

**A KAROTINOID-BIOSZINTÉZIS GENETIKAI HÁTTERE ÉS MÓDOSÍTÁSÁNAK
LEHETŐSÉGEI JÁROMSPÓRÁS GOMBÁKBAN**

DR. PAPP TAMÁS



**SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM
TTIK
MIKROBIOLÓGIAI TANSZÉK**

**SZEGED
2016**

TARTALOMJEGYZÉK

TARTALOMJEGYZÉK	2
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	3
1. BEVEZETÉS	4
1.1. A járomspórás gombák rövid bemutatása	4
1.2. A terpénbioszintézis-kutatás főbb területei gombákban	4
1.3. A mikrobiális karotintermelés vizsgálatának jelentősége	4
1.4. Járomspórás gombák a karotinoid-bioszintézis kutatásában.....	5
1.5. Az általános mevalonsav-út és a terpén-bioszintézis főbb lépései gombákban	6
1.6. A β -karotin-bioszintézis specifikus lépései <i>M. circinelloides</i> -ben	7
1.7. A járomspórás gombák genetikai manipulációja	8
2. CÉLKITŰZÉSEK	9
3. FELHASZNÁLT MÓDSZEREK	10
3.1. A vizsgálatok során használt mikroorganizmusok.....	10
3.2. Általános molekuláris technikák	10
3.3. A szekvenciák elemzése és filogenetikai analízis	10
3.4. Mikroszkópos vizsgálatok.....	11
3.5. Valós idejű kvantitatív PCR.....	11
3.6. Járomspórás gombák genetikai transzformációja és a transzformánsok elemzése	11
3.7. A karotinoid- és ergoszterintartalom elemzése	11
3.8. Statisztikai módszerek.....	11
4. AZ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA	12
4.1. Karotinoidtermelő gombák törzsgyűjteményének létrehozása és jellemzése	12
4.2. Az általános mevalonsav-út és az izoprén-bioszintézis kulcslépéseit meghatározó gének jellemzése és az útvonal módosítása járomspórás gombákban	14
4.3. A specifikus karotinoid-bioszintézis vizsgálata: xantofillok termeltetését lehetővé tevő gének kifejeztetése <i>M. circinelloides</i> -ben	18
4.4. A járomspórás gombák genetikai manipulációjához szükséges transzformációs rendszerek kidolgozása.....	21
5. AZ EREDMÉNYEK GYAKORLATI JELENTŐSÉGE.....	22
6. IDÉZETT IRODALOM.....	23
7. KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE.....	25

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt hálával tartozom szüleimnek, feleségemnek és három gyermekemnek, hogy egész életem során feltétel nélkül, önzetlenül támogattak és számtalanszor erőt adtak céljaim eléréséhez. Soha nem tudom eléggé megköszönni feleségemnek, Ábrók Mariannának megértését és biztatását, támogatása nélkül ez a disszertáció nem készülhetett volna el.

Köszönettel tartozom Dr. Vágvölgyi Csabának, tanáromnak, munkatársamnak és tanszékvezetőmnek, hogy elindított a kutatói pályán és megszerettette velem a mikrobiológiát és a mikroszkopikus gombák világát. Köszönöm továbbá a több mint húszéves közös munkát, a rengeteg ötletet és útmutatást. Az ő tudása, személyisége és humora alapvetően járult hozzá kutatóvá válásomhoz, barátságát igen nagy ajándéknak tartom.

Hálával gondolok Dr. Ferenczy Lajosra és Dr. Kevei Ferencre, akik pályám kezdetén segítettek és támogatták munkámat, és akiknek személyisége, példamutatása meghatározó volt számomra.

Köszönettel tartozom Dr. Arturo P. Eslavanak, Dr. Enrique Iturriaganak és Dr. Antonio Velayosnak, akiknek útmutatásával bekapcsolódhattam a karotinoid-bioszintézis kutatásába.

Külön köszönöm közvetlen munkatársaimnak Dr. Nagy Gábornak, Dr. Csernetics Árpádnak, Dr. Nyilasi Ildikónak és Dr. Takó Miklósnak a sokéves közös munkát és baráti segítséget, munkájuk meghatározó módon járult hozzá a dolgozatomban bemutatott eredményekhez.

Köszönöm Dr. Nagy Lászlónak, Dr. Krizsán Krisztinának, Dr. Linka Beátának, Dr. Kocsubé Sándornak, Dr. Lukács Gyöngyinek, Petkovits Tamásnak, Tóth Eszternek, Szarkándi János Gergőnek, Bencsik Ottónak, Tóth Dórának, Farkas Anitának és minden jelenlegi és egykori munkatársamnak, akik részt vettek a dolgozatban ismertetett kutatásokban, munkájukat és lelkesedésüket, nélkülük számos eredmény nem született volna meg.

Köszönet illeti Dr. Manczinger Lászlót, Dr. Kredics Lászlót, Dr. Galgóczy Lászlót, Dr. Szekeres Andrást és a tragikus hirtelenséggel elhunyt Dr. Varga Jánost, akiktől munkám során számtalanszor kaptam szakmai segítséget és rengeteget tanultam tőlük.

Köszönet illeti az SZTE TTIK Mikrobiológiai Tanszék minden dolgozóját. Külön is hálával tartozom Lele Máriának és Kulcsár Melindának a sokféle technikai segítségért, Dr. Palágyi Andrásnének és Lengyel Boglárkának az adminisztratív teendők végzésében nyújtott segítségükért és Farkas Elvirának a törzsgyűjtemény odaadó gondozásáért.

Köszönet illeti mindazt a sok kollégát és barátot, akik hozzájárultak kutatói és oktatói pályám alakulásához és elnézést kérek, amiért a felsorolás nem sikerülhetett teljes körűre.

1. BEVEZETÉS

1.1. A járomspórás gombák rövid bemutatása

A járomspórás gombák alapvető jellegei a cönocitikus micélium, a kitin- és kitozántartalmú sejtfa, az ivartalanul képződő, önálló mozgásra nem képes sporangiospórák, valamint az ivaros folyamatok eredményekén kialakuló járom- vagy zigospórák, melyről a nevüket is kapták (gör. *zygosz* - járom). A legtöbb fajt a Mucoromycotina altörzs foglalja magába; ide tartoznak az elsősorban telítetlen zsírsavtermelésük miatt tanulmányozott Mortierellales, az ektomikorrhiza- és termőtestképzésről ismert Endogonales, valamint a legváltozatosabb és legjobban tanulmányozott csoport, a Mucorales rend képviselői. A Mucorales rend egyes tagjai biotechnológiai jelentőséggel bírnak, elsősorban extracelluláris enzimek, karotinoidok, telítetlen zsírsavak, alkoholok, valamint tejsav és egyéb szerves savak termelőiként. Egyes *Mucor* törzseket sajterlelésre is felhasználnak; az *Actinomucor*, *Amylomyces*, *Mucor*, valamint *Rhizopus* nemzetségekbe tartozó gombák megtalálhatók fermentált távol-keleti ételek (pl. tempeh, oncom, sufu, ragi, koji) starter kultúráiban. Néhány faj (pl. *Lichtheimia corymbifera*, *Mucor circinelloides* f. *lusitanicus*, *M. hiemalis*, *Rhizopus oryzae* vagy *Phycomyces blakesleeanus*) genetikai és molekuláris biológiai munkákban használt modellszervezet. A jelen dolgozatban ismertetett vizsgálatokban a karotintermelő *M. circinelloides* f. *lusitanicus*-t használtuk, mely az egyik leggyakrabban vizsgált járomspórás modellorganizmus.

1.2. A terpénbioszintézis-kutatás főbb területei gombákban

A terpénszármazékok öt szénatomos izoprénegységekből épülnek fel és ezek számától függően különböző családokba sorolják őket, pl. mono- (C_{10}), szeszkvi- (C_{15}), di- (C_{20}), szeszter- (C_{25}) és triterpének (C_{30}), karotinoidok (C_{40}), stb. Az egyes izoprénszármazékok változatos funkciót töltenek be a különböző élőlényekben. Gombákban e metabolitok bioszintézise az ún. általános mevalonsav-útról ágazik le. Különösen egyes membránalkotók, valamint szignál és szabályozó fehérjék preniloldalláncainak szintézisének keresztül, az útvonal központi lépéseit katalizáló enzimek és az azokat kódoló gének működése olyan alapvető biológiai folyamatokra is hatással vannak, mint a morfogenezis, a dimorfizmus, a sejt integritás fenntartása, a gombaellenes szerekkel szembeni érzékenység, a környezeti hatásokhoz való alkalmazkodás, vagy az apoptotikus folyamatok szabályozása (8, 18, 24, 32, 36, 52, 70, 87, 93). Mindezen folyamatoknak alapvető szerepük van mind az esetleges biotechnológiai alkalmazások szempontjából, mind a patogenitás kutatásában.

1.3. A mikrobiális karotintermelés vizsgálatának jelentősége

A karotinoidok biotechnológiai szempontból értékes metabolitok, amiket elsősorban az élelmiszer-, a kozmetikai- és a gyógyszeripar, valamint az állattenyésztés használ fel jelentősebb mennyiségben. Egészségre gyakorolt kedvező tulajdonságaiknak köszönhetően napjainkban előállításuk és fogyasztásuk dinamikusan növekvő tendenciát mutat. Az iparban felhasznált

karotinoidok túlnyomó többségét kémiai szintézissel állítják elő, ugyanakkor a mikrobiális karotintermelés megvalósítása olcsó, környezetbarát előállítási technológiák alkalmazását teszi lehetővé, mely egyben csökkentheti a szintetikus eredetű termékek arányát.

Az elmúlt években többféle, mikroorganizmusokra alapozott, ipari léptékű karotinoidtermelő eljárást is kidolgoztak, illetve üzembe állítottak. Ilyen célokra legsikeresebben főként algákat, pl. *Dunaliella salina* (β -karotin), *Haematococcus pluvialis* (β -karotin, asztaxantin), és egyes gombákat, pl. *Blakeslea trispora* (β -karotin, likopin) használtak (16, 20). Számos alkalmazás kísérleti fázisban van, ahol a termelés és a fermentáció hatékonyságát még optimalizálni kell. A potenciálisan kihasználhatónak tekintett karotinoidtermelő mikrobák közt említést érdemel több gombaszervezet, pl. a likopin- és β -karotin-termelő *Mucor circinelloides*, *P. blakesleeanus*, *Neurospora crassa* és *Fusarium sporotrichioides*, vagy az asztaxantintermelő *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*) (20, 43). Más mikrobákból származó gének kifejeztetésével sikerrel termeltettek karotinoidokat egyes nem karotinoidtermelő, viszont biztonságosnak tekintett, vagy a fermentációs eljárásokhoz jól adaptált mikroorganizmusok, pl. *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida utilis*, *Pichia pastoris*, *Yarrowia lipolytica* és *Zymomonas mobilis* segítségével (16, 37, 64, 83, 93, 95, 96).

1.4. Járomspórás gombák a karotinoid-bioszintézis kutatásában

Több gombafaj is kiemelt célpontja a karotinoid-bioszintézissel kapcsolatos kutatásoknak (4). Ezek közül elméleti és gyakorlati szempontból is kiemelkednek a Mucoromycotina altörzsbe tartozó szervezetek (20, 71, 82). Jelentőségüket mutatja, hogy az ebbe a csoportba tartozó *Blakeslea trispora* jelenleg az egyetlen olyan gombafaj, amelyet ipari β -karotin termeltetésre használnak (pl. Vitatene, DSM) (68, 71). Járomspórás gombákban a karotintermelés szorosan összefügg az ivaros folyamatokkal. Maguk az ivaros folyamatokat kiváltó feromonok tulajdonképpen párosodási típus-specifikus karotinszármazékok, egyben a trispórsav (a zigofórok képződését stimuláló feromon) prekursor vegyületei (70).

Az ugyancsak a Mucoromycotina csoportba tartozó *P. blakesleeanus* a karotin-bioszintézis, a fényérzékelés és a fototropizmus tanulmányozásának egyik legrégebben használt modellszervezete (17). A *B. trispora*-hoz hasonlóan, *Phycomyces* esetében eddig még minden genetikai transzformációs rendszer kidolgozására irányuló kísérlet kudarcot vallott, ami nagymértékben hátráltatja a folyamatban szerepet játszó gének funkcionális elemzésére és a termelés befolyásolására irányuló vizsgálatokat (29).

