

OTKA nyilvántartási szám: **F 046658**

A kutatási program címe: **A karotinoid termelés genetikai hátterének vizsgálata genetikailag módosított járomspórás gombák segítségével.**

A kutatás időtartama: **2004.04.01. - 2006.12.31.**

Témavezető: Dr. Papp Tamás

A KUTATÁSI PROGRAM EREDMÉNYEI (SZAKMAI BESZÁMOLÓ)

A kutatási program fő célkitűzései a következők voltak:

- I. Heterológ gének (β -karotin hidroxiláz, β -karotin ketoláz) expressziója *Mucor circinelloides*ben, asztaxantin termelés lehetősége *Mucor*ban**
- II. A karotinoid termelés befolyásolása a mevalonsav bioszintézis út genetikai módosításával (*Mucor circinelloides* genetikai transzformációja HMG-CoA reduktáz és *carG* géneket tartalmazó vektorok segítségével).**
- II. Transzformációs kísérletek egyéb karotintermelő járomspórás gombákkal.**

A kutatási szerződésben a következő konkrét munkafeladatok szerepeltek:

2004.(1. év): **1.** *Mucor gpd1* promóter és terminális régió szabályozása alatt álló *Agrobacterium aurantiacum* asztaxantin bioszintéziséért felelős géneket (*crtW*, *crtZ*) hordozó expressziós vektorok szerkesztése. **2.** *Mucor* β -karotin bioszintézis gének promótereinek kontrollja alatt álló *crtW* és *crtZ* géneket hordozó autoreplikatív és integratív transzformációt biztosító különböző expressziós vektorok szerkesztése. **3.** A konstruált vektorokat felhasználva a transzformációs kísérletek megkezdése *M. circinelloides*szel. **4.** Az asztaxantin bioszintézis géneket hordozó transzformánsok analízisének megindítása: transzkripció kimutatása és vizsgálata; a karotinoid produkció analízise és összehasonlítása a vad típusú törzsek karotinkészletével.

2005. (2. év): **1.** A heterológ expressziós kísérletek folytatása az asztaxantin szintéziséért felelős génekkel *M. circinelloides*ben. A transzformánsokban a bevitt gének kifejeződésének és a karotintermelés további analízise. **2.** A mevalonát út módosítását lehetővé tevő HMG-KoA reduktáz (*HMG*) gént hordozó expressziós vektorok szerkesztésének megkezdése. **3.** Transzformációs kísérletek megkezdése a *HMG* génre alapozott vektorokkal *M. circinelloides*szel. A mevalonát út módosítása. A transzformánsok analízise.

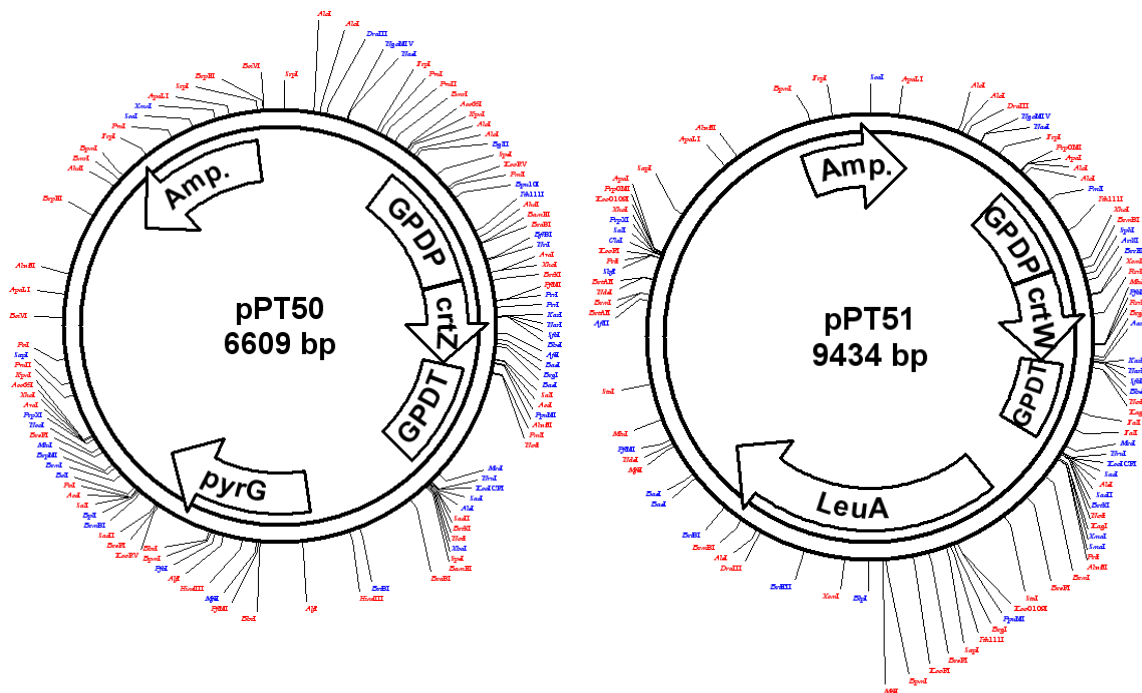
2006. (3. év): **1.** A *HMG* és *carG* génekkel további transzformációs kísérletek az *M. circinelloides* vad típusú és *crtZ* illetve *crtW* géneket hordozó transzformáns törzseivel. A bioszintézis változásának vizsgálata a transzformánsokban. **2.** Egyéb a Mucorales rendbe tartozó gombák, elsősorban *Blakeslea*, *Gilbertella* és *Phycomyces* fajok, vad típusú törzseinek karotinoid termelésének vizsgálata (a termelt karotinoidok összetételének és mennyiségének meghatározása). **3.** Transzformációs kísérletek *Blakeslea*, *Gilbertella* és *Phycomyces* karotintermelő, megfelelő törzseivel.

