

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Riba Milán

Cianobaktériumok peptid mintázatainak elemzése

DEBRECENI EGYETEM

GYÓGYSZERÉSZETI TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2020

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Cianobaktériumok peptid mintázatainak elemzése

Riba Milán

Témavezető: Prof. Dr. Vasas Gábor



DEBRECENI EGYETEM

GYÓGYSZERÉSZETI TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2020

CIANOBAKTÉRIUMOK PEPTID MINTÁZATAINAK ELEMZÉSE

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
a gyógyszerészeti tudományok tudományágban*

Írta: Riba Milán okleveles biológus

Készült a Debreceni Egyetem Gyógyszerészeti Tudományok doktori iskolája
(Farmakológia doktori programja) keretében

Témavezető: Prof. Dr. Vasas Gábor, az MTA doktora

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Tósaki Árpád, az MTA doktora

tagok: Dr. Horváth Györgyi, PhD

Dr. Emri Tamás, az MTA doktora

A doktori szigorlat időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK, Gyógyszerhatástani Tanszék, Könyvtár
2018. április. 23.

Az értekezés bírálói:

Dr. Vasas Andrea, PhD

Dr. Bácsi István, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Tósaki Árpád, az MTA doktora

tagok: Dr. Bácsi István, PhD

Dr. Emri Tamás, az MTA doktora

Dr. Horváth Györgyi, PhD

Dr. Vasas Andrea, PhD

Az értekezés védésének időpontja: online webes felületen keresztül (Zoom)
2020. december 7, 11:00

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	1
2. Célkitűzés	2
3. Irodalmi áttekintés.....	3
3.1. A cianobaktériumok.....	3
3.2. Cianobakteriális peptidek	5
3.3. Cianotoxinok.....	8
3.3.1. Microcystinek és nodularinok	9
3.3.2. Cylindrospermopszinok	9
3.3.3. Anatoxinok	10
3.3.4. Saxitoxinok	10
3.3.5. β -N-metilamino-L-alanine és változatai	10
3.4. Cianobakteriális bioaktív anyagok	11
3.4.1. Aeruginosinok.....	11
3.4.2. Anabaenopeptinek	12
3.4.3. Microgininek.....	12
3.4.4. Depsipeptidek.....	13
3.4.5. Cyclamidok	13
3.5. Cianobakteriális metabolitok gyógyászati jelentősége	14
3.6. A <i>Microcystis</i> fajok jellemzői és előfordulása.....	17
3.7. A <i>Nostoc</i> fajok jellemzői és előfordulása	19
3.8. Metabolomikai vizsgálati módszerek	21
4. Anyag és módszer	23
4.1. Balatoni <i>Microcystis</i> törzsek vizsgálata	23
4.1.1. Mintavételezés, izolálás és tenyésztés.....	23
4.1.2. Cianobakteriális peptidek azonosítása.....	24
4.1.3. Statisztika	24
4.1.4. Filogenetikai analízis.....	25
4.2. Alföldi <i>Nostoc</i> törzsek vizsgálata	26
4.2.1. Mintavételezés, izolálás és tenyésztés.....	26
4.2.2. Cianobakteriális peptidek azonosítása.....	27
4.2.3. Statisztika	27
4.2.4. Filogenetikai analízis.....	27
4.2.5. Ujjlenyomat analízis	28

4.3.	Szimbionta <i>Nostoc</i> törzsek vizsgálata.....	29
4.3.1.	Izolálás és tenyésztés	29
4.3.2.	Cianobakteriális peptidek azonosítása.....	30
4.3.3.	Filogenetikai analízis.....	30
5.	Eredmények.....	31
5.1.	A balatoni <i>Microcystis</i> fajok vizsgálatának eredményei.....	31
5.1.1.	Az izolált sejtvonalak és a vízvirágzást okozó fajok morfológiai azonosítása	32
5.1.2.	Molekuláris filogenetikai vizsgálatok	32
5.1.3.	Peptid metabolitok azonosítása.....	32
5.1.4.	Kemotípusok meghatározása és a kemotípus csoportok filogenetikai kapcsolata	36
5.2.	Az alföldi <i>Nostoc</i> fajok vizsgálatának eredményei	39
5.2.1.	Molekuláris filogenetikai vizsgálatok	39
5.2.2.	Peptid metabolitok azonosítása.....	42
5.2.3.	Az oligopeptidek eloszlása és a kemotípusok meghatározása	47
5.3.	Szimbionta <i>Nostoc</i> fajok vizsgálatának eredményei	49
5.3.1.	Molekuláris filogenetikai vizsgálatok	49
5.3.2.	Peptid metabolitok azonosítása.....	49
6.	Diszkusszió.....	50
6.1.	A <i>Microcystis</i> izolátumok és azok peptid mintázata	50
6.2.	A <i>Nostoc</i> izolátumok és azok peptid mintázata.....	54
6.3.	A szimbionta <i>Nostoc</i> izolátumok és azok peptid mintázata.....	58
6.4.	Az azonosított peptid családok variabilitása és jellemzői	59
6.4.1.	Nostogininek és microgininek	59
6.4.2.	Anabaenopeptinek	60
6.4.3.	Banyasidok	61
6.4.4.	Microcystinek	62
6.4.5.	Nostopeptolidok.....	62
7.	Konklúzió.....	63
8.	Összefoglalás és új eredmények	65
9.	Summary and new results	67
10.	Köszönetnyilvánítás	69
11.	Függelék	70
12.	Felhasznált irodalom.....	80

Rövidítések jegyzéke

ABP	anabaenopeptin
AchE	acetylcholinesterase = acetilkolin észteráz
ACP	acyl carrier protein = acil hordozó fehérje
Adda	3-amino-9-methoxy-2,6,8-trimethyl-10-phenyldeca-4,6-dienoic acid = 3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenildeka-4,6-diénsav
AER	aeruginosin
Ahda	3-amino-2-hydroxydecanoic acid = 3-amino-2-hidroxi-dekánsav
Ahoa	3-amino-2-hydroxydecanoic acid = 3-amino-2-hidroxi-oktánsav
ANTX	anatoxin
APCI	atmospheric pressure chemical ionization = atmoszferikus nyomású kémiai ionizáció
BMAA	beta-N-methylamino-L-alanine = béta-N-metil-amino-L-alanin
BNS	banyasid
CE	capillary electrophoresis = kapilláris elektroforézis
CoA	koenzim A
DAB	diaminobutyric acid = diamino-vajsav
DNS	dezoxiribonukleinsav
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid = etilén-diamin-tetraecetsav
EPS	exopoliszacharidok
ERIC	enterobacterial repetitive intergenic consensus = enterobakteriális ismétlődő intergenikus konszenzus
ESI	electrospray ionization = elektronspray ionizáció
FT-MS	Fourier transform-mass spectrometry = Fourier transzformációs tömegspektrometria
GC	gas chromatography = gázkromatográfia
GSH	glutation
HPLC	high-performance liquid chromatography = nagyteljesítményű folyadékkromatográfia
IC50	50% inhibitory concentration = 50%-os gátló koncentráció
IC90	90% inhibitory concentration = 90%-os gátló koncentráció
ITS	internal transcribed spacer = átírt köztes szekvenciák

kbp	kilobázispár
KS	keto(acyl) synthase = keto(acyl) szintáz
LC	liquid chromatography = folyadékkromatográfia
LPS	lipopolysaccharides = lipopoliszacharidok
MCY	microcystin
MG	microginin
MS	mass spectrometry = tömegspektrometria
NG	nostoginin
NMR	nuclear magnetic resonance = mágneses magrezonancia
NOD	nodularin
NPL	nostopeptolid
NRPS	nonribosomal peptide synthetases = nem riboszomális peptidszintetáz
NWP	nostoweipeptin
OSC	oscillamid
PCP	peptidyl carrier protein = peptidil hordozó fehérje
PCR	polymerase chain reaction = polimeráz láncreakció
PKS	polyketide synthases = poliketid szintáz
PP	protein foszfatáz
RiPP	ribosomally synthesised and posttranslationally modified peptides = riboszomális úton szintetizált és poszt-transzlációs úton módosított peptidek
RNS	ribonukleinsav
rRNS	riboszomális RNS
RT	retention time = retenció idő
SCP	schizopeptin
SDS	sodium dodecyl sulfate = nátrium-dodecil-szulfát
STRR	short tandemly repeated repetitive = rövid, egymás után ismétlődő
STX	saxitoxin
SUO	suomilid
TE	Tris-EDTA
TOF/MS	time-of-flight mass spectrometry = repülési idő tömegspektrometria
UPGMA	unweighted pair group method with arithmetic mean = csoportátlag eljárás

UPLC ultra-performance liquid chromatography = ultrateljesítményű
folyadékkromatográfia

UV ultraviola sugárzás

1. Bevezetés

A cianobaktériumok (kéalgák) világszerte megtalálható ősi mikroorganizmusok. Oxigéntermelő fotoszintézisük révén 2200–2400 millió évvel ezelőtt jelentős szerepük volt a Föld aerob légkörének kialakításában, és ma továbbra is fontos szerepet játszanak a szén, nitrogén és ásványi anyagok biológiai ciklusában. Változatos körülmények között fellelhető élőlények, megtalálhatók az édes és sós vizekben, valamint a sziklák és a talaj megvilágított felületein is. Fotoszintetikus életmódjuk révén, valamint a kedvezőtlen és szélsőséges környezeti feltételekhez való alkalmazkodási képességük miatt a cianobaktériumok elsődleges kolonizálók. Egyes fajaik képesek továbbá a gáznemű nitrogén megkötésére és ammóniává valamint aminosavakká történő átalakítására. Bőséges források idején a cianobaktériumok képesek raktározni az alapvető tápanyagokat (foszfor, nitrogén, szén, vas), hogy korlátozott körülmények között is lehetővé tegyék a növekedésüket. Bizonyos fajok további stratégiákat alkalmaznak a környezeti szélsőségekkel (magas sótartalom, magas és alacsony hőmérséklet, szakaszos kiszáradás, magas napsugárzás) szemben, így biztosítva a túlélésüket és a növekedésüket. A cianobaktériumok számos vízi és szárazföldi tápláléklánc alapját képezik, és a biotechnológiában is egyre növekszik az alkalmazásuk, kezdve a bio-trágyák előállításától a potenciális gyógyszerekig. Vízi környezetben a cianobaktériumok különböző élőhelyeken fordulhatnak elő: diszpergált formában vagy aggregátumokként szuszpendálva a vízben, a víz felszínén, az aljzat üledékében, vagy a parti sziklához, üledékekhez és a növényekhez kapcsolódva. A cianobaktériumok tömeges populációi ezeken a helyeken virágzást, habzást, biofilmeket vagy szőnyeget képezhetnek. Ilyen tömegpopulációk előfordulhatnak érintetlen, emberi tevékenység által nem befolyásolt víztestben ahol a növekedéséhez szükséges tápanyagok természetes geológiai és hidrológiai folyamatok révén jutnak a vízterbe. Mára azonban felismerték, hogy a víztest trofikus állapotának ilyen növekedése (eutrofizáció) különösen érzékeny az antropogén hatásokra. Algavirágzások hátrányosan befolyásolhatják az emberi és állati ivóvíz ellátást, a növények öntözését, az akvakultúrákat, az ipari feldolgozást, a rekreációs tevékenységet és az idegenforgalmat. A cianobaktériumok képesek lehetnek potenciális toxikus metabolitokat (cianotoxinokat), illetve egyéb biológiai szempontból jelentős anyagokat előállítani. Az elmúlt években számos cianobakteriális metabolitot azonosítottak, melyek igen változatos biológiai aktivitással rendelkeznek. Napjainkban a növények és egyes mikroorganizmusok kimondottan nagy gyógyászati jelentőséggel bírnak,

ezek a legfontosabb hatóanyagforrások a gyógyszeripar számára. Az újonnan felfedezett cianobakteriális metabolitokat egyre nagyobb érdeklődés övezi, és a fotoszintetizáló mikroorganizmusok gyógyászati jelentősége is ártértékelődik.

2. Célkitűzés

Munkánk során különböző cianobaktérium fajok peptid metabolit termelő képességét kívántuk vizsgálni. A vizsgálatok során a cianobaktériumok toxin-tartalmának kimutatására alkalmazott megközelítéseken túl a ritkán vizsgált peptidek megjelenésére összpontosítottunk. Ezen kívül a potens biológiailag aktív peptid molekulák azonosításán és jellemzésén keresztül kívántuk felhívni a figyelmet a cianobaktériumokra, mint természetes hatóanyagforrásokra.

A 2010-es években rendszeresen fordultak elő *Microcystis* vízvirágzások a Balatonban. Célunk volt (1) a tóban 2013 és 2016 között megfigyelhető *Microcystis* fajok azonosítása és peptid metabolom elemzése volt. Hasonló módon szeretnénk volna megvizsgálni (2) az Alföld alkalikus gyeptársulásain szabadon előforduló szárazföldi, illetve (3) egyes szimbióta *Nostoc* fajok peptidtermelő képességét. Mindhárom esetben célunk volt:

- Az izolált cianobaktérium fajok morfológiai és molekuláris alapú azonosítása.
- Az izolált cianobaktérium fajok által termelt ismert peptid metabolitok (toxinok és bioaktív peptidek) azonosítása, illetve eddig azonosítatlan peptid metabolitok aminosav szintű karakterizálása LC-ESI-MS/MS módszer alkalmazásával.
- Az azonosított metabolitok előfordulása alapján különböző kemotípusok meghatározása, valamint az egyes kemotípusok térbeli és időbeli eloszlásának vizsgálata.

3. Irodalmi áttekintés

3.1. A cianobaktériumok

A cianobaktériumok ubikvista élőlények, világszerte és minden éghajlati körülmények között, sok különböző élőhelyen megtalálhatók [1]. Szabadon élő formáik megtalálhatók édes és sós vizekben (bentikus és planktonikus formában) vagy talajfelszínen egyaránt. Egyes fajok szimbiózisban élnek magasabb rendű növényekkel vagy gombákkal (például zuzmók). A cianobaktériumok morfológiája igen változatos, lehetnek egysejtűek, kolóniaképzők és többsejtű fonalas szerkezetűek. Egyes fajok speciális, különböző funkciók betöltésére módosult sejtekkel rendelkeznek, ideértve a légköri nitrogén megkötésére szolgáló heterocisztákat vagy a kedvezőtlen körülmények túlélésére szolgáló spóra-szerű sejteket az akinétákat. Az egyes sejtek általában mikroszkopikus méretűek, de a nagyobb, makroszkopikus formák, mint például a zselatinszerű kolóniák (pl. *Microcystis* spp.) vagy a bentikus szőnyegek (pl. *Phormidium* spp.), szabad szemmel is könnyen láthatóak. A kiegészítő pigmenteknek köszönhetően (fikobilinek, különösen a fikocianin és fikoeritrin) a cianobaktériumok képesek a gyenge fényviszonyok mellett is szaporodni. Ezen felül a gázvezikulumoknak köszönhetően képesek lehetnek a felhajtóerejüket is szabályozni, ami lehetővé teszi, hogy a habképző cianobaktériumok (pl. *Microcystis* spp.) fenn maradhassanak a vízoszlop felső rétegében. Ugyanakkor ezek a cianobaktériumok és azon bentikus formák, amelyek nagyon nagy mennyiségű fénynek és ultraibolya (UV) sugárzásnak vannak kitéve, különböző védekezési mechanizmusokkal rendelkeznek (pl. a karotinoid pigmentek és scytonemin), hogy elkerüljék a fényátlást és az UV-károsodást. Legvégül fontos megemlíteni, hogy bizonyos fajok, amelyek képesek a légköri nitrogén megkötésre, nitrogén szegény körülmények között és magas foszfor koncentráció mellett versenyelőnyben vannak társaikkal szemben, ugyanakkor néhány nitrogén-fixáló faj magas nitrogén és foszfor koncentráció mellett is megjelenhet vízvirágzásokban [2,3].

A cianobaktériumok elsődleges termelők, melyek fényenergia felhasználásával ásványi anyagokból és szén-dioxidból állítanak elő szerves anyagot. Következésképpen ezeknek a mikroorganizmusoknak a növekedését befolyásoló főbb tényezők a tápanyagok jelenléte és hozzáférhetősége (különösen a foszfor) és a napfény. Más fizikai és biológiai tényezők, mint például a vízoszlop termikus rétegződése, más organizmusokkal folytatott verseny, a ragadozók és paraziták jelenléte szintén befolyásolják a cianobaktériumok

populációdinamikáját. Az emberi tevékenységek eredményeként sok víztest tápanyag tartalmának megemelkedése a cianobaktériumok elterjedéséhez vezetett az egész világon. Mivel sok potenciálisan mérgező cianobaktérium faj hajlamos vízvirágzásokat okozni, ezek specifikus tulajdonságaikkal és ökológiai viselkedésükkel kapcsolatos ismeretekre is szükség van a kockázatértékelés keretein belül történő megfelelő vizsgálatokhoz és kezelésekhez. Összességében számos fizikai, kémiai és biológiai tényezőről és folyamatról ismert, hogy hatással van a cianobaktériumok populációdinamikájára, valamint a vertikális és horizontális eloszlására. Mindezeknek a tényezőknek és folyamatoknak a többszörös kölcsönhatása szinte lehetetlenné teszi a cianobaktériumok virágzásának közép- és hosszú távú (több hét vagy hónap) előrejelzését, rávilágítva a pontos monitorozás szükségességére [2].

Ma már bebizonyított, hogy a planktonikus cianobaktériumok virágzása a legelterjedtebb az eutróf ökoszisztémákban [4], azaz olyan tavakban, amelyek teljes foszforkoncentrációja magasabb, mint 50 µg/L. Ezen kívül jelentős biomassa található meg a mezotrofikus ökoszisztémákban (ahol a teljes foszforkoncentráció 20 és 50 µg/L közötti), például a mély alpesi tavakban ahol a *Planktothrix rubescens* is jelentős mennyiségben megtalálható. Másfelől az áramló vizekben, oligotróf körülmények között a bentikus cianobaktériumok elterjedése figyelhető meg, például alacsony foszforkoncentrációjú folyókban és hegyi tavakban. A mérsékelt égövi térségben a cianobaktériumok tömeges megjelenése általában nyáron fordul elő, amikor a víz hőmérséklete meghaladja a 20 ° C-ot, és megtörténik a vízoszlop termikus rétegződése (3 m-nél mélyebb tavak esetén). Néhány faj azonban képes elszaporodni hidegebb vizekben is. Ilyen például a *P. rubescens*, amely még télen, a jéggel borított tavakban is képes elszaporodni [5], és a *P. agardhii*, amely képes évelő virágzást képezni a tavakban (néha több évig is). Számos tanulmány készült a vízoszlop termikus rétegződésének a cianobaktériumok virágzásának dinamikájára gyakorolt hatásáról. A rétegződés lehetővé teszi a lebegő cianobaktériumok (pl. *Microcystis*) helyzetének beállítását a vízoszlopban, például a fény elérhetősége érdekében, ami versenyelőnyt jelent más szervezetekkel, például a mikroalgákkal szemben. Ezenkívül az eutrofikus víztestekben a termikus rétegződés az üledékből oxigénhiányos körülmények között a foszfor felszabadulásához vezethet, ami így közvetetten befolyásolhatja a cianobaktérium populációk dinamikáját. Ezen fiziko-kémiai tényezőkön és folyamatokon túl számos biológiai folyamat is működik. Eutrofikus körülmények között verseny zajlik a fotoszintetikus mikroorganizmusok (azaz a cianobaktériumok és a mikroalgák) valamint a cianobaktériumok és a növények között

a fény elérése érdekében. A cianobaktériumokkal táplálkozó zooplankton szintén szerepet játszhat a cianobaktériumok virágzásának megjelenésében, azonban a zooplankton-szervezetek jelenlétét nagymértékben meghatározza a halközösség összetétele [2,6].

A cianobaktériumok számos, különféle másodlagos metabolitot képesek előállítani, melyek közül néhány mérgező hatású lehet a növényekre, állatokra és az emberekre nézve egyaránt. A cianotoxinokkal kapcsolatos vizsgálatok többsége a microcystinekre (MCY) irányul, hiszen ezek azok a leggyakoribb toxinok, amelyeket az édesvízi ökoszisztémákban virágzást képező cianobaktériumok termelnek. A víztestben a MCY-ek eloszlását és koncentrációját különböző faktorok határozzák meg: 1, a toxint termelő cianobaktériumok biomasszája; 2, a toxinok mennyisége és típusa a sejtekben; 3, a toxikus genotípusok aránya a populációban; 4, extracelluláris MCY felszabadulása a vízben. A biomassa egységnyi MCY koncentrációja jelentősen változhat egyik virágzásról a másikra, illetve egyetlen virágzás során, de lehetnek meglehetősen stabilak is [7]. Az elmúlt 10 évben számos kutatást végeztek annak érdekében, hogy jobban megértsék a környezeti feltételek cianobaktérium sejtek toxintartalmára gyakorolt hatását. Noha a környezeti tényezők (ideértve a nyomelemeket, a tápanyagokat és a fényt) befolyásolhatják a MCY termelő és nem termelő sejtek arányát, valamint a sejten belüli MCY termelést, problémás volt nagy bizonyossággal előre jelezni a vízvirágzás lehetséges toxicitását és az azzal járó egészségügyi kockázatokat [8]. Más cianotoxinokról jóval kevesebb adat áll rendelkezésünkre, ám a bentikus cianobaktériumok (különösen a *Phormidium*) által termelt anatoxinokról szóló közelmúltbeli jelentések szerint nagy heterogenitás figyelhető meg az azonos területen gyűjtött különböző szőnyegek toxin koncentrációinak összehasonlításakor. Ennek oka lehet egyrészt a toxikus és nem toxikus genotípusok együttes jelenléte a *Phormidium* populációkban, másrészt a toxikus genotípusok által termelt anatoxin koncentrációjának változása is [9].

3.2. Cianobakteriális peptidek

Az elmúlt két-három évtizedben nagyszámú cianobakteriális metabolitot izoláltak és jellemeztek tenyésztett törzsekből és terepi mintákból. Eddig több mint 600 peptidet vagy peptid jellegű metabolitot írtak le különböző taxonokból. A folyamatos és egyre növekvő tendencia a vízi rendszerek közegészségügyi szempontból jelentős megfigyeléséből és a különféle szerkezetű és változatos biológiai aktivitással rendelkező anyagok potenciális farmakológiai alkalmazhatóságának vizsgálatából származik. A cianobaktériumok által termelt

másodlagos metabolitok nagymértékű szerkezeti változatosságot mutatnak. Ezek nagyrészt peptidek vagy peptid és nem peptid alegységekkel egyaránt rendelkező vegyületek. Többségük NRPS (nem riboszómális peptid-szintetáz) vagy NRPS-PKS (poliketid szintáz) hibrid enzim rendszereken keresztül szintetizálódik, azonban egyes peptidek bioszintézis útja egy-egy riboszómálisan szintetizált peptiddel kezdődik, amelyek később poszt-transzlációs módosításokon mennek keresztül [10].

Az NRPS bioszintézis rendszer fehérje szinten nukleinsav mentesen működik, az aminosav és karboxil-csoportot tartalmazó rokon vegyületek kapcsolódását fehérjesablonok irányítják, és minden egyes bioszintézis lépéshez egy-egy proteinmodul szükséges. Egy modul különböző katalitikus doménekből áll, a minimális modul tartalmaz egy aminosav-aktiváláshoz szükséges adenilációs (A) domént, egy aktivált intermedierek átviteléért felelős tiolációs (T) domént és egy kondenzációs (C) domént. A domének és a modulok gén szinten összetett struktúrák, gén klaszterek formájában vannak jelen és a transzláció során többfunkciós fehérjékké vagy multi-enzimkomplexezzé íródnak át. Az NRPS gének általában több modulból álló fehérjéket kódolnak, de egyedi modulokat vagy doméneket kódoló gének szintén megtalálhatók. Egy minimális modulhoz kb. 3–3,5 kbp (kilobázispár) genetikai szekvenciára van szükség, így ezek a több modulból álló NRPS gének a legnagyobb ismert gének [10]. A cianobaktériumok másodlagos metabolitjainak és ezek kémiai szerkezetének nagy diverzitása arra utal, hogy a cianobaktériumok genomjában változatos NRPS és PKS géncsoportok vannak jelen. A másodlagos anyagcseretermékek bioszintéziséért felelős génekben gyakran megfigyelhetők NRPS és PKS gének keveredése [10].

Az A-domének katalizálják az aminosavak, iminosavak vagy hidroxisavak és különféle karbonsavak karboxilcsoportjainak specifikus aktiválását. Az A-domének azok, amelyek elsődlegesen meghatározzák a kialakuló peptid aminosav sorrendjét, ugyanis az enzim kötőhelyének geometriája határozza meg, hogy mely aminosavak képesek bejutni a katalitikus helyre, ahol egy ATP felhasználásával megtörténik az aktiválás. A T- vagy más néven PCP (peptidil hordozó fehérje) doméneknek kulcsszerepe van a közbelső termékek A- és C-domének közötti szállításában. Köztes módosítások esetén a T-domének más doménekkel is (epimerizációs, formil-transzferáz, N-metilációs, oxidáló, redukáló, ciklizációs) kapcsolódhatnak. A peptidkötés kialakulását az NRPS-ben a kondenzációs C-domén végzi. Mivel a peptidkötés kialakulása az NRPS központi reakciója, a C-domének szinte minden NRPS meghosszabbítási moduljában megtalálhatók. A tioészteráz (Te) domének katalizálják a

bioszintézis folyamat terminációs lépéseit, a peptid- vagy észter kötésekkel járó ciklizációkat vagy a hidrolízissel történő felszabadulást [10,11].

A nem-riboszómális peptidek szerkezete az aminosavak mellett tartalmazhat további szerkezeti elemeket is. Ilyenek például a különböző szénláncok, melyeket a PKS rendszerek integrálnak. Számos természetes anyagot a PKS rendszerek hoznak létre a zsírsav szintézishez hasonló módon, acetát- és/vagy propionát egységek összekapcsolásával. A PKS útvonalak felépítése hasonló az NRPS rendszer felépítéséhez, ami megkönnyíti az egyes modulok közti átmenetet. A poliketidek szintézise három PKS domént igényel. Az acil-transzferáz (AT) domén, amely a szubsztrátok (malonát-származékok CoA-tioészterei) kiválasztásáért felelős, analógiát mutat az NRPS rendszerekben található A-doménekkel. Ezek a szubsztrátok acil-hordozó fehérjéhez (ACP) kapcsolódnak. Az ACP-k a második alapvető egységei a PKS rendszernek, amelyek (az NRPS-ek T-doménjével analóg módon) szállítóegységekként szolgálnak. Végül a kondenzációs lépés során a szubsztrát Claisen kondenzációval kapcsolódik a növekvő lánchoz, amelyet egy ketoszintáz (KS) domén katalizál. A KS domén funkcióját tekintve tehát egyenértékű az NRPS-ek C-doménjével. A PKS modulok a minimális doméneken kívül tartalmazhatnak további módosító doméneket (ketoreduktáz, dehidratáz, enoilreduktáz), melyek a különböző telítetlen és alifás egységek kialakulásáért felelősek. A bioszintézis út végén a termék a Te-domén által katalizált úton kapcsolódik le a rendszerről [10,11].

A riboszómális peptidek a riboszómán keresztül szintetizálódnak és csak proteinogén aminosavakat tartalmaznak. A transzláció utáni módosítások miatt hasonlíthatnak a nem riboszómális peptidekhez. A cianobaktériumokban előforduló riboszómális peptidek egyik leggyakoribb csoportja a cianobaktinok. Ezek ciklikus vagy ritkán lineáris peptidek poszt-riboszómális peptidszintézis útján alakulnak ki, majd utólagos módosításokon mennek keresztül, hogy kialakulhasson a végső komplex szerkezetük [12]. Ezeket a vegyületek riboszómális úton szintetizált és poszt-transzlációs úton módosított peptidek (RiPP) néven is ismertek, de ide sorolhatók például a ciklikus patellamidok vagy a lineáris aeruginosamid is [13].

3.3. Cianotoxinok

A cianobaktériumok igen sokféle toxikus vegyületeket lehetnek képesek termelni (1. táblázat). A cianotoxinokat csoportosíthatjuk a szerkezetük szerint és a hatásaik alapján.

1. táblázat Az ismert cianotoxinok kémiai szerkezete, forrása és azok hatásai.

Cianotoxin	Kémiai szerkezet	Termelő cianobaktériumok	Hatás
Microcystinek	ciklikus heptapeptidek	<i>Microcystis</i> , <i>Anabaena</i> , <i>Nostoc</i> , <i>Planktothrix</i> , <i>Phormidium</i> , <i>Oscillatoria</i> , <i>Radiocystis</i> , <i>Gloeotrichia</i> , <i>Anabaenopsis</i> , <i>Rivularia</i> , <i>Tolypothrix</i> , <i>Hapalosiphon</i> , <i>Plectonema</i>	hepatotoxikus, tumor promóter, eukarióta protein foszfatáz PP1, PP2A és foszfoprotein foszfatáz PPP4 és PPP5 gátló
Nodularinok	ciklikus pentapeptidek	<i>Nodularia spumigena</i> , <i>Nostoc</i>	ua. mint a microcystineknél, ezen kívül gyengén karcinogén
Cylindrospermopszinok	triciklikus guanidin alkaloidok	<i>Cylindrospermopsis</i> , <i>Umezakia</i> , <i>Anabaena</i> , <i>Oscillatoria</i> , <i>Raphidiopsis</i> , <i>Aphanizomenon</i>	több szervre nézve toxikus, neurotoxikus, genotoxikus, protein szintézis gátló
Anatoxin-a	biciklikus alkaloidok	<i>Anabaena</i> , <i>Phormidium</i> , <i>Aphanizomenon</i>	neurotoxikus, kompetitív módon kötődik az acetilkolin receptorokhoz
Anatoxin-a(S)	foszforilált ciklikus N-hidroxiguanin	<i>Anabaena</i>	neurotoxikus, gátolja az acetilkolin-észterázt
Saxitoxinok	alkaloidok	<i>Aphanizomenon</i> , <i>Anabaena</i> , <i>Lyngbya</i> , <i>Cylindrospermopsis</i> , <i>Planktothrix</i>	neurotoxikus, blokkolja a feszültség függő nátriumcsatornákat
Lyngbyatoxinok, Aplysiatoxinok	indol alkaloidok	<i>Lyngbya</i> , <i>Oscillatoria</i> , <i>Schizothrix</i>	tumor promóter, kötődik az eukarióta protein kináz C-hez
BMAA, DAB	diaminosavak	sok nemzetség	neurotoxikus, fejlődési toxin, hibás beépülés fehérjékbe
LPS	lipopoliszacharidok	minden nemzetség	gyulladást okoz, elősegíti a citokin szekréciót

3.3.1. Microcystinek és nodularinok

A MCY-ek a leggyakrabban előforduló cianobakteriális toxinok. Szerkezetüket tekintve ciklikus heptapeptidek, az 5. pozícióban lévő egyedi aminosavat (Adda - 3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenildeka-4,6-diénsav) kivéve a molekula minden része variábilis valamilyen mértékben. Emiatt a MCY-eknek jelenleg több mint 200 variánsa ismert, melyeket a legvariábilisabb 2. és 4. pozícióban lévő aminosavak betűkódjaival különböztetnek meg egymástól (pl.: MCY-LR). Ha az alapszerkezethez képest a többi pozícióban mutatkozik eltérés, akkor azt előtagként szokás megadni (pl.: [MeSer7]MCY-LR). A nodularinok (NOD) szerkezetileg igen hasonlóak a MCY-ekhez, ám ezek ciklikus pentapeptidek, melyeknél az 5. pozícióban szintén Adda található. A variánsok elnevezése is hasonlóképpen történik, a 3. pozícióban lévő legvariábilisabb aminosav betűkódja utótagként, a többi helyen található eltérés előtagként szerepel (pl.: [dHb5]NOD-R). A két toxincsalád bioszintézis útja jól ismert, a szerkezeti hasonlóságokból adódóan mutatnak azonosságokat. Nem riboszómális úton szintetizálódó oligopeptidek, mind az *nda*, mind a *mcy* génklaszter tartalmaz NRPS és PKS géneket egyaránt. A MCY-ek és a NOD-ok hepatotoxinok, a protein foszfatázok (PP) specifikus gátlószerei. A MCY-ek kovalens kötődés útján gátolják az PP1, PP2A, PP3, PP4, és PP5 valamint kisebb mértékben a PP2B működését, míg a NOD-ok a PP1, PP2A és PP3 aktivitására vannak hatással, de nem kötődnek kovalensen az enzimhez. A PP1 és PP2A gátlása máj fehérjék hiperfoszforilációjához vezet, amelyek számos folyamatot befolyásolnak, mint például a metabolikus utak működését, a membrán transzportot, a kiválasztást, a sejtosztódást, a transzkripciót vagy a transzlációt. Ezen kívül tumor promóterek és oxidatív károsodást is okoznak. Továbbá a MCY-ekről tudjuk, hogy károsítják az endokrin rendszert, genotoxikusak és aktiválják a c-jun, c-fos, és c-myc proto-onkogéneket [2].

3.3.2. Cylindrospermopszinok

A cylindrospermopszinok (CYN) guanidin alkaloidok. Szerkezetük nem túl variábilis, összesen öt variánsuk ismert. A bioszintézisükért felelős génklaszter ismert, a *cyr* gének között találunk PKS és NRPS elemeket is. A CYN-ok széles spektrumú mérgező molekulák, különböző szerveket és metabolikus utakat befolyásolnak. Gátolják a fehérjeszintézist, a GSH szintézist, sejthalálhoz vezetnek, progenotoxikusak, károsítják az endokrin rendszert és oxidatív stresszt váltanak ki [2].

3.3.3. Anatoxinok

Az anatoxinok (ANTX) szerkezetük alapján tropán-alkaloidok, PKS útvonalon keresztül szintetizálódnak. Neurotoxinok, szokás őket nagyon gyors halál faktoroknak (VFDF) is nevezni, mivel a toxin szervezetbe kerülése után nagyon gyorsan halált okoz. Az ANTX-ok nikotin agonisták, a nikotinos acetilkolin receptorokhoz kötődnek, és ott is maradnak, mivel az acetilkolin észteráz enzim nem képes a toxint eltávolítani, így blokkolja az ingerület átvitelt. Az ANTX-ok befolyásolják a vérnyomást, a pulzust és a gázcserét, a mérgezések során acidózist, hipoxiát és légzés leállást rögzítettek [2].

Az ANTX-a(S) egy foszforilált ciklikus hidroxiguanidin, ami az egyetlen természetes szerves foszfát tartalmú molekula. A bioszintézis útja egyelőre ismeretlen, azonban feltételezik, hogy L-argininből indul ki. Hasonlóan a peszticidekhez és rovarirtó szerekhez, az ANTX-a(S) irreverzibilisen gátolja az acetilkolin észterázokat (AChE). Ennek következtében az ingerület közvetítő acetilkolin nem fog hidrolizálni, ami megakadályozza a posztzinaptikus membrán repolarizációját, így blokkolva az ingerület átvitelt. Emlősnél a mérgezés következtében kialakuló görcsök és légzésleállás okozza a halált [2].

3.3.4. Saxitoxinok

A saxitoxinok (STX) alkaloid típusú neurotoxinok, jelenleg 57 variánsuk ismert. A bioszintézisért felelős génklasztert az utóbbi időben sikerült azonosítani, a különböző termelő szervezetekből származó sxt génklaszterben a variábilis géneken túl 14 közös központi gén található. Az STX-ok erős neurotoxinok, blokkolják a feszültség függő nátrium ioncsatornákat az idegsejtekben. A közelmúltban felfedezték, hogy az STX-ok kötődnek a kálium- és kalciumcsatornákhöz is. Az STX-ok ember általi elfogyasztása ún. bénulósos kagylómérgezés (PSP) szindrómához vezet, ami súlyos esetekben légzési elégtelenség következtében halált okoz [2].

3.3.5. β -N-metilamino-L-alanine és változatai

A β -N-metilamino-L-alanine (BMAA) kémiai szerkezetét tekintve egy 2-amino-3-metilaminopropánsav, melynek több természetes izomere is létezik. Ezek a molekulák tehát azonos molekula képlettel ($C_4H_{10}N_2O_2$) és azonos molekula tömeggel jellemezhetők. Ezek az anyagok neurotoxinok, az AMPA/kainát receptorokat célozzák meg. A BMAA képes karbamátokat képezni, ami nagyon hasonló a glutamáthoz, így kötődhetnek a glutamát receptorokhoz és ezáltal toxikusak a motoros neuronokra [2].

3.4. Cianobakteriális bioaktív anyagok

A cianobaktériumok képesek különböző típusú, ún. biológiailag aktív (bioaktív) anyagokat előállítani. Ezen metabolitok kémiai és szerkezeti változatossága nagyon különböző biológiai aktivitásokban tükröződik. A legjelentősebb bioaktív anyagok peptidek, retinoidok, alkaloidok, laktonok és foszfolipidek. Ezek a metabolitok többnyire NRPS és PKS útvonalakon keresztül szintetizálódnak, és annak ellenére, hogy egy részük hasonló kémiai szerkezettel rendelkezik, mégis másképpen nevezték el őket. Ezeknek a heterogén vegyületcsoportoknak különféle jelentőségük lehet, például hasznosak lehetnek a gyógyászat szempontjából, hiszen közöttük számos olyan anyag található, melyek antimikrobiális, tumorellenes hatása jól ismert. Egyes enzimműködést gátló vegyületek a gyógyszerfejlesztés és gyógyszergyártás kiindulópontjai lehetnek [2,10,14,15]. A legjelentősebb peptid típusú bioaktív metabolitokat a 2. táblázat foglalja össze.

2. táblázat A legfontosabb bioaktív metabolit családok és hatásaik.