Az utóbbi években intenzíven kezdték tanulmányozni a *M. circinelloides* f. *lusitanicus* karotinoid-bioszintézisét is. Ez a gomba rendelkezik néhány, mind a bioszintetikus út vizsgálata, mind a lehetséges alkalmazások szempontjából rendkívül vonzó tulajdonsággal. Ilyen sajátosság pl. a *M. circinelloides* könnyebb kezelhetősége (az előző fajokhoz képest sokkal jobban használható

molekuláris genetikai munkákban), a lipidakkumuláló képesség, vagy a morfológiai dimorfizmus jelensége (29, 81).

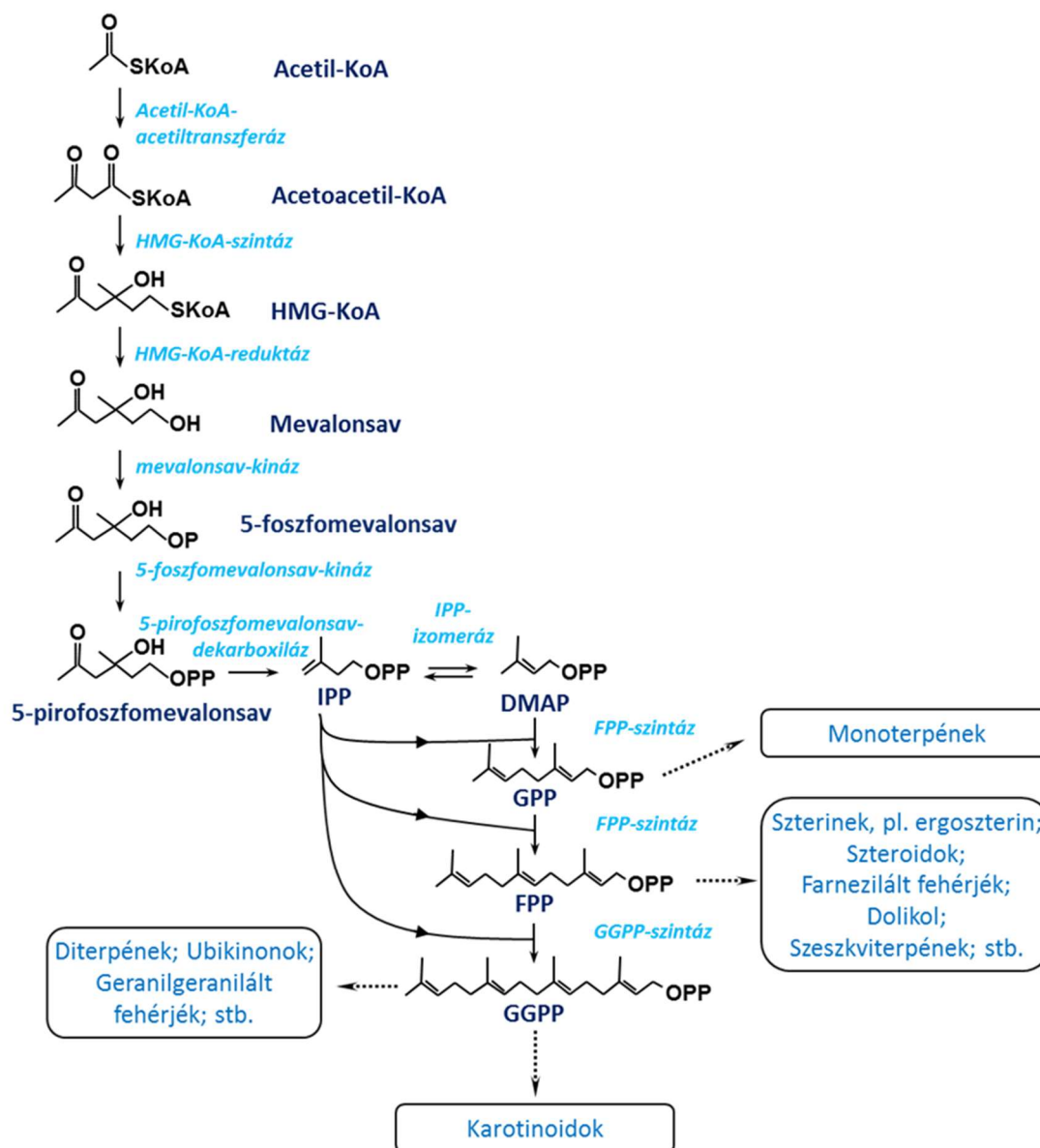
1.5. Az általános mevalonsav-út és a terpén-bioszintézis főbb lépései gombákban

Minden terpénszármazék öt szénatomos izoprénegységekből épül fel. Az izoprén bioszintézise, gombákban csakúgy, mint állatokban, az úgynevezett mevalonsav-úton játszódik le (1. ábra). Ennek kezdeti lépései során két acetyl-koenzim A molekulából acetoacetyl-koenzim A keletkezik, majd ebből újabb acetyl-koenzim A kondenzációjával 3-hidroxi-3-metilglutaril-koenzim A (HMG-KoA) jön létre. Az utóbbi lépést a HMG-KoA-szintáz enzim katalizálja. A folyamat egyik központi lépése a HMG-KoA, HMG-KoA-reduktáz által katalizált, átalakulása mevalonsavvá.

Mivel a HMG-KoA mevalonsavvá alakulása a terpén-bioszintézis egyik sebesség-meghatározó lépése, az enzim működése meghatározó a terpenoid metabolitok képződése szempontjából, kifejeződése pedig erősen szabályozott mind a transzkripció szintjén, mind poszt-transzkripcionálisan (11). Az enzim módosításával befolyásolható többek közt a karotinoidok és más terpénszármazékok, vagy a membránalkotó szterolok termelődése, ezért a HMG-KoA-reduktáz működése és szabályozása biotechnológiai és klinikai szempontból is érdekes és mind emberben, mind gombákban erősen kutatott (11, 93). Az enzim kompetitív inhibitorai a sztatinok, melyeket koleszterinszint-csökkentő hatásuk miatt gyógyszerként alkalmaznak és kutatnak, de gombaellenes hatással is rendelkeznek (6, 23).

A mevalonsavból 5-foszfomevalonsavon keresztül 5-pirofoszfomevalonsav képződik (a folyamatot a mevalonsav-kináz és az 5-foszfomevalonsav-kináz katalizálja), ebből jön létre az 5-pirofoszfomevalonsav-dekarboxiláz enzim segítségével a terpénvegyületek építőegysége, az öt szénatomos izopentenil-pirofoszfát (IPP).

Az izoprén-bioszintézis következő szakasza az IPP izomerizációjával kezdődik, melynek során dimetilallil-pirofoszfát (DMAPP) keletkezik. Egy DMAPP és egy IPP-molekula kondenzációja hozza létre a tíz szénatomos geranyl-pirofoszfátot (GPP, C₁₀), majd további IPP-egységek kondenzációjával öt szénatomonként hosszabbodik a szénlánc, mely a farnezil-pirofoszfát (FPP, C₁₅) és a geranylgeranyl-pirofoszfát (GGPP, C₂₀) képződéséhez vezet. Ezeket a lépéseket izoprenil-pirofoszfát-szintázok katalizálják (39). A képződő köztitermékek nem csak egymás prekursorai, de kiindulási vegyületként szolgálnak az egyes terpénszármazékok specifikus bioszintéziséhez. Így a GPP a monoterpének, az FPP a szterolok, dolikolok, hopanoidok, szeszkviterpének, triterpének, egyes fehérjék farnezil csoportjai és a politerpének, a GGPP pedig az ubikinon prenilcsoportja, egyes fehérjék geranylgeranyl oldalláncai, a diterpének és a karotinoidok előanyaga (39).



1. ábra. Az általános mevalonsav-út és az izoprén-bioszintézis főbb lépései.

Rövidítések: IPP, izopentenil-pirofoszfát; DMAP, dimetilallil-pirofoszfát; GPP, geranyl-pirofoszfát; FPP, farnesil-pirofoszfát; GGPP, geranylgeranyl-pirofoszfát.

A bioszintetikus lépések egymásra épülése miatt a köztitermék-, illetve prekursorszintek és az bioszintézisben résztvevő enzimek aktivitása alapvetően befolyásolja a specifikus utak végtermékeinek mennyiségét.

1.6. A β -karotin-bioszintézis specifikus lépései *M. circinelloides*-ben

A doktori dolgozatban bemutatott kutatás modellorganizmusának választott *M. circinelloides* f. *lusitanicus* esetében a karotinoid-bioszintézis fő terméke a β -karotin. E gombában a bioszintézis specifikus lépéseit és génjeit azonosították és részletesen jellemezték.

A karotinoidok bioszintézise két molekula GGPP kondenzációjával kezdődik, amit a fitoén-szintáz enzim katalizál. Ennek eredményeként keletkezik a szintelen, de már 40 szénatomos fitoén. Gombákban a fitoén-szintáz és a β -karotin-bioszintézis utolsó lépéseit katalizáló likopin-cikláz aktivitásokat egyetlen gén kódolja, melyet *M. circinelloides*-ben *carRP*-nek (88) nevezték el. A

kettős kötések kialakítását, azaz a keletkezett fitoén molekula dehidrogénezését, a *M. circinelloides*-ben a *carB* gén által kódolt fitoén-dehidrogenáz enzim végzi (87). A folyamat több lépésben neurosporén képződésén keresztül valósul meg és a piros színű likopin képződéséhez vezet. A bioszintézis két utolsó lépésében a likopin molekula két vége gyűrűvé záródik, kialakul a β -karotin. A likopin ciklizációját, azaz a jonon gyűrűk kialakítását, a már említett fitoén-szintáz/likopin-cikláz enzim végzi (CarRP).

A karotinoidspecifikus gének gombákban általában egymás mellett, klaszterszerűen fordulnak elő (88, 40, 66). A *M. circinelloides* genomban a *carB* és a *carRP* gén fordított orientációban, egymástól egy közös, mindössze 446 bp-ból álló szabályozó régióval elválasztva helyezkedik el. A két gén összehangolt szabályozás alatt áll, mindkettő átíródását kék fény indukálja (30, 88).

1.7. A járomspórás gombák genetikai manipulációja

A biológiai alap kutatások és a biotechnológiai fejlesztések egyaránt igénylik a génfunkció és kifejeződés vizsgálatának és befolyásolásának rutinszerűen alkalmazható módszereit, melyek magukban foglalják a genetikai transzformációs eljárásokat is.

Járomspórás gombák esetében, amennyiben a transzformáló DNS-t cirkuláris plazmidon juttatjuk be, az szinte mindig episzómálisan, autonóm replikálódó elemként marad fenn és ritkán integrálódik a genomba (2, 57, 63). Amennyiben ez mégis bekövetkezik, szinte mindig véletlenszerű a beépülés (3, 73, 74). A cirkuláris plazmidok alkalmazása általában nagy transzformációs gyakoriságot biztosít, bár az így létrehozott törzsek sokszor mitótikusan instabilak (27, 57).

Nagyon alacsony gyakorisággal ugyan, de a transzformáló DNS integrációja a genomba kettős homológ rekombináció kikényszerítésével megoldható. Ebben az esetben a transzformációt olyan lineáris DNS fragmentummal végezzük, mely a bejuttatni kívánt szakasz két végén, a kettős rekombinációt irányító, homológ szakaszokat tartalmaz (27). Ilyen, homológ rekombináción alapuló génkicserélődéssel azonban csak néhány esetben sikerült gendeléciót megvalósítani *M. circinelloides*-ben (25, 38, 94). Járomspórás gombákból tehát nem könnyű mitótikusan stabil transzformáns törzseket előállítani. Egyes szerzők ezen organizmusok esetében feltételezik egy, a gazda genomot védő mechanizmus jelenlétét, mely meggátolja az idegen DNS genomba történő integrációját és/vagy fennmaradását (27, 55).

A különböző gének funkcionális elemzésére, a génkifejeződés tanulmányozására és módosítására a delécio jól alkalmazható alternatívája az RNS-alapú géncsendesítés (46, 81). Járomspórás gombákban az RNS-interferencia mechanizmusának feltárása és jellemzése folyamatban van, ennek fő modellorganizmusa épp az általunk is vizsgált *M. circinelloides* f. *lusitanicus* (13, 52).

