–772.
- GURR SJ, UNKLES SE, KINGHORN JR (1987) The structure and organisation of nuclear genes of filamentous fungi. In: Kinghorn JR (Ed) Gene Structure in Eukaryotes, IRL Press, Oxford, pp 93-139.
- HAAS H, SCHOESER M, LESUISSE E, ERNST JF, PARSON W, ABT B, WINKELMANN G, OBEREGGER H (2003) Characterisation of the *Aspergillus nidulans* transporters for the siderophores enterobactin and triacetylfusarinine C. Biochem J 371: 505-513.
- HAAS H (2003) Molecular genetics of fungal siderophore biosynthesis and uptake: the role of siderophores in iron uptake and storage. Appl Microbiol Biotechnol 62: 316-330.
- HAJDUKIEWICZ P, SVAB Z, MALIGA P (1994) The small, versatile pPZP family of *Agrobacterium* binary vectors for plant transformation. Plant Mol Biol 25: 989-994.
- HAMILTON CM, FRARY A, LEWIS C, TANKSLEY S (1996) Stable transfer of intact high molecular weight DNA into plant chromosomes. Proc Natl Acad Sci USA 93: 9975-9979.
- HAMMACOTT JE, WILLIAMS PH, CASHMORE AM (2000) *Candida albicans CFL1* encodes a functional ferric reductase activity that can rescue a *Saccharomyces cerevisiae fre1* mutant. Microbiol 146: 869-876.
- HAN BZ, ROMBOUTS FM AND NOUT MJR (2001) A Chinese fermented soybean food. Int J Food Microbiol 65: 1-10.
- HANIF M, PARDO AG, GORFER M, RAUDASKOSKI M (2002) T-DNA transfer and integration in the ectomycorrhizal fungus *Suillus bovinus* using hygromycin B as a selectable marker. Curr Genet 41: 183–188.

- HEYMANN P, ERNST JF, WINKELMANN G (1999) Identification of a fungal triacetylfusarinine C siderophore transport gene (TAF1) in *Saccharomyces cerevisiae* as a member of the major facilitator superfamily. Biometals 12: 301-306.
- HEYMANN P, ERNST JF, WINKELMANN G (2000a) A gene of the major facilitator superfamily encodes a transporter for enterobactin (Enb1) in *Saccharomyces cerevisiae*. BioMetals 13: 65-72.
- HEYMANN P, ERNST JF, WINKELMANN G (2000b) Identification and substrate specificity of a ferrichrome-type siderophore transporter (Arn1p) in *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Microbiol Lett 186: 221-227.
- HEYMANN P, GERADS M, SCHALLER M, DROMER F, WINKELMANN G, ERNST J F (2002) The siderophore iron transporter of *Candida albicans* (Sit1p/Arn1p) mediates uptake of ferrichrome-type siderophores and is required for epithelial invasion. Infect Immun 70: 5246-5255.
- HINNEN A, HICK SJB, FINK GR (1978) Transformation of yeast chimeric ColE1 plasmid carrying *LEU2*. Proc Natl Acad Sci USA 75: 1929-1933.
- HOOD EE, HELMER GL, FRALEY RT, CHILTON MD (1986) The hypervirulence of *Agrobacterium tumefaciens* A281 is encoded in the region pTiBo542 outside the T-DNA. J Bacteriol 168: 1291-1301.
- HORIUCHI H, TAKAYA N, YANAI K, NAKAMURA M, OHTA A, TAKAGI M (1995) Cloning of the *Rhizopus niveus pyr4* gene and its use for the transformation of *Rhizopus delemar*. Curr Genet 27: 472–478.
- HOWARD DH (1999) Acquisition, transport, and storage of iron by pathogenic fungi. Clin Microbiol Rev 12: 394-404.
- HOWARD DH (2003) Iron gathering by zoopathogenic fungi. FEMS Immunol Med Microbiology 1641: 1-6.
- HU C-H, BAI C, ZHENG X-D, WANG Y-M, WANG Y (2002) Characterization and functional analysis of the siderophore-iron transporter CaArn1p in *Candida albicans*. J Biol Chem 277: 30598–30605.
- IBRAHIM AS AND SKORY CD (2006) Genetic manipulation of zygomycetes. In: Kavanagh K (Ed) Medical Mycology, Cellular and Molecular Techniques. New York, NY: John Wiley & Sons, p 305-325.
- IBRAHIM AS, EDWARDS JE, FU Y, SPELLBERG BJ (2006) Deferiprone iron chelation as a novel therapy for experimental mucormycosis. J Antimicrob Chemother 58: 1070-1073.
- IBRAHIM AS, GEBERMARIAM T, FU Y, LIN L, HUSSEINY MI, FRENCH SW, SCHWARTZ J, SKORY CD, EDWARDS JE, SPELLBERG BJ (2007) The iron chelator deferasirox protects mice from mucormycosis through iron starvation. J Clin Invest 117(9): 2649-2657.
- IBRAHIM AS, GEBREMARIAM T, LIU M, CHAMILOS G, KONTOYIANNIS DP, MINK R, KWON-CHUNG KJ, FU Y, SKORY CD, EDWARDS JE AND SPELLBERG B (2008) Bacterial endosymbiosis is widely present among Zygomycetes but does not contribute to mucormycosis pathogenesis. J Infect Dis DOI: 10.1086/591461.
- IDNURM A, REEDY JL, NUSSBAUM JC, HEITMAN J (2004) *Cryptococcus neoformans* virulence gene discovery through insertional mutagenesis. Eukaryot Cell 3: 420–429.

- ITURRIAGA EA, DIAZ-MINGUEZ JM, BENITO EP, ALVAREZ MI, ESLAVA AP (1992) Heterologous transformation of *Mucor circinelloides* with the *Phycomyces blakesleeanus leu1* gene. Curr Genet 21: 215–223.
- ITURRIAGA EA, VELAYOS A, ESLAVA AP (2000) Structure and function of the genes involved in the biosynthesis of carotenoids in the Mucorales. Biotechnol Bioprocess Eng 5: 263-274.
- ITURRIAGA EA, VELAYOS A, ESLAVA AP, ALVAREZ MI (2001) The genetics and molecular biology of carotenoid biosynthesis in *Mucor*. Recent Res Devel Genet 1: 79-92.
- JONES DT, TAYLOR WR, THORNTON JM (1992) The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. Bioinformatics 8: 275-282.
- JUNG MK, OVECHKINA Y, PRIGOZHINA N, OAKLEY CE, OAKLEY BR (2000) The use of beta-D-glucanase as a substitute for Novozym 234 in immunofluorescence and protoplasting. Fung Genet Newslett 47: 65-66.
- JUNG WH, SHAM A, WHITE R, KRONSTAD JW (2006) Iron regulation of the major virulence factors in the AIDS-associated pathogen *Cryptococcus neoformans*. PLoS Biol 4(12): 2282-2295.
- JUNG WH AND KRONSTAD JW (2008) Iron and fungal pathogenesis: a case study with *Cryptococcus neoformans*. Cell Microbiol 10(2): 277-284.
- KADO CI (1991) Molecular mechanisms of crown gall tumorigenesis. Crit Rev Plant Sci 10: 1-32.
- KAMEI K (2000) Animal models of zygomycosis *Absidia, Rhizopus, Rhizomucor*, and *Cunninghamella*. Mycopathologia 152: 5–13.
- KAUFMAN L, TURNER LF AND MCLAUGHLIN DW (1989) Indirect enzymelinked immunosorbent assay for zygomycosis. J Clin Microbiol 27: 1979–1982.
- KING ADJR, HOCKING AD, PITT JI (1979) Dichloran-rose bengal medium for enumeration and isolation of molds from foods. Appl Environ Microbiol 37: 959-964.
- KNIGHT SAB, VILAIRE G, LESUISSE E, DANCIS A (2005) Iron acquisition from transferrin by *Candida albicans* depends on the reductive pathway. Infect Immun 73: 5482–5492.
- KO HS, TAGUCHI H, TAKIZAWA K, FUKUSIMA K, KIM HS (2007) The enzymatic approach of zygomycosis causing Mucorales. Kor J Med Mycol 12: 9–17.
- KOBAYASHI M, TOGITANI K, MACHIDA H, UEMURA Y, OHTSUKI Y, TAGUCHI H (2004) Molecular polymerase chain reaction diagnosis of pulmonary mucormycosis caused by *Cunninghamella bertholletiae*. Respirology 9: 397–401.
- KONCZ C AND SCHELL J (1986) The promoter of the T_L-DNA gene 5 controls the tissuespecific expression of chimeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. Mol Gen Genet 204: 383-396.
- LAN CY, RODARTE G, MURILLO LA, JONES T, DAVIS RW, DUNGAN J, NEWPORT G, AGABIAN N (2004) Regulatory networks affected by iron availability in *Candida albicans*. Mol Microbiol 53: 1451–1469.
- LAZO GR, STEIN PA, LUDWIG RA (1991) A DNA transformation-competent *Arabidopsis* genomic library in *Agrobacterium*. Biotechnol 9: 963-967.

- LEAL CV, MONTES BA, MESA AC, RUA AL, CORREDOR M, RESTREPO A, MCEWEN JG (2004) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Paracoccidioides* brasiliensis. Med Mycol 42: 391–395.
- LESUISSE E AND LABBE P (1989) Reductive and non-reductive mechanisms of iron assimilation by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. J Gen Microbiol 135: 257-263.
- LESUISSE E AND LABBE P (1994) Reductive iron assimilation in *Saccharomyces cerevisiae*. In: Winkelmann G, Winge DR (Eds) Metal ions in fungi. Decker, New York, pp 149–178.
- LESUISSE E, SIMON-CASTERAS M, LABBE P (1998) Siderophore-mediated iron uptake in *Saccharomyces cerevisiae*: the *SIT1* gene encodes a ferrioxamine B permease that belongs to the major facilitator superfamily. Microbiology 144: 3455-3462.
- LI W, GUO G, ZHENG G (2000) *Agrobacterium*-mediated transformation: state of the art and future prospect. Chinese Sci Bull 45(17): 1537-1546.
- LIN L, SPELLBERG BJ, FU Y, SKORY CD, GEBREMARIAM T, HUSSEINY MI, EDWARDS JRJE, IBRAHIM AS (2007) High Affinity Iron Permease is Required for Virulence of *Rhizopus oryzae*. The American Society for Microbiology's 47th Annual Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC). Presentation #B-1444.
- LIOU CM, YANAI K, HORIUCHI H, TAKAGI M (1992) Transformation of a Leu- mutant of *Rhizopus niveus* with the *leuA* gene of *Mucor circinelloides*. Biosci Biotechnol Biochem 56: 1503–1504.
- LIU YG AND WHITTIER RF (1995) Thermal asymmetric interlaced PCR: automatable amplification and sequencing of insert end fragments from P1 and YAC clones for chromosome walking. Genomics 25: 674-681.
- LIU YG, MITSUKAWA N, OOSUMI T, WHITTIER RF (1995) Efficient isolation and mapping of Arabidopsis thaliana T-DNA isert junctions by thermal asymmetric interlaced PCR. Plant J 8: 457-463.
- LOPPNAU P, TANGUAY P, BREUIL C (2004) Isolation and disruption of the melanin pathway polyketide synthase gene of the softwood deep stain fungus *Ceratocystis resinifera*. Fungal Genet Biol 41: 33–41.
- MACKENZIE DA, WONGWATHANARAT P, CARTER AT, ARCHER DB (2000) Isolation and use of a homologous histone H4 promoter and a ribosomal DNA region in a transformation vector for the oilproducing fungus *Mortierella alpina*. Appl Environ Microbiol 66: 4655–4661.
- MADYASTHA KM AND SRIVATSAN J (1987) Novel transformations of progesterone by a *Mucor* sp. Can J Microbiol 33: 361-365.
- MAERTENS J, DEMUYNCK H, VERBEKEN EK, ZACHEE P, VERHOEF GE, VANDENBERGHE P, BOOGAERTS MA (1999) Mucormycosis in allogeneic bone marrow transplant recipients: report of five cases and review of the role of iron overload in the pathogenesis. Bone Marrow Transplant 24: 307–312.
- MALONEK S AND MEINHARDT F (2001) Agrobacterium tumefaciens-mediated genetic transformation of the phytopathogenic ascomycete Calonectria morganii. Curr Genet 40: 152-155.

