

B 6547

**AZ ELSŐ EUKARIÓTA NIKOTINSAV LEBONTÁSI
ÚTVONAL FELDERÍTÉSE *ASPERGILLUS NIDULANS*-BAN**

DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

BOKOR ESZTER

TÉMAVEZETŐ:

DR. HAMARI ZSUZSANNA

EGYETEMI DOCENS



**SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM
TERMÉSZETTUDOMÁNYI ÉS INFORMATIKAI KAR
MIKROBIOLÓGIAI TANSZÉK
BIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA**



SZEGED

2019

Bevezetés

Annak ellenére, hogy a természetben számos mikroorganizmus képes a nikotinsavat (NA) nitrogénforrásként hasznosítani, a lebontás folyamatát eddig csak prokarióták esetében tanulmányozták. Eukariótákban teljesen ismeretlen a katabolizmus folyamata annak ellenére, hogy az *Aspergillus nidulans*-ról már az 1970-es évek óta tudják, hogy képes a NA hasznosítására és jellemezték a lebontási út első lépését végző enzimet, a PHII-t (későbbiekben HxnS), valamint NA-at nem hasznosító mutánsokat izoláltak. A PHII megismerése érdekes módon a purin hasznosítási útvonal vizsgálatához kapcsolódik. A purin hasznosítási útvonalban szereplő *hxA* gén termékéről, a purin hidroxiláz I (PHI) enzimről régóta ismert, hogy képes a hipoxantint (Hx) xantinná, majd a xantint húgysavvá alakítani. A *hxA* génre nézve mutáns törzsek elemzése során fedezték fel a PHII enzimet, amely szintén képes a Hx-t xantinná alakítani, azonban a xantin→húgysav átalakításra képtelen. A vizsgálatok során kiderítették, hogy a PHII enzim a Hx mellett a NA-at is képes szubsztrátként hasznosítani és azt 6-hidroxi-nikotinsavvá (6-NA) alakítani. A 2000-es években kutatócsoportunk megkezdte az első eukarióta NA lebontási útvonal felderítését *A. nidulans* modellszervezetben. Kísérleteink során azonosítottuk a PHII enzimet kódoló *hxnS* gént (AN9178), valamint a lebontási útvonal transzkripciós faktorának génjét, a *hxnR*-t (AN11197). Az ezekkel szomszédos gének vizsgálata során további négy olyan gént (*hxnT*, *hxnY*, *hxnP* és *hxnZ*) találtunk, amelyek a *hxnS*-hez hasonlóan a *hxnR* gén szabályozása alatt állnak és kifejeződésük a NA-tól és annak downstream származékaitól függ. A felfedezett hat génből álló klasztert NDC1-nek neveztük el. Munkánk során az NDC1 klaszterbe tartozó génekre nézve deléciós mutánsokat hoztunk létre, melyek különböző nitrogénforrásokon végzett növekedési tesztjei alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy további, még ismeretlen gének is részt vesznek a NA lebontásának folyamatában.