Metabolit család	Termelő cianobaktériumok	Biológiai aktivitás
Aeruginosinok	<i>Microcystis, Planktothrix, Nodularia</i>	szerin-proteáz gátlók
Anabaenopeptinek	<i>Anabaena, Aphanizomenon, Microcystis, Planktothrix, Plectonema, Nodularia, Schizothrix</i>	protein foszfatáz gátlók, karboxipeptidáz A gátlók, elasztáz gátlók
Biogén aminok	minden nemzetség	vérnyomás szabályzók
Cyanopeptolinok	<i>Anabaena, Lyngbya, Microcystis</i>	citotoxikus hatás, szerin-proteáz gátlók
Cryptophycinek	<i>Anabaena, Lyngbya, Microcystis, Planktothrix, Scytonema</i>	citotoxikus hatás, szerin-proteáz gátlók
Dolastatinok	<i>Anabaena, Lyngbya, Microcystis, Planktothrix, Scytonema</i>	citotoxikus hatás, szerin-proteáz gátlók
Micropeptinek	<i>Anabaena, Lyngbya, Microcystis, Planktothrix, Scytonema</i>	citotoxikus hatás, szerin-proteáz gátlók
Microviridinek	<i>Microcystis, Planktothrix, Nostoc</i>	szerin-proteáz gátlók
Microgininek	<i>Microcystis, Planktothrix, Nostoc</i>	proteáz gátlók
Cyclamidok	<i>Lyngbya, Microcystis, Nostoc, Oscillatoria</i>	

3.4.1. Aeruginosinok

Az aeruginosinok (AER) lineáris tri- illetve tetrapeptidek, melyeknek több rokon elnevezése ismert. Összesen több mint 50 rokon vegyület tartozik ebbe a csoportba. Ezek közös szerkezeti jellemzője, hogy az N-terminálison többnyire valamilyen tejsav származék, a C-terminálison pedig valamilyen arginin származék található (1/A. ábra). A molekula központi

részen lévő egyedi indol származék valamint a tejsav származék gyakran halogénezett. Az AER-okhoz szerkezetileg nagyon hasonló dysinosinok és banyasid típusú glikopeptidek esetében az N-terminálison egy glicerinsav-szulfát származék található. Utóbbi csoport tagjainál a molekula központi részén egy biciklononán és egy hozzá kapcsolódó glükóz egység figyelhető meg. Az AER-ok a szerin-proteázok gátlószerei, ezáltal megakadályozzák a fehérjék lebontását. A cianobakteriális másodlagos metabolitok között ezek gátolják legnagyobb mértékben a plazmin és trombin típusú szerin proteázokat. Gátolják továbbá a tripszin típusú szerin proteázokat is [2,10].

3.4.2. Anabaenopeptinek

Az anabaenopeptinek (ABP) szerkezetileg igen diverz ciklikus hexapeptidek, jelenleg több mint 150 variánsuk ismert és folyamatosan azonosítanak újabb változatokat. A molekulát alkotó aminosavak közül 5 egy gyűrűt alkot, melyhez egy ureido-csoporton keresztül kapcsolódik egy többnyire leucinból, tirozinból, fenilalaninból vagy argininből álló oldallánc. A molekula minden része variábilis, kivéve a 2. pozícióban lévő lizint. A lizin biztosítja a gyűrű kialakulását és rajta keresztül kapcsolódik az oldallánc is a gyűrűhöz. A 3. pozícióban leggyakrabban valin vagy leucin aminosavak, a 4. és 5. pozícióban pedig homo-aminosavak illetve N-metilált aminosavak találhatók (1/B. ábra). Az ABP-ek a toxikus proteáz és foszfatáz gátlók egy csoportja, amelyek befolyásolják a tripszin, kimotripszin, elasztáz, karboxipeptidáz A típusú szerin proteázok valamint a PP1 és PP2A aktivitást. Az ABP-ek proteáz gátló aktivitását nagymértékben befolyásolja az aminosavak konfigurációja [2,10].

3.4.3. Microgininek

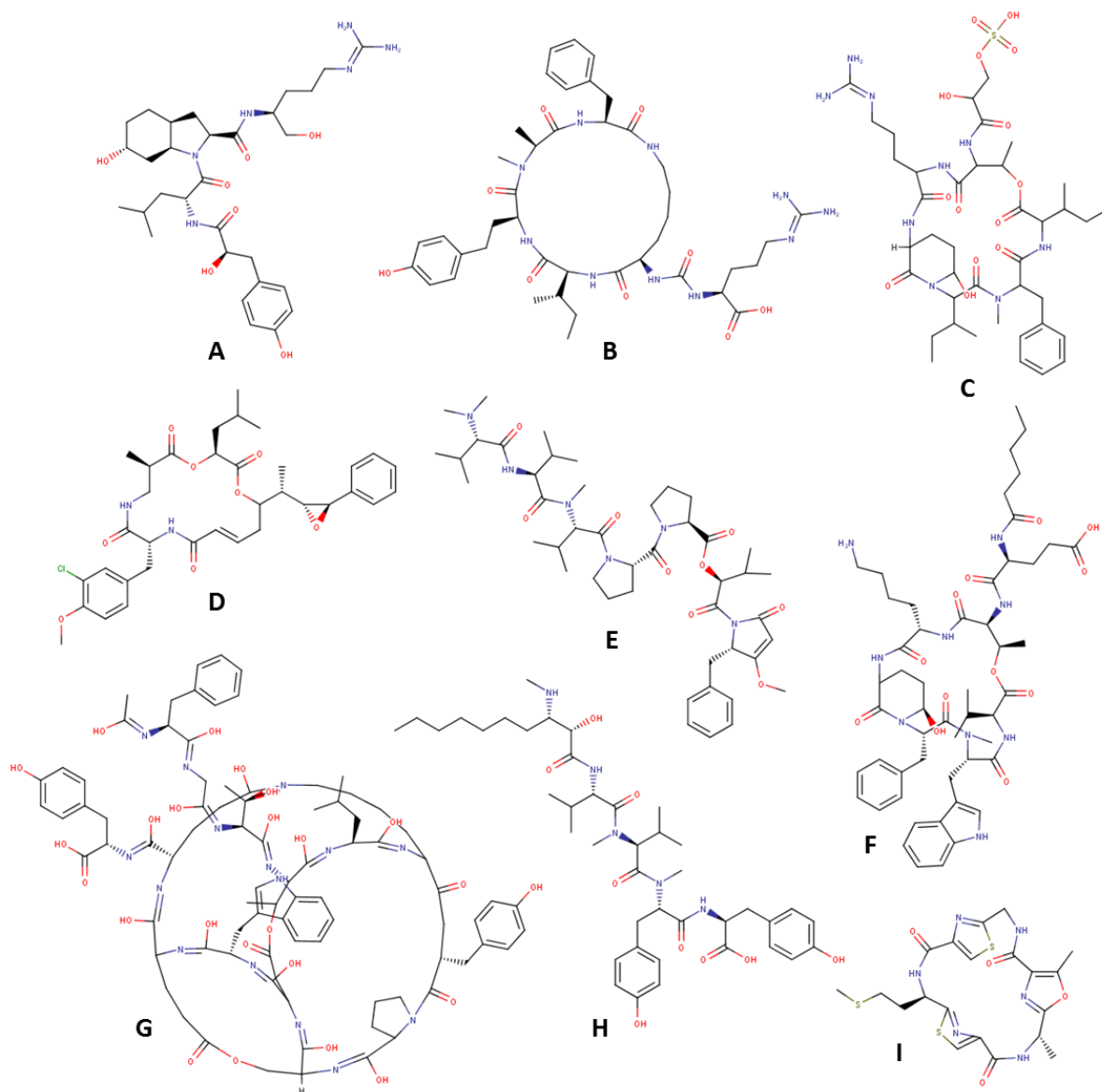
A microgininek (MG) lineáris oligopeptidek, általában négy vagy öt aminosavból állnak, de ritkán lehetnek hexapeptidek. Ezek a molekulák jellemzően egy α -hidroxi- β -amino-dekánsavat tartalmaznak az 1. pozícióban, mely lehet halogénezett. A molekula C-terminálisán általában egy vagy két tirozin/fenilalanin található, valamint a 3. és 4. aminosavak gyakran N-metiláltak (1/H. ábra). A MG-ek közé tartoznak továbbá a cyanostatinok, az oscillagininek és a nostogininek, utóbbiak esetében az N-terminálison egy α -hidroxi- β -amino-oktánsav található. A MG-ek gátolják a cink-metalloproteázok működését. Az angiotenzin-konvertáló enzim működésének gátlása révén jelentőségük lehet a magas vérnyomás kezelésében. Továbbá hatással vannak más aminosavak (pl.: leucin és bovine) működésére is [2,10].

3.4.4. Depsipeptidek

A depsipeptidek olyan peptid típusú metabolitok, melyekben egy vagy több amid kötés helyén észter kötés található. A cianobaktériumok képesek mind lineáris mind ciklikus depsipeptideket szintetizálni, ezek nagy szerkezeti variabilitást mutatnak és változatos biológiai aktivitással bírnak. A csoportba tartoznak a cryptophycinek (1/D. ábra), melyek potenciális rákellenes szerekként ígéretes terápiás tulajdonságokkal rendelkeznek. Több változatuk is rendelkezik gyógyszerrezisztens tumor-szelektív citotoxikus hatással. A dolastatinok (1/E. ábra) szintén depsipeptidek (lineáris és ciklikus), sejtosztódást gátló hatásúak, a mikrotubulusokhoz kapcsolódva (vinca kötő helyek) gátolják azok összeszerelődését és apoptózishoz vezetnek a G2/M átmenet során. A micropeptinek (1/F. ábra) és cyanopeptolinok (1/C. ábra) a cianobaktériumok által termelt legdiverzebb depsipeptidek, ez idáig 142 variánsuk ismert, hatásukat tekintve tripszin és kimotripszin, valamint elasztáz típusú szerin proteázok gátlószerei. A microviridinek (1/G. ábra) riboszómális úton szintetizálódó három gyűrűs depsipeptidek, 12-14 aminosavból állnak, melyek nagy része konzervált, a 2., 3. és 5. pozíciók a variábilisak. Összesen 17 variánsuk ismert, legtöbbjük a szerin proteázok (főként elasztáz) működését gátolja [2,10].

3.4.5. Cyclamidok

Változatos szerkezettel rendelkező metabolitok tartoznak ebbe a nagyjából 50 tagot számláló csoportba, melyek közös jellemzője, hogy tiazol és/vagy oxazol egységeket tartalmaznak (1/I. ábra). A csoportba tartozó vegyületek hatásáról, funkciójáról jelenleg nem sokat tudunk [2,10].



1. ábra A legfontosabb bioaktív metabolit családok szerkezeti variabilitása. A: aeruginosin 298-A; B: anabaenopeptin F; C: cyanopeptolin S; D: cryptophycin 1; E: dolastatin 15; F: micropeptin T2; G: microviridin B; H: microginin 478; I: nostocyclamid.

3.5. Cianobakteriális metabolitok gyógyászati jelentősége

Az emberiség már évezredek óta használ természetes eredetű készítményeket a különféle betegségek kezelésére. Ezek a készítmények kiváló forrásai különféle bioaktív vegyületeknek, amelyek kiindulási alapként szolgálhatnak a gyógyszeripar számára. Az ismert hatással rendelkező komponensek szerkezeti sablonokként használhatók új fél-szintetikus vagy szintetikus gyógyszerek előállításánál. Az utóbbi évtizedekben a cianobaktériumok ilyen jellegű alkalmazhatóságát széles körben vizsgálták, és számos lehetséges antimikrobiális, rákellenes, antivirális és gyulladásgátló hatású vegyületet azonosítottak [16].

A cianobaktériumok egyes törzseit már használják az iparban, ilyenek például az ehető *Arthrospira* (*Spirulina*) és a *Nostoc*. A *Spirulina*-t étrend-kiegészítőként használják magas fehérje, többszörösen telítetlen zsírsav, antioxidáns (fikocianin és karotinoidok) és vitamintartalma miatt. Egyes másodlagos metabolitok természetes összetevőkként használhatók a kozmetikai iparban. A pigmentek, például karotinoidok és fikobiliproteinek felhasználhatók természetes színezékeként és antioxidánsként egyaránt. A mycosporin-szerű aminosavak és scytoneminek krémekbe keverve megvédik a bőrt az UV sugárzás káros hatásaitól [17,18].

A rák terápiájában jelenleg alkalmazott kemoterápiás kezeléseknek súlyos, életveszélyes mellékhatásaik lehetnek, illetve rezisztens rákos sejtek kialakulásához vezethetnek. A természetes eredetű alternatívák lehetőséget adnak új, hatékony és kevésbé ártalmas gyógyszerek kifejlesztésére [19,20]. Egyes vegyületek esetén nagyon ígéretes farmakológiai eredményeket tapasztaltak, és többet közülük klinikai vizsgálatok II. és a III. fázisában tesztelnek. A cianobaktériumok által termelt citotoxikus metabolitok általában az eukarióta sejtekben lévő tubulin- vagy aktin szálakat célozzák meg, ezáltal ígéretes jelöltek lehetnek rákellenes szerek kifejlesztésében. Ilyenek például a *Leptolyngbya* és a *Symploca* fajokban található cryptophycinek és dolastatinok [16,21]. Egyes cryptophycin analógokat (a cryptophycin 249 vagy a cryptophycin 309) jelenleg I. fázisú humán klinikai vizsgálatokban tesztelnek, és szintetikus cryptophycin analógokat is bevontak már a humán klinikai vizsgálatokba. Több dolastatinszármazékot (pl. a dolastatin 10 és dolastatin 15) II. fázisú humán klinikai vizsgálatokban tesztelnek [22-25]. Az apratoxinok, például a *Lyngbya majuscula*-ból származó apratoxin-A, hibrid NRPS-PKS útvonalon keresztül szintetizálódó vegyületek. Citotoxikus hatásúak, a sejtciklus G1 fázisába avatkoznak be és ezáltal apoptózist indukálnak [20]. Az apratoxin-A figyelemre méltó citotoxikus hatást mutatott 60 különböző daganatos sejtvonalon *in vitro* és *in vivo* egyaránt.

Egyes cianobaktérium metabolitok proteáz gátlókként működnek. A proteázok által kiváltott intra- és extracelluláris proteolitikus folyamatok kulcsszerepet játszanak a daganatok kialakulásában, és az áttétképződésben. Ezekben a folyamatokban számos proteáz van jelen, melyek közül a szerin proteázok (kimotripszin, tripszin, plazmin, elasztáz stb.), az aszparagin proteínázok (katepszin D és E) és a metalloproteínázok (mátrix metalloproteínázok, kollagenázok stb.) kiemelt jelentőségűek [26]. Ezen proteázok gátlása alternatív célpont lehet a rákos növekedés szabályozásában. Linington és mtsai. [27] szerint a bázikus egységeket (lizin

és arginin) tartalmazó kisméretű cianobakteriális peptidek kötődhetnek a tripszin, trombin vagy plazmin fehérjékhez és gátolhatják azok működését. A hidrofób részeket (tirozin, fenilalanin, triptofán) tartalmazó változatok célpontjai a kimotripszin és elasztáz enzimek lehetnek.

A cianobaktériumok által termelt különféle antibakteriális metabolitok hatékonyak a gram-negatív és a gram-pozitív baktériumok ellen egyaránt. Az antibakteriális rezisztencia korában az új gyógyszerek nélkülözhetetlenek a bakteriális fertőzések leküzdésében. Az indol-alkaloidok hapalindol típusú csoportja antibakteriális és antifungális hatással rendelkezik [28]. Érdekes módon néhány metabolit erősen gátol specifikus parazitákat vagy kórokozókat. Az ilyen metabolitok hatása kifejezetten a célszervezettel kapcsolatos útvonalak megszakításában rejlik, ezért az ilyen metabolitok nem váltanak ki semmilyen mellékhatást a gazdaszervezetre. Ezen kívül egyes cianobakteriális metabolitok (calothrixinek, symplocamid A, venturamidok, crossbyanol, lobocyclamidok) a rezisztens paraziták (*P. falciparum*, *T. cruzi*, *L. donvani*), illetve rezisztens baktériumok és gombák (*S. aureus*, *C. albicans*, *C. glabrata*) ellen is hatékonyak [29].

A halálos vírusos betegségek, például a HIV okozta szerzett immunhiányos szindróma komoly egészségügyi problémát jelentenek és az ilyen betegségek esetén jelentős igény mutatkozik új, hatékony és biztonságos vírusellenes szerek iránt. A jelenleg alkalmazott HIV-ellenes kezelés (antiretrovirális terápia), bár hatékonyan képes a HIV-fertőzés progressziójának megakadályozására, toxikusnak bizonyult, erős vírusrezisztenciát vált ki, és nem képes maradéktalanul elpusztítani a kórokozót [30]. A cianobaktériumok által termelt egyes vegyületek erős antivirális hatással rendelkeznek, gyógyászati szempontból ígéretesek lehetnek. A legjelentősebb antivirális aktivitású poliszacharidok a *Spirulina* sp. eredetű spirulan és Ca-spirulan. Ezek a vegyületek széles spektrumú aktivitást mutattak HIV-1, HIV-2, H, influenza és más vírusok ellen. Gátolják a HIV-1 reverz transzkriptáz aktivitását. Ezek a szulfatált poliszacharidok megakadályozzák a vírus-sejt kötődést és a gazdasejtekkel való fúziót. Ezenkívül gátolják a HIV-fertőzött és a nem fertőzött limfociták fúzióját [31]. Ugyancsak figyelemre méltó a *Nostoc flagelliforme* savas poliszacharidja, a nostoflan, amely erős antivirális aktivitást mutat a herpes simplex vírus-1 ellen. Jelenleg az antivirális gyógyszerkutatásban két hatékony szénhidrátkötő protein, a cianovirin-N és a scytovirin, áll fejlesztés alatt. Ezek a szénhidrátkötő fehérjék a vírusfúziós folyamat különféle pontjain keresztül fejtik ki antivirális hatásukat [32].

3.6. A *Microcystis* fajok jellemzői és előfordulása

A *Microcystis* az egyik legszélesebb körben vizsgált cianobaktérium nemzetség, hiszen édesvízi környezetben majdnem minden kontinensen képes akár mérgező vízvirágzást képezni. Egysejtűek, de a sejtek legtöbbször kolóniákat alkotnak, amelyet nyálkaburok tart össze. A fajok egyik legfontosabb jellemzője a gázvezikulumok jelenléte, amely lehetővé teszi a felhajtóerő szabályozását és a sejtek üledékből való visszatérését a vízoszlopba [33]. A mérsékelt égövi térségben a *Microcystis* fajok tipikus éves ciklusuk során a nyári virágzást követően ősszel leülepednek, és a téli időszakot az üledék felső rétegeiben vészlik át. A sejtek tavasszal újból belépnek a vízoszlopba és megfelelő körülmények között újabb vízvirágzást idéznek elő [34]. A *Microcystis* fajok által okozott vízvirágzások száma nőtt az elmúlt évtizedekben, és a közeljövőben várhatóan tovább növekszik majd [35]. Magyarországon a 20. század eleje óta figyelhetők meg kisebb-nagyobb méretű *Microcystis* vízvirágzások például a Balatonban (2. ábra) vagy a Velencei-tóban [36]. A nemzetségben belül nagymértékű genetikai sokféleségről, és több különböző genotípus jelenlétéről számoltak be korábbi tanulmányokban [37-45]. Fontos megjegyezni, hogy a kolónia/sejt morfológia alapján leírt számos faj létezését nem támasztják alá molekuláris bizonyítékok, ezek a majdnem azonos 16S rRNS génszekvenciáik alapján egy csoportot képeznek [46,47]. Az alacsony 16S rRNS szekvencia variabilitás és a DNS-DNS hibridizációs adatok alapján Otsuka és mtsai. [48] azt javasolják, hogy az összes morfológiai alapon elkülönített fajt a bakteriológiai kódex szabályait követve egyesítsék egyetlen fajba.



2. ábra *Microcystis* fajok okozta vízvirágzás a Balatonban (2015. augusztus).

Az éghajlatváltozás és a vizek tápanyag tartalmának nagymértékű megnövekedése számos cianobaktérium faj különféle geno- és kemotípusainak világméretű elterjedéséhez vezetett [49], melyek (beleértve a *Microcystis* spp.) komoly környezeti változásokat és egészségügyi problémákat okozhatnak [50-55]. A *Microcystis* fajok által termelt íz- és illatanyagok illetve a különféle mérgező anyagok jelentősen ronthatják az ivóvíz minőségét, és ezért óriási gazdasági és egészségügyi hatással bírnak. Ezek az élőlények a hepatotoxinok, különösen a MCY-ek termelőjeként ismertek. Ezek a toxinok felelősek a vízvirágzás során bekövetkező makro-gerinctelen közösségek fajgazdagságának csökkenéséért, a halak, és esetenként a vadon élő és haszonállatok pusztulásáért. A *Microcystis* fajokról ismert, hogy egyéb biológiailag aktív metabolitok (pl.: ABP-ek, MG-ek, AER-ok, cyanopeptolinok, microviridinek) termelésére is képesek lehetnek [33,56].

3.7. A *Nostoc* fajok jellemzői és előfordulása

A *Nostoc* fajok heterocisztás, fonalas cianobaktériumok. Szinte minden körülmények között megtalálhatók az egész világon. A telepek mérete lehet mikroszkopikus és makroszkopikus is [1,57]. Nitrogént kötő cianobaktériumként a *Nostoc* fajok szerepet játszanak a talaj termékenységének fenntartásában, és sok országban felhasználják őket „zöldtrágya”-ként. A trópusi és szubtrópusi régiókban a rizsföldeken az elárasztás után a *Nostoc* fajok tömeges elszaporodását lehet megfigyelni, ami jelentősen hozzájárul a talaj termékenységének fokozásához és növeli a rizs hozamát [57]. A *Nostoc* fajok a szimbiotikus interakciók egyik leggyakoribb fotoszintetikus partnerei [1,57,58]. Szimbiotikus *Nostoc* törzsek előfordulhatnak mohákban [59,60], páfrányokban, cikászokban és zuzmókban [61]. A *Nostoc flagelliforme* nagy gazdasági értéket képvisel. Gyógyászati jelentősége ősi idők óta ismert, és mintegy 2000 éve használják élelmezésre. A *Nostoc commune*-t sok országban emberi táplálékként fogyasztják, mert rostokban és fehérjékben gazdag [17,62].

A gyeptársulások a hagyományos tájak nélkülözhetetlen elemei, és nagyon fontosak a biodiverzitás megőrzésének szempontjából. A természetes gyepek mérete és fajgazdagsága a mezőgazdaság intenzívebbé válása, az urbanizáció és a hagyományos földhasználati gyakorlatok visszaesése következtében Európában csökkent. A földhasználati rendszerekben bekövetkezett jelentős változások ellenére a közép-európai alkalikus gyepek kiterjedt állományai jó természetvédelmi állapotban maradtak. Ezeket a területeket legelőként használják, mivel gyenge minőségűek és az ingadozó vízviszonyok miatt nem alkalmasak szántóföldi növénytermesztésre [63]. Szárazföldi cianobaktériumok szinte minden lúgos élőhelyen megtalálhatók. Kontinentális körülmények között ezeket a területeket tavasszal víz borítja, de a nyár második felére kiszáradnak, a sótartalom közepes és magas között változik. Európában ezek az élőhelyek közel 210 000 ha területet foglalnak el, amely szinte teljes egészében (> 98%) Magyarországon található. A *Nostoc* fajok kolóniái tavasz elején jelennek meg, amikor a talaj felszínét elárasztja a víz. A duzzadt telepek nyálkarétegeket képeznek, amelyek a nyár folyamán kiszáradnak (3. ábra) [64]. A *Nostoc* fajok megtalálhatók az alkalikus sztyepp, gyepek és rét társulásokban egyaránt [65] (F1. ábra). Ezek az élőhelyek általában heterogén mozaik komplexet alkotnak a tájban.



3. ábra Az Alföldön megfigyelhető *Nostoc* telepek. A felvételek Ágota pusztán (I. helyszín) készültek a 6-os (a), 14-es (b) 15-ös (c) és 16-os (d) számú mintavételi helyeken.

A sós- és édesvízi ökoszisztémákhoz képest sokkal kevesebb kutatás folyik a szárazföldi és a szimbióta cianobaktériumok által termelt metabolitokkal kapcsolatban [60,66-68]. Ezeknél több esetben a hatások nem magyarázhatóak pusztán a kivonatok toxin tartalmával, ami arra utal, hogy más bioaktív metabolitokat is figyelembe kell venni a vizsgálatokban és a kockázat értékelésekben [69-71]. A *Nostoc* fajok különféle típusú metabolitok forrásai lehetnek, amelyek jelentős gyógyászati jelentőséggel bírnak [72]. Különféle szénhidrátok, lipidek, pigmentek, mono- és poliszacharidok, terpenoidok és aromás vegyületek jelenlétét írták már le *Nostoc* fajokból [72-76]. Egyes terpenoidok, mint például a noscomin és a comnostinok, antibakteriális hatásúak különféle baktériumokkal szemben [77-80]. Az emberi fogyasztásra is alkalmas *N. flagelliforme* poliszacharidokban gazdag kivonata tumorellenes aktivitást mutatott [81,82]. Szerkezetileg különféle típusú peptidek és aminosav származékok (cryptophycinek, nostofungicidin, nostopeptolidok, nostogininek (NG), nostocyclin, nostocyclamidok, nostopeptinek, nostocyclopeptidek, ABP-ek, MCY-ek, stb.) termelése

jellemző a *Nostoc* nemzetség tagjaira, melyek széles körű farmakológiai aktivitással (antimikrobiális, citotoxikus, enzimműködést gátló) bírnak [72].

3.8. Metabolomikai vizsgálati módszerek

A metabolomikai vizsgálatokban hatékonyan alkalmaznak több analitikai módszert, amelyek egyesítik a nagy felbontású elválasztást a szelektív kimutatási eszközökkel. Ideális esetben több technológiát kombinálnak, hogy kiterjesszék az egyes technológiák határait, és hogy ellenőrizzék az átfedő metabolitok jeleit. A legfontosabb kritériumok, amelyeket általában figyelembe vesznek az ilyen vizsgálatok során az 1, a vizsgálandó metabolitok tartománya; 2, az elválasztás és a kimutatás szelektivitása; 3, az ismert metabolitok egyértelmű azonosíthatósága; 4, valamint az újonnan felfedezett, de ismeretlen metabolitok természetének megvilágítási lehetősége. A cianobaktérium-metabolom elemzéséhez jelenleg alkalmazott elválasztási technológiák a kapilláris elektroforézis (CE), a folyadékkromatográfia (LC) és a gázkromatográfia (GC) [83]. A CE jól alkalmazható a töltéssel rendelkező vegyületek - például a szerves savak, foszfátok és nukleotidok - elválasztására [84]. A töltésre vonatkozó korlátozás nem vonatkozik a GC-re és az LC-re. Az ultra magas nyomású folyadék kromatográfia (UPLC) alkalmazása során a hagyományos LC beállításokhoz képest hatékonyabb mértékű elválasztás érhető el. A poláros cianobakteriális metabolitok elválasztásához széles körben alkalmaznak normál vagy fordított fázisú LC módszereket [85,86]. Az LC módszereket gyakran korlátozzák az alacsony molekulatömegű metabolitok szétválasztási problémái, ezért gyakran a nagyobb méretű elsődleges és másodlagos metabolitok vagy komplex lipidek elemzéséhez igazítják őket. A GC elemzések kezdetben az illékony vegyületekre koncentráltak, de a lefedettség kibővíthető a különféle metabolitok, például cukrok, aminosavak, szerves savak és foszfátok illékony termékekké történő kémiai származék képzésével [87]. Ez a technológia lehetővé teszi a kémiai metabolitok széles skálájának elemzését egyetlen futtatás során. A metabolitok azonosításának módja többnyire az alkalmazott tömegspektrometriás (MS) technológiáktól függ. A CE-t és az LC-t általában lágy ionizációs MS technológiákhoz kapcsolnak, mint például az elektropray (ESI-MS) vagy az atmoszférikus nyomású kémiai ionizáció (APCI-MS), amelyek fenntartják az adott metabolit protonált (pozitív ion mód) vagy deprotonált (negatív ion mód) molekuláris ionját. Ezek azután olyan MS rendszerekhez kapcsolódnak, amelyek nagy felbontást és pontosságot biztosítanak. A pontos tömegérzékeléssel rendelkező modern, nagyfelbontású műszerek, például TOF/MS,

FT-MS ionciklotron vagy Orbitrap FT-MS manapság lehetővé teszik, hogy nyers kivonatokban több száz vegyületet azonosítsanak, a kimutatott tömegek elemi képlettel történő számításával kombinálva [88]. Mivel a metabolitok azonosításának fő kritériuma a detektált metabolit pontos tömege, ezért az ilyen típusú vizsgálatok során a kémiai izomereket nem lehet megkülönböztetni, mivel ezek azonos molekulaképlettel és következésképpen azonos molekulatömeggel rendelkeznek. Ezzel ellentétben a GC-t általában az elektron-ütközéses ionizációval (EI-MS) kapcsolják, amely nagymértékben ismételhető és összetett molekula részeket, fragmenteket generál, amelyek alkalmasak tömegspektrum könyvtárakhoz való automatizált illesztési eljárásokhoz [83]. Habár az MS elegendő adatot szolgáltat egyes metabolitok szerkezetének meghatározásához, erre a célra a legpontosabb módszer mégis a mágneses magrezonancia spektroszkópia (NMR). Az NMR technológiák segítségével olyan szerkezeti információkhoz juthatunk, amelyek feltárják az atomok helyzetét az új vegyületekben. Az elmúlt években sikerrel alkalmaztak cianobaktérium extraktumok szerkezeti elemzésére egy módszert, amely kombinálja az MS és az NMR detektálását [89].

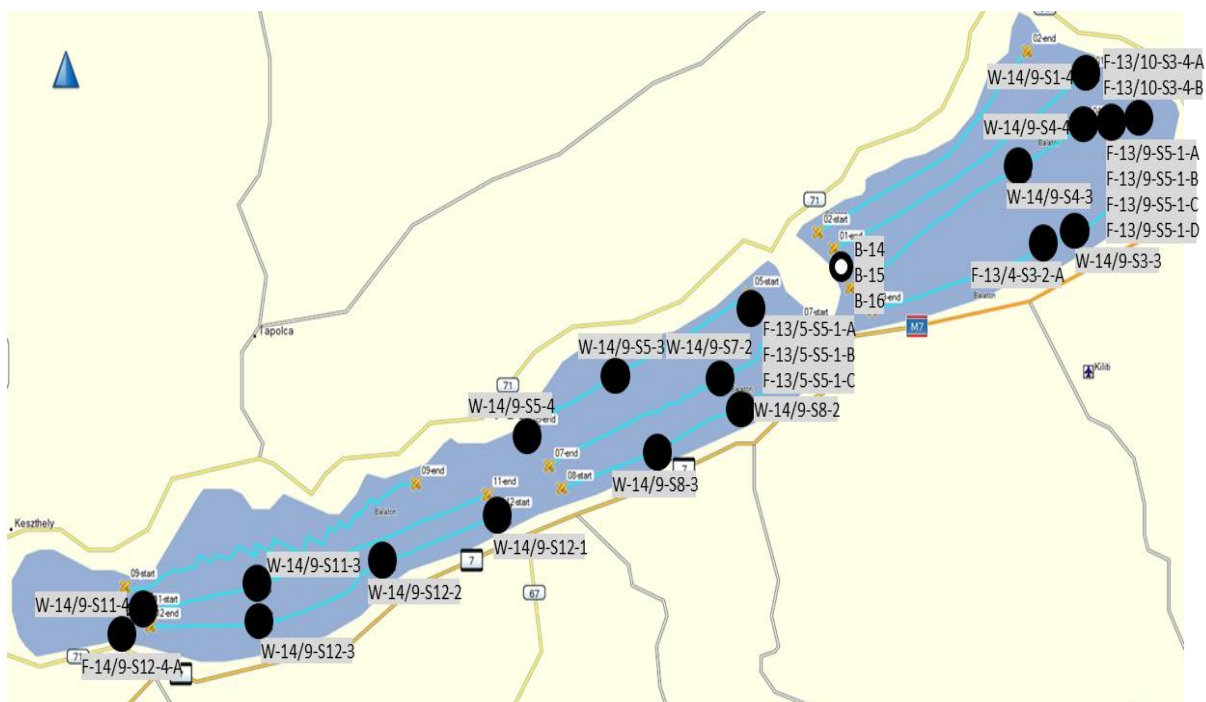
Az LC-MS és GC-MS módszerek rendkívül komplex, ugyanakkor reprodukálható kromatogramokat eredményeznek. A metabolomikai adatelemzés első lépése a kromatogram fájlok előzetes átalakítása numerikus adatmátrixokká, amelyek később felhasználhatók statisztikai adatok elemzésére. A feldolgozás végeredményeként kapott korrigált numerikus táblázat már készen áll a statisztikai adatok elemzésére és megjelenítésére. Az elemzés végső lépése a megfigyelt ismeretlen vegyületek tömegének és retenciós idő adatainak ismert metabolitokkal való összekapcsolása. Az azonosítási folyamat az egyes adatbázisokban hasonlósági keresés révén érhető el, melyeket emberi felügyelet mellett szoftverek támogathatnak [83].

4. Anyag és módszer

4.1. Balatoni *Microcystis* törzsek vizsgálata

4.1.1. Mintavételezés, izolálás és tenyésztés

A Balatonból 2013-ban (április, május, június, szeptember és október hónapokban) a helyi halászati társaság és az MTA Balatoni Limnológiai Kutatóintézet segítségével vízmintákat gyűjtöttünk. Kémiai és biológiai vizsgálatok valamint *Microcystis* fajok izolálása céljából merítéssel vízmintákat vettünk a felső vízrétegből minden egyes transzekt elején, egyharmadánál, kétharmadánál és végénél (4. ábra). 2014 és 2016 között a nyári időszakban (július-augusztus) *Microcystis* fajok nagyobb mértékű megjelenése volt megfigyelhető a Balatonban. Ezeket a vízvirágzásokat is évente egy-egy alkalommal megmintáztuk. Összesen 25 vízmintából izolált *Microcystis* sejtvonalat és 3 vízvirágzás mintát vizsgáltunk meg, ezek eredetét a 4. ábrán jelöltük.



4. ábra A vizsgálatban szereplő izolált *Microcystis* törzsek származási helyei (telt körök) és a vízvirágzás minták begyűjtési helyei (üres kör).

A vízmintákat nitrát tartalmú Allen [90] tápoldattal kevertük és 5 napig inkubáltuk, majd a látható *Microcystis* kolóniákat összegyűjtöttük és a továbbiakban ezeket nitrát tartalmú tápoldatban, 26 °C-on, állandó megvilágítás mellett ($100 \text{ lux m}^{-2}\text{s}^{-1}$) tenyésztettük és hetente

friss tápoldatba oltottuk. A további vizsgálatok előtt a begyűjtött vízvirágzás mintákat, valamint az izolált sejtvonalakat fénymikroszkóp segítségével is megvizsgáltuk.

Az egyhetes tenyészetekből a sejteket centrifugálással gyűjtöttük össze (Beckman Avanti J-25, 4500 g), majd ezeket fagyasztva szárítottuk (Christ Alpha 1-2 LD plus). Minden egyes szárított mintából 25 mg-ot 80%-os metanollal extraháltunk. Centrifugálás (Beckman Avanti J-25, 21000 g) után a felülúszókat HPLC-ESI-MS/MS módszerrel vizsgáltuk.

4.1.2. Cianobakteriális peptidek azonosítása

A méréseket egy Thermo LTQ XL lineáris ioncsapda tömegspektrométerrel kapcsolt Thermo Accela HPLC készülékkel végeztük. A minták komponenseit Kinetex XB-C18 oszlopon (100 mm × 2,1 mm × 2,6 µm) választottuk szét víz (A) - acetonitril (B) gradiens segítségével. Mindkét oldószer 0,1% hangyasavat tartalmazott, a gradiens lépései: 10-70% B: 0-10 perc; 70-100% B: 10-11 perc; 100% B: 11-16 perc; 100-10% B: 16-18 perc; 10% B: 18-20 perc. Az injektált minta térfogata minden esetben 1 µl volt. Az MS mérés pozitív ion módban történt, az ESI ionizáció paraméterei a következők voltak: a hőmérséklet: 250 °C; porlasztógáz: N₂; áramlási sebesség: 10 arb; aux gázáramlási sebesség: 5 arb; spray feszültség: 5 kV; kapilláris hőmérséklet: 375 °C; kapilláris feszültség: 35,00 V. Az adatokat Thermo Excalibur v2.2 SP1.48 és mzMine 2.11 programok segítségével értékeltük ki. Az egyes metabolitok azonosítása MS/MS fragmentációs mintázatok alapján irodalmi adatok felhasználásával [10,91-93] történt.

4.1.3. Statisztika

Az azonosított peptideket célzott csúcskereséssel integráltuk mzMine 2.11 segítségével [94]. Ezt követően, a kapott értékeket R 3.5.0-ban minden tulajdonságra külön-külön skáláztuk [95]. Az adatkészletet mindkét dimenzióban (minták, metabolitok) Minkowski távolság alapján Ward-módszerrel hierarchikusan csoportosítottuk. A hőtérképen a tengelyek megjelenési sorrendje a klaszterezésből következik. A szín erőssége arányos volt a csúcs alatti területek log₁₀ értékével, míg a színárnyalat a metabolit osztály függvénye: ABP: piros; MCY: kék; MG: piros; és egyéb peptidek: magenta.

A kemotípusokat hierarchikus klaszterezéssel határoztuk meg a cianobaktérium izolátumok skálázott abundancia értékeiből Minkowski távolság meghatározás és Ward hierarchikus csoportosítás segítségével. A számítást a pvclust csomag segítségével R 3.5.2-ben végeztük [96]. A kémiai mintázat és egyéb változók (származási hely, taxonómiai helyzet)

statisztikai teszteléséhez a főkomponens-analízis értékeit Kruskal - Wallis szignifikancia tesztnek vetettük alá.

4.1.4. Filogenetikai analízis

A filogenetikai vizsgálatokhoz DNS kivonatokat készítettünk. A szárított sejteket lízis pufferben (100 mM TrisHCl (pH 8.0); 1.5 M NaCl; 50 mM EDTA (pH 8.0); 1% SDS) 65 °C-on inkubáltuk 2 órán keresztül. Centrifugálás után (21000 g, 5 perc) a vizes fázist 3 egymást követő alkalommal 1:1 arányban TE telített fenollal kevertük össze és centrifugáltuk. A vizes fázist ezután 1:1 arányban kloroformmal kevertük, centrifugáltuk és az így kapott tiszta vizes fázist vittük tovább. A DNS kicsapás során a vizes fázishoz 1:3 arányban -20°C-os 96%-os etanolt adtunk és a keveréket legalább 1 órán keresztül -20 °C-on tároltuk. A DNS-t 4°C-on centrifugáltuk (21000 g, 20 perc), majd a pelletet -20 °C-os 70%-os etanollal mostuk és vákuumban megszáritottuk. A száraz DNS-t nukleáz mentes vízben oldottuk vissza és -20°C-on tároltuk. A DNS kivonatok koncentrációját és tisztaságát spektrofotometriás módszerrel határoztuk meg.

