

B3445

**MIKROSKÓPIKUS GOMBÁK GENOMANALÍZISE PULZÁLTATOTT
MEZEJŰ GÉLELEKTROFORÉZIS FELHASZNÁLÁSÁVAL**



DOKTORI (PHD) TÉZISEK

Készítette:

NAGY ÁGNES

József Attila Tudományegyetem

Mikrobiológia Tanszék

Szeged

1996

1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK

A mikroszkópikus gombák esetében a genetikai analízis egyik alapfeltétele a könnyen alkalmazható genetikai markerek megléte. Klasszikus genetikai markerekkel (legtöbbször auxotrófia és rezisztencia marker) jelölt szervezetek alkalmazása számos esetben járult hozzá elméleti, vagy gyakorlati szempontból fontos gombatörzsek genetikai állományának megismeréséhez. Az ilyen markerek (mutációk) bevitelére azonban, elsősorban az ipari törzsek jelentős részében előnytelen. További akadálya lehet a klasszikus genetikai elemzésnek, hogy számos gombatörzsnél hiányzik a szexuális ciklus. A genomanalízis egy másik módszere, a kondenzált kromoszómák fénymikroszkópos vizsgálata (a citológiai kariotípus meghatározása), a gombák esetében a metafázisos kromoszómák kis mérete miatt meglehetősen nehéz.

A 80-as évekig az egyedül alkalmazható DNS gélelektroforetikus módszer a hagyományos gélelektroforézis volt, amely viszonylag kisméretű DNS fragmentek (20kb) elválasztását tette csak lehetővé, mivel ezen méret felett az elektromos erőter hatására megnyúlt molekulák nagyságtól függetlenül azonos sebességgel vándorolnak a gélmátrixban.

A pulzáttatott mezejű gélelektroforézis (Pulsed Field Gel Electrophoresis, továbbiakban: PFGE) technika megalapozói Klotz és Zimm (1972), akik az általuk kidolgozott viszkoelasztikus technikával bizonyították, hogy elektromos tér hatására a DNS molekula megváltoztatja konformációját, majd az erőter kikapcsolása után visszatér eredeti állapotába. Bizonyos molekulanagyságon túl a DNS viszkoelasztikus relaxációs ideje arányos a molekulasúllyal.

A DNS konformáció megváltozásának és molekulasúly függő relaxációjának felismerése tette lehetővé annak az elválasztási technikának a kifejlesztését, melyet a 80-as évek elején Schwartz és munkatársai (1982) dolgoztak ki. A PFGE utat nyitott a

nagyméretű DNS molekulák elválasztásához, és közvetlenül vizsgálhatóvá váltak az eukarióták kromoszómális DNS készletei. (Dixon és Kinghorn, 1990).

Ezen eljárás lényege, hogy két, egymást váltó és egymással szöveget bezáró elektromos tér hatására a töltéssel rendelkező DNS molekulák állandó orientálódásra és reorientálódásra kényszerülnek a vándorlásuk folyamán (Schwartz és Cantor, 1984; Carle és Olson, 1984). Minél nagyobb az elválasztandó DNS molekula, annál nagyobb a konformációváltozáshoz szükséges idő. A kisebb DNS molekulák mobilitásbeli előnyéből következően a DNS molekulák nagyság szerint elválnak.

Egy gombataxont reprezentáló törzsek genetikai állománya szükségszerűen kisebb, vagy nagyobb mértékben eltérő. Ennek oka elsősorban azokban a spontán mutációkban keresendő, amelyek minden örökítőanyagban lejátszódnak. Ilyen például a kromoszómák strukturális mutációja, amely sokszor nem kapcsolódik fenotípusos változáshoz, ugyanakkor az elektroforetikus kariotípus vizsgálatával kimutatható.

