B3816

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI
Molekuláris- és Sejtbiológia Doktori Program

Genetikai és rendszertani vizsgálatok a *Rhizomucor* nemzetségben

készítette
Vastag Mária

SZIE Egyetemi Könyvtár SZEGED 13.

Témavezető
dr. Vágvölgyi Csaba

Szegedi Tudományegyetem
Mikrobiológiai Tanszék

SZEGED
2002

BEVEZETÉS

A járomspórás gombák (Zygomycetes) rendszertanilag jól körülhatárolható, egységes csoportot alkotnak. Ezen osztály különleges jelentőséggel bír az alacsonyabbrendű (*lower fungi*) és magasabbrendű (*higher fungi*) gombák közötti átmeneti jellege miatt. Az idetartozó fajok többsége a Mucorales rend tagja, elsősorban növényi és állati eredetű bomló szerves anyagokon előforduló, talajból izolálható szaprofita szervezet. A növénykárosító gombák döntő többsége ú.n. raktári kártevő szervezet. Ebből a szempontból kiemelkedő fontosságúnak tekinthetők a *Rhizopus*, *Mucor* és *Gilbertella* nemzetségek egyes tagjai.

A Zygomycetes osztályba tartozó gombák gyakran vizsgált modellszervezetek, különböző szabályzó mechanizmusok, sajátos szexuális folyamataik, vagy a gomba morfogenezeis tanulmányozása során. Jelentőségüket tovább növeli, hogy közöttük számos orvosi, ipari, biotechnológiai és mezőgazdasági szempontból fontos fajt találunk. Orvosi szempontból egyes fajok (mint pl. *Absidia*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Rhizomucor* nemzetségek képviselői), mint ú.n. mucormikózist okozó opportunista patogének érdemelnek figyelmet. Ezek a fertőzések bár viszonylag ritkán fordulnak elő, de erősen progressziv és nehezen kezelhető jellegük miatt igen veszélyesek. Más fajok ipari törzsei extracelluláris enzimek (pl. lipázok, proteázok) termelőjeként, vagy

értékes biológiai aktivitással rendelkező (pl. szteroidvázas) vegyületek sztereospecifikus hidroxilálójaként kerülnek ipari felhasználásra.

Meglepő módon a járomspórás gombákkal kapcsolatban csak igen szegényes genetikai ismeretanyag áll rendelkezésünkre, habár ezen gombák számos citológiai, biokémiai és ökológiai sajátossága egyértelművé teszi, hogy genetikai vizsgálatuk nem váltható ki más gombacsoportok tanulmányozásával.

CÉLKITŰZÉSEK

A *Rhizomucor* nemzetség képviselői nagy gyakorlati jelentőséggel bírnak úgy biotechnológia és élelmiszeripar területén, mint a humán és állati mikózisok kórokozójaként az orvosi gyakorlatban is. Ezen gombák genetikai rendszere (az intraspecifikus variabilitás mértéke, genom szerveződése) kevésbé ismert.

Munkánk során célul tűztük ki a következőket:

1. Különböző forrásból származó *Rhizomucor* izolátumok intraspecifikus variabilitásának feltárása.
2. Fiziológiai és molekuláris technikákkal (szénasszimilációs spektrum, izoenzim és RAPD analízis, ITS-RFLP) nagyszámú genetikai marker azonosítása.
3. Ezen vizsgálatok eredményei alapján taxonómiai következtetések levonása, valamint a gyakorlat számára hasznos törzstipizálási eljárások kidolgozása.

4. A *Rhizomucor miehei* egy adott törzséből génkönyvtár létrehozása, majd ennek felhasználásával a gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenáz (*gpd*) struktúrgén és a kapcsolódó szabályzó régiók klónozása és elemzése.
5. Ezen vizsgálatok azon túl, hogy lehetőséget teremtenek az adott gén molekuláris, funkcionális és filogenetikai elemzésére, kiindulópontul szolgálhatnak további genetikai kísérletekhez. A *gpd* gén szabályzó régiói jól használhatók hatékony transzformációs rendszerek kifejlesztésére. Eredményeink lehetőséget teremtenek egy ilyen, a járomspórás gombákban reményeink szerint általánosan alkalmazható (pl. drogrezisztencián alapuló) transzformációs rendszer kidolgozására.
6. A protoplasztképzés körülményeinek optimalizálása a *Rhizomucor* fajoknál, melynek a későbbiekben szintén a transzformációs rendszerek létrehozásánál lesz nagy gyakorlati jelentősége.
7. Kariotipizálási előkísérletek megkezdése a *Rhizomucor* fajok genom méretének megismerése céljából.

ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. Kezdeti vizsgálataink során tanulmányoztuk a rendelkezésünkre álló *Rhizomucor* izolátumok ivaros szaporodását, meghatároztuk a törzsek párosodási típusát, valamint a homotallikus, illetve heterotallikus

szexuális folyamatok révén kapott zigospórák egyes morfológiai jellemzőit. Eredményeink alátámasztották az irodalomban korábban közölt megfigyeléseket, miszerint a zigospóra méretében és morfológiájában mutatkozó különbségek bár bélyegként szolgálhatnak a fajok elkülönítésében, azonban a vizsgálatok időigényesek és esetenként önmagukban nem egyértelműek. Munkánk során többek között célunk volt, hogy meghatározzunk olyan markereket, melyek segítségével lehetővé válik a *Rhizomucor* izolátumok gyors és pontos identifikálása.

2. A *Rhizomucor* törzsek szénforrás hasznosítási képességét 87 vegyületen teszteltük. Ezen vizsgálati eredményekkel kapcsolatban hangsúlyoznunk kell, hogy egy adott vegyület szénforrásként történő tesztelésekor kapott negatív eredmény nem feltétlenül azt jelzi, hogy az adott *Rhizomucor* faj által nem hasznosítható szénforrásról van szó. Számos tényező (pl. a vegyület koncentrációja, hőmérséklet, pH) hozzájárulhat egy ilyen negatív eredményhez és más kísérleti körülmények között elképzelhető, hogy némiképp eltérő növekedési mintázatot észlelnénk. Ezen kitétel ellenére, eredményeink azt bizonyítják, hogy szigorúan meghatározott kísérleti körülmények között vizsgált szubsztrát hasznosítási sajátosságok (mivel indirekt módon az egyes törzsek genetikai hátterére reflektálnak), jól felhasználhatók a taxonómiai vizsgálatokban. Eredményeink alátámasztják azon korábbi megfigyeléseket, miszerint a szaharóz kizárólagos hasznosítására a *R. pusillus* fajok képviselői képesek ellentétben a *R. miehei* fajjal. A gyakorlati célú fajidentifikálás számára az egyik legfontosabb

eredményként, sikerült 3 további olyan vegyületet meghatároznunk (*β-alanin*, *L-fenilalanin*, *glicin*), amelyek egyedi szénforrásként történő hasznosítása a *R. pusillus* és *R. miehei* faj között megbízhatóan differenciáló értékű.

A felsorolt négy vegyület közül a *R. tauricus* hármat tudott hasznosítani önálló szénforrásként (*szaharóz*, *fenilalanin*, *β-alanin*). Ezen eredmények alapján felvetődött bennünk a kérdés, hogy a morfológiailag teljesen eltérő, különböző táptalajon eltérő mértékben spórázó, zigospóra létrehozására képtelen egyetlen *R. tauricus* képviselő vajon valóban különálló faj-e, vagy egy heterotallikus *R. pusillus* mutáns törzs. Vad típusú törzseknél az asszimilációs spektrum analízis jól értékelhető eredményeket mutat, azonban pleiotróf mutáció jelenlétében, amely eltérő biokémiai működést eredményez a vizsgált szervezeteknél, téves következtetés levonásához vezethet. Feltehetően a *R. tauricus* jellegzetes szén-, illetve nitrogén forrás hasznosításának hátterében is egy ilyen jellegű mutáció áll.

