

József Attila Tudományegyetem
Természettudományi Kar
Molekuláris- és Sejtbiológia Doktori Program

B3617

**Variabilitás, mitokondriális genomszerveződés elemzése és
a mtDNS rekombináció értelmezése két imperfekt fekete
Aspergillus faj esetében**

Doktori (PhD) Értekezés Tézisei



Készítette: Kozma-Bognárné Hamari Zsuzsanna
Témavezető: Dr. Kevei Ferenc
Készült: JATE Mikrobiológiai Tanszék

Szeged
1999

1. Bevezetés

Az *Aspergillus niger* fajaggregátum molekuláris jellemzésével ismertté vált, hogy az imperfekt fekete *Aspergillus* fajok extrakromoszómális elemei (mtDNS, RNS vírusok, plazmidok) erőteljes polimorfizmust mutatnak, szemben a teljes életciklussal bíró társaikkal (*Aspergillus nidulans*, *Neurospora crassa*). Az imperfekt gombák kevésbé ismert volta szexuális életciklusuk hiányával magyarázható. A klasszikus genetikai módszerek alkalmazásához a fajon belüli keresztezhetőség elsődleges szempont. A paraszexuális ciklus felfedezése új távlatokat nyitott az imperfekt gombák körében, de a teljes életciklussal bíró fajok esetében is bővíti az elemzés lehetőségét. A paraszexuális ciklus jól használható genetikai vizsgálatokban, kapcsoltsági viszonyok meghatározására és extrakromoszómális elemek rekombinálódásának vizsgálatára. Alkalmazhatóságának egyedüli korlátja az imperfekt gombák (így a fekete *Aspergillus*ok) körében széleskörű vegetatív inkompatibilitás, amely nagyfokú genetikai diverzitásuk következménye. Bizonyos esetekben az anasztomózisra való képtelenség gátolja a heterokariotikus állapot létrejöttét. Ilyenkor a heterokariotikus állapot mesterségesen, protoplasztfúzió alkalmazásával létrehozható. A vegetatív inkompatibilitási rendszer megakadályozhatja a nukleáris állományok keveredését, ugyanakkor nem gátolja meg az extrakromoszómális elemek transzmisszióját, és azok esetleges rekombinálódását. A vegetatív kompatibilitási kapcsolatok hátterében egy összetett, sok gént érintő genetikai rendszer áll. Számos gén több allélja határozza meg egy egyed kompatibilitási genotípusát, így két egyed akkor tud természetes körülmények között heterokariont létrehozni, ha kompatibilitási rendszerük

minden génje, s azoknak minden allélja megegyezik. A paraszexuális ciklus körülményeinek és feltételeinek megismerését követően, az imperfekt gombák tanulmányozása fellendült.

Ezek az előzmények indokolták tanszékünkön a heterokarion kompatibilitási viszonyok vizsgálatát a fekete *Aspergillus* fajok (*A. niger* fajaggregátum, *A. japonicus* és *A. carbonarius*) körében. Az eredmények azt mutatták, hogy nagyfokú a heterokarion inkompatibilitás, nem csak a fent említett közel rokon fajok között, de még az egy fajhoz tartozó izolátumok körében is. Annak felderítésére, hogy a jelenség létrejöttében milyen meghatározó tulajdonságok állnak, molekuláris módszereket vezettek be az egyedi izolátumok jellemzésére. E vizsgálatok ha a jelenséget megmagyarázni nem is, a kompatibilitási viszonyokat azonban valószínűsíteni tudják. A jellemzésre bevezetett új módszer volt az izoenzim analízis, a magi rDNS RFLP (restriction fragment length polymorphism), a mtDNS RFLP vizsgálatok, továbbá a PCR-RAPD (random amplified polymorphic DNA) analízis. A fekete *Aspergillus*okon belül először az *A. niger* fajaggregátum körében jellemeztek nagyszámú törzset. A sejtmagi rDNS és a mtDNS RFLP mintázatai alapján a fajaggregátum tagjait három fő csoportba tudták sorolni, melyről utóbb kiderült, hogy a fajaggregátumot alkotó három *Aspergillus* faj képviselői, név szerint az *A. niger*, az *A. tūbingensis* és az *A. brasiliensis* fajoké. A fő csoportokon belül további alcsoportokat tudtak elkülöníteni, melynek alapja a mtDNS *HaeIII-BglII* restrikciós endonukleázokkal történő kettősemésztése volt. A mitokondriális DNS mérete az *A. brasiliensis* kivételével 30-33 kb között változott. Az *A. japonicus* és *A. carbonarius* fajokat mint külső kontrollt használták az *A. niger* fajaggregátum jellemzésekor. Ezek a fajok már akkor kitűntek jelentősen eltérő molekuláris jellegeikkel. Főként a mtDNS méretük alapján váltak érdekessé