- MARTY FM, COSIMI LA, BADEN LR (2004) Breakthrough zygomycosis after voriconazole treatment in recipients of hematopoietic stem-cell transplants. N Engl J Med 350: 950–952.
- MCBRIDE KE AND SUMMERFELT KR (1990) Improved binary vectors for *Agrobacterium*mediated plant transformation. Plant Mol Biol 14: 269-276.
- MERTENS JA, SKORY CD, IBRAHIM AS (2006) Plasmids for expression of heterologous proteins in *Rhizopus oryzae*. Arch Microbiol 186: 41-50.
- MICHAILIDES TJ AND OGAWA JM (1985) A comparative study of growth characteristics and pathogenicity of *Mucor piriformis* isolates causing decay of peaches and nectarines. Phytopathology 75: 1008.
- MICHIELSE CB, SALIM K, RAGAS P, RAM AFJ, KUDLA B, JARRY B, PUNT PJ, VAN DEN HONDEL CAMJJ (2004) Development of a system for integrative and stable transformation of the zygomycete *Rhizopus oryzae* by *Agrobacterium*-mediated DNA transfer. Mol Genet Genomics 271: 499-510.
- MICHIELSE CB, HOOYKAAS PJJ, VAN DEN HONDEL CAMJJ, RAM AFJ (2005) Agrobacterium-mediated transformation as a tool for functional genomics in fungi. Curr Genet 48: 1-17.
- MIKOSH TSP, LAVRIJSSEN B, SONNENBERG ASM, VAN GRIENSVEN LJLD (2001) Transformation of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus* (Lange) using T-DNA from *Agrobacterium tumefaciens*. Curr Genet 39: 35-39.
- MONFORT A, CORDERO L, MAICAS S, POLAINA J (2003) Transformation of *Mucor miehei* results in plasmid deletion and phenotypic instability. FEMS Microbiol Lett 224: 101–106.
- MOYE-ROWLEY WS (2003) Regulation of the transcriptional response to oxidative stress in fungi: similarities and differences. Eukaryot Cell 2: 381–389.
- MULLINS ED, CHEN X, ROMAINE P, RAINA R, GEISER DM, KANG S (2001) Agrobacteriummediated transformation of *Fusarium oxysporum*: An efficient tool for insertional mutagenesis and gene transfer. Phytopathol 91: 173-180.
- NAGAO K, OTA T, TANIKAWA A, TAKAE Y, MORI T, UDAGAWA S, NISHIKAWA T (2005) Genetic identification and detection of human pathogenic *Rhizopus* species, a major mucormycosis agent, by multiplex PCR based on internal transcribed spacer region of rRNA gene. J Dermatol Sci 39: 23–31.
- NAVARRO E, LORCA-PASCUAL JM, QUILES-ROSILLO MD, NICOLAS FE, GARRE V, TORRES-MARTINEZ S, RUIZ-VAZQUEZ RM (2001) A negative regulator of light-inducible carotenogenesis in *Mucor circinelloides*. Mol Genet Genomics 266: 463-470.
- NEILANDS JB (1995) Siderophores: Structure and function of microbial iron transport compounds. J Biol Chem 270: 26723-26726.
- NYHUS KJ, WILBORN AT, JACOBSON ES (1997) Ferric iron reduction by *Cryptococcus neoformans*. Infect Immun 65: 434-438.
- NYILASI I, ÁCS K, LUKÁCS GY, PAPP T, KASZA ZS, VÁGVÖLGYI CS (2003) Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of *Mucor circinelloides*. FEMS Microbiol Lett 222: (S1) 458.
- NYILASI I, ÁCS K, PAPP T, VÁGVÖLGYI CS (2005a) Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of *Mucor circinelloides*. Folia Microbiol 50: 415-420.

- NYILASI I, GALGÓCZY L, PAPP T, NAGY E, VÁGVÖLGYI CS (2005b) Sequence comparison of high-affinity iron permeases (*FTR1*) from different zygomycetous fungi. FEBS J 272: (S1) 108.
- NYILASI I, PAPP T, TAKÓ M, NAGY E, VÁGVÖLGYI CS (2005c) Identification of biotechnologically important *Rhizopus* strains on the basis of high affinity iron permease (*FTR1*) sequences. J Biotech 118: (S1) 154.
- NYILASI I, PAPP T, LUKÁCS GY, NAGY E, VÁGVÖLGYI CS (2005d) Cloning and sequence analysis of the high affinity iron permease (FTR1) gene from *Rhizomucor miehei*, a basis for functional analysis. Mycoses 48: (S2) 75.
- NYILASI I, PAPP T, CSERNETICS Á, VÁGVÖLGYI CS (2008a) Agrobacterium tumefaciensmediated transformation of the zygomycete fungus, *Backusella lamprospora*. J Basic Microbiol 48: 59-64.
- NYILASI I, PAPP T, CSERNETICS Á, KRIZSÁN K, NAGY E, VÁGVÖLGYI CS (2008b) Highaffinity iron permease (*FTR1*) gene sequence-based molecular identification of clinically important Zygomycetes. Clin Microbiol Infect 14: 393-397.
- OBEREGGER H, ZADRA I, SCHOESER M, ABT B, PARSON W, HAAS H (2002) Identification of members of the Aspergillus nidulans SREA regulon: genes involved in siderophore biosynthesis and utilization. Biochem Soc Trans 30: 781-783.
- OBEREGGER H, SCHOESER M, ZADRA I, ABT B, HAAS H (2001) SREA is involved in regulation of siderophore biosynthesis, utilization and uptake in *Aspergillus nidulans*. Mol Microbiol 41: 1077-1089.
- OBRAZTSOVA IN, PRADOS N, HOLZMANN K, AVALOS J, CERDÁ-OLMEDO E (2003) Genetic damage following introduction of DNA in *Phycomyces*. Fung Genet Biol 41: 168-180.
- OCHMAN H, GERBER AS, HARTL DL (1988) Genetic applications of an inverse polymerase chain reaction. Genetics 120: 621-623.
- O'DONNELL K, LUTZONI FM, WARD TJ, BENNY GL (2001) Evolutionary relationships among mucoralean fungi (Zygomycota): evidence for familiy polyphyly on a large scale. Mycologia 93: 286-296.
- ORLOWSKI M (1991) Mucor dimorphism. Microbiol Rev 55: 234-258.
- ORTIZ-ALVARADO R, GONZALES-HERNANDEZ GA, TORRES-GUZMAN JC, GUTIERREZ-CORONA JF (2006) Transformation of *Mucor circinelloides* with autoreplicative vectors containing homologous and heterologous *ARS* elements and the dominant cbx^r carboxine-resistant gene. Curr Microbiol 52: 178-181.
- OTCENASEK M AND BUCHTA V (1994) *In vitro* susceptibility to 9 antifungal agents of 14 strains of Zygomycetes isolated from clinical specimens. Mycopathologia 128: 135–137.
- OUTTRUP H AND BOYCE COL (1990) Microbial proteinases and biotechnology. In: Fogarty WM, Kelly CT (Eds) Microbial enzymes and biotechnology, Elsevier Applied Science Publ., London, pp 227-254.
- PAPP T, VELAYOS A, BARTÓK T, ESLAVA AP, VÁGVÖLGYI CS, ITURRIAGA EA (2006) Heterologous expression of astaxanthin biosynthesis genes in *Mucor circinelloides*. Appl Microbiol Biotechnol 69(5): 526–531.
- PARK S-M AND KIM D-K (2004) Transformation of a filamentous fungus *Cryphonectria* parasitica using Agrobacterium tumefaciens. Biotechnol Bioprocess Eng 9: 217–222.

- PARTIDA-MARTINEZ LP AND HERTWECK C (2005) Pathogenic fungus harbours endosymbiotic bacteria for toxin production. Nature 437: 884–888.
- PARTIDA-MARTINEZ LP, DE LOOB CF, ISHIDA K, ISHIDA M, ROTH M, BUDER K AND HERTWECK C (2007) Rhizonin, the first mycotoxin isolated from the Zygomycota, is not a fungal metabolite but is produced by bacterial endosymbionts. Appl Environ Microbiol 73: 793–797.
- PELLETIER B, BEAUDOIN J, PHILPOTT CC, LABBÉ S (2003) Fep1, represses expression of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* siderophore-iron transport system. Nucl Acids Res 31: 4332-4344.
- PELLETIER B, BEAUDOIN J, MUKAI Y, LABBÉ S (2002) Fep1, an iron sensor regulating iron transporter gene expression in *Schizosaccharomyces pombe*. J Biol Chem 277: 22950-22958.
- PETERSON KL, WANG M, CANALIS RF, ABEMAYOR E (1997) Rhinocerebral mucormycosis: evolution of the disease and treatment options. Laryngoscope 107: 855–862.
- PFALLER MA, MARCO F, MESSER SA AND JONES RN (1998) *In vitro* activities of two echinocadin derivatives, LY303366 and MK-0991 (L-743,792), against clinical isolates of *Aspergillus*, *Fusarium*, *Rhizopus*, and other filamentous fungi. Diagn Microbiol Infect Dis 30: 251–255.
- PHILPOTT CC, PROTCHENKO O, KIM YW, BORETSKY Y, SHAKOURY-ELIZEH M (2002) The response to iron deprivation in *Saccharomyces cerevisiae*: expression of siderophore-based systems of iron uptake. Biochem Soc Trans 30(4): 698-702.
- PUNT PJ, OLIVER RP, DINGEMANSE MA, POUWELS PH, VAN DEN HONDEL C (1987) Transformation of *Aspergillus nidulans* based on the hygromycin B resistance marker from *Escherichia coli*. Gene 56: 117-124.
- PUNT PJ, DINGEMANSE MA, JACOBS-MEISING BJM, POUWELS PH, VAN DEN HONDEL CAMJJ (1988) Isolation and characterization of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene of *Aspergillus nidulans*. Gene 69: 49-57.
- RAMANAN N AND WANG Y (2000) A high-affinity iron permease essential for *Candida albicans*. Science 288: 1062–1064.
- RATLEDGE C AND DOVER LG (2000) Iron metabolism in pathogenic bacteria. Annu Rev Microbiol 54: 881-941.
- RENSHAW JC, ROBSON GD, TRINCI APJ, WIEBE MG, LIVENS FR, COLLISON D AND TAYLOR RJ (2002) Fungal siderophores: structures, functions and applications. Mycol Res 106: 1123-1142.
- REVUELTA JL AND JAYARAM M (1986) Transformation of *Phycomyces blakesleeanus* to G-418 resistance by an autonomously replicating plasmid. Proc Natl Acad Sci USA 83: 7344–7347.
- RHO HS, KANG S, LEE YH (2001) Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of the plant pathogenic fungus, Magnaporthe grisea. Mol Cells 12: 407–411.
- RHOUNIM L, ROSSIGNOL JL, FAUGERON G (1992) Epimutation of repeated genes in *Ascobolus immersus*. EMBO J 11: 4451–4457.
- RIBES JA, VANOVER-SAMS CL, BAKER DJ (2000) Zygomycetes in Human Disease. Clin Microbiol Rev 13: 236-301.

- RIPPON JW (1974) Mucormycosis, In Medical mycology. The pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes. Saunders, Philadelphia, pp 430-447.
- ROLLAND S, JOBIC C, FEVRE M, BRUEL C (2003) *Agrobacterium*-mediated transformation of *Botrytis cinerea*, simple purification of monokaryotic transformants and rapid conidia-based identification of the transfer-DNA host genomic DNA flanking sequences. Curr Genet 44: 164–171.
- ROMANO N AND MACINO G (1992) Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. Mol Microbiol 6: 3343–3353.
- RONCERO MIG, JEPSEN LP, STROMAN P, VAN HEESWIJCK R (1989) Characterization of a *leuA* gene and an *ARS* element from *Mucor circinelloides*. Gene 84: 335-343.
- RUIZ-HERRERA J (1993) Dimorphism in *Mucor* species. In: van den Bossche H, Odds FC, Herridge D (Eds) Dimorphic fungi in biology and medicine, Plenum Press, New York, pp 257-265.
- RUIZ-HIDALGO MJ, ESLAVA AP, ALVAREZ MI, BENITO EP (1999) Heterologous expression of the *Phycomyces blakesleeanus* phytoene dehydrogenase gene (*carB*) in *Mucor circinelloides*. Curr Microbiol 39: 259-264.
- SAITOU N AND NEI (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol Biol Evol 4: 406-425.
- SAMBROOK J, FRITSCH EF, MANIATIS T (1989) Molecular cloning: a laboratory manual (2nd edn). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- SANTOS R, BUISSON N, KNIGHT S, DANCIS A, CAMADRO JM, LESUISSE E (2003) Haemin uptake and use as an iron source by *Candida albicans*: role of CaHMX1-encoded haem oxygenase. Microbiology 149: 579–588.
- SCHILDE C, WÖSTEMEYER J, BURMESTER A (2001) Green fluorescent protein as a reporter for gene expression in the mucoralean fungus *Absidia glauca*. Arch Microbiol 175: 1-7.
- SCHIPPER MAA (1984) A revision of the genus *Rhizopus*. I The *Rhizopus stolonifer*-group and *Rhizopus oryzae*. Stud Mycol 25: 1-19.
- SCHOLER HJ, MULLER E AND SCHIPPER MAA (1983) Mucorales. In: Howard DW (Ed) Fungi Pathogenic for Humans and Animals, Marcel Dekker, New York, pp 9-59.
- SCHRETTL M, BIGNELL E, KRAGL C, JOECHL C, ROGERS T, ARST HN, HAYNES K AND HAAS H (2004) Siderophore biosynthesis but not reductive iron assimilation is essential for *Aspergillus fumigatus* virulence. J Exp Med 200(9): 1213–1219.
- SCHWARZ P, BRETAGNE S, GANTIER J-C, GARCIA-HERMOSO D, LORTHOLARY O, DROMER F, DANNAOUI E (2006) Molecular identification of Zygomycetes from culture and experimentally infected tissues. J Clin Microbiol 44: 340-349.
- SINGH N (2001) Trends in the epidemiology of opportunistic fungal infections: predisposing factors and the impact of antimicrobial use practices. Clin Infect Dis 33: 1692-1696.
- SINKÓ J (2001) Az invazív gombainfekciók terápiája: jelen és jövő. Lege Artis Medicine 11(3): 206-213.

