

OTKA Nyilvántartási szám: **F 037663**

Témavezető neve: **dr. Antal Zsuzsanna**

A téma címe: **Természetes élőhelyekről és klinikai anyagból származó *Trichoderma* törzsek összehasonlító ökofiziológiai és molekuláris szintű vizsgálata**

A kutatási időszak: **2002-2005**

## **A KUTATÁS CÉLJA ÉS MUNKATERVE**

A *Trichoderma* nemzetség tagjai elterjedt talaj- és avarlakó fonalagombák, melyek mezőgazdasági és ipari szempontból egyaránt jelentős mikroorganizmusok. Az utóbbi években egyre több orvosi esettanulmány látott napvilágot, melyekben e korábban apatogénként nyilvántartott fonalagombák által okozott, sokszor halálos kimenetelű fertőzésekről tudósítanak. Ezekben az esettanulmányokban a fertőzés kialakulását és lefolyását, valamint az alkalmazott antifungális szerek hatékonyságát vizsgálták, azonban a klinikai törzsek karakterizálásáról, a karakterek variabilitásának tanulmányozásáról nem jelentek meg közlemények.

A pályázat keretében természetes élőhelyről és klinikai anyagból származó *Trichoderma* törzsek klasszikus és molekuláris módszerek alkalmazásával történő összehasonlító tanulmányozását kívántuk elvégezni azzal a céllal, hogy adatokat nyerjünk a törzsek ökofiziológiai és genetikai tulajdonságairól, variabilitásukról, hogy feltárjuk azon jeleket melyek segítséget nyújthatnak az egyes fajcsoportokon belül a patogén és apatogén törzsek elkülönítéséhez. A kísérletek során meg kívántuk vizsgálni a törzsek környezeti tényezőkkel szembeni igényét, szén- és nitrogénforrás-hasznosítási spektrumát, valamint extracelluláris enzimeik termelődését, szabályozottságát. A tervezett kutatási programon belül szerepelt a vizsgált törzsek mitokondriális genomjának vizsgálata, DNS-polimorfizmusának felmérése, valamint különböző extrakromoszómális elemek előfordulásának vizsgálata.

### **Munkaterv:**

1. év:

A klinikai mintákból és természetes élőhelyekről származó *Trichoderma* törzsek ökofiziológiai sajátosságainak felmérése és összehasonlítása, a környezet élő és élettelen elemeinek a törzsek életműködésére gyakorolt hatásának tanulmányozása.

2. év:

A *Trichoderma* törzsek által termelt, szerves anyagok lebontásában szerepet játszó extracelluláris enzimek szekréciójának és aktivitásának tanulmányozása, az enzimrendszerek révén detektálható variabilitás meghatározása, RAPD kísérletek megkezdése.

3. év:

A törzsek mitokondriális DNS-e méretének meghatározása, RFLP mintázatok vizsgálata, a RAPD kísérletek optimalizálása, valamint a hibridizációs munkához szükséges génpróbák előállítása.

4. év:

Az RFLP vizsgálatok hibridizációs génpróbákkal történő ellenőrzése, az extrakromoszómális elemek elterjedtségének vizsgálata, a molekuláris-genetikai markerek vizsgálatával kapott adatok feldolgozása, valamint a patogénitással korrelációba hozható markerek keresése.

## A KUTATÁS EREDMÉNYEI

A pályázat keretében 150 *Trichoderma* törzset vontunk be a vizsgálatokba. Ezek nagyobb részét szaprofita izolátumok tették ki, kisebb részét pedig azok a klinikai anyagokból származó törzsek melyeket különböző törzsgyűjteményekből illetve az izolálást elvégző orvosoktól szereztünk be. A vizsgálatba bevont klinikai törzsek az elsődleges leírások alapján a *T. citrinoviride*, a *T. harzianum*, a *T. inhamatum*, a *T. koningii*, a *T. longibrachiatum*, a *T. pseudokoningii* és a *T. viride* fajokba tartoztak.