A kromoszómális szerkezeti változások egyaránt lehetnek interkromoszómális, vagy intrakromoszómális jellegűek. Többféle kromoszóma átrendeződési esemény vezethet a CLP (Chromosome-Length Polymorphism) kialakulásához és gombák genomja gyakran tartalmaz olyan szekvenciákat is, amelyek a kromoszóma átrendeződési folyamatok valamelyikével (rekombináció, deléción, transzlokáció) hozzájárulnak CLP kialakulásához (Zolan, 1995).

Kistler és Miao (1992) hipotézise szerint, a meiózis szelekciós hatású a kromoszómaaberrációkkal szemben, vagyis a meiózis előfordulásának gyakorisága fordítottan arányos a CLP mértékével. A hipotézist támogató és ellene szóló példák egyaránt találhatóak. Egy adott fajon belül lejátszódnak ivaros folyamatokra gyakorolt hatásának tanulmányozását a kromoszómapolimorfizmusra azonban megnehezíti, hogy viszonylag kevés adat áll rendelkezésünkre a CLP kialakulásához vezető molekuláris folyamatokról.

Ismételt vizsgálatok igazolták, hogy néhány kivételtől eltekintve, egy adott gombatörzs kariotípusa stabil, és az egymást követő mitotikus magosztódások során nem változik. A kariotípusok stabilitása és az egyes törzsek közötti variabilitás meglete ugyanakkor egymásnak ellentmond. Ezen ellentmondás feloldása lehet, ha feltételezzük, hogy a különböző kariotípust mutató gombák, több-kevesebb ideig eltérő környezeti körülmények között szeparáltan fejlődtek. Ekkor, ma még pontosan nem ismert mechanizmusok révén eltérések alakulhatnak ki az egyes törzsek kromoszómális állományában. Ezen változások a mikroorganizmus számára sokszor genetikailag hátrányos, vagy közömbös, illetve a megváltozott környezeti feltételek esetén, új kapcsoltságú csoportok kialakulása miatt előnyös is lehet.

A kromoszómaprofilok állandósága, a törzsspecifikus kariotípus a genetikai, orvosi, epidemiológiai és mezőgazdasági vizsgálatok igen fontos módszerévé tették az elektroforetikus kariotipizálást. Elmondható, hogy az ismertett korlátok ellenére az elektroforetikus kariotipizálás napjaink egyik leghatékonyabb törzsidentifikálási eljárása.

- Carle, G.F. and Olson, M.V. (1984). Separation of chromosomal DNA molecules from yeast by orthogonal-field alternation gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res.* 12, 5647-5664.
- Carle, G.F. and Olson, M.V. (1985). An electrophoretic karyotype for yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 3756-3760.
- Dixon, R. and Kinghorn, J.R. (1990). Separation of large DNA molecules by pulsed field gel electrophoresis. *Soc. Gen. Microbiol. Quart.* 17(4), 86-88, 1990.
- Kistler, H.C. and Miao, V.P.W. (1992). New modes of genetic change in filamentous fungi. *Annu. Rev. Phytopathol.* 30, 131-152.
- Klotz, L.C. and Zimm, B.H. (1972). Retardation times of deoxyribonucleic acid solutions. II. Improvements in apparatus and theory. *Macromolecules* 5, 471-481.
- Schwartz, D.C. and Cantor, C.R. (1984). Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell* 37, 67-75.
- Schwartz, D. C., Saffran, W., Welsh, J., Haas, R., Goldenberg, M. and Cantor, C.R. (1982). New techniques for purifying large DNAs and studying their properties and packing. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 47, 189-195.
- Zolan, M.E. (1995). Chromosome-length polymorphism in fungi. *Microbiological Reviews* 59, 686-698.

