

A basidiomycota élesztőgomba, a *Filobasidium capsuligenum* IFM 40078 törzse egy olyan fehérjét (FC-1 killer toxint) választ ki a tápközegbe, amely elpusztítja az opportunistá patogén *Cryptococcus neoformans*-t. Pályázatunkban ezen killer toxin genetikai determinánsát derítettük fel, a toxin fehérje izolálását, jellemzését valósítottuk meg, ill. a toxin hatásmechanizmusát tártuk fel.

A toxin hatásspektrumának meghatározása

Kísérleteinkhez mintegy 70, különböző élő- és földrajzi helyről származó *C. neoformans* törzset használtunk. Egy kivétellel az összes izolátum érzékeny volt a toxinnal szemben, ami arra utal, hogy a toxinnak a cryptococcosis megbetegedés megelőzésében, ill. a gyógyításban gyakorlati szerepe lehet. Az érzékenység mértéke eltérő volt az egyes izolátumok között, ezért a további vizsgálatokhoz a legérzékenyebbet, a *C. neoformans* var. *neoformans* IFM 5844 törzset választottuk ki. A toxin hatása rendkívül specifikus volt: más *Cryptococcus*-ra és a megvizsgált 80 egyéb génuszhoz tartozó élesztőgombára nem volt hatása.

A killer toxin hatásmódjának, a szenzitív sejtek növekedési kinetikájának vizsgálata

Annak bizonyítására, hogy a toxin előli a sejteket (citocidikus hatás) és nem csupán csak megállítja növekedésüket (citosztatikus hatás), time-killing kísérleteket végeztünk: 5×10^5 toxinnal kezelt sejt közül egy sem maradt életképes 24 órás kezelés után.

A pusztítás kinetikáját mikroszkópos, „FITC exclusion” módszerrel határoztuk meg: a sejteknek kb. 50%-a pusztult el 12 óra alatt, 100%-uk 20 órás kezelés után lett életképtelen.

A toxin fermentálásának optimális paraméterei

A toxin nagy hatású, de rendkívül alacsony koncentrációban szekretálódik a táptalajba. Ahhoz, hogy jellemezhesük és izolálhassuk, nagyobb mennyiségben kellett előállítanunk. Kerestük a termeltetés optimális körülményeit: 12-féle táptalajt, 3-féle tenyésztési hőmérsékleten, két különböző pH tartományban próbáltunk ki. Optimálisnak az 1% élesztőkivonat + 1,5 % malátakivonat pH: 4,0 (0,1 M McIlvain pufferben) (YM4) és a 24 °C-os hőmérséklet bizonyult. A sejteket legalább a 10^7 ml⁻¹ sejtszámig kellett feltenyészteni. A részlegesen tisztított ún. „nyers toxinnal” végeztük kísérleteinket: a fermentlevet lecentrifugáltuk, sterilre szűrtük, majd az így nyert anyagot 72 órán át dializáltuk 0,05 M citrát-foszfát pufferrel (pH: 4,0) szemben. Szükség esetén liofilezéssel, etanolos vagy ammónium szulfátos kicsapással koncentráltuk.

A nyers toxinfehérje jellemzése

Az FC-1 toxin fehérje természetét a következőkkel bizonyítottuk:

- 5 perces forralással a killer aktivitást eliminálni tudtuk a mintából,
- pepszin és papain részleges inaktiválást eredményezett,
- a toxin hatása pH függő volt: csak pH 4,0 és 6,0 között bizonyult aktívnek.

A felsorolt folyamatok a toxin irreverzibilis megváltozását okozták.

A toxin azonosítása a *F. capsuligenum* fermentlevének poliakrilamid gélelektroforézises elemzésével

Feltételeztük, hogy a fermentlébe szekretált toxint gélelektroforézissel kimutathatjuk, ha összehasonlítjuk a toxin termelődését biztosító, ill. a toxin termelődését nem biztosító táptalajokban tenyésztett gomba fermentlevének gélelektroferogramját.

