

B4212

Néhány fekete *Aspergillus* faj mitokondriális genom vizsgálata

A doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

Juhász Ákos



**Témavezető:
Dr. Kevei Ferenc
Dr. Kozma-Bognárné Dr. Hamari Zsuzsanna**

**Szegedi Tudományegyetem
Természettudományi Kar
Mikrobiológiai Tanszék**

**Szeged
2006**

Bevezetés

Az *Aspergillus* nemzetség a fonalas *Ascomycota* mikroszervezetek egyik legintenzívebben tanulmányozott csoportja. Az általunk vizsgált *Aspergillus tübingensis*, *Aspergillus niger* és *Aspergillus japonicus* fajok a szakzsargon által fekete *Aspergillusok* (Section Nigri) néven emlegetett csoportba tartoznak. A szekcióba tartozó fajok imperfektek, ezért jelentős az izolátumok közötti inter- (fajok közti), és intraspecifikus (egy fajba tartozó izolátumok közötti) variabilitás.

Tanszékünkön jelenleg is folynak a különböző *Aspergillus* fajok összehasonlító fenó- és genotipikus elemzései. A törzsek jellemzésére többféle módszer került alkalmazásra: izoenzim analízis, a sejtmagi riboszómális RNS (rDNS) gének RFLP (restriction fragment length polymorphism), illetve a mitokondriális DNS (mtDNS) RFLP vizsgálata, továbbá a RAPD-PCR analízis. A fajok közötti jelentős diverzitás mellett határozott intraspecifikus polimorfizmust detektáltak, mely különösen az imperfekt fajok esetében volt erőteljes. A legszembetűnőbb genetikai variabilitást az extrakromoszómális elemek mutatták.

Az *Aspergillus* nemzetségen belül a *Nigri* szekcióban kezdődtek el a legrészletesebb molekuláris vizsgálatok. Az öt, viszonylag jól körülhatárolt faj (*A. carbonarius*, *A. japonicus*, *A. heteromorphus*, *A. ellipticus* és *A. aculeatus*) mellett nagyszámú, iparilag is fontos fajt az *Aspergillus niger* fajaggregátumba soroltak. Az *A. niger* fajaggregátum körében jellemezték először a polimorfikus bélyegeket. A törzseket a sejtmagi rDNS és a mtDNS

RFLP mintázatai alapján három fő csoportba tudták sorolni, név szerint *A. niger*, *A. tubingensis* és *A. brasiliensis*. A fő csoportokon belül további alcsoportokat tudtak elkülöníteni a mtDNS *HaeIII*-*BglII* restriktációs endonukleázokkal történő emésztésével (*A. niger* esetében öt, 1a-1e; *A. tubingensis* esetében hat, 2a-2f)

A mtDNS RFLP mintázatbeli eltérések mellett jelentős méretbeli polimorfizmust is tapasztaltak, az *A. japonicus* esetében a fajon belül a polimorfizmus igen nagymértékű (45-60 kb). A faj sejtmagi rDNS alapján nem mutat polimorfizmust, de mtDNS alapján nyolc csoportra (1-8) osztható.

Elkezdődtek a kísérletek, amelyben fekete *Aspergillusok* különböző mtDNS RFLP csoportjaiba tartozó inkompatibilis törzsei között oligomycin rezisztenciára alapozott mitokondrium átviteli kísérletek meg (fajon belül, és fajok közt is). Megpróbálták a mitokondriális oligomycin rezisztencia direkt szelekciós lehetőségét kihasználva igazolni a mitokondriális rekombináció bekövetkezését olyan esetekben, amikor semmiféle kommunikáció nincs a két partner sejtmagja között. A mitokondrium átviteli kísérletek legtöbb esetben sikeresek voltak, és nagy variációban rekombináns mtDNS-t eredményeztek.

Célitűzés

Munkánk során célunk volt az *A. niger* és *A. tubingensis* fajok teljes mitokondriális genomjának szekvenálása, az eltérések szekvenciaszintű elemzése, valamint a két faj közt mitokondrium transzmisszió során létrejött rekombináns mitokondriummal

rendelkező utódok mtDNS-ének jellemzése, és a rekombináns karakter kialakulásáért felelős molekuláris mechanizmusok felderítése. További célunk volt a hat különböző mtDNS RFLP mintázattal rendelkező *A. tübingensis* izolátum mitokondriális genomjai között megfigyelt polimorfizmus vizsgálata a mtDNS fizikai és funkcionális térképezésével és szekvencia szintű elemzéssel, valamint az *A. japonicus* izolátumok között protoplasztfúzióval végrehajtott mitokondrium transzmisszió során létrejött instabil fenotípust mutató utódok mtDNS-einek térképezése, és az eltérések szekvenciaszintű magyarázata.