2. CÉLKITŰZÉSEK

Munkánk célja, hogy megvizsgáljuk egyes β -karotin-termelő járomspórás gombák alkalmazásának biológiai feltételeit, valamint, hogy a későbbi alap- és alkalmazott kutatásban felhasználható karotin- és xantofilltermelő törzseket és módszereket hozzunk létre. Mindez magában foglalja az általános mevalonsav- és a specifikus karotinoid-bioszintézis genetikai hátterének feltárását, megfelelő kísérleti módszerek fejlesztését, valamint új gombatörzsek létrehozását és jellemzését. A távlati cél olyan törzsek létrehozása, melyek a jelenleg ismerteknél nagyobb karotinoidprodukcióra és/vagy új karotinoidszármazékok, elsősorban xantofillok termelésére képesek. Munkánk során a következő konkrét feladatokat kívántuk megvalósítani:

1. Karotinoidtermelő járomspórás gombákból álló törzsgyűjtemény létrehozása és jellemzése.

A törzsgyűjteményben elsősorban olyan gombatörzsek elhelyezését és jellemzését terveztük, amelyek a karotintermelés befolyásolását célzó vizsgálatokban felhasználhatók. A célkitűzés magában foglalja új, karotinoidtermelő gombák azonosítását, különös tekintettel a *Mucoromycotina* eddig kevésbé vizsgált csoportjaira (pl. az olajtermelő gombákat tartalmazó *Mortierellales* rend).

2. Az általános mevalonsav-út és az izoprén-bioszintézis kulcslépéseit katalizáló enzimek (HMG-KoA-reduktáz, IPP-izomeráz, valamint FPP- és GGPP-szintázok) génjeinek funkcionális jellemzése és a β -karotin-termelés befolyásolása a bioszintézis-útvonal genetikai módosításával járomspórás gombákban. E feladat célja, hogy megvizsgáljuk, az említett gének, illetve az általuk kódolt enzimek, milyen szerepet játszanak a terpén- és karotinoid-bioszintézisben. Terveink között szerepelt annak elemzése, hogy e gének felhasználhatók-e a karotinoidtermelés javítását célzó kutatásokban.

3. A specifikus karotin-bioszintézis módosítása és xantofillok termeltetésének lehetősége *Mucor*-ban. Célul tűztük ki a β -karotinból kiinduló, asztaxantinig vezető bioszintetikus út heterológ, bakteriális és gomba eredetű génjeinek kifejeztetését a β -karotin-termelő *M. circinelloides*-ben. A gének bevitelét többféle expressziós rendszerben terveztük elvégezni, majd a létrehozott kísérleti rendszerben kívántuk elemezni a termelt karotinoidok és xantofillok összetételét.

4. A bioszintézis utak elemzéséhez és módosításához, valamint a génfunkciók vizsgálatához szükséges eljárások, mindenekelőtt a járomspórás gombákra adaptált, hatékony transzformációs rendszerek, kidolgozása. A karotinoidtermelésben résztvevő gének funkcionális elemzéséhez és a termelés befolyásolásához szükség van megfelelő genetikai transzformációs rendszerekre. A járomspórás gombák genetikai manipulációját nagymértékben hátráltatja a hatékony integrációt és a mitótikusan stabil transzformánsokat biztosító eljárások hiánya.

3. FELHASZNÁLT MÓDSZEREK

3.1. A vizsgálatok során használt mikroorganizmusok

Modellorganizmusként a *M. circinelloides* f. *lusitanicus* MS12 törzsét (SZMC 12082) használtuk. Részletesebben vizsgáltuk a *Backusella lamprospora* SZMC 11061B, a *Gilbertella persicaria* SZMC 11089 és a *Rhizomucor miehei* SZMC 11005 törzsét. A *crtR* és *crtS* géneket a *X. dendrorhous* SZMC 9008 törzsből izoláltuk. A klónozási, vektorépítési és génexpressziós kísérletekben az XL1-Blue, DH5 α és TOP10F⁻ *E. coli* törzseket, az *Agrobacterium tumefaciens* közvetítette transzformációhoz az AGL1 (36), GV3101 (33) és GV2260 (44) törzseket használtuk.

3.2. Általános molekuláris technikák

A genomi DNS tisztítása ITURRIAGA és mtsi. (28) szerint, vagy kereskedelmi forgalomban kapható kitekkel történt. Az RNS-tisztítást CHOI és mtsi. (14) szerint, TRI-reagens (Sigma), vagy az E.Z.N.A Total RNA Kit II (Omega Biotek) alkalmazásával végeztük. A hibridizációs próbákat PCR DIG Probe Synthesis Kit-tel (Roche) készítettük; a detektálást „CDP-Star” (Roche) kemilumineszcens reagenssel, vagy NBT-BCIP alapú DIG DNA Detection Kittel (Roche) végeztük. A *R. miehei* NRRL 5282 génkönyvtár készítéséhez a Lambda FIX II/*Xho*I Partial Fill-In Vector Kit (Stratagene) és a Gigapack III Gold Packaging Extract (Stratagene) kiteket használtuk. A *M. circinelloides* cDNS expressziós könyvtár elkészítéséhez a cDNA Synthesis Kitet (Stratagene) használtuk. A *M. circinelloides* IPP-izomeráz (*ipi*) gén teljes meghatározását a GenomeWalker Universal Kittel (Clontech) végeztük. A *M. circinelloides carG* gén transzkripció iniciációs helyeit primer extenziós elemzéssel állapítottuk meg BLASCO és mtsi. (9), valamint VELAYOS és mtsi. (89) szerint.

3.3. A szekvenciák elemzése és filogenetikai analízis

A DNS szakaszok szekvenálása az MTA Szegedi Biológiai Központban, valamint az LGC Genomics (Berlin, Németország) cégnél történt. Az ismert szekvenciákkal való összehasonlításhoz leggyakrabban az NCBI BLAST szolgáltatásait (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), az izolált gének által kódolt fehérjék szekvenciájának elemzéséhez a Swiss Institute of Bioinformatics Expasy portáljának (<http://www.expasy.ch>) szoftvereit használtuk. A törzsazonosításához és a filogenetikai elemzésekhez a magi riboszómális DNS egyes szakaszait, azaz az ITS (*internal transcribed spacer*) régiót, valamint a 18S (SSU) és 28S (LSU) rRNS géneket szekvenáltuk meg. A reakciókörülményeket a standard protokolloknak megfelelően állítottuk be (91). A szekvenciákat a Staden Package programjaival (75) rendeztük össze. A szekvenciák illesztésére a ClustalW, ClustalX (80), Muscle (21), Probcons (19), Probalign (67) és PRANK (42), valamint a GBlocks 0.91b (79) programokat használtuk. Az inszerciók-deléciók (*indelek*) kódolását a FastGap 1.21 (10), a szubsztitúciós modellek tesztelését a jModeltest szoftver (62) segítségével végeztük. A becsült

fák kongruenciájának megállapításához a CONSEL 0.1 programot használtuk (72). A Maximum Likelihood (ML), ML bootstrap (MLBS), Maximum Parsimónia bootstrap (MPBS) és Bayes-féle analíziseket a RaxML 7.0.3 (76), PAUP 4.0b10 (78), MrBayes 3.1.2 (26) és BayesPhylogenies 1.0 (58) programokkal végeztük. A konszenzus filogramokat általában a PHYLIP programcsomag CONSENSE programjával (22) hoztuk létre.

3.4. Mikroszkópos vizsgálatok

A fény- és fluoreszcens mikroszkópos megfigyelésekhez egy AxioCam ERc 5s kamerával felszerelt AxioLab (Carl Zeiss) fluoreszcens mikroszkópot használtunk. A *B. lamrospora* esetében, a GFP fehérje kifejeződését Zeiss Jenalumar fluoreszcens mikroszkóppal végeztük (54).

3.5. Valós idejű kvantitatív PCR

A plazmidok és gének kópiaszámát, valamint a vizsgált gének transzkripcióját valós idejű kvantitatív PCR (qPCR), illetve valós idejű kvantitatív reverz transzkripció PCR (qRT-PCR) segítségével elemeztük (15, 50, 60). A kapott eredményeket a $2^{-\Delta\Delta C_t}$ módszer segítségével értékeltük ki (41); referenciagénként a *M. circinelloides* aktin gént használtuk, kivéve a *crtW* gén kópiaszámának meghatározása esetében, ahol a *carG* és *isoA* génekhez viszonyítottunk (15, 60).

3.6. Járomspórás gombák genetikai transzformációja és a transzformánsok elemzése

A protoplasztokat ITURRIAGA és mtsi. (28) vagy NAGY és mtsi. (49) szerint preparáltuk. A genetikai transzformációhoz VAN HEESWIJCK és RONCERO (84) módszerét adaptáltuk. Az *Agrobacterium* közvetítette transzformációhoz saját protokollt dolgoztunk ki (59). A transzformánsok mitotikus stabilitását a NYILASI és mtsi. (53), CSERNETICS és mtsi. (15), valamint PAPP és mtsi. (60) szerint vizsgáltuk. A transzformáció sikerességét PCR kísérletekkel, illetve DNS hibridizációval bizonyítottuk. Az integráció helyét inverz PCR (IPCR) technikával (56) vizsgáltuk.

3.7. A karotinoid- és ergoszterintartalom elemzése

A karotinoidkivonást és a karotinoidminták vékonyréteg kromatográfiás elemzését PAPP és mtsi. (61) szerint végeztük. Az összkarotinoid-tartalmat fotometriás úton (65) is meghatároztuk. Az ergoszterinkivonáshoz az ALCAZAR-FUOLI és mtsi. (1) által leírt módszert használtuk. A karotinoid- és ergoszterinminták részletes vizsgálata HPLC analízissel történt (15, 50).

3.8. Statisztikai módszerek

Az adatok kiértékelését, az átlagok és szórások, valamint a különbségek szignifikanciájának kiszámítását Microsoft Office Excel programja segítségével végeztük.

4. AZ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

A dolgozatban ismertetett kutatások során β -karotin-termelő járomspórás gombákban, mindenekelőtt a modellorganizmus *M. circinelloides*-ben vizsgáltuk a karotinoid-összetételt, valamint az általános mevalonsav-izoprén- és a specifikus karotinoid-bioszintézist és annak genetikai hátterét. Emellett az alap- és alkalmazott kutatásban felhasználható transzformációs rendszereket dolgoztunk ki, valamint új törzseket hoztunk létre és jellemeztünk a gombacsoport további tanulmányozásához.

4.1. Karotinoidtermelő gombák törzsgyűjteményének létrehozása és jellemzése

1. A járomspórás gombák közül a modellorganizmusként használt *B. trisporá*-n, *M. circinelloides*-en és *P. blakesleanus*-on kívül jobbra csak néhány *Mucor* faj esetében vizsgálták a karotinoidtermelést. Hogy képet kapjunk a karotinoidtermelő járomspórás gombák diverzitásáról és megfelelő mennyiségű törzssel rendelkezünk a későbbi, a jelenlegieknél jobb karotinoidforrások felkutatását és kifejlesztését célzó kutatások számára, fontos célkitűzésünk volt egy megfelelően reprezentatív törzsgyűjtemény létrehozása és jellemzése. Elsődlegesen a Mucoromycotina altörzsbe, illetve azon belül is a Mortierellales és a Mucorales rendbe tartozó, „klasszikus” járomspórás gombák képviselőire koncentráltunk. A gyűjtemény alapját a Szeged Mikrobiológiai Gyűjteményben (SZMC; <http://szmc.hu>) korábban elhelyezett, nagyszámú, a Mucorales rendbe tartozó gomba képezte. Ezt az állományt bővítettük részint saját izolálásokkal, részint más gyűjteményekből történt beszerzések útján. Ennek megfelelően létrehoztunk egy 445 járomspórás gombatörzset magába foglaló gyűjteményt, mely hozzáférhető módon, a Szeged Mikrobiológiai Gyűjteményben került elhelyezésre. A gyűjtemény az ország leggazdagabb járomspórás gomba génbankja, a Mucoromycotina altörzs Mucorales és Mortierellales rendjének 138 fajtát reprezentálja. A gyűjteménybe került izolátumokat meghatároztuk, illetve a korábbi azonosítást molekuláris módszerekkel ellenőriztük. A gyűjtemény megfelelő alapot kínál további alap- és alkalmazott kutatásokhoz, pl. különböző metabolitok (pl. enzimek, szerves savak, lipidek, karotinoidok) bioszintézisének vizsgálatához.

2. A járomspórás gombagyűjtemény tagjainak azonosításához nagy mennyiségű specifikus szekvenciaadatot (pl. elsősorban ITS, LSU, SSU) generáltunk. Ezek közül nagyszámú szekvencia (elsősorban a *Mortierellales* rend és az *Umbelopsis* nemzetség típusfajaira vonatkozóan) bekerült a nemzetközi *Fungal Barcoding Consortium* által e gombák identifikálására létrehozott, validált referenciaszekvenciák adatbázisába (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJNA177353>), valamint hozzájárult, hogy a magi riboszómális ITS régiót jelölték ki univerzális DNS vonalkód markernek gombák azonosítására.