A fenti követelményeknek megfelelőek a komplett (YM4, YPD) ill. a különböző összetételű minimál táptalajok (VMM, YNB). A komplett táptalajon kapunk toxin aktivitást, míg a

minimálban nem. Az YPD-ben előtenyésztett mintákat mintegy 80 szorosára töményítettük Microcon szűrőn és 4-12% NuPAGE Bis-Tris gélen MOPS-SDS puffer rendszerben analizáltuk pH 7,0-n (MW 19-191 kDa, festés Coomassie-R 250-nel) (1. ábra). Az elválasztás után a fehérjéket PVDF membránra blottoltuk BisTris pH 7,2 transzfer pufferben. A membránról három - a biológiai tesztek alapján várható molekulatömegű - fehérje N-terminális szekvenciáját határoztuk meg (1. ábra). Mivel minden esetben kevert szekvenciákat kaptunk és a szekvenciákban, beleértve a blott háttéréből vett mintákat is, legnagyobb mennyiségben a kollagén fehérje töredék szekvenciája volt felismerhető, valószínűleg az YPD tápoldat peptonjában lévő kollagén együtt vándorolt az általunk vizsgált fehérjékkel, függetlenül azok méretétől.

Ezért a következő lépésben az YM4 táptalajban felnevelt élesztő fehérje mintázatát elemeztük: a futtatások során a 10 000 - 90 000 Da közötti méret tartományban 8-12 fehérje sávot kaptunk, amelyeket összehasonlítottunk a minimál táptalaj mintázatával. A kétféle táptalajon tenyésztett élesztő fermentlevének fehérjemintázatában túl sok eltérést találtunk ahhoz, hogy a toxint azonosítani lehessen (2, 3. ábra).

A továbbiakban a *F. capsuligenum* egy olyan izolátumának (VKM 1513) fehérje képét hasonlítottuk össze a toxint termelővel, amelyben genetikailag nem kódolt a toxin, toxint nem tud termelni. Úgy gondoltuk, hogy a nem termelő törzs mintázatából hiányzó, de a termelőben meglévő sávot valószínűleg a toxin molekula adja. A gélelektroforetikus mintázatok összehasonlításakor azonban több eltérést is megfigyeltünk. Ennek oka az lehet, hogy a két törzs eltérő extracelluláris enzimeket, izoenzimeket bocsát ki a fermentlébe még akkor is, ha azonos körülmények között tenyészik.

Újabb megközelítésben magából a killer toxint termelő törzsből készítettünk toxint nem termelő mutánsokat: mivel a toxin kódja a kromoszómához lokalizálható (lásd később), a mutagén kezelést UV besugárzással végeztük. Mintegy 10 ezer mutagén kezelt telep

átvizsgálásával 43 killer mínusz fenotípusú izolátumot nyertünk. A mutánsok többsége instabil volt: néhány passzázs után visszanyerték toxintermelő képességüket. Mind a termelő, mind a stabilabbnak bizonyuló mutáns törzsek fermentlevét elemeztük. Meglepő módon azonban a stabil nem killer törzsek fehérje mintázata is jelentősen eltért mind a termelő, vad törzs mintázatától, mind pedig egymástól, vagyis így sem lehetett a toxint egyértelműen azonosítani (2. ábra).

A killer toxin az érzékeny sejtek sejtfalában előforduló β -1, 6-glükán-hoz kapcsolódva indítja el toxikus hatását (lásd később). Ezt a specifikus kötődést használtuk fel arra, hogy a toxin tisztítását, izolálását affinitás kromatográfiával kíséreljük meg. Epoxi-aktivált Sepharose 6B gyantához kötöttünk pusztulánt, az így nyert affinitás szorbenst 0,1 M citrát-foszfát pufferrel (pH 4,0) egyensúlyba hoztuk. Az affinitás oszlopra nyers toxin fermentlevet vittünk fel, a nem kötődött fehérjéket 0,1 M citrát-foszfát (pH 4,0) pufferrel mostuk a töltetről, majd a pusztulán által megkötött toxint 10 mM-os citrát-foszfát pufferrel (pH 6,0) 1,5 M NaCl jelenlétében eluáltuk. Frakciókat gyűjtöttünk és biológiai aktivitásukat vizsgáltuk. A legaktívabb frakciókat - töményítés után - szintén SDS gélelektroforézissel választottuk el. Ekkor már csak néhány fehérjét találtunk a 19 – 51 kDa tartományban. A legvalószínűbbnek tűnő kb. 47 kDa méretű fehérjét választottuk ki szekvenálásra (4. ábra). A kapott szekvencia (XVNVNGVFPI) az adatbázisokban a *Debaryomyces* killer élesztőgomba „unnamed” proteinjével mutatott némi homológiát. Nagyobb szekvenciárészlet megismerésére folynak a további kísérletek.

