

A METABOLIKUS AKTIVITÁS BECSLÉSE AKRIDINNARANCSFLUORESZCENS FESTÉKKEL

SÁNDOR ERZSÉBET, JUHÁSZ ALÍZ, SZENTIRMAI ATTILA, KARAFFA LEVENTE

Mikrobiológiai és Biotechnológiai Tanszék, Természettudományi Kar,
Debreceni Egyetem 4010, Debrecen, Pf. 63.**ASSESSMENT OF THE METABOLIC ACTIVITY USING THE FLUORESCENT DYE ACRIDINE ORANGE**

A quantitative method for the assessment of the metabolic activity of the filamentous fungus *Acremonium chrysogenum* was developed using the fluorescent dye Acridine Orange. The method is based on the reversible red-green shift in the colour of the dye, quantified by image analysis. It was established, that under circumstances leading to high substrate uptake and a subsequently high biomass production and specific growth rate, the mycelia exhibit an overwhelmingly green colour, while under carbon starvation leading to low biomass production and specific growth rates, they look orange-red. This is an original and powerful application of fluorescent staining for the estimation of the metabolic activity of whole mycelia, which provides a new, visual tool for the investigation of this area in filamentous fungi.

BEVEZETÉS

Tenyésszük bármilyen célból a gombákat, minden esetben tudnunk kell, hogy növekedő, hanyatló, netán pusztulóban lévő populációval dolgozunk-e, vagyis, hogy milyen a tenyészet pillanatnyi metabolikus aktivitása.

A tenyészetek szén-dioxid produkciója, oxigén fogyasztása, szubsztráthasznosítása, biomassza, valamint szekunder metabolit termelése együttesen (és részben külön-külön is) a sejtek metabolikus aktivitását jelzi. A metabolikus aktivitás absztrakt fogalom, mi azonban – kihasználva a fluoreszcens mikroszkópi technikák fejlődését – megpróbáltunk reprodukálható módszert kidolgozni a becslésére. Munkánkhoz az ipari mikrobiológia egyik fontos alanyának számító *Acremonium chrysogenum*-ot választottuk. Eddig egy hasonló (bár csak korlátozottan használható) metodika létezett [1] - a következőkben az általunk kidolgozottat ismertetjük. A módszer kidolgozásának részletes kísérleti hátterét lásd a [2, 3] hivatkozásoknál.

IRODALMI ÁTTEKINTÉS

A vizsgálatainkhoz használt akridinnarancs (3, 6 -bisz[dimetilamino] akridin; AO) egy fluoreszcens festék, alkalmazásával már többféle élettani folyamatot tanulmányoztak.

Kémiaileg egy gyenge bázis, amely a sejt belsejében az alacsony kémhatású területeken akkumulálódik. A sejtbe töltés nélküli formában jut be, a citoszolt a külső térbeli koncentrációjának megfelelően gyorsan feltölti. Ezt követően a savas kémhatású organelumokban lassabban, de jóval nagyobb koncentrációban halmozódik föl, mivel nitrogén atomjai kvaternerizálódnak, s az így kialakult alig permeábilis protonált forma csapdába kerül [4]. Az AO-nak különböző formáiban eltérőek az abszorbancia és fluoreszcencia tulajdonságai. A zöld szín az AO monomer formájából származik, míg a

vörös a molekulák oligomer struktúrává alakulásának tulajdonítható [5]. Alacsony koncentrációban az AO 530 nm-es, vagyis zöld fluoreszcenciát ad. Ha a kompartmentekben az AO koncentráció 500 μ M fölé emelkedik, metakromatikus változás történik és a fluoreszcencia 660 nm-re vált, ami narancsvörös színt eredményez.

A festék (illetve fluoreszcenciás adottságai) felhasználható az intravezikuláris kémhatás-változások nyomonkövetésére. A nemprotonált, neutrális forma a membránok mindkét oldalán azonos koncentrációban van jelen. Ezzel ellentétben a töltéssel rendelkező, ezért alig permeabilis forma sejten belüli mozgását a protongradiens irányítja [6], így az alacsony kémhatású intracelluláris sejtalkotókban (endoszómák, lizoszómák, trans-Golgi komplex, exocitotikus vezikulumok) akkumulálódik. A festék felhalmozódásának mértéke ezen savas organelumok belső kémhatásától függ. Minél savasabbak a kompartmentek annál több AO halmozódik föl bennük, és a koncentráció határozza meg a fluoreszcencia színét [7].