számunkra, amely az *A. niger* komplex tagjaihoz viszonyítva kétszeres méretet is elérhetett. A kutatások ezen stádiumában kerültem e munkát végző csoportba, ahol feladatomban a két, mtDNS szempontjából "különleges" *A. japonicus* és *A. carbonarius* izolátumainak molekuláris markerekkel történő jellemzését kaptam.

2. Célkitűzések

Kezdeti célkitűzésünk az *A. carbonarius*, és *A. japonicus* fajok izolátumai variabilitásának vizsgálata, mitokondriális genom polimorfizmusának tanulmányozása volt. Törekvéseinket később az új eredmények formálták. Kutatási tevékenységünk fejlődését követve az alábbi pontokban vázolom megvalósított célkitűzéseink főbb lépéseit:

- Az *Aspergillus* nemzetségbe tartozó két faj izolátumainak molekuláris és fenotipikus markerekkel történő vizsgálata. A mitokondriális DNS polimorfizmus tanulmányozása.

- Az *A. carbonarius* faj izolátumainak mitokondriális genomjai között megfigyelt különbségek értelmezése fizikai és funkcionális térképek készítésével, és szekvenciaszintű elemzéssel.

- Mitokondriálisan hordozott oligomycin rezisztens *A. japonicus* törzs létrehozása, és ennek alkalmazásával mitokondrium transzmissziós kísérletek kivitelezése.

- Az egyes *A. japonicus* izolátumok között protoplasztfúzióval végrehajtott mitokondrium transzmisszió utódainak jellemzése. A sikeres mitokondrium transzmisszió során létrejött egyik mitokondriális rekombináns utód mtDNS-ének (fizikai térképpel és szekvencia szinten történő) összehasonlítása a két szülővel, a rekombinációs események értelmezése.

3. Új tudományos eredmények

Az általunk vizsgált két imperfekt gombafaj (*A. carbonarius*, *A. japonicus*) gyűjteményes és szabadföldi izolátumait egyéb sajátságok mellett mtDNS és magi rDNS RFLP analízisével jellemeztük.

Az *A. carbonarius* fajon belül vizsgált 15 izolátum mtDNS RFLP polimorfizmus alapján három mitokondriális RFLP típust reprezentált (1a, 1b és 2). A magi rDNS alapján a törzsek két típusba sorolhatók (I., II.). Az rDNS és mtDNS RFLP csoportok korrelációban vannak. Az 1a és 1b mtDNS típust képviselő izolátumok az I. típusú magi rDNS RFLP profilját mutatják, a 2. mtDNS típust reprezentáló egyetlen izolátum pedig a II. típusú rDNS-t képviseli.

A fajra jellemző három különböző megjelenési formájú mtDNS méreteit már kutatásunk kezdetén kiugróan nagyinak találtuk, összehasonlítva az *A. niger* fajaggregátum tagjaira jellemző értékekkel (32-33 kb) [1].

A mitokondriális genom méretbeli különbségeinek értelmezése céljából figyelmünk a genom szerveződése felé fordult.

Kidolgoztunk egy egyszerű és gyors restrikciós térképezési módszert, mely alkalmas volt a nagyméretű mtDNS-ek térképezésére.

Elkészítettük a három különböző mtDNS hat-hat enzimes fizikai, továbbá mitokondriális génpróbák segítségével funkcionális térképeit.

