

Zárójelentés a

Combining Phylogenetics with Genomics to unravel the Evolutionary Origins of Fungal Multicellularity

118722 számú ERC_HU_15 projekthez

Nagy László
MTA SZBK Biokémiai Intézet.

Az ERC_HU támogatás felhasználásával sikeresen végrehajtottuk a kutatási program első évére és harmadik félévére tervezett feladatokat, beszereztük az ERC projektre való felkészüléshez, és a tervezett RNS munkához szükséges eszközöket. A projekt kivitelezéséhez egy postdoc és egy laboratóriumi asszisztens munkatársat alkalmaztunk. 2017-ben sikeresen pályáztunk ERC Starting Grant-re, amely projekt 2018 januárjától indul. A következőkben a munkaterv 3 alprojektje szerint, periódusokra lebontva (1-12 hónap és 13-18 hónap) tárgyalom az elért eredményeket.

1. Alprojekt:

1. periódus (1-12 hónap). Teljes genom szekvenciák felhasználásával összeállítottunk két, az egyszerű és a komplex soksejtűség vizsgálatára alkalmas genomi adatsort. Mindkét adatsoron rekonstruáltuk a génduplikációs és génvesztés mintázatokat a COMPARE módszer segítségével (Nagy és mtsi 2016 MBE), majd a soksejtűség evolúciójának fontos lépéseivel összehasonlítva predikciókat tettünk a soksejtűség genetikai hátterére vonatkozóan. Az egyszerű soksejtűség vizsgálatára egy 72 fajból álló adatsort állítottunk össze. A prediktált fehérje szekvenciákat 'all-vs-all' blast hasonlóságok alapján klasztereztük, ami 56784 fehérjeklasztert eredményezett. Ezek után azonosítottuk az egykópiás klasztereket, amelyeket egy maximum likelihood fajfa becslésére használtunk fel. A fajtát figyelembe véve, minden klaszteren rekonstruáltuk a géncsalád evolúciót formáló génduplikációkat és -vesztéseket. A kapott mintázatokat ezután összevetve a soksejtűség megjelenésének és elvesztésének mintázataival, 300 olyan géncsaládot azonosítottunk melyek evolúciója szoros korrelációt mutat a soksejtűség evolúciójával. Ezek további vizsgálata folyamatban van. Hasonló módon jártunk el a komplex soksejtűség genetikai hátterének megértésében is, amelyet egy 34 fajból álló adatsoron végeztünk és amelynek eredményei jelenleg közlés alatt állnak.

2. periódus (13-18 hónap). Az 1. időszakban összeállított genomi adatsor segítségével 2 fő analízist hajtottunk végre. Az egyik a soksejtűség evolúciójával korrelációt mutató génduplikáció és -vesztés mintázatot mutató géncsaládok azonosítása a COMPARE módszer segítségével. Ennek eredményeként az 1. időszakban 300 géncsaládot azonosítottunk, melyek további analízise számos citokróm p450 és polarizált növekedésben szerepet játszó család esetében a soksejtűséggel való korrelációt fedett fel. A másik fő analízis a soksejtűség különböző aspektusaival irodalmi adatok alapján

összefüggésbe hozható géncsaládok vizsgálata. A polarizált növekedés, szeptum képződés, sejtfalszintézis és depozíció, sejt-sejt kommunikáció és adhézió, valamint génexpresszió reguláció kulcsszavak segítségével több mint 500 publikációból 986 funkcionálisan jellemzett, a gombák soksejtű növekedésével összefüggésbe hozható gént azonosítottunk. Minden génhez azonosítottuk az azt tartalmazó géncsaládot, majd rekonstruáltuk a géncsalád duplikációs mintázatát, annak érdekében, hogy megértsük a soksejtűségben szerepet játszó gének evolúciós eredetét és dinamikáját. A 986 gén összesen 435 géncsaládba tartozott. Az alprojekt eredményei publikációra készek, a kézirat benyújtását 2018 tavaszára tervezzük.

2. Alprojekt:

1. periódus (1-12 hónap). Az ATAC-Seq módszer a nyitott kromatin régiók szekvenálásán alapuló térképezésének legújabb módszere (Buenrostro és mtsai 2013, Nature Methods). A kutatás első évében a protokoll optimalizációja volt a cél, melynek első lépéseként *Coprinopsis cinerea* fajból sejtmagi kivonatok előállítását céloztuk meg. Az irodalomban *Coprinopsis*-ra optimalizált protokoll nem ismert, így hasonló fonalas gombákra publikált sejtmag-izoláló módszerekből indultunk ki. A módszer *Coprinopsis*-ra való adaptációja folyamatban van, előzetes eredményeink protoplasztálással előállított sejtmag kivonatokon végzett transzpozíciós reakciókkal (ami az ATAC-Seq módszer első lépése) ígéretesek.