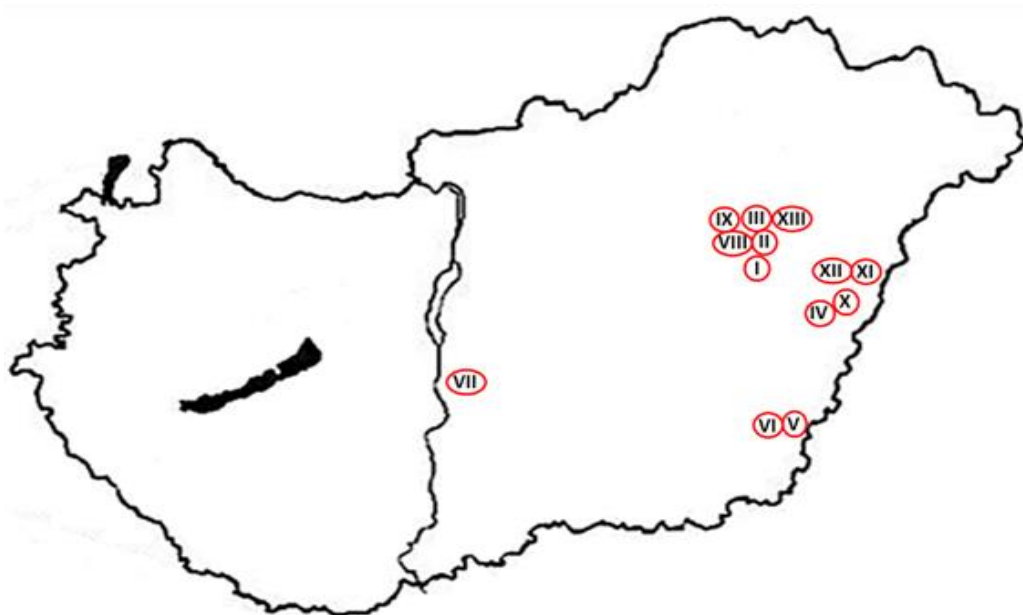
A *Microcystis* sejtvonalak közötti filogenetikai kapcsolatok vizsgálatát a 16-23S ITS régió szekvencia analízisével végeztük. A DNS szakasz felszaporítását MITS-F (5'-AAGGGAGACCTAATTCVGGT-3') és MITS-R (5'-TTGCGGTCYTCTTTTTGGC-3') primerek [42] használatával PCR reakció segítségével végeztük (Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler; Kezdeti denaturáció 95 °C-on 5 percig, ezután 30 amplifikációs ciklus: 30 s 94 °C-on, 30 s 55 °C-on és 30 s 72 °C-on, és egy lezárás 72 °C-on 3 percig. A PCR reakcióelegy összetétele: 200 µM mindegyik dezoxinukleozid-trifoszfátra, 1U LC Taq DNS polimeráz (rekombináns) (Fermentas), 1X (NH₄)₂SO₄ tartalmú Taq puffer (Fermentas), 2 mM MgCl₂, 0,3 µM mindkét primerből és körülbelül 20 ng genomiális DNS-templát 50 µl végtérfogatban. A PCR termékeket 1%-os agaróz gélen ellenőriztük, a mintázatot Eco Safe DNS festékkel (Pacific Image Electronics) UV fénnel detektáltuk. A kapott PCR termékek szekvencia-elemzését Sanger-szekvenálással végeztük (LGC Genomics, Queens Road, Teddington, Middlesex, Egyesült Királyság) az MITS-F primer használatával.

A *Microcystis* sejtvonalak filogenetikai fáját MEGA7 szoftver segítségével készítettük el [97]. A filogenetikai kapcsolatokat Maximum Likelihood módszerrel, Jukes – Cantor modellt [98] alkalmazva határoztuk meg. Az evolúciós modellezésére diszkrét Gamma-eloszlást alkalmaztunk.

4.2. Alföldi *Nostoc* törzsek vizsgálata

4.2.1. Mintavételezés, izolálás és tenyésztés

2013-ban az Alföld különböző részeiről (13 pusztáról) szárazföldi cianobaktérium mintákat gyűjtöttünk (5. ábra és 3. táblázat). A mintavételezésben a Debreceni Egyetem Természettudományi és Technológiai Kar Ökológiai Tanszékének munkatársai voltak a segítségünkre.



5. ábra A vizsgálatban szereplő *Nostoc* minták származási helyei

3. táblázat Az egyes helyszínekről származó minták száma és az izolált *Nostoc* sejtvonalak száma

Mintavételezés helyszíne		Mintavételezési helyek száma (Minta kódszáma)	Izolált <i>Nostoc</i> és egyéb fajok száma	Peptid termelő izolátumok száma
I	Ágota	21 (1-21)	35 + 8	16 (8 különböző mintából)
II	Zám	8 (22-29)	27	7 (5 különböző mintából)
III	Pente_É	6 (30-35)	7	1
IV	Furta	2 (37-38)	3 + 1	2 (2 különböző mintából)
V	Gyula	2 (39-40)	3 + 1	3 (2 különböző mintából)
VI	Kígyós	4 (41-44)	7	3 (2 különböző mintából)
VII	Fülöpszállás	4 (45-48)	14	6 (4 különböző mintából)
VIII	Pentezug	6 (49-54)	7 + 3	3 (3 különböző mintából)
IX	Egyek	2 (55-56)	2	1
X	Váncsod	2 (57-58)	2	0
XI	Konyár	2 (59-60)	3	0
XII	Derecske	5 (61-65)	9	3 (2 különböző mintából)
XIII	Szálka-halom	1 (BGSD.2012)	1	1

A száraz terepi mintákat 3 ismétlésben steril vízzel alaposan lemostuk, majd nitrát mentes Allen [90] tápoldatba helyeztük és 26 °C-on, állandó megvilágítás mellett (100 lux m⁻²s⁻¹) inkubáltuk. Egy hét elteltével a mintákat 1,5% agarral szilárdított nitrát mentes Allen táptalajra szélesztettük és további egy hétig inkubáltuk őket. A morfológiailag különböző, különálló kolóniákat nitrát mentes Allen tápoldatot tartalmazó 96 lyukú mikrotiter lemezekre vittük át. A kolóniák makro- és mikroszkopikus heterogenitásának ellenőrzése érdekében a kolóniákat egymást követő 3 alkalommal újra kiszélesztettük. A homogén izolátumokat 1 l-es nitrát mentes Allen tartalmú Erlenmeyer lombikokban neveltük 2-3 hétig. Ezután a tenyészeteket lecentrifugáltuk (Beckman Avanti J-25, 4500 g) és a sejteket fagyasztva szárítottuk (Christ Alpha 1-2 LD plus). A szárított minták mindegyikéből 25 mg-ot 80%-os metanollal vontunk ki és centrifugálás (Beckman Avanti J-25, 21000 g) után a felülúszókat HPLC-ESI-MS/MS módszerrel vizsgáltuk.

4.2.2. Cianobakteriális peptidek azonosítása

A HPLC-ESI-MS/MS méréseket a 3.1.2. fejezetben leírt készüléken és módszerrel végeztük. Az egyes metabolitok azonosítása MS/MS fragmentációs mintázatok alapján irodalmi adatok felhasználásával [10,91-93,99] történt.

4.2.3. Statisztika

Az azonosított peptideket célzott csúcskereséssel integráltuk mzMine 2.11 segítségével [94]. A nyers abundancia adatokat szűrtük (1,0 x 10² alatti értékeket elhagytuk) és log10 transzformáltuk. A transzformált adatokból R 3.6.0 segítségével, Canberra módszerrel disztancia mátrixot hoztunk létre. A hierarchikus csoportosítás Ward.D2 módszerrel történt mind a két (a minták valamint a metabolitok) irányban [95].

4.2.4. Filogenetikai analízis

A filogenetikai vizsgálatokhoz a 3.1.4. fejezetben leírtaknak megfelelően fenol-kloroformos módszerrel DNS kivonatokat készítettünk. A vizsgálatokhoz PCR reakció (Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler) segítségével szaporítottuk fel a 16S rRNS génszakaszt. A reakciókhoz 2X DreamTaq green PCR Master Mix-et (DreamTaq Green puffer; DreamTaq DNS polimeráz; 0,4 mM dATP, dCTP, dGTP és dTTP; 4 mM MgCl₂) és 16S rRNS gén primereket (CYA359F (GGG GAA TYT TCC GCA ATG GG) [100] és 1492R (TAC GGY TAC CTT GTT ACG AC) [101]) használtunk. A reakcióelegy kb. 20 ng templát DNS-t és 0,1 mM primert tartalmazott,

végtérfogata 50 µl volt. A hőmérsékleti profil a következő volt: kezdeti denaturáció 98 °C-on 3 percig, ezután 32 amplifikációs ciklus: 30 s 94 °C-on, 45 s 52 °C-on és 60 s 72 °C-on, és egy lezárás 72 °C-on 10 percig. A PCR termékeket 1%-os agaróz gélen ellenőriztük és UV fény segítségével detektáltuk.

A terméket Bio Basic EZ-10 Spin Column PCR Purification Kit segítségével tisztítottuk, amiket ezután Sanger-szekvenálással elemeztünk (Base Clear B.V., Leiden, Hollandia). A kapott szekvenciákat Chromas 2.6.4 szoftver segítségével ellenőriztük és szükség esetén javítottuk. A javított szekvenciákat hasonlósági keresésnek vetettük alá a National Center for Biotechnology Information (NCBI) GeneBank adatbázisában. A filogenetikai elemzéshez legközelebb eső referencia törzseket (hiteles törzsek) az AlgaeBase weboldalon választottuk ki [102]. A szekvenciák illesztéséhez a SILVA alignment [103] online felületet használtuk, a filogenetikai analízist pedig MEGA7 szoftver [97] segítségével végeztük el. A filogenetikai kapcsolatokat Maximum Likelihood módszerrel, Kimura 2-paraméter modellt [104] alkalmazva határoztuk meg. Az evolúciós modellezésére diszkrét Gamma-eloszlást alkalmaztunk. A kapott szekvenciákat MN643555-MN643589 hivatkozási szám alatt nyújtottuk be a GeneBank adatbázishoz.

4.2.5. Ujjlenyomat analízis

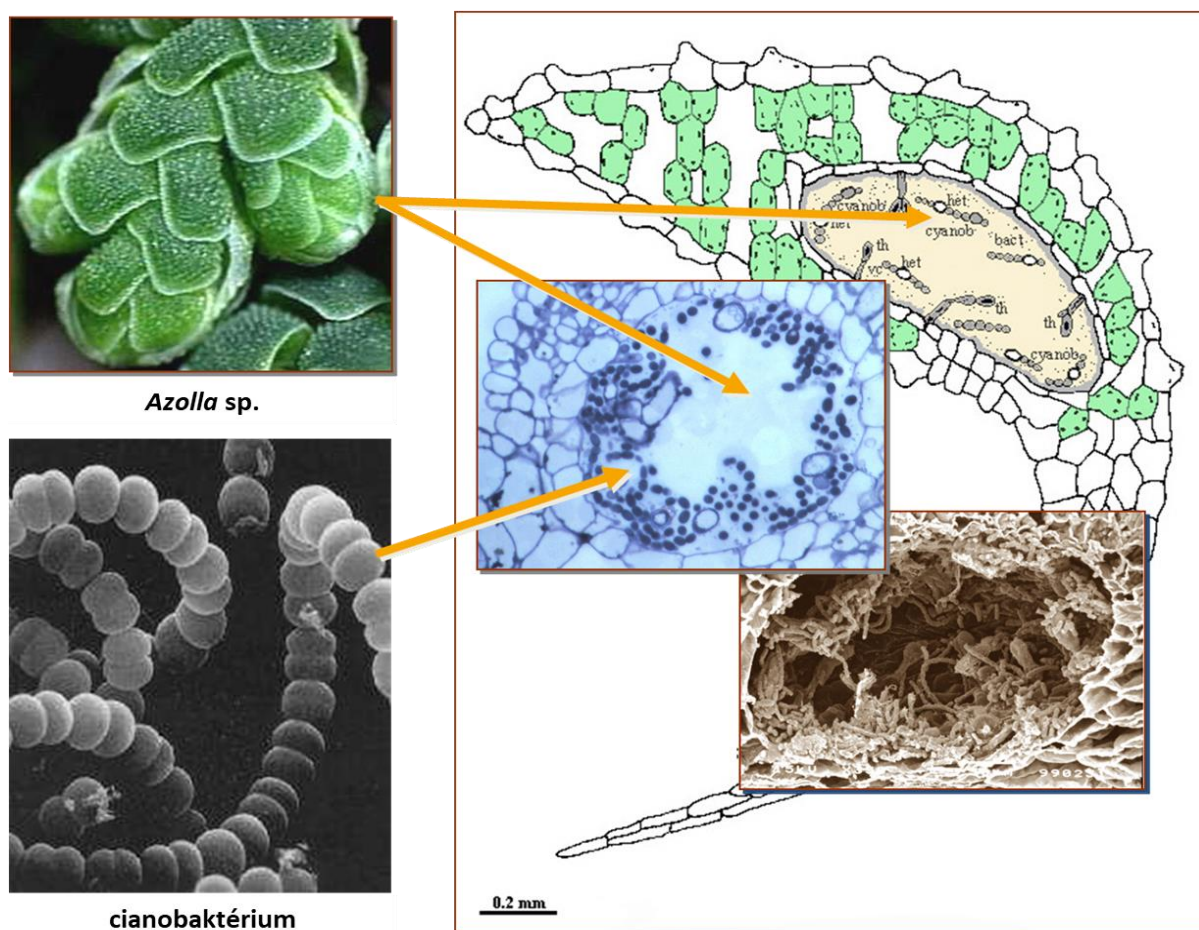
Az ujjlenyomat-elemzéshez STRR (short tandemly repeated repetitive) és ERIC (enterobacterial repetitive intergenic consensus) szekvenciáknak megfelelő primerek felhasználásával PCR reakciókat raktunk össze [105]. Az STRR primereknél a ciklusok a következők voltak: kezdeti denaturálás 95 °C-on 6 percig; 30 ciklus 94 °C-on 1 percig, 56 °C-on 1 percig és 65 °C-on 5 percig; és a végső meghosszabbítást 65 °C-on 16 percig.

Az ERIC primereknél a ciklusok a következők voltak: kezdeti denaturálás 95 °C-on 7 percig; 30 ciklus 94 °C-on 1 percig, 52 °C-on 1 percig és 65 °C-on 8 percig; és a végső meghosszabbítást 65 °C-on 16 percig [106]. A reakcióelegyek 5 µl-ében lévő amplifikált DNS fragmenteket 1%-os agaróz gélen választottuk el, etidium-bromiddal festettük és UVITECH Gel Dokumentációs Rendszerrel rögzítettük (Cambridge, UK). A gélfotókat az UVI-BandMap 11.9 szoftverrel elemeztük.

4.3. Szimbionta *Nostoc* törzsek vizsgálata

4.3.1. Izolálás és tenyésztés

A szimbiotikus kapcsolatokban résztvevő *Nostoc* fajok peptid termelésének vizsgálatához *Azolla* sp. növényekből és különböző zuzmó mintákból izoláltunk nitrogénfixáló cianobaktériumokat. Mindkét esetben felületi sterilizációval távolítottuk el a felszínen lévő mikroorganizmusokat. A sterilizációt 10%-os hypo-oldattal végeztük, majd a mintákat többször, alaposan lemostuk steril desztillált vízzel. A zuzmó minták esetében a letisztított telepeket 1,5%-os agarral szilárdított nitrát mentes Allen táptalajra helyeztük. A telepek peremén megjelenő cianobaktérium kolóniákat fénymikroszkóp alatt vizsgáltuk meg, majd a kolóniákat nitrát mentes Allen tápoldatban neveltük tovább. A felületi sterilizáción átesett *Azolla* sp. növények egy részét Allen tápoldatban neveltük tovább, másik részéből Gebhardt és mtsai. [107] módosított módszere alapján izoláltuk a levélkék üregeiben lévő szimbionta cianobaktériumokat (6. ábra).



6. ábra Az *Azolla* levélüregei oxigénmentes környezetet biztosítanak az *Anabaena/Nostoc* cianobaktériumok számára. A módosított ábra Carrapiço [108] alapján készült.

A növényeket steril dörzsmozsárban szikével apróra vágtuk és a darabokat 1/8 erősségű BG-11 (BG-11/8) tápoldatban homogenizáltuk. A homogenizátumot 4 réteg gézlapon keresztül szűrtük, majd a szűrleményt finoman lecentrifugáltuk (500 g, 5 perc). A pelletet átmostuk BG-11/8 tápoldattal, majd 25 ml BG-11/8 tápoldatban, folyamatos rázatás (150 rpm) és egyre növekvő fényintenzitás valamint tápoldat erősség mellett 26 °C-on inkubáltuk. A sejtekhez hetente friss tápoldatot adtunk 1:1 arányban illetve kéthetente teljes cserét végeztünk. A negyedik hét végén a sejteket teljes erősségű megvilágítás mellett ($100 \text{ lux m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), teljes erősségű BG-11 tápoldatba helyeztük, majd egy hét múlva a tenyészetet szétosztottuk és 1-1 nitrát mentes BG-11, valamint nitrát mentes Allen tápoldatos tenyészetet hoztunk létre. A genetikai és metabolomikai vizsgálatokhoz szükséges sejtmennyiséget 50 ml-es rázatott tenyészetekben állítottuk elő. A tenyészeteket két hétig tartottuk fenn, majd a sejteket centrifugálással gyűjtöttük össze (Beckman Avanti J-25, 4500 g) és fagyasztva szárítottuk (Christ Alpha 1-2 LD plus). A szárított minták mindegyikéből 25 mg-ot 80%-os metanollal vontunk ki és centrifugálás (Beckman Avanti J-25, 21000 g) után a felülúszókat HPLC-ESI-MS/MS módszerrel vizsgáltuk.

4.3.2. Cianobakteriális peptidek azonosítása

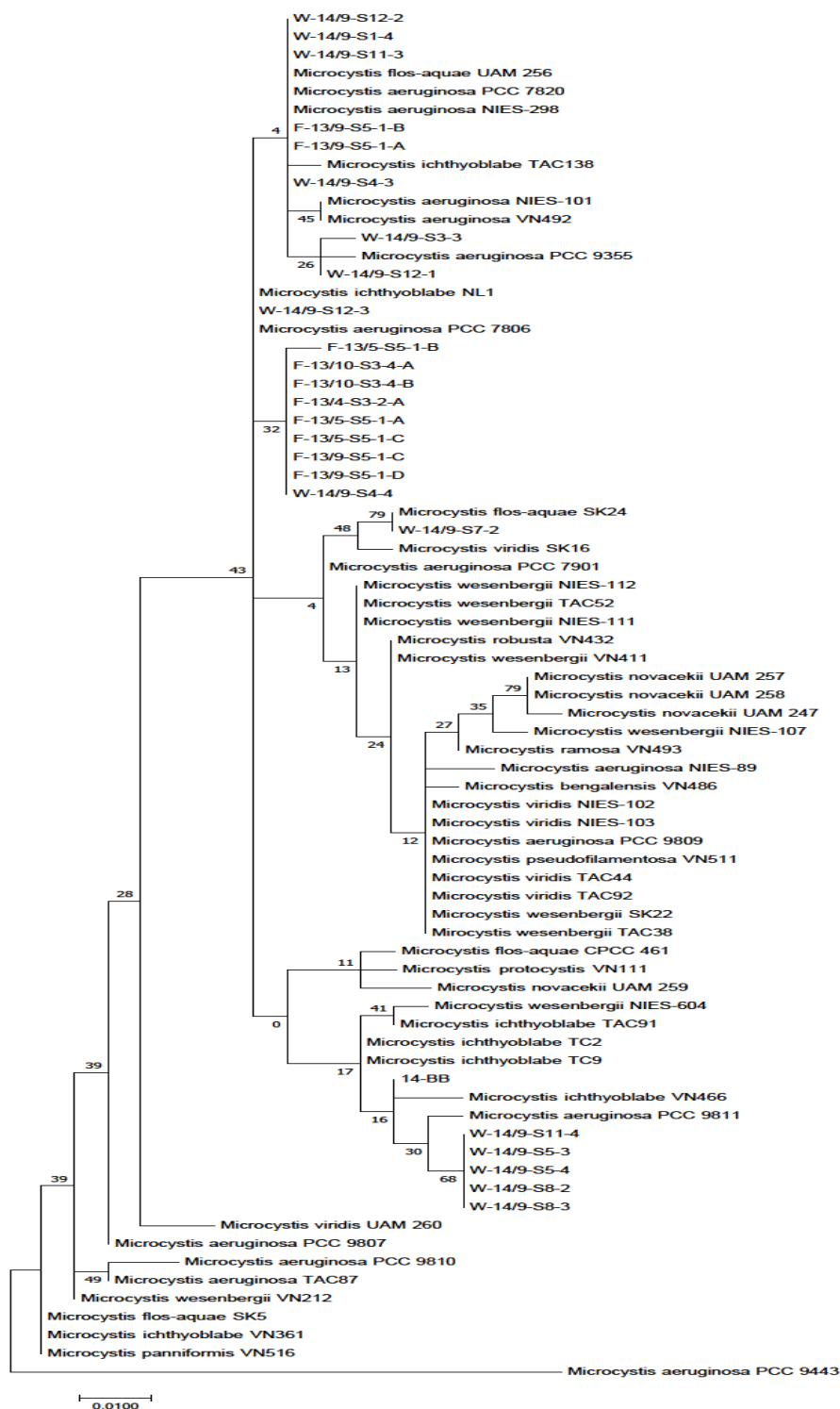
A HPLC-ESI-MS/MS mérések a 3.1.2. fejezetben leírt készüléken és módszerrel történtek. Az egyes metabolitok azonosítása MS/MS fragmentációs mintázatok alapján irodalmi adatok felhasználásával [10,91-93,99] történt.

4.3.3. Filogenetikai analízis

A filogenetikai vizsgálatokhoz a 3.1.4. fejezetben leírtaknak megfelelően, fenol-kloroformos módszerrel DNS kivonást végeztünk. A 16S rRNS génszakasz felszaporítása és vizsgálata a szabadon élő, szárazföldi *Nostoc* fajok esetében használt módszer szerint történt.

5. Eredmények

5.1. A balatoni *Microcystis* fajok vizsgálatának eredményei



7. ábra A vizsgált *Microcystis* törzsek filogenetikai fája. A dendrogram a 16S-23S ITS régiók szekvenciáin alapszik, és az evolúciós kapcsolatokat a Jukes-Cantor modellen alapuló Maximum Likelihood módszerrel határoztuk meg.

5.1.1. Az izolált sejtvonalak és a vízvirágzást okozó fajok morfológiai azonosítása

A *Microcystis* sejtek alakja gömbölyű, átmérőjük átlagosan 5-8 μm , a sejtekben gázvezikulumok találhatók. A sejtek vékony, szintelen nyálkával határolt kolóniákba tömörülnek. A kolóniák mérete lehet mikro- és makroszkopikus, utóbbi halványzöld színű a természetes vízvirágzások során, illetve a tenyészetekben. Ezen tulajdonságok megegyeznek a *Microcystis flos-aquae* fajra leírtakkal [109]. A morfológiai vizsgálatok alapján elmondható, hogy a mintáinkban a domináns morfortípus a *Microcystis flos-aquae*.

5.1.2. Molekuláris filogenetikai vizsgálatok

A filogenetikai vizsgálatokban a 25 általunk izolált *Microcystis* sejtvonalt ITS szekvenciái mellett hat morfológiai alapon elkülönített csoportból származó *Microcystis* ITS referencia szekvenciákat is bevontunk. Izolátumaink különböző klaszterekbe csoportosultak, melyek több különböző morfortípussal mutatnak közeli kapcsolatot. A vízmintákból származó sejtvonalak ITS szekvenciáik alapján 8 leszármazási vonalra különíthetők el (7. ábra), de a leszármazási vonalak és a minták származása között nem találtunk összefüggést. Sejtvonalaink a *M. flos-aquae* és *M. viridis* morfortípusokhoz mutattak legnagyobb hasonlóságot a filogenetikai vizsgálatok során.

5.1.3. Peptid metabolitok azonosítása

4. táblázat A *Microcystis* sejtvonalak vizsgálata során azonosított peptid típusú metabolitok. Az LC-MS/MS adatokból a leucin és az izoleucin formákat nem lehet megkülönböztetni, ezeket az aminosavakat a legközelebbi irodalmi eredmények alapján tüntettük fel. Az azonosítatlan aminosavakat X-szel jelöltük. * az adatokat $[M+2H]^{2+}$ formában adtuk meg.

	Peptid	m/z [M+H] ⁺	RT (min)	Szerkezet	Ref.
microgininek (MG)					
1	MG 565	565.5	6.1	Ahda-Thr-Pro-Tyr	
2	MG 549	549.5	6.2	Ahda-Ala-MePro-Tyr	
3	MG 579	579.6	6.4	MeAhda-Thr-Pro-Tyr	
4	MG 579	579.6	6.3	Ahda-Thr-MePro-Tyr	
5	MG 581	581.5	5.5	Ahda-Thr-Pro-OHTyr	
6	MG 595	595.5	5.7	Ahda-Thr-MePro-OHTyr	
7	MG FR3	728.6	6.3	Ahda-Thr-Pro-Tyr-Tyr	[91]
8	MG 712	712.6	6.4	Ahda-Ala-MePro-Tyr-Tyr	
9	MG FR4	742.6	6.6	MeAhda-Thr-Pro-Tyr-Tyr	[91]
10	MG 744	744.6	6.0	Ahda-Thr-Pro-OHTyr-Tyr	
11	MG 754	754.6	6.7	Ahda-Leu-Pro-Hty-Tyr	
12	MG 607	607.5	6.4	Ahda-Leu-MeVal-Hty	

13	MG 621	621.6	6.4	MeAhda-Leu-MeVal-Hty
14	MG 591	591.5	7.4	MeAhda-Leu-MeVal-Phe
15	MG 770	770.6	6.7	Ahda-Leu-MeVal-Hty-Tyr
16	MG 784	784.6	6.7	MeAhda-Leu-MeVal-Hty-Tyr
17	MG 798	798.6	7.0	MeAhda-Leu-MeLeu-Hty-Tyr

anabaenopeptinek/oscillamidok (ABP/OSC)

18	ABP B	837.7	5.0	Arg-CO-[Lys-Val-Hty-MeAla-Phe]	[110]
19	ABP F	851.7	5.3	Arg-CO-[Lys-Ile-Hty-MeAla-Phe]	[110]
20	ABP A	844.7	6.6	Tyr-CO-[Lys-Val-Hty-MeAla-Phe]	[110]
21	OSC Y	858.6	7.0	Tyr-CO-[Lys-Ile-Hty-MeAla-Phe]	[110]
22	ABP 828	828.6	7.7	Tyr-CO-[Lys-Val-Hph-MeAla-Phe]	
23	ABP 842	842.7	8.0	Tyr-CO-[Lys-Ile-Hph-MeAla-Phe]	
24	ABP 916	916.9	6.9	Tyr-CO-[Lys-Val-Hty-MeHty-Ile]	
25	ABP 930	930.6	7.1	Tyr-CO-[Lys-Ile-Hty-MeHty-Ile]	
26	ABP 852	852.8	7.3	Tyr-CO-[Lys-X3-X4-X5-X6]	
27	ABP 866	866.7	7.6	Tyr-CO-[Lys-X3-X4-X5-X6]	
28	ABP 856	856.7	8.2	Tyr-CO-[Lys-X3-X4-X5-X6]	
29	ABP 870	870.7	8.5	Tyr-CO-[Lys-X3-X4-X5-X6]	
30	ABP 872	872.6	7.2	Tyr-CO-[Lys-X3-X4-X5-X6]	
31	ABP 886	886.7	7.4	MeHty-CO-[Lys-Val-Hty-MeAla-MeLeu]	
32	ABP 900	900.7	7.8	MeHty-CO-[Lys-Ile-Hty-MeAla-MeLeu]	
33	ABP 914	914.8	8.0	MeHty-CO-[Lys-Val-Hph-MeAla-Phe]	
34	ABP 928	928.7	7.9	MeHty-CO-[Lys-Ile-Hph-MeAla-Phe]	
35	ABP 892	892.7	6.0	MeHty-CO-[Lys-Val-Hty-MeAla-Phe]	
36	ABP 938	938.5	7.7	MeHty-CO-[Lys-Ile-Hty-MeAla-Phe]	
37	ABP 860	860.7	6.0	MeHty-CO-[Lys-Ile-Hty-MeAla-MePhe]	
38	ABP 888	888.7	6.6	MeHty-CO-[Lys-X3-X4-X5-X6]	
39	ABP 902	902.6	6.8	MeHty-CO-[Lys-X3-X4-X5-X6]	
40	ABP 904	904.6	6.6	MeHty-CO-[Lys-X3-X4-X5-X6]	
41	ABP 904	904.7	7.4	MeHty-CO-[Lys-X3-X4-X5-X6]	
42	ABP 934	934.6	6.9	MeHty-CO-[Lys-X3-X4-X5-X6]	
43	ABP 854	854.6	8.1	X1-CO-[Lys-Ile-Hty-MeAla-Phe]	
44	ABP 814	814.7	7.6	X1-CO-[Lys-Ile-Hty-MeAla-Phe]	
45	ABP 888	888.7	6.2	X1-CO-[Lys-Val-Hty-MeAla-Phe]	
46	ABP 920	920.7	8.0	X1-CO-[Lys-Ile-Hty-MeAla-Phe]	
47	ABP 892	892.6	7.4	X1-CO-[Lys-X3-X4-X5-X6]	
48	ABP 984	984.6	7.7	X1-CO-[Lys-X3-X4-X5-X6]	
49	ABP 902	902.7	6.5	X1-CO-[Lys-X3-X4-X5-X6]	
50	ABP 918	918.6	6.7	X1-CO-[Lys-X3-X4-X5-X6]	
51	ABP 905	905.2	6.5	X1-CO-[Lys-X3-X4-X5-X6]	
52	ABP 922	922.1	6.6	X1-CO-[Lys-X3-X4-X5-X6]	
53	ABP 904	904.7	5.8	X1-CO-[Lys-X3-X4-X5-X6]	

microcystinek (MCY)

54	MCY-LW	513.3 1*	5.4	[Ala-Leu-MeAsp-Trp-Adda-Glu-MeDha]	[111]
55	MCY-RR	520.3 1*	5.6	[Ala-Arg-MeAsp-Arg-Adda-Glu-MeDha]	[111]
56	[D-Asp3]MCY-LR	981.9	6.6	[Ala-Leu-Asp-Arg-Adda-Glu-MeDha]	[112]
57	MCY-LR	995.8	6.8	[Ala-Leu-MeAsp-Arg-Adda-Glu-MeDha]	[112]
58	MCY-HiIR	1009.9	7.0	[Ala-HiIle-MeAsp-Arg-Adda-Glu-MeDha]	[112]

59	[MeSer7]MCY-LR	1014.0	6.6	[Ala-Leu-MeAsp-Arg-Adda-Glu-MeSer]	[112]
60	[Dha7]MCY-FR	1015.8	7.0	[Ala-Phe-MeAsp-Arg-Adda-Glu-Dha]	[113]
61	MCY-FR	1029.7	7.1	[Ala-Phe-MeAsp-Arg-Adda-Glu-MeDha]	[112]
62	[Dha7]MCY-YR	1031.9	6.5	[Ala-Tyr-MeAsp-Arg-Adda-Glu-Dha]	[112]
63	MCY-YR	1045.5	6.6	[Ala-Tyr-MeAsp-Arg-Adda-Glu-MeDha]	[112]
64	MCY-(H4)YR	1049.7	6.3	[Ala-H4Tyr-MeAsp-Arg-Adda-Glu-MeDha]	[56]
65	MCY-WR	1068.8	7.2	[Ala-Trp-MeAsp-Arg-Adda-Glu-MeDha]	[111]
66	[MeSer7]MCY-WR	1086.9	6.9	[Ala-Trp-MeAsp-Arg-Adda-Glu-MeSer]	[111]

Ahda: 3-amino-2-hidroxi-dekánsav; Adda: (2S,3S,8S,9S)-3 - amino - 9 - metoxi - 2,6,8 - trimetil - 10 - fenildeka - 4,6 - diénsav; Dha: dehidro-alanin;

A MG típusú metabolitok közül 17 variánst sikerült azonosítani a mintáinkban (4. és F1. táblázat). A **7-es** és **9-es** számú vegyületeket az MS/MS mintázatuk alapján MG FR3 illetve MG FR4 variánsként azonosítottuk [91]. Az **1-es** és **3-as** számú változatok ezekkel megegyező mintázatot mutattak, de mindkét esetben az utolsó tirozin egység hiányzott. Az **5-ös** és **10-es** metabolitok MS/MS mintázata nagymértékű hasonlóságot mutatott a MG FR3-mal illetve annak egy tirozin egységgel rövidebb változatával, azonban a 16 Da tömegkülönbségből és az MS/MS adatokból arra a következtetésre jutottunk, hogy ezek a variánsok egy-egy extra hidroxi-csoportot tartalmaznak a 4. pozícióban lévő tirozin egységen. A **11-es** variáns aminosav sorrendjét a MG FR3 szerkezetéből vezettük le. A 26 Da tömegnövekedés két pozícióban történő aminosav cserével magyarázható: a 2. pozícióban lévő threonin helyén egy leucin, míg a 4. pozícióban lévő tirozin helyén egy homotirozin található. Ezeket a feltételezett aminosav változásokat az MS/MS adatok is alátámasztották (F1. táblázat). A **15-ös** számú változat aminosav sorrendjét az irodalomból ismert és hasonló molekulatömegű MG 478 szerkezetéből kiindulva sikerült megalkotni. Az MS/MS adatok alapján a két molekula utolsó három pozíciójában lévő aminosavak azonosak, azonban a mi esetünkben az 1. és 2. pozíciókban Ahda és leucin aminosavak találhatók, ami a 299 *m/z* fragment jelenlétéből valamint az egyes csúcspárok közötti 127 Da tömegkülönbségből (az Ahda oldalláncának leszakadásából adódóan) következik (F1. táblázat). A **16-os** és **17-es** metabolitokat az előbbi metilált változataiként azonosítottuk, mindkettő esetében N-metil-Ahda található az 1. pozícióban, valamint utóbbi esetében egy metil-valin – metil-leucin csere is megfigyelhető a 3. pozícióban. A **12-es** és **13-as** metabolitok a **15-ös** és **16-os** variánsok egy tirozin egységgel rövidebb változataiként kerültek azonosításra. A **14-es** és **13-as** számú vegyületek közötti 30 Da tömegcsökkenés az MS/MS adatok alapján a 4-es pozíciót érinti és egy homotirozin – fenilalanin cserére vezethető vissza. A **8-as** és **2-es** számú variánsokat irodalmi adatok alapján [114] a MG T2 metilált, illetve annak egy tirozin egységgel rövidebb változataiként sikerült

azonosítani, melyeknél a metiláció MS/MS adatok alapján a 3-as pozícióban lévő prolinra volt visszavezethető. A szintén metil-prolint tartalmazó **4-es és 6-os** variánsok pedig az **1-es és 5-ös** MG FR3 változatok metilált formái (4. és F1. táblázat).

Összesen 36 – ebből 15 teljesen és 21 részlegesen karakterizált – ABP típusú metabolitot találtunk mintáinkban (4. és F2. táblázat). A **18-as és 20-as** számú metabolitok megegyező MS/MS illetve MS/MS/MS fragmentációs mintázatokat mutattak, mint amilyeneket Mayumi és mtsai. [92] az ABP B és ABP A esetében leközöltek. Az irodalomból már ismert variánsok közül még az oscillamid (OSC) Y (**21**) és az ABP F (**19**) volt azonosítható. Habár az ABP E és F variánsok molekulatömege megegyezik, de a két vegyület esetében eltérőek a gyűrűt alkotó aminosavak, amelyek eltérő MS³ spektrumot adnak. Esetünkben az MS³ adatok csak az ABP F szerkezetét támogatták. A **22-23** illetve **24-25** vegyületek MS³ mintázatai nagymértékű hasonlóságot mutattak az ABP A és OSC Y variánsokkal. Az első páros esetében a 4. pozícióban homotirozin helyett homofenilalanin található, ami magyarázza a 16 Da csökkenést a molekulatömegben. A második páros esetében azonban a 72 Da tömegnövekedés csak két különböző pozícióban lévő aminosavak együttes cseréjével magyarázható. Az MS³ mérésekből származó adatok alapján az 5. pozícióban lévő N-metil-alanin helyét egy N-metil-homotirozin foglalja el (ami 106 Da tömegnövekedést jelent) és a 6. pozícióban lévő fenilalanin helyén izoleucin található (ami 34 Da tömegcsökkenést jelent) (F2. táblázat). A további hét (**26-32**) teljesen karakterizált ABP esetében az MS/MS mérések szokatlan adatokat eredményeztek. Az egymástól 26 Da tömegben különböző csúcsok (ez a különbség az oldallánc és a gyűrű közötti karbonil-csoport leszakadásához köthető) egy szokatlan, 209 Da tömegű aminosav jelenlétére utalnak az 1. pozícióban, ami egy tirozin származékkal, az N-metil-homotirozinnal magyarázható. Ezek közül a **30-31** és **28-29** variánsok az ABP A-ra és OSC Y-ra valamint a **22-es és 23-as** változatokra jellemző MS³ fragmentációs mintázatot, azaz gyűrű struktúrát mutatnak. A **26-27** metabolitok esetében az MS³ adatok 20 Da-ban különböznek az ABP A és OSC Y esetében kapottaktól, ami metil-leucin jelenlétére utal a 6. pozícióban. A **32-es** változat esetében tapasztalt 14 Da tömegkülönbség pedig egy, a 6. pozícióban lévő metil-fenilalaninra vezethető vissza (4. és F2. táblázat).

