

Doktori (PhD) értekezés tézisei

A Claviceps paspali indol-diterpén bioszintézisének vizsgálata Agrobacterium tumefaciens segítségével végzett transzformáción alapuló génkiütéssel

Kozák László

Témavezető: Prof. Dr. Pócsi István



DEBRECENI EGYETEM

Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola

Debrecen, 2021

A *Claviceps paspali* indol-diterpén bioszintézisének vizsgálata *Agrobacterium tumefaciens* segítségével végzett transzformáción alapuló génkiütéssel

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
a Gyógyszerészeti Tudományok tudományágban

Írta: Kozák László okleveles biomérnök

Készült a Debreceni Egyetem Gyógyszerészeti Tudományok doktori iskolája
(Mikrobiológiai programja) keretében

Témavezető: Prof. Dr. Pócsi István, az MTA doktora

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Kónya József, az MTA doktora

tagok: Dr. Majoros László, PhD

Prof. Dr. Gácsér Attila, az MTA doktora

A doktori szigorlat (online formában) időpontja: 2021.06.24. 10 óra

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Papp Tamás, az MTA doktora

Gálné Dr. Miklós Ida, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Kónya József, az MTA doktora

tagok: Prof. Dr. Papp Tamás, az MTA doktora

Gálné Dr. Miklós Ida, PhD

Dr. Majoros László, PhD

Prof. Dr. Gácsér Attila, az MTA doktora

Az értekezés védésének (online formátumban) időpontja: 2021. június. 24. 15:00 óra. A nyilvánosságot online módon biztosítjuk. Amennyiben a vitán részt kíván venni, úgy jelezze a kozaklaci85@gmail.com e-mail címre a vitát megelőző munkanap (2021. június 23.) 16 óráig. A határidő lejártát követően technikai okok miatt már nincs lehetőség a védéshez kapcsolódni.

BEVEZETÉS

Az indol-diterpének (IDT-ek) kis molekulatömegű mikotoxinok, amelyeket eddigi ismereteink szerint az *Aspergillus*, *Penicillium*, *Eupenicillium*, *Claviceps*, *Epichloë*, *Escovopsis*, *Neotyphodium*, *Periglandula* és *Tolypocladium* nemzetségbe tartozó gombafajok, valamint a *Mucor irregularis* gombafaj (Mucoromycota) termelnek. Az IDT-ek hírhedt mikotoxinok, amelyek neurotoxikus és remegéses tüneteket váltanak ki az azokat elfogyasztó rovarokon és emlősökön. Az IDT-ek ezen biológiai aktivitása legalább részben annak tulajdonítható, hogy gátló hatást fejtenek ki az idegrendszer kálium csatornáira. Az IDT-ek által előidézett, sok esetben tömeges mérgezések komoly gazdasági károkat okoznak az állattenyésztési szektorban évről évre, ugyanakkor ezek a komponensek – biológiai aktivitásuknak köszönhetően - a jövőben alapját képezhetik a növényvédelem területén hasznosítható, új hatásmechanizmusú rovarölőszerek kifejlesztésének. Az IDT-ek ezen felül számos további, változatos biológiai aktivitással jellemezhetők, amik a nem túl távoli jövőben alkalmassá tehetik ezeket a vegyületeket arra, hogy a humán és állatgyógyászat területein hasznosítható gyógyszerhatóanyagok kiindulási anyagát képezhessék.

Bioszintézisük során ezek a metabolitok egy geranilgeranil-difoszfát molekulából (GGPP) és egy indol csoportból épülnek össze. Szinte minden eddig leírt IDT génklaszter tartalmazza azokat a konzervált, korai lépéseket kódoló géneket, amelyek a legegyszerűbb felépítésű ciklikus IDT, a paszpalin bioszintézisét teszik lehetővé. A korai lépéseket kódoló gének mellett minden IDT bioszintetikus génklaszterben fellelhetőek azok a sok esetben egyedi gének, melyek enzimtermékei felelnek a paszpalin további módosításáért, ezáltal pedig a különböző gombafajok által termelt IDT-ekre jellemző nagyfokú kémiai diverzitásért.

A *C. paspali* egy növényi parazita Ascomycota törzsbéli gomba, amely *Paspalum* fűféléket fertőz. A gomba a gazdanövényt kialakított együttélés során, egy meghatározott életciklus-szakaszban szkleróciumot képez, amely a legelésző állatokkal és rovarokkal szembeni védekezési stratégia részeként hatásos rovar- és emlős toxinokat tartalmaz. Ezek a toxinok kémiai felépítésük szerint két jól ismert csoportba, az IDT-ek, valamint az ergot alkaloidok csoportjába tartoznak.

Habár az ergot alkaloidok veszélyes mikotoxinok, a *C. paspali* által okozott mérgezésekért nem ez a vegyületcsoport tehető felelőssé. Ennek oka az, hogy a *C. paspali* által termelt ergotamid típusú ergot alkaloidok toxicitása sokkal kisebb, mint azoknak az ergopeptideknek, amelyeket jellemzően a rozst fertőző, és a középkori ergotizmusok kialakulásáért felelős *C. purpurea* termel. Ugyanakkor a *C. paspali* azon tulajdonsága miatt,

hogy nem csupán parazita kultúrában, de fermentációs körülmények között is képes nagy mennyiségben ergot alkaloidokat bioszintetizálni a gyógyszeripar számára kiemelkedően fontos mikroorganizmussá vált.