Eredmények:

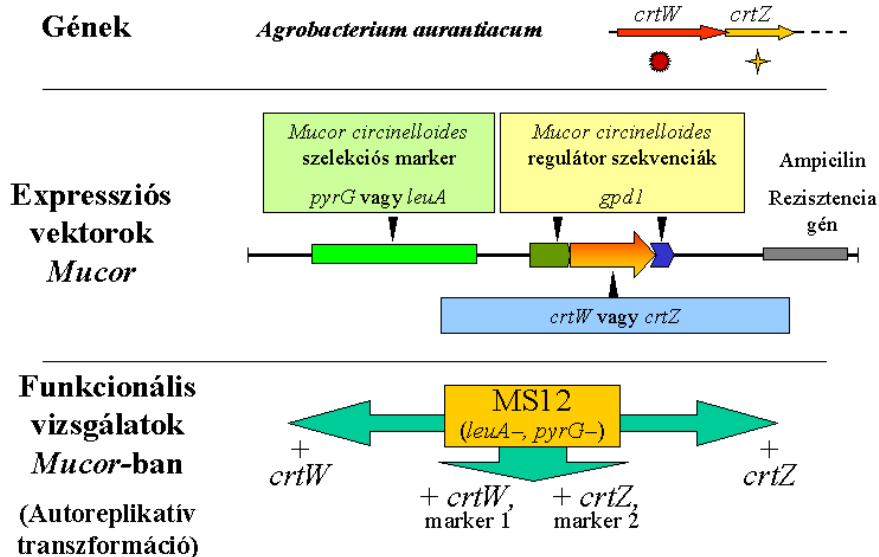
I. Heterológ génexpresszió *Mucor circinelloides*ben, β -karotinból szintetizálódó oxigéntartalmú származékok szintézisének vizsgálata.

Autoreplikatív expressziós vektorokat hoztunk létre, amelyek lehetővé teszik az *Agrobacterium aurantiacum* asztaxantintermelő baktérium β -karotin-asztaxantin átalakulásért felelős génjeinek (β -karotin ketoláz, *crtW* és β -karotin hidroxiláz, *crtZ*) *M. circinelloides*ben történő kifejeződését. Az **1. Ábra** két példát mutat be az elkészített transzformáló vektorokra vonatkozóan, a **2. Ábra** pedig a transzformációs kísérletek stratégiájátszemlélteti ezen plazmidokkal. A bakteriális géneket *Mucor* glicerinaldehid-3-foszfát dehidrogenáz gén (*gpd1*)

szabályozó szakaszaival építettük össze. A létrehozott expressziós vektorokkal, különböző kombinációkban, transzformációs kísérleteket végeztünk.