Módszerek

A mtDNS tisztításhoz törzseinket Pontecorvo tápoldatban tenyésztettük. A mtDNS kinyerését az általunk korábban leírt módon végeztük el. A protoplasztok képzését, és fúzionáltatását Kevei és Peberdy által leírt módon hajtottuk végre. A fizikai térképeket reciprok-emésztés technikával készítettük el. A gének sorrendjének és pontos helyének meghatározásához Southern hibridizációt, és PCR technikát alkalmaztunk (a heterológ primerek *A. nidulans*ból származtak). DNS fragmentumainkat a bázis sorrend meghatározásához pBluescript-SK vektorba ligáltuk, vagy közvetlenül a tisztított mtDNS-t szekvenáltuk. A szekvenáláshoz a vektor saját primerein kívül a törzseink szekvenciáihoz tervezett primereket alkalmaztunk. Az alap molekuláris technikák alkalmazását (restriktív emésztés, transzformálás, RAPD-PCR,

cDNS készítés stb.) a gyártók által ajánlott körülmények közt hajtottuk végre.

Eredmények

Elért eredményeinket a következő pontokban foglalhatjuk össze:

Elvégeztük az *A. niger* és *A. tübingensis* fajok teljes mitokondriális genom szekvenálását. Mindkét törzs esetében a mtDNS géntartalma és a gének sorrendje megegyezett. A mintegy 2,5 kb méreteltérésért elsősorban egyes gének intron tartalmából adódó eltérések felelősek. A méretbeli és RFLP mintázatbeli eltérések ellenére a két genom nagymértékű hasonlóságot mutat egymással, a hasítóhelybeli eltérésekért elsősorban pontmutációk felelősek.

Az *A. niger* 1a mtDNS típusú törzsének *cox1* génje 2728 bp, és csak egyetlen 1015 bp-os intront tartalmaz. Az *A. tübingensis* 2b mtDNS típusú törzsének *cox1* génje 5058 bp méretűnek bizonyult, három intront tartalmaz, amelyek sorrendben 1148 bp, 1126 bp, és 1085 bp hosszúságúak. Mindegyik intron I-es típusú mitokondriális intron. A második intron 94%-os szekvencia homológiát mutat az *A. niger* egyetlen *cox1* intronjával. Az intronok pontos pozícióját mRNS-ről készített cDNS segítségével is igazoltuk.

Az *A. niger* 1a típus esetében az *atp9* gén intronmentes, és 225 bp hosszúságú. Az *A. tübingensis* 2b esetében a gén egy 329 bp-os intront tartalmaz, így a gén hossza 554 bp. A 270 bp-os *nad4L* gén *A. tübingensis* 2b esetében intronmentes, míg *A. niger* 1a esetében egy 477 bp hosszúságú intront tartalmaz. Mindkét intron

ORF nélküli, így nem minősülnek mobilis (mtDNS rekombinációt befolyásoló) elemeknek. Az intronok jelenléte ezen génekben az irodalmi adatok alapján ritka jelenségnek minősül.

Mindkét genomban azonosítottunk két orf-et a *nad1* és *nad4* gének közti intergénikus régióban, melyek endonukleázszerű fehérjékkel mutatnak homológiát. Valószínűleg szerepet játszanak a genomok közti rekombinációban.

Mindkét genom *cob* génje előtt találtunk egy rövid, 100 bp alatti *nad1* génnel 100%-osan homológ szakaszt, valamint a *cob* gén után egy *A. niger* PX21 sejtmagi promóterrel szekvencia szinten szinte teljesen azonos szakaszt. E promóter jelenléte a mitokondriális genomban különös jelenség, de más általunk vizsgált *Aspergillus* törzsekre is jellemző.

Protoplasztfüzió segítségével mitokondriális rekombináns törzseket állítottunk elő. Donorként a mitokondriálisan oligomycin rezisztens *A. niger* 1a típust alkalmaztuk, míg a recipiens az *A. tubingensis* 2b mtDNS típusú törzs volt. A fúzió után hatféle rekombináns típust azonosítottunk. Az utódok minden esetben a donor mitokondriumát örökölték, mely a recipiens intronjai által módosult. Minden utód örökölte a 2b típus mindhárom *cox1* gén intronját, de az intronok „homingja” beindított egy rekombinációs folyamatot, mely kiterjedése a hat különböző típusban eltérő nagyságú szekvenciariészeket érintett (1-14 kb).