A *C. paspali* szkleróciumában fellelhető toxinok másik csoportja az IDT-ek családjába tartozik. A *C. paspali* által előállított IDT-ek a paszpalitremek csoportjába sorolható monoprenilált paszpalinin származékok. Ezen felül a szkleróciumban számos paszpalin típusú, prenilálatlan IDT-t is kimutattak már, amik minden bizonnyal a paszpalitrem bioszintézis közti- és melléktermékei.

A *C. paspali* által termelt IDT-ek jelenlétét, valamint azok fajtáit a munkánk megkezdéséig csupán a szkleróciumban vizsgálták. A szkleróciumban előforduló fő IDT-ek a paszpalin, a paxillin, a paszpalinin, a paszpalitrem A és a paszpalitrem B. Ezen felül a *C. paspali* legalább még 7 paszpalitrem és 7 paszpalin analógot képes előállítani a *P. dilatatum*mal történő együttélésekor.

A déli félteke számos országában a *P. dilatatum* széles körben termesztett, igen elterjedt haszonnövény, melyet többek között szarvasmarhák, birkák, valamint lovak takarmányozására alkalmaznak. A *P. dilatatum* egyik legnagyobb hátránya a takarmányozásban az, hogy az azt fogyasztó állatok gyakran szenvednek mérgezést a növényen előforduló gombatoxinok miatt. Először Brown és Rank mutatott rá 1915-ben (Brown és Rank 1915), hogy az ilyen típusú mérgezéseknek a kiváltó oka a *P. dilatatum*mal szimbiózisban élő gomba, a *C. paspali*.

A *C. paspali* által okozott toxikózis elsősorban a déli területeken, mint Ausztráliában, Új-Zélandon, Dél-Afrikában, és Dél-Amerikában okoz problémát, de számos esetleírás származik más területekről is, mint például Spanyolországból, Portugáliából vagy az Egyesült Államokból. Habár a *C. paspali* szklerócium tartalmaz ergot alkaloid típusú metabolitokat is, a mérgezésért minden esetben a gomba által termelt paszpalitrem típusú IDT-ek, elsősorban a paszpalitrem A, B és C felelnek. A *C. paspali* szklerócium elfogyasztása által előidézett tünetegyüttest a szakirodalom Paspalum kergeségnek nevezi. A Paspalum kergeség legjellemzőbb tünetei a fej, a nyak, valamint a végtagok remegése.

Az állatok által elfogyasztott toxin mennyisége az esetek túlnyomó többségében önmagában nem halálos. Az állatok elhullásához általában a koordinálatlan mozgásból eredő balesetek vezetnek. Viszonylag kevés feljegyzett információ áll rendelkezésre arról, hogy a *C. paspali* által termelt IDT-típusú toxinok mérgező eseteket okoztak volna embereken. A leginkább említésre méltó eset az 1946-os nagy indiai rizshiányhoz köthető, amikor India bizonyos területein szélesebb körben fogyasztottak *P. scrobiculatumot*, amit egyfajta kölesként tartanak számon. Ebben az időben több esetleírás jelent meg arról, hogy sok esetben remegéssel

járó mérgezéses tünetek voltak megfigyelhetők a köles elfogyasztása után. Ezek a tünetek jellemzően egy egyedi megjelenésű, magasabb és sötétebb *P. scrobiculatomhoz* voltak köthetők, amelyen később kimutatták a *C. paspali* szkleróciumok jelenlétét. Közegészségügyi szempontból szintén fontos kérdés az, hogy a szarvasmarhák által elfogyasztott paszpalitrem típusú mikotoxinok milyen mértékben tudnak felhalmozódni a tehéntejben, illetve a szarvasmarhák húsában.

A *C. paspali* talán az egyik legellentmondásosabb megítélésű gombafaj, hiszen amellett, hogy komoly károkat okoz az állattenyésztési ágazatban, a gyógyszeriparban széles körben alkalmazzák ergot alkaloid típusú gyógyszer hatóanyagok előállítására fermentációs úton. Az ergot alkaloid típusú gyógyszerhatóanyagok jellemzően félszintetikus termékek, amiket a D-lizergsav kémiai módosításával állítanak elő. Habár a *C. paspali* fermentlevében bizonyos mennyiségű szabad D-lizergsav is felhalmozódik, a fermentáció végtermékei jellemzően az ergotamidok, mint például az ergonovin, lizergsav-metil-karbonil-amid, ergin és erginin. A fermentáció végén valamennyi ergotamid és klavin-típusú ergot alkaloid komponens begyűjtik, és azok lúgos hidrolízise során nyerik ki a D-lizergsavat, ami ezt követően kiindulási anyagként szolgál a szemiszintetikus gyógyszerhatóanyagok előállítására. Az ergot alkaloid típusú gyógyszer hatóanyagokat többek között migrén, Parkinson-kór és szülés utáni vérzés kezelésére alkalmazzák.

Globális szinten a *C. paspali*-t alkalmazva évente több tíz tonna ergot alkaloid típusú hatóanyagot állítanak elő, így elmondható, hogy ez a gomba mind gyógyszeripari, mind pedig humángyógyászati szempontból kiemelkedő fontosságú.

