

Fejlődési stádiumtól függően expresszálódó gének izolálása és jellemzése mikotoxin termelő *Gibberella fujikuroi* törzsekben (Szakmai beszámoló)

A szakmai beszámoló elkészítésekor -figyelembe véve az útmutatásokat-, az anyag és módszertani részt csak érintőlegesen írom le, mivel az a publikációkból egyértelműen beazonosítható. Inkább a vizsgálatok eredményeinek ötvözését, következtetések és javaslatok levonását tűztem ki célul.

A *G. fujikuroi* gyűjtőfajba tartozó gombák jelentős mezőgazdasági kórokozók. Gazdasági fontosságukat mutatja, hogy számos termesztett növényfajról izolálták őket, de ugyanúgy megtalálhatók a gyomokon is, sőt egyes fásszárúak is gazdanövényeik lehetnek. A gabonaféléken való jelenlétük nemcsak mennyiségi, de másodlagos anyagcseretermékeinek, a mikotoxinjainak révén, minőségi termésveszteséget is okoz. Így állat- és humán-egészségügyi fontosságuk is megkérdőjelezhetetlen. Az ellenük való védekezés tehát alapvető feladat. Hatékonyabb védekezési eljárások kifejlesztéséhez szükség van a kórokozók beható genetikai, élettani és ökológiai tanulmányozására. A molekuláris biológiai technológiák lehetőséget nyújtanak többek között a gomba-növény közötti bonyolult kapcsolat feltárására, a gombák reprodukciós stratégiáinak megismerésére, a mikotoxin termelés genetikai hátterének felderítésére.

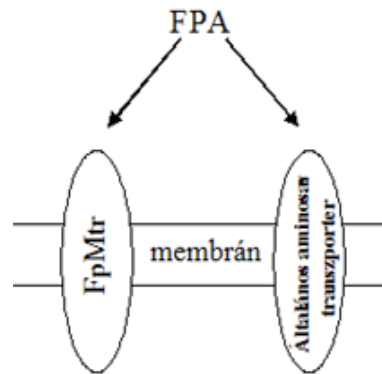
Munkánk elsődleges célja fejlődésspecifikus gének azonosítása, izolálása és jellemzése volt egy, a *G. fujikuroi* fajkomplexbe tartozó gombában, a *F. proliferatumban*. A kiválasztott ITEM 2287 törzsből a fejlődési stádiumtól függően expresszálódó gének keresését cDNS-AFLP módszerrel végeztük. Ennek előzményeként meghatároztuk a gomba növekedési görbéjét, hogy ténylegesen két eltérő fejlődési fázist tudjunk összehasonlítani. A cDNS-AFLP kísérletek során kapott több mint 300 differenciáló fragmentumból negyvennyolcat választottunk ki a további vizsgálatokhoz. Ezek közül hét Northern-hibridizációval történt ellenőrzés után is ígéretesnek bizonyult, azaz szignifikánsan eltérő jelet adott a fiatal, 90%-ban csírázó (9 órás) és az öreg (202 órás) tenyészetben.

A hét darab, fejlődési állapottól függő expressziót mutató fragmentum közül három csak a korai életszakaszban adott pozitív jelet, az öregedő tenyészetben ezek nem voltak jelen. További kísérleteinket ezen klónok egyikével folytattuk, amely a nem fejlődésspecifikus működést mutató neutrális aromás és alifás aminosav permeázt kódoló *P. chrysogenum* *PcMTR*, valamint a *N. crassa mtr* génjével mutatott azonosságot. A génbanki hasonlóságok alapján a gént *Fpmtr*-nek neveztük el. A *G. fujikuroi* aminosav transzport rendszeréről

semmilyen információval nem rendelkezünk. Az aszkomicéta fonalas gombák közül az *A. nidulans*, a *P. chrysogenum* és a *N. crassa* aminosav permeázairól szóló irodalmat tudtuk felhasználni kísérleteinkhez.