3. A *Rhizomucor* izolátumok további intraspecifikus variabilitásának feltárása érdekében izoenzim analízist végeztünk. Különböző enzimrendszereket tesztelve, öt enzim esetében kaptunk olyan elektroforetikus mintázatot, mely alkalmasnak bizonyult a további analízisre. Az izoenzim analízis adatai alapján a *R. tauricus* bizonyos hasonlóságot tárt fel a *R. pusillus* törzsekkel. Ez is megerősíti azon feltételezésünket, miszerint ez az izolátum egy mutáns *R. pusillus*.

Az izoenzim analízis eredményeire alapozva megállapíthatjuk, hogy meghatározhatók olyan molekuláris markerek, amelyek segítségével a *Rhizomucor* fajokat megbízhatóan megkülönböztethetjük (pl. malát dehidrogenáz, glutamát dehidrogenáz, savas foszfatáz futási mintázat).

A *Rhizomucor* fajokon belül jelentősen eltérő mértékű genetikai variabilitást tapasztaltunk: a *R. miehei* izolátumok alkotta csoport a vizsgált markerek alapján homogénnek bizonyult, ellentétben a *R. pusillus* izolátumokkal, melyek markerei jelentős mértékű polimorfizmust mutattak. Ennek egyik lehetséges magyarázata, hogy a *R. pusillus* fajon belül homo-, illetve heterotallikus törzsek is előfordulnak, ellentétben a *R. miehei* fajjal, melynek törzsei kivétel nélkül homotallikus jelleget mutatnak, tehát önálló zigospóra képzésre képesek. Mindezen eredmények közvetett bizonyítékul szolgálhatnak az ivaros ciklus természetben is gyakori lejátszódására ezen gombáknál. Ez azért érdekes, mivel kevés esetben figyeltek meg ivaros spórákat, és ezért általánosan elterjedt az a vélemény, amely szerint a zigospóraképzés a természetben csak nagyon ritkán lejátszódó esemény.

4. A rDNS ITS-RFLP vizsgálat során azt a feltevésünket próbáltuk méginkább megerősíteni, miszerint a *R. tauricus* egyetlen képviselője nem képvisel különálló fajt, hanem egy mutáns heterotallikus *R. pusillus* izolátum.

Az ITS1 és ITS4 primerek segítségével sikeresen felszaporítottuk az általunk vizsgált járomspórás gombák riboszómális ITS régióját. A kapott PCR termék azonos méretet mutatott a *R. tauricus* és a heterotallikus *R.*

pusillus esetében, míg a homotallikus *R. pusillus* és *R. miehei* amplifikációs fragment mérete az előzőektől nagyobbnak bizonyult. Az ITS régió variabilitását az amplifikált DNS RFLP analízisével is vizsgáltuk, kettős emésztéseket végeztünk két különböző restrikciós enzimmel. Minden esetben a *R. tauricus* és a heterotallikus *R. pusillus* azonos restrikciós mintázatot mutatott. Hasonlóan az izoenzim analízis eredményéhez, ebben az esetben is különbséget tapasztaltunk a *R. pusillus* homo-, illetve heterotallikus képviselői között, illetve a *R. pusillus* és *R. miehei* izolátumok is eltérő csoportot alkottak.

5. Hogy további adatokat nyerjünk a *Rhizomucor* fajok intraspecifikus variabilitásának jellegéről és mértékéről, RAPD-PCR eljárással nyert molekuláris markerek vizsgálatát is elvégeztük (a RAPD markerek sokkal inkább neutrálisnak tekinthetők, mint az expresszált géntermékek, pl. az izoenzimek). Összesen 7 primert teszteltünk, mindegyikkel stabil és reprodukálható amplifikációs mintázatot kaptunk. Összességében a RAPD adatok nagyobb mértékű variabilitást mutattak, mint az izoenzim analízis eredményei a vizsgált *Rhizomucor* izolátumok esetében. Hasonlóan az izoenzim analízis eredményéhez, ebben a vizsgálatban is a *R. pusillus* nagyobb mértékű intraspecifikus variabilitást mutatott, mint a *R. miehei* faj. A különböző mértékű genetikai variabilitás magyarázatául a fajok eltérő párosodási (mating) típusa szolgálhat. A *R. tauricus* azonos csoportot alkotott a *R. pusillus* izolátumokkal, ami alátámasztja az izoenzim és ITS-RFLP analízis során felállított elképzelésünket, miszerint ezen izolátum a *R. pusillus* fajba tartozik.