A *C. paspali* azon tulajdonságának ismeretében, hogy a *Paspalum* fűféléket fertőzve számos IDT mikotoxint állít elő, nagyon fontos kérdés az, hogy ezek a toxinok megjelennek-e a fermentációkban, illetve, ha igen, milyen lehetőség van ezek teljes kizárására. Meglepő módon, a munkánk megkezdéséig senki sem vizsgálta, hogy a *C. paspali* képes-e axenikus kultúrában, a gazdanövény jelenléte nélkül előállítani ezeket a másodlagos anyagcseretermékeket.

CÉLKITŰZÉS

(i) Első célunk az volt, hogy megvizsgáljuk, a *C. paspali* DSM833 törzs vajon képes-e fermentációs körülmények között az IDT mikotoxinok előállítására, és ha igen, a termelt IDT-ek spektruma mennyiben hasonlít a *P. dilatatum*mal kölcsönhatásban élő izolátumok által termelt IDT spektrumra.

(ii) Második célkitűzésünk egy olyan genetikai transzformációs protokoll kidolgozása volt, amivel stabil, homokarion *C. paspali* mutánsokat tudunk létrehozni. Munkánk publikálásáig a szakirodalomban nem volt elérhető olyan transzformációs protokoll, amit a *C. paspalira* optimalizáltak volna, és a *C. paspali* jelentősége ellenére még senki sem számolt be a gomba bármilyen célú genetikai módosításáról. A stabil transzformánsok létrehozását nehezíti az a tény, hogy a *C. paspali* hifák, illetve még a képződött protoplasztok is több sejtmagot tartalmaznak, ami megnehezíti a mitotikusan stabil transzformánsok izolálását. Annak érdekében tehát, hogy stabil, genomi integráción átesett transzformánsokat tudjunk létrehozni, úgy döntöttünk, hogy kidolgozzuk a *C. paspali* *Agrobacterium tumefaciens* mediálta transzformációját (*Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation, ATMT), egy olyan izolálási folyamattal kombinálva, ami homokarion, genetikailag egységes sejtmagokat tartalmazó mutánsokat eredményez. A technika kidolgozásával nemcsak stabil transzformációt lehetővé tevő technológiát optimalizáltunk a *C. paspali* fajra, de mi voltunk az elsők, akik ATMT technológiát dolgoztunk ki a *Clavicipitaceae* család valamely tagjára.

(iii) Munkánk további célja az volt, hogy a vad típusú DSM833 törzs IDT profiljának ismeretében, az ATMT módszer felhasználásával génkiütést hajtsunk végre, és így meghatározzuk, illetve kísérletesen igazoljuk a *C. paspali* feltételezett IDT génklaszterét. Ennek okán a klaszter *idtCGBF* génjeit tartalmazó lókuszát ATMT segítségével kicseréltük a higromicin-foszfotranszferáz marker génre, és részletesen vizsgáltuk a keletkezett mutánsok IDT termelődésében bekövetkező változásokat.

(iv) Továbbá célul tűztük ki, hogy a paszpalitrem génklaszter célzott kiütésével olyan *C. paspali* transzformáns törzseket hozzunk létre, amelyek nem képesek az IDT toxinok termelésére, de a kiindulási törzssel azonos mértékben legyenek képesek az ergot alkaloidok előállítására.

(v) A klaszter azonosítását követően elhatároztuk, hogy igazoljuk a klaszter két génjének, az *idtP* P450 monooxygenáz génnek és az *idtF* monoprenil transzferáz génnek a funkcióját ezen gének kiütése, valamint a keletkezett mutánsok IDT profiljának vizsgálata

révén, hogy ezáltal is mélyebb betekintést nyerjünk a paszpalitrem mikotoxinok bioszintézisének folyamatába.

(vi) Végül a mutáns és vad típusú *C. paspali* törzsek metabolit profiljának elemzése, és az elérhető irodalmi adatok tanulmányozása révén célul tűztük ki a *C. paspali* paszpalitrem bioszintézisének modellezését.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Gombatorzs és fermentációs körülmények

Munkánk során a DSMZ törzsgyűjteményben (Braunschweig, Germany) elérhető *C. paspali* DSM 833 izolátummal dolgoztunk, amely azonos a *C. paspali* ATCC 13893 törzsszel. Az ergot alkaloidok és IDT-ek laboratóriumi léptékű termeltetését egy kétlépcsős rázott fermentációs eljárásban valósítottuk meg. Első lépésben az elkészített homogenizátumból 1 mL mennyiséget oltottunk 60 mL inokulum tápfolyadékba (5% mannit; 1% borostyánkősav; 0,5% szójaliszt; 0,2% KH_2PO_4 ; 0,03% $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$; pH=5.2), majd Erlenmeyer lombikban rázatva inkubáltuk 4,16 Hz-en, 28 °C-on 5 napon át. A felnövesztett és besűrűsödött inokulum tenyészetből ezt követően 5 mL-eket oltottunk fő fermentációs tápfolyadékokba (10% szorbit; 3,5% borostyánkősav; 1,5% kukoricalekvár; 0,05% élesztő kivonat; 1,5% NH_4NO_3 ; 0,07% $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$; 0,0022% $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$; 0,001% $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$; pH=5.2), amit további 12 napon át rázatva inkubáltunk az inokulum tenyészetnél leírt körülmények között.