### 1. Klinikai mintákból és természetes élőhelyekről származó *Trichoderma* törzsek ökofiziológiai sajátosságainak felmérése és összehasonlítása

A környezet élő és élettelen elemei közül tanulmányoztuk a hőmérséklet és a pH különböző értékeinek a törzsek életműködéseire gyakorolt hatását, elvégeztük a törzsek szén- és nitrogénforrás-hasznosítási spektrumának, valamint antifungális szerekkel szembeni érzékenységének felmérését.

A magas hőmérsékleten való növekedés képessége egyike az opportunistáknak, mivel az emberi szervezetben hosszán fennmaradni, illetve szaporodni csak azok a kórokozók képesek, melyek tolerálják a 37°C körüli hőmérsékletet. Első lépésben ezért felmértük az egyes fajcsoportokba tartozó, klinikai illetve természetes élőhelyről származó törzsek növekedésének hőmérsékletfüggését szintetikus minimál, valamint élesztőkivonatot tartalmazó táptalajon. A klinikai törzsek képesek voltak növekedni a 10°C és 40°C közé eső hőmérsékleti értékeken, a legnagyobb növekedési rátát 30°C-on mutatva.

A környezet pH értéke komoly hatást gyakorol a mikroorganizmusok életfolyamataira. A fonalasgombák általában a savas kémhatású környezetet kedvelik, a kórokozók azonban képesek tolerálni a semlegeshez közeli értékeket is. A vizsgált *Trichoderma* törzsek nagy része élesztőkivonatot tartalmazó táptalajon a 2,0-tól 7,0-ig terjedő pH tartományban mutatott növekedést, legkedvezőbbnek a pH 4,0-es érték bizonyult, ugyanakkor az általunk vizsgált klinikai izolátumok még pH 9,0-es értéken is életképesnek bizonyultak.

Nyolcvan vegyület szénforrásként, valamint 34 vegyület nitrogénforrásként történő hasznosításának képességét vizsgálva megállapítottuk, hogy a klinikai izolátumok számos aminosavat képesek egyedüli szén- és nitrogénforrásként hasznosítani. A szénforrás-hasznosítási spektrumok alapján hasonlósági mátrixot hoztunk létre, és törzsfán ábrázoltuk a törzsek rokonsági viszonyait.

A törzsek *in vitro* antimikotikum-érzékenységét E-teszt segítségével határoztuk meg. Az összes vizsgált törzs rezisztensnek bizonyult flukonazollal szemben (MIC érték = 64 µg/ml) függetlenül a származási helyüktől. Az itraconazol esetében egy törzs mutatott dózisfüggő érzékenységet (MIC érték 0,25 és 0,5 µg/ml között) a többi rezisztensnek mutatkozott (MIC érték = 1 µg/ml). Amphotericin B-vel szemben a klinikai törzsek egy kivételével rezisztensek voltak (MIC érték > 2 µg/ml), a szaprofita törzsek fele érzékenyek fele rezisztensnek bizonyult. A ketokonazol esetében mind a szaprofita, mind pedig a klinikai izolátumok érzékenyek mutatkoztak (MIC érték < 8 µg/ml). Összességében megállapítható, hogy bár az amphotericin B esetében megfigyelhető volt bizonyos eltérés, jelentős különbség nem volt mérhető a klinikai és a szaprofita törzsek antimikotikum érzékenysége között.

A magas hőmérsékleten való növekedés képessége a gombák virulenciafaktorainak egyike. Emellett a törzsek azon tulajdonságai, hogy képesek elviselni a semleges pH értéket, valamint képesek több aminosavat egyedüli szén- és nitrogénforrásként hasznosítani,

elősegíthetik opportunistáként való növekedésüket. Az egyes antifungális szerekkel szembeni alacsony érzékenység, mely a szaprofita törzsek esetében is gyakran mutatkozott, a fertőzések orvosi kezelése során okozhat komoly nehézségeket.

