

Zárójelentés (2015)

A LaeA/Lae1 egy globális regulátor fehérje, mely számos szekunder metabolit géncsoport (cluster) kifejeződését szabályozza fonalas gombákban, köztük a celluláz és hemicelluláz termelése miatt biotechnológiai jelentőségű *Trichoderma reesei*-ben is. A felfedezése óta eltelt évtizedben számos közlemény jelent meg élettani szerepéről a legkülönbözőbb gombafajokban, és rengeteg génről mutatták ki, hogy a LaeA/Lae1 szabályozó hatása alatt állnak. Van viszont ezen vizsgálatoknak egy közös hiányossága: nem veszi figyelembe azt a tényt, hogy a LaeA/Lae1 hiány- illetve túltermelő mutánsok maximális specifikus növekedési rátája erősen eltérő egymáshoz és a vad típushoz képest is, illetve azt, hogy (részben az előbbiekből következően), süllyesztett illetve szilárd körülmények között ugyanazon a táptalajon más-más növekedési rátával rendelkeznek. A specifikus növekedési ráta viszont egy tenyészet legalapvetőbb parameter, mely minden élettani folyamatra, és az egész anyagcserére döntő hatással van. A szakaszos (süllyesztett) körülmények között végzett összehasonlító vizsgálatok ezért nem tudnak különbséget tenni a mesterségesen megváltoztatott LaeA/Lae1 kifejeződés, illetve a specifikus növekedési ráta eltérései miatt bekövetkező hatások között. A probléma megoldása technikai értelemben sem triviális: az egyetlen módszer a kemosztát-típusú folytonos fermentációk alkalmazása, melyekben a törzs növekedési ráta tartományán belül tetszőleges hígítási (=specifikus növekedési) ráta értékeket állíthatunk be. Kutatási tervünk erre a megközelítésre épült.

A részletes beszámoló előtt egy általános, de fontos megállapítás: **a kutatási terv szakmai vállalásait maradéktalanul sikerült teljesítenünk, sőt bizonyos részterületeken többet értünk el a tervezettnél.** Munkatervünk szerint az első évben a *T. reesei* fonalas gomba QM 9717 jelű, vad típusú (referencia) törzsével végeztünk kemosztát típusú folytonos fermentációkat minimál táptalajon, glükóz szénforráson, három párhuzamos kísérletben, magas és alacsony specifikus hígítási rátán, míg a második évben ugyanezen körülmények között a Lae1-re nézve hiánymutáns ($\Delta lae1$) *T. reesei* törzssel dolgoztunk. Mindkét esetben célunk a tenyészetek létrejövő transzkriptumának elemzése volt, melyhez a genom egészére nézve mikroarray analízist illetve – szelektált génekre vonatkozóan, ellenőrzés gyanánt – kvantitatív RT-PCR (qPCR) módszert alkalmaztunk. Eredeti munkatervünk szerint a túltermelő (tef1:lae1) mutánssal a pályázat harmadik évében végeztük volna el ugyanezen kemosztát tenyésztéseket, de mivel laboratóriumunk kapacitása megnövekedett, ezzel a mutáns törzssel is elvégeztük a fermentációkat a második az évben. A munkaterv harmadik évében így egy – a LAE1 fehérjéhez funkcionálisan kötődő – másik regulátor, a VEL1 élettani hatását is elemezni tudtuk.

A két alkalmazott hígítási ráta érték ($D = 0.075$ illetve 0.020 h^{-1}) egy szakaszos gombatenyészet gyors illetve lassú növekedési szakaszát modellezi. A kemosztát tenyészetek az első 24 órában batch üzemmódban nőttek. Az első 6-7 tartózkodási idő ('residence time') alatt a biomassza koncentráció egyre csökkenő mértékben oszcillált, majd egy közel állandó egyensúlyi értéket ($1.49 \pm 0.11 \text{ g/L}$) ért el, melyet további 5-6 tartózkodási időtartamig sikerült fenntartanunk, a hígítási ráta értékétől függetlenül. A rátáplált glükóz (kizárólagos szénforrás) koncentrációja 3 g/L volt, ami 46 és 53 % közötti, biomasszára számított