3. Molekuláris filogenetikai vizsgálatokat végeztünk a lipidtermelő fajokról ismert Mortierellales renden belüli filogenetikai viszonyok feltárása érdekében. Ennek során elkészítettük a

Mortierellales rend átfogó, több génre alapozott törzsfáját. Megállapítottuk, hogy a Mortierellales rend és a Mortierellaceae család egyetlen monofiletikus csoportot alkot, de a tradicionális, morfológiai alapon kijelölt *Mortierella* nemzetség poli-, illetve parafiletikus és a család taxonómiai revízióra szorul. A családon belül elkülönítettük és mind molekuláris szinten, mind morfológiailag jellemeztük a monofiletikus csoportokat, valamint javaslatot tettünk az osztályozás felülvizsgálatára.

4. Az átfogó szekvencia-adatsor lehetőséget nyújtott a magi riboszómális régióknak a család, illetve rendszintű filogenetika becslésében történő alkalmazhatóságának vizsgálatára. A tesztelt taxonok esetében a riboszómális gének evolúciós mintázatainak az általánosan elfogadottnál nagyobb komplexitását tapasztaltuk, ami alapján az ITS1, 5,8S és az ITS2 lókuszok, valamint az *indel* mátrix külön partícióként való kezelését javasoljuk. Nagyszámú Mucoromycotina ITS szekvencia tesztelésével azt is megállapítottuk, hogy az inszerciók-deléciók bevonása a filogenetikai elemzésekbe jelentősen javítja az ITS illesztések használhatóságát és növeli a feloldóképességet a törzsfák korai elágazásai mentén.

5. Az általunk meghatározott szekvenciákon kívül, az adatbázisokban fellelhető *Mortierella* ITS szekvenciák bevonásával előállítottunk egy közel 900 szekvenciát magába foglaló adatsort is. Ezen adatsorral végzett elemzés információkkal szolgált a *Mortierella* fajok gyakoriságára és földrajzi elterjedtségére vonatkozóan. Az elemzésből általánosabb érvényű megállapításokat is le tudtunk vonni, elsősorban a leírt és még le nem írt gombafajok számának becslésére vonatkozóan. Meg tudtuk becsülni a *Mortierella* fajok abszolút számát és úgy találtuk, hogy az közel van a leírt *Mortierella* fajok számához. Eredményeink arra engedtek következtetni, hogy a környezeti minták szekvenálása során kapott identifikálhatatlan MOTU-k (*molecular operational taxonomic unit*) nagy száma, legalábbis egyes gombacsoportokban, sokkal inkább a típus- és referenciatörzsekre vonatkozó szekvenciaadatok elégtelen voltának tulajdonítható, mintsem nagyszámú még le nem írt faj létezésének.

6. A reprezentatív járomspórás gombagyűjtemény összeállítása lehetővé tette, hogy teljesebb képet kapjunk a járomspórás gombák karotinoidtermelő képességéről. Teszteltük a gyűjtemény tagjainak karotinoid-összetételét, továbbá 41 izolátum (mely 11 nemzetséget reprezentált) esetében HPLC analízissel részletesen elemeztük a karotinoid-összetételt. Több olyan gombatörzset azonosítottunk melyek összkarotinoid-tartalma összemérhető volt a modellorganizmusként használt *M. circinelloides* f. *lusitanicus*, valamint a karotintermelésre használt *B. trispora* vad típusú izolátumainak karotinoidtartalmával. Ilyen izolátumok a *M. azygosporus* SZMC 12015, *B. lamprospora* SZMC 11062B, *M. bainieri* SZMC 12064, *M. circinelloides* SZMC 12684 és 12689, *M. circinelloides* f. *lusitanicus* SZMC 12082 és f. *circinelloides* SZMC 20727, *M. hiemalis* SZMC 12074, *M. hiemalis* f. *hiemalis* SZMC 12056 és az *U. ramanniana* SZMC 11078. A már jellemzett

gombatörzsekhez képest eltérő összetételű (pl. asztaxantin-, γ -karotin-, zeaxantin-, vagy β -kriptoxantin-termelő) törzseket is azonosítottunk (pl. *M. azygosporus* SZMC 12015, *M. bainieri* SZMC 12064 és *G. persicaria* SZMC 11094). Elsőként írtuk le járomspórás gombákban oxigenált karotinszármazékok jelenlétét.

7. Több járomspórás gombatörzs esetében vizsgáltuk a hőmérséklet és különböző szénforrások karotinoidtartalomra gyakorolt hatását. Kísérleteinkben, néhány kivételtől eltekintve (pl. *M. bainieri*), a vizsgált törzsek többségénél a növekedési optimumnál (22-28 °C) magasabb tenyésztési hőmérséklet szintén stimulálta a karotinoidtermelést. A karotinoidtartalom emelkedése általában 35 °C-on volt a legkifejezettebb, mivel a törzsek többsége 37 °C-on már csökkent növekedést mutatott, vagy éppenséggel nem volt képes túlélni. A legnagyobb összkarotinoid-tartalmat a *M. azygosporus* SZMC 2125 (2,1 mg/g_[száraz tömeg]) és az *A. rouxii* SZMC 1207 (0,9 mg/g_[száraz tömeg]) esetében mértük 35 °C-on. A különböző szénforrások eltérő hatással voltak az egyes törzsek karotinoidtartalmára, de a glükóz, galaktóz, cellobióz és a trehalóz több törzsnél is a karotinoidtermelés szempontjából kedvező szénforrásnak bizonyult, míg az aszparaginsav *B. lamprospora* törzsek karotinoidtermelését stimulálta.

4.2. Az általános mevalonsav-út és az izoprén-bioszintézis kulcslépéseit meghatározó gének jellemzése és az útvonal módosítása járomspórás gombákban

1. Azonosítottuk a terpén- és karotinoid-bioszintézis egyik meghatározó enzimének, a HMG-KoA-reduktáznak három feltételezett génjét a modellorganizmusként választott *M. circinelloides* genomjában. A DNS szakaszok GenBank azonosítói a következők: hmgR1: KJ508882; hmgR2: KJ508884; hmgR3: KJ508883. A géneket az azokat határoló régiókkal együtt, valamint a megfelelő cDNS-eket izoláltuk, *in silico* vizsgálatokkal meghatároztuk a gének által kódolt, feltételezett fehérjék főbb tulajdonságait (**1. táblázat**).

2. A *M. circinelloides* három *hmgR* génjének átíródását eltérő körülmények közt (azaz eltérő tenyésztési idők, hőmérséklet, szénforrások, sókoncentráció, valamint oxigén jelenléte, vagy hiánya esetén) qRT-PCR módszerrel elemeztük. Igazoltuk mindhárom gén átíródását. A teljes tenyésztési ciklus alatt, aerob körülmények közt a *hmgR2* fejeződik ki a legerősebben, a *hmgR1* pedig a leggyengébben. A *hmgR2* és *hmgR3* mind a csírázó spórákban, mind a micéliumban átíródik, a *hmgR1* transzkriptumai azonban csak a hifákban vannak jelen. Megállapítottuk, hogy a tápközeg sókoncentrációja és oxigéntartalma erőteljes hatást gyakorol a *hmgR* gének kifejeződésére, de bizonyos szénforrások (pl. glükóz, dihidroxi-aceton, nátrium-acetát) és a hőmérséklet is jelentősen befolyásolják egyes gének relatív transzkriptumszintjeit.

E kísérletek során a *hmgR1* gén transzkripciója hőmérsékletfüggést mutatott, magasabb hőmérsékleteken egyre alacsonyabb transzkriptum-mennyiségeket detektáltunk. A *hmgR2* és *hmgR3* esetében ilyen megfelelést nem tapasztaltunk, kivéve, hogy a *hmgR2* relatív

transzkriptumszintje 30 °C-on szignifikáns csökkenést mutatott a 25 °C-on mérthez képest. Érdekes, hogy az eltérő hőmérsékleteken végzett tenyésztések eredményeit összehasonlítva a gomba összkarotinoid-tartalmának és a *hmgR2* relatív transzkriptumszintjének változása hasonló lefutást mutat.

1. táblázat. A *M. circinelloides* és a *R. miehei* HmgR fehérjéinek főbb jellemzői.

	McHmgR1	McHmgR2	McHmgR3	RmHmgR
Hossz (aminosav)	1107	1084	1115	1058
Számított molekulatömeg (kDa)	120,78	119,07	120,71	114,4
Számított pI	8,86	8,33	8,43	8,4
Transzmembrán hélixek száma	6	8	5	7
Szterol-érzékelő domén (SSD) (aminosav pozíciók)	244-407	236-388	279-443	235-399
Katalitikus domén (aminosav pozíciók)	653-1107	633-1084	692-1115	638-1045
HMG-kötő motívumok (aminosav pozíciók)	CCENVIGYMPI (717-727); PMATTEGCLVA (745-755)	CCENVIGYMPI (697-707); PMATTEGCLVA (725-735)	CCENVIGYMPI (756-706); PMATTEGCLIA (784-794)	CCENVIGYMPI (701-711); PMATTEGCLVA (729-739)
NAD(P)H-kötő motívumok (aminosav pozíciók)	TGDAMGMN (841-848); VGTVGGG (991-997)	TGDAMGMN (821-828); VGTIGGG (971-977)	TGDAMGMN (880-887); VGTIGGG (1030-1036)	TGDDMGMN (825-831); IGTVGGG (976-982)

A sóstressz ugyancsak hatással volt a *hmgR* gén működésére: 10 g/l NaCl jelenlétében mindhárom gén jelentősen nagyobb transzkriptumszinteket mutatott, mint sómentes tápközegben. A *hmgR2* transzkripciója különösen érzékenyen reagált a tápközeg sótartalmának változására, amennyiben a NaCl-koncentráció emelkedését követte relatív transzkriptumszintjének emelkedése is.

Mindhárom gén esetében magas transzkriptumszinteket detektáltunk nátrium-acetát és dihidroxi-aceton egyedüli szénforrásként történt alkalmazásakor. Mindkét vegyület kapcsolatban van a glikolízissal és prekursoraként szolgálhat a HMG-KoA képződéséhez. Az acetát hatással van az ugyancsak karotintermelő járomspórás *Blakeslea* és *Phycomyces* terpén-bioszintézisére (34) és stimulálja a HmgR enzim aktivitását *Borrelia burgorferi* esetében (85). A *hmgR2* és a *hmgR3* glükózon is erőteljes transzkripciót mutatott. Korábban a glükóz kiváló szénforrásnak bizonyult a *Mucor* terpén-bioszintézise és karotinoidtermelése szempontjából (48, 60).

A környezet oxigéntartalma ugyancsak hatással van a *hmgR* gén átíródására. Amikor a *M. circinelloides*-t anaerob körülmények közt tenyésztettük, a *hmgR1* gén transzkripciója szignifikánsan lecsökkent, a *hmgR3* transzkriptumszintje viszont mintegy háromszorosa volt annak, amit aerob tenyésztés során mértünk. Ugyanakkor, a *hmgR2* aerob és anaerob tenyésztés során detektált transzkriptumszintje nem tért el lényegesen egymástól. A három gén transzkripcióját

egymáshoz viszonyítva aerob körülmények közt a *hmgR2*, anaerob körülmények közt a *hmgR3* átíródása volt a legintenzívebb.

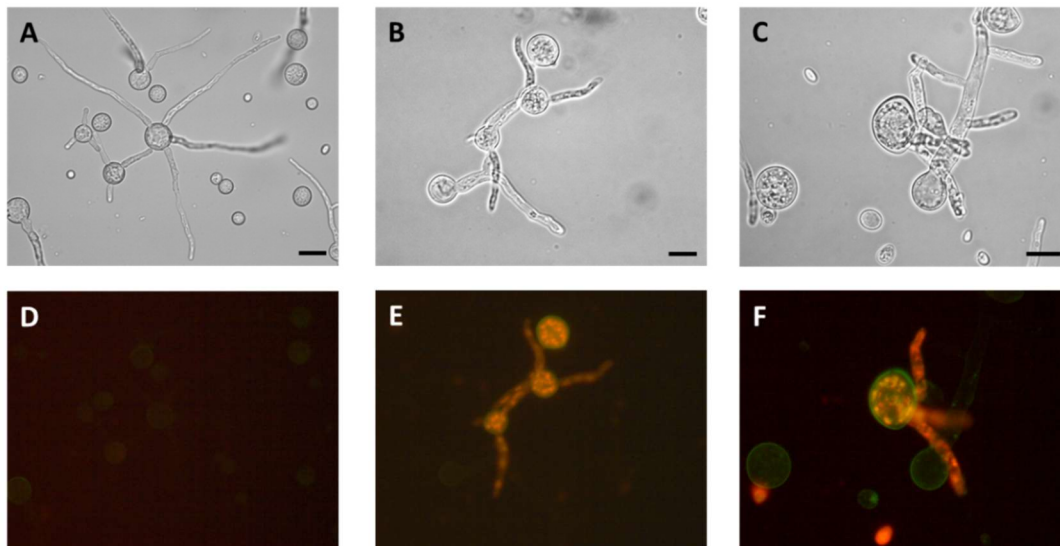
A tenyésztési körülmények megváltozása tehát eltérő hatást gyakorolt a három gén transzkripciójára, ami eltérő szabályozásukat jelzi.