A toxint kódoló genetikai determináns meghatározása:

Totál nukleinsav preparátumot (minilizátum) készítettünk a toxint termelő törzsből. A DNS agaróz gélelektroforetikus vizsgálatával DNS vagy RNS plazmidok jelenlétét kerestük (az eddig ismert killer toxintermelő élesztőgombák általában extrakromoszómálisan kódoltak).

Sem dsRNS, sem lineáris DNS plazmidok jelenléte nem volt kimutatható. A *F. capsuligenum* sejtek pulse-field gel electrophoresis (PFGE) vizsgálata is csak kromoszómális DNS jelenlétét bizonyította, tehát a toxint a kromoszómális DNS kódolja.

A toxint kódoló gén klónozása

Adatbázisokból begyűjtöttük az eddig ismert élesztőgomba killer toxinok (*Pichia farinosa*, *Williopsis saturnus*, *W. mrakii*, *S. cerevisiae* M2, M1, K-28, *Kluyveromyces lactis*, *Hansenula sp.*, stb) nukleotid vagy/és aminosav szekvenciáit. Homológ szakaszokat kerestünk, feltételezve, hogy ha vannak ilyen szekvenciák, akkor ennek alapján elkezdhetjük a *F. capsuligenum* toxin génjének megismerését és izolálását. Homológ szekvenciákat azonban nem találtunk. Miután a fehérje oldaláról is nehezen volt megközelíthető a toxin gén azonosítása, a továbbiakban a termelő IFM 40078 és a nem termelő VKM 1513 törzs mRNS-einek összehasonlító elemzésével kerestük a fehérjét kódoló gént: erre a célra a szubtraktív hibridizáció módszerét alkalmaztuk. A szubtraktív klónozáshoz a BD PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit-et használtuk. A törzseket YM4 táptalajban tenyésztettük, RNS kivonást követően a mRNS populációt izoláltuk, a mRNS-ről cDNS-t (teszter és driver) készítettünk. A cDNS-eket hibridizáltuk, és a nem hibridizálódott cDNS-t, amely azokat a géneket reprezentálja, amelyek a teszterben jelen vannak (többek között a toxin termelés génje), de hiányoznak a driver-ből, amplifikáltuk. Jelenleg a szubtrakció során nyert PCR termékeket klónozzuk. Azonosításukhoz felhasználjuk a fehérje elemzése során kapott szekvenciákat.

A killer toxin receptor helyeinek meghatározása az érzékeny sejtek sejtfalán

Egy toxinnal szembeni érzékenységet két lényeges tényező határoz meg: van-e receptor hely az érzékeny sejtek falában ill. hogy milyen a toxin hatásának mechanizmusa? Mind a sejt falban, mind a sejtmembránban lehetnek receptorok. Hogy meghatározzuk, hogy melyik sejt fal komponens lehet a receptor, kompetíciós kísérleteket végeztünk. A *C.*

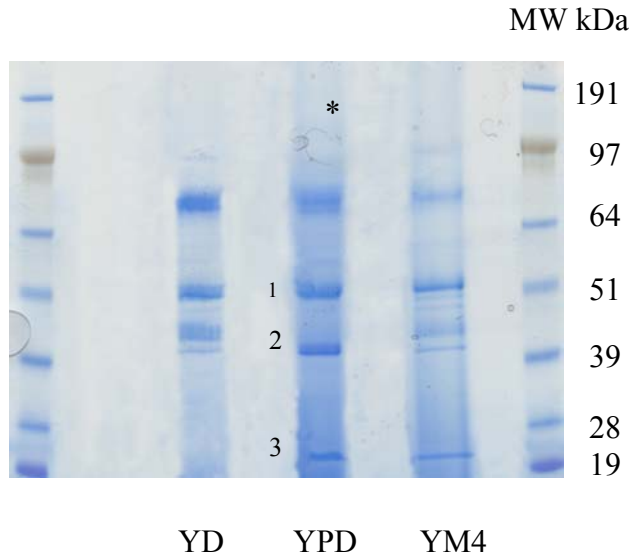
neoformans sejtfał fő komponensei az α -D-glükánok (főleg α -1,3 és kevés α -1,4), β -D-glükánok (főként β -1,6 és kevés β -1,3), kitin, mannán és galaktomannán. Az alábbi kereskedelmi forgalomban kapható sejtfał komponensek hatását vizsgáltuk: laminarin (β -1,3-glükán), pusztulán (β -1,6-glükán), mannán és kitin oligo-szacharid (5-6 oligo). A felsorolt sejtfał komponensek közül csak a pusztulán (β -1,6-glükán) - 10 mg ml⁻¹ koncentrációnál - tudta megóvni a sejteket a pusztulástól (kivédeni a toxin hatását), így valószínűleg a toxin receptorként ismerte fel.