hozamkonstanst eredményezett. A tartomány megegyezik más fonalas gombákról közölt, glükóz-limitált kemosztárból származó hozamkonstans adatokkal, valamint saját korábbi eredményeinkkel is. A maradék (reziduális) D-glükóz koncentráció 0.03 és 0.05 mM között volt mindkét hígítási ráta értéknél, ami remekül korrelál a nagy affinitású hexóz transzporterek affinitásával, s bizonyítja, hogy tenyészeink valóban glükóz limitáltak voltak. Az alacsony hígítási ráta mellett a vad típusban (de a mutánsokban nem!) némi konidiospóra képződés volt észlelhető, míg a vad típusban és a hiánymutáns törzsben $D = 0.020 \text{ h}^{-1}$ mellett a morfológia enyhén pelletessé vált. $D = 0.075 \text{ h}^{-1}$ mellett mindhárom törzs morfológiája döntő részben micéliális volt. Összefoglalóan, noha némi különbség volt a három *T. reesei* törzs morfológiájában, ezek aligha befolyásolták az eredményeket, így a kísérleti rendszert a vizsgálatok céljaira alkalmasnak tekintettük.

A steady-state állapot beálltakor mintákat vettünk, melyekből RNS-t izoláltunk. Az RNS mintákat a NimbleGene izlandi laboratóriumába küldtük, ahol minőségi és mennyiségi ellenőrzés után cDNs-t készítettek mintáinkból és megtörtént a microarray vizsgálat (az izlandi labor rendelkezik azzal a 9123 gént tartalmazó *T. reesei* DNS-chippel, melyet mi is használtunk). A NimbleGene-től kapott adatokat ArrayStar szoftverrel értékeltük ki.

A vad típushoz képest a hiánymutánsban a vizsgált 9123 génből 1069 kifejeződése emelkedett vagy csökkent legalább kétszeresére legalább az egyik (alacsony vagy magas) hígítási rátán. Ezek közül 182 változott meg mindkét folytonos tenyészetben, 321 csak az alacsony, 930 csak a magas hígítási rátán mutatott eltérést. A *lae1*-túltermelő és a vad típusú törzs között jóval kisebb volt az eltérés a gének kifejeződését tekintve: 113 gén expressziója változott meg legalább kétszeres mértékben; 89 a magas, 28 az alacsony növekedési rátán. Mindkét növekedési rátán mindössze 4 gén mutatott eltérést. Az összes fenti halmazban a megváltozott expressziójú gének több, mint harmada ismeretlen funkciójú fehérjét kódolt vagy un. 'árva' gének (orphan gene) voltak. Az ismert funkciójú fehérjéket az un. FunCat rendszer alapján kategorizáltuk. A legtöbb gén a 'metabolism', majd a 'cellular transport' és a 'transcription' kategóriákba került. A FunCat alkategóriák szintjén a *lae1*-hiánymutáns törzsben, magas növekedési rátán az 'amino acid transporters', 'heteroincompatibility proteins', 'GCN5-N-acetyltransferases' és a 'polyketide synthases' csoportok voltak felülreprezentálva. A szekunder anyagcsere génjei közül a 11 illetve 10 ismert *T. reesei* poliketid szintetázból illetve nem-riboszómális peptid szintetázból 3-3 kifejeződése változott meg a LAE1 funkció eltűnése következtében. A *lae1*-túltermelő törzsben viszont egyetlen FunCat kategória vagy alkategória sem emelkedett ki statisztikusan a többi közül.

A fenn említett, megváltozott expressziójú gének közel felének kifejeződését a hígítási ráta is befolyásolta, egyértelműen jelezve, hogy a regulációs mutánsok rögzített specifikus növekedési rátán történő tenyésztése a regulator fehérjék hatásának új aspektusait tárhatja fel.

A vizsgálatok eredményeiből kézirat készült, melyet a **BMC Genomics** c. szakfolyóirathoz küldtünk el közlésre (**impakt faktor: 4.041**). A cikk 2014. júniusában került elfogadásra (Fekete et al., 2014); Open Access jellegéből kifolyólag már másnap olvasható volt a Föld valamennyi, világhálóra bekötött számítógépén.

Következő tanulmányunk kiinduló pontja is a LAE1 szabályzó fehérjéhez köthető. A *T. reesei* celluláz és hemicelluláz génjeink kifejeződését számos transzkripciós faktor, köztük a LAE1 szabályozza. A szabályozás molekuláris mechanizmusa azonban ismeretlen.