A kutatási program célkitűzései a következők voltak:

1. Elektroforetikus kariotipizálás segítségével, a kromoszómális állomány jellemzésének elvégzése, néhány elméleti és gyakorlati szempontból fontos gombanemzetségben (*Aspergillus*, *Claviceps*, *Mucor*, *Penicillium* és *Phaffia*).
2. A fajon belüli kromoszóma hossz polimorfizmus vizsgálata; mértékének és jellegének feltárása néhány mikroszkópikus gomba (*Mucor* és *Phaffia*) esetében.
3. A részletes genetikai analízis megalapozása és megkezdése kromoszómális génlokalizációs kísérletek révén a *Phaffia* és a *Mucor* nemzetségben.
4. PFGE eljárás felhasználhatóságának vizsgálata hibridizációs események genetikai következményeinek nyomonkövetésére és igazolására.
5. A PFGE eljárással összefüggő, hatékonyabb genetikai elemzést lehetővé tevő kísérleti eljárások kidolgozása és fejlesztése.

2. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

2.1. A kísérleti program során vizsgált gombafajok

Candida albicans, *Aspergillus nidulans*, *Candida krusei*, *Hansenula anomala*,
Kluyveromyces lactis, *Phaffia rhodozyma*, *Claviceps fusiformis*, *Claviceps purpurea*,
Mucor plumbeus, *Saccharomyces cerevisiae*, *Mucor circinelloides*, *Saccharomyces*
unisporus, *Schizosaccharomyces pombe*, *Mucor racemosus*, *Mucor bainieri*, *Mucor*
mucedo, *Penicillium notatum*, *Penicillium chrysogenum*

2.2. A kísérleti programban alkalmazott fontosabb módszerek

- DNS gélelektroforézis
- protoplasztképzési módszerek
- DNS jelölés (radioaktív és nem-radioaktív) és DNS hibridizáció eljárásai
- pulzáltatott gélelektroforetikus módszerek (OFAGE, CHEF)

3. EREDMÉNYEK

Kísérleti programunk során elméleti és gyakorlati jelentőséggel bíró mikroszkópikus gombák genom felépítését vizsgáltuk pulzálatott gélelektroforézis (PFGE) segítségével.

1. Munkánk eredményeként adatokat nyertünk a biotechnológiai szempontból jelentős *Phaffia rhodozyma* élesztőgomba ezt megelőzően teljesen ismeretlen genetikai állományáról: meghatároztuk a kromoszómális genom méretét (15,5-23,2 Mb), a kromoszómális DNS mobilitási csoportok számát (8-12) és nagyságát (0,83-3,5 Mb). Több izolátum elektroforetikus kariotípusának összehasonlító analizisével kimutattuk, hogy a *P. rhodozyma* fajon belül jelentős kromoszóma hossz polimorfizmus létezik; vizsgáltuk ennek jellegét és mértékét.
2. Nagyszámú *P. rhodozyma* mutáns (167 szín- és 11 auxotróf mutáns) előállításával és elektroforetikus kariotípusuk elemzésével vizsgáltuk, hogy milyen gyakorisággal következik be kromoszómális átrendeződés az alkalmazott mutációs kezelés (esetünkben γ - és UV-besugárzás) során; továbbá, hogy milyen eltérések vannak a kromoszómaszerelvény egyes tagjainak viselkedésében, valamint lehet-e összefüggést találni egy mutációval kiépített valamely fenotípusos jelleg és bizonyos kromoszómaaberrációk között. Információkat nyertünk ezen élesztőgombák ploiditási szintjéről is.
3. Eredményeink révén először nyertünk betekintést egy *Mucor* törzs kromoszómális állományának szerveződésébe. Meghatároztuk a *M. circinelloides* faj több törzsének kariotípusát; feltártuk a fajon belüli kromoszóma hossz polimorfizmus mértékét és jellegét. Összesen, 5 különböző *Mucor* faj (*M. bainieri*, *M. circinelloides*, *M. mucedo*, *M. racemosus*, *M. plumbeus*) több törzsét vizsgálva, szereztünk adatokat a genom szerveződéséről és a génuuson belüli kromoszómális

polimorfizmusról (genomméret: 31,7-40,1 Mb; kromoszómák száma: 6-11; kromoszómális DNS molekulák nagysága: 2,3-9,3 Mb).