1. Ábra. A pPT50 és pPT51 vektorok.

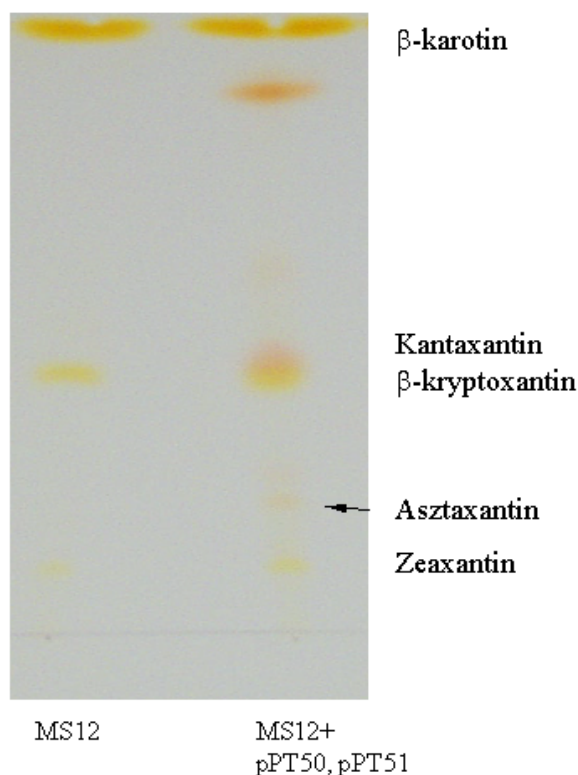


2. Ábra. Az *A. aurantiacum* asztaxantin szintézisért felelős géneket tartalmazó *Mucor* expressziós vektorok szerkesztésének és a transzformációs kísérletek elve (MS12: a *M. circinelloides* karotintermelő, uracil, leucin kettős auxotróf törzse).

A kapott *M. circinelloides* transzformáns törzsek karotintermelését részletesen elemeztük. **Sikerült a β -karotin értékes keto- (asztaxantin, kantaxantin, echinenon) és hidroxiszármazékainak (β -kriptoxantin, zeaxantin) termelődését kiválasztani, illetve fokozni a transzformánsokban (3. Ábra, 1 Táblázat). Ezen eredményekről az *Applied Microbiology and Biotechnology* című folyóiratban számoltunk be:**

Papp, Velayos, Bartók, Eslava, Vágvölgyi, Iturriaga, 2006. Heterologous expression of astaxanthin biosynthesis genes in *Mucor circinelloides*. *Appl. Microbiol.* 69, 526-531.

3. Ábra. Egy *crtW* és *crtZ* hordozó kotranszformáns karotinösszetételének TLC analízise.

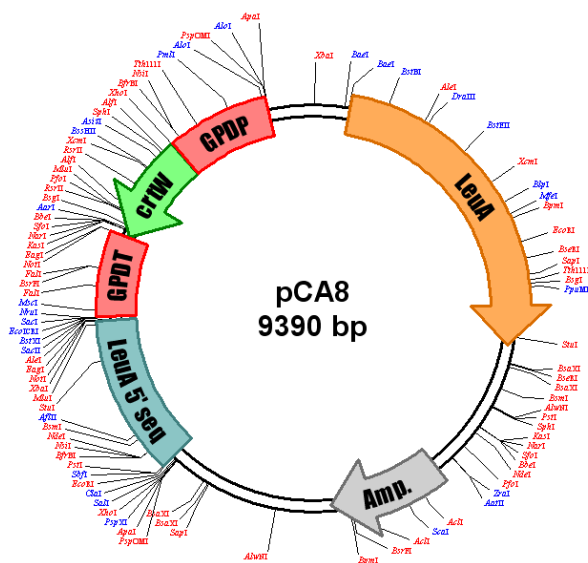


Törzs	Teljes karotinoid	Astaxantin	Kantaxantin	Zeaxantin	β -kriptoxantin	Echinenon	β -karotin
MS12	222.460	-	-	3.897	26.075	-	127.611
MS12-Z	248.654	-	-	9.987	41.038	-	146.325
MS12-W	231.142	2.896	6.034	-	19.673	17.057	155.338
MS12-Z,W	210.023	1.980	13.134	-	31.188	17.201	114.156

1. Táblázat. A transzformánsokban HPLC analízissel mért átlagos karotintermelés szárazsúlyra vonatkoztatva ($\mu\text{g g}^{-1}$).