- SIWEK GT, DODGSON KJ, DE MAGALHAES-SILVERMAN M, BARTELT LA, KILBORN SB, HOTH PL, DIEKEMA DJ AND PFALLER MA (2004) Invasive zygomycosis in hematopoietic stem cell transplant recipients receiving voriconazole prophylaxis. Clin Infect Dis 39: 584–587.
- SKAAR I AND STENWIG H (1996) Malt-yeast extract-sucrose agar, a suitable medium for enumeration and isolation of fungi from silage. Appl Env Microbiol 62: 3614-3619.
- SKORY CD (2002) Homologous recombination and double-strand break repair in the transformation of *Rhizopus oryzae*. Mol Genet Genomics 268: 397–406.
- SKORY CD (2004) Repair of plasmid DNA used for transformation of *Rhizopus oryzae* by gene conversion. Curr Genet 45: 302–310.
- SKORY CD (2005) Inhibition of non-homologous end joining and integration of DNA upon transformation of *Rhizopus oryzae*. Mol Gen Genomics 274: 373–383.
- SPELLBERG B, EDWARDS J, IBRAHIM A (2005) Novel Perspectives on Mucormycosis: Pathophysiology, Presentation, and Management Clin Microbiol Rev 18(3): 556–569.
- STABEN C, JENSEN B, SINGER M, POLLOCK J, SCHECHTMAN M, KINSEY J AND SELKER E (1989) Use of a bacterial hygromycin B resistance gene as a dominant selectable marker in *Neurospora crassa* transformation. Fungal Genet Newsl 36: 79–81.
- STEARMAN R, YUAN DS, YAMAGUCHI-IWAI Y, KLAUSNER RD, DANCIS A (1996) A permease-oxidase complex involved in high-affinity iron uptake in yeast. Science 271: 1552–1557.
- SUAREZ T AND ESLAVA AP (1988) Transformation of *Phycomyces* with a bacterial gene for kanamycin resistance. Mol Gen Genet 212: 120–123.
- SULLIVAN TD, ROONEY PJ, KLEIN BS (2002) *Agrobacterium tumefaciens* integrates transfer DNA into single chromosomal sites of dimorphic fungi and yields homokaryotic progeny from multinucleate yeast. Eukaryot Cell 1: 895–905.
- SUN QN, FOTHERGILL AW, MCCARTHY DI, RINALDI MG, GRAYBILL JR (2002a) *In vitro* activities of posaconazole, itraconazole, voriconazole, amphotericin B, and fluconazole against 37 clinical isolates of zygomycetes. Antimicrob Agents Chemother 46: 1581–1582.
- SUN QN, NAJVAR LK, BOCANEGRA R, LOEBENBERG D, GRAYBILL JR (2002b) *In vivo* activity of posaconazole against *Mucor* spp. in an immunosuppressed mouse model. Antimicrob Agents Chemother 46: 2310–2312.
- TAKAYA N, YANAI K, HORIUCHI H, OHTA A, TAKAGI M (1996) Cloning and characterization of the *Rhizopus niveus leul* gene and its use for homologous transformation. Biosci Biotechnol Biochem 60: 448–452.
- TAKENO S, SAKURADANI E, MURATA S, INOHARA-OCHIAI M, KAWASHIMA H, ASHIKARI T, SHIMIZU S (2004a) Cloning and sequencing of the *ura3* and *ura5* genes, and isolation and characterization of uracil auxotrophs of the fungus *Mortierella alpina* 1S-4. Biosci Biotechnol Biochem 68(2): 277-285.
- TAKENO S, SAKURADANI E, MURATA S, INOHARA-OCHIAI M, KAWASHIMA H, ASHIKARI T, SHIMIZU S (2004b) Establishment of an overall transformation system for an oilproducing filamentous fungus, *Mortierella alpina* 1S-4. Appl Microbiol Biotechnol 65: 419-425.

- TAKENO S, SAKURADANI E, TOMI A, INOHARA-OCHIAI M, KAWASHIMA H, SHIMIZU S (2005) Transformation of oil-producing fungus, *Mortierella alpina* 1S-4, using zeocin, and application to arachidonic acid production. J Biosci Bioeng 100(6): 617-622.
- TANABE Y, SAIKAWA M, WATANABE MM, SUGIYAMA J (2004) Molecular phylogeny of Zygomycota based on EF-1 and RPB1 sequences: limitations and utility of alternative markers to rDNA. Mol Phyl Evol 30: 438–449.
- TANGUAY P AND BREUIL C (2003) Transforming the sapstaining fungus *Ophiostoma* piceae with Agrobacterium tumefaciens. Can J Microbiol 49: 301–304.
- THIEKEN A AND WINKELMANN G (1992) Rhizoferrin: A complexone type siderophore of the Mucorales and Entomophtorales (Zygomycetes). FEMS Microbiol Lett 94: 37-42.
- THOMPSON JD, HIGGINS DG, GIBSON TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. Nucl Acid Res 22: 4673-4680.
- TOBON AM, ARANGO M, FERNANDEZ D, RESPETRO A (2003) Mucormycosis (zygomycosis) in a heart-kidney transplant recipient: recovery after posaconazole therapy. Clin Infect Dis 36: 1488–1491.
- TRIGLIA T, PETERSON MG AND KEMP DJ (1988) A procedure for *in vitro* amplification of DNA segments that lie outside the boundaries of known sequences. Nucl Acid Res 16: 8186.
- VÁGVÖLGYI CS, VASTAG M, ÁCS K, PAPP T (1999) *Rhizomucor tauricus*: a questionable species of the genus. Mycol Res 103: 1318–1322.
- VÁGVÖLGYI CS, HEINRICH H, ÁCS K, PAPP T (2004) Genetic variability in the species *Rhizopus stolonifer*, assessed by random amplified polymorphic DNA analysis. Ant Leeuwenhoek 86: 181-188.
- VAN CUTSEM J AND BOELART JR (1989) Effects of deferoxamine, feroxamine and iron on experimental mucormycosis (zygomycosis). Kidney Int 36: 1061-1068.
- VAN DER HELM D AND WINKELMANN G (1994) Hydroxamates and polycarboxylates as iron transport agents (siderophores) in fungi. In: Winkelmann G, Winge DR (eds): Metal ions in fungi. vol 11. Decker, New York, pp 39–98.
- VAN HEESWIJCK R AND RONCERO MIG (1984) High frequency transformation of with recombinant plasmid DNA. Calsberg Res Commun 49: 691-702.
- VAN HEESWIJCK R, RONCERO MIG, JEPSEN LP (1988) Genetic analysis and manipulation of *Mucor* species by DNA-mediated transformation. In: Linskens HF, Jackson JF (Eds) Modern methods of plant analysis. Springer-Verlag, Berlin, pp 207–220.
- VAN WEST P, KAMOUN S, VAN'T KLOOSTER JW, GOVERS F (1999) Internuclear gene silencing in *Phytophthora infestans*. Mol Cell 3: 339–348.
- VAZQUEZ JA (2007) Combination antifungal therapy: the new frontier. Future Microbiol 2: 115-139.
- VELAYOS A, ALVAREZ MI, ESLAVA AP, ITURRIAGA EA (1998) Interallelic complementation at the *pyrF* locus and the homodimeric nature of orotate phosphoribosyltransferase (OPRTase) in *Mucor circinelloides*. Mol Gen Genet 260: 251-260.

- VIJN I AND GOVERS F (2003) Agrobacterium tumefaciens mediated transformation of the oomycete plant pathogen Phytophthora infestans. Mol Plant Pathol 4: 459–467.
- VOIGT K, CIGELNIK E, O'DONNELL K (1999) Phylogeny and PCR identification of clinically important zygomycetes based on nuclear ribosomal-DNA sequence data. J Clin Microbiol 37: 3957-3964.
- VOIGT K AND WÖSTEMEYER J (2001) Phylogeny and origin of 82 zygomycetes from all 54 genera of the Mucorales and Mortierellales based on combined analysis of actin and translation elongation factor EF-1 alpha genes. Gene 270: 113-120.
- WADA M, BEPPU T, HORINOUCHI S (1996) Integrative transformation of the zygomycete *Rhizomucor pusillus* by homologous recombination. Appl Microbiol Biotechnol 45: 652–657.
- WALDORF AR, RUDERMAN N AND DIAMOND RD (1984) Specific susceptibility to mucormycosis in murine diabetes and bronchoalveolar defense against *Rhizopus*. J Clin Investig 74: 150-160.
- WALSH TJ AND GROLL AH (1999) Emerging fungal pathogens: evolving challenges to immunocompromised patients for the twenty-first century. Transpl Infect Dis 1: 217-261.
- WALSH TJ, GROLL A, HIEMENZ J, FLEMING R, ROILIDES E, ANAISSIE E (2004) Infections due to emerging and uncommon medically important fungal pathogens. Clin Microbiol Infect 10(S1): 48-66.
- WEINBERG ED (1999) The role of iron in protozoan and fungal infectious diseases. J Eukaryot Microbiol 46: 231-238.
- WEITZMAN I, DELLA-LATTA P, HOUSEY G AND REBATTA G (1993) *Mucor ramosissimus* Samutsevitsch isolated from a thight lesion. J Clin Microbiol 31: 2523-2525.
- WHITE MM, JAMES TY, O'DONNELL K, CAFARO MJ, TANABE Y, SUGIYAMA J (2006) Phylogeny of the zygomycota based on nuclear ribosomal sequence data. Mycologia 98(6): 872-884.
- WHITEWAY DE, VIRATA RL AND WRISS LC (1979) Mucormycosis. Arch Intern Med 139: 944-956.
- WILSON T, RABIE CJ, FINCHAM JE, STEYN PS, SCHIPPER MA (1984) Toxicity of rhizonin A, isolated from *Rhizopus microsporus* in laboratory animals. Food Chem Toxicol 22: 275–281.
- WOLF AM AND ARNAU J (2002) Cloning of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenaseencoding genes in *Mucor circinelloides* (Syn. *racemosus*) and use of the *gpd1* promoter in recombinant protein production. Fungal Genet Biol 35: 21-29.
- WÖSTEMEYER J, BURMESTER A, WEIGEL C (1987) Neomycin resistance as a dominantly selectable marker for transformation of the zygomycete *Absidia glauca*. Curr Genet 12: 625–627.
- WU Z, TSUMURA Y, BLOMQUIST G, WANG X-R (2003) 18S rRNA gene variation among common airborne fungi, and development of specific oligonucleotide probes for the detection of fungal isolates. Appl Environ Microbiol 69: 5389–5397.
- YAMAGUCHI-IWAI Y, DANCIS A, KLAUSNER RD (1995) AFT1: a mediator of iron regulated transcriptional control in *Saccharomyces cerevisiae*. EMBO J 14: 1231-1239.

- YAMAZAKI H, OHNISHI Y, TAKEUCHI K, MORI N, SHIRAISHI N, SAKATA Y, SUZUKI H, HORINOUCHI S (1999) Genetic transformation of a *Rhizomucor pusillus* mutant defective in asparagine-linked glycosylation: production of a milk-clotting enzyme in a less-glycosylated form. Appl Microbiol Biotechnol 52: 401–409.
- YANAI K, HORIUCHI H, TAKAGI M, YANO K (1990) Preperation of protoplasts of *Rhizopus niveus* and their transformation with plasmid DNA. Agric Biol Chem 54: 2689–2696.
- YANAI K, HORIUCHI H, TAKAGI M, YANO K (1991) Transformation of *Rhizopus niveus* using a bacterial blasticidin S resistance gene as a dominant selectable marker. Curr Genet 19: 221–226.
- YUN CW, TIEDERMAN JS, MOORE RE, PHILPOTT CC (2000b) Siderophore-iron uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. Identification of ferrichrome and fusarinine transporters. J Biol Chem 275: 16354-16359.
- YUN CW, BAULER M, MOORE RE, KLEBBA PE, PHILPOTT CC (2001) The role of the *FRE* family of plasma membrane reductases in the uptake of siderophore-iron in *Saccharomyces cerevisiae*. J Biol Chem 276: 10218-10223.
- ZWIERS LH AND DE WAARD MA (2001) Efficient Agrobacterium tumefaciens-mediated gene disruption in the phytopathogen Mycosphaerella graminicola. Curr Genet 39: 388–393.

10. Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt köszönettel tartozom Dr. Ferenczy Lajos és Dr. Kevei Ferenc professzor uraknak, akik sajnos már nincsenek közöttünk, hogy még szakdolgozóként lehetővé tették munkám megkezdését a Mikrobiológiai Tanszéken.

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőimnek, Dr. Vágvölgyi Csabának és Dr. Papp Tamásnak, hogy a munkámat mindvégig támogatták, és figyelemmel kísérték, értékes elméleti és gyakorlati útmutatásaikkal minden segítséget megadtak munkám sikeres elvégzéséhez.

Hálával tartozom Dr. Ács Klárának, aki bevezetett a molekuláris biológia rejtelmeibe és megosztotta velem gyakorlati ismereteit tanulmányaim kezdetén. Köszönöm Dr. Juhász Ákosnak, Lukács Gyöngyinek és Csernetics Árpádnak a sok hasznos tanácsot, ötletadó beszélgetést és a közös munkát. Külön köszönöm barátságukat, önzetlen segítségüket és a lelki támogatást, amellyel gyakran adtak erőt munkám folytatásához. Köszönöm minden közvetlen munkatársamnak, Dr. Kasza Zsoltnak, Péteri Zsanettnek, Linka Beátának, Takó Miklósnak, Kocsubé Sándornak, Dr. Galgóczy Lászlónak és Krizsán Krisztinának a laborban nyújtott segítségüket.

Köszönettel tartozom Szvetnik Attilának, hogy lehetővé tette az elektroporálások elvégzését a Bay Zoltán Biotechnológiai Központban, és ezekben segítségemre volt.

Köszönetemet fejezem ki Lele Máriának és Deákné Kulcsár Melindának a munkám során nyújtott technikai segítségért, valamint Dr. Palágyi Andrásnénak és Kreisch Istvánnénak, hogy a munkámmal kapcsolatos hivatalos ügyeket intézték.

És végezetül, de nem utolsó sorban hálával és köszönettel tartozom szüleimnek, akik egész életem folyamán megértéssel és önzetlen segítséggel támogattak, és szeretetükkel mindvégig biztos hátteret nyújtottak.

11. Mellékletek

1. melléklet: Különböző járomspórás gombák részleges *ftr1* szekvenciáinak összehasonlítása CLUSTAL W program segítségével.

A sárga és kék jelölések olyan karakterisztikus szekvencia részleteket jelölnek, amelyek alapul szolgáltak a fajspecifikus primerek tervezésekor.