4. A *Phaffia rhodozyma* és a vizsgált *Mucor* fajok esetében (ahol a klasszikus genetikai eljárások alkalmazása nehéz, vagy éppen lehetetlen) megkezdjük a genom kromoszómális génlokalizáció révén történő markerezését. Ez megnyitja az utat a további részletes genetikai elemzés előtt ebben a két fontos nemzetségben.
5. Először tudtunk érdemi információt szerezni a *Claviceps* génuszba tartozó fajok genom méretéről és kromoszómaszámáról.
6. Eredményeket értünk el ipari *Penicillium* törzsek elektroforetikus kariotipizálásában.
7. A PFGE eljárást nemcsak vad törzsek és mutáns származékaik jellemzésére használtuk fel, hanem két gombafaj esetében (*P. rhodozyma* és *A. nidulans*) sikerrel alkalmaztuk a protoplasztfúzió során létrejött hibridizációs folyamatok következményeinek nyomkövetésére is. Analizáltuk a fúziós partnereket, a belőlük létrehozott hibridek, illetve rekombináns törzsek kromoszómális állományát. Bizonyítottuk, hogy a PFGE segítségével követni és igazolni lehet a fúziós esemény lejátszódását, az egyes kromoszómák szegregációját.
8. Kidolgoztunk új, illetve tökéletesítettünk olyan kísérleti technikákat, amelyek elősegítik mikroszkópikus gombák elektroforetikus kariotipizálását.

A felsorolt eredmények számos új összefüggéssel bővítik a mikroszkópikus gombák genomszerveződésével kapcsolatos ismereteinket. Segítik a tanulmányozott gombákkal folytatott genetikai kutatást éppúgy, mint a gyakorlati célú törzsnemesítést.

4. PUBLIKÁCIÓK LISTÁJA

4.1. KÖZLEMÉNYEK

1. Nagy, Á., Vágvölgyi, Cs., Balla, É., and Ferenczy, L. (1994) Electrophoretic karyotype of *Mucor circinelloides*. Curr. Genet. 26, 45-48.
2. Nagy, Á., Garamszegi, N., Vágvölgyi, Cs., and Ferenczy, L. (1994) Electrophoretic karyotypes of *Phaffia rhodozyma* strains. FEMS Microbiol. Letters 123, 315-318.
3. Nagy, Á., Vágvölgyi, Cs. and Ferenczy, L. (1995) Simple method for obtaining chromosomal DNA for orthogonal field alteration gel electrophoresis analysis from *Phaffia rhodozyma*. BioTechniques 18, 63-65.
4. Varga, J., Vágvölgyi, Cs., Nagy, Á. és Ferenczy, L. (1995) Isoenzyme, restriction fragment length polymorphism and random amplified polymorphic DNA characterization of *Phaffia rhodozyma* Miller et al. Int. J. Syst. Bacteriol. 45, 173-177.
5. Palágyi, Zs., Nagy, Á., Vágvölgyi, Cs. and Ferenczy, L. (1995) A new mutation protocol for obtaining mutants of the yeast *Phaffia rhodozyma*. Biotechnol. Techn. 9, 401-402.
6. Palágyi, Zs., Nagy, Á., Papp, T., Ferenczy, L. and Vágvölgyi, Cs. (1996) Chromosomal DNA preparation from yeasts of biotechnological importance. Biotechnol. Techn. 10, 565-568.
7. Vágvölgyi, Cs., Magyar, K., Papp, T., Palágyi, Zs., Ferenczy, L. and Nagy, Á. (1996) Value of substrate utilization data for characterization of *Mucor* isolates. Can. J. Microbiol. 42, 613-616.