Elvégeztük a hat eltérő mtDNS RFLP mintázatot mutató *A. tubingensis* típus mitokondriális genomelemzését, és összehasonlítottuk a korábban már részletesen elemzett 2b típussal.

Megállapítottuk, hogy a törzsek génkészlete és sorrendje azonos, méretbeli eltérésükért pedig a *cox1* gén introntartalombeli eltérései a felelősek. A 2b és 2e típus *cox1* génje három, a 2c egy, a többi két intront tartalmaz. Megállapítottuk, hogy a 2b típusra jellemző 1. intron csak a 2b, 2e és 2f típusoknál van jelen. A 2b típusra jellemző 2. intron a 2c kivételével minden típusban előfordul. A 2b típusra jellemző 3. intron szintén egy kivétellel (2f) minden típusban jelen van. A 2b és 2e típus szinte teljesen azonos, csak néhány pontmutációban térnek el egymástól.

Vizsgáltuk az *A. japonicus* faj mtDNS polimorfizmusát; a faj mtDNS RFLP alapján nyolc csoportra osztható. A mtDNS átvitel a nyolc különböző RFLP mintázatú csoport között protoplasztfúzióval valósítottuk meg. A mitokondrium transzmisszió mindig egyirányú volt, és az átvitel során donorként minden esetben egy oligomycin rezisztenciát mitokondriálisan hordozó lizin auxotróf fehér konídium színű izolátum (12870^R) szerepelt, mely a leggyakoribb mtDNS RFLP mintázatú 1. csoportba tartozik. A fúzió minden esetben sikeres volt, kivéve az 1→7 esetben. Ma már a 7. mtDNS csoportot képviselő izolátumok különálló fajnak (*Aspergillus aculeatus*) tekinthetők.

A fúziót követően az oligomycin rezisztens regenerált utódok mtDNS RFLP mintázatát összehasonlítva azt tapasztaltuk, hogy rekombináns mtDNS profillal jellemezhető törzsek mellett nagy gyakorisággal szubsztitúciós utódok is izolálhatók. A mitokondrium helyettesítés az *A. niger* fajaggregátum izolátumai közötti mitokondrium transzmisszió során igen ritka eseménynek

számított, gyakorisága 1% alatti. Az *A. japonicus* 1→2, 1→6 és 1→8 mtDNS RFLP osztályok közötti mitokondrium átvitel utódainak 100%-a szubsztitúciós volt, az 1→4 mtDNS típusok közötti transzmisszió utódainak 100%-a valódi rekombinánsnak bizonyult. Az 1→3 és az 1→5 mtDNS RFLP csoportok közötti mitokondrium transzfer utódainak kisebb hányada rekombináns volt, nagyobb hányada azonban helyettesített, donor RFLP-jű mitokondriumot hordozott.

Az 1→3 és az 1→5 fúziók esetében az utódok fenotípusa nem volt egységes, ellentétben a többi fúziós csoporttal. Alapvetően három fenotípust azonosítottunk: a regenerált utódok jelentős részére visszafogott konídiumképzése miatt világos telepszínt mutatott. Más utódok erőteljes konídiumképzést - a recipiensre jellemző fekete színben - mutattak, ezeket „feketéknek” neveztük el. A harmadik csoport, mely még mindig csökkent konídiumképzést mutatott, de a „világosaknál” erőteljesebb volt; ezt a típust átmeneti formának neveztük el. A fúzió után először csak a „világosak” izolálhatók. Bizonyos esetben ezek szegregációra voltak hajlamosak, amely során a „világos” fenotípus egyre jobban kezdett hasonlítani a vad fenotípus morfológiai sajátosságaihoz. A világosból képződtek az átmeneti formára és a „feketékre” jellemző szektorok, de az átmeneti forma is képes volt átalakulni „feketévé”. Ez utóbbi típus nem alakult tovább, ezért végformának tekinthető. Az átalakulás mindig egyirányú volt.