A *F. proliferatum* genomi génkönyvtárából izoláltuk az *Fpmtr* teljes kópiáját, amelyen egy rövidebb és egy hosszabb exont azonosítottunk, köztük egy rövid intronnal. A start kodon előtti 1 kb méretű promóter részen számos olyan szekvencia motívumot találtunk, amelyek transzkripciós faktorok felismerő szekvenciájaként szolgálhatnak. Ezek alapján valószínűnek tűnik, hogy a *F. proliferatum*-ban is jelen vannak a nitrogén anyagcsere-folyamat szabályozásában résztvevő regulátor fehérjék, mint a GCN4-szerű proteinek, vagy a GATA-típusú transzkripciós faktorok. A GCN4-szerű fehérjék aminosav éhezés esetén az aminosav bioszintézisben részt vevő gének promótereinek TGACTC szekvenciáihoz kötődve fejtik ki szabályozó hatásukat. GATA-típusú regulátor fehérjéket is azonosítottak már fonalas gombákban, melyek a promóter GATA magszekvenciájú részéhez kötődve indukálják a nitrogén anyagcserében résztvevő gének nagy részét, így például az aminosav transzportereket kódoló géneket is. A gomba számára kedvező N-források jelenlétében (NH_4^+ -ion, glutamin) e transzkripciós faktorok hiányoznak, emiatt nem aktiválódnak ezek a gének. Az *Fpmtr* gén promóterében azonosított GATA szekvencia motívumok alapján valószínűsíthető, hogy a nitrogén katabolit represszió a *F. proliferatum*-ban is fontos szerepet játszik az aminosav felvétel szabályozásában. Ennek bizonyításához elvégeztük a $\Delta Fpmtr$ mutáns és a vad típusú törzs FPA toxikus aminosav analóggal szembeni érzékenységének összehasonlítását. Miután *hph* kazetta felhasználásával $\Delta Fpmtr$ mutáns törzseket hoztunk létre, NH_4^+ -iont tartalmazó minimál táptalajban, növekvő FPA koncentrációban figyeltük a vad és mutáns törzsek növekedését. A vad típusú törzs lényegesen érzékenyebben reagált az FPA jelenlétére. Régóta ismert, hogy az *mtr* lókuszt érintő mutáció rezisztenssé teszi a *N. crassa*-t az FPA-val szemben. Az FPA felvételét a neutrális alifás és aromás Mtr, valamint a *pmg* (*NAAPI*) gén által kódolt általános aminosav transzport rendszer végzi, amelynek működését az NH_4^+ -ion jelenléte blokkolja. Vizsgálataink alapján feltételezhető, hogy a *F. proliferatum*-ban is létezik legalább két aminosav transzporter, amelyek az FPA felvételét végzik (**1. ábra**). Az egyik az FpMtr, míg a másik, a *N. crassa* általános aminosav transzporteréhez hasonló permeáz, amely NH_4^+ -ion jelenlétével gátolható. Azaz, a *F. proliferatum*-ban az aminosavak felvételének szabályozásában a nitrogén katabolit represszió ugyanúgy szerepet játszik, mint a legtöbb eddig tanulmányozott gombában. Ugyanakkor kérdéses, hogy amennyiben az NH_4^+ ion nem blokkolja az FpMtr-el történő aminosav transzportot, akkor miért van jelen az *Fpmtr* gén promóter régiójában a GATA szekvencia

motívum? Ahogyan az aminosav éhezés sem okozott változást az *Fpmtr* aktivitásában. A gén azonos expressziós mintázatot mutatott mind minimál, mind komplett tápközegben, pedig a GCN4-szerű regulátor fehérjék kötőhelyeként azonosított TGACTC szekvencia sor is megtalálható a promóter részben.



1. ábra Az FPA elképzelt felvétele *F. proliferatum*ban

A toxikus aminosav analóg FPA felvételében valószínűleg két aminosav transzporter vesz részt. Az egyik (talán az általános aminosav permeáz) NH_4^+ -ion jelenlétében nem, vagy alig működik, így az FPA bejutása a sejtekbe az FpMtr segítségével történik. Ezért tapasztalhattunk NH_4^+ -ion tartalmú tápközegben a $\Delta Fpmtr$ mutánsokban nagyobb rezisztenciát az FPA-val szemben, mint a vad típusú törzsben.