4.2. SZABADALMAK

1. Eljárás ergolénvázas vegyületek, elsősorban ergometrin termelésére, és szelekciós festési eljárás.
Zalai K., Trinn M., Manczinger L., Polestyukné Nagy Á., Kordik G., Pécsné Rázsó Á., Beszedics Gy., Ferenczy L., Nagy L., Robicsek K., Szegedi M.
2251-2949/90/5 sz. szabadalom
2. Eljárás elimoklavin fokozott termelésére és ehhez új törzs előállítására
Trinn M., Manczinger L., Polestyukné Nagy Á., Kordik G., Pécsné Rázsó Á., Zalai K., Beszedics Gy., Ferenczy L., Nagy L., Robicsek K., Szegedi M.
2251-2950/90/7 sz. szabadalom

4.3. ELŐADÁSOK ÉS POSZTER BEMUTATÓK

1. Vágvölgyi, Cs., Nagy, Á., Varga, J., Palágyi, Zs. and Ferenczy, L. (1994) Value of some molecular markers for species delimitation in the genus *Mucor*. 7. Int. Congr. Mycol. Div. IUMS, Prague, Abstracts, 324.
2. Nagy, Á., Vágvölgyi, Cs. and Ferenczy, L. (1994) Pulsed field electrophoresis of *Mucor* chromosomal DNA. ECFG-2, Lunteren, Abstracts. C3.
3. Kevei, F., Varga, J., Vágvölgyi, Cs., Kucsera, J., Nagy, Á., Pfeiffer, I. and Ferenczy, L. (1994) Interpretation of compatibility relations among black *Aspergilli* on the basis of their molecular characters. Acta Microbiol. Hung. 41, 348.
4. Nagy, Á., Vágvölgyi, Cs. and Ferenczy, L. (1994) Electrophoretic karyotyping of *Mucor* species. Acta Microbiol. Hung. 41, 353.
5. Varga, J., Vágvölgyi, Cs., Nagy, Á. and Ferenczy, L. (1995) Molecular characterization of *Phaffia rhodozyma* strains. Acta Microbiol. Hung. 42, 135.
6. Nagy, Á., Vágvölgyi, Cs., Palágyi, Zs. and Ferenczy, L. (1995) Analysis of chromosomal DNA polymorphism of *Phaffia rhodozyma*. Acta Microbiol. Hung. 42, 133.
7. Nagy, Á., Vágvölgyi, Cs. and Ferenczy, L. (1995) Preparation of chromosomal DNA from yeasts of biotechnological importance. Acta Microbiol. Hung. 42, 134.
8. Nagy, Á., Vágvölgyi, Cs., Palágyi, Zs., Papp, T. and Ferenczy, L. (1996) *Mucor* fajok kromoszóma polimorfizmusának vizsgálata elektroforetikus kariotipizálással. MBE Mol. Biol. Szakoszt. 1. munkaértekezlete, Seregélyes, Összefoglalók 135.
9. Palágyi, Zs., Vágvölgyi, Cs., Nagy, Á. and Ferenczy, L. (1996) Efficient method of mutant isolation from the yeast *Phaffia rhodozyma*. Acta Microbiol. Hung. 43, 241-242.
10. Nagy, Á., Palágyi, Zs., Vágvölgyi, Cs., Papp, T. and Ferenczy, L. (1996) Chromosomal rearrangements observed in auxotrophic and hybrid strains of *Phaffia rhodozyma*. Acta Microbiol. Hung. 43, 242.
11. Vágvölgyi, Cs., Fekete, Cs., Magyar, K., Papp, T., Palágyi, Zs. and Nagy, Á. (1996) Kettősszálú RNS molekulák detektálása *Mucor* fajokban. MMT 1996. évi Nagygyűlése, Nyíregyháza, Összefoglalók.

5. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetemet szeretném kifejezni mindazoknak, akik dolgozatom elkészítését lehetővé tették és munkámat támogatták:

Dr. Ferenczy Lajos akadémikus, tanszékvezető egyetemi tanár
(JATE, Mikrobiológiai Tanszék)

Dr. Szegedi Mihály
Dr. Zalai Károly (Richter Gedeon Vegyészeti Gyár Rt.)

Nagy Lajos Gergely tudományos ügyintéző
Dr. Palágyi Zsuzsanna tudományos munkatárs
Dr. Vágvölgyi Csaba adjunktus (JATE, Mikrobiológiai Tanszék)