A térképezés során meghatároztuk a mitokondriális genomok pontos méretét, mely 1a, 1b és 2 mtDNS típus esetén 62,0 kb, 63,1 kb és 43,3 kb-nak bizonyult. A 2. mtDNS típust képviselő egyetlen, IN7 jelű izolátum mitokondriális genom mérete mintegy 20 kb-sal kisebb a többinél. A mtDNS és a magi rDNS mintázata is eltér a többi izolátumétól, ezért taxonómiai szempontból távolabbi rokoni kapcsolatot feltételezünk, s ezt

a típust az *A. carbonarius* faj alfajának tekintjük.

Az 1a és 1b mtDNS-ek restriktions térképei a közöttük megfigyelt jól lokalizálható 1,1 kb méreteltéréstől eltekintve azonosak. Az eltérést okozó régió szekvenenciaanalízise alapján valószínűsítettük, hogy az a *cox2* gén egyik I. típusú (ORF-et hordozó) intronja, mely az 1b mtDNS-ben jelen van, az 1a-ból pedig hiányzik. Az intronnal történt hibridizációs kísérletekkel igazoltuk, hogy a 2. típusú mtDNS-ben sincs jelen ez az intron.

Intergénikus szekvenciákkal végzett hibridizációs kísérletek rávilágítottak arra, hogy a 2. típusú mtDNS intergénikus régiói is eltérő módon szerveződnek. A funkcionális térképek eredményei alapján a három különböző mtDNS géntartalma és génsorrendje alapvetően azonosnak bizonyult.

A NADH dehidrogenáz hét lehetséges alegysége közül a *ndh2* gén kivételével mindegyik kódolva van a mitokondriális genomokban. Az 1b mtDNS-ből teljesen hiányzik a *ndh2* gén. Az 1a és 2. típusú mtDNS-ek a gén egy 300 bp-os darabjával pozitív hibridizációt mutat, a gén maradék szekvenciáival azonban nem. E szerint a *ndh2* gén még részlegesen jelen van az 1a és 2. mtDNS-ben, de ez egy átmeneti állapot lehet a teljes eltűnés irányába.

Mindezek alapján megállapíthatjuk, hogy az *A. carbonarius* faj polimorfikus mtDNS megjelenése alapvetően intronális variációkra vezethető vissza, melyet az intergénikus régiók eltérő szerveződése is formál [2].

Az *A. japonicus* fajon belül 52, földrajzilag távoli területekről származó izolátum polimorfizmusát tanulmányoztuk mtDNS és magi rDNS RFLP vizsgálatával. A mtDNS RFLP analízis eredményeként nyolc eltérő típust találtunk. A különböző polimorfikus csoportot reprezentáló

mitokondriális genomok mérete az *A. niger* komplex tagjaihoz képest 20-30 kb-sal bizonyultak nagyobbak (50 és 60 kb között változtak).

A fajon belül, magi rDNS szinten polimorfizmust nem tapasztaltunk, még az alfajként elkülönített *A. japonicus* var. *aculeatus* törzsek is invariábilisnak bizonyultak. Ma ezeket különálló fajként *A. aculeatus* néven tartják számon [3].

Mitokondrium transzmissziós kísérleteket végeztünk az *A. japonicus* faj és közeli rokon *A. aculeatus* mtDNS RFLP csoportjait képviselő törzsek irányába. Donor partnerként mindig az 1. csoporthoz tartozó mitokondriális oliR törzset alkalmaztuk. A mitokondrium transzmissziók az *A. aculeatus* irányába történt átviteltől eltekintve sikeresnek bizonyultak. A sikertelenség az *A. aculeatus* önálló fajként való elkülönítésének további bizonyítékának tekinthető.

A többi mitokondrium átviteli kísérlet során valódi mtDNS rekombinációs és egyszerű mitokondrium helyettesítési események játszódtak le transzferpáronként különböző gyakorisággal, változatos eloszlásban. Fontosnak tartjuk azt, hogy az *A. japonicus* fajon belüli mitokondrium transzmissziókat követően nagy gyakorisággal jöttek létre mitokondrium helyettesített utódok, az *A. niger* fajaggregátum körében végzett mitokondrium transzmissziókhöz képest [4].