Molekuláris biológiai munkafolyamatok

A *C. paspali* genomi DNS-t a feltárt és előkészített gomba lizátumból a MagNa Pure 2.0 nukleinsav izoláló robottal nyertük ki. Az előkészítéskor a liofilizált és porított micéliumot 400 μL szulfid pufferben (0,7 M NaCl; 0,1 M Na_2SO_3 ; 0,1 M Tris-HCl pH=7,5; 0,05 M EDTA; 1% SDS) szuszpendáltuk fel, amit 3 U proteináz K majd 50 U RNáz enzimmel kezeltünk. Centrifugálást követően a tiszta felülúszót használtuk nagy tisztaságú DNS izolálására.

A PCR reakciók kivitelezéséhez a NEB Phusion HF DNA Polymerase-t használtuk (New England Biolabs, Ipswich, MA). Minden reakció össztérfogata 50 μL volt, ami 20 ng DNS-t tartalmazott genomi, illetve 1 ng DNS-t tartalmazott plazmid templát esetében. A reakciók ezen felül 0,2 mM dNTP elegyet, 1-1 pM szensz és antiszensz primert, 1 μL Phusion

HF DNS polimerázt és 10 µl HF puffert (New England Biolabs, Ipswich, MA) tartalmaztak. A hőmérsékleti ciklusok beállításánál a gyártói utasításoknak megfelelően jártunk el. A klónozási folyamatokat a Gibson Assembly Master Mixxel végeztük el. A reakció elegyek 50 ng linearizált vektor DNS-t, molárisan 3-szoros mennyiségű inzert DNS-t, 10 µL Gibson Assembly Master Mixet, és 20 µL végtér fogat eléréséhez szükséges mennyiségű nukleáz mentes vizet tartalmaztak. A Gibson reakció elegyeket 50 °C- on inkubáltuk 60 percen át mielőtt a ligátumokat *E. coli* XL1blue kémiai kompetens sejtekbe transzformáltuk hősokk módszert alkalmazva. Az *E. coli* transzformáns sejteket kanamicint (25 µg/mL) tartalmazó LB agaron választottuk ki, majd az önálló telepeket 3-3 mL, kanamicint (25 µg/mL) tartalmazó LB tápfolyadékba oltva növesztettük fel.

A felnövesztett tenyészetekből az EZ-10 Spin Column Plasmid DNA MiniPreps Kit segítségével izoláltunk plazmid DNS-t a gyártó által leírt protokoll alapján.

A génkiütésekhez használt plazmidok összeszerelése

Az IDT klaszter *idtCBGF* lókuszának kiütéséhez használt pAg-*idtCBGF*-KO plazmidot két lépésben szerkesztettük meg. Első lépésben a bal oldali célzókart (az *idtC* gén 3' végén elhelyezkedő, 1,5 kbp hosszúságú szakasz) PCR-rel amplifikáltuk a *C. paspali* genomi DNS-ről, majd a PCR segítségével linearizált pAg-H3 vektor *hph* génjének 5' végébe klónoztuk a Gibson Assembly Master Mix segítségével. A ligáláshoz szükséges átfedő végeket a bal oldali célzókar amplifikálásához használt primerek 5' végére fuzionáltattuk. Második lépésben a PCR-rel amplifikált jobb oldali célzókart (az IDT génklaszter 1,9 kbp hosszúságú fragmentuma, amely a paszpalitrem génklaszter *idtF* génjének 5' végében található) a bal oldali célzókart már tartalmazó pAg-H3 plazmid *hph* génjének 3' végébe ligáltuk az előzőekben leírt módon.

Az *idtP* és *idtF* gének kiütéséhez használt konstrukciókat eltérő módon hoztuk létre, ahol a pAg-H3 plazmidról készült amplitikonokat (*hph* gén, valamint a pAg-H3 vektor *hph* gént nem tartalmazó gerince), valamint az *idtP* és *idtF* gének kiütéséhez használt bal és jobb oldali célzókarokat egy-egy lépésben ligáltuk össze a pAg-*idtP*-KO és pAg-*idtF*-KO plazmidokká. A plazmidok helyes struktúráját restriktációs enzim kezeléssel, PCR reakciókkal és Sanger szekvenálással ellenőriztük le, majd a kiválasztott plazmidokat *A. tumefaciens* LBA4404 sejtekbe elektroporáltuk Bio-Rad Micropulser 411BR készülék segítségével. A plazmidokat tartalmazó *A. tumefaciens* transzformánsokat kanamicin (25 µg/mL) és sztreptomycin (50 µg/mL) tartalmú LB agaron választottuk ki.

A *C. paspali* DSM 833 A. tumefaciens segített transzformációja (ATMT)

A PDA ferde agaron felnevesztett *C. paspali* vegetatív micéliumot 50 mL PDB tápfolyadékba inokuláltuk, majd 48 órán át rázatás közben növesztettük 28 °C-on. Az inokulum tenyészetből 5 mL-t 50 mL friss PDB tápfolyadékba oltottunk, amit további 24 órán át rázatás közben növesztettünk 28 °C-on. A tenyészetet ezt követően centrifugáltuk, majd a micéliumot indukciós médium tápfolyadékban (IM tápfolyadék) mostuk, majd végül acetosziringont tartalmazó (200 µM) IM tápfolyadékba vettük fel úgy, hogy a szuszpenzió nedves micéliumra számított koncentrációja 100 mg/mL legyen. A gomba tenyészetet ezt követően rázatás mellett inkubáltuk 8 órán át, 28 °C-on.