Tovább bonyolítja a helyzetet, hogy nem találtunk növekedésbeli különbséget a vad és a mutáns törzs között akkor, amikor a gombákat különböző aminosavakkal kiegészített minimál tápoldatban tenyésztettük. A legtöbb aminosav transzporter egy aminosavra vagy nagyon hasonló struktúrájú aminosavak kis csoportjára specifikus, míg mások az aminosavak széles skálájának szállítását végzik. Az Mtr-típusú permeázok nem egy aminosav felvételére specializáltak, hanem neutrális aminosavak felvételében vesznek részt, ahogyan a gombákban általában az AAAP család többi tagja is. A minimál tápoldatot kiegészítettük különböző koncentrációjú savas glutaminsav, bázikus arginin vagy neutrális triptofán aminosavval. Szárazanyagtömeg mérést végezve nem tapasztaltunk semmi különbséget a vad és a mutáns törzsek között. Ez alapján nem tudtuk meghatározni, hogy mely aminosavak szállítását végzi az FpMtr fehérje, sőt még azt sem, hogy egyáltalán végez-e aminosav felvételt. Bár ez utóbbi kérdést eldönteni látszik a vad és a mutáns törzseknek az FPA jelenlétére adott szenzitivitásbeli különbsége.

Az FPA-val kapcsolatos kísérletek eredményei megerősítettek bennünket abban, hogy az *Fpmtr* gén egy olyan fehérjét kódol, amely az Mtr-típusú proteinek közé tartozik. Ezt igazolja a hipotetikus FpMtr transzporter topológiai analízise is. Ugyanis valamennyi Mtr-típusú

permeáznak - az AAP család tagjaként - 11 membránt átérő doménje van, amit mi is bebizonyítottunk az FpMtr fehérjéről számítógépes programok segítségével. Az AAP családot ez a hidrofób profil és a tagok közötti minimális szekvencia konzerváltság jellemzi. Az eddig ismert PcMtr és Mtr transzporter, illetve számítógépes adatbázisokból azonosított Mtr-típusú permeázok egymással 50% feletti aminosav azonosságot mutatnak. Ezzel szemben az FpMtr az előbb említett fehérjékkel csak 31-34% aminosav azonosságot ad. Az FpMtr-t kódoló gén és a *N. crassa mtr* génjének expressziós mintázata szintén különbözik egymástól. Míg az *Fpmtr* fejlődésspecifikusságot mutat, azaz korai életszakaszban aktív és az öregedő gombában represszált a gén, addig az *mtr* konstitutívan expresszálódik minimál tápközegben. Az irodalomban leginkább csak olyan aminosav transzportereket találunk, amelyek a tápközegben jelenlevő tápanyag által erősen szabályozottak, vagy kódoló génjük konstitutívan expresszálódik egész életük folyamán. Ritka kivételként ismerjük az *U. fabae* hausztóriumában detektálható, növény jelenléte által indukált aminosav permeáz. Az aszkomicéta gombák közül egyedül a szaprofiton *A. nidulans*ban találtak fejlődésspecifikus aminosav transzportert, a prolin felvételét végző PrnB-t. A *prnB* expresszióját egyaránt indukálja a prolin jelenléte, az aminosav éhezés és a konídiumok csírázása, ugyanakkor az ammónia és a glükóz együttes jelenléte represszálja működését. Ebben a meglehetősen bonyolult és még nem teljesen ismert módon történő szabályozásban egymással kölcsönhatásban és egymástól független módon is részt vesz számos regulátor fehérje. Így a *prnB*-vel egy klaszterben lévő *prnA* génterméke, a karbon katabolit represszor protein CreA, a GATA-típusú AREA és a CPCA transzkripciós faktor. A csírázó konídiumban a *prnB* aktiválása mindezeketől függetlenül is megtörténik, tehát nem a csírázás során fellépő átmeneti éhezés indukálja expresszióját, hanem az valódi fejlődésspecifikus jelenség. Az *Fpmtr* működését azonban vizsgálataink szerint nem befolyásolja a tápközeg minősége, az aminosav éhezés, vagy NH_4^+ -ion jelenléte, hanem mindig ugyanazt az expressziós mintázatot mutatja. Azaz határozottan erős expressziót mutat csírázáskor, szemben a késői stacionárius fázisban tapasztalt represszálttsággal.