3. Genetikai transzformációval olyan *M. circinelloides* törzseket hoztunk létre, melyekben az egyes *hmgR* gének túlműködtetése valósul meg. Mind a *hmgR2*, mind a *hmgR3* gének túlműködtetése emelte a gomba összkarotinoid-tartalmát és csökkentette sztatinnal szembeni érzékenységét. Ugyanakkor az ergoszterintartalom csak a *hmgR2* gént túlműködtető törzsekben emelkedett meg, a *hmgR1* gén kópiaszámának emelése pedig nem volt hatással a vizsgált tulajdonságokra. Eredményeink azt jelzik, hogy annak ellenére, hogy eltérő szabályozás alatt állnak, a *hmgR2* és a *hmgR3* termékei részben ugyanazon folyamatokban vesznek részt, illetve funkcióik átfednek. Az is megállapítható volt, hogy mindkét gén felhasználható a karotinoid-bioszintézis javítását célzó fejlesztésekben.

4. Olyan *M. circinelloides* törzseket is létrehoztunk, melyekben a *hmgR* gének működését asRNS technikával csendesítettük, majd elemeztük a törzsek fenotípusát és a gének kifejeződését. A *hmgR2* és *hmgR3* gének csendesítésének hatására csökkent a gomba karotinoid- és ergoszterintartalma, ami ugyancsak a két gén átfedő funkciójára utal. Míg a *hmgR1* és *hmgR2* gének csendesítése nem volt lényeges hatással a spórák csírázására, a növekedésre és a morfológiára, a *hmgR3* gének csendesítése esetén csökkent csírázóképeséget, lassabb növekedést, torzult mikro- és makromorfológiát, valamint apoptotikus folyamatokat detektáltunk (2. ábra).

Mindez azt jelzi, hogy a karotinoid- és ergoszterin-bioszintézis mellett, a *hmgR3*-nak szerepe van a spórák csírázóképeségének fenntartásában és a gomba morfogenezisében. Megállapítottuk azt is, hogy a *hmgR3* transzkripciójának csendesítése esetén a *hmgR2* gén átíródása jelentősen megemelkedik, azt sugallva, hogy talán a *hmgR3* kiesésének kompenzációjáról van szó, ami az utóbbi génnek és termékének a gomba életfolyamataiban betöltött alapvető szerepét, valamint a két gén szabályozásának kapcsolatát jelzi.

5. Izoláltuk és jellemeztük a *R. miehei* HMG-KoA-reduktáz génjét, meghatároztuk a gén által kódolt, feltételezett fehérje főbb tulajdonságait (1. táblázat) és bizonyítottuk, hogy a *M. circinelloides*-től eltérően, e gomba genomja egyetlen *hmgR* gént tartalmaz. Nagyszámú *Rhizomucor* izolátumot tesztelve megállapítottuk, hogy a *R. miehei* ellenálló a HMG-KoA-reduktáz szelektív gátlószerével, a lovasztatinnal szemben. A *Rhizomucor hmgR* gént *M. circinelloides*-ben kifejeztetve sikerült csökkenteni utóbbi érzékenységét lovasztatinnal és szimvasztatinnal szemben. Ugyanakkor a heterológ expresszióknak a *M. circinelloides* karotinoid-bioszintézisére nem volt hatása, ami alátámasztja az utóbbinak a többi prenilszármazék (pl. ergoszterin, vagy egyes fehérjék prenilcsoportjai) bioszintézisétől való feltételezett függetlenségét (5, 35).



2. ábra. Az MS12 (A, D), valamint az MS12+pAS3/1 (B, E) és MS12+pAS3/2 (C, F) izolátumok fény- (A-C) és fluoreszcens (D-F) mikroszkópos képe Annexin V-FITC és propidium-jodid festést követően.

Az MS12+pAS3/1 és MS12+pAS3/2 törzsek hordozzák a pAS3 plazmidot, mely a *hmgR3* gént csendesítő antiszensz RNS kifejeződését biztosítja. A festést Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit-tel (Sigma) végeztük a gyártó utasításaink megfelelően. A törzseket 25 °C-on YNB tápoldatban neveltük, a vizsgálathoz a leoltástól számított 8. órában vettünk mintákat. A méretskála 10 µm-nek felel meg.

6. Izoláltuk és jellemeztük a *M. circinelloides* IPP-izomeráz (*ipi*) és GGPP-szintáz (*carG*) génjeit és vizsgáltuk kifejeződésüket a tenyésztési ciklus során (EMBL/GenBank azonosítók: AM903092 és AJ276129). A *M. circinelloides ipi* gén egy 225 aminosavból álló, 26 kDa tömegű fehérjét kódol. A katalitikus régió (18-208. aminosav) tartalmazza az ún. NUDIX (*nucleoside diphosphate linked to some other moiety X*) hidrolázok családjára jellemző konzervált domént (49-199. aminosav), valamint az aktív helyre jellemző és az enzimaktivitáshoz szükséges konzervált pozíciójú ciszteint (C85) és glutaminsavat (E147) (7). A *M. circinelloides carG* gén egy 303 aminosavból álló fehérjét kódol, melynek számított molekula tömege 34,78 kDa. A CarG fehérje a III. típusú GGPP-szintázok csoportjába tartozik, a konzervált poliprenil-szintáz domén a 17. és a 270. aminosavak közt található és tartalmazza az aktív hely kialakításában szerepet játszó, aszparaginsavban gazdag ún. FARM és SARM régiókat (66-80. és 185-197. aminosavak). A *carG* gén promóterében olyan, ún. APE motívumokat azonosítottunk, melyek feltehetően a gén átíródásának fény általi indukciójában játszanak szerepet. A *carG* gén promóterét összehasonlítva az ugyancsak fény indukálta, specifikus karotinoid-bioszintézis gének (*carB* és *carRP*) promótereivel megállapítottuk a *Mucor*-ra jellemző APE motívumok konszenzus szekvenciáját: GRAN₍₁₋₆₎TTGYY. Besugárzást követő Northern-analízissel bizonyítottuk a *carG* gén kék fény általi indukcióját és a *carG*, valamint az említett karotinoidspecifikus gének összehangolt fényszabályozását.

7. Vizsgáltuk az IPP-izomeráz, valamint az FPP- és GGPP-szintázok alkalmazhatóságát a karotinoidtermelés javítására. Ennek érdekében olyan *M. circinelloides* törzseket hoztunk létre, amelyekben az említett enzimeket kódoló *ipi*, *isoA* és *carG* géneket (külön-külön, vagy két-két gént kombinációban) túlműködtettük. A transzformánsok karotinoidtermelése minden esetben megemelkedett a recipiens törzshöz képest. A *M. circinelloides* karotinoidtermelése eredményesen

fokozható volt az izoprén-bioszintézis gének kópiaszámának emelésével és erőteljes kifejeződést biztosító szabályozó szekvenciák (*M. circinelloides gpd1* promóter) alkalmazásával. Egyetlen gén módosítása esetén a gének túlműködtetése a következő sorrendben növelte a karotinoidprodukción: $carG > ipi > isoA$. A génkombinációkkal végzett transzformációk során, az egyes kombinációk a következő sorrendben fokozták a karotinoidtermelést: $ipi + isoA > isoA + carG > ipi + carG$. Eredményeink megerősítik a *carG* gén és a karotinoid-bioszintézis korábban feltárt szoros kapcsolatát. Megállapítottuk, hogy a GGPP-szintáz működésének befolyásolása alkalmas a karotinoidtermelés javítására. Bizonyítottuk, hogy több élesztőfajjal szemben (47, 90), az IPP-izomeráz működése *M. circinelloides*-ben sebesség-meghatározó a karotinoid-bioszintézis szempontjából és felhasználható a termelés javítására.

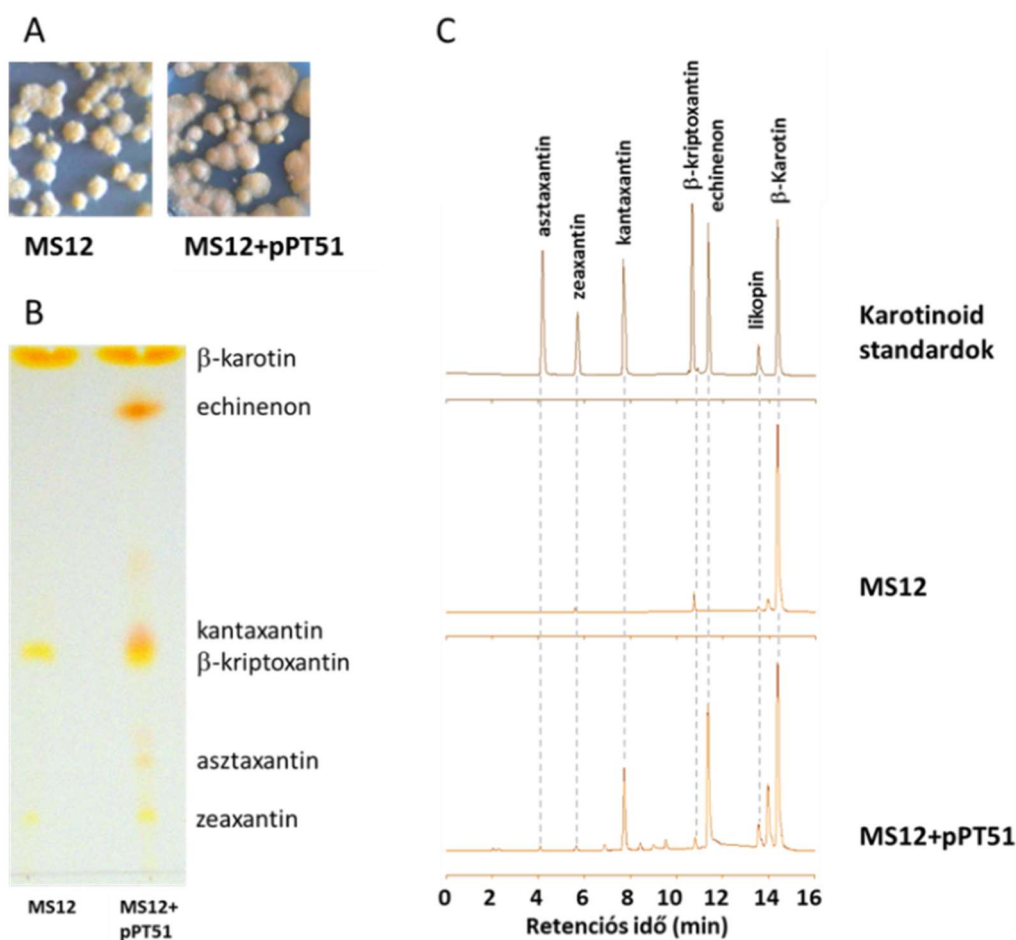
E rendszerben mg-os nagyságrendű szárazanyag tartalomra vonatkoztatott összkarotinoid-produkciót értünk el. Ez a mennyiség összemérhető a *B. trispora*, mely jelenleg az egyetlen ipari karotinoidtermelésre használt fonalas gomba, vad típusú törzseivel, illetve nem optimalizált tenyésztési körülmények közt elérhető karotinoidtartalommal (32, 45). A *B. trispora* IPP-izomeráz és GGPP-szintáz génjeit karotintermelő *E. coli* törzsekben túlműködtetve szintén hasonló karotinoidprodukción sikerült elérni (77). Azt gondoljuk, hogy az általunk előállított törzsek termelőképesége a fermentációs körülmények optimalizálásával jelentősen fokozható. Mindenesetre a fent ismertetett kísérletek azt mutatják, hogy a *M. circinelloides* karotinoidtermelése eredményesen fokozható az izoprén-bioszintézis gének kópiaszámának emelésével és erőteljes kifejeződést biztosító regulátor szekvenciák alkalmazásával. Eredményeink nem csak a karotinoid-bioszintézissel direkt kapcsolatban álló *carG*, hanem a korábbi lépésekért felelős *ipi* és *isoA* gének alkalmazhatóságát is bizonyították.