## 2. Az extracelluláris enzimek tanulmányozása

Tizenegy kromogén paranitroanilin szubsztrát alkalmazásával vizsgáltuk meg a klinikai *Trichoderma* izolátumok induktív körülmények között termelt extracelluláris proteázainak aktivitását. Valamennyi törzs esetében kimutatható volt tripszin-, kimotripszin- és kimoelasztáz típusú aktivitás. A tripszin- és kimotripszin-típusú proteázok enzimprofilja, az oszlopkromatográfiás elválasztások alapján, összetettnek mutatkozott, számos izoenzim jelenlétére utalva. Ugyanezen proteázok aktivitásának pH-függését tanulmányozva kitűnt, hogy mindkét enzimtípus magas aktivitást mutat egy széles, 5-től 9-ig terjedő pH-tartományban, mely a különböző izoenzimek eltérő pH-optimumára utal. A vizsgált enzimek tehát aktívnak bizonyultak fiziológiás pH-n, továbbá egyes törzsek 37°C-on nagyobb mennyiségben szekretáltak mindkét vizsgált enzimtípust mint 25°C-on. Ezek alapján feltételezhető, hogy az ilyen típusú aktivitások hozzájárulhatnak az opportunisták *Trichoderma* törzsek virulenciájához.

Tanulmányoztuk a szisztémás gombafertőzések egy további lehetséges virulenciafaktorát, a hemolízisre való képességet is. Eredményeink alapján valamennyi vizsgált klinikai *Trichoderma* törzs képes a vérbontásra.

## 3. Toxintermelési vizsgálatok

A Helsinki Egyetem kutatóival kialakított együttműködés keretében lehetőség nyílt a klinikai *Trichoderma* törzsek toxikológiai vizsgálatának elvégzésére is, szemikvantitatív spermatoxicitási teszt segítségével. Négy törzs esetében a vaddisznó spermatozoák elvesztették mozgási képességüket, ami arra utal, hogy ezek a törzsek a spermasejtekre toxikus metabolitokat termelnek. E négy törzs kivonata kioltotta a JC-1-el festett vaddisznóspermák középrészének fluoreszcenciáját, ami a mitokondriális membránpotenciál megszűnésére enged következtetni. Ezek alapján a toxikus metabolitok termelésére való képesség a *Trichoderma* törzsek, mint opportunisták kórokozók lehetséges virulenciafaktorai közé sorolható.

## 4. Extrakromoszómális elemek elterjedtségének vizsgálata

A *Trichoderma* törzsek extrakromoszómális genetikai elemei közül a mitokondriális DNS-en kívül a DNS plazmidok, valamint a dsRNS molekulák jelenlétét is részletesebben megvizsgáltuk.

### 4.1. dsRNS molekulák jelenlétének vizsgálata

A törzsek dsRNS-tartalmának vizsgálatához a micéliumokból előállított, teljes nukleinsav kivonatot CF11 cellulóz kromatográfiával tisztítottuk. Az első körben megvizsgált 105 szaprofita *Trichoderma* izolátum között összesen három olyan törzset találtunk, melyek az előzetes vizsgálat alapján feltehetőleg dsRNS-elemeket hordoznak. A kapott mintázat elemzését RNáz mentes DNáz, RNáz, valamint az egyszálú RNS molekulákat hasító S1 nukleáz emésztéssel végeztük el, mely kísérletekből egyértelművé vált, hogy a törzsek közül kettő egyenként 9-9, a harmadik törzs pedig 7 dsRNS molekulát hordozott. A gombákban előforduló dsRNS vírusok a *Hypoviridae*, *Totiviridae*, *Chrysoviridae* illetve a *Partitiviridae* családokba tartoznak, melyek közül a két utóbbi osztott genomú vírusokat tartalmaz, de