Rdel*: FU és mtsi. (2004) által közölt *Rh. oryzae* 99-880 (*Rh. delemar*) törzs megfelelő régiója (EMBL azonosító: AY3445879)

		10	2	20	30)	40		50		60		70		80		90	100
		$\cdot \cdot \cdot \cdot $
в1	GAGGACAT	TTGGGA	AGGCT	TTTC	CGCTAC	TTGCCA	CCATCA	TGATC	ACTGT	CATGG	G <mark>CTTA</mark> (CTATO	CTGAG	CACAG	AAAG	AATGC	AAGAG	AAATGGA
M15	GAGGATAT	TTGGGA	AGGCT	TTTC	CGCTAC	TTGCCA	CCATCA	TGATC	ACTGT	CATGG	G <mark>CTTA</mark> (CTATO	CTGAG	AACAG	AAAG	AATGC	AAGAG	AAATGGA
M16	GAGGATAT	TTGGGA	AGGCT	TTTC	CGCTAG	TTGCCA	CCATCA	TGATC	ACTGT	CATGG	GCTTA	CTAT	CTGAG	AACAG	AAAG	AATGC	AAGAG	AAATGGA
м20	GAGGATAT	ATGGGA	GGGCT	CTTC	CGCTT C	TTGCCA	CCATCA	TGATT	ACTGT	CATGG	GTCTG	CTAT	CTCAG	AACTG	AAAG	AATGC	AAGAG	AAATGGA
M52	GAGGATAT	TTGGGA	GGGCT	CTTC	CGCTT	TTGCCA	CCATCA	TGATT	ACTGT	CATGG	GTCTG	CTAT	CTCAG	AACTG	AAAG	AATGC	AAGAG	AAATGGA
M4	GAGGATAT	ATGGGA	AGGTT	TTTC	CTCTT C	TGGCTA	CCATTA	TGATT	ACTGT:	TATGG	GTTTA	CTAT	CTTAG	AACTG	AAAG	AATGC	AAGAG	AAATGGA
Rh27	GAGGATAT	ATGGGA	GGGTGT	TATTC	CACTT C	TAGCCA	CAATTA	TGATT	ACAGT	AATGG	GTATC	ACCATO	CTTCG	AACTG	AAAG	AATGC	AAGAA	AAGTGGA
Rh48	GAGGATAT	CTGGGA	AGGTG	CTTC	CTCTG	TTGCT G	TGATC?	TGATC	ACTGC	<mark>CAT</mark> GG	GTCTT	CTAT	CTCAA	GACAG	AACG	FATGC	AAGAA	AAGTGGA
Rh49	GAGGTTAT	TTGGGA	AGGTG	CTTC	CTCTG	TTGCT G	TGATCA	TGATC	ACTGC	CATGG	GTCTT	CTAT	CTCAA	GACAG	AACG	TATGC	AAGAA	AAGTGGA
Rh24	GAGGATAT	CTGGGA	AGGTG	CTTC	CTCTG	TTGCT G	TGATCA	TGATC	ACTGC	CATGG	GTCTT	CTAT	CTCAA	GACAG	AACG	TATGC	AAGAA	AAGTGGA
Rh28	GAGGATAT	TTGGGA	GGGTG	CTTC	CTCTGG	TTGCTG	TGATCA	TGATC	ACTGC	CAT GG	GTCTT	CTAT	CTCAA	GACAG	AACG	TATGC	AAGAA	AAGTGGA
Rh18	GAAGATAT	ATGGGA	AGGTG	CTTC	CTCTGG	TTGCTG	TGATCA	TGATC	ACTGC	CAT GG	GTCTT	CTAT	CTCAA	GACGG	AACG	TATGC	AAGAA	AAGTGGA
Rh59	GAGGATAT	TTGGGA	GGGTGT	CTTC	CTCTG	TTGCT G	TGATC?	TGATC	ACTGC	<mark>CAT</mark> GG	GTCTT	CTAT	CTCAA	GACGG	AACG	FATGC	AAGAA	AAGTGGA
Rh50	GAAGATAT	ATGGGA	AGGTG	CTTC	CTCTG	TTGCT G	TGATCA	TGATC	ACTGC	CATGG	GTCTT	CTAT	CTCAA	GACAG	AACG	TATGC	AAGAA	AAGTGGA
Rh61	GAGGATAT	ATGGGA	GGGTG	CTTC	CTCTGG	TTGCTG	TGATCA	TGATC	ACTGC	CAT GG	GTCTT	CTAT	CTCAA	GACAG	AACG	TATGC	AAGAA	AAGTGGA
Rh60	GAGGATAT	TTGGGA	GGGTG	CTTC	CTCTGG	TTGCTG	TGATCA	TGATC	ACTGC	CAT GG	GTCTT	CTAT	CTCAA	GACTG	AACG	TATGC	AAGAA	AAGTGGA
Rdel*	GAAGATAT	CTGGGA	AGGTG	CTTC	CTCTGG	TTGCTG	TGATCA	TGATC	ACTGC	CATGG	GTCTT	CTAT	CTCAA	GACTG	AACG	TATGC	AAGAA	AAGTGGA
Rh42	GAGGATAT	TTGGGA	AGGTG	CTTTT	ICTCTT	TTGCTG	TGCTTA	TGATT	ACCGT:	TATGG	GTCTT	CTAT	CTTAA	AACCG	AACG	TATGC	AAGAA	AAGTGGA
Rh45	GAGGACAT	TTGGGA	AGGTG	CTTC	ICCCTCC	TTGCT G	TTCTT	TGATT	ACAGT:	TATGG	GTCTC	CTAT	CTTAA	AACCG	AACG	FATGC	AAGAA	AAGTGGA
Rh40	GAGGATAT	TTGGGA	AGGTA	CTTC	ICTCTT C	TAGCCA	CTATCA	TGATT	ACTGT	CATGG	GTCTC	CTAT	CTCAA	GACTG	AACG	TATGC	AAGAA	AAATGGA
Rh58	GAGGACAT	TTGGGA	GGGTG	CTTC	ICCTTGG	TCGCTG	TCATCA	TGATC	ACTGT:	TATGG	GTCTC	CTAT	CTTAA	AACCG	AACG	TATGC	AAGAA	AAGTGGA
Rh64	GAGGATAT	ATGGGA	GGGTG	CTTC1	ICCTTGG	TCGCTG	TCATCA	TGATC	ACTGT:	TATGG	GTCTC	CTAT	CTTAA	AACCG	AACG	TATGC	AAGAA	AAGTGGA
Rh62	GAGGACAT	ATGGGA	GGGCG:	TTTTC1	r <mark>CTTT</mark> GG	TCGCTG	TCATCA	TGATT	ACCGC	GATGG	GTCTC	CCAT	CTCAA	AACTG	AACG	TATGC	AGGAA	AAATGGA
Rh63	GAGGACAT	ATGGGA	GGG <mark>C</mark> G'	TTTC	r <mark>CTTT</mark> GG	TCGCTG	TCATCA	TGATT	ACCGC	GATGG	GTCTC	CCAT	CTCAA	AACTG	AACG	TATGC	AGGAA	AAATGGA
S1	GAGGATAT	CTGGGA	AGGTG	CTTC	CGCTT?	ATTGCTA	CGCTGA	TGATT	ACCGT	CATGG	GCCTT	CTAT	CTGCG	AACGG	AACG	TATGC	AAGAT	AAGTGGA
R15	GAAGATAT	ATGGGA	AGGTG	CTTC1	CCTTGP	ATCGCTG	TTATT	TGATT	ACTGT	AATGG	GTCTT	CTATO	CTCCG	CACCG	AACG	FATGC	AAGAA	AAATGGA
R18	GAGGATAT	ATGGGA	AGGTG	CTTC1	rccttg/	TTGCC G	TAATTA	TGATC	ACCGC	AATGG	GTCTC	CTAT	CTCAA	GACTG	AACG	TATGC	AAGAA	AAATGGA

	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
		.				.				.
в1	AGATCAAGCTAGC	AAGAGCCAT	GGAGGAAAA	GGGT	-CAAAAGATC	<mark>GGTTTCAA</mark> G	GCCTGGATGC	AAAAGTACTCGT	TCTTCTTTC	FCCCATT
M15	AGATCAAGCTAGC	AAGAGCCAT	GGAGGAAAA	GGGT	-CAAAAGATC	<mark>GGTTTCAA</mark> G	GCCTGGATGC	AAAAGTACTCGT	TCTTCTTTC	FCCCATT
M16	AGATCAAGCTAGC	AAGAGCCAT	GGAGGAAAA	GGGT	-CAAAAGATC	<mark>GGTTTCAA</mark> G	GCCTGGATGC	AAAAGTACTCGT	TCTTCTTTC	FCCCATT
M20	AGGTCAAATTAGC	AAAGACCAT	GAAGAAAA	GGG <mark>C</mark>	-CAAAAGATT	GGATTCAA	GCTTGGATGC2	AAAAGTACTCAT	TCTTCTTTC	FTCCATT
M52	AGGTCAAATTAGC	AAAGACCAT	GAAGAAAA	GGG <mark>C</mark>	-CAAAAGATT	GGATTCAA	GCTTGGATGC2	AAAAGTACTCAT	TCTTCTTTC	FTCCATT
M4	AGGTTAAATTAGC	AAAAACTATC	GAGCAAAA	GGGT	-CAAAAGATT	<mark>GGTTTGAA</mark> G	GCTTGGATGC2	AAAATACTCCT	TTTTCTTCC	TT <mark>CC</mark> TTT
Rh27	AGCTCAAATTAGC	CAAGTCGAT	GAAAACAA	ААА <mark>С</mark> АААА	AACAAAAATTG	GGATTTAAG	GCATGGATGC	AAAGTACTCCT	TTTT <mark>C</mark> TTTT'	FACCGTT
Rh48	AGGTCAAGTTGGC	TAAAGCAATO	GCAAAAGTC	CAACAGT	GAAAAG <mark>TC</mark> A	TCCTTTAAA	AGAAAAACTTC/	AAAATACGCGT	TCTTTGTCT'	FG<mark>CC</mark>TTT
Rh49	AGGTCAAGTTGGC	TAAAGCAAT	GCAAAAGTC	CAACAGT	GAAAAG <mark>TC</mark> A	TCCTTTAAA	AGAAAAACTTC/	AAAAATACGCGT	TCTTTGTCT'	FG<mark>CC</mark>TTT
Rh24	AGGTCAAGTTGGC	TAAAGCAAT	GCAAAAGTC	CAACAGT	GAAAAG <mark>TC</mark> A	TCCTTTAAA	AGAAAAACTTC/	AAAATACGCGT	TCTTTGTCT:	FG<mark>CC</mark>TTT
Rh28	AGGTCAAGTTGGC	TAAAGCAATO	GCAAAAGTC	CAACAGT	GAAAAG <mark>TC</mark> A	TCCTTTAAA	AGAAAAACTTC/	AAAATACGCGT	TCTTTGTCT'	FG<mark>CC</mark>TTT
Rh18	AGGTCAAGTTGGC	TAAAGCAATO	GCAAAAGTC	CAACAGT	AAAAAG <mark>TC</mark> A	TCCTTTAAA	AGAAAAACTTC/	AAAATACGCGT	TCTTTGTCT'	FG<mark>CC</mark>TTT
Rh59	AGGTCAAGTTGGC	TAAAGCAATO	GCAAAAGTC	CAACAGT	GAAAAG <mark>TC</mark> A	TCCTTTAAA	AGAAAAACTTC/	AAAATACGCGT	TCTTTGTCT'	FG<mark>CC</mark>TTT
Rh50	AGGTCAAGTTGGC	TAAAGCAAT	GCAAAAGTC	CAACAGT	GAAAAG <mark>TC</mark> A	TCCTTTAAA	AGGAAAACTTC/	AAAAATACGCGT	TCTTTGTCT'	FG<mark>CC</mark>TTT
Rh61	AGGTCAAGTTGGC	TAAAGCAAT	GCAAAAGTC	CAACAGT	GAAAAG <mark>TT</mark> A	TCCTTTAAA	AGAAAAACTTC/	AAAAATACGCGT	TCTTTGTCT'	FG<mark>CC</mark>TTT
Rh60	AGGTCAAGTTGGC	TAAAGCAAT	GCAAAAGTC	CAACAGT	GAAAAG <mark>TC</mark> A	TCCTTTAAA	AGAAAAACTTC/	AAAAATACGCGT	TCTTTGTCT	FG<mark>CC</mark>TTT
Rdel*	AGGTCAAGTTGGC	TAAAGCAATO	GCAAAAGTC	CAACAGT	GAAAAG <mark>TC</mark> A	TCCTTTAAA	AGAAAAACTTC/	AAAATACGCGT	TCTTTGTCT'	FG<mark>CC</mark>TTT
Rh42	AGGTCAAGTTGGC	CAAGGCTAT	GCAAAAGTC	CAGTGAA	GAAAA <mark>GTCC</mark>	AACTTCAAG	<mark>GAAAAGAT</mark> GCI	AAAAGTACGCTT	TCTTCATTT'	FACCCTT
Rh45	AGGTCAAGTTGGC	CAAGGCTAT	CAAAAATC	TAAAGAA	GAAAA <mark>GTCC</mark>	AACTTTAAC	<mark>GAAAAGAT</mark> GCI	AAAAGTACGCTT	TCTTCATCT	FG<mark>CC</mark>TTT
Rh40	AAGTCAAATTAGC	CAAGGCTAT	CAAAAGGA	CT <mark>CGCAA</mark>	GAGCGTTCT	TCTTTCAAG	GAAAAG <mark>CTTC</mark> A	AAGATATGCTT	TCTTTGTTT'	FG<mark>CC</mark>ATT
Rh58	AAGTCAAATTAGC	AAAGGCAAT	GCAAAAGTC	CAGCTCT	GAAAAAACC	ACCTTCAAA	AGACAAACTCC/	A <mark>GAAG</mark> TACGCTT	TCTTTGTTT'	IGCCCTT
Rh64	AAGTCAAATTAGC	AAAGGCAAT	GCAAAAGTC	CAGCTCT	GAAAAAACC	ACCTTCAAA	AGACAAACTCC/	A <mark>GAAG</mark> TACGCTT	TCTTTGTTT'	IGCCCTT
Rh62	AGGTCAAGTTGGC	AAAGGCAAT	3CAAAAAT <mark>C</mark>	TAGCACT	GAAAAGACT	<mark>GGCT</mark> TTAAA	AGAAAAG <mark>CTTC</mark> A	AGAAA <mark>T</mark> ACGCCC	TTTTTGTCT'	FACCCTT
Rh63	AGGTCAAGTTGGC	AAAGGCAAT	3CAAAAAT <mark>C</mark>	TAGCACT	GAAAAGACT	<mark>GGCT</mark> TTAAA	AGAAAAGCTTC/	AGAAA <mark>TACGCCT</mark>	TTTTTGTCT'	FACCCTT
S1	AGTTCAAGCTCGC	CAAGGCCAT	GAGG <mark>CC</mark> AAGAC	GATGG	JAGAA <mark>GAAGAC</mark>	ACTTAGC	GCACGCATGC	AAAAGTACGCTT	TCTTTCTGC	FG<mark>CC</mark>ATT
R15	AGATCAAGCTCGC	CAAGGCCAT	GAAACCGATGC	TTTGCAGCO	GAACGAAAA	ACCTGGAAG	GTTCGAATGC	ACGTTACTCCT	TCTTCGTCT'	IGCCTTT
R18	AGATCAAGCTCGC	CAAGGCTAT	GAAACCGATGC	CTTGCAACG	CGATAAAAGA	ACTTGGAAG	GTTCGCATGC	ACGATACTCCT	TCTTCCTCT	IG<mark>CC</mark>TTT