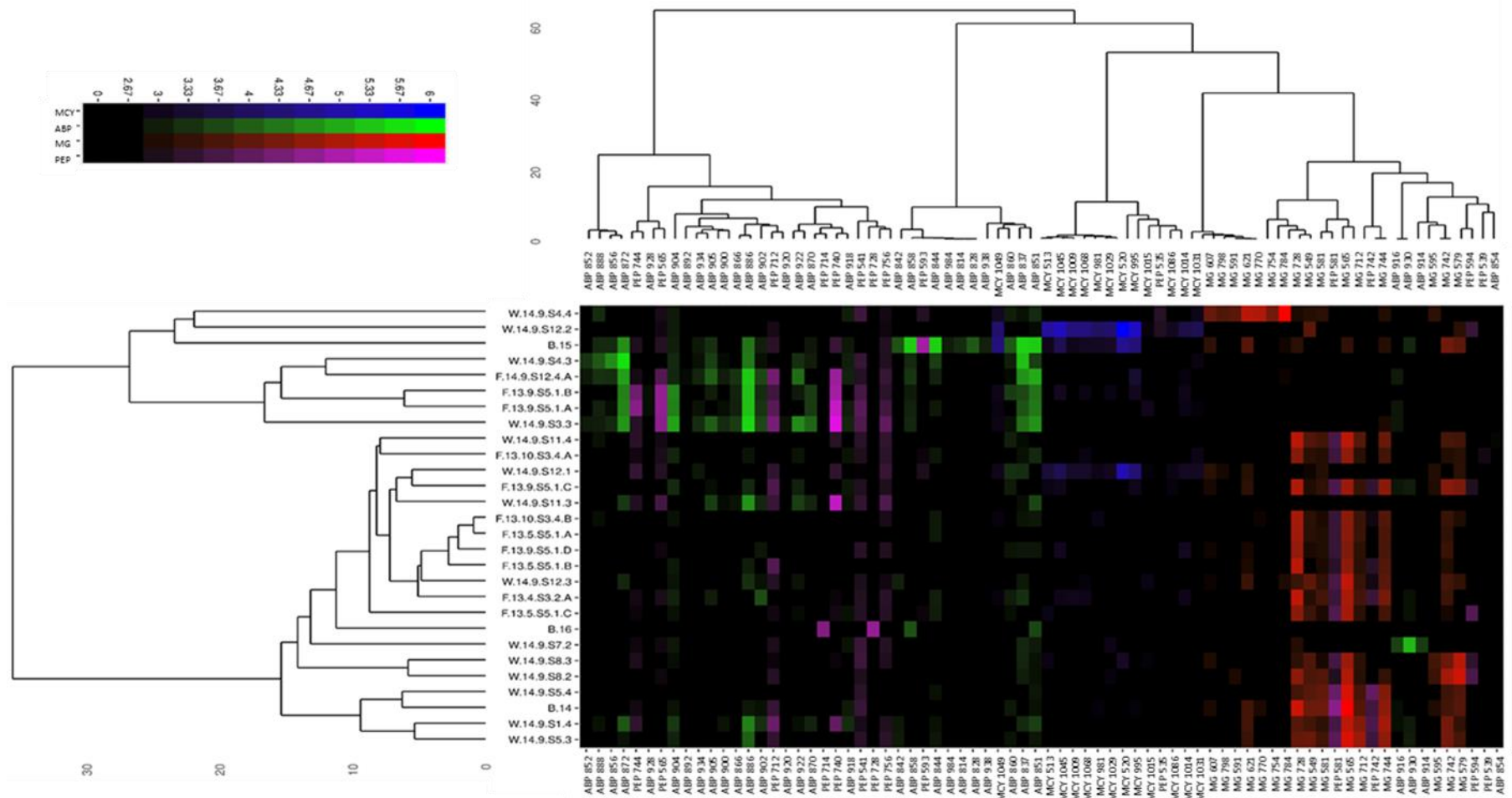
A részlegesen karakterizált ABP variánsok mindegyikénél megtaláltuk a peptid családra jellemző, egymástól 26 Da tömegben különböző csúcsokat az MS² mérések során (F2. táblázat). Négy esetben (**43-45**) nem tudtuk meghatározni, hogy milyen aminosav vagy aminosav származék alkothatja az oldalláncot, azonban a gyűrűk szerkezete alapján ezek

egyértelműen a korábban ismert ABP variánsok (ABP A és OSC Y) változatai. A többi változat esetében az MS mérésekből származó adatok az alacsony csúcsintenzitás miatt nem voltak megfelelőek a teljes aminosav sorrend meghatározásához (4. és F2. táblázat).

Az ismert MCY formák közül 13-at sikerült azonosítani mintáinkban (4. és F3. táblázat). A MCY-RR és -LW variánsokat (**54, 55**) kétszeresen protonált formában találtuk meg, ahogyan azt már korábban is leírták [111]. A MCY-LR, -FR, -YR és -WR változatok (**57, 61, 63, 65**) egyszeresen töltött formában jelentek meg. Négy, a 7-es pozícióban módosított aminosavat tartalmazó változatot is találtunk: [Dha7]MCY-FR (**60**), [Dha7]MCY-YR (**62**), [MeSer7]MCY-LR (**59**) és [MeSer7]MCY-WR (**66**). Egy, a 3-as pozícióban nem metilált MCY-LR változat ([D-Asp3]MCY-LR (**56**)) szintén azonosításra került. Két analóg esetében volt jellemző nem proteinogén aminosav jelenléte a 2-es pozícióban. Az egyik egy homoizoleucin tartalmú változat (MCY-HiLR; **58**) a másik pedig egy tetrahidro-tirozint tartalmazó variáns (MCY-(H4)YR; **64**) [111-113].

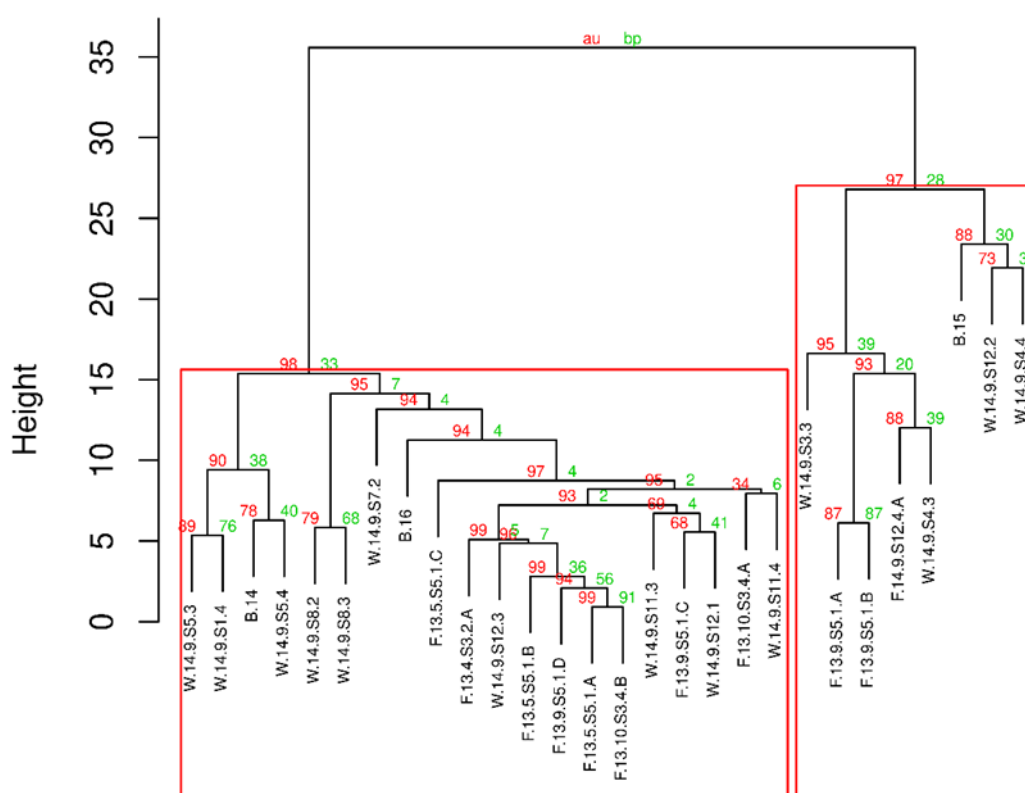
5.1.4. Kematípusok meghatározása és a kemotípus csoportok filogenetikai kapcsolata

Az egyes *Microcystis* törzseket és mintákat vizsgálva többé-kevésbé eltérő (különböző peptid mintázattal rendelkező) kemotípusokat lehet megfigyelni. Ezek a kemotípusok klaszterekbe csoportosíthatók az egyes metabolitok közös előfordulása vagy hiánya alapján (8. és 9. ábra). A minták jellemzően fő komponensként vagy ABP vagy MCY vagy MG variánsokat tartalmaznak, melyek mellett szignifikánsan kisebb mennyiségben esetleg megjelenhetnek más típusú peptidok. Például azok a minták, melyek ABP variánsokat termelnek, de sem MG sem MCY variánsokat nem tartalmaznak, egy kemotípus csoportba tartoznak. A MCY formák együttes termelése csak néhány mintában figyelhető meg. Ennek tudható be az is, hogy a MCY variánsok egy kompakt, a többi peptid típustól jól elkülönülő klasztert alkotnak. Ezekben a MCY-ben gazdag mintákban nem találtunk más érdekes vegyületet. A minták egy másik csoportja nagy koncentrációban tartalmazott MG variánsokat, de nem tartalmazott nagyobb mennyiségben semmilyen más típusú peptidet. Mivel ezek a változatok mind együtt fordultak elő, így ezek is egy viszonylag kompakt MG klasztert alkotnak (8. ábra). A hierarchikus klaszterelemzés két fő (egy MG domináns és egy ABP domináns) kemotípus létezését támogatja ($p < 0,05$) (9. ábra).



8. ábra A *Microcystis* mintákból származó peptid metabolitok hő térképe. A színskála arányos az egyes metabolitok LC-ESI-MS mérés során kapott csúcs alatti területértékeinek log10 értékeivel. A különböző peptid családokat eltérő színekkel jelöltük: microcystinek (MCY) – kék; anabaenopeptinek (ABP) – zöld; microgininek (MG) – piros; egyéb peptidek (PEP) – magenta.

Annak ellenére, hogy izolátumainkat a mikroszkópos megfigyelések során a *M. flos-aquae* morfortípusba soroltuk be, a molekuláris módszerek segítségével több filogenetikai csoportot és különböző kemotípus csoportokat is sikerült elkülönítenünk (7. és 8. ábra). Azonban az egyes kemotípusok között nem találtunk filogenetikai kapcsolatot. Nem találtunk szignifikáns összefüggést a metabolit mintázatok, az abundancia értékek és a genetikai vizsgálatok eredményei között sem. A 16S-23S ITS alapú filogenetikai csoportok nem voltak hatással a metabolit mintázatra ($p>0,05$). Ezen kívül nem találtunk szignifikáns összefüggést a metabolit mintázatok, az abundancia értékek és a minták származása között sem. Az izolálás forrása nem volt hatással a peptid mintázatra ($p>0,05$).

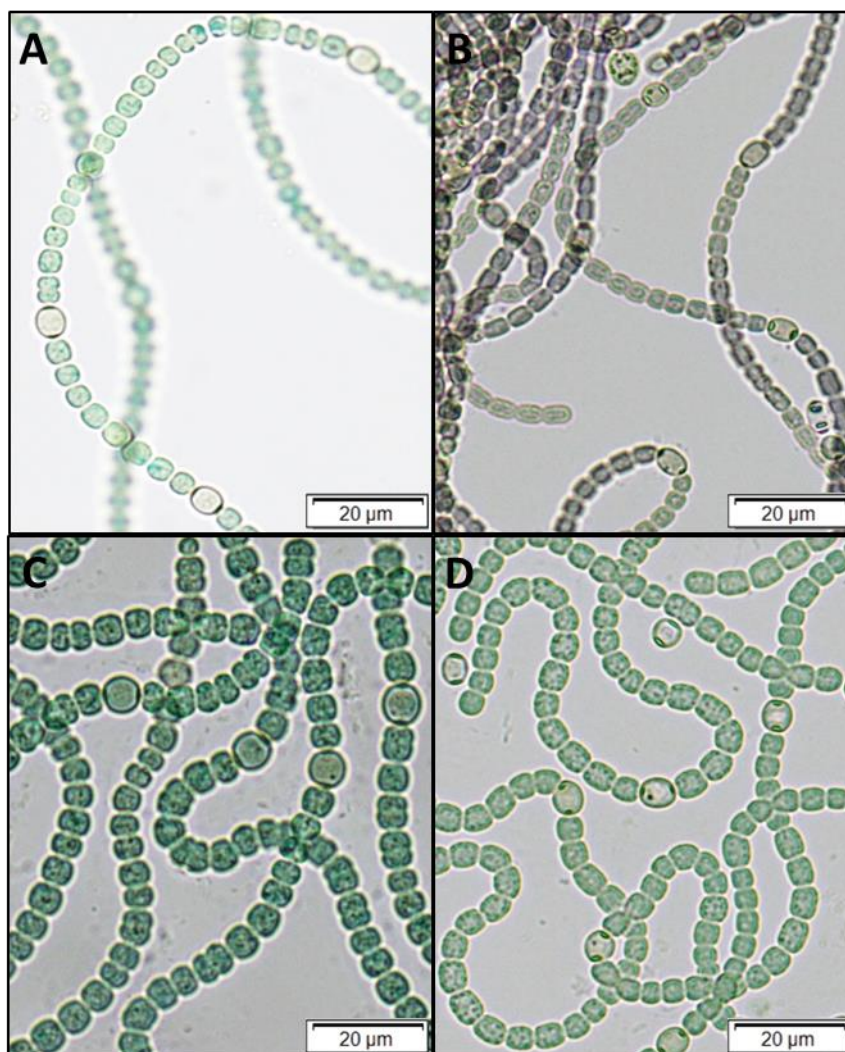


9. ábra A vizsgált *Microcystis* sejtvonalak metabolit termelésük alapján két valódi kemotípus csoportra különülnek el.

5.2. Az alföldi *Nostoc* fajok vizsgálatának eredményei

5.2.1. Molekuláris filogenetikai vizsgálatok

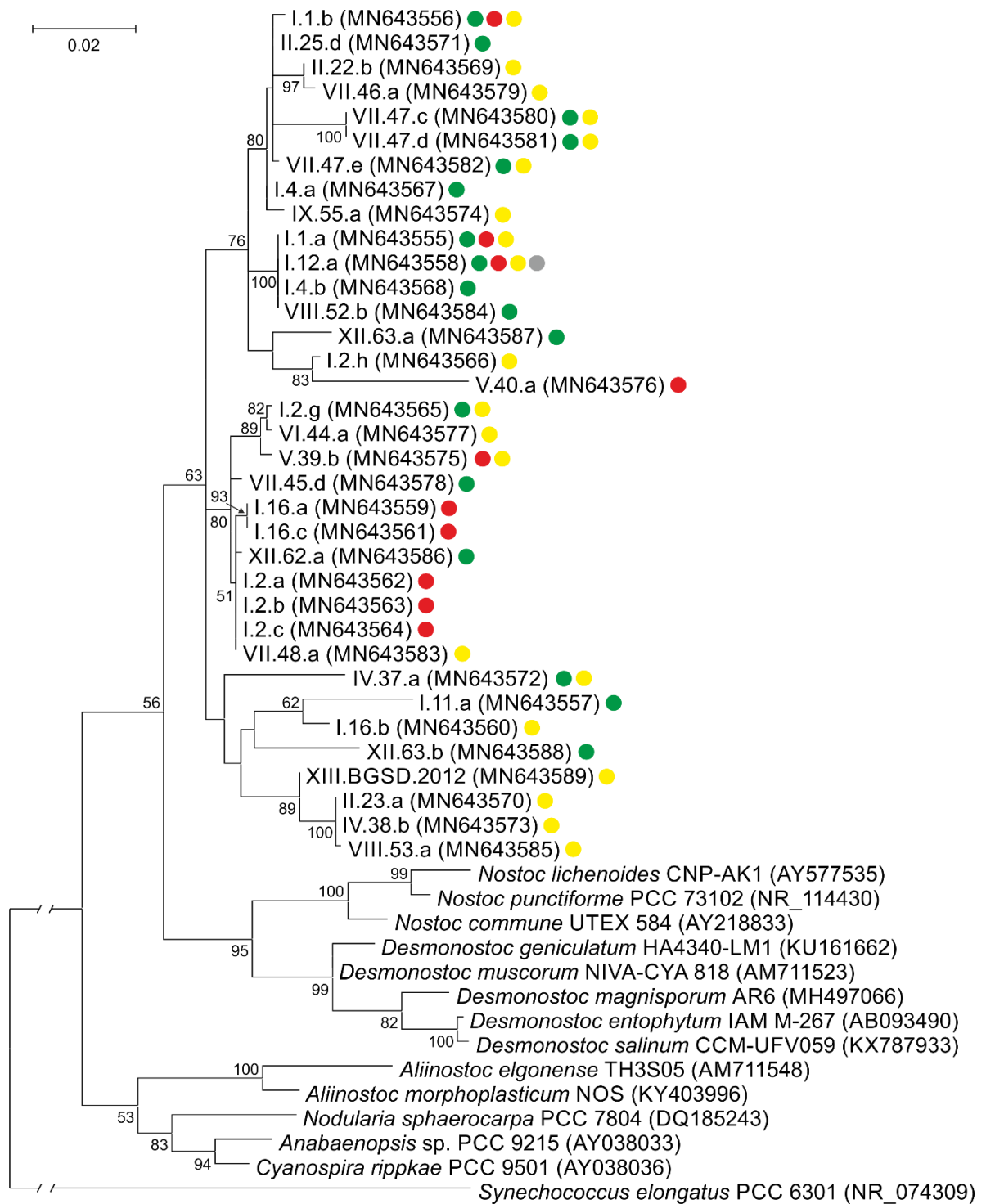
Összesen 133 izolátumot sikerült létrehozunk a begyűjtött 65 száraz mintából (3. táblázat). Az izolált kolóniák színe változó, a világos zöldtől a sötétbarnáig minden átmenet előfordul.



10. ábra Peptid termelő *Nostoc*-szerű sejtvonalak válogatott mikroszkópos fotói. A: nostopeptolid A1/A3 termelő (I/12/a) sejtvonala; B: anabaenopeptin termelő (II/25/d) sejtvonala; C: nostoginin/microginin termelő (V/40/a) sejtvonala; D: banyasid termelő (XIII/BGSD/2012) sejtvonala.

Gyakran megfigyelhető kocsonyás burok a kolóniák körül, de gázvezikulumok nem voltak jellemzőek. A mikroszkópos megfigyelések alapján [115,116] a legtöbb izolátum (90%) a *Nostoc* nemzetségbe tartozott (10. ábra), ritkábban megfigyelhetők voltak egyéb Nostocales (*Calothrix* sp.; *Scytonema* sp.; *Tolypothrix* sp.; *Trichormus* sp.) és Oscillatoriales rendbe (*Leptolyngbya* sp.; *Microcoleus* sp.; *Oscillatoria* sp.; *Phormidium* sp.; *Tychonema* sp.) tartozó

fajok is. Az izolált és peptidtermelő *Nostoc* törzsek filogenetikai elemzése során az izolátumaink 16S rRNS génszekvenciáik alapján három leszármazási csoportot alkottak, melyek elkülönültek a *Nostoc*, *Aliinostoc* és *Desmonostoc* referencia törzsektől (11. ábra). Nem figyeltünk meg egyértelmű összefüggést a kapott filogenetikai csoportok és a mintavételi helyek, valamint a filogenetikai csoportok és a metabolit profilok között. Emellett az izolált törzsek genetikai heterogenitását DNS-ujjlenyomat módszerrel is vizsgáltuk. Az STRR és az ERIC ujjlenyomat vizsgálatok különbségeket mutattak az izolált törzsek között, de ezek nem voltak összefüggésben a filogenetikai elemzés eredményével.



11. ábra A vizsgált *Nostoc* törzsek filogenetikai fája. A dendrogram a 16S rRNS régiók szekvenciáin alapszik, az evolúciós kapcsolatokat a Kimura 2-paraméter modellen alapuló Maximum Likelihood módszerrel határoztuk meg. A sejtvonalak által termelt peptid típusokat színes körökkel jelöltük: nostogininek/microgininek ●; anabaenopeptidek ●; banyasidok/suomilidek ●; nostopeptolidok ●.

5.2.2. Peptid metabolitok azonosítása

5. táblázat A *Nostoc* sejtvonalak vizsgálata során azonosított peptid típusú metabolitok. Az LC-MS/MS adatokból a leucin és az izoleucin formákat nem lehet megkülönböztetni, ezeket az aminosavakat a legközelebbi irodalmi eredmények alapján tüntettük fel. * az m/z adatokat $[M+H-SO_3]^+$ formában adtuk meg.

	Peptid	m/z [M+H] ⁺	RT (min)	Szerkezet	Ref.
nostogininek/microgininek (NG/MG)					
67	NG 592	593.21	5.75	MeAhoa-Val-NMelle-NMeTyr	
68	MG 606	607.25	6.02	Ahda-Val-NMelle-NMeTyr	
69	NG 709	710.31	6.75	Ahoa-Pro-Ile-NMeTyr-Phe	
70	NG 725	726.23	6.48	Ahoa-Val-NMelle-NMeTyr-Phe	
71	NG 739	740.32	6.67	MeAhoa-Val-NMelle-NMeTyr-Phe	
72	NG BN741	742.23	5.86	Ahoa-Val-NMelle-NMeTyr-Tyr	[117]
73	MG 753	754.21	7.01	Ahda-Val-NMelle-NMeTyr-Phe	
74	MG SD755	756.30	6.04	MeAhoa-Val-NMelle-NMeTyr-Tyr	[118]
75	NG 757	758.23	5.78	Ahoa-Val-NMelle-NMeTyr-OHTyr	
76	MG 769	770.31	6.34	Ahda-Val-NMelle-NMeTyr-Tyr	
77	NG 771	772.36	5.63	MeAhoa-Val-NMelle-NMeTyr-OHTyr	
78	MG 785	786.30	6.1	Ahda-Val-NMelle-NMeTyr-OHTyr	
anabaenopeptinek/schizopeptinek (ABP/SCP)					
79	SCP 791	792.37	8.95	Ile-CO-[Lys-Ile-Hph-MeAla-Phe]	[119]
80	ABP 807	808.22	7.54	Ile-CO-[Lys-Ile-Hty-MeAla-Phe]	[119]
81	ABP 827	828.38	7.83	Phe-CO-[Lys-Val-Hph-Ala-Hty]	
82	ABP 834	835.31	8.21	Ile-CO-[Lys-Val-Hph-MeAsn-Hph]	
83	ABP 841	842.29	7.95	Phe-CO-[Lys-Val-Hph-MeAla-Hty]	[93]
84	ABP 848	849.34	8.64	Ile-CO-[Lys-Val-MeHph-MeAsn-Hph]	
85	ABP 855	856.32	8.40	Phe-CO-[Lys-Ile-Hph-MeAla-Hty]	[93]
86	ABP 857	858.29	6.99	Phe-CO-[Lys-Val-Hty-MeAla-Hty]	[93]
87	ABP 862	863.26	8.87	Ile-CO-[Lys-Val-EtHph-MeAsn-Hph]	
88	ABP 864	865.30	7.35	Ile-CO-[Lys-Val-MeHph-MeAsn-Hty]	
89	ABP 869	870.16	8.64	Tyr-CO-[Lys-Ile-Hph-MeAla-MeHph]	
90	ABP 876	877.16	9.26	Ile-CO-[Lys-Ile-EtHph-MeAsn-Hph]	
91	ABP KB899	900.31	7.69	Tyr-CO-[Lys-Val-Hph-MeHty-Ile]	[120]
92	ABP MM913	914.41	8.10	Tyr-CO-[Lys-Ile-Hph-MeHty-Ile]	[121]
93	ABP 915	916.28	7.09	Tyr-CO-[Lys-Val-Hty-MeHty-Ile]	[122]
94	ABP G	930.35	7.36	Tyr-CO-[Lys-Ile-Hty-MeHty-Ile]	[123]
banyasidok/suomilidek (BNS/SUO)*					
95	BNS 852	772.15	1.37	Mgs-Leu-(Glu)Abn-Aaep	
96	BNS 895	815.29	1.61	Mgs-Leu-(CGlu)Abn-Aaep	
97	BNS 909	829.34	1.86	Mgs-Leu-(CGlu+14)Abn-Aaep	
98	BNS 979	899.36	4.25	Mgs-Leu-(Hex-CGlu)-14)Abn-Aaep	
99	BNS B	870.33	4.83	Mgs-Leu-(Hex-Glu)Abn-Aaep	[124]
100	BNS A	913.24	5.10	Mgs-Leu-(Hex-CGlu)Abn-Aaep	[124]

101	BNS 1007	927.43	5.47	Mgs-Leu-((Hex-CGlu)+14)Abn-Aaep	
102	BNS 1020	940.43	5.66	Mgs-Leu-((diHex-Glu)-28)Abn-Aaep	
103	BNS 1035	955.98	6.84	Mgs-Leu-((Hex-CGlu)+42)Abn-Aaep	
104	SUO	968.42	6.32	Mgs-Leu-(diHex-Glu)Abn-Aaep	[125,126]
105	BNS 1077	997.35	6.85	Mgs-Leu-((diHex-CGlu)-14)Abn-Aaep	
106	BNS 1091	1011.50	7.24	Mgs-Leu-(diHex-CGlu)Abn-Aaep	

nostopeptolidok (NPL)

107	NPL A1/A3	1081.50	8.1	But-Ile-[Ser-mPro-LeuAc-Leu-Gly-Asn-Tyr-Pro]	[99]
-----	-----------	---------	-----	--	------

Ahoa: 3-amino-2-hidroxi-oktánsav; Ahda: 3-amino-2-hidroxi-dekánsav; Mgs: 2-O-metilglicerinsav-3-O-szulfát; Hex: hexánsav; Glu: α -glükóz; CGlu: 3-karbamoil- α -glükóz; Abn: 4-amino-5,7,9-trihidroxi-2-azabicyclo[3.3.1]nonán-3-karboxilsav; Aaep: 1-Amidino-3-(2-aminoetil)-3-pirrolin; But: vajsav; MePro: 4-metil-prolin; LeuAc: leucilacetát

Az izolált *Nostoc* sejtvonalak vizsgálata során 41 különböző peptid jellegű metabolitot sikerült azonosítanunk. Szerkezetük alapján ezek 4 különböző peptid családra oszthatók (5. táblázat).

Az azonosított vegyületek közül 12 a NG/MG családba sorolható. Ezek a 4-6 aminosav hosszúságú lineáris peptidek az N-terminálison lévő oktánsav (NG-ek esetében), illetve dekánsav (MG-ek esetében) származékban különböznek egymástól. A MS/MS adatok alapján a **72-es** és **74-es** vegyületeket az irodalomból már ismert NG BN 741 [117] és MG SD 755 [118] variánsokként azonosítottuk. A **75-ös** és **77-es** metabolitok azonos fragmentációs mintázatot mutattak ezen ismert variánsokkal, viszont a 16 Da tömegkülönbség alapján ezek a változatok tirozin helyett egy-egy hidroxi-tirozint tartalmaznak az utolsó pozícióban. A **76-os** és **78-as** számú vegyületek a NG BN 741 és annak hidroxi-változatának (**75**) analógjai, melyeknél az 1. pozícióban egy amino-hidroxi-dekánsav (Ahda) található. A **70-es**, **71-es** és **73-as** számú metabolitok aminosav sorrendjét szintén a NG BN 741 variánsból kiindulva sikerült levezetnünk. Ezen változatoknál mindhárom esetben tirozin helyett fenilalanin található az 5. pozícióban, viszont az 1. pozíciót amino-hidroxi-oktánsav (Ahoa) (**70**), metil-Ahoa (**71**) illetve Ahda (**73**) foglalja el. A **69-es** számú vegyület 16 Da tömegkülönbséget mutatott a **70-es**hez viszonyítva, és az MS² adatokat összevetve ez az eltérés a 2. pozícióban lévő valin – prolin, és a 3. pozícióban lévő metil-izoleucin – leucin aminosav cserével magyarázható. A **67-es** és **68-as** metabolitok a **74-es** és **76-os** számú variánsok egy-egy tirozin egységgel rövidebb változataiként kerültek azonosításra (5. és F5. táblázat).

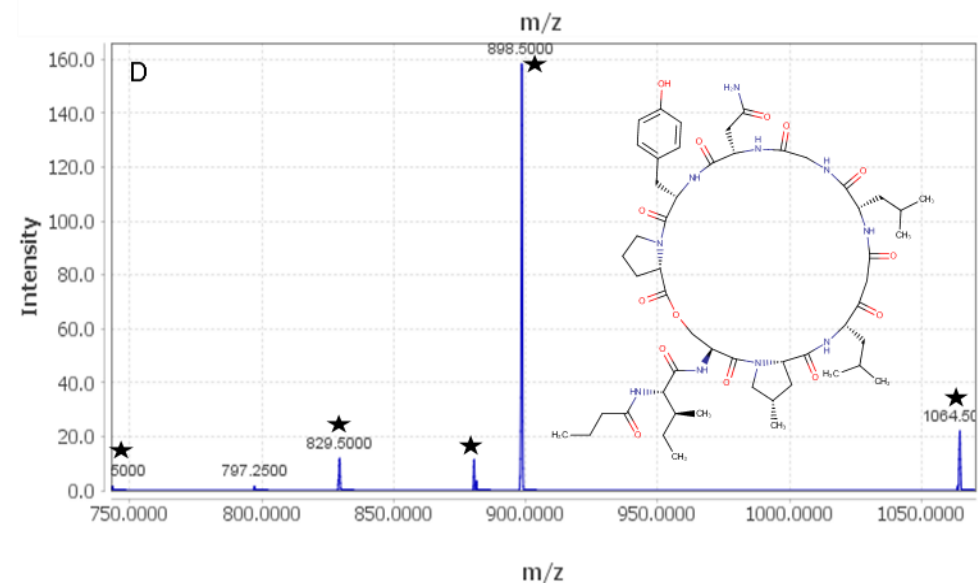
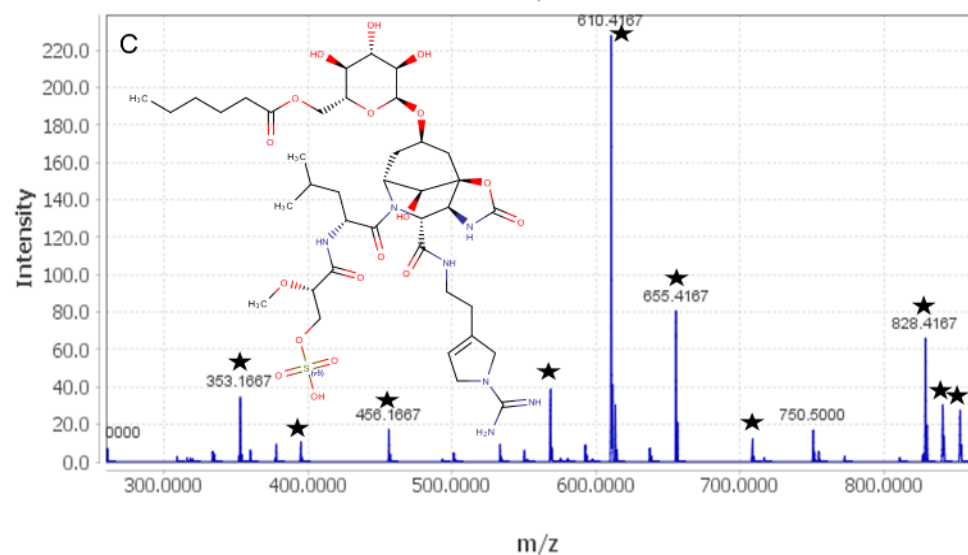
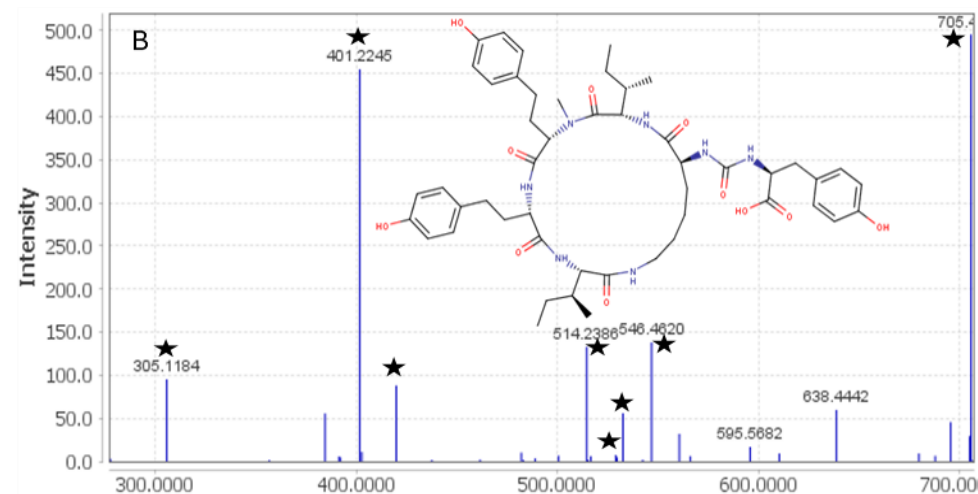
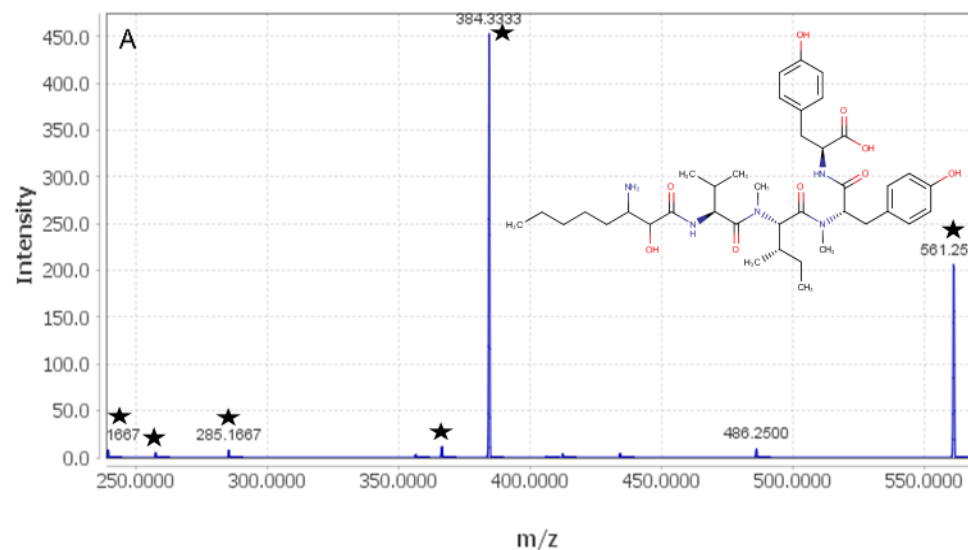
ABP-ek közül 16 variánst sikerült azonosítanunk mintáinkban, melyek az oldallánc szerkezetük alapján 3 csoportra oszthatók (5. táblázat). Hét variáns esetében (**79**, **80**, **82**, **84**,

87, 88 és 90) izoleucin alkotja az oldalláncot. Irodalmi források alapján a **79-es és 80-as** metabolitok schizopeptin (SCP) 791 és ABP 807 [119] variánsokként lettek azonosítva. A **82-es** számú vegyület aminosav sorrendjét az MS³ mérési adatokból a Mayumi és mtsai. [92] által kidolgozott fragmentációs séma alapján határoztuk meg: Ile-CO-[Lys-Val-Hph-MeAsn-Hph](F6. táblázat). A csoport többi tagja (**84, 87, 88 és 90**) ezen variáns módosított változatai. A 4. pozícióban lévő homofenilalanin a **84-es és 87-es** változatokban metilezett formában, míg a **88-as és 90-es** változatokban etilezett formában vannak jelen. A **84-es és 88-as** változatok közötti 16 Da tömegkülönbség alapján az utóbbi esetében a 6. pozícióban lévő homofenilalanin helyén homotirozin található. Továbbá a **90-es** változat **87-hez** képest mért 14 Da tömegnövekedése egy valin – izoleucin aminosav cserére utal a 3. pozícióban. Természetesen mindezeket az MS³ adatok is teljes mértékben alátámasztották (5. és F6. táblázat). Négy ABP variáns (**81, 83, 85 és 86**) esetében fenilalanin alkotja az oldalláncot, melyek közül hármat (**83, 85 és 86**) Sanz és munkatársai [93] már korábban leközöltek egy *Nostoc* fajok peptid metabolit termelését is vizsgáló publikációjukban. A **81-es** számú variánst a **83-as** egyik változataként sikerült azonosítani, melynél az 5. pozícióban lévő metil-alanin helyett alanin található. A fennmaradó öt metabolit (**89, 91-94**) mindegyike tirozint tartalmaz az 1. pozícióban. A **89-es** variáns és az SCP 791 MS³ mintázata nagymértékű hasonlóságot mutatott, amiből megállapítottuk, hogy a két gyűrű közötti 26 Da tömegkülönbséget a 6. pozícióban történt fenilalanin – metil-homofenilalanin csere okozza. A csoport többi tagját az MS³ adatok alapján a szakirodalomból már ismert ABP KB899 (**91**) [120], ABP MM 913 (**92**) [121], ABP 915 (**93**) [122] és ABP G (**94**) [123] variánsokként azonosítottuk (5. és F6. táblázat).

