

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 ( $\beta$ -karotin hidroxiláz,  $\beta$ -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 bioszintézisért felelős géneket (*crtW*, *crtZ*) hordozó expressziós vektorok szerkesztése. **2.** *Mucor*  $\beta$ -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 szintézisért 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.

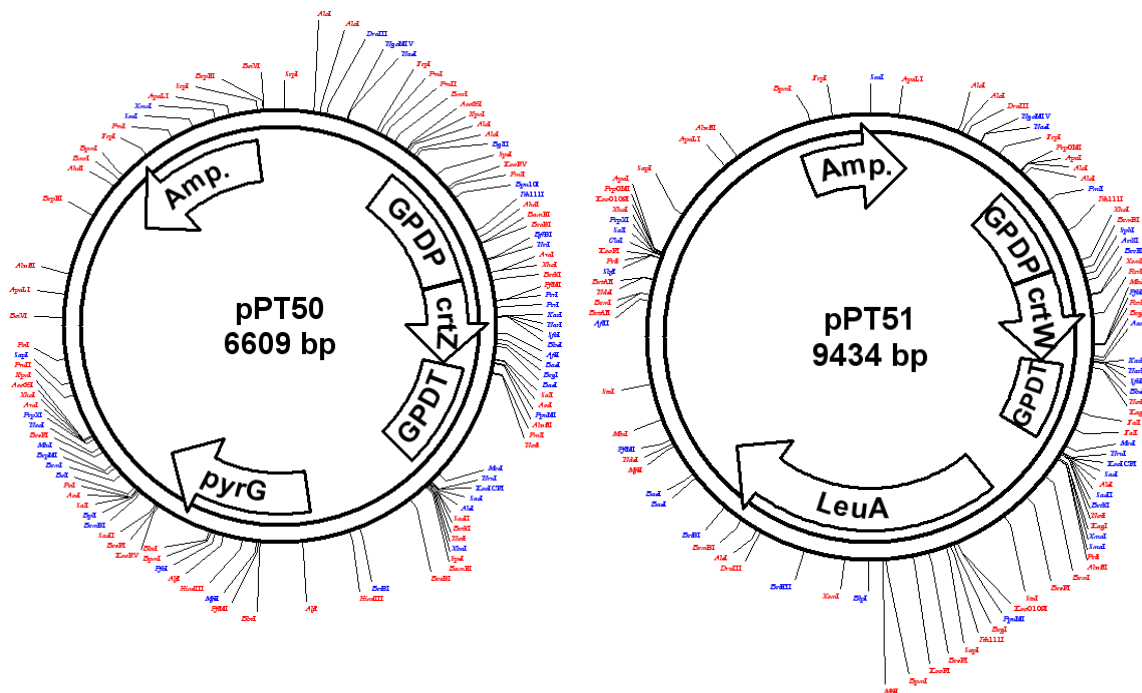
**2006. (3. év):** **1.** A *HMG* és *carG* génekkel további transzformációs kísérletek az *M. circinelloides* vad típusú és *crtZ* illetve *crtW* géneket hordozó transzformáns törzseivel. A bioszintézis változásának vizsgálata a transzformánsokban. **2.** Egyéb a Mucorales rendbe tartozó gombák, elsősorban *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:**

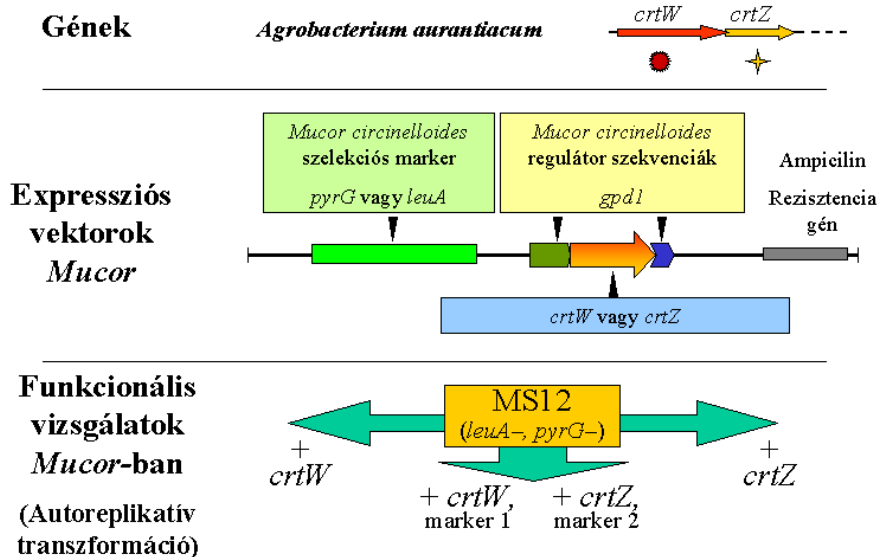
##### ***I. Heterológ génexpresszió *Mucor circinelloides*ben, $\beta$ -karotinból szintetizálódó oxigéntartalmú származékok szintézisének vizsgálata.***

Autoreplikatív expressziós vektorokat hoztunk létre, amelyek lehetővé teszik az *Agrobacterium aurantiacum* asztaxantintermelő baktérium  $\beta$ -karotin-asztaxantin átalakulásért felelős génjeinek ( $\beta$ -karotin ketoláz, *crtW* és  $\beta$ -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.