Egy kiválasztott rekombináns utód fizikai térképének és bizonyos régióinak a szülővel történő szekvenciaszintű összehasonlítása során megállapítottuk, hogy a rekombináns utód alapvetően a donor mtDNS-ét örökli, mely a recipiens szülő szekvenciái által módosul. A rekombináns utód és a donor mtDNS szerveződését összehasonlítva szekvenciaelemzés során, két távoli régióban bekövetkező intronmozgást detektáltunk. Ezek a *cob* és a *cox1* gén szekvenciáit érintették. A *cob* génbe egy recipiens

eredetű 1149 bp méretű (ORF-et hordozó) I. típusú intron inszertálódását mutattuk ki. A *cox1* gént érintő rekombinációs változások összetettebb intronmozgásra utaltak. Egyrészt azonosítottuk egy recipiens eredetű 1359 bp méretű (ORF-et hordozó) I. típusú intron inszertálódását a vizsgált *cox1* fragmentum downstream régiójának egyik exonjába, másrészt ezen fragmentum upstream irányában egy intron szerzéssel és intronvesztéssel járó összetett eseménysorozatot is valószínűsítettünk. Ez utóbbi folyamat a donor 1230 bp-os (ORF-et hordozó) I. típusú intronjának elvesztését követő 1239 bp-os recipiens eredetű (ORF-et hordozó) I. típusú intron inszertálódásából állt. Az események sorrendjének megállapítását az tette lehetővé, hogy a két ellentétes irányú esemény egymástól néhány nukletid távolságra következett be, s tudjuk azt, hogy az intronok szekvenciafelismerő motívumai legalább 18 bp nagyságúak. Ebből következik, hogy a fenti két szekvenciafelismerő motívum átfedést mutat. Így a recipiens intron csak akkor inszertálódhat, ha azt megelőzően a donor adott intronjának kiugrása következtében helyreáll a recipiens intron restriktós hasítóhely felismerő motívuma. A rekombináns utód ezen kettős esemény által érintett régiójában exonális szekvenciaátrendeződéseket is megfigyeltünk a donorhoz képest, melyek az intronvesztés és nyelés során generálódtak.

Az intronális szekvenciákat hibridizációs próbaként felhasználva a többi rekombináns utód introntartalmára vonatkozóan is szereztünk ismereteket, mely során bizonyos transzmissziókból származó utódokban az intronvesztés előfordulásának nagy gyakoriságát detektáltuk. Ez a gyakoriság, melynek létrejöttét kísérleti rendszerünkben megfigyeltük, a szakirodalom által hivatkozott adatokhoz képest nagyságrendekkel nagyobb [4].

Összegezve, kísérleteinkkel a természetben lejátszódó mitokondriális

rekombinációt modelleztük. A mitokondrium transzmissziók során létrejött rekombináns utódok mtDNS vizsgálatával igazoltuk, hogy a rekombinációs események az intronok mozgásán alapulnak. A jelenség részletes tanulmányozása, pontos megismerése a jövőben komoly gyakorlati felhasználási lehetőséget jelenthet (génterápia). Valószínűsíthető, hogy az imperfekt fajok esetében tapasztalt nagyfokú intraspecifikus mtDNS polimorfizmus a természetben lejátszódó rekombinációs események következményeként jött létre. Kísérleti rendszerünk nagy gyakoriságú intronmozgás megfigyelését biztosítja, a molekuláris történések jó modellrendszere, a transzmisszió eredményességére vonatkozó vizsgálatok pedig a sejtmagtól független kompatibilitási viszonyok értelmezését segíti [4].

Hivatkozott közlemények:

- [1] Kevei F., Hamari Zs., Varga J., Kozakiewicz Z., Croft J.H. (1996) Molecular polymorphism and phenotypic variation in *Aspergillus carbonarius*. *Antonie van Leeuwenhoek* 70: 59-66
- [2] Hamari Zs., Pfeiffer I., Ferenczy L., Kevei F. (1999) Interpretation of variability of mitochondrial genomes in the species *Aspergillus carbonarius*. *Antonie van Leeuwenhoek* (accepted)
- [3] Hamari Zs., Kevei F., Kovács É., Varga J., Kozakiewicz Z., Croft J.H. (1997). Molecular and phenotypic characterisation of *Aspergillus japonicus* and *A. aculeatus* strains with special regard to their mitochondrial DNA polymorphisms. *Antonie van Leeuwenhoek* 72:337-347
- [4] Hamari Zs., Ferenczy L., Kevei F. (1999) Recombination of mitochondrial DNAs after transmission of mitochondria between vegetative incompatible *Aspergillus japonicus* strains. *Fungal Genet. & Biol.* (submitted)