Célkitűzések

- Az 1970-es években izolált *hxn6* mutáns törzs *A. nidulans* génbank transzformálásával célul tűztük ki további, NDC1 klaszteren kívüli, NA hasznosításban részt vevő gén(ek) azonosítását.
- Célul tűztük ki az azonosított új gén(ek) és a szomszédos gének regulációjának vizsgálatát kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakcióval (RT-qPCR) történő transzkriptum analízissel vad típusú törzsben és *hxnR* funkcióvesztéses mutánsban nem indukált és 6-NA-val indukált körülmények között. Az NDC1 génekkel mutatott koreguláció esetén a vizsgálat igazolja az új gén(ek) NA katabolikus útvonalhoz való tartozását, valamint a vizsgálat szomszédos génekre történő kiterjesztése lehetőséget nyújt egy új génklaszter azonosítására.
- A genom adatbázisokban elérhető gombagenomok összehasonlító *in silico* elemzésével vizsgálni kívántuk az NDC1 klaszter génjeinek és az új gén(ek) kromoszóma lokalizációs mintázatát (szinténia vizsgálat) evolúciós összefüggések feltárása céljából.
- Amennyiben az azonosított új gén(ek) regulációja összhangban van az NDC1 klaszter génjeivel, akkor a szóban forgó gén(ek) kiütésével deléciós mutáns(ok) előállítását terveztük, amely(ek) növekedési tesztjei bizonyíthatják, hogy a deletált gén(ek) terméke valóban a katabolikus útvonalban szerepel. A növekedési tesztet NA-at és a kereskedelemben forgalmazott származékait tartalmazó táptalajok bevonásával terveztük elvégezni.
- Mivel a *hxnTA* és *hxnYA* mutánsok növekedési tesztjei (Ámon, 2018) azt sugallták, hogy a NA lebontás nem egyetlen útvonalból áll, hanem alternatív útvonalak vesznek benne részt, célul tűztük ki a *hxnS*, *hxnT* és *hxnY* génekre nézve dupla- és tripla deléciós mutánsok létrehozását és ezek nitrogénforrás hasznosítási képességének vizsgálatát. A halmozottan deléciós mutánsok a

HxnT és HxnY útvonalban betöltött szerepének tisztázásához is hozzájárulnak majd.

- Célul tűztük ki, hogy mielőtt *in silico* fehérje elemzést végzünk, kísérletes úton meghatározzuk az újonnan azonosított gén(ek) cDNS szekvenciáját és összehasonlítjuk a génbank által feltételezett cDNS szekvenciával.
- Célul tűztük ki továbbá az új gén(ek) által kódolt fehérje(ék) lehetséges funkcióinak feltárását *in silico* elemzéssel.
- További célkitűzésünk annak felderítése volt, hogy a katabolikus útvonal milyen intracelluláris térben zajlik. Ezt a lebontási útvonal már ismert és újonnan azonosított további génjeinek zöld fluoreszcens fehérjével (GFP) történő fúziójával és a fúziós fehérjét kifejező törzsek mikroszkópos vizsgálatával terveztük végrehajtani.
- Továbbá célul tűztük ki, hogy gázkromatográffal kapcsolt tömegspektrometria (GC-MS) és folyadékkromatográffal kapcsolt tömegspektrometria (HPLC-MS) analízist végzünk, melyekhez további deléciós törzseket hozunk létre. Az összes deléciós mutáns metabolitjainak elemzésével célunk a katabolikus útvonal köztes metabolitjainak meghatározása és végső soron a teljes lebontási útvonal megismerése.

Alkalmazott módszerek

Mikrobiológiai eljárások

E.coli és *A. nidulans* törzsek tenyésztése táptalajon és folyadék kultúrában, növekedési tesztek.

Molekuláris technikák

DNS és RNS izolálása *A. nidulans*-ból; cDNS szintézis; *A. nidulans* transzformálás; kompetens *E. coli* készítése, kémiai transzformálás; plazmid kivonása *E. coli*-ból; PCR, qRT-PCR, Double-Joint PCR; DNS gélelektroforézis; Southern analízis, molekuláris klónozás; Sanger szekvenálás

Egyéb módszerek

A. nidulans törzsek heterozigóta keresztezése; GFP-fúziós konstrukciók készítése; fluoreszcens mikroszkópia; *In silico* vizsgálatok; GC-MS és HPLC-MS analízis