lehetséges magyarázat a delécióval létrejött defektív származékok, illetve szatellita vírusok jelenléte is. A dsRNS-elemek mitotikus stabilitását a konídiumokba való átjutás megfigyelésével vizsgáltuk. A 7 elemet hordozó törzs esetében mindegyik dsRNS molekula jelenléte stabilnak mutatkozott, ugyanakkor a másik két törzs esetében a különböző méretű molekulák átjutása egymástól függetlenül, és kb. 50-70%-os gyakorisággal történt meg. A továbbiakban vizsgáltuk a dsRNS-molekulák RNáz bontással szembeni, fehérjék jelenlétével összefüggésben álló védettségét, ami víruspartikulumokba való csomagolódásra utalt. További 27 szaprofita, gombafarmokról származó *Trichoderma* törzs vizsgálata során 12-ben találtunk dsRNS-molekulákat, itt tehát a vírushordozó törzsek aránya jóval magasabb volt, mint a szántóföldről izolált törzsek esetében. Összességében megállapíthattuk, hogy a megvizsgált szaprofita illetve klinikai *T. longibrachiatum* törzsek ugyanakkor minden esetben mentesnek bizonyultak dsRNS-molekulák jelenlététől. Mivel a tenyésztés hőmérséklete gyakran befolyásolja az extrakromoszómális genetikai elemek jelenlétét és stabilitását, ezért a vírushordozó törzsek esetében 25, 28, 31 illetve 34 °C-on történő tenyésztést követően is készítettünk nukleinsavpreparátumot. Mint megállapítható volt, a három vizsgált törzs közül kettőnél a magas hőmérsékleten való tenyésztésből származó nukleinsavmintákban a dsRNS-molekulák nem voltak jelen (a harmadik törzs 34 °C-on nem mutatott növekedést). Mivel a klinikai *Trichoderma* izolátumok szinte kizárólag a *T. longibrachiatum* fajba tartoznak, melynek növekedésére a magasabb hőmérsékleti optimum jellemző, ez magyarázattal szolgálhat ezen törzsek dsRNS mentességére.

### **3.2. Plazmidmolekulák jelenlétének vizsgálata**

Egy szaprofita *T. harzianum* törzs izolált mitokondriumaiból kinyert DNS-minta emésztetlen preparátumának elektroforetikus elválasztását követően a nagy molekulású régióban elhelyezkedő sáv mellett további két (egyenként 1,5 illetve 3,0 kbp nagyságú) sáv volt megfigyelhető a kis molekulású régióban. A mintázatot 2,6 kbp nagyságú, különböző csavarodottsági fokú plazmidmolekulák hozták létre. Az általunk pThr1-nek elnevezett plazmid a mtDNS-sel szekvenciahomológiát nem mutatott. A plazmid teljes, 2622 bp-nyi szekvenciáját meghatároztuk és számítógépes programok segítségével elemeztük. A pThr1 plazmid DNS-szinten nem mutat homológiát a GenBank adatbázisában hozzáférhető más mitokondriális plazmidokkal vagy egyéb DNS szekvenciákkal. A szekvenciaanalízis kimutatta, hogy a plazmid nyitott leolvasási kerete olyan fehérjét kódolhat, mely 650 bp hosszan, aminosavszerint homológiát mutat *Neurospora* fajok Mauriceville és Varkud plazmidjainak reverz transzkriptázával. További 27 szaprofita, gombafarmokról származó *Trichoderma* törzs vizsgálata során öt, különböző fajokhoz tartozó törzsből találtunk plazmidmolekulákat, melyek a hibridizációs kísérletek eredményei alapján egymással szekvenciahomológiát mutatnak, ugyanakkor különböznek az általunk korábban megklónozott pThr1 plazmidtól. Részletesebb vizsgálatukhoz a klónozási munka folyamatban van. A plazmidok jelenlétének vizsgálata alapján összességében megállapíthattuk, hogy míg ezen extrakromoszómális elemek jelenléte az egyéb szaprofita fajokhoz tartozó törzsek esetében nem túl nagy előfordulási gyakorisággal ugyan, de megfigyelhető, a megvizsgált szaprofita illetve klinikai *T. longibrachiatum* törzsek minden esetben mentesnek bizonyultak extrakromoszómális dsDNS plazmidmolekulák jelenlététől. Mivel a magas tenyésztési hőmérséklet ezen extrakromoszómális genetikai elemek jelenlétére és stabilitására gyakorolt negatív hatásáról is beszámoltak már más fonalgombanemzetségek esetében, így valószínűleg a *T. longibrachiatum* fajra jellemző, magasabb hőmérsékleti optimumon való növekedés magyarázhatja ezen extrakromoszómális dsDNS-molekulák hiányát a vizsgálatba bevont szaprofita és klinikai *T. longibrachiatum* törzsek esetében.