A munkatervnek megfelelően olyan további vektorokat is szerkesztettünk, amelyek az *A. aurantiacum* génjeinek a *Mucor* genomba történő integrálását teszik lehetővé, ezekben a

vektorokban is a *Mucor gpdI* szabályozó régiói biztosítják az expressziót (**4. Ábra**). Olyan plazmidokat is készítettünk, amelyekben a β -karotin szintézis végső lépéseit felelős aktivitásokat kódoló *carRP* gént, illetve annak szabályozó szakaszait fuzionáltattuk a *crtW* génnel. Ezekkel a plazmidokkal is elvégeztük a transzformációs kísérleteket. Elemeztük a bevitt gének kifejeződésének mértékét a transzformánsokban, illetve vizsgáltuk karotinoid összetételüket, valamint a produkció mértékét. Ugyan sikerült megváltozott karotintermelésű, transzformáns törzseket előállítani, azonban az általuk termelt karotinszármazékok (az asztaxantin és a kantaxantin) mennyisége nem haladja meg a korábban autoreplikatív vektorokkal előállított törzsek produkciójának mértékét. Jelenleg olyan kísérleteket végzünk, ahol a munkaterv további pontjai szerint (rekombináns technikákkal) előállított β -karotint túltermelő törzseket transzformálunk az eddig konstruált expressziós vektorokkal. Emellett további, erősebb expressziót lehetővé tevő integratív vektorokat is szerkesztünk. Ezek a kísérletek befejező szakaszukba jutottak, reményeink szerint eredményeinket a 2007-es év folyamán publikáljuk.



4. Ábra. A bakteriális *crtW* gén *Mucor* genomba történő beépülését lehetővé tevő egyik konstrukció. A plazmid a leucin auxotrófiát komplementáló *Mucor leuA* gént hordozza szelekciós markerként. Az integráció a *Mucor leuA* és az azzal 5' irányban szomszédos régió között, kettős rekombinációval valósul meg. A bakteriális gén expresszióját a *Mucor gpdI* gén szabályozó régiói teszik lehetővé.

II. A karotinoid termelés befolyásolása a mevalonsav és az izoprén bioszintézis út genetikai módosításával.

A mevalonsav-izoprén bioszintézis utak módosítását célzó kísérletekkel a *M. circinelloides* β -karotin termelésének fokozását kívántuk megvalósítani. Számos a mevalonsav és az izoprén út különböző kulcsenzimeinek géndózis hatásán alapuló túlműködtetését lehetővé tevő expressziós vektort készítettünk, melyekkel genetikai transzformációs kísérleteket végeztünk.

E munka keretében:

1. Részletesen jellemeztük a kutatási program előzményeként általunk izolált *Rhizomucor miehei* HMG-KoA reduktáz gént (*hmg*). Az izolált gén expressziós analízisét is elvégeztük, valamint kidolgoztunk egy erre a génre alapozott, direkt szelekciót biztosító transzformációs rendszert.

Vágvölgyi, Cs., Lukács, Gy., Nyilasi, I. and Papp, T. (2004) Development of a lovastatin resistance-based transformation system for *Rhizomucor miehei*. *Clin. Microbiol. Inf.* 10(S3), 507.

Lukács 2005. Isolation and characterization of the gene encoding 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase (HMG-CoA reductase) of *Rhizomucor miehei*. *Acta Biol. Szeged* 49: 51.