Eredmények

A *hxn6* törzs mutációjának és az NDC2 klaszter génjeinek azonosítása

Annak érdekében, hogy kiderítsük, melyek a NA lebontásban szerepet játszó, eddig ismeretlen gének, egy, az 1970-es évekből származó *hxn6* elnevezésű mutáns vizsgálatába kezdtünk, amely nem képes nitrogénforrásként hasznosítani sem a NA-at, sem pedig a 6-NA-at, a mutáció pedig az NDC1 klaszterben található *hxnS* és *hxnR* lókusztól kb. 40 kb távolságra térképezték. A *hxn6* mutáns törzsbe *A. nidulans* génbank transzformálást hajtottunk végre és direkt szelekció alkalmazásával izoláltunk egy NA hasznosító transzformánst. A *hxn6*-ot komplementáló génbank plazmid menekítését követően szekvenálás segítségével az AN11187 génben azonosítottuk a *hxn6* mutációt. Az AN11187 (későbbiekben *hxnV*) az NDC1 klasztertől mintegy 40 kb távolságra helyezkedik el. A *hxn6* egy G1171A nukleotid cserét hordoz, amely a kódolt fehérjében W296STOP AS cserét okozva láncterminációt eredményez. Ezt követően megvizsgáltuk a *hxnV*, valamint az ezzel szomszédos AN9159, AN11172, AN9161, AN9162 és AN9163 gének kifejeződését qRT-PCR segítségével a *hxnR*⁺ és *hxnRA* törzsekben nem indukált és indukált (1 mM 6-NA-val történő indukció) körülmények között. A *hxnV*, AN11172 és AN9161 gének koregulációt mutattak az NDC1 génekkel (kifejeződésük HxnR és NA származék függést mutatott), így a NA katabolikus úthoz lehetett őket kapcsolni. Az AN11172 és AN9161 géneket *hxnW*-nek és *hxnX*-nek neveztük el. A NA lebontási útvonal génjeiként azonosított *hxnV*, *hxnW* és *hxnX* gének az NDC1-től 40 kb távolságra a VI-os kromoszómán egy újabb klasztert alkotnak, amelyet NDC2-nek neveztünk el.

In silico homológkeresés és az NDC3 klaszter génjeinek azonosítása

Korábbi *in silico* vizsgálataink alapján megállapítottuk, hogy számos gombarendben megtalálhatóak az NDC1 gének ortológjai. A NA katabolikus génklaszterek evolválódásának megismeréséhez egy kiterjedt *in silico* analízist végeztünk el közel 200 *Pezizomycotina* genomon, szintén figyelembe vevő ortológkeresési eljárással, a JGI Fungal Genome Portal adatbázisát használva. Érdekes módon a legtöbb gombafajban az NDC1 és NDC2 génjei egyetlen klaszterbe szerveződnek. A génsorrend vizsgálatakor megfigyeltük, hogy bizonyos gének génpárokba rendeződve erős konzerváltságot mutatnak. A génpárokat alkotó gének közül kettő számunkra ismeretlen volt. Ezek az AN6518 és az AN10833 géneknek feleltek meg az *A. nidulans*-ban, melyek az I. kromoszómán egymás mellett helyezkednek el.

A két újonnan felfedezett gén (AN6518 és AN10833, a későbbiekben *hxnM* és *hxnN*) esetében is transzkript analízissel vizsgáltuk a génkifejeződés HxnR és NA származékok általi regulációját. Ez alapján a *hxnM* és *hxnN* gének is a NA katabolikus úthoz kapcsolhatóak. A két gén által alkotott klasztert NDC3-nak neveztük el.

cDNS szekvenálás

Az NDC2-be és NDC3-ba tartozó gének cDNS szekvenciáinak kísérletes úton történő azonosítása során fényt derítettünk arra, hogy az AspGD adatbázisban szereplő intronok a *hxnV* gén esetén nem helytállóak.

Az NDC2 és NDC3 klaszterekben kódolt fehérjék *in silico* analízise

Az újonnan felfedezett két klaszterbe tartozó gének funkciójának megismeréséhez *in silico* fehérje elemzést végeztünk el, melynek eredményei alapján a következőket kaptuk:

- A HxnV valószínűleg egy FAD-függő fenol-monooxygenáz, amelynek szubsztrátja feltehetően a 2,5-dihidroxipiridin (2,5-DP).
- A HxnX egy N-terminális FAD-kötő doménnel rendelkező fehérje, mely monooxygenázokkal mutat homológiát, szubsztrátja pedig valószínűleg a 6-NA és a 2,5-DP köztesterméket hozza létre.
- A HxnW fehérje vizsgálataink alapján rövid láncú dehidrogenáz/reduktáz (SDR) szupercsalád tagjaival, oxidoreduktázokkal és NAD(P)-kötő fehérjékkel mutat homológiát. Feltételezhetően vagy ketoreduktázként működik, vagy dekarboxilációt végez a NA lebontás valamely aromás köztestermékén.
- A HxnM valószínűleg egy amido-hidroláz, amely a NA lebontás egy telített piridingyűrűvel rendelkező köztestermékét hasítja fel egy szén és egy nitrogén molekula között.
- A HxnN egy amidáz, amely valószínűleg lehasítja egy felnyílt gyűrűs szerkezetű köztestermék amid csoportját, mely ezt követően nitrogénforrásként hasznosulhat.

A *hxnS*, *hxnT* és *hxnY* génekre nézve halmozottan deléciós mutánsok létrehozás

Korábbi eredményeink alapján feltételezzük, hogy a *hxnS*, *hxnT* és *hxnY* gének a lebontási útvonal kezdeti lépéseiben játszanak szerepet. Ennek bizonyítására *hxnShxnTA*, *hxnSA/hxnYA*, *hxnTA/hxnYA* és *hxnShxnTA/hxnYA* mutáns törzseket hoztunk létre. Ezek különböző nitrogénforrásokon végzett növekedési vizsgálatainak során azt vettük észre, hogy a *hxnShxnTA* és

hxnShxnTA/hxnYA törzsek nitrogénforrásként 6-NA-at tartalmazó táptalajon a vad típushoz képest sokkal erősebb növekedést mutattak. Erre a meglepő fenotípusra magyarázat lehet, hogy a *hxnShxnTA* duplamutáns előállítását egy közös szubsztitúciós kazetta transzformálásával végeztük, így ez a törzs nem tartalmazza a *hxnS* és *hxnT* gének közös promóter régióját. Az elmélet bizonyítására létrehoztunk egy olyan mutáns törzset, amelyben a promóter régiót nem érintette a deléció. Azonban 6-NA nitrogénforráson ez a törzs ugyanolyan erős növekedést mutatott, mint a promótert nem tartalmazó mutáns. A fenotípus magyarázatának megismeréséhez további vizsgálatok szükségesek.

Az NDC2 és NDC3 klaszter génjeire nézve deléciós mutánsok létrehozása és vizsgálata

A lebontás folyamatának megértéséhez az NDC2 (*hxnV*, *hxnW* és *hxnX*) és NDC3 (*hxnM* és *hxnN*) klaszterbe tartozó génekre nézve deléciós mutánsokat hoztunk létre, és növekedési képességüket vizsgáltuk különböző nitrogénforrásokon. Az Allopurinollal (Allp, a PHI inhibitora) és 100 μ M NA-val, vagy 6-NA-val kiegészített Hx diagnosztikus táptalajon végzett növekedési tesztek alapján, ahol a Hx hasznosítását egyedül a HxnS enzim végzi, megállapítottuk, hogy a HxnM és a HxnN a katabolikus útvonal valódi inducerének (mely nem a NA, vagy a 6-NA) termelődését követő lépésekért felelősek, míg a HxnV, HxnW és HxnX a valódi inducertől „upstream” vesznek részt a NA lebontásában. Amikor a NA-at és 6-NA-at nitrogénforrásként alkalmaztuk a *hxnVA*, a *hxnXA*, és a *hxnMA* mutánsok közül egyik sem volt képes nőni, a *hxnWA* mutáns pedig „leaky” növekedést mutatott. Mindezek alapján úgy tűnhet, hogy a HxnV, HxnX és HxnM a lebontási út elágazás nélküli ágán, a HxnW pedig az alternatív ágon működve játszik szerepet a NA lebontásának folyamatában. A *hxnNA* törzs esetében látott redukált növekedés a NA és 6-NA nitrogénforráson, arra utalt, hogy nem a HxnN

az egyedüli amidáz a katabolikus út végén, amely az amid csoport lehasításáért felel.