A két *Rhizomucor* faj amplifikációs mintázata jelentős különbségeket mutatott, azonban sikerült olyan RAPD markereket meghatároznunk, melyek segítségével megbízhatóan elkülöníthető a *R. miehei* a *R. pusillus* fajtól. Ezen fajspecifikus markerek mellett egyetlen génusz specifikus markert találtunk, mely minden *Rhizomucor* izolátumban amplifikálódott, de hiányzott a *M. piriformis* törzs amplifikációs mintázatából.

A PCR-RAPD analízis során meghatározott genetikai markerek segítségével lehetővé válik a *Rhizomucor* izolátumok gyors és biztos identifikálása. Annak ellenére, hogy a RAPD mintázatban esetlegesen előforduló halvány, gyenge sávok megjelenése nagymértékben függ a DNS minta tisztaságától, ez a módszer jól használható a gyakorlatban akár előzetes DNS tisztítás nélkül is.

6. Lambda Fix II fág vektor, valamint a Gigapack III Gold Packaging Extract kit felhasználásával, a *Rhizomucor miehei* NRRL 5258 törzséből, 15 kb átlagméretre szelektált genomiális DNS inzertek beépítésével reprezentatív génkönyvtárat hoztunk létre, melynek titere átlagban 4×10^4 PFU/ml-nek felel meg.

A létrehozott génkönyvtár felhasználásával sikeresen klónoztuk a *R. miehei* NRRL 5258 törzséből a gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenáz (*gpd*) gént. A λ Fix II fágban létrehozott reprezentatív génkönyvtár szűrése *R. miehei gpd* homológ próbával történt. Az izolált rekombináns fág által tartalmazott inzertet tovább emésztettük különböző restrikciós enzimekkel; a kapott *gpd* gént tartalmazó fragmenteket szubklónoztuk a

pBluescript SK (-) plazmidba, majd szekvenáltattuk. A kapott *gpd* gén egy adott régiójának megismert szekvenciája alapján különböző szekvenáló oligonukleotidokat szintetizáltattunk, melyek felhasználásával több lépcsőben, különböző átfedésekkel megkaptuk a teljes *gpd* gén nukleotid szekvenciáját. A *R. miehei gpd* gén 1354 nukleotidnyi kódoló régiója 336 aminósavat kódol, 5 intront tartalmaz. A promóter régióból 100 nukleotidot tudtunk az eddigiekben meghatározni, valamint megismertük a terminális régió 246 bp-nyi szekvenciáját is. A *R. miehei gpd* gén vizsgálata során meghatároztuk az intronok helyzetét, majd összehasonlítottuk más szervezetek *gpd* génjének intronhelyzetével. A korábbi vizsgálatokkal ellentétben eredményeink alapján nem tudtunk messzemenő következtetéseket levonni a vizsgált szervezetek rokonsági kapcsolatáról. Az általunk vizsgált gén aminósav szekvenciáját 11 szervezet *gpd* génjének aminósav szekvenciájával hasonlítottuk össze. Igen nagymértékű homológiát (átlagban 70%) tudtunk kimutatni a különböző szervezetek aminósav szekvenciái között, ami igazolja a *gpd* gén nagymértékű konzervatív voltát az élővilágban. A zigomicéták ezen gén aminósav szekvenciáinak összehasonlítása során közelebbi rokonsági kapcsolatot mutatnak a bazidiomicétákkal, mint az aszkomicétákkal.

A *gpd* gén vizsgálata során információt szereztünk a *R. miehei* adott génjének kodonhasználatáról, meghatároztuk az intronok, valamint a nem-kódoló régiók konszenzus szekvenciáit, mely utóbbinak a későbbiekben a járomspórás gombákban alkalmazható transzformációs rendszer létrehozásánál lesz nagy gyakorlati jelentősége.

7. Kidolgoztuk a *Rhizomucor* fajok optimális protoplasztálási körülményeit, melynek fontos szerepe lesz a továbbiakban a transzformációs rendszerek kiépítésénél. Előzetes elektroforetikus kariotipizálási munkákat folytattunk, mely segítségével adatokat nyertünk a *Rhizomucor* fajok genomméretéről.

KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

AZ ÉRTEKEZÉS TÁRGYKÖRÉHEZ TARTOZÓ KÖZLEMÉNYEK

1. **Vastag, M.**, Papp, T., Kasza, Zs. and Vágvölgyi, Cs. (1998). Differentiation of *Rhizomucor* species by means of carbon source utilization and isoenzyme analysis. J. Clin. Microbiol. 36, 2153-2156.
2. Vágvölgyi, Cs., **Vastag, M.**, Ács, K. and Papp, T. (1999). *Rhizomucor tauricus*: a questionable species of the genus. Mycol. Res. 103, 612-618.
3. **Vastag, M.**, Papp, T., Kasza, Zs. and Vágvölgyi, Cs. (2000). Intraspecific variation in two species of *Rhizomucor* assessed by random amplified polymorphic DNA analysis. J. Basic Microbiol. 40, 269-277.
4. Vágvölgyi, Cs., **Vastag, M.**, Kasza, Zs., Ács, K. and Schwab, H. (2002). Cloning and sequence analysis of a glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene from a zygomycete fungus, *Rhizomucor miehei*. FEMS Microbiol. Letters (előkészítve).

KONGRESSZUSI SZEREPLÉSEK

1. **Vastag, M.**, Papp, T., Nagy, Á., Palágyi, Zs., Ferenczy, L. and Vágvölgyi, Cs. (1997). Delimitation of *Rhizomucor* species on the

basis of genetic and physiological markers. Acta Microbiol. Hung. 44, 430-431.

2. **Vastag, M.**, Nagy, Á., Papp, T., Ács, K. and Vágvölgyi, Cs. (1999). Investigation of the taxonomic position of *Rhizomucor tauricus*. Acta Microbiol. Hung. 46, 134-135.

3. **Vastag, M.**, Papp, T., Ács, K. and Vágvölgyi, Cs. (1999). Intraspecific variability of thermophilic *Rhizomucor* species as assessed by randomly amplified polymorphic DNA. Acta Microbiol. Hung. 46, 351.

4. Vágvölgyi, Cs., **Vastag, M**, Papp, T., Nagy, Á. and Ferenczy, L. (1997). Physiological and molecular markers to differentiate *Rhizomucor* species. 13th ISHAM, Parma, Abstracts 101.

5. Vágvölgyi, Cs., Nagy, Á. and **Vastag, M.** (1998). DNA amplification polymorphism of *Rhizomucor* species. IMC-6, Jerusalem, Abstract 28.

6. Ács, K., **Vastag, M.**, Kasza, Zs. és Vágvölgyi, Cs. (2001). A *Rhizomucor miehei* glicerinaldehid-3-foszfát dehidrogenáz génjének klónozása. MMT 2001. évi Naggyűlése, Balatonfüred, Összefoglalók.

7. Vágvölgyi, Cs., **Vastag, M.**, Kasza, Zs. and Ács, K. (2002). Isolation and Characterization of the Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene from *Rhizomucor miehei*. IMC7, Oslo, Abstracts.

EGYÉB KÖZLEMÉNYEK

1. Palágyi, Zs., Nagy, Á., **Vastag, M.**, Ferenczy, L. and Vágvölgyi, Cs. (1997). Maintenance of fungal strains on cryopreservative-immersed porous ceramic beads. Biotechnol. Tech. 11, 249-250.
2. Vágvölgyi, Cs., Magyar, K., Papp, T., **Vastag, M.**, Ferenczy, L. Hornok, L., and Fekete, Cs. (1998). Detection of double-stranded RNA molecules and virus-like particles in different *Mucor* species. Ant. Leeuwenhoek 73, 207-210.
3. Nagy, Á., Palágyi, Zs., **Vastag, M.**, Ferenczy, L. and Vágvölgyi, Cs. (2000). Electrophoretic karyotypes of some related *Mucor* species. Ant. Leeuwenhoek 78, 33-37.
4. Papp, T., **Vastag, M.**, Nagy, Á., Michailides, T.,J. and Vágvölgyi, Cs. (2001). Genetic variability of the postharvest pathogen *Gilbertella persicaria*: identification of randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers correlating with (+) and (-) mating types. Ant. Leeuwenhoek 80, 301-309.