Az AO-t elterjedten használják a nukleinsavak kvantitatív citokémiájában, aminek oka, hogy különbözőképpen festi a szimpla szálú (ss) és a dupla szálú (ds) nukleinsavakat. Az AO ds nukleinsavval alkotott komplexe zöld színű ($\lambda = 520$ nm), ss nukleinsavval pedig vörös ($\lambda = 650$ nm; [8]). Az AO interkalálódik a ds nukleinsavakba (DNS, dsRNS), ss nukleinsavhoz való kapcsolódása azonban még nem teljesen világos, ezekhez valószínűleg az ionos AO dimerek kötődnek [9]. A vörös / zöld fluoreszcencia intenzitásának mértéke jelzi a dsDNS transzformációját ssDNS-sé, amit a sejtben a kromatin állapotának alakulása ill. az *in situ* DNS denaturáció indukál. Az AO festés alkalmas a citoplazmában folyó fehérjeszintézis gyors detektálására és a sejtbeli RNS tartalom mérésére is [10].

A MÓDSZER ELVI ALAPJAI

Az öregedő (az életterükben található tápanyagokat jórészt elfogyasztott, lelassult vagy leállt növekedésű) gombasejtek egyik karakterisztikus jellemzője a vakuolizáció, melynek során mind a vakuolumok száma, mind térfogatuk jelentősen megnő [11-13]. Régóta ismert, hogy a vakuolumok kémhatása az életkorral változik [14, 15], idősebb korban lényegesen savanyúbbá válnak [16]. Az irodalom ismeretében feltételezhető, hogy a savasodás biokémiaiilag a vakuolumok membránjához kötött protonfüggő ATPázok működésének az eredménye, melyek a gombák vakuolumainak membránján keresztül protongradienst teremtenek [17-20]. Az AO festődésben bekövetkező színváltozást ezért mi a vakuolumok kémhatás változásának tulajdonítjuk.

Az Irodalmi áttekintésből ill. a fentiekből következően módszerünk elvi alapja tehát az volt, hogy ha egy sejtben vagy sejtrégióban időegység alatt csak kevés szénváz hasznosul, akkor ez a vakuolumok savasodásával és / vagy savanyú vakuolumok megjelenésével fog együtt járni, ami akridinnarancssal, mint indikátorral, kimutatható. Nagy fluxus esetén ellentétes tendenciák és ellentétes (zöld színű) festődés lesz a jellemző. A festődés eredménye fluoreszcens mikroszkóppal a mintavételt követően 15 perccel már látható, mikroszkópra szerelt fényképezőgéppel megörökíthető, Image Analysis szoftverrel pedig reprodukálhatóan számszerűsíteni is lehet.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

TÖRZS, TÖRZSFENNTARTÁS, TENYÉSZTÉSI KÖRÜLMÉNYEK:

Acremonium chrysogenum ATCC 46117. A sejteket ferdített agarcsöveken, +4 °C-on tartottuk fenn. A tenyésztési körülmények és táptalajok részletes leírását illetően korábbi publikációinkra hivatkozunk [3, 13, 21-26]. A kísérleteink során használt Erlenmayer-lombikokba 3 db egyenként 6 cm-es üvegtorlót építettünk, melyek szerepe a

folyadékáramlás turbulensebbé tétele, a levegő-víz határfelület megnövelése, vagyis a hatékonyabb levegőztetés volt [23].

ANALITIKAI MÓDSZEREK:

Növekedés: az egységnyi térfogatra vonatkoztatott szárazanyagtartalom gyarapodására vezettük vissza.

Légzés: Clark-típusú polarográfiás oxigén elektróddal.

Szén-dioxid produkció: on-line tömegspektrométerrel (MMG-80).

Kla becslése: a szulfit-oxidációs módszerrel [24].

Szacharóz és glükóz meghatározás: HPLC-analízissel (Gilson), Ca-fázisú ioncserélő oszlopon, 80 °C-on, 0.5 mL / perc áramlási sebesség mellett. Eluensként tridesztillált vizet, érzékelőként törésmutató detektort (Gilson) használtunk.

Festés és mikroszkópizálás: 0.5 ml mintát lecentrifugáltunk, a felülúszót 0.5 ml 0.1 M Na-foszfát pufferben (pH = 7.0) készített 400 µM AO oldattal helyettesítettük. 10 perc elteltével a festékoldatot 0.1 M Na-foszfát pufferre cseréltük. A preparátumot Jenalumar epifluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk.