4.3. A specifikus karotinoid-bioszintézis vizsgálata: xantofillok termeltetését lehetővé tevő gének kifejeztetése *M. circinelloides*-ben

1. Az asztaxantintermelő tengeri baktérium, a *Paracoccus* sp. N81106, valamint az ugyancsak asztaxantintermelő bazídiumos élesztő, a *X. dendrorhous* bioszintézis génjeit *M. circinelloides*-ben kifejeztetve létrehoztunk egy módosított karotinoid-összetételű (xantofilltermelésre képes törzsekből álló) mutánsparcát. A törzsek felhasználhatók a bioszintézis utak elemzésére, a képződő termékek arányának meghatározására, továbbá annak vizsgálatára, hogy a génműködés vagy a mevalonsav/izoprén-út módosítása, milyen hatással van a karotinoidok képződésére.

2. A *Paracoccus* sp. N81106 *crtW* és *crtZ* génjeit, melyek a β -karotin asztaxantinná alakulásához szükséges β -karotin-ketolázt és a β -karotin-hidroxilázt kódolják, először olyan plazmidokon juttattuk be *M. circinelloides*-be, amelyeket a transzformánsok autonóm replikatív úton tartottak fenn. A két gént külön-külön és kombinációban (egymással és a mevalonsav-út egyes génjeivel) fejeztettük ki a gombában. Ezen kísérletek során kutatócsoportunknak elsőként sikerült

xantofilltermelő járomspórás gombatörzseket genetikai transzformációval előállítani. Mivel a *M. circinelloides* eleve képes zeaxantin- és β -kriptoxantin-termelésre, a csak a *crtZ* gént kifejező törzsek karotinoidspektruma nem változott meg a recipiens törzshöz képest, de a két hidroxilált származék mennyisége megemelkedett. A *crtW* gént expresszáló transzformánsok képesek voltak a β -karotin keto-származékainak, azaz az echinenonnak, a kantaxantinnak és az asztaxantinnak a termelésére (3. ábra).



3. ábra. A *crtW* gént hordozó MS12+pPT51 transzformáns, valamint a recipiens MS12 törzs telepmorfológiája YNB táptalajon (A) és karotinoid-összetételének vékonyréteg kromatográfiás (B) és HPLC (C) vizsgálata.

3. Mivel az izoprén-bioszintézis három génjének (azaz az *ipi*, *isoA* és *carG* géneknek) túlműködtetésével fokozni lehetett a β -karotin-produkciót és rendelkezésünkre álltak az ehhez szükséges expressziós vektorok, kotranszformációs kísérleteket végeztünk a *crtW* gént hordozó pPT51 és az egyes izoprén-bioszintézis géneket hordozó pPT82 (*ipi*), pPT83 (*isoA*) és pPT84 (*carG*) plazmidokkal. E kísérletek eredményeképpen a kotranszformánsok összkarotinoid-tartalma az MS12 és a csak a bakteriális géneket hordozó törzsekhez képest jelentősen megemelkedett. Megállapítottuk, hogy az *ipi* és a *carG* gének túlműködtetésével, az MS12+pPT51 törzsben mérhető képest, a xantofilltermelés fokozható volt. Ugyancsak bebizonyosodott, hogy ha a xantofill-bioszintézis létrehozásához szükséges heterológ expressziót cirkuláris plazmidok alkalmazásával valósítjuk meg, a β -karotin marad a transzformánsokban a fő karotinoid termék, azaz a konverzió nem lesz teljes.

4. Az előzőeket figyelembe véve, vektorokat szerkesztettünk a bakteriális *crtW* génnek a *M. circinelloides* genomba történő integrálásához, majd megvalósítottuk az integrációt, kétféle stratégiát alkalmazva, egyrészt kettős homológ rekombinációval, ami elvileg irányított génbevitelt tesz lehetővé, másrészt restrikciós enzim közvetítette integrációval (*restriction enzyme mediated integration*, REMI), melyet főként nagy gyakoriságú ektopikus integrációk elérésére használnak. Ennek során elsőként valósítottunk meg sikeres REMI transzformációt járomspórás gombában. A pCA8lf, pCA9lf, pCA8'R és a pPT51'R1-3 fragmentumok alkalmazásával a bejuttatott DNS integrálódott a genomba. Így olyan *M. circinelloides* törzseket állítottunk elő, melyek stabilan hordozták és örökítették a bevitt gént.

Elemeztük a transzformánsokban a bejuttatott DNS további sorsát, az integráció helyét és az esetleges genom átrendeződéseket, amivel információkat szolgáltatunk a járomspórás gombák genetikai transzformációja során lezajló folyamatokról. Minden vizsgált MS12+pCA8lf és MS12+pCA8'R transzformáns elemzése azt mutatta, hogy az integráció homológ helyre, azaz a *leuA* gén és az azzal 5' irányban szomszédos régió közé történt, ugyanakkor ektopikus integrációkat detektáltunk a tesztelt MS12+pCA9lf és MS12+pPT51'R3 transzformánsokban. Az IPCR elemzés eredményei több transzformánsban is a bejuttatott DNS több kópiában történt integrációját és/vagy átrendeződését sugallták. A betranszformált *crtW* gén kópiaszámának vizsgálatát qPCR analízissel végeztük. Néhány transzformánsban (pl. MS12+pCA8lf/1-2, MS12+pCA9lf/1 és MS12+pPT51'R3/2) a kópiaszám a 13. tenyésztési ciklus után meglepően magasnak bizonyult. Az MS12+pCA8lf/1 és az MS12+pCA9lf/1 esetében az IPCR analízis eredménye is azt sugallta, hogy a bevitt DNS sok tandem ismétlődő kópiában található egy adott régióban. Ennek ellenére az említett törzsek stabilnak bizonyultak és a karotinoidtermelésükben sem voltak megfigyelhetők szignifikáns ingadozások a további tenyésztések során.

5. Elemeztük a bakteriális *crtW* gént a genomba integráltan hordozó *M. circinelloides* törzsek karotinoidtartalmát. A kantaxantintartalom több transzformánsban jelentősen megnőtt a *crtW* gént autonóm replikálódó plazmidokon hordozó törzsekhez képest. Több olyan mitotikusan stabil törzset sikerült előállítani, melyekben a kantaxantin- és echinenontartalom meghaladta a 100 µg/g[száraz tömeg] mennyiséget és megközelítette a *crtW* donor *Paracoccus* sp. N81106 keto-karotinoid-tartalmát. Igazoltuk ugyanakkor, hogy a karotinoidtermelés nem fokozható korlátlanul a gén kópiaszámának emelésével, mivel egy bizonyos szint után a rendelkezésre álló prekursorok mennyisége, valamint a gombasejt enzimszintézis- és folding-kapacitása korlátozóvá válik. Ezzel egyidejűleg megállapítottuk, hogy a *crtW* gént a genomba integráltan hordozó transzformánsok többségének karotinoidtartalma magasabb, mint az eredeti MS12 törzsé, ami azt jelzi, hogy a keto-származékok képződése stimulálja a karotinoid-bioszintézist. Megállapítottuk, hogy a kantaxantintermelő *M. circinelloides* törzsek magasabb hőmérsékleten is túléltek, mint az elsősorban β-karotint termelő vad típus. Feltételezzük, hogy a kantaxantinnek a membránfluiditásra

és szerkezetre gyakorolt hatása, valamint a β -karotinnál erőteljesebb antioxidáns jellege állhat a jelenség hátterében.

6. Különböző szénforrások tesztelése során a dihidroxi-aceton és az L-aszparaginsav alkalmazása a β -karotin kantaxantinná történő átalakulását eredményezte. Azt feltételezzük, hogy mindkét vegyület elsősorban a *gpd1* promóter indukcióján keresztül fokozta a *crtW* gén transzkripcióját és így járult hozzá a keto-karotinoid-szint emeléséhez. Ez alapján egy olyan tápközeget állítottunk össze (2,5% glükóz, 1% dihidroxi-aceton, 1% pepton; 0,5% élesztőkivonat, 2% agar), melynek alkalmazásával 25 °C-on, állandó megvilágítás mellett tenyésztve, megvalósítható volt a teljes β -karotin - kantaxantin konverzió és a termelt keto-karotinoid-mennyiség megközelítette a vad típusú kantaxantintermelő mikroorganizmusokét (400-500 $\mu\text{g/g}_{[\text{száraz tömeg}]}$ kantaxantin).

7. Sikeresen kifejeztettük a *X. dendrorhous* bazídiumos élesztő asztaxantin bioszintéziséért felelős, a citokróm P450 családba tartozó β -karotin-oxigenázát (CrtS) *M. circinelloides*-ben. A *crtS* gént hordozó transzformánsokban körülbelül kétszeresére emelkedett a hidroxilált β -karotinszármazékok szintje. Igazoltuk, hogy a *crtS* kifejeződése *M. circinelloides*-ben is eredményez asztaxantinképződést. Megállapítottuk, hogy a *M. circinelloides* képes az exogén eredetű CrtS enzim redukciójára, azaz az aktív enzimforma létrehozására, tehát egyetlen gén, a *crtS*, kifejezetése elegendő a *M. circinelloides* karotinoidtermelésének módosításához és nem szükséges ehhez a *X. dendrorhous crtR* gén heterológ kifejeztetése.

4.4. A járomspórás gombák genetikai manipulációjához szükséges transzformációs rendszerek kidolgozása

1. Olyan általánosan felhasználható vektorokat és transzformációs rendszereket dolgoztunk ki, amelyek heterológ gének kifejeztetését teszik lehetővé különböző járomspórás gombákban. A *M. circinelloides* és a *R. miehei* glicerinaldehid-3-foszfát-dehidrogenáz génjeinek promóter és terminális régióira alapozva olyan plazmidokat szerkesztettünk, amelyek a különböző gének nagy hatékonyságú kifejeződését teszik lehetővé járomspórás gombákban. Az *A. nidulans*-ból származó acetamidáz génre alapozva direkt szelekciós rendszert dolgoztunk ki e gombák genetikai transzformációjára. Olyan vektorokat is szerkesztettünk, melyek *A. tumefaciens* közvetítette transzformációra voltak alkalmasak. A létrehozott vektorok segítségével először alkalmaztuk, optimalizáltuk és jellemeztük e módszert több járomspórás gombafaj esetében.

2. A létrehozott általánosan használható vektorokat alkalmaztuk a karotinoid-bioszintézis befolyásolására, a zöld fluoreszcens fehérje kifejeztetésére, extracelluláris enzim (β -glükozidáz) gén heterológ expressziójára többféle járomspórás gombában, pl. *M. circinelloides*-ben, *B. lamprospora*-ban, *G. persicaria*-ban és *R. miehei*-ben.

5. AZ EREDMÉNYEK GYAKORLATI JELENTŐSÉGE

A dolgozatban tárgyalt kutatások során létrehoztunk a Szeged Mikrobiológiai Gyűjteményben egy jellemzett járomspórás gombagyűjteményt. A gyűjtemény tagjainak karotinoid- és egyéb a dolgozatban nem tárgyalt metabolit- (pl. telítetlen zsírsav, extracelluláris enzim) összetételét jellemeztük. Mind a gyűjteményben elhelyezett törzsek, mind a törzsekről rendelkezésre álló információk komoly értéket képviselnek és kiindulópontjai lehetnek új alap- és alkalmazott kutatási irányoknak.

Munkánk során bekapcsolódtunk a Mucoromycotina csoport taxonómiai viszonyainak tisztázását és filogenetikai vizsgálatát célzó nemzetközi kutatásokba. A gombák ősi csoportjainak ilyen irányú vizsgálata jelenleg is folyamatban van, eredményeink ezekben a kutatásokban felhasználhatók. A Mortierellales rend taxonómiai revíziójának és a csoport tagjainak azonosítása jelentőséggel bír a talajból izolálható gombák vizsgálata, valamint a zsírsav- és olajtermelő szervezetek kutatása során.

Létrehoztunk egy karotintúltermelő és új karotinoidok, pl. különböző xantofilok, termelésére képes törzsekből álló mutánsparkot, mely ugyancsak az SZMC gyűjteményben került elhelyezésre. A létrehozott mutánsok és az elkészített transzformánsok további törzsnemesítés alapját képezhetik, távlati célként egyes törzsek biotechnológiai felhasználása is elképzelhető. A kifejlesztett genetikai manipulációs és vizsgálati, valamint analitikai eljárások felhasználhatók más fonalas, különösen járomspórás gombák alapkutatásában és törzsnemesítésében is.

A terpén-bioszintézis genetikai hátteréről szerzett ismeretek a karotinoidtermelés témakörén túl hozzájárulnak a vizsgált gombacsoport alaposabb megismeréséhez olyan alapvető területeken is, mint a morfogenezis, a környezeti változásokra adott válaszok, vagy éppen az apoptotikus folyamatok mechanizmusainak tanulmányozása.