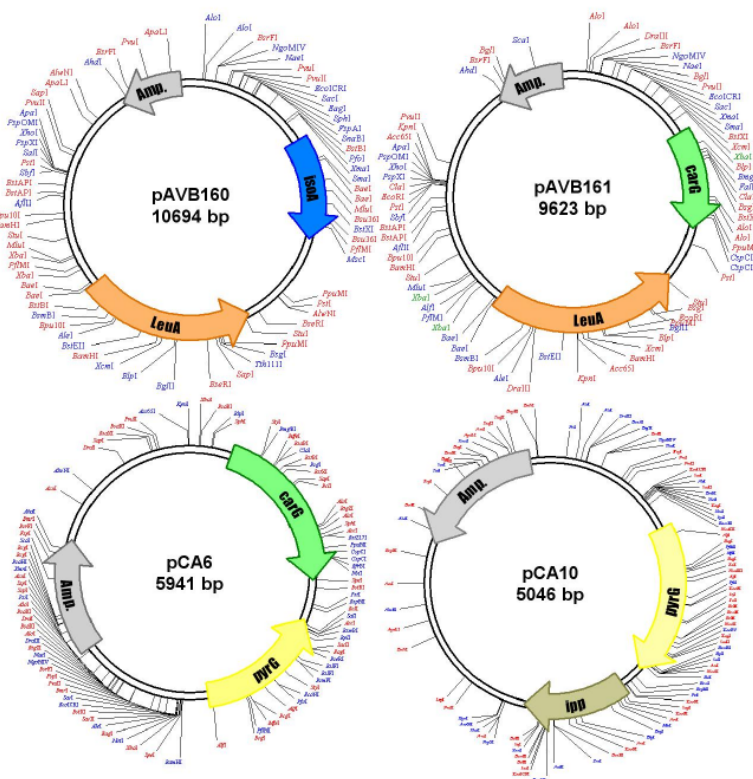
Készítettünk a *hmg* gént hordozó transzformáló vektorokat, melyekben a *hmg* a saját, vagy *Mucor* szabályozó régiók kontrollja alatt áll.

2. Izoláltuk a *M. circinelloides* izopentenil pirofoszfát izomeráz génjét (*McIpp*), mely az izoprén bioszintézis út egyik kulcslépését katalizálja. A gént *M. circinelloides* cDNS génkönyvtár szűrésével azonosítottuk. A teljes gén és határoló szakaszainak nukleotid-sorrendjét inverz PCR technikával határoztuk meg, majd az azonosított szakaszt felszaporítottuk és plazmidba klónoztuk. Meghatároztuk a megfelelő fehérje aminosav-sorrendjét, valamint elvégeztük a gén részletes szekvenencia- és funkcionális elemzését is.

Papp, Iturriaga, Csernetics, Molina, Álvarez, Eslava, Vágvölgyi 2006. Cloning and analysis of the IPP (isopentenyl pyrophosphate isomerase)-coding gene of *Mucor circinelloides*. 8th European Conference on Fungal Genetics, Bécs, Ausztria.

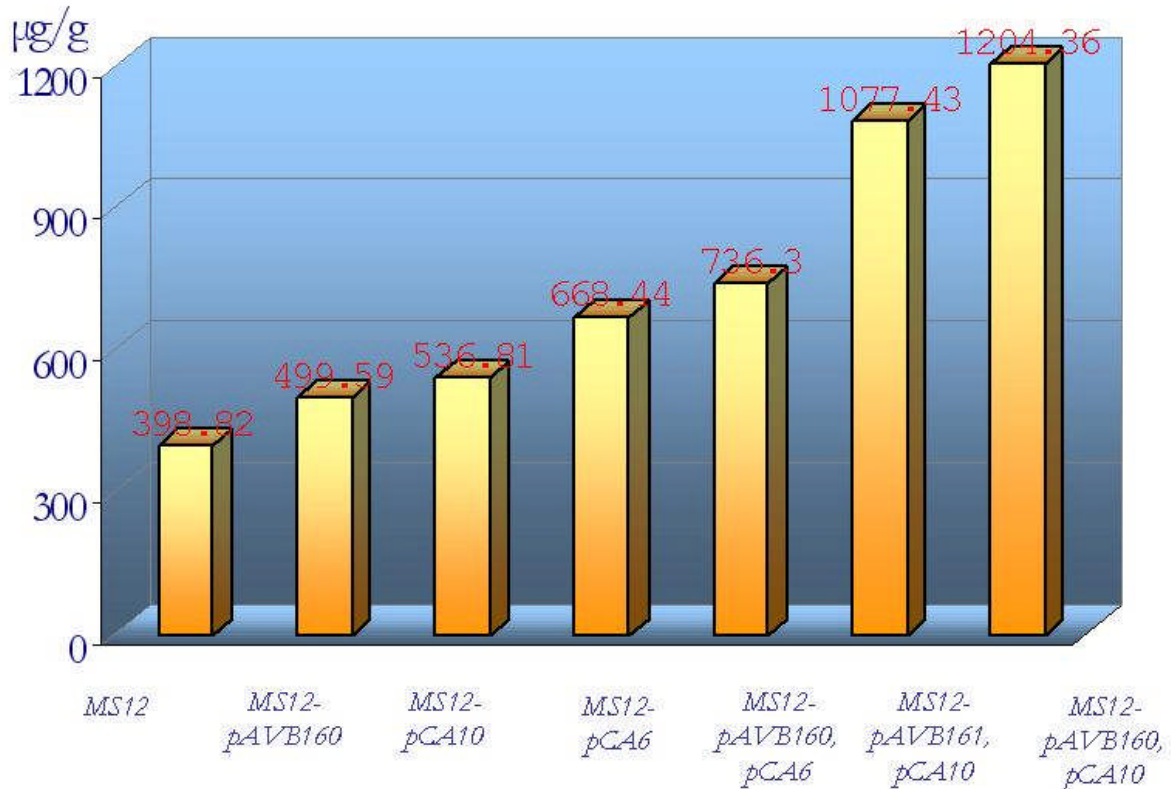
Szerkesztettünk továbbá olyan transzformáló vektorokat is, amelyek az *McIpp* gént hordozzák és alkalmasak az önálló és a többi vizsgált gént hordozó vektorral kombinált bevitelre is. Reményeink szerint ezen kutatási eredményeinket még az idén szakfolyóiratban is publikáljuk.