Mindezek alapján felvetődik annak a lehetősége, hogy ha az FpMtr végez is valamilyen aminosav transzport tevékenységet, mégis inkább receptor/szenzor fehérjeként működhet. Az Mtr homológoknak a gomba genomokban található alacsony kópiaszáma is azt a hipotézist erősíti, miszerint az Mtr-típusú fehérjék szenzor funkciót láthatnak el. *S. cerevisiae* esetében ismerünk ilyen példát. Igaz, nem egy Mtr-típusú aminosav permeáz, hiszen ilyen nincs is az élesztőkben, hanem egy AAP családtag transzporter, az Ssy1 végez szenzor/receptor/regulátor feladatot. N-terminális doménje révén közvetlen kapcsolatba lép az extracelluláris

aminosavakkal, és számos aminosav permeázt kódoló gén transzkripcióját szabályozza. A $\Delta Fpmtr$ mutánsokban észlelt fenotípusos változások alátámasztják az Mtr transzporterek szenzorként való működését. Az FpMtr-t kódoló gén inaktiválása késlelteti a konídiumok csírázását, és ezzel párhuzamosan a csíratömlő deformált növekedése figyelhető meg, ami talán a növekedésben bekövetkező átmeneti zavar eredménye lehet.

A *G. fujikuroi* gyűjtőfaj tagjait számos növényről izolálták már. A gazdanövényeiket endofiton életmódot folytatva kolonizálhatják, így sok esetben izolálták a gombát teljesen tünetmentes szövetekből, gyökérből, szárból, magból egyaránt. A környezeti feltételek, a növény és a gomba genetikai háttere egyaránt fontos tényező a tényleges betegség kialakításában, de nem ismert még, hogy miért fordul elő a tünetmentes fertőzés, és mi váltja ki végül a rothadást, vagy a hervadást a gomba által kolonizált szövetekben. Talajfertőzéses kísérleteink során megállapítottuk, hogy a *F. proliferatum*-ra is jellemző az endofiton életmód, hiszen a gomba jelenlétét tünetmentes kukoricában ki tudtuk mutatni. Ugyanakkor, a kukorica szövetek kolonizálásában az *Fpmtr* hiánya hátrányt jelentett a gomba számára, azt sejtetve, hogy a szuboptimális környezeti feltételekhez való alkalmazkodásban komoly feladata lehet a génnek.

A $\Delta Fpmtr$ mutánsok hím-fertilitása nem változott, női fertilitásuk azonban jelentősen gyengült. Nemcsak a peritéciumok megjelenése történt jóval később a vad típushoz képest, hanem azok száma is nagymértékben csökkent a mutánsokban. A peritéciumok képződéséhez nehéz a megfelelő körülményeket biztosítani, de ha az megtörténik, akkor a gomba szexuális ciklusa beindítható. E folyamat genetikai háttere meglehetősen bonyolult, és jórészt még felderítetlen. Az *Fpmtr*-nek szerepe lehet benne, így magyarázható, hogy hiánya valamilyen jelátviteli zavart okozva gyengíti a gomba női fertilitását. Az *Fpmtr* működése a vegetatív inkompatibilitás jelenségével is kapcsolatba hozható. Az FpMtr szenzor funkcióját erősíti meg az az eredményünk, miszerint a vegetatív önincompatibilis vad típusú törzs *nit* mutánsait a $\Delta Fpmtr$ *nit* mutánsok képesek voltak komplementálni.

Úgy tűnik tehát, hogy az *Fpmtr* számos fejlődési folyamatban játszik szerepet, úgy mint a szexuális és paraszexuális rekombinációban, esetleg a környezeti felvételekhez való adaptálódásban. Az FpMtr pedig inkább szenzor/receptor fehérje, mintsem tipikus aminosav transzporter.