MS/MS fragmenseik alapján 12 metabolitot egy közös csoportba osztottunk be (12. ábra). Ezek a fragmentek irodalmi adatok alapján a banyasid (BNS)/suomilid (SUO) típusú glikopeptidekre jellemzőek (5. és F7. táblázat). Mivel ezek mind pozitív, mind negatív töltésű részekkel egyaránt rendelkeznek (guanidin és szulfát csoportok), az MS mérések során pozitív ion módban csak a molekula szulfát csoport nélküli, pozitív töltésű formáját ([M+H-SO₃]⁺) tudjuk detektálni. A csoport eddig ismert variánsai, a BNS B (**99**) a BNS A (**100**) és a SUO (**104**) azonosíthatóak voltak a mintáinkban [124-126]. A 98 Da tömegkülönbség a BNS A és a **106-os** vegyület esetében utóbbinál a glükóz molekulán egy további hexánsav jelenlétére utal, ugyan úgy, mint a BNS B és a SOU esetében. Ezen kívül a BNS B és BNS A hexánsav nélküli változatait (**95 és 96**) szintén azonosítottuk a vizsgálatok során. A fennmaradó 6 vegyületet (**97, 98, 101-103, 105**) az adatok elégtelensége okán csak részben sikerült karakterizálni. Az MS/MS

mérésekből kiderült, hogy ezek a BNS B vagy a BNS A változatai, melyekben a metil-, etil- vagy propil-csoportok addíciója vagy hiánya a jellemző, és az is kiderült, hogy ezek a módosulások a molekula glükóz és/vagy hexánsav részét érintik (5. és F7. táblázat).

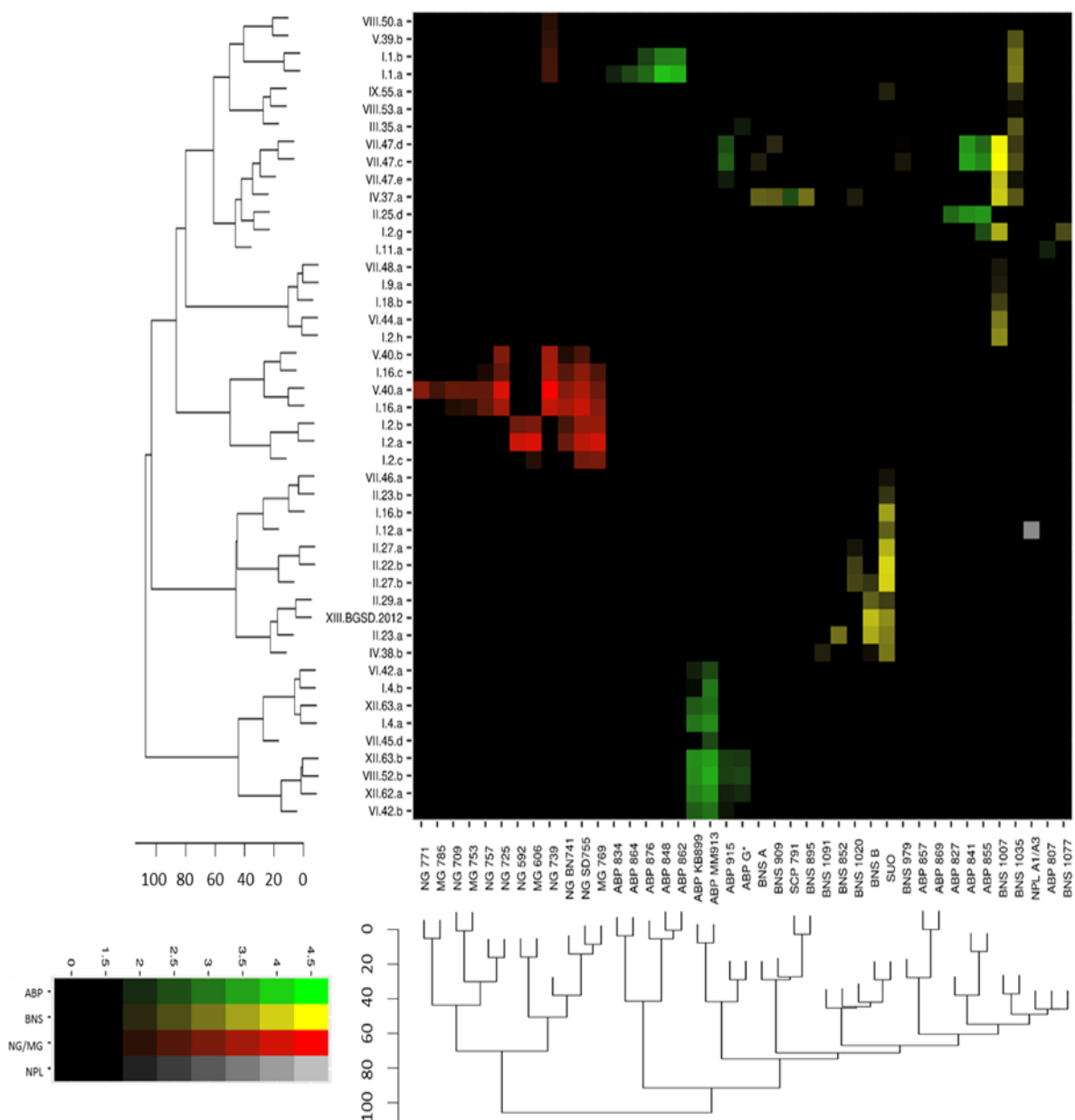
A **107**-es számú metabolit sajátos MS/MS mintázata alapján egyértelműen elkülönül az előző csoportoktól (12. ábra). Habár a mérések során kapott MS adatok igen szegényesek voltak, ezeket összevetve Liaimer és mtsai [127] által publikált eredményekkel, mégis elég információ állt rendelkezésünkre, hogy a vegyületet, mint nostopeptolid A1/A3 azonosítsuk (5. és F8. táblázat).



12. ábra A *Nostoc* sejtvonalakban talált különböző peptid családok fragmentációs mintázata a jellemző fragmentekkel (★). A nostoginin BN741 (A) MS² fragmentációja; Az anabaenopeptin G (B) gyűrű szerkezetének MS³ fragmentációja ; A banyasid B (C) és nostopeptolid A1/A3 (D) MS² fragmentációja.

5.2.3. Az oligopeptidek eloszlása és a kemotípusok meghatározása

Az általunk izolált *Nostoc* törzseknek csak a 37%-a termelt valamilyen peptid típusú metabolitot. Viszont ezek a sejtvonalak a peptid mintázatuk alapján különböző kemotípusokra oszthatók. A mintákat négy csoportba tudtuk besorolni. Külön-külön csoportot alkotnak azok a sejtvonalak, melyek csak és kizárólag vagy NG/MG típusú vegyületeket (1) vagy ABP-eket (2) vagy BNS variánsokat (3) termelnek nagy mennyiségben. Azonban találtunk olyan izolátumokat is, melyek mind ABP, mind BNS típusú metabolitokat egyaránt termelnek (4). Továbbá az is megfigyelhető, hogy míg a csak NG/MG illetve csak ABP termelő sejtvonalak kompakt csoportokat alkotnak, addig a csak BNS tartalmú minták két alcsoportra oszthatók aszerint, hogy BNS A vagy B típusú metabolitokat tartalmaznak (13. ábra). Annak ellenére, hogy az ABP-ek számos mintában jelen voltak, ezen csoport összintenzitás értéke fele akkora volt mint a NG/MG csoportnak vagy a BNS csoportnak. Továbbá elmondható az is, hogy annak ellenére, hogy NG/MG metabolitok viszonylag kevés mintából kerültek elő, mégis a család összintenzitás értéke közel azonos volt a BNS csoportéval. A molekuláris vizsgálatok eredményeit összevetve nem találtunk összefüggéseket az egyes kemotípusok és genotípusok között, annak ellenére, hogy a 16S RNS génszekvencia vizsgálatok során több filogenetikai klasztert is elkülönítettünk (11. ábra).



13. ábra A *Nostoc* mintákból származó peptid metabolitok hőterképe. A színskála arányos az egyes metabolitok LC-ESI-MS mérés során kapott csúcs alatti területértékeinek $\log_{10}$ értékeivel. A különböző peptid családokat eltérő színekkel jelöltük: microgininek és nostogininek (MG és NG) – piros; anabaenopeptinek (ABP) – zöld; banyasidok (BNS) – sárga; nostopeptolidok (NPL) – szürke.

5.3. Szimbionta *Nostoc* fajok vizsgálatának eredményei

5.3.1. Molekuláris filogenetikai vizsgálatok

A vizsgálatok során 25 szimbionta cinaobaktérium sejtvonalat (24 zuzmó eredetű és egy *Azolla* sp. szimbionta) sikerült létrehozunk. Az izolált kolóniák színe és struktúrája igen változatos volt. A mikroszkópos megfigyelések alapján [116] valamint a 16S rRNS gén szekvencia vizsgálatok alapján izolátumaink egyértelműen a *Nostoc* nemzetségbe tartoznak. A filogenetikai vizsgálatok során ezek a törzsek két leszármazási csoportra váltak szét. Az egyik csoport tagjai a főként ANA és BNS/SUO termelő szárazföldi *Nostoc* törzseinkkel állnak közel rokon kapcsolatban, míg a másik csoport tagjai különálló leszármazási ágot képeznek és elkülönültek a *Nostoc*, *Aliinostoc* és *Desmonostoc* referencia törzsektől is. Utóbbi csoportba tartozik az egyetlen *Azolla* sp. eredetű izolátumunk is (F2 ábra).

5.3.2. Peptid metabolitok azonosítása

A szimbionta törzsek közül egyedül az *Azolla* sp. eredetű sejtvonal termelt speciális peptid típusú metabolitot. A vizsgálatok során megállapítottuk, hogy a sejtvonal kivonatában található metabolit megegyezik azzal a metil-BNS A variánssal (**101**), amit a szabadon élő *Nostoc* fajok esetében már korábban azonosítottunk.

6. Diskusszió

6.1. A *Microcystis* izolátumok és azok peptid mintázata

Az általunk megfigyelt balatoni *Microcystis flos-aquae* vízvirágzások váratlan, ugyanakkor nem kivételes esetek, hiszen már a 20. század elején is megfigyeltek kisebb, lokális *Microcystis* vízvirágzásokat [128]. A tóban megfigyelt *Microcystis* vízvirágzások ismételt megjelenése (2. ábra) feltehetőleg külső nitrogén terhelés hatására következhetett be. Munkánk során három, egymás utáni években megjelenő *Microcystis* vízvirágzás, valamint 25 izolált *Microcystis* sejtvonal vizsgálatát végeztük el.

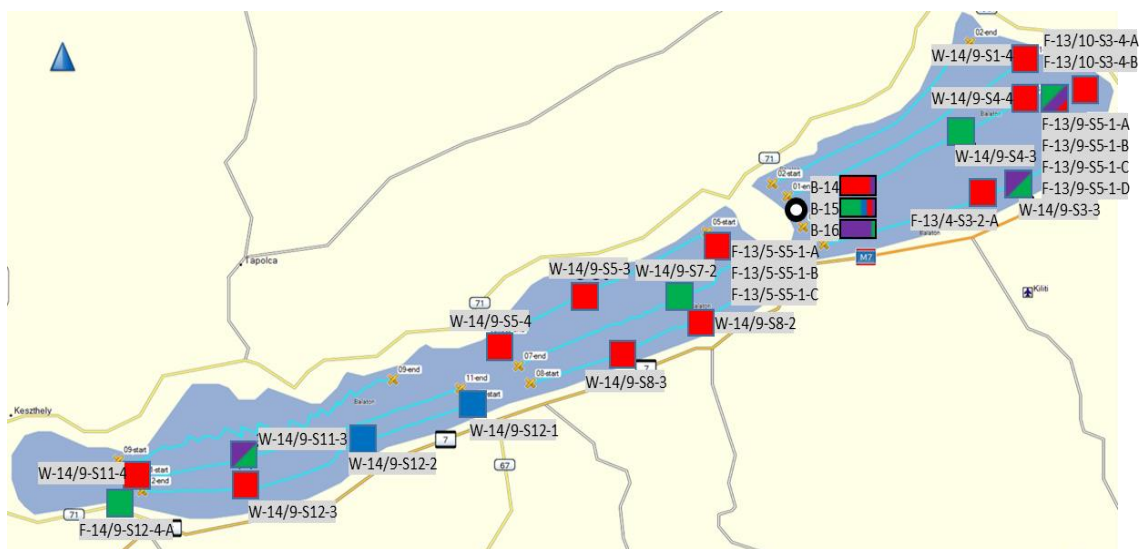
A *Microcystis* fajok taxonómiai besorolása igen nehéz. A mikroszkópos megfigyelések és a molekuláris adatok kombinációja lehet a legalkalmasabb módszer az egyes izolátumok pontos azonosítására [2]. Ennek a nemzetségnek a legtöbb fajt morfológiai tulajdonságaik alapján írták le [129,130], azonban az egyes kolóniák közötti eltérés hatalmas lehet, valamint a különböző populációk külső tulajdonságai átfedhetnek egymással [131,132]. Emiatt igen nehéz megtalálni a különbségeket az egyes fajok között [133].

Az izolált sejtvonalaink taxonómiai helyzetét filogenetikai elemzéssel igazoltuk. Törzseink a *M. flos-aquae* és a *M. viridis* morfortípusokkal álltak a legszorosabb filogenetikai kapcsolatban (7. ábra). Korábban már több publikáció is megjelent, melyekben a *Microcystis* morfortípusok és genotípusok közötti összefüggést vizsgálták [134,135]. Neilan és mtsai. [136] vizsgálatukban genetikai hasonlóságot mutattak ki, és leírták, hogy a fajnak nincs specifikus filogeográfiai szerkezete, ami összhangban áll a Bittencourt-Oliveira és mtsai. (2001) [39] által közölt eredményekkel, melyekben a *Microcystis* törzsek nem mutattak elkülöníthető filogenetikai mintázatot. Az általunk vizsgált *Microcystis* törzseknél erős nyálkaburkot figyeltünk meg. Ez a burok jellemzője a morfortípusnak és egyfajta magyarázata lehet annak, hogy ez a cianobaktérium faj hogyan képes túlélni a halak tápcsatornájában. Az exopoliszacharidok (EPS) döntő jelentőségűek lehetnek a sejtek kötődése, adhéziója és túlélése szempontjából. Ez az erősen hidratált réteg védelmet nyújt a cianobaktérium sejteknek a kiszáradással, a toxikus szerekkel vagy más organizmusok emésztő enzimeivel szemben. Az EPS ilyen jellegű szerepét már több tanulmány is megerősítette [137].

Munkánk során 36 ABP és 17 MG variánst azonosítottunk az izolált törzsekből (4. táblázat). Új MCY variánsokat egyre ritkábban azonosítanak, valószínűleg azért, mert eddig ezek voltak a leginkább vizsgált cianobakteriális peptidek. Azonban a bioaktív peptid családok,

például az MG-ek és az ABP-ek manapság egyre nagyobb figyelmet kapnak. Vizsgálataink során 4 ismert és 32 - a legjobb tudásunk szerint - korábban ismeretlen ABP variánst sikerült teljesen vagy részben azonosítanunk. Továbbá számos, részlegesen azonosított peptid-fragment is megfigyeltünk (F4. táblázat), amelyek a hőtérekép-elemzés eredményei alapján az ABP-ekkel együtt fordultak elő leggyakrabban (8. ábra). A vizsgálatok során 2 ismert, és 15 - a legjobb tudásunk szerint - eddig ismeretlen MG variánst azonosítottunk. Számos, részben azonosított peptid fragment is valószínűsíthetően ehhez a peptid családhoz tartozik, mivel ezek a hőtérekép elemzés eredményei alapján az azonosított MG variánsokkal együtt fordulnak elő (8. ábra).

A cianobaktérium-populációkban az oligopeptid mintázatok foltos eloszlása lehetővé teszi az egyes izolátumok oligopeptid-alapú kemotípusba történő csoportosítását [138,139]. Fontos megjegyezni, hogy elsősorban ABP és MG domináns törzseket detektáltunk a Balatonból, de 10 törzs esetében MCY-ek is előfordultak (8. és 14. ábra).



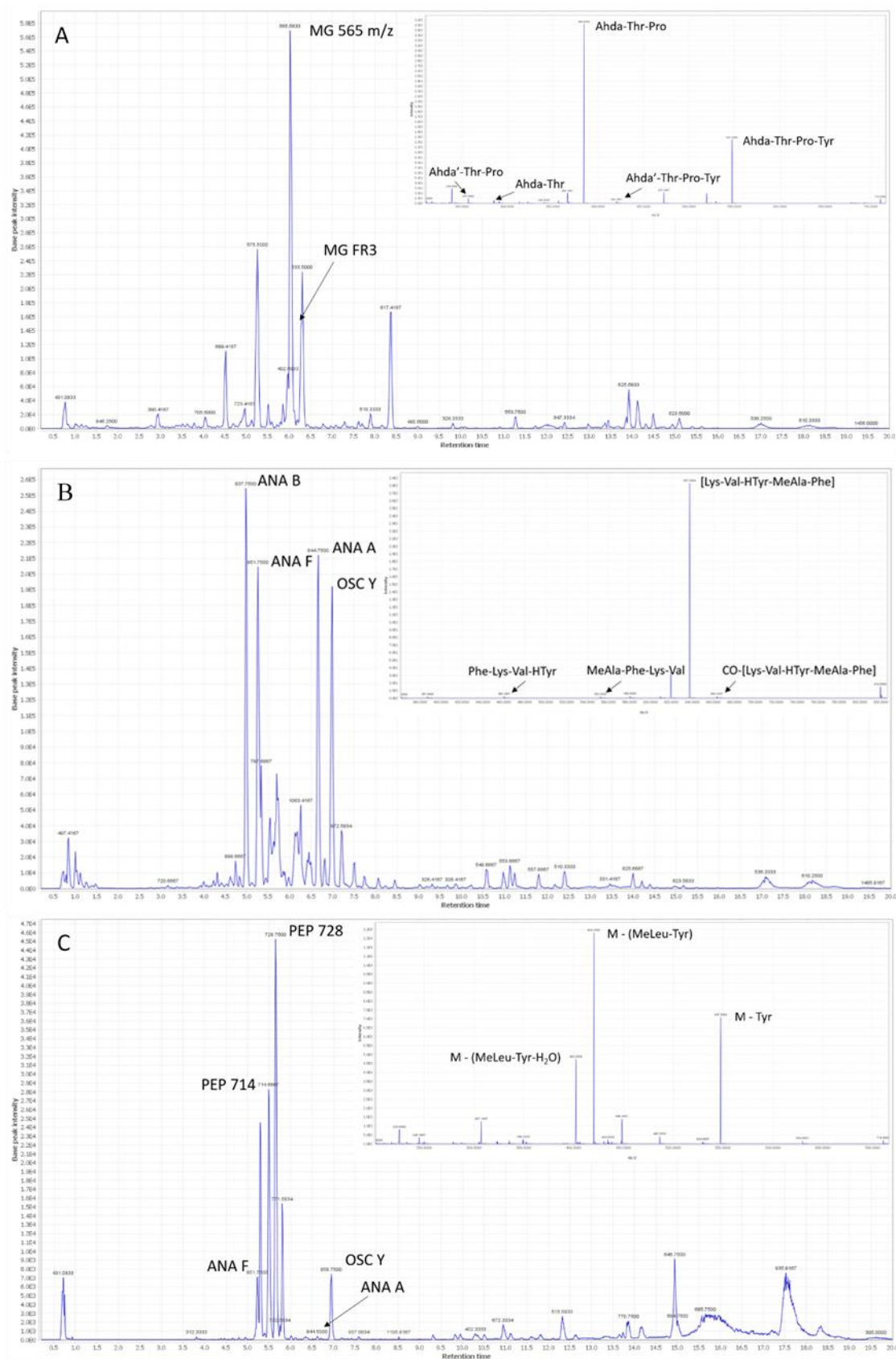
14. ábra A Balatonban előforduló *Microcystis* eredetű peptid családok relatív aránya az egyes mintavételi helyeken. A peptid családokat eltérő színekkel jelöltük: microcystinek (MCY) – kék; anabaenopeptinek (ABP) – zöld; microgininek (MG) – piros; egyéb peptidek (PEP) – magenta

A vizsgálatok során az általunk talált egyes kemotípusok különböző csoportokra oszthatók az egyes metabolitok jelenléte vagy hiánya alapján, hasonlóan más tanulmányokhoz, melyekben *Microcystis* és más peptid termelő cianobaktériumokat (például *Planktothrix* sp., *Nostoc* sp. stb.) vizsgáltak [138-141]. Ezekre a nemzetségekre gyakran igen eltérő kemotípusok jellemzőek, amelyek így képesek különböző típusú peptideket előállítani a természetes közösségekben [10]. A természetes populációkból származó *Microcystis* izolátumainkban négy

kemotípust különítettünk el, melyek néhány vagy több jellemző peptidet tartalmaztak, de sok esetben, kis mértékben a különböző bioszintetikus klaszterekhez tartozó különböző peptidek is megfigyelhetők voltak (8. ábra).

A Balatonból elsősorban ABP és MG domináns törzseket azonosítottunk (14. ábra), mindkét peptid csoportban sok, kevésbé ismert vagy új rokon vegyület jelent meg. Ezen túl az elemzés során részlegesen azonosított peptid fragmenseket is detektáltunk, amelyek a hőtérekép-vizsgálatok alapján valószínűleg a két fő csoport metabolizmusához (szintézis vagy lebomlás) tartoznak. A 2014-2016 közötti vízvirágzás mintákat illetően fontos megjegyezni, hogy mindhárom természetes körülmények között gyűjtött minta vegyes mátrixot képvisel és a *Microcystis* nemzetség több különféle kemotípusát és/vagy genotípusát tartalmazza. Ezek a minták különböző kemotípus klaszterekhez tartoztak. Az azonos mintavételi helyről származó vízvirágzás minták időben különböző bioaktív peptid mintázatokat mutattak. Míg a 2014. évi mintára főként MG dominancia volt a jellemző, a 2015. évi vízvirágzás meglehetősen ABP gazdag volt. A 2016-os vízvirágzást alkotó közösség többnyire részlegesen azonosított peptideket tartalmazott (15. ábra).

A vizsgálatok során összesen 13 MCY variánst azonosítottunk. Nem kétséges, hogy az ismert cianobakteriális peptidek közül a MCY-k az egyik legközismertebb és legkárosabb család. Az azonosítás során nem találtunk új MCY variánsokat, az összes kimutatott MCY forma a szakirodalomból már ismert. Habár kis mennyiségben néhány MCY változat megfigyelhető volt a MG és ABP domináns mintákban is, ezek a peptid termelő izolátumok külön klasztert alkottak.



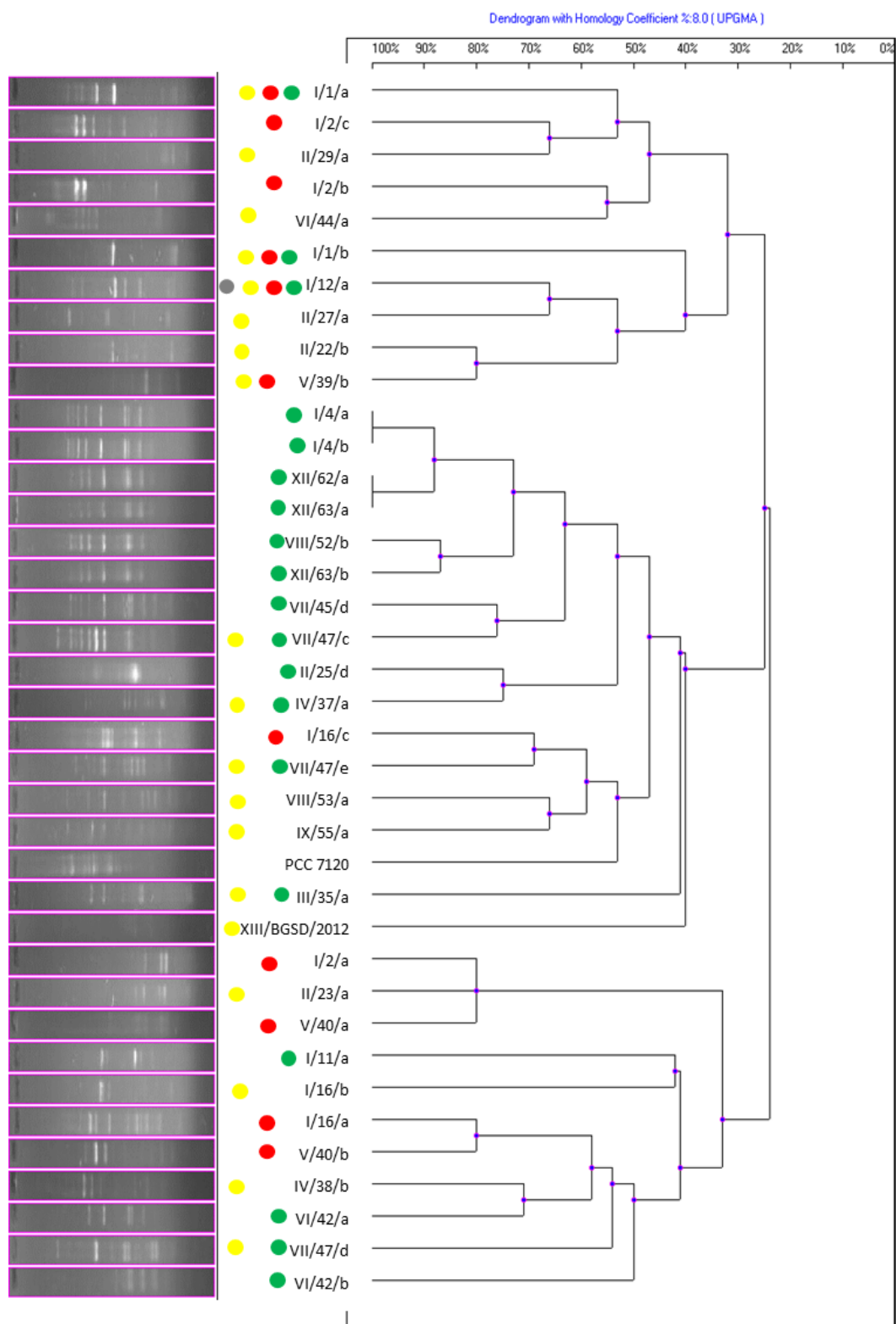
15. ábra A Balatonból gyűjtött 2014-es (A), 2015-ös (B) és 2016-os (C) *Microcystis* vízvirágzás minták LC/MS kromatogramja és a legjellemzőbb metabolitok MS/MS fragmentációs spektruma.

Számos tanulmány során, amikor a *Microcystis* és a *Planktothrix* fajok oligopeptid mintázatát vizsgálták akár a térségünkben [142-145], vagy bárhol világszerte [138,139,146-150] a filogenetikai markerek segítségével számos különböző genotípust sikerült azonosítani [136,151]. Ahogy a mi vizsgálataink során, úgy ezekben az esetekben sem találtak összefüggéseket az egyes genotípusok és kemotípusok között, ami arra enged következtetni, hogy a biológiailag aktív peptidok szintézise filogenetikailag nem konzervált a nemzetségen belül. Erre a következtetésre jutottak egy a közelmúltban megjelent munka során [152], amikor spanyolországi édesvizekben és víztározókban előforduló *Microcystis* fajok peptid mintázatát vizsgálták. Vizsgálatunk eredményei összhangban állnak azokkal a korábbi állításokkal, hogy az oligopeptid termelő képesség megoszlása nincs kapcsolatban a morfológiai alapú fajmeghatározás eredményeivel, az általánosan használt molekuláris markereken alapuló filogenetikai vizsgálatok eredményeivel, vagy az izolált organizmusok földrajzi eredetével [136,153].

6.2. A *Nostoc* izolátumok és azok peptid mintázata

A *Nostoc* nemzetségen belül az egyes fajok azonosítása nagyon nehéz, a limitáló morfológiai taxonómiai tulajdonságok valamint a tenyésztés során bekövetkező morfológiai változások miatt [154,155]. A genetikai markerek bevezetése egyre több problémát vetett fel és több törzs többszörös átnevezéséhez, valamint a "*Nostoc* sp." megnevezés gyakori használatához vezetett. Például a *Nostoc* sp. PCC 7120 törzs eredetileg a *Nostoc muscorum* elnevezést kapta, majd Rippka és munkatársai [156] átsorolták az *Anabaena* nemzetségbe, később azonban molekuláris adatok (DNS-DNS hibridizáció [157] és az ismétlődő (STRR) DNS szekvenciák [158]) alapján a törzs a *Nostoc* sp. PCC 7120 megnevezést kapta. A többfázisú megközelítés eredményeként különböző tanulmányok a *Nostoc* nemzetség heterogenitásáról [159-161], és a *Nostoc*-szerű cianobaktériumok külön klasztereiről [162-165] számoltak be. A *Desmonostoc* [163] és az *Aliinostoc* [165] fajok filogenetikailag különböző csoportjai a *Nostoc*-szerű taxonoknak. A *Desmonostoc* és az *Aliinostoc* fajok különálló filogenetikai csoportokat alkotnak, de morfológiai tulajdonságaik alapján szinte megkülönböztethetetlenek a *Nostoc* fajoktól [166]. A 16S rRNS génszekvenciák alapján törzseink rokonságban állnak a *Nostoc*, *Aliinostoc* és *Desmonostoc* nemzetséggel, de külön csoportot alkotnak tőlük (11. ábra), melyek így tovább növelik a *Nostoc* nemzetség rejtélyes sokféleségét. Habár az izolátumainkat több filogenetikai vonalra lehet felosztani, ezen csoportok nem mutattak semmilyen összefüggést

sem a származási helyeikkel sem a metabolikus aktivitásukkal. A termelt peptid típusok sokféleségét tekintve azonban a fő filogenetikai csoportok különbségeket mutattak. Az egyik csoport csak ABP- és BNS/SUO termelő törzseket tartalmazott, míg a másik csoport az ABP, NG/MG és/vagy BNS/SUO előállítására képes törzsekből állt. Ebben a két klaszterben a peptideket termelő törzseknek csak 15%-a volt képes két különböző típus előállítására szimultán. A szekvenált peptid termelő törzsek csaknem fele (46%) egy harmadik filogenetikai csoporthoz tartozott, és sokuk több peptid típust is képes volt előállítani, továbbá a törzs, amely mind a négy típust termelte, szintén ebbe a csoportba tartozik. Az a megfigyelésünk, hogy a törzsek sem a mintavételi helyeik, sem a kemotípusuk alapján nem mutatnak összefüggést a filogenetikai csoportokkal, azzal magyarázható, hogy számos szabadon élő mikroorganizmus terjedése nem korlátozott [167]. A földrajzi eloszlásról szóló hasonló megállapításokat már korábban közzétették a *Microcystis* és az édesvízi *Synechococcus* fajok esetében [39,168]. Különböző típusú cianobakteriális oligopeptidek termelését világszerte széles körben kutatják [93,142,149-153,169]. Az egyes kemotípusok és a genotípusok közötti korreláció hiányát hasonló tanulmányokban már korábban is leírták [152]. Nem találtunk kapcsolatot a DNS-ujjlenyomat vizsgálatok eredménye és a filogenetikai elemzés között sem. Ezenkívül az STRR és az ERIC DNS-ujjlenyomat eredmények szintén nem mutattak szigorú korrelációt sem a törzsek eredetével, sem a termelt peptid metabolitokkal, viszont az ABP termelő törzsek többsége külön csoportot alkotott (16. ábra).



16. ábra A peptid metabolit termelő *Nostoc*-szerű sejtvonalak STRR mintázata alapján készült dendrogramja. A sejtvonalakat UPGMA módszerrel csoportosítottuk. A sejtvonalak által termelt peptid metabolitokat színes körökkel jelöltük: ● anabaenopeptinek, ● nostogininek/microgininek, ● banyasidok/suomilidek, ● nostopeptolidok.

Az izolált sejtvonalak valamivel több, mint egyharmada termelt valamilyen peptid típusú metabolitot. Méréseink során összesen 41 komponenst azonosítottunk, amelyeket 4 peptid osztályba soroltunk be. Tizenkét NG/MG, 16 ABP, 12 BNS/SOU és 1 NPL variánst találtunk az izolátumaink kivonataiban (5. táblázat). Annak ellenére, hogy sok esetben leírtak MCY-t és a NOD-t termelő *Nostoc* fajokat [170-174], esetünkben sem MCY, sem NOD variánsokat nem azonosítottunk. Érdekes módon törzseink nagy hasonlóságot mutattak a GeneBank egyes *Nostoc* törzseivel, mint például a TAU-MAC 0799 vagy a TAU-MAC 0899, amelyek szintén nem termeltek MCY variánsokat [175]. Nem találtunk kapcsolatot az izolátumok származási helyei és az általuk termelt peptid metabolitok előfordulása között. Ugyanakkor az egyes izolátumok szintjén meg tudtunk különböztetni különféle kemotípus csoportokat azok peptid-metabolit tartalma alapján (13. ábra). Mintáinkban azonosított metabolitok között szerepel - a legjobb tudásunk szerint - 10 új NG/MG, 7 új ABP és 9 új BNS/SOU változat is (5. táblázat).

A *Nostoc*-fajok a természetes bioaktív metabolitok jelentős forrásai, amelyek sok szempontból fontosak lehetnek [72], habár ezen metabolitok pontos funkciója még nem teljesen ismert. A szimbiotikus *Nostoc* fajok vizsgálata során Liaimer és mtsai. [60] megállapította, hogy egyes metabolitok (például a MCY-ek) szerepet játszhatnak a szimbiotikus kapcsolatok kialakulásában. Ezenkívül arra is utalnak, hogy bizonyos peptideknek nagy jelentősége van a kommunikációban, a tápanyagok megkötésében vagy a védelemben (például antibiotikus aktivitásuk miatt), mivel ezek a vizsgálatok során a tápközegben jelentősebb mennyiségben jelentek meg, mint intracellulárisan [60]. Továbbá ezek az anyagok jelentős hatással lehetnek a természetes közösségek fajösszetételére [64]. Másrészről ezeknek és hasonló cianobaktérium metabolitoknak gyógyászati és terápiás jelentőségük is lehet [19,29,32,176,177]. Eredményeink szerint a különböző *Nostoc*-fajok peptid metabolit tartalma változatos, esetenként igen magas is lehet, ami összhangban áll más kísérletek eredményeivel [60,93]. Az adatainkat összevetve a korábbi tanulmányunkkal [36], látható, hogy a *Nostoc* fajok kevésbé változatos és mennyiségre relatíve kevesebb peptid metabolitot tartalmaztak más édesvízi fajokhoz (például *Microcystis* spp.) képest.

Annak ellenére, hogy nincs pontos összehasonlító elemzés sem *Nostoc*, sem más nemzetségbe tartozó cianobaktériumok szárazföldi és nyíltvízi formáinak peptidtermelő képességéről/peptid tartalmáról, eredményeink arra utalnak, hogy ezek a szárazföldi *Nostoc* fajok kevésbé változatos és kevesebb mennyiségű peptid metabolitot tartalmaznak,

összehasonlítva más édesvízi fajokkal (például *Microcystis* sp., *Planktothrix* sp.) [36,56,91,150].

Mint azt már említettük, ezeknek a peptideknek a pontos ökofiziológiai funkciója még nem ismert, de érdemes hangsúlyozni, hogy az izolátumaink főként jellegzetes növényi közösségekből származnak. Tekintettel arra, hogy az édesvízi cianotoxin-növény kölcsönhatásokat az utóbbi évtizedekben intenzíven kutatták [2,145,178-180], és néhány előzetes megállapítás [64] arra utal, hogy néhány szárazföldi növényfaj érzékeny bizonyos bioaktív peptidekre, felvetődik annak a lehetősége, hogy ezek akár egyfajta allelopatikus metabolitok lehetnek a szárazföldi ökoszisztémákban. Nem zárható ki azonban, hogy ezek a bioaktív peptidek szerepet játszanak a fogyasztók, a paraziták elleni védekezésben és/vagy a fajok közötti versenyben, amint azt az édesvízi ökoszisztémák esetében is feltételezik.

6.3. A szimbionta *Nostoc* izolátumok és azok peptid mintázata

A 16S rRNS génszekvenciák alapján az szimbionta törzseink rokonságban állnak a *Nostoc*, *Aliinostoc* és *Desmonostoc* nemzetséggel, de külön csoportot alkotnak tőlük. A sejtvonalak két külön csoportra váltak szét, melyek közül az egyik közeli kapcsolatban áll a főként ANA és BNS/SUO termelő szárazföldi *Nostoc* törzsek csoportjával, bár ők maguk nem termeltek semmilyen peptid típusú speciális metabolitot. A másik csoport elkülönült mind a szárazföldi izolátumainktól, mind a referencia törzsektől (F2 ábra). Ebbe a csoportba tartozik az *Azolla* sp. szimbionta sejtvonal is, ami az egyetlen olyan izolált szimbionta *Nostoc* törzsünk, ami képes volt valamilyen speciális metabolitot (a szárazföldi törzsekhez hasonló mértékben) előállítani. Annak ellenére, hogy a mi törzseinkre nem volt jellemző, számos olyan tanulmányt lehet találni, amelyek szimbionta cianobaktériumok, köztük *Nostoc* fajok speciális metabolit termeléséről szólnak [68,72,171,172]. Figyelembe véve az irodalmi adatokat, valamint azt, hogy a zuzmó eredetű sejtvonalaink szinte mindegyike egy nemzetségből (*Collema*) származik, több különböző forrásból származó minta vizsgálata nagyobb valószínűséggel adott volna pozitív eredményt a peptid metabolit vizsgálatok során.

6.4. Az azonosított peptid családok variabilitása és jellemzői

6.4.1. Nostogininek és microgininek

Ezeket a rövid, lineáris szerkezetű, nem riboszómális oligopeptideket már több vízvirágzást alkotó cianobaktérium izolátumból is kimutatták és tisztították korábban. Az ismert variánsok száma nagyjából 50-re tehető és folyamatosan növekszik [10,181,182]. A család tagjaira jellemző, hogy egy α -hidroxi- β -amino-oktánsav (NG-ek esetében) vagy α -hidroxi- β -amino-dekánsav (MG-ek esetében) található az első pozícióban, ami a terminális metilcsoporton keresztül ritkán klórozott is lehet. A molekulában ezen kívül még 3-5 aminosav található, melyek közül az utolsó leggyakrabban tirozin vagy fenilalanin [182-185].