3. A mevalonát-izoprén bioszintézis út gendózis hatásán alapuló túlműködtetésével különböző karotintultermelő *M. circinelloides* törzseket hoztunk létre. Számos az izoprénbioszintézis módosítását lehetővé tevő expressziós vektort készítettünk (Az 5. Ábra 4 ilyen vektort mutat be), az általunk izolált *hmg* és *McIPP*, valamint a *Mucor* farnezil pirofoszfát szintáz (*isoA*) és a geranilgeranil pirofoszfát szintáz (*carG*) génekre alapozva.



5. Ábra. 4 példa az izoprén bioszintézis enzimeit kódoló gének kópiszámnövelése érdekében előállított vektorokra.

Tanulmányoztuk a bioszintézis út módosításának hatását a karotintermelésre. Expressziós vizsgálatokat végeztünk az egyes, részletesen analizált struktúrgénekekkel, valamint különböző génkombinációkkal, különböző szabályozó szekvenciák alkalmazásával. A gének kópiaszám növelését külön-külön és minden lehetséges kombinációban elvégeztük. A transzformánsok karotin összetételének HPLC analízise alapján elmondható, hogy az egyes géneket önállóan alkalmazva ezen módszerrel – géntől és vektortól függően – mintegy másfél-kétszeresére növelhető az összkarotinoid produkció. Megfelelő génkombinációk bevitelével azonban, az általunk előállított törzsekben, több mint háromszorosára sikerült a β -karotin tartalmat emelni az eredeti vad típusú törzshöz képest (6. Ábra).



6. Ábra. Különböző autoreplikatív vektorkonstrukciókkal kapott transzformánsok. Az egyes konstrukciók a következő géneket tartalmazzák: pAVB160: *isoA*, pAVB161: *carG*; pCA6: *carG*; pCA10: *McIPP*.

Vizsgáltuk a karotintermelés fokozására alkalmas tenyésztési és fermentációs körülményeket, valamint a kutatási program során, a transzformációs kísérletek eredményeképpen összegyűlt ismeretek alapján megkezdtük az izoprén bioszintézis gének, valamint a *hmg* gén karotintermelésre gyakorolt hatásának, valamint a termelés fokozására való felhasználhatóságának összehasonlító elemzését.

E munka eredményeiről több nemzetközi konferencián is beszámoltunk.

Papp, Csernetics, Iturriaga, Eslava, Vágvölgyi 2005. Production of β -Carotene with genetically modified *Mucor circinelloides* strains. 12th European Congress of Biotechnology, Koppenhága, Dánia, *J. Biotechnol.* 118(S1), 153

Csernetics, Papp, Velayos, Iturriaga, Eslava and Vágvölgyi 2005. Carotene production with genetically modified *Mucor circinelloides* strains. 1st Central European Forum for Microbiology, Keszthely, Magyarország, *Acta Microbiol. Hung.* 52(S), 22

Papp, Iturriaga, Csernetics, Eslava, Vágvölgyi 2006. Improvement of the carotene production in *Mucor circinelloides*. *Acta Microbiol. Hung.* 53, 328.