A kiválasztott *A. tumefaciens* transzformánsokat 50 mL, kanamicin (25 µg/mL) és sztreptomycin (50 µg/mL) tartalmú LB tápfolyadékban növesztettük fel. A tenyészeteket először 48 órán át rázatva növesztettük 30 °C-on, majd az így kapott inokulumból 1 mL-t 50 LB tápfolyadékba oltva (25 µg/mL kanamicin és 50 µg/mL sztreptomycin) a friss tenyészetet további egy éjszakán át növesztettük, OD₆₀₀=0,2-1 sejtsűrűség eléréséig. A baktérium tenyészeteket centrifugáltuk, IM tápfolyadékban mostuk, majd 50 mL, acetosziringont (200 µM) tartalmazó IM tápfolyadékba szuszpendáltuk fel. A baktérium tenyészetet végül 8 órán át, 30 °C-on inkubáltuk rázatás közben.

Az így felnevesztett baktérium és gomba tenyészetekből ezt követően 100-100 µL mennyiségeket 200 µM acetosziringont tartalmazó indukciós médium agar (IM agar) felszínére szélesztettünk, és együtt inkubáltuk őket 2-6 napig, 28 °C-on. Az együttes növesztést elvégeztük IM agar felszínére helyezett cellulóz-acetát membránon is.

A *C. paspali* transzformánsok szelektálása és izolálása

Az inkubációs idő lejártát követően az IM agar táptalajt PDA top agarral fedtük, amely higromicin és cefotaxim antibiotikumokat tartalmazott olyan koncentrációban, hogy azok az egész agar számított végkoncentráció 200-200 µg/mL legyen egyaránt. Membrán tenyészetek esetében a cellulóz acetát membránokat higromicint (200 µg/mL) és cefotaximot (200 µg/mL) tartalmazó PDA agarra helyeztük át. A tenyészeteket ezt követően további 10 napon át inkubáltuk 28 °C-on. Az inkubációs idő lejártá után az önálló higromicin rezisztens *C. paspali* telepek széléből egy-egy fogpiszkálóhegynyi darabot higromicin (200 µg/mL) tartalmú PDA agarra vittünk át, majd 7 napig inkubáltuk 2 °C-on. Annak érdekében, hogy minél inkább homokarion izolátumokat kapjunk, a tenyészetek újra izolálását 4-5 alkalommal végeztük el.

Az IDT-ek és ergot alkaloidok analitikai vizsgálata

Az IDT komponensek jelenlétét és szerkezetét folyadékkromatográfiával kapcsolt tandem tömegspektrometriával (LC-MS/MS) vizsgáltuk. A minták előkészítésekor a nedves micéliumot liofilizáltuk és porítottuk, majd a porított gomba micéliumból az IDT komponenseket acetonitril:víz (4:1 v/v) elegyben extraháltuk ki. Az így kapott extraktum felülúszójának szűrését követően a mintákat az IDT-ek LC-MS analízisére használtuk fel.

Az ergot alkaloid komponenseket a fermentlevek vizes fázisából mutattuk ki. A fermentlevek 5 g-jait egy 50 mL-es mérő lombikba mértük, amit aztán acetonitril:víz (15:85) eleggyel jelre töltöttünk. A HPLC rendszerbe történő injektálás (10 μ L) előtt a hígított fermentlé oldatot 0,22 μ m-es membránszűrőn szűrtük. A HPLC analízishez egy Waters (Milford, MA) XBridge C18 (100 \times 4.6 mm; 3.5 μ m) analitikai kolonnát használtunk, az UV detektálás hullámhossza $\lambda=310$ nm volt.

Mivel a lizergsav és a paszpálsav együtt eluálódik a fenti módszerben, e két vegyület elválasztására egy külön módszert alkalmaztunk, melynek során az UV detektálást $\lambda=230$ nm-en végeztük. Ebben a módszerben a mintákat kétszeres, acetonitril:víz (5:95) eleggyel történő hígítása után 0,22 μ m membránszűrőn szűrtük. A módszer egy fordított fázisú kolonnát (Zorbax Extend C18, 100 \times 4.6 mm, 3,5 μ m, Agilent Technologies, Santa Clara, CA) használtuk.

AZ ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

A *C. paspali* ATMT módszer optimalizálása

Mivel korábban semmilyen, a *C. paspalira* optimalizált genetikai transzformációs protokoll nem volt elérhető a szakirodalomban, a mi feladatunk volt egy robosztus, stabil, homokarion mutánsokat eredményező transzformációs protokoll kidolgozása erre a gombafajra. Erre a célra az ATMT módszert választottuk ki, amit korábban már számos, ipari szempontból is fontos fonalas gombára adaptáltak sikeresen.