Vizsgálataink során a *Microcystis* és *Nostoc* izolátumok kivonataiból 29 különböző NG és MG variánst azonosítottunk, ezek között nem volt olyan, ami mindkét nemzetségben egyaránt megjelent volna. NG variánsok csak a *Nostoc* kivonatokban voltak jelen, míg MG változatok mindkét csoportból előkerültek. A *Microcystis* fajok által termelt MG-ek nagyobb variabilitást mutattak, ezek többségében szerkezetileg a MG FR3 és a MG FR4 formákhoz állnak közelebb, azok különböző változatai, melyek többnyire egy-egy aminosav egységben térnek el egymástól. A fennmaradó változatok szerkezeti alapon egyrészt a MG T2, másrészt az Ishida és mtsai. [186] által leírt MG 478 variánshoz hasonlíthatók. Mindent egybevéve a *Microcystis* eredetű MG variánsoknál minden aminosav pozíció variábilisnak tekinthető. A *Nostoc* kivonatok a már régóta ismert NG BN741 és MG SD755 különböző szerkezeti változatait tartalmazták, melyeknél az 1. és 5. pozíció volt a legvariábilisabb és a 2.-4. pozícióban lévő aminosavak szinte minden esetben megegyeztek (Val-NMeIle-NMeTyr).

Az NG-ek és a MG-ek cink-metalloproteáz gátlók (például angiotenzin-konvertáló enzim) valamint aminoproteinázok gátlószerei, α -hidroxi- β -amino-alegységükön keresztül kötődnek az enzim aktív helyén lévő cinkhez [72]. A MG T2 aminopeptidáz M (IC_{50} 2,9 μ M) és angiotenzin-konvertáló enzim (IC_{50} 10 μ M) gátló hatással rendelkezik [186]. Hasonló mértékű aminopeptidáz M gátlást figyeltek meg MG FR3 (IC_{50} 6,2 μ M) és MG FR4 (IC_{50} 1,8 μ M) esetében is [181], de angiotenzin-konvertáló enzim gátló hatásukról nincs adat az irodalomban. Ploutno és Carmeli [117] valamint Reshef és Carmeli [118] aminopeptidáz N gátló hatást figyeltek meg NG BN741 (IC_{90} 1,3 μ M) és MG SD755 (IC_{90} 18,5 μ M) esetében, de angiotenzin-konvertáló enzim gátló hatásukról nem számoltak be. Megállapításaink szerint ezek az anyagok fontos jelöltek lehetnek akár a magas vérnyomás kezelésében is [187].

6.4.2. Anabaenopeptinek

Az ABP-ek ciklikus hexapeptidek, a 2. és a 6. helyzetben lévő aminosavak közötti kötésen keresztül alakul ki a gyűrűs struktúra. Az egyetlen aminosavból álló oldallánc a 2. helyzetben található lizinhez kapcsolódik egy ureido-csoporton keresztül. A lizin kivételével az összes aminosav-pozíció variábilis, a 4. és 5. pozíciókban homo-aminosavak és metilezett aminosavak jelenléte gyakori [10]. Az ismert ABP-változatok száma hirtelen nőtt az elmúlt 15 évben: Welker és von Döhren [10] 32 változatot említettek még 2005-ben, Spoof és mtsai. [188] már 97 rokon vegyületet sorolnak fel 2015-ben, Shishido és mtsai. [119] pedig már 115 variánsról tesznek említést 2017-ben.

A vizsgálataink során több mint 50 ABP variánst találtunk kivonatainkban. Ezeknek több mint a felét teljes aminosav szekvenciával jellemeztük. A *Microcystis* fajok esetében több variánst figyeltünk meg, igaz nem minden esetben sikerült a teljes aminosav sorrendet meghatározni. A teljes aminosav szekvenciával rendelkező variánsok a már ismert ABP A, ABP B, ABP F és OSC Y szerkezeti változatai, de több részlegesen azonosított peptid esetében (**43-46**) is felismerhető az ezekre jellemző gyűrűs szerkezet. A *Nostoc* törzseink kivonataiból több korábbi irodalmi forrásból ismert ABP variáns is előkerült (ABP G, ABP 915, ABP MM913, ABP KB899, SCP 791), a legtöbb új variáns szerkezetileg mégis inkább a Sanz és mtsai. [93] által, szintén *Nostoc* fajokból származó ABP változatokhoz áll közelebb. Ezen variánsoknál az 5. aminosav pozícióban egy metil-aszparagin, valamint a 6. pozícióban egy homo-aminosav (homotirozin vagy homofenilalanin) található. Az ABP-ek szerkezetére általánosan jellemző, hogy a 4. pozíciót egy homo-aminosav (homotirozin vagy homofenilalanin) foglalja el, azonban egyes, általunk talált változatoknál metil-homofenilalanin és etil-homofenilalanin jelenlétét feltételezzük. Ilyen szokatlan aminosavak szintén előfordulnak egyes Sanz és mtsai. [93] által leírt variánsokban. Más szerzőknél szintén előfordulnak hasonlóan szokatlan aminosavak, amelyek tömegük alapján megfeleltethetők ezeknek a változatoknak. Például a Schreuder és mtsai. [189] által leközölt tanulmányban található 5-fenil-norvalin, és 6-fenil-norleucin, illetve a Shishido és mtsai. [119] által leközölt tanulmányban található 2-amino-5-fenil-pentánsav és 2-amino-6-fenilhexánsav megnevezés megfeleltethető az általunk használt metil-homofenilalanin és etil-homofenilalanin megnevezéseinknek. Ezen kívül mindkét szerző említést tesz egy további szokatlan aminosav, a 2-amino-6-(4'-hidroxifenil)-hexánsav, azaz etil-homotirozin előfordulásáról, de mi nem találtunk ilyen módosítást tartalmazó variánst a kivonatainkban.

Az ABP-ek szerkezeti sokféleségüknek köszönhetően igen különböző hatásokkal bírhatnak. Az ABP F, OSC B és C variánsok protein foszfatáz inhibitorok. Az N-metil-homotirozin és a pozitív töltésű arginin aminosav egységek kulcsfontosságúak a gátló hatás kialakulásában [190]. Az ABP-ekről azt is kimutatták, hogy gátolják a proteináz enzimek, például a tripszin, kimotripszin, elasztáz és karboxipeptidáz A (ABP 915 IC₅₀ 65 µg/ml; ABP G IC₅₀ 1,8 ng/ml [191]) működését [192-194]. Kimutatták továbbá azt is, hogy az ABP B és az ABP F, amelyek a leggyakrabban előforduló variánsok, gátolják több *M. aeruginosa* sejtvonal növekedését, valamint elindítják a sejtek lízisét [195,196]. Néhány publikációban az ABP B és az ABP F kalmomodulinnal aktivált agyi foszfodiészteráz és a szarkoplazmatikus retikulum Ca²⁺-ATPáz gátló hatásait közölték [166,197]. Patkány aorta vizsgálatokban ABP B és ABP 906 kezelések eredményeként simaizomgörcsoldó aktivitást detektáltak [198]. Az eddig ismert hatások alapján elmondható, hogy ezek a metabolitok mind ökológiai, mind egészségügyi szempontból nagyon fontosak lehetnek [187].

6.4.3. Banyasidok

A BNS-ok/SUO-ek egy, a cianobaktériumok által termelt másodlagos metabolitok kevésbé ismert csoportja. Ezek a glikopeptidek szerkezetileg az aeruginosin típusú metabolitokhoz tartoznak, mivel a 4. pozícióban egy arginin-származékot (Aaep) tartalmaznak [10]. A 3. helyzetben lévő jellegzetes biciklononán részhez kapcsolódik egy α-glükóz, ami a molekula egyetlen variábilis része. Az 1. és 2. pozícióban kivétel nélkül egy metil-glicerinsav-szulfát és egy leucin található [124,125]. A korábban ismert variánsok proteáz (tripszin és trombin) gátlóknak bizonyultak [124]. BNS variánsok kizárólag *Nostoc* kivonatokban fordultak elő, sok mintánkban jelen voltak (köztük az *Azolla* sp. szimbionta sejtvonal kivonatában is), és bizonyos esetekben nagyon magas intenzitást mutattak. Ezek között számos korábban ismeretlen BNS változatot sikerült azonosítanunk, melyek legtöbbször a BNS A és BNS B valamint a SUO szerkezetétől egy hexánsav egységben illetve kisebb egységekben (metil-, etil-, propil csoportban különböznek). Sonkoly és mtsai. [64] egy csírázási vizsgálat során kimutatták, hogy a BGSD-2012 törzs BNS-okban gazdag kivonata befolyásolta (gátolta) az alkalikus gyeptársulásokat alkotó növényfajok csírázását. Előzetes vizsgálataink alapján ugyan ez a kivonat gátolta a savas és lúgos proteázok működését mustár csíranövényekben, továbbá (szintén előzetes mérések során) BNS tartalmú kivonatok gátolták az angiotenzin-konvertáló enzim működését.

6.4.4. Microcystinek

Ez a peptid csoport különösen nagy figyelemet követel, mivel a MCY-ek a leggyakoribb, természetes vizekben előforduló cianobakteriális toxinok [169,199], melyek emberre, állatra és a növényi szervezetekre egyaránt veszélyesek; komoly károkat, betegségeket, szövődeményeket és halált is okozhatnak. Bár sok különböző cianobaktérium nemzetségből leírtak már MCY termelő fajokat (köztük szabadon élő és szimbionta *Nostoc* fajokat is), mi csak és kizárólag *Microcystis* fajokban találtunk MCY variánsokat. Minden azonosított MCY változat már fellelhető volt az irodalomban. Szerkezetileg igen sokfélék, különböző MCY-LR, -YR -FR és -WR analógokat figyeltünk meg, de MCY-RR és -LW is jelen volt a kivonatokban. A MCY-ek az egyik leginkább kutatott peptid metabolit csoport. Hatásaikat már jól ismerjük, tudjuk, hogy ezek a hepatotoxinok a protein foszfatáz enzimek gátlása révén fejtik ki hatásukat, és befolyásuk lehet a legkülönbözőbb életfolyamatokra.

6.4.5. Nostopeptolidok

A cianobaktériumokban először Golakoti és mtsai. azonosítottak NPL-okat [99]. Az utóbbi években számos új NPL variánst és szerkezetileg hasonló nostoweipeptin (NWP) variánsokat azonosítottak [127,200]. Munkánk során egy NPL variánst sikerült azonosítanunk, ami egy *Nostoc* kivonatból származik. Ezen ciklikus peptidek mindegyikére egy nem proteinogén aminosav, a 4-metil-prolin vagy a 4-hidroxi-prolin jelenléte a jellemző. Liaimer és mtsai. [127,201] megállapították, hogy a NPL-ok és más poliketid vegyületek részt vesznek a *Nostoc punctiforme* életciklusának szabályozásában és a motilis stádiumról a vegetatív növekedésre való áttérésében. Az NPL-okat és NWP-eket antitoxinként azonosították, gátolták a HEK293 hepatociták MCY-indukált apoptózisát a MCY felvételért felelős OATP1B1/B3 szerves aniontranszporterek gátlása révén [200].

7. Konklúzió

A hagyományos cianobakteriális toxin és/vagy bioaktív metabolit kutatásokkal szemben, amelyeknél főként az egyes peptidekre, azok hatásának feltárására vagy bioszintézisre összpontosítanak, mi céltalan módszerrel történő kemotípus vizsgálat segítségével tanulmányoztuk a vízvirágzásokban, vízi és szárazföldi körülmények között megfigyelhető cianobaktérium fajok által termelt különböző típusú peptidek előfordulását.

Munkánk során a Balatonból származó 25 nyíltvízi *Microcystis* izolátum és 3 vízvirágzást alkotó *Microcystis* közösség által termelt peptid metabolit variabilitását vizsgáltuk meg. Ezeket *Microcystis flos-aquae*-ként azonosítottuk és megfigyeltük a fajra jellemző nyálkaburkokat is, ami a sejtek legfontosabb védőrétege lehet a sajátos szűrő módszerrel táplálkozó halfajok tápcsatornájában lévő szélsőséges körülmények között. Az izolátumok kivonataiban 3 különböző peptid családba tartozó metabolitokat (összesen 66 félét) azonosítottunk. A peptidek között találunk MCY variánsokat is, ezek néhány sejtvonal esetében nagyobb mennyiségben is jelen voltak. A külső poliszacharid réteg védelmi funkcióján túl érdemes megjegyezni a vizsgálatok során kimutatott peptideket, elsősorban a nagyszámú ABP-eket és MG-eket, valamint azok fentebb tárgyalt bioaktivitást. A halfajok emésztő enzimeinek aktivitását korábban már több tanulmányban is vizsgálták [202,203], és a főbb emésztőenzim csoportok a foszfatazok és proteázok voltak [204]. Számos tanulmány rámutatott már arra, hogy egyes cianobaktériumok képesek túlélni a halak tápcsatornájában, és életképes formában szabadulnak ki onnan [54,55,205-207]. Elképzeléseink szerint, az azonosított MG-ek és ABP-ek, mint hatékony proteázgátlók, az enzimekhez való közvetlen kötődéssel módosíthatják azok aktivitását.

Munkánk eredményeként bemutattuk a magyarországi speciális alkalikus élőhelyeken előforduló nitrogén kötő szárazföldi cianobaktériumok peptid metabolit variabilitását. Az izolált *Nostoc*-szerű törzseket metabolikus aktivitásuk alapján különféle kemotípus csoportokba tudtuk besorolni. Összesen 41 peptid típusú metabolitot azonosítottunk, amelyek 4 különböző peptid családba tartoztak. A sokat vizsgált cianotoxinok (például MCY-ek) közül egy sem fordult elő a törzsek kivonataiban, de sok, eddig ismeretlen biológiailag aktív peptid metabolitot sikerült azonosítanunk. Számos hasonló tanulmány, ami csak a jól ismert toxin formákra fókuszál negatív eredménnyel zárult. Eredményeink közül érdemes kiemelni a *Nostocaceae* család BNS termelőinek jelentőségét, amelyek nagy számban voltak jelen a

vizsgált területen, sőt, kiemelkedő kemotípusként is megjelentek. Ezek a glikopeptidek szerkezetileg az aeruginosinokhoz hasonlóak, hatásukat tekintve proteáz gátlók, de a molekulában lévő cukor egység miatt sokkal vízdíszíthetőbbak, mint több más peptid. Az előfordulásuk és az intenzitásuk alapján ezeket a peptideket érdemes lehet tovább kutatni, vizsgálni. A vizsgálataink során talált és a hozzájuk hasonló kevésbé ismert vagy ismeretlen metabolitok pontos szerepét a jövőben érdemes lesz tisztázni, hiszen ezek jelentősek lehetnek orvosi szempontból és a potenciális gyógyászati hatóanyagok fejlesztésének szempontjából is. Továbbá eredményeink felhívják a figyelmet a nem célzott vizsgálati módszerek alkalmazásának fontosságára is.

8. Összefoglalás és új eredmények

A cianobaktériumok világszerte elterjedt élőlények, változatosságuknak köszönhetően igen sok szempontból jelentősek. Egyes fajaik képesek különféle biológiai szempontból jelentős anyagokat előállítani, melyek gyógyászati szempontból érdekesek lehetnek, míg más fajok toxicitásuk miatt tarthatnak számot érdeklődésre. Az elmúlt években a korábbiaktól eltérően rendszeresen fordultak elő *Microcystis* vízvirágzások a Balatonban. Munkánk során azonosítottuk a tóban megtalálható *Microcystis* fajokat és megvizsgáltuk azok peptid termelő képességét. Az egyes metabolitok előfordulása alapján különböző kemotípusokat határoztunk meg, valamint megvizsgáltuk az egyes kemotípusok térbeli és időbeli eloszlását. A főbb eredmények a következők:

- Az izolált sejtvonalaink morfológiai és molekuláris filogenetikai alapon a *Microcystis flos-aquae* fajhoz tartoznak.
- 25 nyíltvízi *Microcystis* izolátum és 3 vízvirágzást alkotó *Microcystis* közösség peptid metabolit vizsgálata során összesen 66 metabolitot azonosítottunk. A sejtvonalak vagy ABP vagy MCY vagy MG variánsokat termeltek nagyobb mennyiségben. Az egyes kemotípusok között nem találtunk filogenetikai kapcsolatot.
- Munkánk során 17 MG, 36 ABP és 13 MCY variánst azonosítottunk az izolált törzsekből. Ezek között szerepel 15 új MG és 32 új ABP változat is.
- Elsősorban ABP és MG domináns törzseket azonosítottunk, két sejtvonal nagyobb mennyiségben termelt MCY-eket.
- Nem találtunk szignifikáns összefüggést a metabolit mintázatok és a minták származása között sem. A 3 egymás utáni évből származó vízvirágzás minták különböző kemotípus csoportokhoz tartoztak.

Hasonló módon vizsgáltuk meg az Alföld különböző területeiről származó szabadon élő *Nostoc* faj peptid termelő képességét:

- Az izolálás során a terepi mintákból morfológiai alapon 133 sejtvonalat hoztunk létre. A sejtvonalak a molekuláris filogenetikai vizsgálatok során elkülönültek a *Nostoc*, *Aliinostoc* és *Desmonostoc* referencia törzsektől. A sejtvonalak genetikai heterogenitását DNS-ujjlenyomat módszerrel is vizsgáltuk, és nem találtunk összefüggéseket a filogenetikai elemzéssel.

- A peptid metabolom vizsgálatok során összesen 41 metabolitot azonosítottunk. A sejtvonalakat peptid metabolit tartalmuk alapján 4 kemotípus csoportba tudtuk besorolni. Nem találtunk összefüggéseket a kemotípus csoportok és a filogenetikai vizsgálatok, valamint a kemotípus csoportok és a DNS-ujjlenyomat vizsgálatok eredményei között.
- Az azonosított peptidek között található 12 NG/MG, 16 ABP, 12 BNS/SUO és 1 NPL variáns, ezek közül elsőként írtunk le 10 NG/MG, 7 ABP és 9 BNS/SUO változatot.

Megvizsgáltuk továbbá néhány szimbionta *Nostoc* faj peptid termelő képességét is:

- A szimbionta *Nostoc* sejtvonalaink molekuláris alapon rokonságban állnak a *Nostoc*, *Aliinostoc* és *Desmonostoc* nemzetséggel, de külön csoportot alkotnak. Egyes sejtvonalak közeli kapcsolatban állnak főként ANA és BNS/SUO termelő szárazföldi *Nostoc* törzsek csoportjával.
- A zuzmó eredetű sejtvonalaink nem termeltek semmilyen peptid típusú speciális metabolitot.
- Az *Azolla* sp. szimbionta sejtvonal képes volt BNS variánst (a szárazföldi törzsekhez hasonló mértékben) előállítani.

A két cianobaktérium nemzetség tagjai által termelt peptid metabolitok gyógyászati és egészségügyi szempontból egyaránt jelentősek:

- A MCY-ek a leggyakoribb természetes vizekben előforduló cianobakteriális toxinok, egyaránt veszélyesek emberekre, állatokra és növényi szervezetekre.
- A NG-ek és a MG-ek cink-metalloproteáz gátlók, valamint aminoproteinázok gátlószerei. Az angiotenzin-konvertáló enzimre gyakorolt gátló hatásuk miatt ezek az anyagok fontos jelöltek lehetnek akár a magas vérnyomás kezelésében.
- Az ABP-ek különböző hatásokkal bírhatnak, leggyakrabban a proteináz enzimek, például tripszin, kimotripszin, elasztáz és karboxipeptidáz A működését gátolják. Egyes variánsok protein foszfatázok inhibitorai.
- A korábban is ismert BNS-ok/SUO-ek proteáz (tripszin és trombin) gátlóknak bizonyultak, azonban előzetes vizsgálataink során BNS tartalmú kivonatok gátolták az angiotenzin-konvertáz enzim működését.
- Egyes NPL variánsokat antitoxinként tartanak számon, gátolják a MCY-ek felvételéért felelős aniontranszporterek működését.

9. Summary and new results

Cyanobacteria are widespread throughout the world and, due to their diversity, they can be significant in many ways. Some species are able to produce a variety of biologically significant substances, which can be interesting from medicinal point of view. In recent years, *Microcystis* water blooms have been regularly occurring in Lake Balaton. During our work *Microcystis* species were identified and their peptide production capacity were examined. Based on the occurrence of the metabolites, different chemotypes were determined and the spatial and temporal distribution of the chemotypes was investigated. Our main results are:

- Based on morphological and molecular phylogenetic data, our isolated strains were identified as *Microcystis flos-aquae*.
- A total of 66 metabolites were identified from 25 *Microcystis* isolates and 3 water bloom forming *Microcystis* communities. Strains produced either ABP or MCY or MG variants in larger amounts. No phylogenetic relationship was found between the chemotypes.
- 17 MG, 36 ABP and 13 MCY variants were identified from the isolated strains, including 15 new MGs and 32 new ABP variants.
- Mostly ABP and MG dominant strains were identified, and two strains produced higher amount of MCYs.
- No significant correlation was found between the metabolite patterns and the origin of the samples. The water bloom samples, which came from 3 consecutive years belonged to different chemotype groups.

We investigated the peptide-producing ability of free-living *Nostoc* species from various parts of the Great Plain in a similar manner:

- Based on morphological features, 133 cell lines were generated from field samples during the isolation. Our strains formed different lineages in the phylogenetic tree, separately from the *Nostoc*, *Aliinostoc* and *Desmonostoc* reference strains. Genetic heterogeneity of the cell lines was also analyzed by DNA fingerprinting and no correlation was found with the results of the phylogenetic analysis.
- A total of 41 metabolites were identified, and the strains were classified into 4 chemotype groups based on their peptide metabolite content. No correlation was

found between the chemotype groups and the results of the phylogenetic analysis, or between the chemotype groups and the results of the DNA fingerprinting.

- Among the identified peptides there were 12 NG/MG, 16 ABP, 12 BNS/SUO and 1 NPL variants. 10 NG/MG, 7 ABP and 9 BNS/SUO variants were described for the first time.

We also examined the peptide-producing ability of some symbiotic *Nostoc* species:

- Symbiont *Nostoc* strains showed similarity to the *Nostoc*, *Aliinostoc* and *Desmonostoc* genus, but formed separate groups in the phylogenetic tree. Some strains were closely related to some ANA and BNS/SUO producing free-living *Nostoc* strains.
- Lichen-derived cell lines did not produce any specific peptide-type metabolites.
- *Azolla* sp. symbiont strain was able to produce a BNS variant (to the same extent as the free-living strains).

The peptide metabolites produced by the members of this two cyanobacterial genus can be important both from medicinal and health/toxicological points of view:

- MCYs are the most common cyanobacterial toxins and are dangerous to humans, animals and plants.
- NGs and MGs are zinc metalloprotease inhibitors and aminoproteinase inhibitors. Due to their inhibitory effect on the angiotensin converting enzyme, these substances may be important candidates for the treatment of hypertension.
- ABPs can have different effects; commonly they inhibit proteinase enzymes such as trypsin, chymotrypsin, elastase and carboxypeptidase A. Some variants are inhibitors of protein phosphatases.
- Previously known BNSs/SUOs have been shown to be protease inhibitors (trypsin and thrombin), but in our preliminary studies BNS-containing extracts inhibited the function of the angiotensin convertase enzyme.
- Some NPL variants are recognized as antitoxins, they inhibit the function of anion transporters responsible for the uptake of MCYs.

10. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, Vasas Gábornak a kutatómunkám során nyújtott támogatásáért.

Köszönöm a MTA Ökológiai Kutatóközpont Balatoni Limnológiai Intézet és Duna-kutató Intézet munkatársainak a balatoni mintavételezésben, valamint a DE TTK Ökológiai Tanszék munkatársainak az alföldi mintavételezésben nyújtott segítségét.

Köszönöm Kériné Borsodi Andrea és Felföldi Tamás filogenetikai analízisekben nyújtott nélkülözhetetlen szakmai segítségét.

Köszönöm Kiss-Szikszai Attila és Gonda Sándor analitikai vizsgálatokban nyújtott nélkülözhetetlen szakmai segítségét.

Köszönet illeti továbbá Barna Erzsébetet, Garda Tamást, Hanyicska Martint, Plaszkó Tamást, Sramkó Gábort, Surányi Gyulát, Szabó Katalint, Szűcs Zsoltot, Tar Ágnest és Ujvárosi Andrea Zsuzsannát a laboratóriumi munkákban nyújtott segítségükért.

A dolgozat elkészülését a Gazdaságfejlesztési és Innovációs Operatív Program (GINOP-2.3.3-15-2016-00021), a Debrecen Venture Catapult Program (EFOP-3.6.1-16-2016-00022), a Felsőoktatási Intézményi Kiválósági Program (20428-3/2018/FEKUTSTRAT, NKFIH-1150-6/2019) és a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal (NKFIH K119647) támogatták.

11. Függelék

F1. táblázat A *Microcystis* törzsekből származó microginin (MG) típusú peptidek fragmentjeinek m/z értékei. Az értékeket Dalton-ban tüntettük fel és kerekítve adtuk meg. Az LC-MS/MS adatokból a leucin és az izoleucin formákat nem lehet megkülönböztetni, ezeket az aminosavakat a legközelebbi irodalmi eredmények alapján tüntettük fel. X1' – az Ahda oldallánc nélküli központi része ($m = 58$ Da); nd – nem detektált.

	Peptid	[M + H] ⁺ m/z	X1-X2-X3-X4	X1-X2-X3-X4 -H ₂ O	X1'-X2-X3-X4	X1'-X2-X3-X4 -H ₂ O	X1-X2-X3	X1-X2-X3 -H ₂ O	X1'-X2-X3	X1'-X2-X3 -H ₂ O	X1-X2
1	MG 565	565.5					384	366	257	239	287
2	MG 549	549.5					368	nd	241	nd	257
3	MG 579	579.6					398	380	257	239	301
4	MG 579	579.6					398	380	271	253	287
5	MG 581	581.5					384	366	257	239	287
6	MG 595	595.5					398	380	271	253	287
7	MG FR3	728.6	547	529	420	402	384	366	257	239	287
8	MG 712	712.6	531	513	404	nd	368	350	241	223	257
9	MG FR4	742.6	561	543	420	nd	398	380	257	239	301
10	MG 744	744.6	547	529	nd	nd	384	366	257	239	287
11	MG 754	754.6	573	nd	446	nd	396	nd	269	252	299
12	MG 607	607.5					412	394	285	267	299
13	MG 621	621.6					426	408	285	267	313
14	MG 591	591.5					426	408	285	267	313
15	MG 770	770.6	589	571	462	444	412	394	285	267	299
16	MG 784	784.6	603	585	462	nd	426	408	285	267	313
17	MG 798	798.6	617	599	476	458	440	422	299	281	313

F2. táblázat A *Microcystis* törzsekből származó anabenozeptin (ABP) típusú peptidek fragmentjeinek m/z értékei. Az értékeket Dalton-ban tüntettük fel és kerekítve adtuk meg. Az LC-MS/MS adatokból a leucin és az izoleucin formákat nem lehet megkülönböztetni, ezeket az aminosavakat a legközelebbi irodalmi eredmények alapján tüntettük fel. OSC – oscillapeptin; nd – nem detektált.

	Peptid	$[M + H]^+$ m/z	Gyűrű-CO	Gyűrű	X6-X2-X3-X4	X5-X6-X2-X3	X2-X3-X4
18	ABP B	837.7	663	637	552	460	405
19	ABP F	851.7	677	651	566	474	419
20	ABP A	844.7	663	637	552	460	405
21	OSC Y	858.6	677	651	566	474	419
22	ABP 828	828.6	647	621	536	460	389
23	ABP 842	842.7	661	635	550	474	403
24	ABP 916	916.9	735	709	518	532	405
25	ABP 930	930.6	749	723	532	546	419
26	ABP 852	852.8	733	707	nd	nd	nd
27	ABP 866	866.7	747	721	nd	nd	nd
28	ABP 856	856.7	711	685	nd	nd	nd
29	ABP 870	870.7	757	731	nd	nd	nd
30	ABP 872	872.6	679	653	nd	nd	nd
31	ABP 886	886.7	643	617	532	440	405
32	ABP 900	900.7	657	631	546	454	419
33	ABP 914	914.8	647	621	536	460	389
34	ABP 928	928.7	661	635	550	474	403
35	ABP 892	892.7	663	637	552	460	405
36	ABP 938	938.5	677	651	566	474	419
37	ABP 860	860.7	691	665	580	488	419
38	ABP 888	888.7	679	653	nd	nd	nd
39	ABP 902	902.6	693	667	nd	nd	nd
40	ABP 904	904.6	695	669	nd	nd	nd
41	ABP 904	904.7	695	669	nd	nd	nd
42	ABP 934	934.6	725	699	nd	nd	nd
43	ABP 854	854.6	677	651	566	474	419
44	ABP 814	814.7	677	651	566	474	419
45	ABP 888	888.7	663	637	552	460	405

46	ABP 920	920.7	677	651	566	474	419
47	ABP 892	892.6	677	651	nd	nd	nd
48	ABP 984	984.6	677	651	nd	nd	nd
49	ABP 902	902.7	677	651	nd	nd	nd
50	ABP 918	918.6	677	651	nd	nd	nd
51	ABP 905	905.2	679	653	nd	nd	nd
52	ABP 922	922.1	712	686	nd	nd	nd
53	ABP 904	904.7	721	695	nd	nd	nd

F3. táblázat A *Microcystis* törzsekből származó microcystin (MCY) típusú peptidek fragmentjeinek m/z értékei. Az értékeket Dalton-ban tüntettük fel és kerekítve adtuk meg. * az adatokat $[M + 2H]^{2+}$ formában adtuk meg.

	Peptid	$[M + H]^+$ m/z	X4-X5-X6- X7-X1-X2	X3-X4- X5-X6	X3-X4- X5-X6 - H ₂ O	X4-X5- X6-X7	X4- X5-X6	X7-X1-X2- X3-X4-NH ₂	X7-X1- X2-X3- X4	X1-X2- X3-X4	X4- X5
54	MCY-LW	513.3 *	896	758	740	712	629	600	583	500	500
55	MCY-RR	520.3 *	910	728	710	682	599	614	597	514	470
56	[D-Asp3]MCY-LR	981.9	866	714	696	682	599	556	539	456	470
57	MCY-LR	995.8	866	728	710	682	599	570	553	470	470
58	MCY-HiIR	1009.9	880	728	710	682	599	584	567	484	470
59	[MeSer7]MCY-LR	1014	884	728	710	700	599	588	571	470	470
60	[Dha7]MCY-FR	1015.8	886	728	710	668	599	590	573	504	470
61	MCY-FR	1029.7	900	728	710	682	599	604	587	504	470
62	[Dha7]MCY-YR	1031.9	902	728	710	668	599	606	589	520	470
63	MCY-YR	1045.5	916	728	710	682	599	620	603	520	470
64	MCY-(H4)YR	1049.7	920	728	710	682	599	624	607	524	470
65	MCY-WR	1068.8	939	728	710	682	599	643	626	543	470
66	[MeSer7]MCY-WR	1086.9	957	728	710	700	599	661	644	543	470

F4. táblázat A *Microcystis* törzsekből származó azonosítatlan peptid töredékek fragmentjeinek m/z értékei. Az értékeket Dalton-ban tüntettük fel és kerekítve adtuk meg. Az LC-MS/MS adatokból a leucin és az izoleucin formákat nem lehet megkülönböztetni, ezeket az aminosavakat a legközelebbi irodalmi eredmények alapján tüntettük fel.

Peptid	$[M + H]^+$ m/z	Aminosav szekvencia	Xn	Xn+1
PEP 535	535.4	Xn-Leu	404	
PEP 539	539.4	Xn-Leu	408	
PEP 541	541.4	Xn-Phe	376	
PEP 565	565.5	Xn-MeLeu	420	
PEP 581	581.5	Xn-Tyr	400	
PEP 593	593.5	Xn-Met-MeLeu	317	448
PEP 756	756.6	Xn-Tyr-Tyr	412	575
PEP 593	593.5	Xn-Tyr	412	
PEP 594	594.4	Xn-Thr-Leu	362	463
PEP 712	712.6	Xn-MeLeu-Tyr	404	531
PEP 714	714.6	Xn-MeLeu-Tyr	406	533
PEP 728	728.6	Xn-MeLeu-Tyr	420	547
PEP 740	740.7	Xn-MeLeu-Tyr	432	559
PEP 742	742.6	Xn-Met	593	
PEP 744	744.5	Xn-MeLeu	599	
PEP 714	714.6	Xn-MeLeu-Tyr	406	533
PEP 728	728.6	Xn-MeLeu-Tyr	420	547

F5. táblázat A *Notoc* törzsekből származó nostoginin (NG) és microginin (MG) típusú peptidek fragmentjeinek m/z értékei. Az értékeket Dalton-ban tüntettük fel és kerekítve adtuk meg. X1' – az Ahoa/Ahda oldallánc nélküli központi része ($m = 58$ Da); nd – nem detektált.

Peptid fragment	1	2	3	4	5	6 [NG BN741]	7	8 [MG SD755]	9	10	11	12
X1-X2 – H ₂ O	253.25	267.25	nd	239.17	253.17	239.17	nd	253.17	239.17	267.17	253.17	nd
X1-X2	271.17	285.17	nd	257.25	271.17	257.25	nd	271.25	257.25	285.17	271.17	285.08
X1'-X2-X3 – H ₂ O	nd	267.25	nd	267.25	267.17	nd	nd	267.25	nd	267.17	nd	nd
X1'-X2-X3	285.17	285.17	269.08	285.17	285.17	285.17	285.17	285.25	285.17	285.17	285.08	285.08
X1-X2-X3 – H ₂ O	380.33	nd	nd	366.42	380.33	366.42	394.25	380.33	366.25	394.33	380.33	394.25
X1-X2-X3	398.25	412.33	368.25	384.25	398.25	384.33	412.33	398.25	384.25	412.42	398.25	412.33
X1'-X2-X3-X4 – H ₂ O	nd	nd	nd	nd	448.33	nd	nd	448.17	nd	nd	nd	nd
X1'-X2-X3-X4	nd	nd	nd	nd	462.33	nd	nd	462.08	nd	462.17	462.25	nd
X1-X2-X3-X4 – H ₂ O	nd	nd	nd	nd	557.42	nd	nd	557.34	nd	nd	nd	nd
X1-X2-X3-X4	593.21	607.25	545.33	561.25	575.42	561.25	589.50	575.33	561.25	589.33	575.42	589.50
X1-X2-X3-X4-X5 – H ₂ O	nd	nd	nd	nd	722.58	nd	nd	738.42	nd	752.34	nd	nd
X1-X2-X3-X4-X5	nd	nd	710.31	726.23	740.32	742.23	754.21	756.30	758.23	770.31	772.36	786.30

F6. táblázat A *Notoc* törzsekből származó anabaenopeptin (ABP) típusú peptidek fragmentjeinek m/z értékei. Az értékeket Dalton-ban tüntettük fel és kerekítve adtuk meg. nd – nem detektált.

Peptid fragment	13 [SCP 791]	14 [ABP 807]	16	18	21	22	24
X5-X6	233.17	233.17	290.04	290.07	290.10	306.17	290.11
X2-X3-X4 – H ₂ O	385.15	401.20	371.34	385.28	399.29	385.25	413.28
X2-X3-X4	403.16	419.22	389.36	403.24	417.29	403.29	431.29
X5-X6-X2-X3 – H ₂ O	456.33	456.37	499.83	499.31	499.71	515.20	513.32
X5-X6-X2-X3	474.36	474.41	517.32	517.32	517.33	533.25	531.34
X6-X2-X3-X4 – H ₂ O	nd	548.34	532.27	546.42	560.31	562.35	574.41
X6-X2-X3-X4	550.42	566.38	550.52	564.32	578.40	580.48	592.47
[X2-X3-X4- X5-X6] – H ₂ O	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
[X2-X3-X4- X5-X6]	635.51	651.49	678.47	692.52	706.54	708.54	720.50
CO-[X2-X3-X4- X5-X6] – H ₂ O	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
CO-[X2-X3-X4- X5-X6]	661.42	677.51	704.42	718.54	732.48	734.47	746.44
X1-CO-[X2-X3-X4- X5-X6] – H ₂ O	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
X1-CO-[X2-X3-X4- X5-X6]	792.37	808.22	835.62	849.34	863.26	865.30	877.16

F6. táblázat Folytatás

Peptid fragment	15	17	19	20	23	25 [ABP KB899]	26 [ABP MM913]	27 [ABP 915]	28 [ABP G]
X5-X6	249.08	263.12	263.03	263.10	261.12	305.09	305.03	305.07	305.12
X2-X3-X4 – H ₂ O	371.17	371.18	385.15	387.14	385.30	371.17	385.21	387.25	401.22
X2-X3-X4	398.15	398.21	403.16	405.18	403.30	398.24	403.30	405.26	419.41
X5-X6-X2-X3 – H ₂ O	458.49	472.39	486.33	472.25	484.36	484.38	498.42	500.29	514.24
X5-X6-X2-X3	476.16	490.29	504.36	490.27	502.39	502.41	516.35	518.40	532.28
X6-X2-X3-X4 – H ₂ O	548.26	548.30	562.38	564.31	560.43	514.42	528.23	514.58	528.71
X6-X2-X3-X4	566.29	266.39	580.31	582.39	578.48	532.41	546.20	532.31	546.46
[X2-X3-X4- X5-X6] – H ₂ O	619.48	633.51	nd	649.51	nd	675.59	689.64	691.46	nd
[X2-X3-X4- X5-X6]	637.48	651.45	665.58	667.43	663.56	693.44	707.48	709.47	723.51
CO-[X2-X3-X4- X5-X6] – H ₂ O	645.60	659.43	nd	675.50	nd	701.60	715.75	717.38	nd
CO-[X2-X3-X4- X5-X6]	663.50	677.42	691.49	693.43	689.67	719.52	733.51	735.44	749.59
X1-CO-[X2-X3-X4- X5-X6] – H ₂ O	810.67	824.53	nd	840.52	nd	882.67	896.56	898.53	912.57
X1-CO-[X2-X3-X4- X5-X6]	828.38	842.29	856.32	858.29	870.16	900.31	914.41	916.28	930.35

F7. táblázat A *Notoc* törzsekből származó banyasid (BNS) típusú peptidek fragmentjeinek m/z értékei. Az értékeket Dalton-ban tüntettük fel és kerekítve adtuk meg. SUO – suomilid; nd – nem detektált.