Ebből a munkából jelenleg egy további közlemény áll összeállítás alatt, melyet szintén az év során szándékozunk publikálni. A járomspórás gombák karotintermelésének befolyásolására, új törzsek előállítására vonatkozó eredményeink egy részét és ismereteinket egy „review” jellegű könyvfejezetben is publikáltuk:

Iturriaga, Papp, Breum, Arnau, Eslava, 2005. Strain and culture conditions improvement for b-carotene production in *Mucor*. In: *Microbial Processes and Products*, Methods in Biothenology series – Vol. 18 (ed. Barredo), Humana Press.

III. A transzformációs kísérletek kiterjesztése egyéb karotintermelő járomspórás gombákra.

1. Mivel a járomspórás gombák közül csak néhánynak ismerjük a részletes karotinoid összetételét, **nagyszámú törzs bevonásával mintegy 20**, a *Mucor*, *Blakeslea*, *Backusella*, *Gilbertella* nemzetségekbe tartozó, **járomspórás gombafaj karotinoid összetételét és termelőképességét elemeztük**. Vizsgáltuk a különböző környezeti feltételek (fény, hőmérséklet, szénforrás) hatását is a karotinoid produkcióra. Sikerült az eddigi modellorganizmusokhoz képest eltérő karotinösszetételű, illetve intenzívebb termelő törzseket azonosítani. **Több igen nagy produkcióra képes törzset találtunk, köztük olyanokat is, amelyek viszonylag nagy mennyiségben termelik az értékes zeaxanthint és β -kriptoxanthint**. Ezen vizsgálatokról egy hazai konferencián számoltunk be:

Csernetics, Papp, Barta, Vágvölgyi 2006. Carotenoid production of different Zygomycetes fungi *Acta Microbiol. Hung.* 53, 255-256.

2. Az új termelő törzsek genetikai módosításának lehetővé tétele érdekében megkezdtük ezen, eddig ilyen munkákra egyáltalán nem használt törzsekre optimalizált transzformációs rendszerek kiépítését és markerezett mutánsok (auxotróf törzsek) létrehozását.

Többféle, direkt szelekciót biztosító rendszert is kiépítettünk. Az egyik ilyen az általunk klónozott *Rhizomucor* HMG-CoA redukáz gént (*hmg*) tartalmazza, itt a géndózis hatás elvére és a transzformálandó törzsek lovastatin (a HMG-CoA redukáz kompetitív gátlója) érzékenységére alapozott transzformáció valósítható meg.

Lukács, Papp, Nyilasi, Nagy, Vágvölgyi, 2004. Differentiation of *Rhizomucor* species on the basis of their different sensitivities to lovastatin. *J. Clin. Microbiol.* 42, 5400-5402.

Vágvölgyi, Lukács, Nyilasi, Papp, 2004. Development of a lovastatin resistance-based transformation system for *Rhizomucor miehei*. *Clin. Microbiol. Inf.* 10(S3), 507.

Továbbá több karotintermelő fajra (többek közt *M. circinelloides*, *Backusella lamrospora*, *Gilbertella persicaria*) kidolgoztunk higromicin B rezisztencián, valamint az *Aspergillus* acetamidáz gén bevitelén alapuló direkt szelekciós módszereket.

Ugyancsak kidolgoztunk egy a *M. circinelloides* integratív transzformációját lehetővé tevő *Agrobacterium tumefaciens* közvetítette transzformációs rendszert.

Nyilasi, Ács, Papp, Vágvölgyi, 2005. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Mucor circinelloides*. *Folia Microbiol.* 50, 415-420.

Ezt a transzformációs eljárást sikerült úgy optimalizálni, hogy a járomspórás gombák közt általánosan használható módszerré váljon.

Nyilasi, Papp, Nagy, Vágvölgyi 2006. Applicability of the *Agrobacterium*-mediated transformation in Zygomycetes. *Acta Microbiol. Hung.* 53, 324-325.

Jelenleg e transzformációs technika felhasználásával állítunk elő karotintúltermelő törzseket *Mucor*, *Gilbertella* és *Backusella* törzsekből.