A fenotípus összefüggésben volt az mtDNS RFLP mintázatával is. Minden világos szubsztitúciós mtDNS-sel

rendelkezett. Az átmeneti formákra többféle rekombináns RFLP volt jellemző, míg a végforma szintén rekombináns volt, de csak egyféle RFLP mintázattal jellemezhető. Az utódok itt is a donor mitokondriumát örökölték elsődlegesen, mely fokozatosan alakult át intronvesztéssel a recipiensre jellemző mtDNS típusúvá. Feltételezésünk szerint ennek oka az, hogy a recipiens magja nem kompatibilis a donor jóval nagyobb mitokondriumával, és intronkivágódási problémák miatt fellépő mitokondriális funkcióhiány okozza a gyengébb növekedést és konídium képzést. Elméletünk alapja az volt, hogy a rekombináns típusok mitokondriuma egyre jobban a recipiensére kezdett hasonlítani, az eltérés a *cox*, de elsősorban a *cox1* gént érintette: jelentős méretbeli csökkenést tapasztaltunk, ami intronok elvesztésére utal. Eredményeink nem igazolták ezt az elméletet, mert sikerült az intronmentes géneknek megfelelő méretű cDNS-t előállítanunk mindkét genom esetében. Megállapíthatjuk tehát, hogy az *A. japonicus* izolátumaink esetében általunk eddig ismeretlen faktorok felelősek a mtDNS változásaiért.

Elvégzett kísérleteink a természetben lejátszódó mitokondriális rekombináció jelenségének modellezésére szolgáltak. Az általunk megfigyelt rekombinációs események intron mozgáson alapulnak. Az eddigi adatok alapján valószínűsíthető, hogy a mtDNS rekombináció folyamatának kiváltásában az intronok mozgásának kulcsszerepe van.

Publikációk

A dolgozathoz felhasznált közlemények:

- Kevei Ferenc, Juhász Ákos, Hamari Zsuzsanna (2001) Interaction between mitochondria derived from incompatible black *Aspergillus* isolates. *Acta Biologica Hungarica* 52: 201-210
- Hamari Zsuzsanna, Juhász Ákos, Gácser Attila, Judit Kucsera, Pfeiffer Ilona, Kevei Ferenc (2001) Intron mobility results in rearrangement in mitochondrial DNAs of heterokaryon incompatible *Aspergillus japonicus* strains after protoplast fusion. *Fungal Genetics and Biology* 33: 83-95
- Juhász Ákos, Ládai Miklós, Gácser Attila, Kucsera Judit, Pfeiffer Ilona, Kevei Ferenc és Hamari Zsuzsanna (2004) Mitochondrial DNA organisation of the mtDNA type 2b of *Aspergillus tubingensis* compared to the *Aspergillus niger* mtDNA type 1a. *FEMS Microbiol. Letters* 241: 119-126
- Juhász Ákos, Engi Helga, Pfeiffer Ilona, Vágvölgyi Csaba és Hamari Zsuzsanna (2005) Comparative analysis of polymorphic mtDNAs of *Aspergillus tubingensis* strains. *FEMS Microbiol. Letters*. (közlésre elküldve)

Egyéb publikációk:

- Hamari Zsuzsanna, Juhász Ákos, Kevei Ferenc (2002) Role of mobile introns in mitochondrial genome diversity of fungi – a mini review. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 49: 331-335
- Hamari Zsuzsanna, Tóth Beáta, Beer Zsuzsanna, Gácser Attila, Kucsera Judit, Pfeiffer Ilona, Juhász Ákos, Kevei Ferenc (2003) Interpretation of intraspecific variability in mtDNAs of *Aspergillus niger* strains and their mtDNA rearrangement following mitochondrial transmissions. *FEMS Microbiol. Letters* 221:63-71

- Láday Miklós, Juhász Ákos, Giuseppina Mule, Antonio Moretti, Szécsi Árpád és Antonio Logrieco (2004) Mitochondrial DNA diversity and lineage determination of European isolates of *Fusarium graminearum* (*Gibberella zeae*). Eur. J. Plant Pathol. 110: 563-571, 2004
- Láday Miklós, Giuseppina Mule, Antonio Moretti, Hamari Zsuzsanna, Juhász Ákos, Szécsi Árpád és Antonio Logrieco (2004) Mitochondrial DNA variability in *Fusarium proliferatum* (*Gibberella intermedia*). Eur. J. Plant Pathol. 110: 545-550, 2004
- Varga János, Juhász Ákos, Kevei Ferenc és Zofia Kozakiewicz (2004) Molecular diversity of agriculturally important *Aspergillus* species. Eur. J. Plant. Pathol. 110: 627-640, 2004

Konferencia posztterek:

- Hamari, Zs., Juhász, Á., Tóth, B., Ferenczy, L., Kevei, F. (1999) Mitokondriális rekombináció értelmezése. IV. Magyar Genetikai Kongresszus, Siófok, 1999 április 11-14, Összefoglalók: E014, p. 34
- Hamari, Zs., Juhász, Á., Tóth, B., Ferenczy, L., Kevei, F. (1999) Transmission of mitochondria between vegetative incompatible *Aspergillus japonicus* strains. *Acta Microbiogca et Immunologica Hungarica*, 46: 135-136
- Hamari, Zs., Tóth, B., Juhász, Á., Ferenczy, L., Kevei, F. (1999) Interpretation of recombination events of mtDNAs after transmission of mitochondria among vegetative incompatible *Aspergillus japonicus* strains. *Acta Microbiogca et Immunologica Hungarica*. 46: 339
- Hamari, Zs., Tóth, B., Juhász, Á., Ferenczy, L., Kevei, F. (1999) Interpretation of recombination events in fungal mtDNAs. 26th Meeting of the Federation of European Biochemical Society, Nice, France, 1999. June 19-24. *Biochemie* 8: (Suppl., 6.) 182
- Hamari, Zs., Juhász, Á., Ferenczy, L., Kevei, F. (2000) Role of mobile introns in mtDNA recombination in black *Aspergilli*. Fifth European Conference on Fungal Genetics, Arcachon, France, In (eds.) B. Felenbok, B. Turcq, Fungal Genetics, Abstract Book, p. 69

- Kevei, F., Juhász, Á., Hamari, Zs. (2000) Level of heterokaryon incompatibility influences the effectivity of mitochondrial transmissions. Fifth European Conference on Fungal Genetics, Arcachon, France, In (eds.) B. Felenbok, B. Turcq, Fungal Genetics, Abstract book, p. 70
- Hamari, Zs., Juhász, Á., Kevei, F. (2000) Incompatibility influences the effectivity of mitochondrial transmissions. 1st Joint Meeting of the Slovenian Society for Microbiology and the Hungarian Society for Microbiology, Keszthely, Hungary. Abstract book, p 170-171
- Gácsér, A., Hamari, Zs., Juhász, Á., Pfeiffer, I., Kucsera, J., Kevei, F. (2001) Reduced fitness of *Aspergillus japonicus* strains attribute to mitochondrial malfunction? *European J. Biochem.* 268: (Suppl. 1) 164
- Juhász, Á., Hamari, Zs., Kevei, F. (2001). Mitokondrium transzmissziók okozta fenotípus változások *Aspergillus japonicus*-nál. Balatonfüred, 2001. Október 10-12, Abstract book p. 72
- Hamari, Zs., Juhász, Á., Kevei, F. (2001). A *cox1* gén mobilis I. típusú intronjainak terjedése közel rokon fekete *Aspergillus* izolátumok között. Balatonfüred, 2001. Október 10-12, Abstract book, p. 61
- Juhász, Á., Hamari, Zs., Kevei, F. (2002) MtDNA organisation of unstable *Aspergillus japonicus* isolates derived from intraspecific mitochondrial transmission. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* 49: 398
- Kevei, F., Juhász, Á., Hamari, Zs. (2002) Detection of a highly invasive intron in mitochondrial transmission experiments. 6th European Conference on Fungal Genetics. Pisa, Italy. Fungal Genetics, Abstract Book, p. 87
- Juhász, Á., Hamari, Zs., Kevei, F. (2002) Characterisation of instable mitochondrial recombinants of *Aspergillus japonicus*. 6th European Conference on Fungal Genetics. Pisa, Italy. Fungal Genetics, Abstract Book, p. 89
- Hamari, Zs., Juhász, Á., Kevei, F. (2002) Study of mtDNA variability among *Aspergillus niger* isolates. 6th European Conference on Fungal Genetics. Pisa, Italy. Fungal Genetics, Abstract Book, p. 423

- Juhász, Á., Engi, H., Hamari, Zs., Kevei, F. (2003) Interpretation of mtDNA polymorphisms of *Aspergillus tubingensis* strains. 1st FEMS Congress of European Microbiologists. Szlovénia, Ljubljana. Abstract book, p. 204
- Juhász, Á., Engi, H., Hamari, Zs., Kevei, F. (2003) Comparative analysis of polymorphic mtDNAs of *Aspergillus tubingensis* strains. 14th International Congress of the Hungarian Society for Microbiology. Balatonfüred, 2003. October 9-11. Abstract book
- Juhász, Á., Engi, H., Hamari, Zs. (2004) *Aspergillus tubingensis* törzsek mtDNS elemzése. Keszthely, 2004 október 7-9, Abstract book, p. 52
- Juhász Á., Engi H., Pfeiffer I., Hamari Zs. (2005) Study of mtDNA variability among *Aspergillus tubingensis* strains. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 52: 245
- Hamari Zs., Pfeiffer I., Juhász Á. (2005) Reorganisation of mitochondrial DNA in *Aspergillus niger* and *Aspergillus tubingensis* hybrids. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 52: 248