## **5. RAPD vizsgálatok és szekvenciaelemzések**

A RAPD kísérletek során az OPA random primer kettő segítségével vizsgáltuk a *Trichoderma* törzseket és az amplifikációs mintázatok alapján megállapítottuk, hogy az OPA primerek közül több is megfelelően ígérkezett a molekuláris vizsgálatokhoz. Az ITS1 és 2 szekvenciák *TrichOkey* programmal ([www.isth.info](http://www.isth.info)) történő elemzését elvégezve megállapítottuk hogy hét, morfológiai bélyegeik alapján eredetileg *T. citrinoviride*-nek (UAMH 9573), *T. koningii*-nek (CM382), *T. pseudokoningii*-nek (UAMH 7955, UAMH 7956), illetve *T. viride*-nek (CNM-CM-1792, CNM-CM-1798 és CNM-CM-2277) meghatározott izolátum a *T. longibrachiatum*/*Hypocrea orientalis*/*Trichoderma cerebriformis* fajok valamelyikének képviselője, tehát reidentifikálásra szorul. Mivel ez a három faj az ITS régió szekvenciaelemzésével nem elkülöníthető, a Bécsi Egyetem kutatóival együttműködésben elvégeztük a vizsgált klinikai izolátumok transzlációs elongációs faktort kódoló *tefl* $\alpha$  génjének szekvenciaelemzését, melynek eredményeként igazolást nyert, hogy a klinikai törzsek a *T. longibrachiatum* fajba sorolhatók, 1 kivétellel: az UAMH 9573 jelű törzs a közeli rokon *H. orientalis* faj képviselőjének bizonyult. A közelmúltban sikerült a *T. longibrachiatum* fonalagombát egy hazai, leukémiás betegből származó mintából is azonosítani. Vizsgálati eredményeink alapján tehát mindenképpen hangsúlyozandó, hogy a klinikai gyakorlatban nagyobb figyelmet érdemel a *T. longibrachiatum* faj, mint potenciális opportunista kórokozó.

## 6. Izoenzim polimorfizmus vizsgálatok

Tizenhárom enzim aktivitásának cellulóz-acetát elektroforézissel történt elemzése során hét: a glükóz-6-foszfát-dehidrogenáz (G6PDH), a glükóz-6-foszfát-izomeráz (GPI), a 6-foszfoglükonát-dehidrogenáz (6PGDH), a peptidáz A, B, és C (PEP A, B, D) valamint a foszfoglükomutáz (PGM) alkalmasnak bizonyult az összes vizsgált klinikai *T. longibrachiatum* törzs tesztelésére. Az alkalmazott enzimek polimorfizmus mutatkoztak a vizsgált populációban, a PGM interspecifikusnak, míg a többi enzim intraspecifikusnak bizonyult. Az enzimmintázatok felhasználva 10 elektroforetikus típust tudunk elkülöníteni, melyek az előállított dendrogramon három elkülönülő csoportra bontották a vizsgált *T. longibrachiatum* izolátumokat. Eredményeink alapján a cellulóz acetát elektroforézissel végzett izoenzim-analízis a *T. longibrachiatum* fajba tartozó törzsek gyors azonosítására és tipizálására egyaránt alkalmas, így diagnosztikai célokra történő felhasználása is elképzelhető.