Ezen és más, itt fel nem sorolt eredményeink kiindulópontul szolgáltak a járomspórás gombák további vizsgálatához. Egyebek mellett tovább bővítjük a molekuláris manipuláció eszköztárát, pl. az RNS-alapú géncsendesítés különböző eljárásai, valamint a CRISPR/Cas rendszer alkalmazásának optimalizálása által.

Napjainkban, az említett kutatási célok mellett fokozott figyelemmel fordulunk az opportunistá patogén fonalas gombák kutatása felé. Mivel a terpén-bioszintézisben szerepet játszó gének, különösen a HMG-KoA-reduktázok működése olyan, a patogenitás szempontjából is fontos folyamatokra is hatással van, mint a membránszerkezet fenntartása, a gombaellenes szerekkel szembeni érzékenység, az oxigéntenzio változására adott válasz, vagy az apoptotikus folyamatok szabályozása, a disszertációban ismertetett eredmények és a kapcsolódó vizsgálatok során előállított gombatörzsek jó kiindulópontul szolgálnak és felhasználhatók ezen új kutatási területen is.

6. IDÉZETT IRODALOM

1. Alcazar-Fuoli L, Mellado E *et al.* (2008) *Steroids* 73: 339-347.
2. Appel KF, Wolff AM *et al.* (2004) *Mol Genet Genomics* 271: 595-602.
3. Arnau J, Stroman P (1993) *Mol Gen Genet* 23: 542-546.
4. Avalos J, Limón MC (2015) *Curr Genet* 61: 309-324.
5. Bejarano ER, Cerda-Olmedo E (1992) *FEBS J* 306: 209-212.
6. Bellanger AP, Shirazi F *et al.* (2016) *J Infect Dis* 214:114-121.
7. Berthelot K, Estevez Y *et al.* (2012) *Biochimie* 94: 1621-1634.
8. Bien CM, Espenshade PJ (2010) *Eukaryot Cell* 9: 352-359.
9. Blasco JL, García-Sánchez MA *et al.* (2002) *Res Microbiol* 153: 155-164.
10. Borchsenius F (2007) FastGap 1.0.8. University of Aarhus, Aarhus, Denmark.
11. Burg JS, Espenshade PJ (2011) *Prog Lipid Res* 50: 403-410.
12. Calo S, Nicolás FE *et al.* (2012) *Mol Microbiol* 83: 379-394.
13. Cervantes M, Vila A *et al.* (2013) *PloS One* 8: e69283.
14. Choi HT, Revuelta JL *et al.* (1988) *Gene* 71: 85-95.
15. Csernetics Á, Nagy G *et al.* (2011) *Fungal Genet Biol* 48: 696-703.
16. Das A, Yoon S-H *et al.* (2007) *Appl Microbiol Biotechnol* 77: 505-512.
17. Delbrück M, Reichardt W (1956) In: Cellular Mechanisms in Differentiation and Growth. Rudnick D (ed.), Princeton University Press, Princeton, NJ. pp. 3-44.
18. Dimster-Denk D, Schafer WR *et al.* (1995) *Mol Biol Cell* 6: 59-70.
19. Do CB, Mahabhashyam MS *et al.* (2005) *Genome Res* 15: 330-340.
20. Dufossé L (2006) *Food Technol Biotechnol* 44: 313-321.
21. Edgar RC (2004) *Nucleic Acids Res* 32: 1792-1797.
22. Felsenstein J (2004) Inferring phylogenies. Sinauer Associates, Sunderland, MA, USA, pp 664.
23. Galgóczy L, Nyilasi I *et al.* (2009) *Clin Infect Dis* 49: 483-484.
24. Grabinska K, Palamarczyk G (2002) *FEMS Yeast Res* 2: 259-265.
25. Gutiérrez A, López-García S *et al.* (2011) *J Microbiol Methods* 84: 442-446.
26. Huelsenbeck JP, Ronquist F (2001) *Bioinformatics* 17: 754-755.
27. Ibrahim AS, Skory CD (2007) In: Medical Mycology. Kavanagh K (ed.), John Wiley and Sons, pp. 305-326.
28. Iturriaga EA, Díaz-Mínguez JM *et al.* (1992) *Curr Genet* 21: 215-223.
29. Iturriaga EA, Papp T *et al.* (2005) In: Microbial Processes and Products, Methods in Biothenology series; 18. Barredo JL (ed.) Humana Press, Totowa, pp. 239-256.
30. Iturriaga EA, Velayos A *et al.* (2000) *Biotechnol Bioprocess Eng* 5: 263-274.
31. Janik A, Juchimiuk M *et al.* (2012) In: Glycosylation. Petrescu S (ed.) InTech, <http://www.intechopen.com/books/glycosylation/impact-of-yeast-glycosylation-pathway-on-cell-integrity-and-morphology>.
32. Kim SW, Seo WT *et al.* (1997) *Biotechnol Lett* 19: 557-560.
33. Koncz C, Schell J (1986) *Mol Gen Genet* 204: 383-396.
34. Kuzina V, Cerdá-Olmedo E (2006) *Appl Environ Microbiol* 72: 4917-4922.
35. Kuzina V, Domenech C *et al.* (2006) *Arch Microbiol* 186: 485-493.
36. Lazo GR, Stein PA *et al.* (1991) *Nat Biotechnol* 9: 963-967.
37. Lee PC, Schmidt-Dannert C (2002) *Appl Microbiol Biotechnol* 60: 1-11.
38. Lee SC, Li A *et al.* (2013) *PLoS Pathog* 9: e1003625.
39. Liang PH, Ko TP *et al.* (2002) *Eur J Biochem* 269: 3339-3354.
40. Linnemannstöns P, Prado M *et al.* (2002) *Mol Genet Genomics* 267: 593-602.
41. Livak KJ, Schmittgen TD (2001) *Methods* 25: 402-408.
42. Löytynoja A, Goldman N (2008) *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 10557-10562.
43. Mata-Gómez LC, Montañez JC *et al.* (2014) *Microbial Cell Fact* 13:12.
44. McBride KE, Summerfelt KR (1990) *Mol Biol* 14: 269-276.
45. Mehta BJ, Obratsova IN *et al.* (2003) *Appl Environ Microbiol* 69: 4043-4048.
46. Meussen BJ, de Graaff LH *et al.* (2012) *Appl Microbiol Biotechnol* 94: 875-886.
47. Misawa N, Shimada H (1998) *J Biotechnol* 59: 169-181.
48. Mosqueda-Cano G, Gutierrez-Corona JF (1995) *Curr Microbiol* 31: 141-145.
49. Nagy Á, Vágvolgyi C *et al.* (1994) *Curr Genet* 26: 45-48.
50. Nagy G, Farkas A *et al.* (2014) *BMC Microbiol* 14: 93.
51. Nickerson KW, Atkin AL *et al.* (2006) *Appl Environ Microbiol* 72: 3805-3813.
52. Nicolás FE, Vila A *et al.* (2015) *BMC Genomics* 16: 1.
53. Nyilasi I, Ács K *et al.* (2005) *Folia Microbiol* 50: 415-420.

54. Nyilasi I, Papp T *et al.* (2008) *J Basic Microbiol* 48: 59-64.
55. Obratzsova IN, Prados N *et al.* (2004) *Fung Genet Biol* 41: 168-180.
56. Ochman H, Gerber AS *et al.* (1988) *Genetics* 120: 621-623.
57. Ortiz-Alvarado R, Gonzalez-Hernandez GA *et al.* (2006) *Curr Microbiol* 52: 178-181.
58. Pagel M, Meade A (2006) BayesPhylogenies 1.0. Software. URL: <http://www.evolution.reading.ac.uk/SoftwareMain.html>.
59. Papp T, Cséretics Á *et al.* (2012) In: *Microbial Carotenoids from Fungi, Methods and Protocols, Series: Methods in Molecular Biology*, Vol. 898. Barredo, J-L (ed.) Humana Press, New York. pp. 123-132.
60. Papp T, Cséretics Á *et al.* (2013) *Appl Microbiol Biotechnol* 97: 4937-4950.
61. Papp T, Velayos *et al.* (2006) *Appl Microbiol Biotechnol* 69: 526-531.
62. Posada D (2008) *Mol Biol Evol* 25: 1253-1256.
63. Quiles-Rosillo MD, Ruiz-Vázquez RM *et al.* (2003) *FEMS Microbiol Lett* 222: 229-236.
64. Reyes LH, Gomez JM *et al.* (2014) *Metab Eng* 21: 26-33.
65. Rodríguez-Amaya DB (2001) *A Guide to Carotenoid Analysis in Foods*. Research, ILSI Press, USA.
66. Rodríguez-Sáiz M, Paz B *et al.* (2004) *Appl Environ Microbiol* 70: 5589-5594.
67. Roshan U, Livesay DR (2006) *Bioinformatics* 22: 2715-2721.
68. Roukas T (2016) *Crit Rev Biotechnol* 36: 424-433.
69. Roze LV, Linz JE (1998) *Fungal Genet Biol* 25: 119-133.
70. Schimek C, Wöstemeyer J (2009) *Phycochemistry* 70: 1867-1875.
71. Schweiggert RM, Carle R (2016) In: *Carotenoids: Nutrition, Analysis and Technology*. Baranska M, Kaczor A (eds.) John Wiley and Sons, Chichester, UK, p. 217.
72. Shimodaira H, Hasegawa M (2001) *Bioinformatics* 17: 1246-1247.
73. Skory CD (2004) *Curr Genet* 45: 302-310.
74. Skory CD (2005) *Mol Genet Genomics* 274: 373-383.
75. Staden R, Beal KF *et al.* (2000) *Methods Mol Biol* 132: 115-130.
76. Stamatakis A (2006) *Bioinformatics* 22: 2688-2690.
77. Sun J, Sun XX *et al.* (2012) *Biotechnol Lett* 34: 2077-2082.
78. Swofford DL (2003) PAUP*. Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, MA, USA.
79. Talavera G, Castresana J (2007) *Syst Biol* 56: 564-577.
80. Thompson JD, Gibson TJ *et al.* (2002) *Curr Protoc Bioinformatics* 2.3.1-2.3.22.
81. Torres-Martínez S, Ruiz-Vázquez RM *et al.* (2012) In: *Microbial Carotenoids from Fungi, Methods and Protocols, Series: Methods in Molecular Biology*, Barredo, J-L (ed.) Humana Press, New York. pp. 85-107.
82. Tuli HS, Chaudhary P *et al.* (2015) *J Food Sci Technol* 52: 4669-4678.
83. Umeno D, Tobias AV *et al.* (2005) *Microbiol Mol Biol Rev* 69: 51-78.
84. van Heeswijck R, Roncero MIG (1984) *Carlsberg Res Commun* 49: 691-702.
85. van Laar TA, Lin YH *et al.* (2012) *PLoS One* 7: e38171.
86. Vaupotič T, Veranić P *et al.* (2008) *Stud Mycol* 61: 61-66.
87. Velayos A, Blasco JL *et al.* (2000) *Planta* 210: 938-946.
88. Velayos A, Eslava AP *et al.* (2000) *Eur J Biochem* 267: 1-12.
89. Velayos A, Papp T *et al.* (2003) *Curr Genet* 43: 112-120.
90. Visser H, Sandmann G *et al.* (2005) In: *Microbial Processes and Products, Methods in Biothenology series*; 18. Barredo JL (ed.) Humana Press, Totowa, pp. 257-272.
91. White TJ, Bruns T *et al.* (1990) In: *PCR Protocols: a guide to methods and applications*. Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds.) Academic Press, San Diego, pp 315-322.
92. Yasmin S, Alcazar-Fuoli L *et al.* (2012) *Proc Natl Acad Sci USA* 109: E497-504.
93. Ye VM, Bathia SK (2012) *Biotechnol Lett* 34: 1405-1414.
94. Yuzbashev TV, Larina AS *et al.* (2015) *Fungal Biol* 119: 494-502.
95. Zhao J, Li Q *et al.* (2013) *Metab Eng* 17: 42-50.
96. Zhu Q, Jackson EN (2015) *Curr Opin Biotechnol* 36: 65-72.

7. KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

A dolgozat alapjául szolgáló közlemények:

A megjelenés évének impact faktorával és hivatkozási adatokkal (független idézők száma).