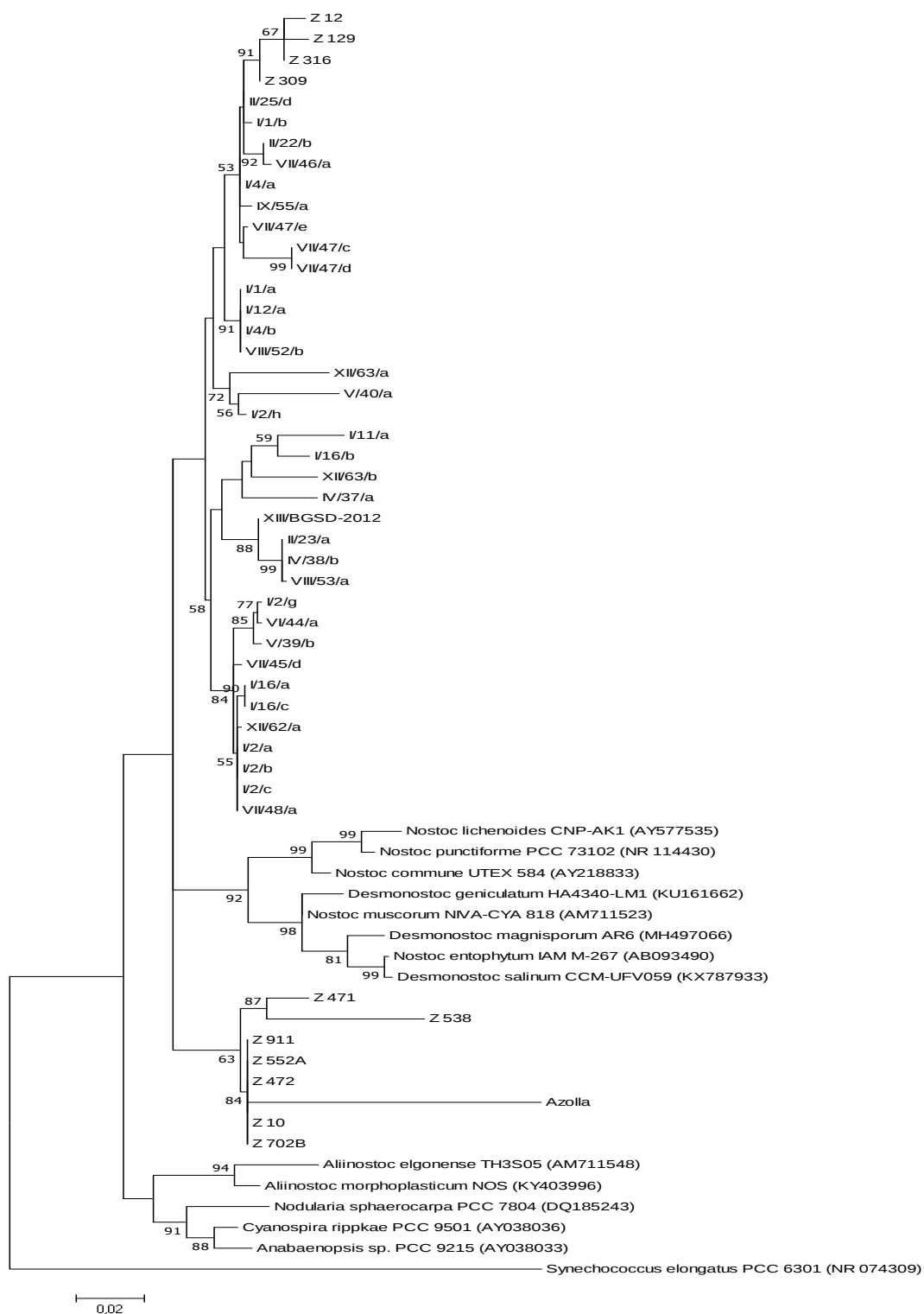
Peptid fragment	29	30	31	32	33 [BNS B]	34 [BNS A]	35	36	37	38 [SUO]	39	40
X2-X3	353.17	353.08	353.25	353.17	353.17	353.17	353.25	353.08	353.17	353.08	nd	353.17
X3-X4	395.17	395.17	395.17	395.08	395.25	395.17	395.25	nd	359.17	395.08	nd	nd
X1-X2-X3	456.25	456.25	456.25	456.08	456.17	456.08	456.25	nd	456.08	456.33	nd	nd
X1-X2-X3-X4 – CN_2H_3	568.42	568.42	568.25	568.33	568.33	568.25	568.42	568.42	568.33	568.33	568.25	568.58
X1-X2-X3-X4 – H_2O	592.33	592.25	592.25	nd	592.33	592.42	592.33	nd	592.33	592.50	592.50	592.25
X1-X2-X3-X4	610.42	610.42	610.42	610.42	610.33	610.25	610.25	610.33	610.42	610.42	610.42	610.33
(S2-S1) X3-X4	557.25	600.33	614.33	684.42	655.42	698.33	712.25	725.42	740.50	753.50	782.58	796.42
X1-X2-(S2-S1)X3	nd	nd	nd	nd	716.33	nd	nd	nd	801.33	814.08	nd	857.33
X1-X2-(S2-S1)X3-X4 – CN_2H_3	730.33	773.42	787.42	857.42	828.50	871.42	885.42	898.50	913.58	926.58	955.42	969.58
X1-X2-(S2-S1)X3-X4 – H_2O	754.50	797.50	811.50	881.50	852.42	895.50	909.25	922.50	937.67	950.67	979.58	993.50
X1-X2-(S2-S1)X3-X4	772.15	815.29	829.34	899.36	870.33	913.24	927.43	940.43	955.98	968.42	997.35	1011.50

F8. táblázat A nostopeptolid A1/A3 fragmentjeinek m/z értékei. Az értékeket Dalton-ban tüntettük fel és kerekítve adtuk meg.

	X9-X10-X3- X4-X5-X6-X7	X6-X7-X8-X9- X10-X3	X3-X4-X5-X6- X7-X8 – H_2O	X6-X7-X8-X9- X10-X3-X4	X4-X5-X6-X7- X8-X9-X10	[X3-X4-X5- X6-X7-X8-X9- X10] – H_2O	[X3-X4-X5- X6-X7-X8-X9- X10]	X1-X2-[X3- X4-X5-X6-X7- X8-X9-X10] – H_2O	X1-X2-[X3- X4-X5-X6-X7- X8-X9-X10]
41	614.17	614.17	620.50	743.50	829.42	880.50	898.42	1064.58	1081.50



F1. ábra Alkalikus sztyepp és gyepek (fent), valamint rét társulások (lent) *Nostoc* kolóniákkal.



F2. ábra A vizsgált szabadon élő és szimbióta *Nostoc* törzsek filogenetikai fája. A dendrogram a 16S régiók szekvenciáin alapszik, és az evolúciós kapcsolatokat a Kimura 2-parameter modellen alapuló Maximum Likelihood módszerrel határoztuk meg.

12. Felhasznált irodalom

- [1] Whitton, B.A., Ed. *Ecology of Cyanobacteria II: Their Diversity in Space and Time.*; Springer: Dordrecht, Heidelberg, New York, London, 2012.
- [2] Meriluoto, J.; Spoof, L.; Codd, G.A., Eds. *Handbook of Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis.*; John Wiley & Sons, Inc.: Chichester, West Sussex, UK, 2016.
- [3] Dolman, A.M.; Rücker, J.; Pick, F.R.; Fastner, J.; Rohrlack, T.; Mischke, U.; Wiedner, C. Cyanobacteria and Cyanotoxins: The Influence of Nitrogen Versus Phosphorus. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e38757.
- [4] Conley, D.J.; Paerl, H.W.; Howarth, R.W.; Boesch, D.F.; Seitzinger, S.P.; Havens, K.E.; Lancelot, C.; Likens, G.E. Controlling Eutrophication: Nitrogen and Phosphorus. *Science* **2009**, *323*, 1014.
- [5] Halstvedt, C.B.; Rohrlack, T.; Andersen, T.; Skulberg, O.; Edvardsen, B. Seasonal Dynamics and Depth Distribution of *Planktothrix* spp. in Lake Steinsfjorden (Norway) Related to Environmental Factors. *J. Plankton Res.* **2007**, *29*, 471-482.
- [6] O'Farrell, I.; Izaguirre, I.; Chaparro, G.; Unrein, F.; Sinistro, R.; Pizarro, H.; Rodriguez, P.; de Tezanos Pinto, P.; Lombardo, R.; Tell, G. Water Level as the Main Driver of the Alternation between a Free-Floating Plant and a Phytoplankton Dominated State: A Long-Term Study in a Floodplain Lake. *Aquat. Sci.* **2011**, *73*, 275-287.
- [7] Briand, J.F.; Jacquet, S.; Flinois, C.; Avois-Jacquet, C.; Maisonnnette, C.; Leberre, B.; Humbert, J.F. Variations in the Microcystin Production of *Planktothrix rubescens* (Cyanobacteria) Assessed from a Four-Year Survey of Lac Du Bourget (France) and from Laboratory Experiments. *Microb. Ecol.* **2005**, *50*, 418-428.
- [8] Neilan, B.A.; Pearson, L.A.; Muenchhoff, J.; Moffitt, M.C.; Dittmann, E. Environmental Conditions that Influence Toxin Biosynthesis in Cyanobacteria. *Environ. Microbiol.* **2013**, *15*, 1239-1253.
- [9] Catherine, Q.; Susanna, W.; Isidora, E.S.; Mark, H.; Aurelie, V.; Jean-Francois, H. A Review of Current Knowledge on Toxic Benthic Freshwater Cyanobacteria--Ecology, Toxin Production and Risk Management. *Water Res.* **2013**, *47*, 5464-5479.
- [10] Welker, M.; von Döhren, H. Cyanobacterial Peptides - Nature's Own Combinatorial Biosynthesis. *FEMS Microbiol. Lett.* **2006**, *30*, 530-563.
- [11] Schwarzer, D.; Finking, R.; Marahiel, M.A. Nonribosomal Peptides: From Genes to Products. *Nat. Prod. Rep.* **2003**, *20*, 275-287.
- [12] Sivonen, K.; Leikoski, N.; Fewer, D.P.; Jokela, J. Cyanobactins-Ribosomal Cyclic Peptides Produced by Cyanobacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, *86*, 1213-1225.

- [13] Kehr, J.C.; Gatte Picchi, D.; Dittmann, E. Natural Product Biosyntheses in Cyanobacteria: A Treasure Trove of Unique Enzymes. *Beilstein J. Org. Chem.* **2011**, *7*, 1622-1635.
- [14] Barzkar, N.; Tamadoni Jahromi, S.; Poorsaheli, H.B.; Vianello, F. Metabolites from Marine Microorganisms, Micro, and Macroalgae: Immense Scope for Pharmacology. *Mar. Drugs* **2019**, *17*, 464.
- [15] Sathasivam, R.; Radhakrishnan, R.; Hashem, A.; Abd Allah, E.F. Microalgae Metabolites: A Rich Source for Food and Medicine. *Saudi J. Biol. Sci.* **2019**, *26*, 709-722.
- [16] Kultschar, B.; Llewellyn, C. Secondary Metabolites in Cyanobacteria. In *Secondary Metabolites - Sources and Applications*; Vijayakumar, R. and Raja, S.S.S., Eds.; IntechOpen: Rijeka, 2018.
- [17] Abed, R.M.M.; Dobretsov, S.; Sudesh, K. Applications of Cyanobacteria in Biotechnology. *J. Appl. Microbiol.* **2009**, *106*, 1-12.
- [18] Pathak, J.; Pandey, A.; Maurya, P.K.; Rajneesh, R.; Sinha, R.P.; Singh, S.P. Cyanobacterial Secondary Metabolite Scytonemin: A Potential Photoprotective and Pharmaceutical Compound. *Proc. Indian Natl. Sci. Acad. B Biol. Sci.* **2019**.
- [19] Rastogi, R.P.; Sinha, R.P. Biotechnological and Industrial Significance of Cyanobacterial Secondary Metabolites. *Biotechnol. Adv.* **2009**, *27*, 521-539.
- [20] Zanchett, G.; Oliveira-Filho, E.C. Cyanobacteria and Cyanotoxins: From Impacts on Aquatic Ecosystems and Human Health to Anticarcinogenic Effects. *Toxins (Basel)* **2013**, *5*, 1896-1917.
- [21] Back, S. Production of Cryptophycin from Blue Green Algae. *J. Young Investig.* **2005**, *12*.
- [22] Shih, C.; Teicher, B.A. Cryptophycins: A Novel Class of Potent Antimitotic Antitumor Depsipeptides. *Curr. Pharm. Des.* **2001**, *7*, 1259-1276.
- [23] Liang, J.; Moore, R.E.; Moher, E.D.; Munroe, J.E.; Al-awar, R.S.; Hay, D.A.; Varie, D.L.; Zhang, T.Y.; Aikins, J.A.; Martinelli, M.J. *et al.* Cryptophycins-309, 249 and Other Cryptophycin Analogs: Preclinical Efficacy Studies with Mouse and Human Tumors. *Invest. New Drugs* **2005**, *23*, 213-224.
- [24] Corbett, T.H.; Valeriote, F.A.; Demchik, L.; Polin, L.; Panchapor, C.; Pugh, S.; White, K.; Knight, J.; Jones, J.; Jones, L. *et al.* Preclinical Anticancer Activity of Cryptophycin-8. *J. Exp. Ther. Oncol.* **1996**, *1*, 95-108.
- [25] Cunningham, C.; Appleman, L.J.; Kirvan-Visovatti, M.; Ryan, D.P.; Regan, E.; Vukelja, S.; Bonate, P.L.; Ruvuna, F.; Fram, R.J.; Jekunen, A. *et al.* Phase I and Pharmacokinetic Study of the Dolastatin-15 Analogue Tasidotin (ILX651) Administered Intravenously on Days 1, 3, and 5 Every 3 Weeks in Patients with Advanced Solid Tumors. *Clin. Cancer Res.* **2005**, *11*, 7825-7833.
- [26] Pandey, R.; Patil, N.; Rao, M. Proteases and Protease Inhibitors: Implications in Antitumorogenesis and Drug Development. *Int. J. Hum. Genet.* **2007**, *7*, 67-82.

- [27] Linington, R.G.; Edwards, D.J.; Shuman, C.F.; McPhail, K.L.; Maitainaho, T.; Gerwick, W.H. Symplocamide A, a Potent Cytotoxin and Chymotrypsin Inhibitor from the Marine Cyanobacterium *Symploca* sp. J. Nat. Prod. **2008**, *71*, 22-27.
- [28] Walton, K.; Berry, J.P. Indole Alkaloids of the Stigonematales (Cyanophyta): Chemical Diversity, Biosynthesis and Biological Activity. Mar. Drugs **2016**, *14*, 10.3390/md14040073.
- [29] Nagarajan, M.; Maruthanayagam, V.; Sundararaman, M. A Review of Pharmacological and Toxicological Potentials of Marine Cyanobacterial Metabolites. J. Appl. Toxicol. **2012**, *32*, 153-185.
- [30] Singh, R.K.; Tiwari, S.P.; Rai, A.K.; Mohapatra, T.M. Cyanobacteria: An Emerging Source for Drug Discovery. J. Antibiot. **2011**, *64*, 401-412.
- [31] Sielaff, H.; Christiansen, G.; Schwecke, T. Natural Products from Cyanobacteria: Exploiting a New Source for Drug Discovery. IDrugs **2006**, *9*, 119-127.
- [32] Vijayakumar, S.; Menakha, M. Pharmaceutical Applications of cyanobacteria—A Review. J. Acute Med. **2015**, *5*, 15-23.
- [33] Sejnohova, L.; Marsalek, B. Microcystis. In *Ecology of Cyanobacteria II: Their Diversity in Space and Time*; Whitton, B.A., Ed.; Springer: Dordrecht, Heidelberg, New York, London, 2012; pp. 195-228.
- [34] Reynolds, C.; Jaworski, G.; Cmiech, H.; Leedale, G. On the Annual Cycle of the Blue-Green Alga *Microcystis aeruginosa* Kutz. Emend. Elenkin. Royal Society of London Philosophical Transactions Series B **1981**, *293*.
- [35] Carmichael, W.W. Cyanobacteria Secondary Metabolites—the Cyanotoxins. J. Appl. Bacteriol. **1992**, *72*, 445-459.
- [36] Riba, M.; Kiss-Szikszai, A.; Gonda, S.; Boros, G.; Vitál, Z.; Borsodi, A.K.; Krett, G.; Borics, G.; Ujvárosi, A.Z.; Vasas, G. *Microcystis* Chemotype Diversity in the Alimentary Tract of Bigheaded Carp. Toxins **2019**, *11*, 288.
- [37] Neilan, B.A.; Jacobs, D.; Goodman, A.E. Genetic Diversity and Phylogeny of Toxic Cyanobacteria Determined by DNA Polymorphisms within the Phycocyanin Locus. Appl. Environ. Microbiol. **1995**, *61*, 3875-3883.
- [38] Kondo, R.; Kagiya, G.; Hiroishi, S.; Watanabe, M. Genetic Typing of a Bloom-Forming Cyanobacterial Genus *Microcystis* in Japan using 16S rRNA Gene Sequence Analysis. Plankt. Biol. Ecol. **2000**, *47*, 1-6.
- [39] Bittencourt-Oliveira, M.C.; Oliveira, M.C.; Bolch, C.J.S. Genetic Variability of Brazilian Strains of the *Microcystis aeruginosa* Complex (Cyanobacteria/Cyanophyceae) using the Phycocyanin Intergenic Spacer and Flanking Regions (cpcBA). J. Phycol. **2001**, *37*, 810-818.

- [40] Wilson, A.E.; Sarnelle, O.; Neilan, B.A.; Salmon, T.P.; Gehringer, M.M.; Hay, M.E. Genetic Variation of the Bloom-Forming Cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* within and among Lakes: Implications for Harmful Algal Blooms. *Appl. Environ. Microbiol.* **2005**, *71*, 6126-6133.
- [41] El Herry, S.; Nasri, H.; Bouaïcha, N. Morphological and Phylogenetic Analysis of Colonies of *Microcystis* Morphospecies Isolated from the Lebna Dam, Tunisia. *Afr. J. Microb. Res.* **2008**, *2*, 340-348.
- [42] Yoshida, M.; Yoshida, T.; Satomi, M.; Takashima, Y.; Hosoda, N.; Hiroishi, S. Intra-Specific Phenotypic and Genotypic Variation in Toxic Cyanobacterial *Microcystis* Strains. *J. Appl. Microbiol.* **2008**, *105*, 407-415.
- [43] Tanabe, Y.; Kasai, F.; Watanabe, M.M. Fine-Scale Spatial and Temporal Genetic Differentiation of Water Bloom-Forming Cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*: Revealed by Multilocus Sequence Typing. *Environ. Microbiol. Rep.* **2009**, *1*, 575-582.
- [44] Fathalli, A.; Jenhania, A.B.R.; Moreira, C.; Welker, M.; Romdhane, M.; Antunes, A.; Vasconcelos, V. Molecular and Phylogenetic Characterization of Potentially Toxic Cyanobacteria in Tunisian Freshwaters. *Syst. Appl. Microbiol.* **2011**, *34*, 303-310.
- [45] Gaevsky, N.A.; Kolmakov, V.I.; Belykh, O.I.; Tikhonova, I.V.; Joung, Y.; Ahn, T.S.; Nabatova, V.A.; Gladkikh, A.S. Ecological Development and Genetic Diversity of *Microcystis aeruginosa* from Artificial Reservoir in Russia. *J. Microbiol.* **2011**, *49*, 714-720.
- [46] Lepère, C.; Wilmotte, A.; Meyer, B. Molecular Diversity of *Microcystis* Strains (Cyanophyceae, Chroococcales) Based on 16S rDNA Sequences. *Syst. Geogr. Pl.* **2000**, *70*, 275-283.
- [47] Litvaitis, M.K. A Molecular Test of Cyanobacterial Phylogeny: Inferences from Constraint Analyses. *Hydrobiologia* **2002**, *468*, 135-145.
- [48] Otsuka, S.; Suda, S.; Shibata, S.; Oyaizu, H.; Matsumoto, S.; Watanabe, M.M. A Proposal for the Unification of Five Species of the Cyanobacterial Genus *Microcystis* Kützing Ex Lemmermann 1907 Under the Rules of the Bacteriological Code. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2001**, *51*, 873-879.
- [49] O'Neil, J.M.; Davis, T.W.; Burford, M.A.; Gobler, C.J. The Rise of Harmful Cyanobacteria Blooms: The Potential Roles of Eutrophication and Climate Change. *Harmful Algae* **2012**, *14*, 313-334.
- [50] Ribeiro, K.F.; Duarte, L.; Crossetti, L.O. Everything is Not Everywhere: A Tale on the Biogeography of Cyanobacteria. *Hydrobiologia* **2018**, *820*, 23-48.
- [51] Padisák, J.; Vasas, G.; Borics, G. Phycogeography of Freshwater Phytoplankton: Traditional Knowledge and New Molecular Tools. *Hydrobiologia* **2016**, *764*, 3-27.
- [52] Traveset, A.; Richardson, D.M. Biological Invasions as Disruptors of Plant Reproductive Mutualisms. *Trends. Ecol. Evol.* **2006**, *21*, 208-216.

- [53] Dufour, P.; Sarazin, G.; Quiblier, C.; Sane, S.; Leboulanger, C. Cascading Nutrient Limitation of the Cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* in a Sahelian Lake (North Senegal). *Aquat. Microb. Ecol.* **2006**, *44*, 219-230.
- [54] Borics, G.; Grigorszky, I.; Szabó, S.; Padisák, J. Phytoplankton Associations in a Small Hypertrophic Fishpond in East Hungary during a Change from Bottom-Up to Top-Down Control. *Hydrobiologia* **2000**, *424*, 79-90.
- [55] Borics, G.; Tóthmérész, B.; Lukács, B.A.; Várbíró, G. Functional Groups of Phytoplankton Shaping Diversity of Shallow Lake Ecosystems. *Hydrobiologia* **2012**, *698*, 251-262.
- [56] Welker, M.; Brunke, M.; Preussel, K.; Lippert, I.; von Döhren, H. Diversity and Distribution of *Microcystis* (Cyanobacteria) Oligopeptide Chemotypes from Natural Communities Studied by Single-Colony Mass Spectrometry. *Microbiology* **2004**, *150*, 1785-1796.
- [57] Dodds, W.K.; Gudder, D.A.; Mollenhauer, D. The Ecology of *Nostoc*. *J. Phycol.* **1995**, *31*, 2-18.
- [58] Calcott, M.J.; Ackerley, D.F.; Knight, A.; Keyzers, R.A.; Owen, J.G. Secondary Metabolism in the Lichen Symbiosis. *Chem. Soc. Rev.* **2018**, *47*, 1730-1760.
- [59] Costa, J.L.; Paulsrud, P.; Rikkinen, J.; Lindblad, P. Genetic Diversity of *Nostoc* Symbionts Endophytically Associated with Two Bryophyte Species. *Appl. Environ. Microbiol.* **2001**, *67*, 4393-4396.
- [60] Liaimer, A.; Jensen, J.B.; Dittmann, E. A Genetic and Chemical Perspective on Symbiotic Recruitment of Cyanobacteria of the Genus *Nostoc* into the Host Plant *Blasia pusilla* L. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, 1693-1693.
- [61] Pawlowski, K. *Prokaryotic Symbionts in Plants*, 1st ed.; Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2009; pp. VIII, 306.
- [62] Liu, X.J.; Chen, F. Cell Differentiation and Colony Alteration of an Edible Terrestrial Cyanobacterium *Nostoc flagelliforme*, in Liquid Suspension Cultures. *Folia Microbiol. (Praha)* **2003**, *48*, 619-626.
- [63] Török, P.; Kapocsi, I.; Deák, B. Conservation and management of alkali grassland biodiversity in Central-Europe. In *Grasslands: Types, Biodiversity and Impacts.*; Zhang, W.J., Ed.; Nova Science Publishers Inc.: New York, NY, USA, 2012, pp. 109-118.
- [64] Sonkoly, J.; Valkó, O.; Deák, B.; Miglécz, T.; Tóth, K.; Radócz, S.; Kelemen, A.; Riba, M.; Vasas, G.; Tóthmérész, B. *et al.* A New Aspect of Grassland Vegetation Dynamics: Cyanobacterium Colonies Affect Establishment Success of Plants. *J. Veg. Sci.* **2017**, *28*, 475-483.
- [65] Deák, B.; Valkó, O.; Alexander, C.; Mücke, W.; Kania, A.; Tamás, J.; Heilmeier, H. Fine-Scale Vertical Position as an Indicator of Vegetation in Alkali Grasslands – Case Study Based on

Remotely Sensed Data. Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants **2014**, *209*, 693-697.

[66] Golakoti, T.; Yoshida, W.Y.; Chaganty, S.; Moore, R.E. Isolation and Structure Determination of Nostocyclopeptides A1 and A2 from the Terrestrial Cyanobacterium *Nostoc* sp. ATCC53789. J. Nat. Prod. **2001**, *64*, 54-59.

[67] Hrouzek, P.; Tomek, P.; Lukesova, A.; Urban, J.; Voloshko, L.; Pushparaj, B.; Ventura, S.; Lukavsky, J.; Stys, D.; Kopecky, J. Cytotoxicity and Secondary Metabolites Production in Terrestrial *Nostoc* Strains, Originating from Different Climatic/Geographic Regions and Habitats: Is their Cytotoxicity Environmentally Dependent? Environ. Toxicol. **2011**, *26*, 345-358.

[68] Kaasalainen, U.; Fewer, D.P.; Jokela, J.; Wahlsten, M.; Sivonen, K.; Rikkinen, J. Cyanobacteria Produce a High Variety of Hepatotoxic Peptides in Lichen Symbiosis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **2012**, *109*, 5886.

[69] Le Manach, S.; Khenfech, N.; Huet, H.; Qiao, Q.; Duval, C.; Marie, A.; Bolbach, G.; Clodic, G.; Djediat, C.; Bernard, C. *et al.* Gender-Specific Toxicological Effects of Chronic Exposure to Pure Microcystin-LR Or Complex *Microcystis aeruginosa* Extracts on Adult Medaka Fish. Environ. Sci. Technol. **2016**, *50*, 8324-8334.

[70] Baumann, H.I.; Jüttner, F. Inter-Annual Stability of Oligopeptide Patterns of *Planktothrix rubescens* Blooms and Mass Mortality of *Daphnia* in Lake Hallwilersee. Limnologica **2008**, *38*, 350-359.

[71] Smutná, M.; Babica, P.; Jarque, S.; Hilscherová, K.; Maršálek, B.; Haeba, M.; Bláha, L. Acute, Chronic and Reproductive Toxicity of Complex Cyanobacterial Blooms in *Daphnia magna* and the Role of Microcystins. Toxicon **2014**, *79*, 11-18.

[72] Dembitsky, V.M.; Rezanka, T. Metabolites Produced by Nitrogen-Fixing *Nostoc* Species. Folia Microbiol. (Praha) **2005**, *50*, 363-391.

[73] Dembitsky, V.M.; Shkrob, I.; Dor, I. Separation and Identification of Hydrocarbons and Other Volatile Compounds from Cultured Blue-Green Alga *Nostoc* sp. by Gas Chromatography-Mass Spectrometry using Serially Coupled Capillary Columns with Consecutive Nonpolar and Semipolar Stationary Phases. J. Chromatogr. A **1999**, *862*, 221-229.

[74] Liu, A.; Zhu, T.; Lu, X.; Song, L. Hydrocarbon Profiles and Phylogenetic Analyses of Diversified Cyanobacterial Species. Appl. Energy **2013**, *111*, 383-393.

[75] Temina, M.; Rezankova, H.; Rezanka, T.; Dembitsky, V.M. Diversity of the Fatty Acids of the *Nostoc* species and their Statistical Analysis. Microbiol. Res. **2007**, *162*, 308-321.

[76] Sharathchandra, K.; Rajashekhar, M. Total Lipid and Fatty Acid Composition in some Freshwater Cyanobacteria. J. Algal Biomass Util. **2011**, *2*, 83-97.

- [77] Jaki, B.; Orjala, J.; Sticher, O. A Novel Extracellular Diterpenoid with Antibacterial Activity from the Cyanobacterium *Nostoc commune*. J. Nat. Prod. **1999**, *62*, 502-503.
- [78] Jaki, B.; Heilmann, J.; Sticher, O. New Antibacterial Metabolites from the Cyanobacterium *Nostoc commune* (EAWAG 122b). J. Nat. Prod. **2000**, *63*, 1283-1285.
- [79] Jaki, B.; Orjala, J.; Heilmann, J.; Linden, A.; Vogler, B.; Sticher, O. Novel Extracellular Diterpenoids with Biological Activity from the Cyanobacterium *Nostoc commune*. J. Nat. Prod. **2000**, *63*, 339-343.
- [80] Ploutno, A.; Carmeli, S. Nostocycline A, a Novel Antimicrobial Cyclophane from the Cyanobacterium *Nostoc* sp. J. Nat. Prod. **2000**, *63*, 1524-1526.
- [81] Takenaka, H.; Yamaguchi, Y.; Sakaki, S.; Watarai, K.; Tanaka, N.; Hori, M.; Seki, H.; Tsuchida, M.; Yamada, A.; Nishimori, T. *et al.* Safety Evaluation of *Nostoc flagelliforme* (Nostocales, Cyanophyceae) as a Potential Food. Food Chem. Toxicol. **1998**, *36*, 1073-1077.
- [82] Huang, Z.; Liu, Y.; Paulsen, B.S.; Klaveness, D. Studies on Polysaccharides from Three Edible Species of *Nostoc* (Cyanobacteria) with Different Colony Morphologies: Comparison of Monosaccharide Compositions and Viscosities of Polysaccharides from Field Colonies and Suspension Cultures. J. Phycol. **1998**, *34*, 962-968.
- [83] Schwarz, D.; Orf, I.; Kopka, J.; Hagemann, M. Recent Applications of Metabolomics Toward Cyanobacteria. Metabolites **2013**, *3*, 72-100.
- [84] Eisenhut, M.; Huege, J.; Schwarz, D.; Bauwe, H.; Kopka, J.; Hagemann, M. Metabolome Phenotyping of Inorganic Carbon Limitation in Cells of the Wild Type and Photorespiratory Mutants of the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803. Plant Physiol. **2008**, *148*, 2109-2120.
- [85] Narainsamy, K.; Cassier-Chauvat, C.; Junot, C.; Chauvat, F. High Performance Analysis of the Cyanobacterial Metabolism Via Liquid Chromatography Coupled to a LTQ-Orbitrap Mass Spectrometer: Evidence that Glucose Reprograms the Whole Carbon Metabolism and Triggers Oxidative Stress. Metabolomics **2013**, *9*, 21-32.
- [86] Bennette, N.B.; Eng, J.F.; Dismukes, G.C. An LC-MS-Based Chemical and Analytical Method for Targeted Metabolite Quantification in the Model Cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7002. Anal. Chem. **2011**, *83*, 3808-3816.
- [87] Takahashi, H.; Uchimiya, H.; Hihara, Y. Difference in Metabolite Levels between Photoautotrophic and Photomixotrophic Cultures of *Synechocystis* sp. PCC 6803 Examined by Capillary Electrophoresis Electrospray Ionization Mass Spectrometry. J. Exp. Bot. **2008**, *59*, 3009-3018.
- [88] Allwood, J.W.; De Vos, R.C.; Moing, A.; Deborde, C.; Erban, A.; Kopka, J.; Goodacre, R.; Hall, R.D. Plant Metabolomics and its Potential for Systems Biology Research Background Concepts, Technology, and Methodology. Methods Enzymol. **2011**, *500*, 299-336.

- [89] Lin, Y.; Schiavo, S.; Orjala, J.; Vouros, P.; Kautz, R. Microscale LC-MS-NMR Platform Applied to the Identification of Active Cyanobacterial Metabolites. *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 8045-8054.
- [90] Allen, M.M. Simple Conditions for Growth of Unicellular Blue-Green Algae on Plates. *J. Phycol.* **1968**, *4*, 1-4.
- [91] Welker, M.; Maršálek, B.; Šejnohová, L.; von Döhren, H. Detection and Identification of Oligopeptides in *Microcystis* (Cyanobacteria) Colonies: Toward an Understanding of Metabolic Diversity. *Peptides* **2006**, *27*, 2090-2103.
- [92] Mayumi, T.; Kato, H.; Kawasaki, Y.; Harada, K. Formation of Diagnostic Product Ions from Cyanobacterial Cyclic Peptides by the Two-Bond Fission Mechanism using Ion Trap Liquid Chromatography/Multi-Stage Mass Spectrometry. *Rapid. Commun. Mass. Spectrom.* **2007**, *21*, 1025-1033.
- [93] Sanz, M.; Andreote, A.P.; Fiore, M.F.; Dorr, F.A.; Pinto, E. Structural Characterization of New Peptide Variants Produced by Cyanobacteria from the Brazilian Atlantic Coastal Forest using Liquid Chromatography Coupled to Quadrupole Time-of-Flight Tandem Mass Spectrometry. *Mar. Drugs* **2015**, *13*, 3892-3919.
- [94] Pluskal, T.; Castillo, S.; Villar-Briones, A.; Orešič, M. MZmine 2: Modular Framework for Processing, Visualizing, and Analyzing Mass Spectrometry-Based Molecular Profile Data. *BMC Bioinformatics* **2010**, *11*, 395.
- [95] R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing **2014**, *Vienna*.
- [96] Suzuki, R.; Shimodaira, H. Pvcust: An R Package for Assessing the Uncertainty in Hierarchical Clustering. *Bioinformatics* **2006**, *22*, 1540-1542.
- [97] Kumar, S.; Stecher, G.; Tamura, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol. Biol. Evol.* **2016**, *33*, 1870-1874.
- [98] Jukes, T.H.; Cantor, C.R. Evolution of Protein Molecules. In *Mammalian Protein Metabolism*; Munro, H.N., Ed.; Academic Press, 1969, pp. 21-132.
- [99] Golakoti, T.; Yoshida, W.Y.; Chaganty, S.; Moore, R.E. Isolation and Structures of Nostopeptolides A1, A2 and A3 from the Cyanobacterium *Nostoc* sp. GSV224. *Tetrahedron* **2000**, *56*, 9093-9102.
- [100] Nübel, U.; Garcia-Pichel, F.; Muyzer, G. PCR Primers to Amplify 16S rRNA Genes from Cyanobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **1997**, *63*, 3327-3332.
- [101] Lane, D.J. 16S/23S rRNA Sequencing. In *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematic*; Stackebrandt, E. and Goodfellow, M., Eds.; John Wiley and Sons: New York, 1991, pp. 115-175.
- [102] Guiry, M.D.; Guiry, G.M. *AlgaeBase*. World-Wide Electronic Publication, National University of Ireland, Galway. **2019**.

- [103] Pruesse, E.; Peplies, J.; Glockner, F.O. SINA: Accurate High-Throughput Multiple Sequence Alignment of Ribosomal RNA Genes. *Bioinformatics* **2012**, *28*, 1823-1829.
- [104] Kimura, M. A Simple Method for Estimating Evolutionary Rates of Base Substitutions through Comparative Studies of Nucleotide Sequences. *J. Mol. Evol.* **1980**, *16*, 111-120.
- [105] Rasmussen, U.; Svenning, M.M. Fingerprinting of Cyanobacteria Based on PCR with Primers Derived from Short and Long Tandemly Repeated Repetitive Sequences. *Appl. Environ. Microbiol.* **1998**, *64*, 265-272.
- [106] de Bruijn, F.J. Use of Repetitive (Repetitive Extragenic Palindromic and Enterobacterial Repetitive Intergeneric Consensus) Sequences and the Polymerase Chain Reaction to Fingerprint the Genomes of *Rhizobium meliloti* Isolates and Other Soil Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **1992**, *58*, 2180-2187.
- [107] Gebhardt, J.S.; Nierzwicki-Bauer, S. Identification of a Common Cyanobacterial Symbiont Associated with *Azolla* spp. through Molecular and Morphological Characterization of Free-Living and Symbiotic Cyanobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **1991**, *57*, 2141.
- [108] Carrapiço, F. *Azolla* as a Superorganism. Its Implication in Symbiotic Studies. In *Symbioses and Stress*; Seckbach, J. and Grube, M., Eds.; Springer: Dordrecht, 2010, pp. 225-241.
- [109] Komárek, J.; Anagnostidis, K. *Cyanoprokaryota: Teil 1/Part 1: Chroococcales (Suesswasserflora Von Mitteleuropa)*; Springer Spektrum: Heidelberg, 2008; pp. 548.
- [110] Puddick, J.; Prinsep, M.R. MALDI-TOF Mass Spectrometry of Cyanobacteria: A Global Approach to the Discovery of Novel Secondary Metabolites. *Chem. New Zeland* **2008**, *72*, 68-71.
- [111] Poon, G.K.; Griggs, L.J.; Edwards, C.; Beattie, K.A.; Codd, G.A. Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-Mass Spectrometry of Cyanobacterial Toxins. *J. Chromatogr. A* **1993**, *628*, 215-233.
- [112] Miles, C.O.; Sandvik, M.; Nonga, H.E.; Rundberget, T.; Wilkins, A.L.; Rise, F.; Ballot, A. Identification of Microcystins in a Lake Victoria Cyanobacterial Bloom using LC-MS with Thiol Derivatization. *Toxicon* **2013**, *70*, 21-31.
- [113] Luukkainen, R.; Namikoshi, M.; Sivonen, K.; Rinehart, K.L.; Niemelä, S.I. Isolation and Identification of 12 Microcystins from Four Strains and Two Bloom Samples of *Microcystis* spp.: Structure of a New Hepatotoxin. *Toxicon* **1994**, *32*, 133-139.
- [114] Kodani, S.; Suzuki, S.; Ishida, K.; Murakami, M. Five New Cyanobacterial Peptides from Water Bloom Materials of Lake Teganuma (Japan). *FEMS Microbiol. Lett.* **1999**, *178*, 343-348.
- [115] Komárek, J.; Anagnostidis, K. *Cyanoprokaryota, 2. Teil / 2nd Part: Oscillatoriales*. In *Süßwasserflora Von Mitteleuropa, Bd. 19/2*; Büdel, B., Krienitz, L., Gärtner, G. and Schagerl, M., Eds.; Elsevier/Spektrum: Heidelberg, 2005.