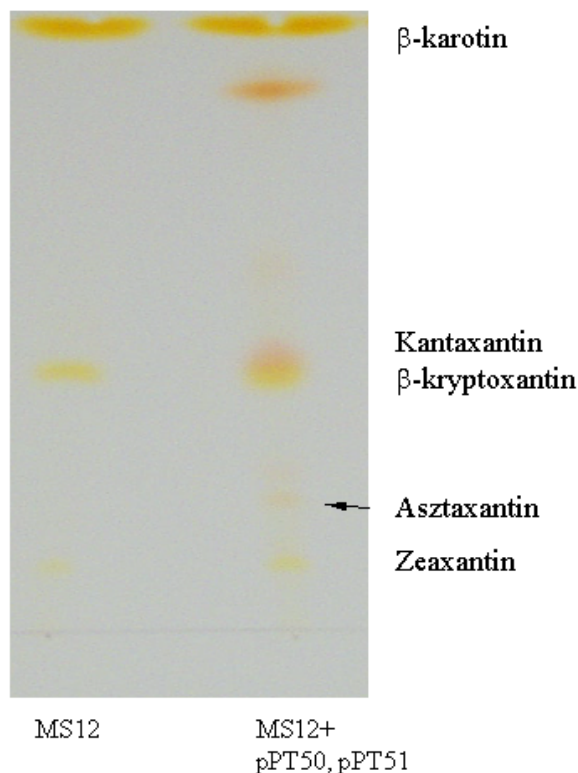


2. Ábra. Az *A. aurantiacum* asztaxantin szintéziséért felelős géneket tartalmazó *Mucor* expressziós vektorok szerkesztésének és a transzformációs kísérletek elve (MS12: a *M. circinelloides* karotintermelő, uracil, leucin kettős auxotróf törzse).

A kapott *M. circinelloides* transzformáns törzsek karotintermelését részletesen elemeztük. **Sikerült a  $\beta$ -karotin értékes keto- (asztaxantin, kantaxantin, echinenon) és hidroxiszármazékainak ( $\beta$ -kriptoxantin, zeaxantin) termelődését kiválatni, 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.

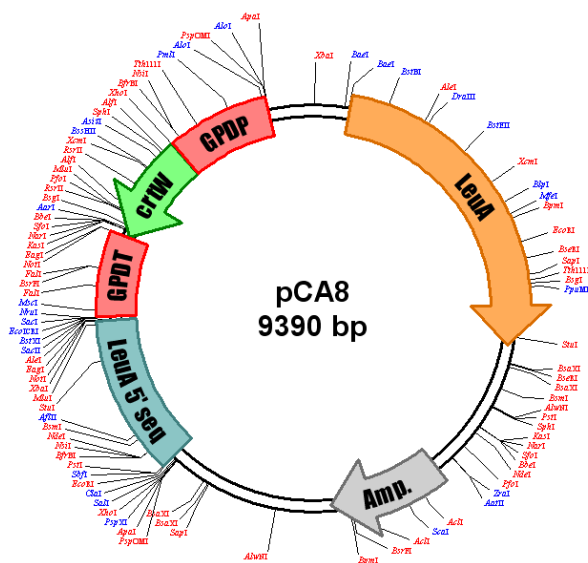


| Törzs    | Teljes karotinoid | Astaxantin | Kantaxantin | Zeaxantin | $\beta$ -kriptoxantin | Echinenon | $\beta$ -karotin |
|----------|-------------------|------------|-------------|-----------|-----------------------|-----------|------------------|
| MS12     | 222.460           | -          | -           | 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  $\beta$ -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  $\beta$ -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*  $\beta$ -karotin termelésének fokozását kívántuk megvalósítani. Számos a mevalonsav és az izoprén út különböző kulcsenzimeinek géndózis hatáson 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.

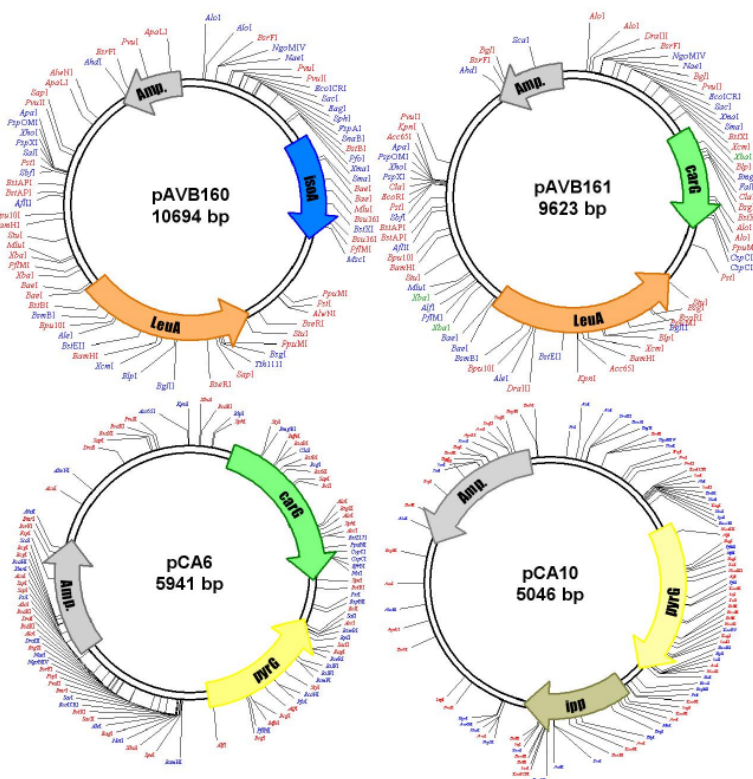
Készítettünk a *hmg* gént hordozó transzformáló vektorokat, melyekben a *hmg* a saját, vagy *Mucor* szabályozó régiók kontrollja alatt áll.