Az NDC2 és NDC3 gének delécióinak konstitutív *hxnR* (*hxnR^c*) háttérbe juttatása és a létrehozott mutánsok vizsgálata

Azért, hogy a lebontási út génjeinek funkcióját az egyes mutánsokban az enzimműködés hiányában felhalmozódó metabolitokon keresztül vizsgálhassuk, biztosítanunk kellett az útvonalgénnek expresszióját a valódi inducer termelődésétől függetlenül. Ezt egy konstitutív *hxnR* (*hxnR^c*) allél kifejeztetésével tudtuk biztosítani, ezért minden *hxn* deléciós mutánst *hxnR^c7* háttérbe kereszteztünk és vizsgáltuk a N-forrás hasznosításukat, valamint metabolit profiljukat. A HxnR kifejeződése és a HxnS enzim aktivitása miatt azt vártuk, hogy minden mutáns nőni fog, ha az Allp-lal kiegészített Hx táptalajhoz NA-at vagy annak downstream származékait adagoljuk indukáló szer mennyiségben. Érdekes módon az 1 mM NA-val, vagy 6-NA-val kiegészített diagnosztikus Hx táptalajon a *hxnVΔ hxnR^c7* törzs nem képes nőni, a *hxnWΔ hxnR^c7* pedig redukált növekedést mutat, ugyanakkor 100 μM mennyiségben adagolva a NA-at, vagy 6-NA-at ezek a törzsek vad típusú módon növekedni tudtak. A jelenség oka a köztes metabolit konstitutív háttér miatti túlzott felhalmozódása lehet, mely feltehetőleg toxikus a törzs számára, vagy inaktiválja a transzkripció faktort.

A *hxnVΔ hxnR^c7* törzset urea nitrogénforrás mellett adagolt 10 mM NA-on, vagy 10 mM 6-NA-on tenyésztve kék színű pigmentképződést figyeltünk meg a telep körül a táptalajban. Ehhez hasonló jelenséget baktériumok esetében (*Bacillus* és *Pseudomonas* fajokban) már leírtak és úgy gondolják, hogy a bakteriális kék pigment nem-enzimatis úton képződő azakinon, amely telítetlen tri-hidroxilált piridin származékból képződik. Jelenleg zajlanak a *P. putida* és az *A. nidulans* esetében termelődő kék pigmentek összehasonlítására és azonosítására irányuló GC-MS vizsgálatok.

A pigmentképződés vizsgálatának céljából *hxnYΔ/hxnVΔ hxnR^c7*, *hxnTΔ/hxnVΔ hxnR^c7*, *hxnWhxnVΔ hxnR^c7* és *hxnXhxnWhxnVΔ hxnR^c7* mutáns törzseket hoztunk létre. A *hxnVΔ hxnR^c7* törzs és az újonnan létrehozott mutáns törzsek tápoldatban történő növesztése során vizsgáltuk a pigment megjelenését. Mivel csak a *hxnX* deléció akadályozta meg a pigment képződését, ezzel kísérletesen bizonyítottuk, hogy a HxnX a HxnV előtt működik az útvonalban, ahogy azt már a korábbiakban is feltételeztük.

A HxnV és HxnX fehérjék intracelluláris lokalizációjának vizsgálata

A NA katabolikus útvonal feltárásának keretén belül kíváncsiak voltunk arra is, hogy az egyes katabolikus lépések milyen intracelluláris kompartmentben zajlanak. Az útvonal enzimek lokalizációjának vizsgálata céljából *in silico* lokalizációs szignál keresés után létrehoztuk és vizsgáltuk a GFP fúziós HxnV és HxnX fehérjék intracelluláris kompartmentalizációját. A HxnV feltételezhetően a citoplazmában, vagy valamely membránnal körülhatárolt kompartmentben, a HxnX pedig a peroxiszómákban lokalizálódik.