- [116] Komárek, J. Cyanoprokaryota, 3. Teil / 3rd part: Heterocytous Genera. In *Süßwasserflora Von Mitteleuropa*, Bd. 19/3.; Büdel, B., Gärtner, G., Krienitz, L. and Schagerl, M., Eds.; Elsevier/Spektrum: Heidelberg, 2013.
- [117] Ploutno, A.; Carmeli, S. Modified Peptides from a Water Bloom of the Cyanobacterium *Nostoc* sp. *Tetrahedron* **2002**, *58*, 9949-9957.
- [118] Reshef, V.; Carmeli, S. Protease Inhibitors from a Water Bloom of the Cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Tetrahedron* **2001**, *57*, 2885-2894.
- [119] Shishido, T.K.; Jokela, J.; Fewer, D.P.; Wahlsten, M.; Fiore, M.F.; Sivonen, K. Simultaneous Production of Anabaenopeptins and Namalides by the Cyanobacterium *Nostoc* sp. CENA543. *ACS Chem. Biol.* **2017**, *12*, 2746-2755.
- [120] Elkobi-Peer, S.; Carmeli, S. New Prenylated Aeruginosin, Microphycin, Anabaenopeptin and Micropeptin Analogues from a *Microcystis* Bloom Material Collected in Kibbutz Kfar Blum, Israel. *Mar. Drugs* **2015**, *13*, 2347-2375.
- [121] Zafrir-Ilan, E.; Carmeli, S. Eight Novel Serine Proteases Inhibitors from a Water Bloom of the Cyanobacterium *Microcystis* sp. *Tetrahedron* **2010**, *66*, 9194-9202.
- [122] Okumura, H.S.; Philmus, B.; Portmann, C.; Hemscheidt, T.K. Homotyrosine-Containing Cyanopeptolins 880 and 960 and Anabaenopeptins 908 and 915 from *Planktothrix agardhii* CYA 126/8. *J. Nat. Prod.* **2009**, *72*, 172-176.
- [123] Itou, Y.; Suzuki, S.; Ishida, K.; Murakami, M. Anabaenopeptins G and H, Potent Carboxypeptidase A Inhibitors from the Cyanobacterium *Oscillatoria agardhii* (NIES-595). *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 1243-1246.
- [124] Pluotno, A.; Carmeli, S. Banyasin A and Banyasides A and B, Three Novel Modified Peptides from a Water Bloom of the Cyanobacterium *Nostoc* sp. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 575-583.
- [125] Fujii, K.; Sivonen, K.; Adachi, K.; Noguchi, K.; Shimizu, Y.; Sano, H.; Hirayama, K.; Suzuki, M.; Harada, K. Comparative Study of Toxic and Non-Toxic Cyanobacterial Products: A Novel Glycoside, Suomilide, from Non-Toxic *Nodularia spumigena* HKVV. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 5529-5532.
- [126] Fujii, K.; Mayumi, T.; Noguchi, K.; Kashiwagi, T.; Akashi, S.; Sivonen, K.; Hirayama, K.; Harada, K. Mass Spectrometric Studies of Peptides from Cyanobacteria Under FAB MS/MS Conditions. *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.* **2000**, *48*, 56-64.
- [127] Liaimer, A.; Helfrich, E.J.N.; Hinrichs, K.; Guljamow, A.; Ishida, K.; Hertweck, C.; Dittmann, E. Nostopeptolide Plays a Governing Role during Cellular Differentiation of the Symbiotic Cyanobacterium *Nostoc punctiforme*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2015**, *112*, 1862.
- [128] Hajnal, É; Padisák, J. Analysis of Long-Term Ecological Status of Lake Balaton Based on the ALMOBAL Phytoplankton Database. *Hydrobiologia* **2008**, *599*, 227-237.

- [129] Komárek, J. Die taxonomische Revision der planktischen Blaualgen der Tschechoslowakei. In *Algologische Studien.*; Komárek, J. and Ettl, H., Eds.; Academia: Praha, 1958, pp. 10-206.
- [130] Komárek, J. A Review of Water-Bloom Forming *Microcystis* Species, with Regard to Populations from Japan. Arch. Hydrobiol. /Algolog. Stud. **1991**, *64*, 115-127.
- [131] Cronberg, G.; Komárek, J. Planktic Cyanoprokaryotes found in South Swedish Lakes during the XIIth International Symposium on Cyanophyte Research, 1992. Arch. Hydrobiol. /Algolog. Stud. , **1994**, *105*, 323-352.
- [132] Otsuka, S.; Suda, S.; Li, R.; Matsumoto, S.; Watanabe, M.M. Morphological Variability of Colonies of *Microcystis* Morphospecies in Culture. J. Gen. Appl. Microbiol. **2000**, *46*, 39-50.
- [133] Komárek, J.; Komárková, J. Review of the European *Microcystis* Morphospecies (Cyanoprokaryotes) from Nature. Czech Phycol. **2002**, *2*, 1-24.
- [134] Otsuka, S.; Suda, S.; Li, R.; Watanabe, M.; Oyaizu, H.; Matsumoto, S.; Watanabe, M.M. Phylogenetic Relationships between Toxic and Non-Toxic Strains of the Genus *Microcystis* Based on 16S to 23S Internal Transcribed Spacer Sequence. FEMS Microbiol. Lett. **1999**, *172*, 15-21.
- [135] Xu, Y.; Yang, F.; Liu, Y.; Wang, Z.; Wang, J.; Wang, G.; Li, R. Genetic Diversity of *Microcystis* Populations in a Bloom and its Relationship to the Environmental Factors in Qinhuai River, China. Microbiol. Res. **2011**, *167*, 20-26.
- [136] Neilan, B.A.; Jacobs, D.; DelDot, T.; Blackall, L.L.; Hawkins, P.R.; Cox, P.T.; Goodman, A.E. rRNA Sequences and Evolutionary Relationships among Toxic and Nontoxic Cyanobacteria of the Genus *Microcystis*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **1997**, *47*, 693-697.
- [137] Kehr, J.C.; Dittmann, E. Biosynthesis and Function of Extracellular Glycans in Cyanobacteria. Life **2015**, *5*, 164-180.
- [138] Agha, R.; Lezcano, M.À; del Mar Labrador, M.; Cirés, S.; Quesada, A. Seasonal Dynamics and Sedimentation Patterns of *Microcystis* Oligopeptide-Based Chemotypes Reveal Subpopulations with Different Ecological Traits. Limnol. Oceanogr. **2014**, *59*, 861-871.
- [139] Rohrlack, T.; Edvardsen, B.; Skulberg, R.; Halstvedt, C.B.; Utkilen, H.C.; Ptacnik, R.; Skulberg, O.M. Oligopeptide Chemotypes of the Toxic Freshwater Cyanobacterium *Planktothrix* can Form Sub-Populations with Dissimilar Ecological Traits. Limnol. Oceanogr. **2008**, *53*, 1279-1293.
- [140] Sakamoto, T.; Hashimoto, A.; Yamaba, M.; Wada, N.; Yoshida, T.; Inoue-Sakamoto, K.; Nishiuchi, T.; Matsugo, S. Four Chemotypes of the Terrestrial Cyanobacterium *Nostoc commune* Characterized by Differences in the Mycosporine-Like Amino Acids. Phycological Res. **2018**.

- [141] Sharp, K.; Arthur, K.E.; Gu, L.; Ross, C.; Harrison, G.; Gunasekera, S.P.; Meickle, T.; Matthew, S.; Luesch, H.; Thacker, R.W. *et al.* Phylogenetic and Chemical Diversity of Three Chemotypes of Bloom-Forming *Lyngbya* Species (Cyanobacteria: Oscillatoriales) from Reefs of Southeastern Florida. *Appl. Environ. Microbiol.* **2009**, *75*, 2879-2888.
- [142] Vasas, G.; Farkas, O.; Borics, G.; Felföldi, T.; Sramkó, G.; Batta, G.; Bácsi, I.; Gonda, S. Appearance of *Planktothrix rubescens* Bloom with D-Asp3, Mdha7]MC-RR in Gravel Pit Pond of a Shallow Lake-Dominated Area. *Toxins* **2013**, *5*, 2434-2455.
- [143] Farkas, O.; Gyémánt, G.; Hajdú, G.; Gonda, S.; Parizsa, P.; Horgos, T.; Mosolygó, Á; Vasas, G. Variability of Microcystins and its Synthetase Gene Cluster in *Microcystis* and *Planktothrix* Waterblooms in Shallow Lakes of Hungary. *Acta. Biol. Hung.* **2014**, *65*, 227-239.
- [144] Bell, T.A.S.; Sen-Kilic, E.; Felfoldi, T.; Vasas, G.; Fields, M.W.; Peyton, B.M. Microbial Community Changes during a Toxic Cyanobacterial Bloom in an Alkaline Hungarian Lake. *Antonie Van Leeuwenhoek* **2018**, *111*, 2425-2440.
- [145] Ujvarosi, A.Z.; Riba, M.; Garda, T.; Gyemant, G.; Vereb, G.; M-Hamvas, M.; Vasas, G.; Mathe, C. Attack of *Microcystis aeruginosa* Bloom on a *Ceratophyllum submersum* Field: Ecotoxicological Measurements in Real Environment with Real Microcystin Exposure. *Sci. Total Environ.* **2019**, *662*, 735-745.
- [146] Agha, R.; Quesada, A. Oligopeptides as Biomarkers of Cyanobacterial Subpopulations. Toward an Understanding of their Biological Role. *Toxins* **2014**, *6*, 1929-1950.
- [147] Welker, M.; Sejnohova, L.; Nemethova, D.; von Döhren, H.; Jarkovsky, J.; Marsalek, B. Seasonal Shifts in Chemotype Composition of *Microcystis* sp. Communities in the Pelagial and the Sediment of a Shallow Reservoir. *Limnol. Oceanogr.* **2007**, *52*, 609-619.
- [148] Agha, R.; Cires, S.; Wormer, L.; Dominguez, J.A.; Quesada, A. Multi-Scale Strategies for the Monitoring of Freshwater Cyanobacteria: Reducing the Sources of Uncertainty. *Water Res.* **2012**, *46*, 3043-3053.
- [149] Fastner, J.; Erhard, M.; von Dohren, H. Determination of Oligopeptide Diversity within a Natural Population of *Microcystis* spp. (Cyanobacteria) by Typing Single Colonies by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. *Appl. Environ. Microbiol.* **2001**, *67*, 5069-5076.
- [150] Harustiakova, D.; Welker, M. Chemotype Diversity in *Planktothrix rubescens* (Cyanobacteria) Populations is Correlated to Lake Depth. *Environ. Microbiol. Rep.* **2017**, *9*, 158-168.
- [151] Sanchis, D.; Padilla, C.; Del Campo, F.F.; Quesada, A.; Sanz-Alférez, S. Phylogenetic and Morphological Analyses of *Microcystis* Strains (Cyanophyta/Cyanobacteria) from a Spanish Water Reservoir. *Nova Hedwigia* **2005**, *81*, 431-448.

- [152] Lezcano, M.Á; Agha, R.; Cirés, S.; Quesada, A. Spatial-Temporal Survey of *Microcystis* Oligopeptide Chemotypes in Reservoirs with Dissimilar Waterbody Features and their Relation to Genetic Variation. *Harmful Algae* **2019**, *81*, 77-85.
- [153] Mazur-Marzec, H.; Kaczkowska, M.J.; Blaszczyk, A.; Akcaalan, R.; Spoof, L.; Meriluoto, J. Diversity of Peptides Produced by *Nodularia spumigena* from various Geographical Regions. *Mar. drugs* **2013**, *11*, 1-19.
- [154] Keshari, N.; Das, S.K.; Adhikary, S.P. Identification of Cyanobacterial Species with Overlapping Morphological Features by 16S rRNA Gene Sequencing. *Eur. J. Phycol.* **2015**, *50*, 395-399.
- [155] Svenning, M.M.; Eriksson, T.; Rasmussen, U. Phylogeny of Symbiotic Cyanobacteria within the Genus *Nostoc* Based on 16S rDNA Sequence Analyses. *Arch. Microbiol.* **2005**, *183*, 19-26.
- [156] Rippka, R.; Deruelles, J.; Waterbury, J.B.; Herdman, M.; Stanier, R.Y. Generic Assignments, Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria. *Microbiology* **1979**, *111*, 1-61.
- [157] Lachance, M.-. Genetic Relatedness of Heterocystous Cyanobacteria by Deoxyribonucleic Acid-Deoxyribonucleic Acid Reassociation. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **1981**, *31*, 139-147.
- [158] Mazel, D.; Houmard, J.; Castets, A.M.; Tandeau de Marsac, N. Highly Repetitive DNA Sequences in Cyanobacterial Genomes. *J. Bacteriol.* **1990**, *172*, 2755-2761.
- [159] Rajaniemi, P.; Komárek, J.; Willame, R.; Hrouzek, P.; Kaštovská, K.; Hoffmann, L.; Sivonen, K. Taxonomic Consequences from the Combined Molecular and Phenotype Evaluation of Selected *Anabaena* and *Aphanizomenon* Strains. *Arch. Hydrobiol. Suppl. Algol. Stud.* **2005**, *117*, 371-391.
- [160] Hrouzek, P.; Ventura, S.; Lukesova, A.; Angela Mugnai, M.; Turicchia, S.; Komárek, J. Diversity of Soil *Nostoc* Strains: Phylogenetic and Phenotypic Variability. *Arch. Hydrobiol. Suppl. Algol. Stud.* **2005**, *117*, 251-264.
- [161] Fernandez-Martinez, M.A.; de Los Rios, A.; Sancho, L.G.; Perez-Ortega, S. Diversity of Endosymbiotic *Nostoc* in *Gunnera magellanica* from Tierra Del Fuego, Chile. *Microb. Ecol.* **2013**, *66*, 335-350.
- [162] Rehakova, K.; Johansen, J.; Casamatta, D.; Xuesong, L.; Vincent, J. Morphological and Molecular Characterization of Selected Desert Soil Cyanobacteria: Three Species New to Science Including Mojavia Pulchra Gen. Et Sp. Nov. *Phycologia* **2007**, *46*, 481-502.
- [163] Hrouzek, P.; Lukesova, A.; Mares, J.; Ventura, S. Description of the Cyanobacterial Genus *Desmonostoc* Gen. Nov. Including *D. muscorum* Comb. Nov. as a Distinct, Phylogenetically Coherent Taxon Related to the Genus *Nostoc*. *Fottea* **2013**, *13*, 201-213.

- [164] Genuario, D.B.; Vaz, M.G.; Hentschke, G.S.; Sant'Anna, C.L.; Fiore, M.F. *Halotia* Gen. Nov., a Phylogenetically and Physiologically Coherent Cyanobacterial Genus Isolated from Marine Coastal Environments. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2015**, *65*, 663-675.
- [165] Bagchi, S.N.; Dubey, N.; Singh, P. Phylogenetically Distant Clade of Nostoc-Like Taxa with the Description of *Aliinostoc* Gen. Nov. and *Aliinostoc morphoplasticum* Sp. Nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2017**, *67*, 3329-3338.
- [166] Kobayashi, J.; Sato, M.; Murayama, T.; Ishibashi, M.; Kanai, M.; Shoji, J.; Ohizumi, Y. Konbamide, a Novel Peptide with Calmodulin Antagonistic Activity from the Okinawan Marine Sponge *Theonella* sp. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1991**, 1050-1052.
- [167] van Gremberghe, I.; Leliaert, F.; Mergeay, J.; Vanormelingen, P.; Van der Gucht, K.; Debeer, A.E.; Lacerot, G.; De Meester, L.; Vyverman, W. Lack of Phylogeographic Structure in the Freshwater Cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* Suggests Global Dispersal. *PLoS One* **2011**, *6*, e19561.
- [168] Felföldi, T.; Somogyi, B.; Márialigeti, K.; Vörös, L. Notes on the Biogeography of Non-Marine Planktonic Picocyanobacteria. *J. Plankton Res.* **2011**, *33*, 1622-1626.
- [169] Rastogi, R.P.; Madamwar, D.; Incharoensakdi, A. Bloom Dynamics of Cyanobacteria and their Toxins: Environmental Health Impacts and Mitigation Strategies. *Front. Microbiol.* **2015**, *6*, 1254.
- [170] Sivonen, K.; Namikoshi, M.; Evans, W.R.; Fardig, M.; Carmichael, W.W.; Rinehart, K.L. Three New Microcystins, Cyclic Heptapeptide Hepatotoxins, from *Nostoc* sp. Strain 152. *Chem. Res. Toxicol.* **1992**, *5*, 464-469.
- [171] Oksanen, I.; Jokela, J.; Fewer, D.P.; Wahlsten, M.; Rikkinen, J.; Sivonen, K. Discovery of Rare and Highly Toxic Microcystins from Lichen-Associated Cyanobacterium *Nostoc* sp. Strain IO-102-I. *Appl. Environ. Microbiol.* **2004**, *70*, 5756-5763.
- [172] Kaasalainen, U.; Jokela, J.; Fewer, D.P.; Sivonen, K.; Rikkinen, J. Microcystin Production in the Tripartite Cyanolichen *Peltigera leucophlebia*. *Mol. Plant Microbe Interact.* **2009**, *22*, 695-702.
- [173] Kurmayer, R. The Toxic Cyanobacterium *Nostoc* Sp. Strain 152 Produces Highest Amounts of Microcystin and Nostophycin Under Stress Conditions1. *J. Phycol.* **2011**, *47*, 200-207.
- [174] Gehringer, M.M.; Adler, L.; Roberts, A.A.; Moffitt, M.C.; Mihali, T.K.; Mills, T.J.T.; Fieker, C.; Neilan, B.A. Nodularin, a Cyanobacterial Toxin, is Synthesized in Planta by Symbiotic *Nostoc* sp. *ISME J.* **2012**, *6*, 1834.
- [175] Gkelis, S.; Lanaras, T.; Sivonen, K. Cyanobacterial Toxic and Bioactive Peptides in Freshwater Bodies of Greece: Concentrations, Occurrence Patterns, and Implications for Human Health. *Mar. Drugs* **2015**, *13*, 6319-6335.

- [176] Nowruzi, B.; Haghighat, S.; Fahimi, H.; Mohammadi, E. Nostoc Cyanobacteria Species: A New and Rich Source of Novel Bioactive Compounds with Pharmaceutical Potential. *J. Pharm. Health Serv. Res.* **2018**, *9*, 5-12.
- [177] Singh, R.; Parihar, P.; Singh, M.; Bajguz, A.; Kumar, J.; Singh, S.; Singh, V.P.; Prasad, S.M. Uncovering Potential Applications of Cyanobacteria and Algal Metabolites in Biology, Agriculture and Medicine: Current Status and Future Prospects. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 515.
- [178] Márta M.-Hamvas; C. Máthé; G. Vasas; Katalin Jámbrik; Mária Papp; D. Beyer; Ilona Mészáros; G. Borbély. Cylindrospermopsin and Microcystin-LR Alter the Growth, Development and Peroxidase Enzyme Activity of White Mustard (*Sinapis alba* L.) Seedlings, a Comparative Analysis. *Acta Biol. Hung.* **2010**, *61*, 55-68.
- [179] Beyer, D.; Surányi, G.; Vasas, G.; Roszik, J.; Erdődi, F.; M-Hamvas, M.; Bácsi, I.; Bátori, R.; Serfőző, Z.; Szigeti, Z.M. *et al.* Cylindrospermopsin Induces Alterations of Root Histology and Microtubule Organization in Common Reed (*Phragmites australis*) Plantlets Cultured in Vitro. *Toxicon* **2009**, *54*, 440-449.
- [180] Szigeti, Z.M.; Jámbrik, K.; Roszik, J.; M-Hamvas, M.; Tándor, I.; Beyer, D.; Vasas, G.; Vereb, G.; Surányi, G.; Máthé, C. Cytoskeletal and Developmental Alterations in *Ceratophyllum demersum* Induced by Microcystin-LR, a Cyanobacterial Toxin. *Aquat. Bot.* **2010**, *92*, 179-184.
- [181] Lodin-Friedman, A.; Carmeli, S. Microginins from a *Microcystis* sp. Bloom Material Collected from the Kishon Reservoir, Israel. *Mar. Drugs* **2018**, *16*, 78.
- [182] Okino, T.; Matsuda, H.; Murakami, M.; Yamaguchi, K. Microginin, an Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitor from the Blue-Green Alga *Microcystis aeruginosa*. *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 501-504.
- [183] Ishida, K.; Okita, Y.; Matsuda, H.; Okino, T.; Murakami, M. Aeruginosins, Protease Inhibitors from the Cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Tetrahedron* **1999**, *55*, 10971-10988.
- [184] Bannage, M.E.; Burke, A.J.; Davies, S.G.; Goodwin, C.J. Asymmetric Synthesis of (2S,3R)-3-Amino-2-Hydroxydecanoic Acid: The Unknown Amino Acid Component of Microginin. *Tetrahedron: Asymmetry* **1994**, *5*, 203-206.
- [185] Lifshits, M.; Zafrir-Ilan, E.; Raveh, A.; Carmeli, S. Protease Inhibitors from Three Fishpond Water Blooms of *Microcystis* spp. *Tetrahedron* **2011**, *67*, 4017-4024.
- [186] Ishida, K.; Kato, T.; Murakami, M.; Watanabe, M.; Watanabe, M.F. Microginins, Zinc Metalloproteases Inhibitors from the Cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Tetrahedron* **2000**, *56*, 8643-8656.
- [187] Elersek, T.; Bláha, L.; Mazur-Marzec, H.; Schmidt, W.; Carmeli, S. Other cyanobacterial bioactive substances. In *Handbook of Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis.*; Meriluoto, J., Spoof, L. and Codd, G.A., Eds.; John Wiley & Sons, Ltd.: United Kingdom, 2017, pp. 179-196.

- [188] Spoof, L.; Blaszczyk, A.; Meriluoto, J.; Ceglowska, M.; Mazur-Marzec, H. Structures and Activity of New Anabaenopeptins Produced by Baltic Sea Cyanobacteria. *Mar. Drugs* **2015**, *14*, 8.
- [189] Schreuder, H.; Liesum, A.; Lonze, P.; Stump, H.; Hoffmann, H.; Schiell, M.; Kurz, M.; Toti, L.; Bauer, A.; Kallus, C. *et al.* Isolation, Co-Crystallization and Structure-Based Characterization of Anabaenopeptins as Highly Potent Inhibitors of Activated Thrombin Activatable Fibrinolysis Inhibitor (TAFIa). *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 32958.
- [190] Sano, T.; Usui, T.; Ueda, K.; Osada, H.; Kaya, K. Isolation of New Protein Phosphatase Inhibitors from Two Cyanobacteria Species, *Planktothrix* spp. *J. Nat. Prod.* **2001**, *64*, 1052-1055.
- [191] Nagarajan, M.; Maruthanayagam, V.; Sundararaman, M. SAR Analysis and Bioactive Potentials of Freshwater and Terrestrial Cyanobacterial Compounds: A Review. *J. Appl. Toxicol.* **2013**, *33*, 313-349.
- [192] Ishitsuka, M.O.; Kusumi, T.; Kakisawa, H.; Kaya, K.; Watanabe, M.M. Microviridin. A Novel Tricyclic Depsipeptide from the Toxic Cyanobacterium *Microcystis viridis*. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 8180-8182.
- [193] Murakami, M.; Suzuki, S.; Itou, Y.; Kodani, S.; Ishida, K. New Anabaenopeptins, Potent Carboxypeptidase-A Inhibitors from the Cyanobacterium *Aphanizomenon flos-aquae*. *J. Nat. Prod.* **2000**, *63*, 1280-1282.
- [194] Sano, T.; Kaya, K. Oscillamide Y, a Chymotrypsin Inhibitor from Toxic *Oscillatoria agardhii*. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 5933-5936.
- [195] Sedmak, B.; Carmeli, S.; Elersek, T. "Non-Toxic" Cyclic Peptides Induce Lysis of Cyanobacteria-an Effective Cell Population Density Control Mechanism in Cyanobacterial Blooms. *Microb. Ecol.* **2008**, *56*, 201-209.
- [196] Sedmak, B.; Eleršek, T.; Grach-Pogrebinsky, O.; Carmeli, S.; Sever, N.; Lah, T. Ecotoxicologically Relevant Cyclic Peptides from Cyanobacterial Bloom (*Planktothrix rubescens*) - a Threat to Human and Environmental Health. *Radiol. Oncol.* **2008**, *42*, 102-113.
- [197] Kobayashi, J.; Sato, M.; Ishibashi, M.; Shigemori, H.; Nakamura, T.; Ohizumi, Y. Keramamide A, a Novel Peptide from the Okinawan Marine Sponge *Theonella* sp. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1991**, 2609-2611.
- [198] Harada, K.I.; Mayumi, T.; Shimada, T.; Suzuki, M.; Kondo, F.; Watanabe, M.F. Occurrence of Four Depsipeptides, Aeruginopeptins, Together with Microcystins from Toxic Cyanobacteria. *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 6091-6094.
- [199] Babica, P.; Bláha, L.; Maršálek, B. Exploring the Natural Role of Microcystins - a Review of Effects on Photoautotrophic Organisms. *J. Phycol.* **2006**, *42*, 9-20.

- [200] Liu, L.; Jokela, J.; Herfindal, L.; Wahlsten, M.; Sinkkonen, J.; Permi, P.; Fewer, D.P.; Doskeland, S.O.; Sivonen, K. 4-Methylproline Guided Natural Product Discovery: Co-Occurrence of 4-Hydroxy- and 4-Methylprolines in Nostoweipeptins and Nostopeptolides. *ACS Chem. Biol.* **2014**, *9*, 2646-2655.
- [201] Liaimer, A.; Jenke-Kodama, H.; Ishida, K.; Hinrichs, K.; Stangeland, J.; Hertweck, C.; Dittmann, E. A Polyketide Interferes with Cellular Differentiation in the Symbiotic Cyanobacterium *Nostoc punctiforme*. *Environ. Microbiol. Rep.* **2011**, *3*, 550-558.
- [202] Bitterlich, G. Digestive Enzyme Pattern of Two Stomachless Filter Feeders, Silver Carp, *Hypophthalmichthys molitrix* Val., and Bighead Carp, *Aristichthys nobilis* Rich. *J. Fish Biol.* **2006**, *27*, 103-112.
- [203] Ni, S.; Gui, Y.; Liu, H. A Comparative Research on Amylase Activities among Grass Carp, Common Carp, Silver Carp, Bighead Carp, Tilapia Nilotica. *Journal of Dalian Fisheries University* **1992**, *7*, 24-31.
- [204] Opuszynski, K.; Shireman, J.V. Food Passage Time and Daily Ration of Bighead Carp, *Aristichthys nobilis*, Kept in Cages. *Environ. Biol. Fish.* **1991**, *30*, 387-393.
- [205] Kolar, C.S.; Chapman, D.C.; Courtenay, J.W.R.; Housel, C.M.; Williams, J.D.; Jennings, D.P. *Bigheaded Carps : A Biological Synopsis and Environmental Risk Assessment, Vol 33.*; American Fisheries Society Special Publication: Bethesda, MD., 2007; pp. 204.
- [206] Lewin, W.C.; Kamjunke, N.; Mehner, T. Phosphorus Uptake by *Microcystis* during Passage through Fish Guts. *Limnol. Oceanogr.* **2003**, *48*, 2392-2396.
- [207] Kolmakov, V.I.; Gladyshev, M.I.; Kravchuk, E.S.; Chuprov, S.M.; Anishchenkob, O.V.; Ivanova, E.A.; Trusova, M.Y. Species-Specific Stimulation of Cyanobacteria by Silver Carp *Hypophthalmichthys molitrix* (Val.). *Dokl. Biol. Sci.* **2006**, *408*, 223-225.

Publikációk – Publications

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények – Publications related to the dissertation

Riba, M., Kiss-Szikszai, A., Gonda, S., Parizsa, P., Deák, B., Török, P., Valkó, O., Felföldi, T., Vasas, G.: Chemotyping of terrestrial *Nostoc*-like isolates from alkali grassland areas by non-targeted peptide analysis. *Algal Res.* 46 1-18, 2020. IF: 3.723

Riba, M., Kiss-Szikszai, A., Gonda, S., Boros, G., Vitál, Z., Borsodi, A., Krett, G., Borics, G., Ujvárosi, A., Vasas, G.: *Microcystis* Chemotype Diversity in the Alimentary Tract of Bigheaded Carp. *Toxins.* 11 (5), 1-27, 2019. IF: 3.895

Egyéb közlemények – Other publications

Ujvárosi, A., Herczeg, K., Riba, M., Gonda, S., Filipič, M., Vasas, G., Žegura, B.: The cyanobacterial oligopeptides microginins induce DNA damage in the human hepatocellular carcinoma (HepG2) cell line. *Chemosphere.* 240 1-11, 2020. IF: 5.108

Ujvárosi, A., Riba, M., Garda, T., Gyémánt, G., Vereb, G., Mikóné Hamvas, M., Vasas, G., Máthé, C.: Attack of *Microcystis aeruginosa* bloom on a *Ceratophyllum submersum* field: ecotoxicological measurements in real environment with real microcystin exposure. *Sci. Total Environ.* 662 735-745, 2019. IF: 5.589

Sonkoly, J., Valkó, O., Deák, B., Miglécz, T., Tóth, K., Radócz, S., Kelemen, A., Riba, M., Vasas, G., Tóthmérész, B., Török, P.: A new aspect of grassland vegetation dynamics: cyanobacterium colonies affect establishment success of plants. *J. Veg. Sci.* 28 (3), 475-483, 2017. IF: 2.658

Garda, T., Kónya, Z., Tándor, I., Beyer, D., Vasas, G., Erdődi, F., Vereb, G., Papp, G., Riba, M., Mikóné Hamvas, M., Máthé, C.: Microcystin-LR induces mitotic spindle assembly disorders in *Vicia faba* by protein phosphatase inhibition and not reactive oxygen species induction. *J. Plant Physiol.* 199 1-11, 2016. IF: 3.121

Riba, M., Borsodi, A., Ujvárosi, A., Vasas, G.: *Microcystis* izolátumok peptid-variabilitás vizsgálata. *Hidrol. Közlöny.* 96 (ksz.), 79-82, 2016.

Garda, T., Riba, M., Vasas, G., Beyer, D., Mikóné Hamvas, M., Hajdu, G., Tándor, I., Máthé, C.: Cytotoxic effects of cylindrospermopsin in mitotic and non-mitotic *Vicia faba* cells. *Chemosphere.* 120 145-153, 2015. IF: 3.698

Máthé, C., Demeter, Z., Resetár, A., Gonda, S., Balázs, A., Szőke, É., Kiss, Z., Simon, Á., Székely, V., Riba, M., Garda, T., Gere, B., Noszály, Z., Molnár, V., Vasas, G.: The plant tissue

culture collection at the Department of Botany, University of Debrecen. Acta biol. Szeged. 56 (2), 179-182, 2012.



Nyilvántartási szám: DEENK/49/2020.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Riba Milán
Neptun kód: DHFKMF
Doktori Iskola: Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10044557

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Riba, M.**, Kiss-Szikszai, A., Gonda, S., Parizsa, P., Deák, B., Török, P., Valkó, O., Felföldi, T., Vasas, G.: Chemotyping of terrestrial Nostoc-like isolates from alkali grassland areas by non-targeted peptide analysis.
Algal Res. 46, 1-18, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2020.101798>
IF: 3.723 (2018)
2. **Riba, M.**, Kiss-Szikszai, A., Gonda, S., Boros, G., Vitál, Z., Borsodi, A., Krett, G., Borics, G., Ujvárosi, A. Z., Vasas, G.: Microcystis Chemotype Diversity in the Alimentary Tract of Bigheaded Carp.
Toxins. 11 (5), 1-27, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/toxins11050288>
IF: 3.895 (2018)

További közlemények

3. Ujvárosi, A. Z., Herczeg, K., **Riba, M.**, Gonda, S., Filipič, M., Vasas, G., Žegura, B.: The cyanobacterial oligopeptides microginins induce DNA damage in the human hepatocellular carcinoma (HepG2) cell line.
Chemosphere. 240, 1-11, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124880>
IF: 5.108 (2018)
4. Ujvárosi, A. Z., **Riba, M.**, Garda, T., Gyémánt, G., Vereb, G., Mikóné Hamvas, M., Vasas, G., Máthé, C.: Attack of Microcystis aeruginosa bloom on a Ceratophyllum submersum field. Ecotoxicological measurements in real environment with real microcystin exposure.
Sci. Total Environ. 662, 735-745, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.01.226>
IF: 5.589 (2018)





5. Sonkoly, J., Valkó, O., Deák, B., Migléc, T., Tóth, K., Radócz, S., Kelemen, A., **Riba, M.**, Vasas, G., Tóthmérész, B., Török, P.: A new aspect of grassland vegetation dynamics: cyanobacterium colonies affect establishment success of plants.
J. Veg. Sci. 28 (3), 475-483, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/jvs.12503>
IF: 2.658
6. Garda, T., Kónya, Z., Tándor, I., Beyer, D., Vasas, G., Erdődi, F., Vereb, G., Papp, G., **Riba, M.**, Mikóné Hamvas, M., Máthé, C.: Microcystin-LR induces mitotic spindle assembly disorders in *Vicia faba* by protein phosphatase inhibition and not reactive oxygen species induction.
J. Plant Physiol. 199, 1-11, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jplph.2016.04.009>
IF: 3.121
7. **Riba, M.**, Borsodi, A., Ujvárosi, A. Z., Vasas, G.: Microcystis izolátumok peptid-variabilitás vizsgálata.
Hidrol. Közöny. 96 (ksz.), 79-82, 2016.
8. Garda, T., **Riba, M.**, Vasas, G., Beyer, D., Mikóné Hamvas, M., Hajdu, G., Tándor, I., Máthé, C.: Cytotoxic effects of cylindrospermopsin in mitotic and non-mitotic *Vicia faba* cells.
Chemosphere. 120, 145-153, 2015.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.06.035>
IF: 3.698
9. Máthé, C., Demeter, Z., Resetár, A., Gonda, S., Balázs, A., Szőke, É., Kiss, Z., Simon, Á., Székely, V., **Riba, M.**, Garda, T., Gere, B., Noszály, Z., Molnár, V. A., Vasas, G.: The plant tissue culture collection at the Department of Botany, University of Debrecen.
Acta biol. Szeged. 56 (2), 179-182, 2012.

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 27,792

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 7,618

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudománymetriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2020.02.28.





Registry number: DEENK/49/2020.PL
Subject: PhD Publikációs Lista

Candidate: Milán Riba
Neptun ID: DHFKMF
Doctoral School: Doctoral School of Pharmacy
MTMT ID: 10044557

List of publications related to the dissertation

1. **Riba, M.**, Kiss-Szikszai, A., Gonda, S., Parizsa, P., Deák, B., Török, P., Valkó, O., Felföldi, T., Vasas, G.: Chemotyping of terrestrial Nostoc-like isolates from alkali grassland areas by non-targeted peptide analysis.
Algal Res. 46, 1-18, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2020.101798>
IF: 3.723 (2018)
2. **Riba, M.**, Kiss-Szikszai, A., Gonda, S., Boros, G., Vitál, Z., Borsodi, A., Krett, G., Borics, G., Ujvárosi, A. Z., Vasas, G.: Microcystis Chemotype Diversity in the Alimentary Tract of Bigheaded Carp.
Toxins. 11 (5), 1-27, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/toxins11050288>
IF: 3.895 (2018)

List of other publications

3. Ujvárosi, A. Z., Herczeg, K., **Riba, M.**, Gonda, S., Filipič, M., Vasas, G., Žegura, B.: The cyanobacterial oligopeptides microginins induce DNA damage in the human hepatocellular carcinoma (HepG2) cell line.
Chemosphere. 240, 1-11, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124880>
IF: 5.108 (2018)
4. Ujvárosi, A. Z., **Riba, M.**, Garda, T., Gyémánt, G., Vereb, G., Mikóné Hamvas, M., Vasas, G., Máthé, C.: Attack of Microcystis aeruginosa bloom on a Ceratophyllum submersum field. Ecotoxicological measurements in real environment with real microcystin exposure.
Sci. Total Environ. 662, 735-745, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.01.226>
IF: 5.589 (2018)





5. Sonkoly, J., Valkó, O., Deák, B., Migléc, T., Tóth, K., Radócz, S., Kelemen, A., **Riba, M.**, Vasas, G., Tóthmérész, B., Török, P.: A new aspect of grassland vegetation dynamics: cyanobacterium colonies affect establishment success of plants.
J. Veg. Sci. 28 (3), 475-483, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/jvs.12503>
IF: 2.658
6. Garda, T., Kónya, Z., Tándor, I., Beyer, D., Vasas, G., Erdődi, F., Vereb, G., Papp, G., **Riba, M.**, Mikóné Hamvas, M., Máthé, C.: Microcystin-LR induces mitotic spindle assembly disorders in *Vicia faba* by protein phosphatase inhibition and not reactive oxygen species induction.
J. Plant Physiol. 199, 1-11, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jplph.2016.04.009>
IF: 3.121
7. **Riba, M.**, Borsodi, A., Ujvárosi, A. Z., Vasas, G.: Microcystis izolátumok peptid-variabilitás vizsgálata.
Hidrol. Közlöny. 96 (ksz.), 79-82, 2016.
8. Garda, T., **Riba, M.**, Vasas, G., Beyer, D., Mikóné Hamvas, M., Hajdu, G., Tándor, I., Máthé, C.: Cytotoxic effects of cylindrospermopsin in mitotic and non-mitotic *Vicia faba* cells.
Chemosphere. 120, 145-153, 2015.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.06.035>
IF: 3.698
9. Máthé, C., Demeter, Z., Resetár, A., Gonda, S., Balázs, A., Szőke, É., Kiss, Z., Simon, Á., Székely, V., **Riba, M.**, Garda, T., Gere, B., Noszály, Z., Molnár, V. A., Vasas, G.: The plant tissue culture collection at the Department of Botany, University of Debrecen.
Acta biol. Szeged. 56 (2), 179-182, 2012.

Total IF of journals (all publications): 27,792

Total IF of journals (publications related to the dissertation): 7,618

The Candidate's publication data submitted to the iDEa Tudóstér have been validated by DEENK on the basis of the Journal Citation Report (Impact Factor) database.

28 February, 2020