4. Közlemények jegyzéke

Az értekezés témájához közvetlenül kapcsolódó közlemények

Kevei F., Zs. Hamari, J. Varga, Z. Kozakiewicz, J.H. Croft (1996)
Molecular polymorphism and phenotypic variation in *Aspergillus carbonarius*. *Antonie van Leeuwenhoek* 70: 59-66

Hamari Zs., I. Pfeiffer, F. Kevei, L. Ferenczy (1997). Preparation of mitochondrial DNA from fungal protoplasts. *J. Microbiol. Meth.* 30: 165-166

Hamari Zs., F. Kevei, É. Kovács, J. Varga, Z. Kozakiewicz, J.H. Croft (1997). Molecular and phenotypic characterisation of *Aspergillus japonicus* and *A. aculeatus* strains with special regard to their mitochondrial DNA polymorphisms. *Antonie van Leeuwenhoek* 72:337-347

Hamari Zs., I. Pfeiffer, L. Ferenczy, F. Kevei (1999) Interpretation of variability of mitochondrial genomes in the species *Aspergillus carbonarius*. *Antonie van Leeuwenhoek* (accepted)

Hamari Zs., L. Ferenczy, F. Kevei (1999) Recombination events in mitochondrial DNAs after protoplast fusions between heterokaryon incompatible *Aspergillus japonicus* strains belonging to different mtDNA RFLP groups. *Fungal Gen. Biol.* (submitted)

További közlemények

Téren J., J. Varga, Zs. Hamari, E. Rinyu, F. Kevei (1996). Immunochemical detection of ochratoxin A in black *Aspergillus* strains. *Mycopathologia* 134: 171-176

- Kevei F., B. Tóth, A. Coenen, Zs. Hamari, J. Varga, J. H. Croft (1997) Recombination of mitochondrial DNA following transmission of mitochondria among incompatible strains of black *Aspergilli*. Mol. Gen. Genet. 254: 379-388
- Varga J., F. Kevei, Zs. Hamari, B. Tóth, J. Téren, J.H. Croft, Z. Kozakiewicz (1997) Genotypic and phenotypic variability among black *Aspergilli*. In: Integration of molecular and morphological approaches to *Aspergillus* and *Penicillium* taxonomy (eds) Samson R.A. and Pitt J.I. (accepted for publication)
- Tóth B., Zs. Hamari, L. Ferenczy, J. Varga, F. Kevei (1998) Recombination of mitochondrial DNA without selection pressure among compatible strains of the *Aspergillus niger* species aggregate. Curr. Genet. 33: 199-205
- Kevei F., Zs. Hamari, J. Kucsera (1999) Extrachromosomal genetic elements in fungi - a review. Acta Microbiol. Immunol. Hung. (accepted)

Előadások és poszterek:

- Kevei F., Zs. Hamari, Z. Kozakiewicz, J.H. Croft, J. Varga (1993) Characterization of *Aspergillus japonicus* and *Aspergillus carbonarius* strains based on mitochondrial DNA RFLPs. In: FEMS Symposium Number 69, Canterbury 1993, Abstracts.
- Hamari Zs., F. Kevei, J. Varga (1994) Characterization of *Aspergillus japonicus* and *Aspergillus carbonarius* strains based on mitochondrial DNA RFLPs. Acta Microbiol. Immunol. Hung. 41: 352