GC-MS és HPLC-MS vizsgálatok szimpla és halmozottan deléciós mutánsokkal

GC-MS és HPLC-MS vizsgálatokat indítottunk el a NA katabolikus út metabolitjainak azonosítása céljából. A vizsgálatok során a konstitutív *hxnR^c* háttérbe juttatott szimpla deléciós törzseket használtuk, valamint a keresztezésükkel létrehozott halmozottan deléciós mutánsokat (*hxnMΔ/hxnXΔ*, *hxnMΔ/hxnVΔ*, *hxnMΔ/hxnWΔ*).

Az eddigi GC-MS és HPLC-MS eredményeink összhangban állnak a növekedési tesztek eredményeivel. A *hxnXΔ*, *hxnWΔ*, *hxnVΔ* és *hxnMΔ* szimpla és *hxnMΔ/hxnXΔ*, *hxnMΔ/hxnVΔ* és *hxnMΔ hxnWΔ* duplamutáns törzsek vizsgálata előre vetítette, hogy a HxnW mellett valószínűleg a HxnV és HxnX enzimek egy

másik alternatív útvonalon játszanak szerepet. A *hxnSΔ*, *hxnTΔ* és *hxnYΔ* szimpla és a halmozottan deléciós törzsek analitikai vizsgálatainak eredményei támogatták az alternatív út létezését a NA katabolikus folyamatban. Eredményeink alapján az alternatív útvonalak egyik ágán a HxnS után előbb a HxnX, majd a HxnV következik, a másik ágán pedig a HxnW működik. A HxnY és HxnT helyzete ezeken az alternatív utakon jelenleg nem meghatározott. A deléciós törzsekben vizsgáltuk, hogy milyen köztes metabolitok halmozódnak fel a NA-on, vagy 6-NA-on történő inkubálás során. Azt figyeltük meg, hogy a nagy mennyiségben felhalmozódó metabolitok egynél több törzsben voltak megfigyelhetők (igazolja a reverz irányú folyamatok meglétét), kivéve a 2,5-DP és egy 131 g/mol molekulásúlyú komponens esetén. A 2,5-DP felhalmozódást kizárólag a *hxnVΔ* *hxnR^c7* törzsben tapasztaltunk, mely alapján valószínűsíthetjük, hogy a HxnV enzim szubsztrátja a 2,5-DP. A 131 g/mol molekulásúlyú komponens kizárólag a *hxnWΔ* *hxnR^c7* törzs esetében halmozódott fel. A komponens szerkezeti azonosítására irányuló elemzések alapján ez a metabolit valószínűsíthetően az 1,2,3,6-tetrahidro-piridin-2,3,6-triol, mely a HxnW szubsztrátja lehet. Meglepő módon a 6-NA szubsztrátból kiinduló vizsgálatok során a *hxnVΔ*, *hxnWΔ* és *hxnXA* mutánsokban NA felhalmozódást figyeltünk meg, amely rávilágított arra, hogy a lebontás során a celluláris környezetben a 6-NA képes NA-vá visszaalakulni, és lehetséges az is, hogy a 6-NA-tól downstream metabolitok esetén is történhet visszaalakulás.

Összefoglalás

Jelen munka során:

- Azonosítottuk a *hxn6* törzs mutációjának pozícióját, melynek segítségével felfedeztük az NDC2 klasztert alkotó *hxnV*, *hxnW* és *hxnX* géneket
- Közel 200 *Pezizomycotina* gombagenom összehasonlító *in silico* elemzése során felfedeztünk további két, a NA lebontásban szerepet játszó gént, a *hxnM* és *hxnN* géneket, melyek az NDC3 klasztert alkotják
- cDNS szekvenálás segítségével megállapítottuk, hogy a *hxnV* gén cDNS szekvenciája helytelenül szerepel az adatbázisban
- Számos szimpla és halmozottan deléciós mutáns törzset hoztunk létre a NA katabolikus út feltárása érdekében:
 - *hxnSA::pabaA⁺*, *hxnSA/hxnTA*, *hxnSA/hxnYA*, *hxnTA/hxnYA*, *hxnSA/hxnTA/hxnYA*
 - *hxnVA*, *hxnXA*, *hxnWA*, *hxnMA*, *hxnNA*
 - *hxnMA/hxnVA*, *hxnMA/hxnXA*, *hxnMA/hxnWA*
 - *hxnYA/hxnVA*, *hxnTA/hxnVA*, *hxnWhxnVA*, *hxnXhxnWhxnVA*
- A létrehozott deléciós mutánsok NA hasznosítási vizsgálatai során megállapítottuk, hogy:
 - a *hxnV*, *hxnW*, *hxnX*, *hxnM* gének a lebontási útvonal 6-NA utáni lépéseiben játszanak szerepet
 - a *hxnV* és *hxnX* gének az útvonal valódi inducerének létrejötte előtt vesznek részt a lebontásban
 - a *hxnW* valószínűleg egy alternatív útvonalban játszik szerepet
- HxnV-GFP és GFP-HxnX konstrukciókat kifejező törzseket hoztunk létre, melyek fluoreszcens mikroszkópos vizsgálata során megállapítottuk, hogy a HxnV a citoplazmában, vagy valamely membránnal körülhatárolt kompartmentben, a HxnX pedig a peroxiszómákban lokalizálódik