Az FC-1 toxin hatásmechanizmusának megállapítása

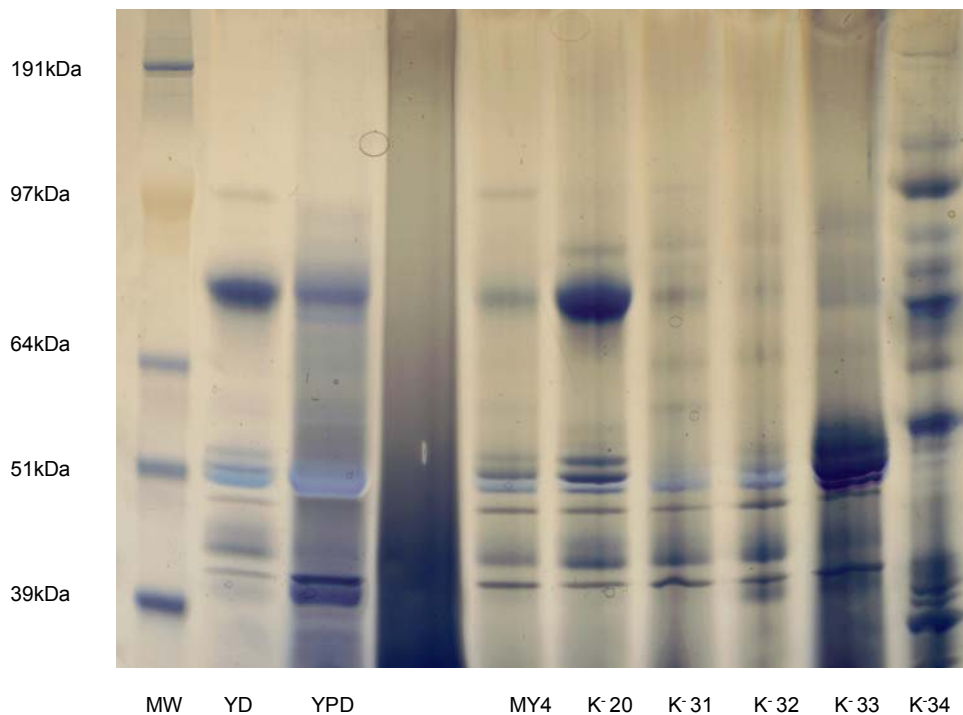
Az élesztőkben eddig ismeretes hatásmechanizmusokat vizsgáltuk a *F. capsuligenum* toxinja esetében is: a citoplazmamembrán funkciójának megzavarása; a magi DNS szintézisnek, a sejtciklus S-fázisának gátlása; ill. a sejtfał bioszintézisének blokkolása.

A sejtciklus elemzéséhez, az egyedi sejtek DNS tartalmának megállapításához az FC-1 toxinnal kezelt *Cryptococcus neoformans* sejtekben FACS analízissel mértük a DNS tartalmat toxinnal kezelt és kezeletlen esetben. Az analízis eredménye azt bizonyította, hogy a toxin nem gátolja a DNS szintézist, és nincs hatása a sejtciklusra sem.