- Kevei F., Zs. Hamari, J. Varga (1994) Transmission of extrachromosomal elements among black *Aspergilli*. 7. Int. Congr. Mycol. Div. IUMS, Prague, Abstracts, 364
- Hamari Zs., B. Tóth, J. Varga, F. Kevei (1995) Transmission and recombination of mitochondria among black *Aspergilli*. Acta Microbiol. Immunol. Hung. 42: 126
- Tóth B., Zs. Hamari, F. Kevei (1996). Recombination of mitochondria among compatible strains of *Aspergillus niger* aggregate without selection pressure. Acta Microbiol. Immunol. Hung. 43: 247
- Hamari Zs., I. Pfeiffer, B. Tóth, F. Kevei (1996). Detailed map of mitochondrial genome of *Aspergillus carbonarius*. 3rd European Conference on Fungal Genetics, Münster, Germany. Abstract: 247
- Kevei F., B. Tóth, A. Coenen, Zs. Hamari, J. Varga, J. H. Croft (1996). Recombination of mitochondrial DNA following directed mitochondrial transmission among black *Aspergilli*. 3rd European Conference on Fungal Genetics, Münster, Germany. Abstract: 249
- Tóth B., Zs. Hamari, F. Kevei (1996). Mitochondrial DNA recombination among compatible strains of the *Aspergillus niger* aggregate without using selection pressure. 3rd European Conference on Fungal Genetics, Münster, Germany. Abstract: 255
- Kevei F., B. Tóth, A. Coenen, Zs. Hamari, J. Varga, J. H. Croft (1996) Transmission of mitochondria and recombination of mtDNA among black *Aspergilli* in incompatible and compatible relations. 8. Int. Congr. Mycol. Div. IUMS, Jerusalem, Abstract:55

- Hamari Zs. (1996).** Fekete *Aspergillus* fajok molekuláris polimorfizmusának vizsgálata.(előadás) Doktoranduszok I. országos konferenciája, Debrecen.
- Hamari Zs., I. Pfeiffer, B. Tóth, F. Kevei (1997)** Physical maps of polymorphic mtDNAs in *Aspergillus carbonarius* strains. Acta Microbiol. Immunol. Hung. 44: 72-73
- Tóth B., Zs. Hamari, R. Barna, J. Varga, F. Kevei (1997)** Phenotypic and molecular characterization of black wild type *Aspergillus* isolates. Acta Microbiol. Immunol. Hung. 44: 72
- Varga J., E. Rinyu, É. Kevei, F. Kevei, Zs. Hamari, J. Téren (1997)** Ochratoxin production by *Aspergillus* species. Acta Microbiol. Immunol. Hung. 44: 71
- Tóth B., Zs. Hamari, J. Varga, F. Kevei (1997)** Physical maps of the mitochondrial DNAs of some isolates of the *Aspergillus niger* species aggregate. Acta Microbiol. Immunol. Hung. 44: 628-629
- Tóth B., Zs. Hamari, F. Kevei (1997)** Transmission of mitochondria and recombination of mtDNA in *Aspergillus niger* complex. Acta Microbiol. Immunol. Hung. 44: 429-430
- Hamari Zs., B. Tóth, L. Ferenczy, F. Kevei (1997)** Altered mitochondrial genome organisation in the species *Aspergillus carbonarius*. Acta Microbiol. Immunol. Hung. 44: 416-417
- Hamari Zs., B. Tóth, L. Ferenczy, F. Kevei (1998)** Altered mitochondrial genome organisation in the species *Aspergillus carbonarius*. 4th European Conference on Fungal Genetics, Leon, Spain, In: (eds) J.F. Martin, S. Gutiérrez, Fungal Genetics, Abstract Book, pp. 114.

Tóth B., Zs. Hamari, J. Varga, F. Kevei (1998) Physical maps of wild type and recombinant mitochondrial DNAs of some strains of the *Aspergillus niger* species aggregate. 4th European Conference on Fungal Genetics, Leon, Spain, In: (eds) J.F. Martin, S. Gutiérrez, Fungal Genetics, Abstract Book, pp. 115.

Kevei F., Zs. Hamari, B. Tóth, L. Ferenczy (1998) Transmission of mitochondria and recombination of mitochondrial DNA among incompatible black *Aspergillus* strains. 4th European Conference on Fungal Genetics, Leon, Spain, In: (eds) J.F. Martin, S. Gutiérrez, Fungal Genetics, Abstract Book, pp. 110.

Hamari Zs., Á. Juhász, B. Tóth, L. Ferenczy, F. Kevei (1998) Mitochondrial transmission among vegetative incompatible *A. japonicus* strains. MMT Nagygyűlés, Miskolc, Abstract