EGYÉB KONGRESSZUSI SZEREPLÉSEK

1. Palágyi, Zs., Nagy, Á, Vágvölgyi, Cs., **Vastag, M.** and Ferenczy, L. (1997). Application of "Protect" bacterial storage system for fungal strain maintenance. EBC-8, Budapest, Abstracts 108.

2. Papp, T., **Vastag, M.** and Vágvölgyi, Cs. (1999). Genetic variability of the postharvest pathogen *Gilbertella persicaria.* Acta Microbiol. Hung. 46, 343-344.

3. Vágvölgyi, Cs., **Vastag, M.**, Papp, T. and Kasza, Zs. (1999). Isoenzyme and random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis of the homothallic *Mucor genevensis.* Acta Microbiol. Hung. 46, 352.

4. Garas, K., **Vastag, M.**, Somogyvári, F. and Vágvölgyi, Cs. (1999). Applicability of the *ATB Fungus* system for rapid antifungal susceptibility testing of *Rhizomucor* isolates. Acta Microbiol. Hung. 46, 355.

5. Papp, T., Fekete, Cs., **Vastag, M.**, Nagy, Á. and Vágvölgyi, Cs. (1999). Presence of double-stranded RNA molecules and virus-like particles in *Rhizopus* strains. Acta Microbiol. Hung. 47,333.

6. **Vastag, M.**, Garas, K., Papp, T., Ács, K. and Vágvölgyi, Cs. (1999). The antifungal activity of lovastatin against *Rhizomucor* strains. Acta Microbiol. Hung. 47, 383-384.

7. Papp, T., Nagy, Á., Palágyi, Zs., **Vastag, M.** and Vágvölgyi, Cs. (1999). Genetic studies on sexual processes of *Gilbertella persicaria.* Acta Microbiol. Hung. 47, 327-328.

8. Papp T., Nagy, Á., Palágyi, Zs., **Vastag, M.** and Vágvölgyi, Cs. (1999). Genetic studies on sexual processes of *Gilbertella persicaria.* 13th. International Congress of the Hungarian Society for Microbiology, Budapest, Abstracts 75.

9. **Vastag, M.** Garas, K., Papp, T., Ács, K. and Vágvölgyi, Cs. (1999). The antifungal activity of lovastatin against *Rhizomucor* strains. 13th. International Congress of the Hungarian Society for Microbiology, Budapest, Abstracts 109.

10. Papp, T., **Vastag, M.**, Ferenczy, L. and Vágvölgyi, Cs. (2000). Investigation of the genetic variability of *Gilbertella persicaria* via molecular markers. ECFG-5, Arcachon, Abstracts 314.

11. Papp, T., **Vastag, M.**, Ferenczy, L. and Vágvölgyi, Cs. (2000). Phylogenetic position of *Gilbertella persicaria* inferred from glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene sequences. ECFG-5, Arcachon, Abstracts 315.

12. **Vastag, M.**, Palágyi, Zs., Nagy, Á., Ferenczy, L. and Vágvölgyi, Cs. (2000). Investigation of the genetic variability of *Phaffia rhodozyma* via RAPD markers. ECFG-5, Arcachon, Abstracts 338.

13. Ács, K., Kasza, Zs., **Vastag, M.** és Vágvölgyi, Cs. (2000). A gliceraldehide-3-foszfát dehidrogenáz gén klónozása és részleges szekvenciaelemzése *Mucor circinelloides*ben. MMT 2000. évi Naggyűlése, Keszthely, Összefoglalók.

14. Papp, T., Nyilasi, I., Ács, K., **Vastag, M.** és Vágvölgyi, Cs. (2000). A *Gilbertella persicaria* taxonómiai helyének vizsgálata a glicerinaldehid-3-foszfát dehidrogenáz gén és magi riboszómális-DNS szekvenciák alapján. MMT 2000. évi Naggyűlése, Keszthely, Összefoglalók.