A transzformációs folyamat optimalizálásakor a legkritikusabb paraméterek az *A. tumefaciens* sejtek sűrűsége, valamint a tenyészetek IM agar táptalajon történő együttes növesztésének a napokban kifejezett hossza voltak. A túl nagy *A. tumefaciens* sejtsűrűség rontotta a *C. paspali* transzformánsok életképességét, míg a túl kicsi sejtsűrűség csökkentette a transzformáció hatékonyságát. Hasonlóképpen, a túl hosszúra nyújtott együttes növesztési periódus negatívan hatott a transzformálandó gomba életképességére, míg a túl rövid csökkentette a transzformáció bekövetkeztének valószínűségét. Korábbi megfigyelésekkel összhangban mi is azt tapasztaltuk, hogy az acetosziringon jelenléte az indukciós agarban az együttes növesztés alatt nélkülözhetetlen a sikeres transzformációhoz, és így a T-DNS integrálódásához a befogadó sejt genomjába. A legnagyobb transzformációs hatékonyságot – körülbelül 80 higromicin-rezisztens kolónia per 10 mg nedves *C. paspali* micélium – $OD_{600}=0,5$ *A. tumefaciens* sejtsűrűségnél, valamint 4 napos együtt növesztési időt alkalmazva sikerült elérni.

A *C. paspali* ATMT módszert cellulóz acetát membránon is alkalmaztuk, amihez az indukciós agarra helyezett membránra szélesztettük a sejteket, és annak felületén hajtottuk végre az együttes növesztést. Habár a membránon történt transzformáció sikeresnek bizonyult, a membrános szelekció bevezetése nem növelte meg a transzformáció hatékonyságát.

Annak érdekében, hogy megvizsgáljuk a keletkezett transzformánsok stabilitását, 50 elsődleges higromicin-rezisztens kolóniát oltottunk át higromicin tartalmú PDA agarra. A transzformánsok nemcsak, hogy végig megtartották a rezisztenciájukat a higromicinnel szemben, de ugyanannyi inkubációs idő alatt egyre nagyobb telepet képeztek higromicin jelenlétében, ami nagy valószínűséggel azzal magyarázható, hogy szelekciós agarra történő, egymást követő izolálásoknak köszönhetően a higromicin rezisztencia gént tartalmazó sejtmagok egyre inkább feldúsultak a micéliumokban, mindinkább ellenállóbbá téve ezzel a sejteket a higromicinnel szemben. A stabil géntranszfer megtörténtét az is igazolta, hogy a

kiválasztott 12 transzformánsból ki tudtuk mutatni PCR reakció segítségével a *hph* gén jelenlétét, míg a vad típusú, transzformálatlan DSM833 izolátumból nem.

A vad típusú *C. paspali* DSM833 által fermentációs körülmények között előállított IDT komponensek

A munkánk megkezdéséig az irodalomban nem volt elérhető adat arról, hogy a *C. paspali* axenikus körülmények között képes-e előállítani IDT típusú metabolitokat. A fermentációs körülmények között növesztett tenyészetből sikerült kimutatnunk paszpalin, paxillin, paszpalinin, paszpalitrem A és paszpalitrem B IDT komponenseket, valamint a paszpalitrem A egy izomerjét, minden bizonnyal a paszpalitrem C lehet. Ezek az IDT komponensek az *in planta* tenyészetekben szintén legnagyobb mennyiségben előforduló IDT variánsok.

A *C. paspali* paszpalitrem gén klaszterének kísérletes igazolása az *idtCBGF* gének kiütése révén

Annak érdekében, hogy kísérletesen igazolni tudjuk a *C. paspali* DSM 833 paszpalitrem génklaszter funkcióját ATMT módszerrel inaktiváltuk a paszpalitrem génklaszter *idtCBGF* lókuszát. A kiválasztott és megvizsgált 12 transzformáns közül négyenél következett be a higromicin homológ beépülése, és ennek révén az *idtCBGF* lókusz kiütése. A négy transzformánsból három homozigóta, egy pedig heterozigóta volt az transzformáns allélra nézve. Annak érdekében, hogy megvizsgáljuk, hogy az *idtCBGF* lókusz kiütése milyen hatással van a *C. paspali* IDT bioszintézisére, két kiválasztott homozigóta génkiütött transzformáns extraktumát is HPLC-MS analízisnek vetettük alá. Ezen törzsek extraktumában egyetlen egy sem volt detektálható a fentebb említett IDT molekulák közül, ami arra utal, hogy a génkiütés teljesen blokkolta az IDT bioszintézisét ezekben a mutáns törzsekben.

Az *idtP* és *idtF* gének szerepének vizsgálata a *C. paspali* paszpalitrem bioszintézisében

Annak érdekében, hogy információt nyerjünk az *idtP* és *idtF* géneknek az IDT bioszintézisben betöltött szerepéről *C. paspaliban*, két-két reprezentatív $\Delta idtP$ és $\Delta idtF$ mutáns törzsből készült extraktum IDT profilját vizsgáltuk meg és hasonlítottuk a vad típusú *C. paspali* IDT profiljához.