	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
						.				.
в1	CATCACTGTCCTGAGAG	GAGGGCCTTGA	AGCGGTTG	IGTTTATCGG	TGGTGT					
M15	CATCACTGTCCTGAGAG	GAGGGCCTTGA	AGCGGTTG	IGTTTATCGG	TGGTGT					
M16	CATCACTGTCCTGAGAG	GAGGG <mark>TCTT</mark> GA	AGCGGTTG	IGTTTATCGG	CGGTGT					
M20	CATTACTGTACTGAGAG	GAAGG <mark>TCTC</mark> GA	AGCGGTTG	FCTTTATTGO	CGGTGT					
M52	CATTACTGTACTGAGAG	GAAGG <mark>TCTC</mark> GA	AGCGGTTG	FCTTTATTGO	CGGTGT					
м4	CATTACAGTATTAAGAG	GAAGGCCTTGA	AGCTGTTG	FATTCATTGO	TGGTGT					
Rh27	CATTACTGTTTTACGAG	GAAGG <mark>TCT</mark> AGA	AGCTGTTG	FCTTTATTGO	TGGTGT					
Rh48	TATCACCGTTCTCAGAG	GAAGGA <mark>TT</mark> GGA	AGCGGTTG	FCTTTATTGO	TGGTGT					
Rh49	TATCACCGTTCTCAGAG	GAAGGG <mark>CTT</mark> GA	AGCGGTTG	FCTTTATTGO	TGGTGT					
Rh24	TATCACCGTTCTCAGAG	GAAGGG<mark>CTT</mark>GA	AGCGGTTG	ICTTTATTGO	TGGTGT					
Rh28	TATCACCGTTCTCAGAG	GAAGGG<mark>CTT</mark>GA	AGCGGTTG	ICTTTATTGO	TGGTGT					
Rh18	TATCACCGTTCTCAGAG	GAAGGA<mark>CTT</mark>GA	AGCGGTTG	ICTTTATTGO	TGGTGT					
Rh59	TATCACCGTTCTCAGAG	GAAGGA<mark>CTT</mark>GA	AGCGGTTG	ICTTTATTGO	TGGTGT					
Rh50	TATCACCGTTCTCAGAG	GAAGGA <mark>TT</mark> GGA	AGCGGTTG	FCTTTATTGO	TGGTGT					
Rh61	TATCACCGTTCTCAGAG	GAAGGA <mark>TT</mark> GGA	AGCGGTTG	FCTTTATTGO	TGGTGT					
Rh60	TATCACCGTTCTCAGAG	GAAGGTCTTGA	AGCTGTTG	ICTTTATTGO	TGGTGT					
Rdel*	TATCACCGTTCTCAGAG	GAAGGA<mark>CTT</mark>GA	AGCTGTTG	ICTTTATTGO	TGGTGT					
Rh42	TATTACTGTTCTCAGAG	GAAGGTCTTGA	AGCCGTTG	TTTTTGTTGG	TGGTGT					
Rh45	CATCACCGTACTCAGAG	GAGG<mark>TCTC</mark>GA	AGCTGTTG	ICTTTGTTGG	TGGTGT					
Rh40	CATCACCGTTCTTAGAC	GAAGG<mark>CCTT</mark>GA	AGCTGTTG	ICTTTATTGO	TGGTGT					
Rh58	CATCACTGTTCTAAGAG	GAAGG<mark>CCTT</mark>GA	AGCCGTTG	IGTTCATTGO	AGGTGT					
Rh64	CATCACTGTTCTAAGAG	GAAGG <mark>CCTT</mark> GA	AGCCGTTG	IGTTCATTGO	AGGTGT					
Rh62	TGTCACTGTACTCAGAG	JAAGGTCTTGA	AGCCGTTG	TATTCATCGO	TGGTGT					
Rh63	TGTCACTGTACTCAGAG	JAAGGTCTTGA	AGCCGTTG	TATTCATCGO	TGGTGT					
S1	CATCACCGTGCTCCGT	JAAGGTCTTGA	GGCCGTTG	rcttcgtcgg	TGGTGTAA	GTGAAATAGAAT	GACT	TATCATTGAT	CTAAGCTA.	ACAGGTT
R15	CGTTACTGTGCTCCGT	JAAGG<mark>TC</mark>TTGA	AGCTGTCG	TTTTCATCGO	TGGTGTAA	GTAGTTGAAATG	ATA-CGTCTT	TAATTTTACC	CT-TTCTC	AA <mark>CTC</mark> AG
R18	CATCACTGTCCTTCGT	JAAGG<mark>TC</mark>TTGA	AGCTGTCG	TTTTCATCGO	TGGTGTAA	GTCGCAAACCTT	TTAGC GGAAA	CATTTTTGTT	GTGTTCTT.	ACCTGAG

	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400
в1		-ATCTCTGGA	CGTTCAGGC	AAAA <mark>TC</mark> AAT	TCCTATTGC	TGCCATCATG	GTTTCCTCTG	TGGTTGTGCT	GTTGGTTTGC	JTCATT
M15		-ATCTCTGGA	CGTTCAGGC	AAAA <mark>TC</mark> AAT	TCCTATTGC	TGCCATCATG	GTTTCCTCTG	TGGTTGTGCT	GTTGGTTTGC	JTCATT
M16		-ATCTCTGGA	CGTTCAGGC	AAAA <mark>TC</mark> AAT	TCCTATTGC	TGCCATCATG	GTTTCCTCTG	TGGTTGTGCT	GTTGGTTTGC	TCATT
M20		-ATCTCTGGA	TGTGCAAGC	AAAG <mark>TC</mark> GAT	CCCCATTGC	TGCTATCATG	GATTCATCTG	TGGTTGTGCT	GTCGGCTTGC	TCATT
M52		-ATCTCTGGA	TGTGCAAGC	AAAG <mark>TC</mark> GAT	CCCCATTGC	TGCTATCATG	GATTCATCTG	TGGTTGTGCT	GTCGGCTTGC	JTCATT
м4		-ATCTCTTAA	TGTTCAAGC	CAAGTCAAT	TCCTATTGC	TGCTATTATG	GGGTTTCTCTG	TGGTTGTGCT	G <mark>TC</mark> GGATTGC	JTTATT
Rh27		-ATCTTTAAA	TATTGCAGC	TAAATCCAT	TCTTCTCGC	AGCTATAATG	GATTATTTG	IGGTTGTATT	GTTGGCTAT?	TTATT
Rh48		-CTCCTTGGG	TATTCAAGG	AAAATCAAT	TCCTATTGC	TGCCATCATG	GTATCATCTG	TGGTTGTTTG	GTCGGTTTC	TTATT
Rh49		-CTCCTTGGG	TATTCAAGG.	AAAATCAAT	TCCTATTGC	TGCCATCATG	GTATCGTCTG	IGGTTGTTTG	GTCGGTTTC	TTATT
Rh24		-CTCCTTGGG	TATTCAAGG	AAAATCAAT	TCCTATTGC	TGCCATCATG	GTATCATCTG	IGGTTGTTTG	GTCGGTTTC	TTATT
Rh28		-CTCCTTGGG	TATTCAAGG	AAAAT <mark>C</mark> AAT	TCCTATTGC	TGCCATCATG	GTATCATCTG	IGGTTGTTTG	GTCGGTTTC	TTATT
Rh18		-CTCCTTGGG	TATTCAAGG	AAAAT <mark>C</mark> AAT	TCCTATTGC	TGCCATCATG	GTATCATCTG	IGGTTGTTTG	GTCGGTTTC	TTATT
Rh59		-CTCCTTGGG	TATTCAAGG	AAAAT <mark>C</mark> AAT	TCCTATTGC	TGCCATCATG	GTATCATCTG	IGGTTGTTTG	GTCGGTTTC	TTATT
Rh50		-CTCCTTGGG	TATTCAAGG	AAAATCAAT	TCCTATTGC	TGCCATCATG	GTATCATCTG	IGGTTGTTTG	GTCGGTTTC	TTATT
Rh61		-CTCCTTGGG	TATTCAAGG	AAAATCAAT	TCCTATTGC	TGCCATCATG	GTATCATCTG	IGGTTGTTTG	GTCGGTTTC	TTATT
Rh60		-CTCCTTGGG	TATCCAAGG	AAAAT <mark>C</mark> AAT	TCCTATTGC	TGCCATCATG	GTATCATCTG	IGGTTGTTTG	GTCGGTTTC	TTATT
Rdel*		-CTCCTTGGG	TATCCAAGG	AAAAT <mark>C</mark> AAT	TCCTATTGC	TGCCATCATG	GTATCATCTG	IGGTTGTTTG	GTCGGTTTC	TTATT
Rh42		-CTCTTTGGG	TATTACTGC	CAAGTCAAT	TCCTATTGC	TGCTATCATG	GTATCCTTTG:	IGGTTGTTTG	GTTGGTCTC	TTATT
Rh45		-CTCTTTGGG	TATTACTGC	CAAGTCAAT	TCCTATTGC	TGCCATCATG	GTATCCTTTG:	IGATTGTTTG	GTCGGTGTC	TTATC
Rh40		-CTCTTTGGG	TATTTCTGG	CAAGTCTAT	TCCTATTGC	TGCCATCATG	GTATTGTTTG	CGGTTGTTTG	GTTGGTTTG	TTATT
Rh58		-TTCCTTGGG	TATTCAAGG	TAAATCCAT	CCCCATTGC	TGCTATCATG	GTATCATCTG	IGGTGCCTTG	GTTGGTTTC	TTATC
Rh64		-TTCCTTGGG	TATTCAAGG	TAAATCCAT	CCCCATTGC	TGCTATCATG	GTATCATCTG	IGGTGCCTTG	GTTGGTTTC	TTATC
Rh62		-CTCCTTGGG	TGTTCAAGG	TAAATCCAT	TCCTATCGC	TGCTATCATG	GTATCATCTG	TGGTG <mark>CC</mark> TTG	GTCGGTTTC	TCATC
Rh63		-CTCCTTGGG	TGTTCAAGG	TAAATCCAT	TCCTATCGC	TGCTATCATG	GTATCATCTG	IGGIGCCIIG	GTCGGTTTC	TCATC
S1	TTGATTTAACAGG	TTTCTCTCGA	CGTCCAAGC	CAAGTCTAT	CCCAATTGC	GACCATTATG	GCTTCATTTG	CGGCTGTCTT	GTCGGTTTC	TGATC
R15	GAATCTTAGG	TCTCCTTGAA	CGTCCAAGC	CAAGTCCAT	CCCCATTGC	CGCTATCATG	JGCTTCATCTG	IGGATGTCTC	GTCGGTTTC2	ATCATT
R18	AATCTTTTCTACATAGG	TCTCCTTGAA	CGTCCAAGC'	TAAATCTAT	TCCTATTGC	TGCCATTATG	GTTTCATCTG	TGGATGCCTC	GTCGGTTTC2	ATCATT