**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 szekvencia- 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.

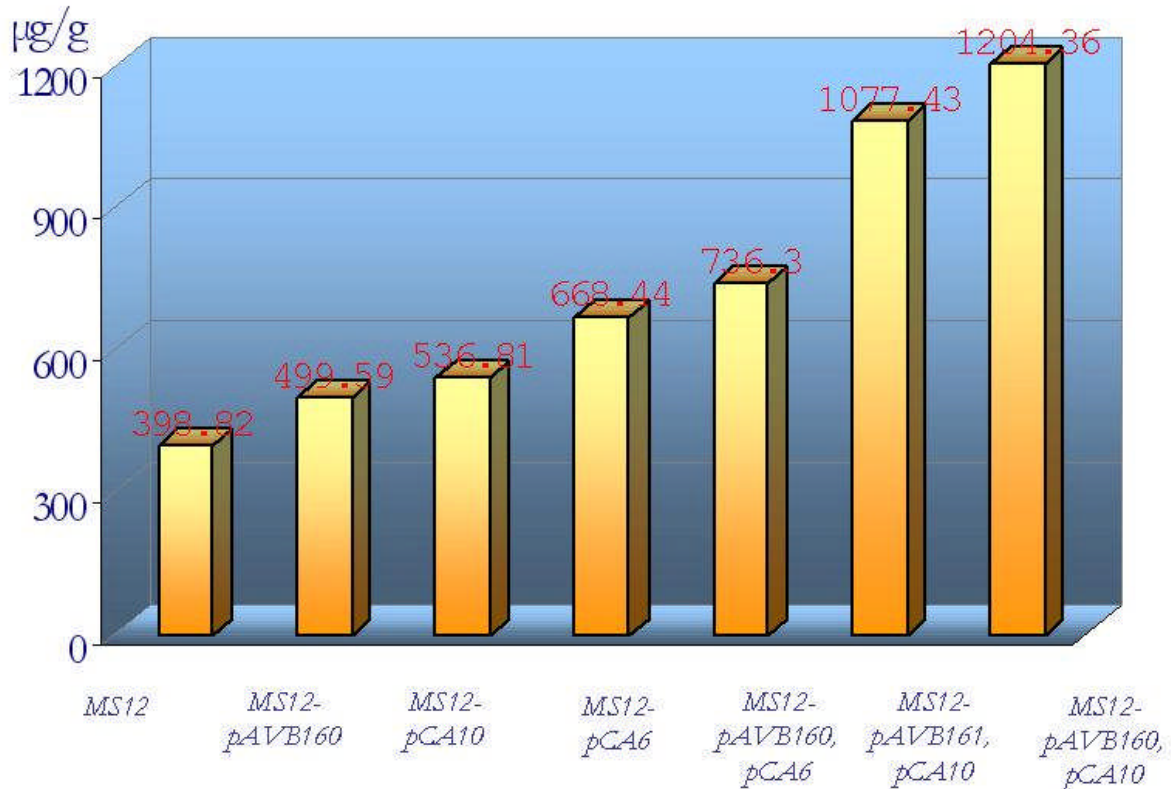
Szerkesztettünk továbbá olyan transzformáló vektorokat is, amelyek az *McIpp* gént hordozzák és alkalmasak az önálló és a többi vizsgált gént hordozó vektorral kombinált bevitelre is. Reményeink szerint ezen kutatási eredményeinket még az idén szakfolyóiratban is publikáljuk.

**3. A mevalonát-izoprén bioszintézis út gendózis hatásán alapuló túlműködtetésével különböző karotintúltermelő *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  $\beta$ -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  $\beta$ -Carotene with genetically modified *Mucor circinelloides* strains. 12<sup>th</sup> 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. 1<sup>st</sup> 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  $\beta$ -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) érzékenységre 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 ( $\beta$ -karotin, zeaxantin,  $\beta$ -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 szándékozzuk 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 (Salamancai Egyetem, Spanyolország) kutatócsoportját, amely a járomspórás gombák (azon belül is a karotinoid bioszintézis) kutatásának egyik legelismertebb csoportja Európában.