2. periódus (13-18 hónap). Az ATAC-Seq módszer további optimalizációja, illetve a DAP-Seq (O'Malley és mtsai 2017, Cell) protokoll implementációja. Utóbbi módszer az ATAC-Seq komplementereként transzkripció faktor kötőhelyek azonosítására szolgál. Ennek részeként kidolgoztunk egy *in vitro* transzkripció és transzláció rendszert, amellyel képesek vagyunk *Schizophyllum commune* és *Coprinopsis cinerea* transzkripció faktorok *in vitro* termeltetésére. Cisz-reguláló szekvenciák *in silico* analízisére koexpresszált gének promótereit hasonlítottuk össze és azokban transzkripció faktor kötőhelyeket prediktáltunk az *Armillaria ostoyae* transzkriptóm alapján. Ezen eredményeket 2017-ben közzétettük (Sipos és mtsai Nature Ecology and Evolution 2017).

3. Alprojekt:

1. periódus (1-12 hónap). A komplex soksejtű termőtestek vizsgálatára a *Coprinopsis cinerea*, *Armillaria ostoyae* és *Phanerochaete chrysosporium* fajok transzkriptóm szekvenálását végeztük el. A *Coprinopsis* és az *Armillaria* esetében 6, míg a *Phanerochaete* esetében 3 fejlődési stádiumból vettünk mintát, majd Illumina HiSeq platformon szekvenáltuk. Minden stádiumhoz három biológiai ismétlést vizsgáltunk. A kapott transzkriptómok előzetes kiértékelése alapján a biológiai ismétlések génenkénti expressziós értékek alapján egymással jól csoportosulnak, további összehasonlító vizsgálatuk, a fejlődésben szerepet játszó gének, különös tekintettel a transzkripció faktorokra, folyamatban van. Az *Armillaria ostoyae* transzkriptómjának elemzését közzétettük (Sipos és mtsai Nature Ecology and Evolution 2017).

A projekt során egysejt-transzkriptomikai módszereket optimalizálunk *Coprinopsis* és más fajok korai fejlődésének vizsgálatához. Ehhez a Smart-Seq 2 protokollt választottuk (Picelli és mtsai Nature Methods 2014), melyet sikeresen implementáltunk a laborban. Az első RNA-Seq kísérletekben kapott Illumina MiSeq read-ek nagy része (>80%) fehérjekódoló genomi szekvenciákra esett, ami jelzi a módszer sikerességét. A továbbiakban a *Coprinopsis* esetében a komplex soksejtű struktúrák megjelenésének folyamatát fogjuk vizsgálni egysejt transzkriptomika segítségével.

2. periódus (13-18 hónap). Hat Basidiomycota faj (*Coprinopsis cinerea*, *Schizophyllum commune*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Rickenella mellea*, *Armillaria ostoyae*,

Lentinus tigrinus) teljes ontogenezisét lefedő transzkriptóm adatsorokat generáltunk. Összesen 132 RNS könyvtár került szekvenálásra. A program célja komplex soksejtű termőtestek fejlődése mögött meghúzódó konzervált és fajspecifikus gének azonosítása, a termőtestképzéshez szükséges minimális genetikai eszköztár azonosítása. A projekt során generált szekvenálási eredmények analízise folyamatban van, az eddigi vizsgálatok során 2-7000 a fejlődésben szerepet játszó gént azonosítottunk a 6 fajban, melyek közül számos mutat a fejlődéssel összefüggő expressziós mintázatot mind a 6 fajban.

Egysejt-transzkriptómikai kísérletekhez optimalizáltuk *Coprinopsis cinerea* primordiumok beágyazásának módját, a kriometszés és a 'Laser Capture Microdissection' technikával történő egysejt-izolálás protokolljait. Ennek során a *Coprinopsis cinerea* korai ontogenetikai eseményeinek minden eddigénél részletesebb leírása készült el, beleértve egy részletes sejt-leszármazási útvonalat is. Három új, korai fejlődési állapotot azonosítottunk. A Smart-Seq 2 RNS-amplifikációs protokollt sikeresen beállítottuk (Picelli és mtsai Nat. Methods alapján) és a kereskedelmi forgalomban kapható, hasonló kémiát alkalmazó kittel összehasonlításban leteszteltük. Előzetes, a *Coprinopsis cinerea* 1-es típusú primordiaiból izolált egysejt RNS minták szekvenálásának eredményei alapján ("pilótakísérletek") jelenleg számos sejttípust tartalmazó egysejt minta szekvenálása folyamatban van.