## 7. A mitokondriális DNS méretének meghatározása, az RFLP mintázatok vizsgálata

A klinikai mintából származó, illetve a talajból izolált *T. longibrachiatum* törzsek esetében előállított mtDNS restrikciós fragmenthossz-polimorfizmus (RFLP) mintázatok különbözőségeinek alapján a klinikai törzsek 5, a talajizolátumok pedig négy mtDNS-típusba voltak sorolhatóak. Bár azonos méretű fragmentek megfigyelhetők voltak a klinikai és a talajból származó törzsek mintáiban, teljesen egyező mintázatot nem találtunk. Ezen eredmények alapján a *T. longibrachiatum* fajon belül is nagyfokú polimorfizmus jellemzi az izolátumokat mtDNS szinten. Az emésztett mtDNS fragmentjeinek méretmeghatározása alapján a klinikai és a szaprofita *T. longibrachiatum* törzsek mtDNS-e a 35,1 és 39,5 kbp közötti tartományba esik. A klinikai *Trichoderma* törzsek mtDNS állományának részletesebb vizsgálatához az ATP szintetáz 9. alegységének (*atp9*), az apocitokrom b-nek (*cob*), a NADH dehidrogenáz 5. alegységének (*ndh5*) valamint a kicsi (*rns*) és nagy (*rnl*) riboszómális alegység RNS-ének génjeit hordozó, *Aspergillus nidulans* illetve *A. carbonarius* mitokondriális DNS-éből származó heterológ génpróbák álltak rendelkezésünkre. Ezek a génpróbák a mitokondriális génekre jellemző, nagyfokú konzervativitásuknak köszönhetően

megfelelőek voltak a *Trichoderma* törzsek vizsgálatához, és segítségükkel a mtDNS RFLP vizsgálatok során nyert hasonló mintázatok azonossága megállapítható volt.

## **8. A molekuláris-genetikai markerek vizsgálatával kapott adatok feldolgozása, taxonómiai elemzések**

A legtöbb klinikai mintából izolált *Trichoderma* törzset eredetileg morfológiai jellegeik alapján határozták meg, azonban a törzsek azonosításához és rendszertani besorolásához megbízhatóbb eredményt szolgáltatnak a molekuláris biológiai módszerek. Az ITS1, ITS2 és *tefl $\alpha$*  szekvenciák analízise alapján több klinikai izolátumot reidentifikáltunk. Eredményeink alapján kijelenthető, hogy a klinikai mintákból izolált törzsek döntő többsége a *Trichoderma* nemzetség *Longibrachiatum* szekciójába tartozik. Megállapítottuk, hogy az ITS1 és 2 szekvenciák önmagukban nem elegendően variabilisak a szekción belüli pontos besoroláshoz illetve az egyes törzsek rokonsági viszonyainak megállapításához, ebből a célból további markerek vizsgálata szükséges. A cellulóz acetát elektroforézis hét enzim esetében (glükóz-6-foszfát-dehidrogenáz; glükóz-6-foszfát-izomeráz; 6-foszfoglükonát-dehidrogenáz; foszfoglükomutáz; peptidáz A, B, és C) hasznosnak bizonyult a törzsek 10 elektroforetikus típusba való besorolására, melyek három csoportra váltak szét a törzsfán. A mtDNS RFLP vizsgálata még ennél is jobb felbontást eredményezett, és a megfigyelt mintázatok 4 csoport elkülönítését tették lehetővé a dendrogrammon. Ez utóbbi két módszer tehát nagyobb felbontási eredményezett mint az ITS analízis, ráadásul jobb reprodukálhatóságot mutatott mint a RAPD technika. Mindazonáltal egyik módszernél sem váltak el egymástól a dendrogrammon a szaprofita és a klinikai izolátumok, így további vizsgálatokat igényel annak eldöntése, vajon mindegyik *T. longibrachiatum* törzs képes-e megbetegedést okozni. Jelenleg is folyamatban van további gének (pl. *ech42*) analízise az izolátumok taxonómiai viszonyainak pontosabb tisztázására, illetve a kutatási munka folytatásaként a Bécsi Műszaki Egyetem kutatóival együttműködésben megkezdjük a patogenitásért felelőssé tehető gének felkutatását, génexpressziós vizsgálatok segítségével.