- A HPLC-MS vizsgálatok során megállapítottuk, hogy a *hxnV* szubsztrátja a 2,5-DP, a *hxnW* szubsztrátja pedig az 1,2,3,6-tetrahidro-piridin-2,3,6-triol, valamint hogy a lebontás lépései visszafelé is működnek

Eredményeink jelentősen hozzájárultak a NA katabolikus út feltárásához, de az útvonal teljes felderítése további kísérleteket igényel. Elképzelésünk szerint a *hxnS*, *hxnT*, *hxnY*, *hxnV*, *hxnW*, *hxnX*, *hxnM* és *hxnN* deléciókra nézve halmozottan deléciós mutánsok létrehozása minden kombinációban megoldást fog nyújtani az eddig még nem tisztázott katabolikus lépéseket felderítésére.

A DOLGOZAT ALAPJÁT KÉPEZŐ PUBLIKÁCIÓK

Publikációk referált folyóiratokban

Bokor, Eszter; Ámon, Judit; Keisham, Kabichandra; Karácsony, Zoltán; Vágvölgyi, Csaba; Hamari, Zsuzsanna; HMGB proteins are required for sexual development in *Aspergillus nidulans*; PLOS ONE 14 : 4 p. e0216094 (2019) ; **IF: 1,95**

Ámon J, Keisham K, **Bokor E**, Kelemen E, Vágvölgyi C, Hamari Z; Sterigmatocystin production is restricted to hyphae located in the proximity of hülle cells, Journal Of Basic Microbiology 58:(7) pp. 590-596. (2018); **IF: 1,580**

Ámon J, Fernandez-Martin R, **Bokor E**, Cultrone A, Kelly JM, Flipphi M, Scazzocchio C, Hamari Z; A eukaryotic nicotinate-inducible gene cluster: convergent evolution in fungi and bacteria, *Open Biology* 7:(12) Paper 170199. 17 p. (2017); **IF: 3,268**

Összesített impakt faktor: 6,798

A dolgozat témájához kapcsolódó konferencia összefoglalók:

Bokor E, Ámon J, Vágvölgyi Cs, Hamari Zs; Investigation of the initial steps of the nicotinic acid degradation pathway in *Aspergillus nidulans*; In: [Department of Public Health Faculty of Medicine University of Szeged] (szerk.) 19th Danube-Kris-Mures-Tisa (DKMT) Euroregional Conference on Environment and Health: Program and abstracts. 65 p. Konferencia helye, ideje: Szeged, Magyarország, 2017.06.09-2017.06.10. Szeged: University of Szeged, Faculty of Medicine, 2017. p. 15. (ISBN:978-963-306-535-8)

Bokor Eszter; Investigation of the nicotinic acid degradation pathway in *Aspergillus nidulans*; Acta Biologica Szegediensis 60:(1) p. 80. (2016) Conference for Doctoral Students in Biology. Szeged, Magyarország: 2016.05.17 -2016.05.18.