	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500
	· · · · · · · · · ·	<u> </u>
в1	T <mark>ATCGCGGTGGA</mark>	<mark>AGTCTGTTGC</mark> A	ATTGCGCCGG	TTTTTCATCAT	CTCCACCATC	ATTTTGTAC	CTCGTTGCTGC1	GGTTTGATGG	CAAAGGCTC	JTTGGTT
M15	T <mark>ATCGCGGTGGA</mark>	<mark>AGTCTGTTGC</mark> A	ATTGCGCTGG	TTTTTCATCAT	CTCCACCATC	ATTTTGTAC	CTCGTTGCTGCT	GGTTTGATGG	CAAAGGCTC	JTTGGTT
M16	T <mark>ATCGCGGTGGA</mark>	<mark>AGTCTGTTGC</mark> A	ATTGCGCTGG	TTTTTCATCAT	CTCCACCATC	ATTTTGTAC	CTCGTTGCTGC1	GGTTTGATGG	CAAAGGCTC	JTTGGTT
M20	T <mark>ATCGCGGTGGA</mark>	<mark>AGTCTGTTGC</mark> A	CTTGCGTTGG	TTTTTCATCAT	CTCTACCATC	ATCCTGTAT	CTCGTAGCTGCT	GGTTTGATGG	CAAAGGCT	GTGGGCT
M52	T <mark>ATCGCGGTGGA</mark>	<mark>AGTCTGTTGC</mark> A	CTTGCGTTGG1	TTTTTCATCAT	CTCTACCATC	ATCCTGTAT	CTCGTAGCTGCT	GGTTTGATGG	CAAAGGCTC	TGGGCT
м4	T <mark>ATCGAGGTGGA</mark>	<mark>AGTCTTTTGC</mark> A	TTTGCGTTGG1	TTCTTTATTAT'	TTCTACTATT	ATTTTGTAC	TGGTTGCTGCT	GGTCTAATGT	CAAAGGCTC	JTTGGTT
Rh27	TATCGTGGTGGT	AGTTTAATCAA	ATTGCGTTGG	TTTTTTATTAT'	TTCCACTATT	ATATTATAT'	TAGTTGCTGC1	GGTTTAATGI	CAAAAGCTO	TTGGGT
Rh48	TACCGAGGTGGT	TCCTTGATTCA	ACTCCGTTGG	TTCTTTGTGTT	CTCTACCGTC	TTCTTTAC	CTTGTCGCTGC1	GGTTTGATGG	CTAAAGGT	TTGGTT
Rh49	TACCGTGGTGGT	TCCTTGATTCA	ACTCCGTTGGT	TTCTTTGTGTT	CTCTACCGTC	TTCTTTAC	CTTGTCGCTGC1	GGTTTGATGG	CTAAAGGT	TTGGTT
Rh24	TACCGTGGTGGT	TCCTTGATTCA	ACTCCGTTGG	TTCTTTGTGTT	CTCTACCGTC	TTCTTTAC	CTTGTCGCTGCT	GGTTTGATGG	CTAAAGGT	JTTGGTT
Rh28	TACCGTGGTGGT	TCCTTGATTCA	ACTCCGTTGG	TTCTTTGTGTT	CTCTACCGTC	TTCTTTAC	CTTGTCGCTGCT	GGTTTGATGG	CTAAAGGT	JTTGGTT
Rh18	TACCGTGGTGGT	TCCTTGGTTCA	ACTCCGTTGG	TTCTTTGTGTT	CTCTACCGTC	TTCTTTAC	CTTGTCGCTGCT	GGTTTGATGG	CTAAAGGT	JTTGGTT
Rh59	TACCGTGGTGGT	TCCTTGATTCA	ACTCCGTTGGT	TTCTTTGTGTT	CTCTACCGTC	TTCTTTAC	CTTGTCGCTGC1	GGTTTGATGG	CTAAAGGT	TTGGTT
Rh50	TACCGTGGTGGT	TCCTTGATTCA	ACTCCGTTGGT	TTCTTTGTGTT	CTCTACCGTC	TTCTTTAC	TTGTCGCTGCT	GGTTTGATGG	CTAAAGGT	JTTGGTT
Rh61	TACCGTGGTGGT	TCCTTGATTCA	ACTCCGTTGGT	TTCTTTGTGTT	CTCTACCGTC	TTCTTTAC	TTGTCGCTGCT	GGTTTGATGG	CTAAAGGT	JTTGGTT
Rh60	TACCGTGGTGGT	TCCTTGATTCA	ACTTCGTTGGT	TTCTTTGTGTT	CTCTACTGCC	TTCTTTAC	CTTGTCGCTGCT	GGTTTGATGG	CTAGAGGT	JTTGGTT
Rdel*	TACCGTGGTGGT	TCCTTGATTCA	ACTTCGTTGGT	TTCTTTGTGTT	CTCTACTGTC	TTCTTTAC	CTTGTCGCTGC1	GGTTTGATGG	CTAAAGGT	TTGGTT
Rh42	TACCGTGGTGGT	AAATTGATTCA	ACCTTCGTTGG1	TTCTTTGTTTT	CTCTACTGTT	ATTCTTTAC	TTGTTGCTGCT	GGTTTAATGG	CTAAAGGT	TTGGTT
Rh45	TATCGTGGTGGT	TCCTTGATTCA	ACTTCGTTGGT	TTTTTTGTTTT	CTCTACTGTC	ATTCTTTAC	TTGTCGCTGCT	GGTTTGATGG	CTAAGGGC	JTTGGTT
Rh40	TATCGTGGTGGT.	AAATTGATTCA	ACTTCGTTGGT	TTCTTTGTCTT	CTCTACTGTT	ATTCTTTAC	TTGTTGCCGC	GGTTTGATGT	CTAAGGGT	JTTGGTT
Rh58	TACCGTGGTGGT	TCCTTGATTCA	GCTTCGCT GG	TTCTTTGTTTTC	CTCAACTGTC	ATTCTTTAC	TTGTTGCTGCT	GGTTTAATGT	CCAAGGCTC	TC GGTT
Rh64	TACCGTGGTGGT	TCCTTGATTCA	AGCTTCGCTGG1	TTCTTTGTTTT	CTCAACTGTC	ATTCTTTAC	TTGTTGCTGCT	GGTTTAATGT	CCAAGGCTC	TCGGTT
Rh62	TACCGTGGTGGT	TCTCTGATCCA	ACTCCGATGG	TTCTTTGTTTTC	CTCCACTGTC	ATCCTTTAC	TCGTCGCTGCC	GGTTTGATGI	CCAAGGCTC	JTTGGTT
Rh63	TACCGTGGTGGT	TCTCTGATCCA	ACTTCGATGG	TTCTTTGTTTTC	CTCCACTGTT	ATCCTTTAC	TCGTCGCTGCC	GGTTTGATGI	CCAAGGCTC	JTTGGTT
S1	TATCGTGGTGGT	CATATGATTGC	CCTGCGCTGGI	TTCTTTATTTT	CTCGACAATC	ATCCTCTAC	TTGTGGCTGCT	GGTCTCATGT	CCAAGGCGC	TC GGTT
R15	TATCGTGGTGGT	TCCATGCTTAA	AGCTTCGCTTC1	TTCTTTATTTT	CTCTACTGTC	ATCCTGTAC	TCGTTGCAGC	GGTCTCATGT	CTAAGGCTC	TCGGAT
R18	TACCGTGGTGGT	TCCATGCTCAA	AGCTTCGCTTC1	TTCTTCATTTT	CTCCACTGTC	ATCTTGTAC	TCGTCGCAGC	GGTCTTATGI	CCAAGGCT	JTTGGAT

	510	520	530	540	550	560	570	580	590	600
		.				.				.
в1	ACTTTGAACAAAAC	G <mark>CAT</mark> GGAA <mark>TC</mark> AA	GTTATTGGC	GG <mark>C</mark> GAATCT	GCTGATG-	T AA	TTAGTTAT	AGATGACTAC	AGCTGTGTG	GCATGT
M15	ACTTTGAACAAAAC	G <mark>CAT</mark> GGAA <mark>TC</mark> AA	GTTATTGGC	GG <mark>C</mark> GAATCT	GCTGATG-	T AA	TTAGTTAT	AGATGACTAC	AGCTGTGTG	GCATGT
M16	ACTTTGAACAAAAC	G <mark>CAT</mark> GGAA <mark>TC</mark> AA	GTTATTGGC	GG <mark>C</mark> GAATCT	GCTGATG-	T AA	TTAGTTAT	AGATGACTAC	AGCTGTGTG	GCATGT
M20	ATTTTGAACAAAAC	G <mark>CTT</mark> GGAA <mark>TC</mark> AA	.GTCATTGGC	GGCGAATCT(GCTGATG-	T GA	TCAGCTACA	AGATGACCAC	GGCTGTATO	GCATGT
M52	ATTTTGAACAAAAC	G <mark>CTT</mark> GGAA <mark>TC</mark> AA	.GTCATTGGC	GGCGAATCT(GCTGATG-	T GA	TCAGCTACA	AGATGACCAC	GGCTGTATO	GCATGT
м4	ATTTTGAACAGAAT	G <mark>CTT</mark> GGAA <mark>CC</mark> AA	GTCATTGGA	GGTGAGTCC	GCTGATG-	TT A	TTAGTTAC?	AGATGACCAC	AGCTGTATO	GCATGT
Rh27	TTCTCGAACAAAAT	TCTTGGAACAAG	GTTATTGGA	GG <mark>C</mark> GAAG <mark>C</mark> A	G <mark>C</mark> AG <mark>AGGA(</mark>	GTCAGGATCCATCA	TTGGATAC7	AGGTAACTAC	TGC TGTTTC	GCATGT
Rh48	ATCTTGAACAAAAT	G <mark>CTT</mark> GGAA <mark>TC</mark> AA	GTCATTGGT	GG <mark>T</mark> GAAG <mark>CT</mark> (GCTGA	TGTC A	TTGGCTAC	GAGTCTCTAC	CGC TGTCTC	GCACGT
Rh49	ATCTTGAACAAAAT	G <mark>CTT</mark> GGAA <mark>TC</mark> AA	GTCATTGGT	GG <mark>T</mark> GAAG <mark>CT</mark> (GCTGA	TGTC A	TTGGCTAC	GAGTCTCTAC	CGC TGTCTC	GCACGT
Rh24	ATCTTGAACAAAAT	G <mark>CTT</mark> GGAA <mark>TC</mark> AA	GTCATTGGT	GG <mark>T</mark> GAAG <mark>CT</mark> (GCTGA	TGTC A	TTGGCTAC	GAGTCTCTAC	CGC TGTCTC	GCACGT
Rh28	ATCTTGAACAAAAT	G <mark>CTT</mark> GGAA <mark>TC</mark> AA	GTCATTGGT	GG <mark>T</mark> GAAG <mark>CT</mark> (GCTGA	TGTC A	TTGGCTAC	GAGTCTCTAC	CGC TGTCTC	GCACGT
Rh18	ACCTTGAACAAAAT	G <mark>CTT</mark> GGAA <mark>TC</mark> AA	GTCATTGGT	GG <mark>T</mark> GAAG <mark>CT</mark> (GCTGA	TGTC A	TTGGCTAC	GAGTCTCTAC	CGC TGTCTC	GCACGT
Rh59	ACCTTGAACAAAAT	G <mark>CTT</mark> GGAA <mark>TC</mark> AA	GTCATTGGT	GG <mark>T</mark> GAAG <mark>CT</mark> (GCTGA	TGTC A	TTGGCTAC	GAGTCTCTAC	CGC TGTCTC	GCACGT
Rh50	ATCTTGAACAAAGT	G <mark>CTT</mark> GGAA <mark>TC</mark> AA	GTCATTGGT	GG <mark>TGAAGCT</mark> (GCTGA	TGTC A	TTGGCTAC	GAGTCTCTAT	CGC TGTCTC	GCACGT
Rh61	ATCTTGAACAAAAT	G <mark>CTT</mark> GGAA <mark>TC</mark> AA	GTCATTGGT	GG <mark>TGAAGCT</mark> (GCTGA	TGTC A	TTGGCTAC	GAGTCTCTAC	CGC TGTCTC	GCACGT
Rh60	ACCTTGAACAAAAT	G <mark>CTT</mark> GGAA <mark>TC</mark> AA	GTCATTGGT	GG <mark>T</mark> GAAG <mark>CT</mark> (GCTGA	TGTC A	TTAGTTAC	GAGTCTCCAC	CGC TGTCTC	GCACGT
Rdel*	ACCTTGAACAAAAT	G <mark>CTT</mark> GGAA <mark>TC</mark> AA	GTCATTGGT	GG <mark>T</mark> GAAG <mark>CT</mark> (GCTGA	TGTC A	TTAGTTAC	GAGTCTCAAC	CGC TGTCTC	GCACGT
Rh42	ATCTTGAACAAAAC	G <mark>CTT</mark> GGAA <mark>C</mark> ACA	GTTATTGGT	GG <mark>T</mark> GAACCT	rcrgg	TGTTA	TCGGTTAC	GAGTATCTAC	TTCTGTTTC	GCACGT
Rh45	ATCTTGAACAAAAT	G <mark>CTT</mark> GGAA <mark>C</mark> AAT	GTTATTGGT	GG <mark>T</mark> GAACCT	rccgg	CGTTA	TCGGTTAC	GAGTCTCAAC	TTCCGTTTC	GCACGT
Rh40	ATCTTGAACAAAAT	G <mark>CTT</mark> GGAA <mark>CC</mark> AA	GTTGTTGGT	GG <mark>TGAACCT</mark>	GCTGG	TGTTA	TTACTTAC	GAGTCAGTAC	TTCTGTCTC	GCATGT
Rh58	ACTTTGAACAAAAT	G <mark>CTT</mark> GGAA <mark>TC</mark> AA	GTCATTGGT	GG <mark>TGAATC</mark> A	GCTGAAGA	AGGTGGTGATGTGA	TCGCATACA	AGGTGACTAC	TGCCGTCTC	GCACGT
Rh64	ACTTTGAACAAAAT	G <mark>CTT</mark> GGAA <mark>TC</mark> AA	GTCATTGGT	GG <mark>TGAATC</mark> A	GCTGAAGA	AGGTGGTGATGTGA	TCGCATACA	AGGTGACTAC	TGCCGTCTC	GCACGT
Rh62	ATTTTGAACAAAAT	G <mark>CCT</mark> GGAA <mark>CC</mark> AA	GTCATTGGT	GGTGAAGTT	G <mark>CT</mark> GAAGA	AGG <mark>T</mark> GG <mark>T</mark> GA <mark>T</mark> GTGA	TCTCATAC	AGGTAACCAC	TGCTGTCTC	GCACGT
Rh63	ATTTTGAACAAAAT	G <mark>CCT</mark> GGAA <mark>CC</mark> AA	GTCATTGGT	GGTGAAGTT(GCTGAAGA	AGGTGGTGATGTGA	TCTCATACA	AGGTAACCAC	TGCTGTCTC	GCACGT
S1	ACTTTGAGCAGAAC	GCCTGGAACAAC	GTCATCGGT	GGAGAA <mark>CCC</mark>	rc	T GG T G T GA	TCTCCTACA	GATATTCGAC	TTCCATCTO	GCACGT
R15	ACTTTGAACAATAC	G <mark>CTT</mark> GGAA <mark>CC</mark> AA	GTTATTGGT	GGTGAAG <mark>CT</mark>	GCCGAAGA	<mark>AGGTGGTGATG</mark> TTA	TCACATACA	AGGTCACCAC	AGCTGTCTG	GCACGT
R18	ACTTTGAGCAGTAT	G <mark>CTT</mark> GGAA <mark>CC</mark> AA	GTCATTGGT	GGTGAAG <mark>CC</mark>	GCCGAAGA	<mark>AGGCGGTGACG</mark> TGA	TCGCATACA	AGGTTACCAC	AGCCGTCTC	GCACGT