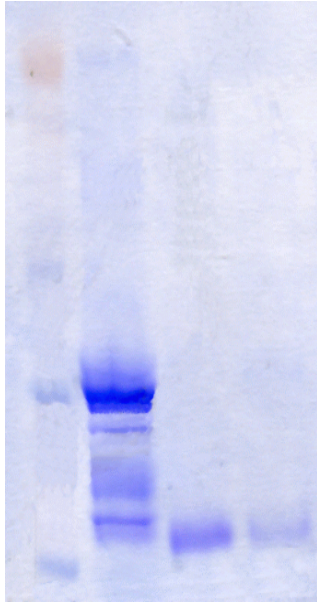
A toxin membrán károsító hatásának vizsgálata fluoreszcens festéssel (FITC festés) történt. Megállapítottuk, hogy a toxinnal kezelt sejtekben a védőburok (sejtfał, sejtmembrán) integritása megszűnt a mérge hatására, a sejtek belsejébe hatoló festék intenzíven fluoreszkált. A sejtfał mikroszkóposan látható károsodását nem tapasztaltuk, a sejtek nem éltek túl a toxin kezelést izoozmotikus közegben sem. Ezek az eredmények azt bizonyítják, hogy a toxin sem a DNS szintézist, sem a sejtfał bioszintézisét nem károsítja, valószínűleg sejtmembrán permeabilitását károsító hatású ioncsatornákat képez a *C. neoformans* érzékeny sejteiben.



1. ábra: Kompletต์ tápoldatban (YD, YPD, YM4) előtenyésztett *F. capsuligenum* fermentlevének elektroferogramja: a 1, 2, 3 a fehérjéket, * a háttérrel jelöli, amelyekbe beleszekvenáltunk;

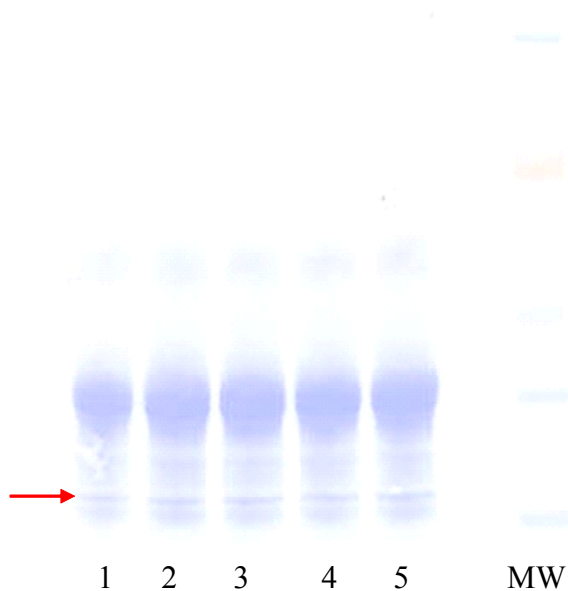


2. ábra Különbözö komplett táptalajokban (YD, YPD, MY4) tenyésztett *F. capsuligenum* fermentlevének fehérje mintázata, ill. néhány killer mínusz (K^-) fenotípusú mutáns (K⁻ 20 , K⁻ 31, K⁻ 32, K⁻ 33, K⁻ 34) fermentlevének SDS-gélelektroforetikus képe. MW: molekulásúly marker.



MW YM4 VMM YNB

3. ábra: Minimál táptalajokban előtenyésztett *F. capsuligenum* fermentlevének SDS-gél képe. MW: molekulásúly marker, YM4 Kompletta táptalaj, VMMM (Wickerham-féle minimál), YNB (Yeast Nitrogen Base táptalaj).



4. ábra: Biológiaiailag aktív toxint tartalmazó YM4 fermentlé SDS géljéről készült blott. 1-5: mindenütt ugyanaz a minta található; a piros nyíl jelzi azt a fehéréjt, amelyet szekvenálunk. MW: molekulásúly marker.

A toxin hatásspektrumára, hatásmódjára, termeltetésre vonatkozó eredményeinket a következő folyóiratban közöltük (közlésre elfogadva, megjelenés alatt):

A. Keszthelyi¹, M. Ohkusu², K. Takeo², I. Pfeiffer¹, J. Litter¹ and J. Kucsera¹ (2006)
Characterization of the anti-cryptococcal effect of the FC-1 toxin produced by *Filobasidium capsuligenum*. *Mycoses* 49/3:

A pályázati munka további eredményeit a következő 2 éven belül tervezzük megjelentetni, ezért kérjük, hogy a pályázat minősítését az OTKA kiegészítő eljárásban később módosítsa.