A $\Delta idtP$ törzs extraktuma nem tartalmazott kimutatható mennyiségben paszpalitrem A-t, paszpalitrem B-t, illetve paszpalininint, viszont detektálható mennyiségben tartalmazott paszpalint, ami arra utal, hogy ezekben az izolátumokban a génkiütés a paszpalin továbbalakulását akadályozta meg. A $\Delta idtP$ törzsekhez hasonlóan, a $\Delta idtF$ izolátumok extraktumában sem voltak jelen prenilált IDT-ek. Ezzel szemben ezekben az extraktumokban megfigyelhető volt a paszpalinin felhalmozódása, arra utalva, hogy ezekben a transzformánsokban a paszpalinin prenilálása nem történt meg. A paszpalinin mellett kis mennyiségű paszpalin is kimutatható.

A vad típusú és a $\Delta idtCBGF$ *C. paspali* törzsek ergot alkaloid termelésének vizsgálata

Annak érdekében, hogy kimutassuk, hogy az *idtCBGF* gén kiütése, így módon az IDT bioszintézis teljes blokkolása hatással volt-e a *C. paspali* DSM-833 törzs ergot alkaloid termelésére, HPLC analízis segítségével vizsgáltuk a vad típusú, valamint két kiválasztott $\Delta idtCBGF$ mutáns törzs fermentleveiben található ergot alkaloidok profilját és mennyiségét. A fermentlevek extraktumainak vizsgálata kimutatta, hogy a vad típusú és transzformáns törzsek ergot alkaloid termelőképesége közel azonos volt. A vad típusú *C. paspali* DSM-833 $18,30 \pm 1,05$ $\mu\text{g/g}$ ergot alkaloidot termelt, amelyből $1,25 \pm 0,09$ $\mu\text{g/g}$ volt a paszpálsav. A CPIDT2 és CPIDT8 gén törzsek $19,09 \pm 1,30$ $\mu\text{g/g}$ és $18,41 \pm 0,50$ $\mu\text{g/g}$ ergot alkaloidot termeltek, amelyekből $1,17 \pm 0,15$ $\mu\text{g/g}$ és $1,28 \pm 0,11$ $\mu\text{g/g}$ volt a paszpálsav. A különböző típusú ergot alkaloidok, mint például az ergin, lizergsav, lizergsav metil-karbonilamid, ergonovin, izolizergsav-metil-karbonilamid, erginin és paszpálsav komponensek eloszlása a vad típusú és az *idtCBGF* deléciós törzsekben szintén megegyezett.

A *C. paspali* paszpalitrem bioszintézisének modellezése

A *C. paspali* IDT génklaszter funkcionális igazolása lehetővé tette számunkra a paszpalitrem bioszintézis rekonstrukcióját. A klaszter *idtG*, *idtM*, *idtB* és *idtC* génjeinek protein termékei 53, 38, 56 és 45%-os azonosságot mutatnak a *P. paxilli* PaxG (GGPP szintáz), PaxM (FAD-függő monooxigenáz), PaxB (IDT cikláz) és PaxC (prenil transzferáz) fehérjéivel, amely gének protein termékei bizonyítottan az első stabil ciklikus IDT intermedier, a paszpalin kialakulásáért felelnek. Ebből kifolyólag feltételezhető, hogy hasonlóképpen a *C. paspali* *idtG*, *idtM*, *idtB* és *idtC* génjei a paszpalitrem bioszintézis korai lépéseit katalizálják, a paszpalin

kialakulását eredményezve. A paszpalitrem génklaszter *idtP* és *idtQ* génjei egy-egy feltételezett citokróm P450 monooxygenáz enzimet kódolnak.

Az IdtP egy citokróm P450 monooxygenáz enzimet kódol, aminek a fehérje terméke 41% hasonlóságot mutat a *P. paxilli* PaxP enzimével aminosav szinten. Minden bizonnyal, a PaxP-hez hasonlóan, az IdtP a paszpalin konverzióját katalizálja 13-dezoxipaxillinné, β -PC-M6 intermedieren keresztül, a C30 metil csoport eliminálása, majd pedig a C10 karbonil installálása révén.

Az IdtQ aminosav-szekvenciája 37%-os azonosságot mutat a *P. paxilli* PaxQ enzim aminosav szekvenciájával. Az IdtQ szerepe kettős. Egyrészt katalizálja a 13-dezoxipaxillin C13 oxidációját, ami paxillint eredményez, másfelől pedig a kialakult intermedier C7 szénatomjának oxidációja révén alakítja ki a paszpalinint.

Mivel korábban paspalicint (a 13-dezoxipaxillin C7 oxidált változata) is detektálták *C. paspali* – *P. dilatatum* együttélésből a paxillinen és paszpalininen felül, valószínű, hogy a C7 és C13 oxidáció sorrendje felcserélhető, és a paszpalinin bioszintézise mind paxillin, mind pedig paspalicin köztitermékből is megtörténik.