	610	620	630	640	650	660	670	680	690	700
							.	.		
в1	TTCTTGGGGAGATCCAC	AGGCCAACAC	GGATACAAA	CGGTGGCTG	GGAGATTTTCA A	TGCCAT				
M15	TTCTTGGGGAGATCCAC	AGGCCAACAC	GGATACAAA	CGGTGGCTG	GGAGATTTTCAA	TGCCAT				
M16	TTCTTGGGGAGATCCAC	GAGGCCAACAC	GGATACAAA	CGGTGGCTG	GGAGATTTTTAA	TGCCAT				
M20	TTCTTGGGGAGATCCAG	BAGGCCAACAC	AGATACAAA	CGGCGGCTA	CGAAATTTTTAA	CGCAAT				
м52	TTCTTGGGGAGATCCAC	AGGCCAACAC	AGATACAAA	CGGCGGCTA	CGAAATTTTTAA	CGCTAT				
м4	ATCTTGGGGAGATCCAC	BAAGCCAACAC	TGATACCAA	CGGTGGTTG	GGAAATTTTCAA	CGCTAT				
Rh27	GTCTTGGGGAGACCCTC	BAAGTCAATAC	TGCAGAAAA	CGGCGGCTG	GCAAATTTTCAA	CGCGAT				
Rh48	TTCTTGGGGAGACCCAC	BAAGCGAACAA	TGATACCTC	GGGTGGTTG	GCAAATCTTCAA	CGCGAT				
Rh49	TTCTTGGGGAGACCCAC	BAAGCGAACAA	TGATACCTC	GGGTGGTTG	GCAAATCTTCAA	CGCTAT				
Rh24	TTCTTGGGGAGACCCAC	BAAGCGAACAA	TGATACCTC	GGGTGGTTG	GCAAATCTTTAA	CGCAAT				
Rh28	TTCTTGGGGAGACCCAC	BAAGCGAACAA	TGATACCTC	GGGTGGTTG	GCAAATCTTCAA	CGCGAT				
Rh18	TTCTTGGGGAGACCCAC	GAAGCTAACAA	TGATACCTC	TGGTGGTTG	GCAAATCTTTAA	CGCCAT				
Rh59	TTCTTGGGGAGACCCAC	BAAGCTAACAA	TGATACCTC	TGGTGGTTG	GCAAATCTTCAA	CGCGAT				
Rh50	TTCTTGGGGAGACCCAC	BAAGCGAACAA	TGATACCTC	GGGTGGTTG	GCAAATCTTCAA	CGCAAT				
Rh61	TTCTTGGGGAGACCCAC	BAAGCGAACAA	TGATACCTC	GGGTGGTTG	GCAAATCTTTAA	CGCAAT				
Rh60	TTCTTGGGGAGACCCAC	GAAGCCAACAA	TGATACCTC	TGGTGGTTG	GCAAATCTTTAA	CGCGAT				
Rdel*	TTCTTGGGGAGACCCAC	BAAGCCAACAA	TGATACCTC	TGGTGGTTG	GCAAATCTTTAA	CGCCA				
Rh42	CTCTTGGGGGAGACCCAC	AAGCTAACAA	TGATACCAG	TGGTGGTTG	GCAAATCTTTAA	CGCCAT				
Rh45	CTCTTGGGGGAGACCCAC	AAGCTAATAC	TGACACCAG	TGGTGGTTG	GCAAATTTTCAA	CGCAAT				
Rh40	TTCTTGGGGAGACCCAC	AACTCAATGT	TGATACTAA	CGGTGGTTG	GCAAATTTTCAA	CGCCAT				
Rh58	CTCTTGGGGGAGATCCCC	BAAT <mark>TGAATGT</mark>	TGACACAAA	C <mark>G</mark> GTGGTTG	GCAAATCTTCAA	TGCCAT				
Rh64	CTCTTGGGGGAGATCCCC	BAAT <mark>TGAATGI</mark>	TGACACAAA	CGGTGGTTG	GCAAATCTTCAA	TGCAAT				
Rh62	CTCTTGGGGAAAATCCTC	AATTAAACAT	TTCTGCCAA	CGGTGGTTG	GCAAATCTTTAA	CGCTAT				
Rh63	CTCTTGGGGAAAATCCTC	AATTAAACAT	TTCTGCCAA	CGGTGGTTG	GCAAATCTTTAA	CGCCAT				
S1	CTCCTGGGGTGACCCGG	AACTGCAGAC	TTCCACCAA	CGGTGGCTG	G <mark>TAAAGTC</mark> GTGA	CTTATTTAC	GTTCGCTGGT	TTCTCGA	FACTCATA	TGGCAT
R15	CTCCTGGGGTGATCCAC	GAATTGAACGT	TGACACCAA	CGGTGGTTG	GTAAGTACTGCI	TTTAGTTTG	FCGCGCCAGC	TTGTTCCT	FGCGCTTA	CAATGT
R18	CTCCTGGGGTGATCCCC	GAACTGAACGT	'AGACACTAA	TGGTGG <mark>C</mark> TG	GTGAGTATTA <mark>C</mark> I	ACATTTTTT	JAATACTATC	CAGCCATACT	FTCGCTC A	СААААА

	I	710	720	730	740
B1				- TCTCGGCT G	
M15				-TCTCGGTTG	IG
M16				ACTGGGTTG	G
M20				TTTCGGGTG	G
M52				CTTTGGCTG	G
м4				-CTTTGGCTG	G
Rh27					G
Rh48				-AC	
Rh49				-CCTTGGATG	G
Rh24				-CCTTGGCTG	G
Rh28				-CCTCGGCTG	G
Rh18				-CCTCGGTTG	G
Rh59				-CCTTGGTTG	G
Rh50				-ACTCGGCTG	G
Rh61				-ACTTGGTTG	G
Rh60				-CTTTGGCTG	
Rdel*					
Rh42				-CCTCGGATG	G
RD45					:G
RH40				ACTCGGTTG	
RH56					
RH04					
RHOZ Dh63					
<1 KI105	CTA ATTTC	ACCATCATT	TTCAACCCCA		IG
R15	GAGTTGGT	ACCCAAATC	TTTAACGCCA		
R18	TC-TTGAC	ACCCAAATC	TTAACGCGA	rTTTTCCCTC	CTTC
	IC IIGAC				

2. melléklet: Különböző járomspórás gombák részleges FTR1 fehérje szekvenciáinak

összehasonlítása CLUSTAL W program segítségével.

Rdel*: FU és mtsi. (2004) által közölt Rh. oryzae 99-880 (Rh. delemar) törzs megfelelő régiója (EMBL azonosító: AY3445879)

	10	20)	30	40	50		60	70	80	90	100
					.		.					
в1	EDIWEGCFSLVA	TIMITVMGI	AMLSTERM	QEKWKIKLA	RAMEEKG	QKIGI	KAWMQK	YSFFFLPFI	TVLREGLE	VVFIGGVSL	VQAKSIP	IAAIMG
M15	EDIWEGCFSLVA	TIMITVMGI	AMLRTERM	Q <mark>EKWKIKLA</mark>	RAMEEKG	QKIGI	KAWMQK	YSFFFLPFI	TVLREGLE	VVFIGGVSL	VQAKSIP	IAAIMG
M16	EDIWEGCFSLVA	TIMITVMGI	AMLRTERM	Q <mark>EKWKIKLA</mark>	RAMEEKG	QKIGI	KAWMQK	YSFFFLPFI	TVLREGLE	VVFIGGVSL	VQAKSIP	IAAIMG
M20	EDIWEGCFSLVA	TIMITVMGI	AMLRTERM	Q <mark>EKWKVKLA</mark>	KTMEEKG	QKIGE	KAWMQK	YSFFFLPFI	TVLREGLEA	VVFIGGVSL	VQAKSIP	IAAIMG
M52	EDIWEGCFSLVA	TIMITVMGI	AMLRTERM	Q <mark>EKWKVKLA</mark>	KTMEEKG	QKIGE	KAWMQK	YSFFFLPFI	TVLREGLEA	VVFIGGVSL	VQAKSIP	IAAIMG
М4	EDIWEGCFSLVA	TIMITVMGI	AMLRTERM	Q <mark>EKWKVKLA</mark>	KTMEQKG	QKIGI	KAWMQK	YSFFFLPFI	TVLREGLEA	VVFIGGVSLN	VQAKSIP	IAAIMG
Rh27	EDIWEGVFSLVA	TIMITVMG	TMLRTERM	QEKWKLKLA	KSMENKN	-KKQKLGI	KAWMQK	YSFFFLPFI	TVLREGLEA	VVFIGGVSLN	IAAKSIL	LAAIMG
Rh48	EDIWEGVFSLVA	VIMITAMGI	AMLKTERM	Q <mark>EKWKVKLA</mark>	KAMQKS-	-NSEKSSE	KEKLQK	YAFFVLPFI	TVLREGLEA	VVFIGGVSL	IQ <mark>GK</mark> SIP	IAAIMG
Rh49	EVIWEGVFSLVA	VIMITAMGI	AMLKTERM	Q <mark>EKWKVKLA</mark>	KAMQKS-	-NSEKSSE	KEKLQK	YAFFVLPFI	TVLREGLEA	VVFIGGVSL	IQ <mark>GK</mark> SIP	IAAIMG
Rh18	EDIWEGVFSLVA	VIMITAMGI	AMLKTERM	Q <mark>EKWKVKLA</mark>	KAMQKS-	-NSKKSSI	KEKLQK	YAFFVLPFI	TVLREGLE	VVFIGGVSL	IQGKSIP	IAAIMG
Rh24	EDIWEGVFSLVA	VIMITAMGI	AMLKTERM	Q <mark>EKWKVKLA</mark>	KAMQKS-	-NSEKSSE	KEKLQK	YAFFVLPFI	TVLREGLEA	VVFIGGVSL	IQ <mark>GK</mark> SIP	IAAIMG
Rh28	EDIWEGVFSLVA	VIMITAMGI	AMLKTERM	Q <mark>EKWKVKLA</mark>	KAMQKS-	-NSEKSSE	KEKLQK	YAFFVLPFI	TVLREGLEA	VVFIGGVSL	IQ <mark>GK</mark> SIP	IAAIMG
Rh59	EDIWEGVFSLVA	VIMITAMGI	AMLKTERM	Q <mark>EKWKVKLA</mark>	KAMQKS-	-NSEKSSE	KEKLQK	YAFFVLPFI	TVLREGLEA	VVFIGGVSL	IQ <mark>GK</mark> SIP	IAAIMG
Rh61	EDIWEGVFSLVA	VIMITAMGI	AMLKTERM	Q <mark>EKWKVKLA</mark>	KAMQKS-	-NSEKLSE	KEKLQK	YAFFVLPFI	TVLREGLEA	VVFIGGVSL	IQ <mark>GK</mark> SIP	IAAIMG
Rh60	EDIWEGVFSLVA	VIMITAMGI	AMLKTERM	Q <mark>EKWKVKLA</mark>	KAMQKS-	-NSEKSSE	KEKLQK	YAFFVLPFI	TVLREGLEA	VVFIGGVSL	IQ <mark>GK</mark> SIP	IAAIMG
Rh50	EDIWEGVFSLVA	VIMITAMGI	AMLKTERM	Q <mark>EKWKVKLA</mark>	KAMQKS-	-NSEKSSI	KGKLQK	YAFFVLPFI	TVLREGLE	VVFIGGVSL	IQGKSIP	IAAIMG
Rdel*	EDIWEGVFSLVA	VIMITAMGI	AMLKTERM	Q <mark>EKWKVKLA</mark>	KAMQKS-	-NSEKSSE	KEKLQK	YAFFVLPFI	TVLREGLEA	VVFIGGVSL	IQ <mark>GK</mark> SIP	IAAIMG
Rh40	EDIWEGIFSLVA	TIMITVMGI	AMLKTERM	Q <mark>EKWKVKLA</mark>	KAIQKD-	-SQERSSI	KEKLQR	YAFFVLPFI	TVLREGLEA	VVFIGGVSL	ISGKSIP	IAAIMG
Rh42	EDIWEGAFSLVA	VLMITVMGI	AMLKTERM	Q <mark>EKWKVKLA</mark>	KAMQKS-	-SEEKSNE	KEKMQK	YAFFILPFI	TVLREGLEA	VVFVGGVSL	ITAKSIP	IAAIMG
Rh45	EDIWEGAFSLVA	VLMITVMGI	AMLKTERM	Q <mark>EKWKVKLA</mark>	KAMQKS-	-KEEKSNE	KEKMQK	YAFFILPFI	TVLRGGLE	VVFVGGVSL	ITAKSIP	IAAIMG
Rh58	EDIWEGVFSLVA	VIMITVMGI	AMLKTERM	Q <mark>EKWKVKLA</mark>	KAMQKS-	-SSEKTTE	KDKLQK	YAFFVLPFI	TVLREGLE	VVFIGGVSL	IQGKSIP	IAAIMG
Rh64	EDIWEGVFSLVA	VIMITVMGI	AMLKTERM	Q <mark>EKWKVKLA</mark>	KAMQKS-	-SSEKTTE	KDKLQK	YAFFVLPFI	TVLREGLE	VVFIGGVSL	IQGKSIP	IAAIMG
Rh62	EDIWEGVFSLVA	VIMITAMGI	AMLKTERM	Q <mark>EKWKVKLA</mark>	KAMQKS-	-STEKTGE	KEKLQK	YALFVLPFV	TVLREGLE	VVFIGGVSL	VQGKSIP	IAAIMG
Rh63	EDIWEGVFSLVA	VIMITAMGI	AMLKTERM	Q <mark>EKWKVKLA</mark>	KAMQKS-	-STEKTGE	KEKLQK	YAFFVLPFV	TVLREGLE	VVFIGGVSL	VQGKSIP	IAAIMG
S1	EDIWEGVFSLIA	TLMITVMGI	AMLRTERM	Q DKWKFKLA	KAMEAK-	-TMEKKTI	SARMQK	YAFFLLPFI	TVLREGLE	VVFVGGVSL	VQAKSIP	IATIMG
R15	EDIWEGVFSLIA	VIMITVMGI	AMLRTERM	Q <mark>EKWKIKLA</mark>	KAMETDA	LQRERKTV	KVRMQR	YSFFVLPFV	TVLREGLE	VVFIGGVSLN	VQAKSIP	IAAIMG
R18	EDIWEGVFSLIA	VIMITAMGI	AMLKTERM	Q <mark>EKWKIKLA</mark>	KAMETDA	LQRDKRTV	KVRMQR	YSFFLLPFI	TVLREGLE	VVFIGGVSLN	VQAKSIP	IAAIMG