Eszter Bokor, Judit Ámon, Csaba Vágvölgyi, Michel Flipphi, Claudio Scazzocchio, Zsuzsanna Hamari; Investigation of the role of *hxn* genes in the nicotinic acid catabolic process of *Aspergillus nidulans*; In: 14th European Conference on Fungal Genetics (ECFG14). Konferencia helye, ideje: Haifa, Izrael, 2018.02.25-2018.02.28.p. 144.

Bokor Eszter, Ámon Judit, Vágvölgyi Csaba, Hamari Zsuzsanna; Investigation of the function of the *hxnS*, *hxnT* and *hxnY* genes in the nicotinic acid degradation process in *Aspergillus nidulans*; In: 6th Hungarian Mycological Conference. Konferencia helye, ideje: Szeged, Magyarország, 2017.07.03-2017.07.05. Abstract book p. 73-75. (ISSN 0133-9095)

Bokor Eszter, Ámon Judit, Vágvölgyi Csaba, Hamari Zsuzsanna; *hxnW*, a new member of the nicotinic acid degradation pathway; Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica 62:(Suppl 1) p. 12. (2015) Annual Meeting of the Hungarian Society for Microbiology, 2014. Keszthely, Magyarország: 2014.10.15 -2014.10.17.

Bokor E, Karácsony Z, Vágvölgyi C, Scazzocchio C, Hamari Z; A monooxygenase involved in the nicotinic acid degradation pathway in *Aspergillus nidulans*; In: Avalos J, Cánovas D, Corrochano LM, Ibeas JI, Limón CM (szerk.) 12th European Conference on Fungal Genetics (ECFG12). 358 p. Konferencia helye, ideje: Sevilla, Spanyolország, 2014.03.23-2014.03.27. Sevilla: p. 107.

Bokor E, Karácsony Z, Vágvölgyi C, Hamari Z; Verification of HxnV plays role in the nicotinic acid degradation pathway in *Aspergillus nidulans*; Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica 60:(Suppl. 2) pp. 120-121. (2013) 4th Central European Forum for Microbiology. Keszthely, Magyarország: 2013.10.16 - 2013.10.18.

Bokor E, Vágvölgyi C, Karácsony Z, Hamari Z; Investigation of the first eukaryotic nicotinic acid degradation pathway in the model organism *Aspergillus nidulans*; In: Gácsér A, Vágvölgyi Cs (szerk.) Kutatások az SZTE Biológus Tanszékein: 1. Biomedica Minikonferencia. 57 p. Konferencia helye, ideje: Szeged, Magyarország, 2013.12.13 Szeged: JATEPress Kiadó, 2013. p. 41. (ISBN:978-963-315-157-0)

Bokor E, Karácsony Z, Papp C, Vágvölgyi C, Hamari Z; Investigation of the role of HxnV in the utilization of nicotinic acid as nitrogen-source in *Aspergillus nidulans*; In: Škrbić B (szerk.) 15th Danube-Kris-Mures-Tisa (DKMT) Euroregion Conference on Environment and Health with satellite event LACREMED Conference "Sustainable agricultural production: restoration of agricultural soil quality by remediation": Book of Abstracts. Konferencia helye, ideje: Novi Sad, Szerbia, 2013.05.16-2013.05.17. Novi Sad: University of Novi Sad, 2013. p. 57. (ISBN:978-86-6253-018-9)

TÁRSSZERZŐI NYILATKOZAT

Alulírott Dr. Hamari Zsuzsanna kijelentem, hogy BOKOR ESZTER szerepe meghatározó jelentőségű volt az

Bokor, Eszter; Ámon, Judit; Keisham, Kabichandra; Karácsony, Zoltán; Vágvölgyi, Csaba; Hamari, Zsuzsanna; HMGB proteins are required for sexual development in *Aspergillus nidulans*

címmel megjelenő közleményben, így az értekezésben és a publikációban közölt eredményeket más tudományos fokozat megszerzésére nem használtuk fel és ezt a jövőben sem tesszük.

Szeged, 2019. 06. 18.

.....

Dr. Hamari Zsuzsanna