Aspergillus nidulans-ban (a fonalas gombák egyik legfontosabb model szervezetében) a LAE1 ortológ LaeA a VELVET fehérjekomplex része. Az *A. nidulans* VELVET komplex három fehérjéből épül fel – a LaeA-n kívül a VeA és a VelB alkotja – és döntő szerepet játszik a szekunder anyagcsere illetve a sporuláció és differenciálódás szabályozásában. Az a megfigyelés, miszerint a *T. reesei* celluláz génjeinek kifejeződése LAE1-függő, felvetette azt a hipotézist, hogy a cellulázok expressziójához a VELVET komplex működése szükséges. A hipotézis teszteléséhez a VELVET központi egységét, az *A. nidulans* VeA ortológját, a VEL1 fehérjét kódoló *vell* gént klónoztuk és jellemeztük funkcionálisan *T. reesei*-ben.¹

A *T. reesei* *Δvell* hiánymutáns látványosan eltérő fenotípust mutatott a vad típushoz képest. Összehasonlító mikroszkópos ‘Image Analysis’ vizsgálatunk azt mutatta, hogy noha a mutáns képes volt rövid, vastag micéliumokat fejleszteni, a konídiospóra képzés képessége eltűnt, nemcsak minimal de komplex táptalajon is. A mutáns növekedési rátája glükózon kissé visszaesett a vad típushoz képest. A különbség laktózon szignifikánssá vált, míg cellulózon abszolúttá – ezen a szénforráson a *T. reesei* *Δvell* hiánymutáns nem képes növekedni. Mivel a laktóz és a cellulóz celluláz géneket indukáló szénforrások, az eredmények azt sejtették, hogy a VEL1 szükséges a cellulázok keletkezéséhez *T. reesei*-ben. Ennek eldöntéséhez a mutánst laktózon növesztettük, melynek hasznosítása – szemben a cellulózzal – független a kiválasztott celluláz enzimektől.

Süllyesztett (batch) körülmények között, minimál táptalajon a laktóz fogyási illetve a biomassza képződési ráta is szignifikánsan alacsonyabb volt a *T. reesei* *Δvell* hiánymutáns törzsben, mint a vad típusban. Legfontosabb megfigyelésünk azonban az volt, hogy celluláz aktivitásokat a mutáns törzs fermentációjának egyetlen időpillanatában sem tudtunk mérni. A fenti eredményeket megerősítendő a két legfontosabb celluláz gén, a *cbh1* és a *cbh2*, továbbá a legfontosabb celluláz regulátort kódoló *xyl1* gén kifejeződését Real-Time PCR segítségével számszerűsítettük. Mindhárom gén kifejeződése jelentősen visszaesett a *Δvell* hiánymutáns törzsben a vad típushoz képest. Mivel a mutáns laktózon rosszul növekedett – s így az eredmények elvileg ennek is betudhatók lehettek – a génkifejeződéseket nyugvó sejtes rendszerben, a cellulázok legerősebb induktoraként számon tartott szoforózon (2-O-béta-D-glükopiranozil-alfa-D-glükóz) is teszteltük. Az így kapott eredmények megegyeztek a laktóz szénforráson elértekkel: vad típusban a transzkriptumok mennyisége szoforóz hozzáadására egyből jelentősen emelkedni kezdett, míg a hiánymutáns törzsben változatlanok maradtak. Megállapítottuk, hogy *T. reesei*-ben a LAE1 VELVET komplexen belüli társa, a VEL1 is esszenciális a cellulázok képződésében, és döntő szerepe van a gomba morfológiájában és differenciálódásában is.

Az eredményeinket tartalmazó közleményt a **PLoSOne** szakfolyóirat (**impakt factor: 3.534**) fogadta el közlésre 2014. októberében (Karimi-Aghcheh et al. 2014).

A fenti két közlemény tartalmazza a kutatási tervben tett vállalásainkra vonatkozó eredményeket. A pályázati futamidő alatt azonban más szakmai projekteken is részt vettem, így röviden ezek eredményeiről is beszámolok.