Image analysis: Leica Q 600 Imaging Workstation-re írt programmal, ami megadta egyrészt a teljes festődő terület, másrészt a zöldre festődő terület méretét. Ezekből az adatokból kiszámítható volt a micéliumon belül a zölden festődő területek aránya.

EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉSÜK

SZAKASZOS FERMENTÁCIÓ

A glükóz szénforráson történt tenyésztés során rendszeres időközönként mintát vettünk, és megvizsgáltuk az AO festődést. A leoltást követően a csírázó spórák előbb vörösen, majd egyre nagyobb számban zölden fluoreszkáltak, jelezve metabolikus aktivitásuk fokozódását. A növekedési szakaszban a micéliumok csaknem kizárólag zöld színben fluoreszkáltak, míg a szénforrás elfogyásakor, a légzési intenzitás csökkenésekor és a növekedés leállásakor vörösre kezdtek váltani. A biomassa koncentráció és a szén-dioxid produkció hanyatlása idején a tenyészetek jórészt vörös színt mutattak. A micéliumon belül megjelenő vörös szín nem volt egyenletes, hanem eleinte kicsi, majd az idő előrehaladtával egyre nagyobb foltokban fordult elő. Ezek a foltok minden valószínűség szerint a vakuolumokat jelezték (fáziskontraszt felvételeken látni is lehetett őket). A szakaszos fermentáció értékelése tehát azt jelzi, hogy az AO festődés zöld színt eredményez, ha a tenyészet gyorsan nő, szubsztráthasznosítása, légzése erőteljes. A metabolikus aktivitás hanyatlásakor viszont a micéliumok egyre vörösebb színben tündökölnek, míg végül a zöld szín aránya nullára csökkent.

RÁADAGOLÁSOS FERMENTÁCIÓ

Első szakaszában a tenyészet növekedése, szubsztrát-hasznosítása, légzése, szén-dioxid termelése hasonló jellegű volt, mint a szakaszos fermentációnál; a rövid lappangó fázist a fenti paraméterek gyors felfutása követte, majd a glükóz teljes ill. a szacharóz kb. 75 %-nak elfogyásakor a növekedés üteme lassulni kezdett, végül teljesen leállt. Ekkor glükózt adtunk a tenyészethez. Ez a biomassa produkció és a légzés gyors megugrását eredményezte, ami azonban a glükóz elfogyásával hamar lecsengett.

Az akridinnarancs festődés a tenyészet leoltása és a glükóz-ráadagolás között szintén a szakaszos fermentációnál leírt jellemzőket mutatta. Alig egy órával a ráadagolás után azonban a tenyészet fluoreszcenciája zöldre váltott, jelezve a metabolikus aktivitás

glükóz hatására történő fokozódását. A zöld szín néhány órán át, a glükóz túlnyomó részének elfogyásáig megmaradt, ezt követően újra visszaállt a hanyatló kultúrákat jelző vörös fluoreszcencia.

FOLYAMATOS FERMENTÁCIÓ

A növekedés és az AO festődés közötti kapcsolat legkézenfekvőbb bizonyítékát a kemosztát kultúrák vizsgálata nyújtotta. Ilyen rendszerben az alacsonyabb hígítási ráta definíció szerint az átáramló szénváz kisebb fluxusát jelenti [28], aminek következménye az alacsonyabb specifikus növekedési ráta.

Vizsgálataink során négy különböző specifikus növekedési rátán ($D = 0.094 \text{ h}^{-1}$, $D = 0.064 \text{ h}^{-1}$, $D = 0.036 \text{ h}^{-1}$, $D = 0.021 \text{ h}^{-1}$) tanulmányoztuk az AO festődést. Ezek az értékek nagyjából megfelelnek a minimál táptalajon végzett szakaszos fermentációk exponenciális, gyorsulási, lassulási és stacioner fázisainak. Ahogy az elméletileg várható volt, az egyensúlyi biomassza koncentráció mindegyik tenyészetnél nagyjából megegyezett (ez egyben azt is jelzi, hogy a tenyészetek nem voltak oxigén-limitáltak), a specifikus légzési értékek azonban a növekedési rátával egyenes arányban növekedtek. Mivel a kemosztátokat glükóz-limitált üzemmódban futtattuk, a szénforrás koncentrációja értelemszerűen mindvégig nulla volt.