	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
		.			.					
в1	FLCGCAVGLVIYRGGS	SLLQLRRFFII	STIILYLVAA	LMAKAVGYFE	QNAWNQVI	GESAD	VISYKMTTAVW	HVSWGDPEANT	DINGGWEIF	NAILGW
M15	FLCGCAVGLVIYRGG	SLLQLRWFFII	STIILYLVAA	GLMAKAVGYF	QNAWNQVI	GESAD	VISYKMTTAVW	HVSWGDPEANT	DINGGWEIF	NAILGW
M16	FLCGCAVGLVIYRGG	SLLQLRWFFII	STIILYLVAAC	LMAKAVGYF	QNAWNQVI	GESAD	VISYKMTTAVW	HVSWGDPEANT	DINGGWEIF	NAILGW
M20	FICGCAVGLVIYRGG	SLLHLRWFFII	STIILYLVAAC	LMAKAVGYF	QNAWNQVI	GESAD	VISYKMTTAVW	HVSWGDPEANT	DINGGYEIF	NAIFGW
M52	FICGCAVGLVIYRGG	SLLHLRWFFII	STIILYLVAAC	LMAKAVGYF	QNAWNQVI	GESAD	VISYKMTTAVW	HVSWGDPEANT	DINGGYEIF	NAIFGW
M4	FLCGCAVGLVIYRGG	SLLHLRWFFII	STIILYLVAA	LMSKAVGYFE	QNAWNQVI	GESAD	VISYKMTTAVW	HVSWGDPEANT	DINGGWEIF	NAIFGW
Rh27	LFCGCIVGYIIYRGG	SLIKLRWFFII	STIILYLVAA	LMSKAVGFL	QNSWNKVI	GEAAEESGS	IIGYKVTTAVW	HVSWGDPEVNT	AENGGWQIF	NAILGW
Rh48	IICGCLVGFLIYRGG	SLIQLRWFFVF	STVVLYLVAA	GLMAKGVGYLE	QNAWNQVI	GGEAAD	VIGYRVSTAVW	HVSWGDPEANN	DTSGGWQIF	NAI
Rh49	IVCGCLVGFLIYRGG	SLIQLRWFFVF	STVVLYLVAA	GLMAKGVGYLE	QNAWNQVI	GGEAAD	VIGYRVSTAVW	HVSWGDPEANN	DTSGGWQIF	NAILGW
Rh18	IICGCLVGFLIYRGG	SLVQLRWFFVF	STVVLYLVAA	GLMAKGVGYLE	QNAWNQVI	GGEAAD	VIGYRVSTAVW	HVSWGDPEANN	DTSGGWQIF	NAILGW
Rh24	IICGCLVGFLIYRGG	SLIQLRWFFVF	STVVLYLVAA	GLMAKGVGYLE	QNAWNQVI	GGEAAD	VIGYRVSTAVW	HVSWGDPEANN	DTSGGWQIF	NAILGW
Rh28	IICGCLVGFLIYRGG	SLIQLRWFFVF	STVVLYLVAA	GLMAKGVGYLE	QNAWNQVI	GGEAAD	VIGYRVSTAVW	HVSWGDPEANN	DTSGGWQIF	NAILGW
Rh59	IICGCLVGFLIYRGG	SLIQLRWFFVF	STVVLYLVAA	GLMAKGVGYLE	QNAWNQVI	GGEAAD	VIGYRVSTAVW	HVSWGDPEANN	DTSGGWQIF	NAILGW
Rh61	IICGCLVGFLIYRGG	SLIQLRWFFVF	STVVLYLVAA	GLMAKGVGYLE	QNAWNQVI	GGEAAD	VIGYRVSTAVW	HVSWGDPEANN	DTSGGWQIF	NAILGW
Rh60	IICGCLVGFLIYRGG	SLIQLRWFFVF	STAVLYLVAA	GLMARGVGYLE	QNAWNQVI	GGEAAD	VISYRVSTAVW	HVSWGDPEANN	DTSGGWQIF	NAIFGW
Rh50	IICGCLVGFLIYRGG	SLIQLRWFFVF	STVVLYLVAA	JLMAKGVGYL	QSAWNQVI	GEAAD	VIGYRVSIAVW	HVSWGDPEANN	DTSGGWQIF	NAILGW
Rdel*	IICGCLVGFLIYRGG	SLIQLRWFFVF	STVVLYLVAAC	GLMAKGVGYLE	QNAWNQVI	GGEAAD	VISYRVSTAVW	HVSWGDPEANN	DTSGGWQIF	N A
Rh40	IVCGCLVGLLIYRGG	CLIQLRWFFVF	STVILYLVAA	GLMSKGVGYLE	QNAWNQVV	GGEPAG	VITYRVSTSVW	HVSWGDPELNV	DINGGWQIF	NAILGW
Rh42	ILCGCLVGLLIYRGG	CLIHLRWFFVF	STVILYLVAA	GLMAKGVGYLE	QNAWNTVI	GGEPSG	VIGYRVSTSVW	HVSWGDPEANN	DTSGGWQIF	NAILGW
Rh45	ILCDCLVGVLIYRGG	SLIQLRWFFVF	STVILYLVAA	GLMAKGVGYLE	QNAWNNVI	GGEPSG	VIGYRVSTSVW	HVSWGDPEANT	DTSGGWQIF	NAILGW
Rh58	IICGALVGFLIYRGG	SLIQLRWFFVF	STVILYLVAA	LMSKAVGYFE	QNAWNQVI	GESAEEGGD	VIAYKVTTAVW	HVSWGDPELNV	DINGGWQIF	NAILGW
Rh64	IICGALVGFLIYRGG	SLIQLRWFFVF	STVILYLVAA	LMSKAVGYFE	QNAWNQVI	GESAEEGGE	VIAYKVTTAVW	HVSWGDPELNV	DINGGWQIF	NAILGW
Rh62	IICGALVGFLIYRGG	SLIQLRWFFVF	STVILYLVAA	LMSKAVGYFE	QNAWNQVI	GEVAEEGGE	VISYKVTTAVW	HVSWGNPELNI	SANGGWQIF	NAILGW
Rh63	IICGALVGFLIYRGG	SLIQLRWFFVF	STVILYLVAA	LMSKAVGYFE	QNAWNQVI	GEVAEEGGE	VISYKVTTAVW	HVSWGNPELNI	SANGGWQIF	NAILGW
S1	FICGCLVGFLIYRGG	MIALRWFFIF	STIILYLVAAC	LMSKAVGYFE	QNAWNNVI	GGEPSG	VISYRYSTSIW	HVSWGDPELQT	STNGGWMIF	NAILGW
R15	FICGCLVGFIIYRGG	MLKLRFFFIF	STVILYLVAAC	LMSKAVGYFE	QYAWNQVI	GEAAEEGGE	VITYKVTTAVW	HVSWGDPELNV	DINGGWQIF	N A
R18	FICGCLVGFIIYRGG	MLKLRFFFIF	STVILYLVAA	JLMSKAVGYFE	QYAWNQVI	GGEAAEEGGE	VIAYKVTTAVW	HVSWGDPELNV	DINGGWQIF	NAIFGW

3. melléklet: A R. miehei ftr1 gén kodonhasználata.

Az *ftr* a oszlop az adott kodon arányát mutatja az aminosavat kódoló szinonim kodonokhoz viszonyítva, míg az *ftr* b oszlopban az adott kodon összes előfordulása olvasható a génben.

Kodon	Ami	inosav	<i>ftr</i> a	<i>ftr</i> b	Kodon	Ami	nosav	<i>ftr</i> a	<i>ftr</i> b
TTT	Phe	F	36 %	8	TAT	Tyr	Y	8 %	1
TTC	Phe	F	64 %	14	TAC	Tyr	Y	92 %	12
TTA	Leu	L	3 %	1	TAA	-	-	100 %	1
TTG	Leu	L	31 %	9	TAG	-	-	0 %	0
CTT	Leu	L	21 %	6	CAT	His	Н	0 %	0
CTC	Leu	L	24 %	7	CAC	His	Н	100 %	1
СТА	Leu	L	10 %	3	CAA	Gln	Q	73 %	8
CTG	Leu	L	10 %	3	CAG	Gln	Q	27 %	3
ATT	Ile	Ι	56 %	22	AAT	Asn	N	33 %	4
ATC	Ile	Ι	41 %	16	AAC	Asn	N	67 %	8
ATA	Ile	Ι	3 %	1	AAA	Lys	K	28 %	6
ATG	Met	М	100 %	11	AAG	Lys	K	72 %	15
GTT	Val	V	31 %	12	GAT	Asp	D	50 %	7
GTC	Val	V	62 %	24	GAC	Asp	D	50 %	7
GTA	Val	V	5 %	2	GAA	Glu	E	85 %	23
GTG	Val	V	2 %	1	GAG	Glu	E	15 %	4
ТСТ	Ser	S	27 %	4	TGT	Cys	C	80 %	4
TCC	Ser	S	53 %	8	TGC	Cys	C	20 %	1
TCA	Ser	S	0 %	0	TGA	-	-	0 %	0
TCG	Ser	S	7 %	1	TGG	Trp	W	100 %	12
ССТ	Pro	Р	17 %	1	CGT	Arg	R	29 %	5
CCC	Pro	Р	33 %	2	CGC	Arg	R	47 %	8
CCA	Pro	Р	17 %	1	CGA	Arg	R	24 %	4
CCG	Pro	Р	33 %	2	CGG	Arg	R	0 %	0
ACT	Thr	Т	24 %	5	AGT	Ser	S	7 %	1
ACC	Thr	Т	24 %	5	AGC	Ser	S	7 %	1
ACA	Thr	Т	43 %	9	AGA	Arg	R	0 %	0
ACG	Thr	Т	9 %	2	AGG	Arg	R	0 %	0
GCT	Ala	A	46 %	15	GGT	Gly	G	74 %	25
GCC	Ala	A	30 %	10	GGC	Gly	G	9 %	3
GCA	Ala	A	24 %	8	GGA	Gly	G	15 %	5
GCG	Ala	A	0 %	0	GGG	Gly	G	3 %	1

4. melléklet: A R. pusillus ftr1 gén kodonhasználata.

Az *ftr* a oszlop az adott kodon arányát mutatja az aminosavat kódoló szinonim kodonokhoz viszonyítva, míg az *ftr* b oszlopban az adott kodon összes előfordulása olvasható a génben.

Kodon	Ami	inosav	<i>ftr</i> a	<i>ftr</i> b	Kodon	Ami	nosav	<i>ftr</i> a	<i>ftr</i> b
TTT	Phe	F	21 %	5	TAT	Tyr	Y	9 %	1
TTC	Phe	F	79 %	19	TAC	Tyr	Y	91 %	10
TTA	Leu	L	3 %	1	TAA	-	-	100 %	1
TTG	Leu	L	23 %	7	TAG	-	-	0 %	0
CTT	Leu	L	16 %	5	CAT	His	Н	50 %	1
CTC	Leu	L	35 %	11	CAC	His	Н	50 %	1
СТА	Leu	L	10 %	3	CAA	Gln	Q	75 %	9
CTG	Leu	L	13 %	4	CAG	Gln	Q	25 %	3
ATT	Ile	Ι	48,5%	18	AAT	Asn	N	17 %	2
ATC	Ile	Ι	48,5%	18	AAC	Asn	N	83 %	10
ATA	Ile	Ι	3 %	1	AAA	Lys	K	29 %	6
ATG	Met	М	100 %	12	AAG	Lys	K	71 %	15
GTT	Val	V	23 %	8	GAT	Asp	D	61 %	11
GTC	Val	V	56 %	19	GAC	Asp	D	39 %	7
GTA	Val	V	9 %	3	GAA	Glu	Е	92 %	23
GTG	Val	V	12 %	4	GAG	Glu	E	8 %	2
TCT	Ser	S	16 %	3	TGT	Cys	С	60 %	3
TCC	Ser	S	53 %	10	TGC	Cys	С	40 %	2
TCA	Ser	S	5 %	1	TGA	-	-	0 %	0
TCG	Ser	S	5 %	1	TGG	Trp	W	100 %	12
ССТ	Pro	Р	33 %	2	CGT	Arg	R	35 %	6
CCC	Pro	Р	17 %	1	CGC	Arg	R	35 %	6
CCA	Pro	Р	17 %	1	CGA	Arg	R	12 %	2
CCG	Pro	Р	33 %	2	CGG	Arg	R	6 %	1
ACT	Thr	Т	47 %	8	AGT	Ser	S	5 %	1
ACC	Thr	Т	29,5%	4	AGC	Ser	S	16 %	3
ACA	Thr	Т	29,5%	4	AGA	Arg	R	12 %	2
ACG	Thr	Т	6 %	1	AGG	Arg	R	0 %	0
GCT	Ala	Α	36 %	13	GGT	Gly	G	74 %	23
GCC	Ala	Α	33 %	12	GGC	Gly	G	6,5 %	2
GCA	Ala	Α	28 %	10	GGA	Gly	G	16 %	5
GCG	Ala	Α	3 %	1	GGG	Gly	G	3 %	1