IV. Egyéb eredmények

1. A karotinoidok HPLC analízisével kapcsolatos metodológiai eredményeinkből egy kézirat áll elbírálás alatt (Bartók, Papp, Vágvölgyi, 2005. High-pressure liquid chromatography – atmospheric pressure photoionization mass spectrometry as a useful tool for the determination of carotenoids. *J. Chromatography*, submitted), egy további pedig összeállítás alatt áll.

2. A járomspórás gombák karotintermelésének vizsgálata, a mutánsok előállítása során szerzett tapasztalatokat más karotinoidtermelő gombákkal (pl. *Xanthophyllomyces*) kapcsolatos kutatásainkban is sikerrel fel tudtuk használni:

Palágyi, Papp, Takó, Nagy, Pesti, Vágvölgyi, 2004. Genetic variability of astaxanthin-producing yeasts: random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis of *Phaffia rhodozyma* and *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Acta Biol. Szeged.* 48,35-38.

Vágvölgyi, Lukács, Takó, Csernetics, Papp 2005. The effect of vegetable oils on astaxanthin production of *Phaffia rhodozyma* and *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *J. Biotechnol.* 118(S1), 153.

Lukács, Kovács, Papp, Vágvölgyi 2005. The effect of vegetable oils on carotenoid production of *Phaffia rhodozyma*. *Acta Microbiol. Hung.* 52, 267.

Palágyi, Linka, Papp, Vágvölgyi 2006. Isolation and characterization of *Xanthophyllomyces dendrorhous* mutants with altered carotenoid content. *Acta Aliment. Hung.* 35, 223-228.

Összefoglalva a fentieket, elmondható, hogy a kitűzött célokat megvalósítottuk. A kutatási program eredményeként:

Mintegy húsz megváltozott karotinösszetételű (asztaxantin és/vagy kantaxantin termelésre képes), illetve karotin (β -karotin, zeaxantin, β -kriptoxantin) túltermelő *M. circinelloides* törzset állítottunk elő és jellemeztünk részletesen. Több eljárást dolgoztunk ki járomspórás gombák genetikai módosítására, valamint létrehoztunk egy módosított karotinoid termelésű mutánsparkot. Az eredmények felhasználhatók a további alap- és alkalmazott kutatásokban (ipari termelő törzsek kifejlesztése).

Azonosítottuk és részletesen jellemeztük a *Rhizomucor miehei* HMG-KoA reduktáz, valamint a *Mucor circinelloides* izopentenil pirofoszfát izomeráz génjét.

Nagyszámú, a karotintermelés módosítását lehetővé tevő transzformációs vektort készítettünk, melyek a további törzsnemesítésben felhasználhatók.

20 járomspórás gombafaj különböző törzseinek karotintermelését elemeztük különböző környezeti feltételek (fény, hőmérséklet, szénforrás) mellett. Több új, nagy karotinoid produkcióra képes, illetve új karotinösszetételű törzset azonosítottunk, melyek a további munkákban felhasználhatók. A *M. circinelloides* genetikai transzformációja során alkalmazott technikák, vektorok, gének ezeknél a gombáknál is alkalmazhatók.

Új, a későbbi alap- és alkalmazott kutatásokban is felhasználható eljárásokat, protokollokat dolgoztunk ki elsősorban a járomspórás gombák genetikai transzformációjára, a karotin termelés körülményeire (tenyésztés, fermentáció) és a termelés fokozására vonatkozóan.

Noha a kutatási szerződésben vállalt feladatokat teljesítettük, az eredmények egy részének publikálása áthúzódott a 2007. évre. Ugyanakkor fontos megemlíteni, hogy az OTKA pályázat keretében megvalósított kutatást – elsősorban a túltermelő mutánsok előállítását és jellemzését – folytatni szándékozunk elsősorban szélesebb, konzorciális keretek közt. Ehhez segítséget nyújtanak azok a nemzetközi együttműködések, melyek épp a jelen kutatási program megvalósítása során és a támogatás segítségével mélyültek el. Ezek közül is ki kell emelnünk Arturo Perez Eslava professzor (Salamanca Egyetem, Spanyolország) kutatócsoportját, amely a járomspórás gombák (azon belül is a karotinoid bioszintézis) kutatásának egyik legelismertebb csoportja Európában.