A paszpalitrem bioszintézis során következő lépése a 2-metilbut-2-én oldallánc kialakítása a C21 vagy C20 pozíciókban, paszpalitrem A-t vagy paszpalitrem C-t eredményezve. A prenilációs reakció elvégzésére a legvalószínűbb jelölt az IdtF prenil transferáz volt, ami 21% hasonlóságot mutat az *A. flavus* aflatrem bioszintézisének AtmD fehérjéjével. Ennek megfelelően az általunk generált $\Delta idtF$ törzsek extraktumaiban nem voltak jelen prenilált IDT származékok, hanem a paszpalinin felhalmozódása volt megfigyelhető, ami egyértelműen bizonyítja, hogy a paszpalitrem bioszintézisben az IdtF felel a paszpalinin prenilációjáért. A paszpalitrem bioszintézis utolsó lépése a paszpalitrem A prenil-csoportjának C32 hidroxilációja, ami a végterméket, a paszpalitrem B-t eredményezi. A *C. paspali* IDT génklaszter bioinformatikai analízisekor nem mutattak ki olyan gént, amely feltételezhetően ezt a szerepet töltené be, így nagy valószínűséggel ezt a funkciót egy klaszteren kívüli gén, vagy nagyobb eséllyel egy olyan gén tölti be, amely a JN613321 és JN613322 kontigok közötti, a genomi szekvencia-adatokból hiányzó szakaszban helyezkedik el.

ÖSSZEFOGLALÁS

A *C. paspali* egy növényparazita Ascomycota törzsbéli gomba, amely *Paspalum* fűfélékkel való együttélésekor nagy mennyiségben állít elő IDT típusú mikotoxinokat. Abból kifolyólag, hogy a *P. dilatatum* – a *C. paspali* elsődleges gazdanövénye – egy igen elterjedt takarmánynövény a déli féltekén, az ilyen típusú mérgezések jelentős károkat okoznak az állattenyésztési szektorban minden évben. Ugyanakkor a *C. paspali* a gyógyszeriparban előszeretettel alkalmazzák azon tulajdonsága miatt, hogy axenikus körülmények között nagy hozamban képes vízoldható ergot alkaloid származékokat előállítani.

Ezek tekintetében meglepő, hogy ez idáig senki sem vizsgálta, hogy a *C. paspali* fermentációs körülmények között képes-e előállítani IDT típusú mikotoxinokat. Továbbá munkánk megjelenéséig nem dolgoztak ki olyan genetikai transzformációs módszert, amellyel hatékonyan lehetne elvégezni a kívánt genetikai módosításokat ezen a gombán. Ennek következtében, sem az ergot alkaloid, sem pedig az IDT bioszintetikus génklaszterek kísérletes igazolása nem történt meg ebben a gombában.

Munkám során elsőként igazoltam azt, hogy a *C. paspali* axenikus körülmények között képes előállítani IDT típusú mikotoxinokat.

Annak érdekében, hogy kísérletesen is tudjuk igazolni a feltételezett IDT génklaszter funkcióját a *C. paspali*-ban, kifejlesztettünk egy *A. tumefaciens* segített géntranszferen alapuló stabil transzformációs rendszert erre a gombára. Az általunk kifejlesztett transzformációs módszer segítségével sikeresen inaktíváltuk az *idT* génklaszter egy részét, ami az IDT bioszintézis teljes blokkolását eredményezte a vizsgált gén-kiütött transzformációkban.

Az ATMT módszert felhasználva kísérletesen igazoltuk a klaszter két génjének, az *idTP* (P450 monooxigenáz) és *idTF* (monoprenil transzferáz) géneknek a funkcióját. Mind a két gén inaktíválása a *idT* típusú IDT-ek eliminálásához vezetett, miközben a $\Delta idTP$ mutánsok esetében a *idT*-in, az $\Delta idTF$ mutánsok esetében a *idT*-in jelent meg fő terméként.

Az általunk elvégzett kísérletek új lehetőségeket nyitnak meg a *C. paspali* genetikájában. Az optimalizált transzformációs protokoll segítségével lehetőség nyílik olyan ipari izolátumok létrehozására, amelyek képesek nagyobb mértékben, vagy módosított spektrummal előállítani az ergot alkaloid metabolitokat.

Továbbá célzott genetikai módosítások révén a *C. paspali* IDT bioszintézise olyan irányba módosítható, hogy a bioszintetikus folyamat végterméke csökkent toxicitást mutasson emlősökre nézve, de megtartsa toxicitását a kártevő rovarokkal szemben, lehetővé

téve ezzel a gomba és az általa termelt IDT-ek felhasználhatóságát a rovarkártevők kontrolljában.



Nyilvántartási szám: DEENK/38/2021.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Kozák László
Doktori Iskola: Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Kozák, L., Szilágyi, Z., Tóth, L., Pócsi, I., Molnár, I.: Functional characterization of the idtF and idtP genes in the *Claviceps paspali* indole diterpene biosynthetic gene cluster.
Folia Microbiol. 65 (3), 605-613, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s12223-020-00777-6>
IF: 1.73 (2019)
2. Kozák, L., Szilágyi, Z., Vágó, B., Kakuk, A., Tóth, L., Molnár, I., Pócsi, I.: Inactivation of the indole-diterpene biosynthetic gene cluster of *Claviceps paspali* by *Agrobacterium*-mediated gene replacement.
Appl. Microbiol. Biotechnol. 22 (7), 3255-3266, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-018-8807-x>
IF: 3.67

További közlemények

3. Kozák, L., Szilágyi, Z., Tóth, L., Pócsi, I., Molnár, I.: Tremorgenic and neurotoxic paspaline-derived indole-diterpenes: biosynthetic diversity, threats and applications.
Appl. Microbiol. Biotechnol. 103 (4), 1599-1616, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-018-09594-x>
IF: 3.53

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 8,93

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 5,4

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudománymetriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2021.01.27.