A micéliumok AO festődése lényegesen eltért a különböző hígítási rátákon. A legmagasabb hígítási rátánál észleltük a legnagyobb arányú zöld fluoreszcenciát, a legkisebb növekedési rátánál zöld szín nem látszott, itt már teljes mértékben a vörös került túlsúlyba. A köztes növekedési / hígítási ráta értékeknél az AO festődés is átmeneti jellegű volt.

Festődés és oxigénellátás

Az eddigiek során bizonyítást nyert, hogy a szubsztrátellátottság (és az ezzel összefüggő növekedési ráta) döntően befolyásolja a sejtek AO festődésének jellegét. Egy aerob mikróbatenyészetnek azonban a szénforrással egyenrangú fontosságú szubsztrátja az oxigén is, mi több, sülyesztett kultúrában inkább ez utóbbi szokott a limitáló tényező lenni [24]. A következőkben az oxigénellátás mértékének és az AO festődés jellegének kapcsolatát taglaljuk.

A bioreaktorok oxigéntranszfer rátájának becslése során 30, 80 és 150 ml térfogatú fermentlevet tartalmazó, eltérő felépítésű 500 ml-es Erlenmayer lombikok K_{La} -ját határoztuk meg. Torlótlan ill. torlóval ellátott lombikokat alkalmaztunk; torlótlan lombikoknál további megkülönböztetést tett lehetővé, hogy vagy papírpelenkával és krepppapírral, vagy alumíniumkupakkal fedtük le őket. Az előbbi lényegesen jobb szellőzést tesz lehetővé, vagyis a fémkupak használata csökkenti a K_{La} -t. Hasonlóképpen, a tápközeg térfogatának emelése is a K_{La} csökkenését vonja maga után. A lombikok fenti elrendezése lehetővé tette, hogy csaknem két nagyságrenden belül tetszésünk szerinti K_{La} értéket rendelhessünk egy tenyészethez. A legmagasabb értékkel a 30 ml-es torlós, míg a legalacsonyabbal a 150 ml-es torlótlan lombik rendelkezett. A mintákat egységesen a tenyésztés 15.5 órájában vettük.

A legmagasabb oxigéntranszfer ráta értéknél szinte teljesen zöld színben tündököltek a micéliumok. A K_{La} csökkentésével a vörös szín előbb megjelent, majd fokozatosan egyre dominánsabbá vált. Mivel a leggyengébben levegőztetett tenyészet nyilvánvalóan oxigén limitált, a sejtek metabolikus aktivitása alacsony lehetett. Ezt a vörös micéliumok is jelezték.

A MÓDSZER LEHETSÉGES FEJLESZTÉSEI:

Első lépésben más, rokon gombafajokat (*Aspergillus nidulans*, *Aspergillus oryzae*, *Penicillium chrysogenum*) is megfestettünk AO-val. Valamennyi esetben hasonló jellegű festődést tapasztaltunk a növekedés függvényében.

A következőkben azt próbáltuk megállapítani, hogy mennyire „színtartó” az AO festődés, össze lehet-e a mintákat gyűjteni, és elemzésüket a fermentáció végére halasztani. Ebből a célból a mintákat az AO kezelés után kettéosztottuk; egyik felét azonnal lefotóztuk, míg a másikat lefagyasztottuk. Mint kiderült, a tenyészetek színe több hetes tárolás után sem változott, a mintákat felolvasztva a kontrollal megegyező színű fluoreszcenciát kaptunk.

Módszerünket összehasonlítva a Bevezetőben említett eljárással [1], megállapíthatjuk, hogy míg az ott használt Mag fura nevű festék csak a metabolikusan aktív régiókat festi, addig az AO-t alkalmazva megkülönböztethetők a nagyobb (zöld) és kisebb (piros) metabolikus aktivitással rendelkező sejtek. Módszerünk további előnye, hogy az AO-val festett kép alkalmas számítógépes képelemzéssel (image analysis) történő kiértékelésre is. Jelentősen megkönnyíti az AO festődés alapján történő vizsgálatot az is, hogy a festett minták lefagyasztva akár egy hónapig is tárolhatóak, míg a Mag furával festett képet néhány percen belül ki kell értékelni. Végezetül, míg az AO-t széleskörűen alkalmazzák élő sejtek festésére [5], Mag furával csak a sejtfalukban sok kitint tartalmazó gombák festődnek megfelelően [2].