- A.1. Csernetics Á, Nagy G, Iturriaga EA, Szekeres A, Eslava AP, Vágvolgyi C, **Papp T** (2011) Expression of three isoprenoid biosynthesis genes and their effects on the carotenoid production of the zygomycete *Mucor circinelloides*. *Fung Genet Biol* 48: 696-703. **IF: 3,737 Független idéző: 8**
- A.2. Csernetics Á, Tóth E, Farkas A, Nagy G, Bencsik O, Vágvolgyi C, **Papp T** (2015) Expression of *Xanthophyllomyces dendrorhous* cytochrome-P450 hydroxylase and reductase in *Mucor circinelloides*. *World J Microbiol Biotechnol* 31: 321-336. **IF: 1,532 Független idéző: 2**
- A.3. Iturriaga EA, **Papp T**, Breum J, Arnau J, Eslava AP (2005) Strain and culture conditions improvement for b-carotene production in *Mucor*. In: Barredo JL (ed.) *Microbial Processes and Products*. Totowa: Humana Press, pp. 239-256. (Methods in Biothenology series; 18.) **Független idéző: 10**
- A.4. Lukács G, **Papp T**, Nyilasi I, Nagy E, Vágvolgyi C (2004) Differentiation of *Rhizomucor* species on the basis of their different sensitivities to lovastatin. *J Clin Microbiol* 42: 5400-5402. **IF: 3,439 Független idéző: 21**
- A.5. Lukács G, **Papp T**, Somogyvári F, Csernetics Á, Nyilasi I, Vágvolgyi C (2009) Cloning of the *Rhizomucor miehei* 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase gene and its heterologous expression in *Mucor circinelloides*. *Ant Leeuwenhoek* 95: 55-64. **IF: 1,983 Független idéző: 4**
- A.6. Nagy G, Csernetics Á, Bencsik O, Szekeres A, Vágvolgyi C, **Papp T** (2012a) Carotenoid composition of Mucorales fungi. *Afr J Microbiol Res* 6: 7265-7270.
- A.7. Nagy G, Farkas A, Csernetics Á, Bencsik O, Szekeres A, Nyilasi I, Vágvolgyi C, **Papp T** (2014) Transcription of the three HMG-CoA reductase genes of *Mucor circinelloides*. *BMC Microbiol* 14: 93 **IF: 2,729 Független idéző: 1**
- A.8. Nagy LG, Kocsubé S, Csanádi Z, Kovács GM, Petkovits T, Vágvolgyi C, **Papp T** (2012b) Re-mind the gap! Insertion – deletion data reveal neglected phylogenetic potential of the nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) of fungi. *PLOS ONE* 7: e49794. **IF: 3,730 Független idéző: 19**
- A.9. Nagy LG, Petkovits T, Kovács G M, Voigt K, Vágvolgyi C, **Papp T** (2011) Where is the unseen fungal diversity hidden? A study of *Mortierella* reveals a high contribution of reference collections to the identification of fungal environmental sequences. *New Phytol* 191: 789-794. **IF: 6,645 Független idéző: 30**
- A.10. Nyilasi I, Ács K, **Papp T**, Nagy E, Vágvolgyi C (2005) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Mucor circinelloides*. *Folia Microbiol* 50: 415-420. **IF: 0,918 Független idéző: 13**
- A.11. Nyilasi I, **Papp T**, Csernetics A, Vágvolgyi C (2008) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of the zygomycete fungus *Backusella lamprospora*. *J Basic Microbiol* 48: 59-64. **IF: 1,051 Független idéző: 6**
- A.12. **Papp T**, Csernetics Á, Nagy G, Bencsik O, Iturriaga EA, Eslava AP, Vágvolgyi C (2013) Canthaxanthin production with modified *Mucor circinelloides* strains. *Appl Microbiol Biotechnol* 97: 4937-4950. **IF: 3,811 Független idéző: 4**
- A.13. **Papp T**, Csernetics Á, Nyilasi I, Vágvolgyi C, Iturriaga EA (2012) Integration of a bacterial β -carotene ketolase gene into the *Mucor circinelloides* genome by the *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation method. In: Barredo, José-Luis (ed.) *Microbial Carotenoids From Fungi: Methods and Protocols*, Methods in Molecular Biology, Vol. 898. New York: Humana Press, pp. 123-132.
- A.14. **Papp T**, Nyilasi I, Csernetics Á, Nagy G, Takó M, Vágvolgyi C (2016) Improvement of industrially relevant biological activities in Mucoromycotina fungi. In: *Gene Expression Systems in Fungi: Advancements and Applications*. Schmoll M, Dattenböck C (eds.), Springer International Publishing, pp. 97-118.
- A.15. **Papp T**, Vastag M, Michailides TJ, Ferenczy L, Vágvolgyi C (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. **IF: 2,066 Független idéző: 5**
- A.16. **Papp T**, Velayos A, Bartok T, Eslava A, Vágvolgyi C, Iturriaga E (2006) Heterologous expression of astaxanthin biosynthesis genes in *Mucor circinelloides*. *Appl Microbiol Biotechnol* 69: 526-531. **IF: 2,441 Független idéző: 18**

- A.17. Petkovits T, Nagy LG, Hoffmann K, Wagner L, Nyilasi I, Griebel T, Schnabelrauch D, Vogel H, Voigt K, Vágvölgyi C, **Papp T** (2011a) Data partitions, Bayesian analysis and phylogeny of the zygomycetous fungal family Mortierellaceae, inferred from nuclear ribosomal DNA sequences. *PLOS One* 6: e27507. **IF: 4,092 Független idéző: 10**
- A.18. Takó M, Tóth A, Nagy LG, Krisch J, Vágvölgyi C, **Papp T** (2010) A new β -glucosidase gene from the zygomycete fungus *Rhizomucor miehei*. *Ant Leeuwenhoek* 97: 1-10. **IF: 1,673 Független idéző: 12**
- A.19. Vastag M, Kasza Z, Acs K, **Papp T**, Schwab H, Vágvölgyi C (2004) Cloning and sequence analysis of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene from the zygomycetes fungus *Rhizomucor miehei*. *Ant Leeuwenhoek* 86: 111-119. **IF: 2,915 Független idéző: 13**
- A.20. Velayos A, **Papp T**, Aguilar-Elena R, Fuentes-Vicente M, Eslava AP, Iturriaga EA, Alvarez MI (2003) Expression of the *carG* gene, encoding geranylgeranyl pyrophosphate synthase, is up-regulated by blue light in *Mucor circinelloides*. *Curr Genet* 43: 112-120. **IF: 2,168 Független idéző: 19**
- A.21. Wagner L, Stielow B, Hoffmann K, Petkovits T, **Papp T**, Vágvölgyi C, de Hoog GS, Verkley G, Voigt K (2013) A comprehensive molecular phylogeny of the Mortierellales (Mortierellomycotina) based on nuclear ribosomal DNA. *Persoonia* 30: 77-93. **IF: 4,225 Független idéző: 20**
- Összesített impakt faktor: 49,155; összes független hivatkozások száma: 215.**

A dolgozat témájához kapcsolódó további közlemények:

- B.1. Blaskó A, Belágyi J, Dergez T, Deli J, Papp G, **Papp T**, Vágvölgyi C, Pesti M (2008) Effect of polar and non-polar carotenoids on *Xanthophylomyces dendrorhous* membranes by EPR. *Eur Biophys J* 37: 1097-1104. **IF: 2,409 Független idéző: 3**
- B.2. Csernetics Á, Tóth E, Farkas A, Nagy G, Bencsik O, Manikandan P, Vágvölgyi C, **Papp T** (2014) Expression of a bacterial β -carotene hydroxylase in canthaxanthin producing mutant *Mucor circinelloides* strains. *Acta Biol Szeged* 58: 139-146.
- B.3. Galgóczy L, Lukács G, Nyilasi I, **Papp T**, Vágvölgyi C (2010) Antifungal activity of statins and their interaction with amphotericin B against clinically important Zygomycetes. *Acta Biol Hung* 61: 356-365. **IF: 0,793 Független idéző: 6**
- B.4. Galgóczy L, Nyilasi I, **Papp T**, Vágvölgyi C (2009) Are statins applicable for the prevention and treatment of zygomycosis? *Clin Infect Dis* 49: 483-484. **IF: 8,195 Független idéző: 8**
- B.5. Galgóczy L, **Papp T**, Vágvölgyi C (2009) *In vitro* interaction between suramin and fluvastatin against clinically important Zygomycetes. *Mycoses* 52: 447-453. **IF: 1,402 Független idéző: 5**
- B.6. Kotogán A, Kecskeméti A, Szekeres A, **Papp T**, Chandrasekaran M, Kadaikunnan S, Alharbi NS, Vágvölgyi C, Takó M (2016) Characterization of transesterification reactions by Mucoromycotina lipases in non-aqueous media. *J Mol Catal B: Enzym* 127: 47-55 **IF: 2,189 Független idéző: 1**
- B.7. Kotogán A, Németh B, Vágvölgyi C, **Papp T**, Takó M (2014) Screening for extracellular lipase enzymes with transesterification capacity in Mucoromycotina strains. *Food Technol Biotechnol* 52: 73-82. **IF: 0,92 Független idéző: 4**
- B.8. Krizsán K, Bencsik O, Nyilasi I, Galgóczy L, Vágvölgyi C, **Papp T** (2010) Effect of the sesterterpene-type metabolites, ophiobolins A and B, on zygomycetes fungi. *FEMS Microbiol Lett* 313: 135-140. **IF: 2,040 Független idéző: 7**
- B.9. Nagy G, Imre G, Csernetics Á, Petkovits T, Nagy LG, Szekeres A, Vágvölgyi C, **Papp T** (2011) A prenyl pyrophosphate synthase gene from the zygomycete fungus, *Gilbertella persicaria*. *Acta Biol Szeged* 55: 7-12.
- B.10. **Papp T**, Nyilasi I, Csernetics Á, Galgóczy L, Vágvölgyi C (2008) Molecular studies on Zygomycetes fungi causing opportunistic infections. *Rev Med Microbiol* 19: 39-46. **IF: 0,750**
- B.11. Palágyi Z, Linka B, **Papp T**, Vágvölgyi C (2006) Isolation and characterization of *Xanthophyllomyces dendrorhous* mutants with altered carotenoid content. *Acta Aliment* 35: 223-228. **IF: 0,253**

- B.12. Schoch CL, Robbertse B, Kovács GM, Krizsan K, **Papp T**, Petkovits T, Vágvölgyi C, Federhen S [101] (2014) Finding needles in haystacks: linking scientific names, reference specimens and molecular data for Fungi. *Database* 2014: Paper bau061. **IF: 3,372, Független idéző: 12**
- B.13. Schoch CL, Seifert KA, Knapp DG, Kovács GM, Nagy LG, Nyilasi I, **Papp T**, Petkovits T, Vágvölgyi C, Schindel D [156] (2012) Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *PNAS* 109: 6241-6246. **IF: 9,737 Független idéző: 680**
- B.14. Somogyvári F, Vágvölgyi C, **Papp T** (1996) Electrofusion of *Mucor circinelloides* protoplasts. *Biotechnol Tech* 10: 607-610. **IF: 0,558 Független idéző: 4**
- B.15. Takó M, Farkas E, Lung Sz, Krisch J, Vágvölgyi C, **Papp T** (2010) Identification of acid- and thermotolerant extracellular β -glucosidase activities in Zygomycetes fungi. *Acta Biol Hung* 61: 101-110. **IF: 0,793 Független idéző: 5**
- B.16. Vágvölgyi C, Heinrich H, Ács K, **Papp T** (2004) Genetic variability in the species *Rhizopus stolonifer*, assessed by random amplified polymorphic DNA analysis. *Ant Leeuwenhoek* 86: 181-188. **IF: 2,915 Független idéző: 13**
- B.17. Vágvölgyi C, Magyar K, **Papp T**, Palágyi Z, Ferenczy L, Nagy Á (1996) Value of substrate utilization data for characterization of *Mucor* isolates. *Can J Microbiol* 42: 613-616. **IF: 1,184 Független idéző: 5**
- B.18. Vastag M, **Papp T**, Kasza Z, Vágvölgyi C (1998) Differentiation of *Rhizomucor* species by carbon source utilization and isoenzyme analysis. *J Clin Microbiol* 36: 2153-2156. **IF: 3,579 Független idéző: 13**

Összesített impakt faktor: 41,089; összes független hivatkozások száma: 766.

A+B if.: 90,244; Független hivatkozások A+B: 981.

Scientometriaai adatok:

Publikációim összesített impakt faktora: 212,5.

Ebből az első és utolsó szerzőségű publikációk impakt faktora: 84,0.

A publikációkra kapott független hivatkozások száma: 1563.

Hirsch index: 20.

A disszertáció alapját képező dolgozatok impakt faktora 49,155.

A disszertáció alapját képező dolgozatokra kapott független hivatkozások száma: 215.