¹ A *Sordariomycetes* osztály fajainál (ahová a *T. reesei* is tartozik) a gének/proteinek nevét három betűvel és egy számmal jelzik, szemben a csak betűkből felépülő *Eurotiomycetes* osztály nomenklatúrájával.

Egy osztrák-holland-magyar együttműködés keretében a *T. reesei* intracelluláris galakto-oligoszaccharidjainak minőségi/mennyiségi viszonyait vizsgáltuk. Célunk a celluláz gének laktóz általi indukciója során keletkező induktor azonosítása volt. A vizsgálat közvetlen metabolomikai megközelítést alkalmazott: az eltérő celluláz termelőképeségű (mutáns) törzsekből kipreparáltuk az intracelluláris cukor-származékokat, majd tömegspektrométerhez kapcsolt High-Performance Anion Exchange Chromatography készülék (HPAEC-MS) révén meghatároztuk a galaktóz tartalmú elemeket. Sikerült találnunk egy béta (1-1) kötést tartalmazó diszacharidot, melynek sejten belüli koncentrációja jól korrelált a celluláz termelő képességgel, s laktózon kívül más szénforráson nem keletkezett, így az első számú celluláz induktornak számít. Eredményeinket az **Applied Microbiology and Biotechnology** folyóirat (impakt faktor: 3.811) közölte le 2013-ban (Karaffa et al., 2013).

Laboratóriumunk másfél évtizede tanulmányozza a fonalas gombák laktóz és D-galaktóz anyagcseréjét. Ebből a szerteágazó kutatási programból a pályázat időtartama alatt négy új közlemény jelent meg. Az elsőben (Fekete et al., 2012) az *Aspergillus nidulans* laktóz transzportját tanulmányoztuk. Azonosítottunk és jellemeztünk egy laktóz permeázt kódoló gént, és megállapítottuk, hogy noha élettanilag releváns transzportert kódol, nem egyedül felelős a laktóz transzportjáért.² A másodikban (Orosz et al., 2014) a laktóz intracelluláris hidrolízisét végző béta-galaktozidáz, a *BgaD* szabályzását vizsgáltuk. Megállapítottuk, hogy a D-galaktóz lebontása nem szükséges a gén indukciójához, a D-galaktóz lebontási útvonalak köztesei nem indukálják a hidrolázt. A harmadik tanulmány során az *Aspergillus niger* gomba D-galaktóz negatív fenotípusának élettani hátterét tanulmányoztuk (Fekete et al., 2012). A legtöbb Fekete *Aspergillus*-hoz hasonlóan ez a faj sem képes csírázni D-galaktózon. Megállapítottuk, hogy a D-galaktóz negatív fenotípus csak a konídiospórára vonatkozik, ugyanis a micélium már D-galaktóz pozitív rokon gombákhoz (pl. *A. nidulans*) hasonló rátával képes a D-galaktóz felvételére. A spórák D-galaktóz negatív fenotípusa a cukor felvételével van összefüggésben; a spórák nem képesek ezt a hexózt transzportálni. Végezetül, *in silico* azonosítottuk a penicillin antibiotikumot termelő *Penicillium chrysogenum* gomba laktóz transzportereit illetve extra-és intracelluláris hidrolázait, majd expressziós analízisnek vetettük alá őket. Eredményeink azt mutatták, hogy a *P. chrysogenum* laktóz anyagcseréje több elemből épül fel és részben eltérően szabályzódik az *A. nidulans*-hoz vagy a *T. reesei*-hez képest (Jónás et al., 2014).

Tanszékünk legújabb, rendkívül ígéretes kutatási programja egy eddig le nem írt intron-kivágási mechanizmus, az ún. stwintron-jelenség filogenetikai előfordulását és élettani szerepét vizsgálja. Az első vonatkozó közlemény is a pályázati támogatás időszakában jelent meg (Flipphi et al., 2012).

Végezetül, a Debreceni Egyetem Mezőgazdaságtudományi Karán régóta sikeresen kutatják a *Botrytis cinerea* gomba populációgenetikáját, molekuláris élettanát. A programhoz Laboratóriumunk rendszeres módszertani támogatást ad (Asadollahi et al., 2013).

² A második laktóz transzportert (*lacpB*) az elmúlt hetekben azonosítottuk. Az *A. nidulans* *lacpA/lacpB* kettős mutáns teljes mértékben képtelen a laktóz felvételére.