IRODALOM

- [1] Cox P. W., Thomas C. R. (1999) *Mycol. Res.* **103**: 757-763.
- [2] Sándor E. M. (1999) Morfológiai változások az *Acremonium chrysogenum*-ban és kapcsolatuk a gomba cefalosporin C termelésével. Doktori (Ph.D.) értekezés, Debreceni Egyetem, Orvos-és Egészségtudományi Centrum, Általános Orvostudományi Kar.
- [3] Sándor E., Karaffa L., Paul G.C., Pócsi I., Thomas C.R., Szentirmai A. (2000) *Biotechnol. Letts.* **22**: 693-697.
- [4] Dean R. T., Jessup W., Roberts C. R. (1984) *J. Biochem.* **217**: 27-40.
- [5] Millot C., Millot J.-M., Morjani H., Desplaces A., Manfait M. (1997) *J. Histochem Cytochem* **45**: 1255-1264.
- [6] Warnock D. G., Reenstra W. W., Yee V. J. (1982) *Am. J. Physiol.* **242**: 733-739.
- [7] Huang S. S., Koh H. A., Huang J. S. (1997) *FEBS Letts.* **416**: 297-301.
- [8] Kapuscinski J., Darzynkiewicz Z., Melamed M. R. (1982) *Cytometry* **2**: 201-210.
- [9] Gordon R. Y., Bocharova L. S., Kruman I. I., Popov V. N. (1997) *Cytometry* **29**: 215-221.
- [10] Freudenberg S., Fasold K.-I., Müller S. R., Siedenberg D., Kretzmer G., Schügerl K., Giuseppin M. (1996) *J. Biotechnol.* **46**: 265-273.
- [11] Paul G. C., Kent C. A., Thomas C. R. (1994 a) *Biotechnol. Bioeng.* **44**: 655-660.
- [12] Paul G. C., Kent C. A., Thomas C. R. (1994 b) *Trans. I. Chem.E.* **72**: 95-105.
- [13] Karaffa L., Sándor E., Kozma J., Szentirmai A. (1997) *Proc. Biochem.* **32**: 495-499.
- [14] Cassone A., Carpenielli G., Angionella L., Maddaluno G., Podo F. (1983): *J. Gen. Microbiol.* **129**: 1569-1575.
- [15] Greenfield N. J., Hussain M., Lenard J. (1987) *Biochim. Biophys. Acta* **926**: 205-214.
- [16] Rost F. W. D., Shepherd V. A., Ashford A. E. (1995) *Mycol. Res.* **95**: 549-533.
- [17] Bowman B. J., Bowman E. J. (1986) *J. Membr. Biol.* **94**: 83-97.
- [18] Mellman I., Fuchs R., Helenius A. (1986) *Ann. Rev. Biochem.* **55**: 663-700.
- [19] Rothman J. H., Yamashiro C. T., Raymond C. T., Kane P. M., Stevens T. H. (1989): *J. Cell. Biol.* **109**: 93-100.

- [20] Yamashiro C. T., Kane P. M., Wolczyk D. F., Breston R. A., Stevens T. H. (1990): *Mol. Cell. Biol.* **10**: 3737-3749.
- [21] Karaffa L., Sándor E., Kozma J., Szentirmai A. (1996) *Biotechnol. Letts.* **18**: 701-706.
- [22] Karaffa L., Sándor E., Kozma J., Kubicek, C.P., Szentirmai A. (1999) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **51**: 633-638.
- [23] Karaffa L., Váczy, K., Sándor E., Biró, S.; Szentirmai A., Pócsi, I. (2001) *Free Rad. Res.*, in press.
- [24] Kozma J., Karaffa L. (1996 a) *Hung. J. Ind. Chem.* **24**: 225-227.
- [25] Kozma J., Karaffa L. (1996 b) *J. Biotechnol.* **48**: 59-66.
- [26] Sándor E., Pusztahelyi T., Karaffa L., Karányi Zs., Pócsi I., Biró S., Szentirmai A. (1998) *FEMS Microbiol. Letts.* **164**: 231-236.
- [27] Sándor E., Biró S., Szentirmai A., Karaffa L. (1999) *Biotechnol. Techniques* **13**: 443-445.
- [28] Pirt S. J. (1975) Principles of Microbe and Cell Cultivation. Chapter 5. Chemostat culture. Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK.