



INTÉZMÉNYI TUDOMÁNYOS DIÁKKÖRI KONFERENCIA

2024. november 20.

OCHRATOXIN A BIODEGRADÁCIÓJÁRA ALKALMAS FEHÉRJÉK HOMOLÓG ÉS HETEROLÓG EXPRESSZIÓJA **Homologous and heterologous expression of ochratoxin A degrading proteins**

Készítette: **Bajzák Emma Klára**
JJHYIF
Mezőgazdasági biotechnológia, mesterképzés
nappali tagozat
Szent István Campus

Témavezetők: **Dr. Baka Erzsébet**
tudományos munkatárs
Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézet,
Molekuláris Ökológia Tanszék
Ábrahám Renáta
PhD hallgató
MATE, Akvakultúra és Környezetbiztonsági
Intézet, Molekuláris Ökológia Tanszék

Lehetséges OTDK szekció: Agrártudományi szekció

**Gödöllő
2024.**

TARTALOMJEGYZÉK

1.	BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉS.....	4
2.	SZAKIRODALMI ÁTTEKINTÉS	6
2.1.	Az ochratoxin A (OTA) ismertetése.....	6
2.1.1.	Kémiai tulajdonságok.....	6
2.1.2.	Bioszintézis	7
2.1.3.	Toxicitás	7
2.1.4.	Metabolizmus	7
2.2.	Dekontaminációs stratégiák.....	8
2.2.1.	Fizikokémiai módszerek.....	8
2.2.2.	Biodegradáció.....	9
2.3.	A <i>Cupriavidus</i> nemzetség általános jellemzése.....	10
2.3.1.	A <i>Cupriavidus basilensis</i> ÓR16	10
2.3.2.	A CPA2 karboxipeptidáz enzim.....	11
2.3.3.	A <i>C. plantarum</i> BCCM/LMG 26296 ^T	12
2.4.	Alkalmazott molekuláris biológiai módszerek áttekintése.....	13
2.4.1.	<i>In vitro</i> amplifikáció polimeráz-láncreakcióval (PCR)	13
2.4.2.	<i>In vivo</i> amplifikáció klónozó vektorral.....	13
2.4.3.	Expressziós vektorok.....	13
2.4.4.	Restrikciós emésztés.....	14
2.4.5.	Ligálás	14
2.4.6.	Szekvenálás	14
2.4.7.	Transzformációs módszerek	15
2.4.8.	Expresszió	15
2.4.9.	Citotoxicitás vizsgálata <i>Aliivibrio fischeri</i> -vel	16
3.	ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	17
3.1.	Bakteriális törzsek és tenyésztésük körülményei	17
3.1.1.	Tenyésztési tápközegek	17
3.2.	Reagensek.....	18
3.2.1.	Enzimek.....	19
3.2.2.	Plazmidkonstrukciók	20
3.2.3.	Primerek	22
3.2.4.	Tisztításhoz és izoláláshoz használt kitek	23
3.3.	Módszerek	23
3.3.1.	Donor szervezet genomi DNS-ének izolálása	23
3.3.2.	Célgén amplifikációja.....	24
3.3.3.	Restrikciós emésztés.....	25
3.3.4.	Rekombináns DNS létrehozása ligálással	25

3.3.5.	Kémiaiilag kompetens <i>E. coli</i> TOP10 és BL21(DE3) sejtek létrehozása.....	26
3.3.6.	<i>E. coli</i> TOP10 és BL21 (DE3) transzformációja hősokkal.....	26
3.3.7.	Az újonnan létrehozott expressziós plazmidok ellenőrzése	26
3.3.8.	OTA bontási kísérlet.....	27
3.3.9.	Bomlástermékek detektálása HPLC-vel.....	27
3.3.10.	Krónikus <i>A. fischeri</i> citotoxicitási teszt.....	28
4.	EREDEMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELEÉSÜK	29
4.1.	Izolált és PCR-amplifikált CPA2 inszert.....	29
4.2.	Rekombináns DNS-konstrukciók létrehozása	29
4.3.	Az újonnan létrehozott expressziós plazmidok ellenőrzése	31
4.3.1.	Restrikciós hasítással létrehozott fragmentek.....	31
4.3.2.	Szekvenáló PCR-rel amplifikált inszert	31
4.3.3.	A CPA2 gén ellenőrzése plazmid konstrukcióban szekvencia analízissel	32
4.4.	Transzformánsok	32
4.4.1.	Elektrokompetens <i>C. plantarum</i> sejtek létrehozása.....	32
4.4.2.	<i>C. plantarum</i> elektroporációs transzformációja pCAT222_CPA2-vel.....	33
4.4.3.	<i>E. coli</i> transzformációja pET-28a(+)_CPA2-vel	34
4.5.	CPA2 OTA-bontó kapacitásának vizsgálata	35
4.5.1.	Natív ŐR16 CPA2.....	35
4.5.2.	Homológ expresszált CPA2	35
4.5.3.	Heterológ expresszált CPA2.....	36
4.5.4.	OTA krónikus hatása <i>A. fischeri</i> biolumineszcenciájára.....	37
4.6.	Eredmények értékelése és javaslatok	38
5.	ÖSSZEFOGLALÁS.....	39
6.	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	41
7.	IRODALOMJEGYZÉK.....	42

1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉS

Élelmiszer- és takarmánynövények termesztése és tárolása során toxinogén fonalas gombák által termelt, úgynevezett mikotoxinok halmozódhatnak fel a terményállományban. A mikotoxinok krónikus expozíciója és a – gyakran termékenységi, immun-, és felszívódási zavarokban megmutatkozó – betegségekkel való kapcsolata arra sarkallja a mezőgazdaság és az élelmiszeripar szereplőit, hogy fokozottan ügyeljenek állományaik tisztaságára. Sokak által hivatkozott adat az az Élelmiszerügyi és Mezőgazdasági Világszervezetnek (Food and Agriculture Organization, FAO) tulajdonított – Eskola és mtsai. (2020) szerint szerény – becslés, miszerint a mikotoxinnal szennyezett termények aránya évi 25%. A klímaváltozás négy lovasa: a magas hőmérséklet, az aszályok, a nagy mennyiségű légköri szén-dioxid (CO₂) és a felhőszakadások mind hozzájárulnak a toxintermelő penészek szaporulatahoz és fokozott versengéséből adódó, megnövekedett toxinszintéziséhez (Zingales et al., 2022). Mivel a klímakutatók szerint a klímaváltozás iránya változatlan, a mikotoxinok jelentette veszéllyel a jövőben is számolnunk kell. Számos fonalas gomba termel ilyen másodlagos anyagcseretermékeket, ugyanakkor egy faj több toxin szintézisére is képes lehet, így a legtöbb szennyezett állomány esetében multimikotoxin-kontamináció áll fenn. Különböző *in vitro* végzett kutatások szerint mérgező hatásuk additív-, vagy akár szinergens módon is felerősödhet, ezért egészen kicsiny koncentrációk tartós fogyasztása is igen veszélyes lehet (Smith et al., 2016). Az egyik legszigorúbban monitorozott mikotoxin az ochratoxin A (OTA). Toxikus mechanizmusai között beszámoltak már a fehérjeszintézis gátlásáról, a fenilalanin-metabolizmus megzavarásáról, a membránok lipidperoxidációjának elősegítéséről, a kalcium-homeosztázis megbolygatásáról, a sejtlégzés gátlásáról és a DNS károsításáról (Ringot et al., 2006). Vese- és májkárosodást, immungyengeséget és feltételezhetően rákot okoz (Kószegi & Poór, 2016; IARC, 1993). Élettani okokból kifolyólag a sertések és a baromfik sokkal érzékenyebbek az OTA toxikus hatásaira, mint az eltérő jellegű tápcsatornával és bélmikrobiommal rendelkező, kérődző állatok. Az Európai Bizottság ajánlásában meghatározott, OTA-ra vonatkozó irányértékek takarmányok esetében 0,05 és 0,25 part per million (ppm), élelmiszereknél pedig 0,5 és 20 ppm között mozognak (2006/576/EC; 2023/915/EC). A 2023. évi Alltech European Harvest Analysis által vizsgált 20 európai országból származó, összesen több mint ezerszáz gabonaminta mindegyikében átlagosan 4,4 különböző mikotoxin volt jelen. A kukoricaminták 36%-a volt ochratoxinokkal szennyezett, melyek átlagos koncentrációja 28 ppb volt (*Alltech 2023 European Harvest Analysis Reveals That Challenging Weather Conditions Contributed to High Levels of Mycotoxins in Grains*,

2023). A mezőgazdaságilag legjelentősebbnek számító, OTA-termelő tömlősgombákat (*Ascomycota*) az *Aspergillus* és a *Penicillium* nemzetségekben találjuk (Pitt, 2000). Az OTA a többi mikotoxinhoz hasonlóan igen stabil, így a feldolgozás során alkalmazott hagyományos technológiai lépések sorozata után is fennáll a szennyezettség kockázata. Indokolt tehát olyan speciális, kifejezetten mikotoxin-eliminációt célzó dekontaminációs stratégiák fejlesztése, melyekkel kiküszöbölhető a potenciálisan felszabaduló, káros mikotoxin-bomlástermékek felhalmozódása, továbbá önmagukban sem hordoznak egészségügyi kockázatot, és a termék érzékszervi tulajdonságaiban sem okoznak jelentős változást.

1.1.CÉLKITŰZÉS

A kutatás célja egy olyan fehérje azonosítása és termelése, mely biztonságosan és hatékonyan képes lebontani az OTA-t. A következő lépések mentén hajtottuk végre a kísérletet:

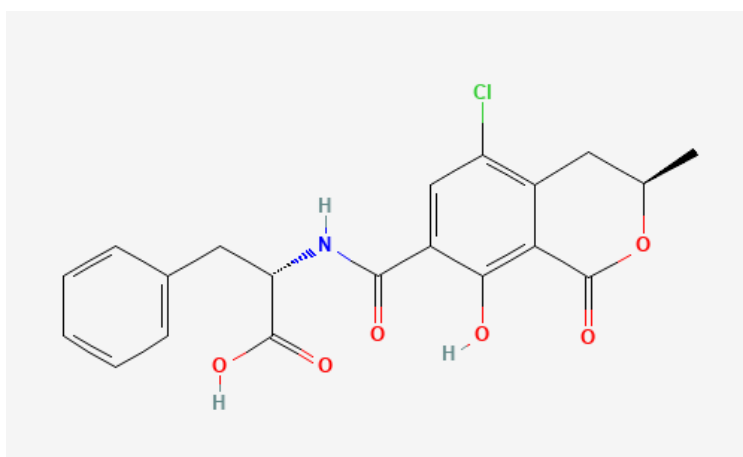
- Az egyetemen folytatott korábbi kutatások eredményeire alapozva kiválasztottunk egy széleskörű xenobiotikum-rezisztenciaprofillal rendelkező környezeti baktériumtörzset, melynek genomjából szelektáltuk egy olyan OTA-bontó enzim génjét, mely OTA-jelenlétére nagy mennyiségben expresszáldott.
- A választott gén expresszióját két különböző, OTA-detoxifikációs aktivitással gyakorlatilag nem rendelkező recipiens törzsben valósítjuk meg annak érdekében, hogy potenciálisan növelhessük a rekombináns fehérjetermék hozamát és aktivitását.
- A rekombináns enzim OTA-bontó képességét folyadék-kromatográfiával, bomlástermékeinek sejtsemleges hatását pedig citotoxicitási tesztekkel kívánjuk igazolni. Az eredményeket aszerint hasonlítjuk össze, hogy a fehérje homológ vagy heterológ expresszióval jött-e létre.

2. SZAKIRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. Az ochratoxin A (OTA) ismertetése

2.1.1. Kémiai tulajdonságok

Az OTA-t 1965-ben van der Merwe és mtsai. izolálták először steril kukoricelekváron tenyésztett *Aspergillus ochraceus* Wilh. törzsből. Térszerkezetét (1. ábra) 1967-ben optikai rotáció diszperziós spektroszkópia segítségével Steyn és mtsai írták le. Összegképlete $C_{20}H_{18}O_6NCl$, molekulatömege 403,82 Da.



1. ábra. Az OTA térszerkezete (PubChem)

IUPAC formulája N-[(3R)-5-kloro-8-hidroxi-3-metil-1-oxo-3,4-dihidro-1H-2-benzopirán-7-karbonil]-L-fenilalanin. Az ochratoxin α ($OT\alpha$) kivételével minden ismert ochratoxin egy olyan poliketid-származék dihidroizokumarin részt tartalmaz, melynek karboxil csoportjában található hetes szénatomján keresztül kapcsolódik egy L- β -fenilalaninhoz. A többi ochratoxinszármazék az OTA-nak metilésztere vagy etilésztere; az ochratoxin C (OTC); az ochratoxin B (OTB) és annak metil-, ill. etilésztere; a hidroxiochratoxinok ($OTA-OH$), valamint az OTA deklór-analógja, az ochratoxin β ($OT\beta$); illetve a csonka $OT\alpha$, mely az OTA izokumarin-származéka, melyből hiányzik a fenilalanin molekularész (Ringot et al., 2006). Az OTA-molekula dihidroizokumarin része és a fenilalanin között található amid kötés támadáspontként szolgál a legtöbb ismert hidrolitikus OTA-bontó enzim számára. Poláris szerves oldószerekben kiválóan, híg lúgokban kevésbé oldódik. Az OTA toxicitásának egyik felelőse a dihidroizokumarin gyűrűn lokalizálódó klór (Cl), melyet helyettesítő hidrogén (H) az OTB molekulában már tizedére csökkenti annak toxicitását. A természetes OTA-származékok mind elmaradnak toxicitásban az anyamolekulától (Tao et al., 2018).

2.1.2. Bioszintézis

Féltrópusi éghajlatokon főleg az *Aspergillus*-, a mérsékelt övben pedig a *Penicillium* nemzetség egyes tagjainál figyelhető meg ochratoxin-termelés; név szerint az *A. albertensis*, az *A. ochraceus*, a *P. verrucosum* és a *P. viridicatum* fajoknál (Wang et al., 2016). Az OTA bioszintézisének pontos forgatókönyve vitatott, azonban általánosan elfogadott a Huff és Hamilton szerzőpáros (1979) azon megállapítása, hogy a folyamat acetát és malonát anyagokból indul ki, és négy konzerválódott fehérje – az OtaA, az OtaC, az OtaB és az OtaD – mediálja. Az OtaA egy poliketid szintáz, mely acetyl koenzim A (acetyl-KoA) és malonyl-KoA molekulákból 7-metilmelleint szintetizál, melynek OT β -vá történő oxidációját citokróm P450 monooxygenáz (OtaC) katalizálja. Ezután az OT β és egy fenilalanin között amid kötést alakít ki egy non-riboszomális peptid szintetáz (NRPS), az OtaB, OTB molekulát létrehozva. Végül, az OTB OT β részének OtaD halogenáz enzim általi klorinációjával OT α rész-, összességében OTA jön létre (Wang et al., 2018).

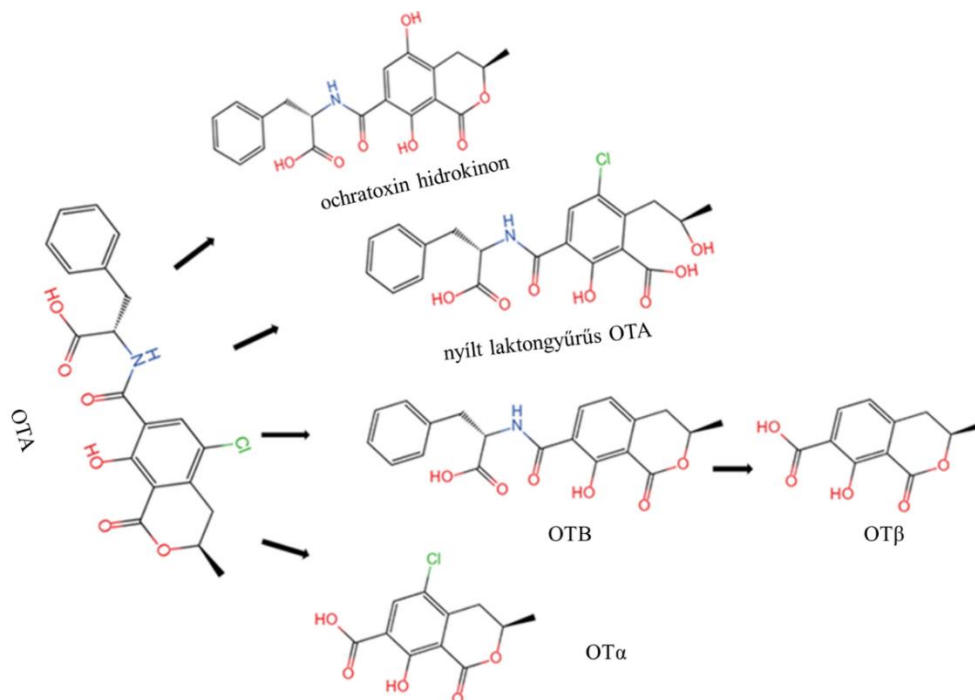
2.1.3. Toxicitás

Az OTA erős hepato- és nefrotoxin. Különböző állatmodelleken végzett kísérletek alapján különösen nagy veszélyt jelent a monogasztrikus állatokra (pl.: sertés, baromfi, rágcsálók, ló, ember) vérszérumban kötött formája miatt (Bernardini et al., 2014). Rendelkezik azonban karcinogén, immunszuppresszív és neurotoxikus hatással is (Sava et al., 2006). Az OTA genotoxicitásában fontos szerepet játszó származékok a peroxidáz enzimek aktiválta gyökök, és a citokróm P450 enzimek által aktivált elektrofil benzokinon, mely reakcióba lépve deoxiguanozinnal C8-dG adduktot képez, melynek helyén a DNS-szintézis akadályozott lehet (Manderville et al., 2008). Felszívódási zavarokat okoz a bélrendszerben, mely alultápláltsághoz és fertőzésekhez vezet (Maresca et al., 2001). Halakkal végzett kísérletek során is tapasztaltak fokozott mortalitást, ill. vese-, máj- és légzőszervrendszeri károsodást (El-Sayed et al., 2009).

2.1.4. Metabolizmus

Szájon át történő elfogyasztást követően a gyomor-bél traktusból gyorsan felszívódik a vérbe, majd enzimatisz hidrolízis vagy citokróm P450 indukció révén metabolizálódik a fogyasztó szervezetétől függően. Sertésekben 66%, nyulakban 56%, baromfikban pedig 40% OTA szívódik fel közvetlenül (Galtier et al., 1981). A bélmikrobiom főleg non-toxikus OT α -ra és fenilalaninra hidrolizálja, míg a májban jelenlévő citokróm P450 rendszer főként OTA-OH

különböző formáira hidroxilálja. A mikrobiális OTA-bontó útvonalakat a 2. ábra szemlélteti. Rágcsálókban főleg a vastagbél és a vakbél anaerob baktériumai felelnek az OTA hidrolitikus bontásáért (Galtier, 1991). Kérődzőkben a rumen protoza nagy hatékonysággal hidrolizálja az elfogyasztott OTA-t (Tao et al., 2018). A különböző metabolitok ezután eltérő ütemben vizelettel és széklettel ürülnek, azonban a szérum albuminhoz való erős affinitása miatt az OTA-OH csak nagyon lassan ürül ki a szervezetből, így ez az útvonal kevésbé hatékony kiválasztást tesz lehetővé (Ding et al., 2023).



2. ábra. Ismert mikrobiális OTA-metabolizmus útvonalak (Luo et al., 2021)

2.2. Dekontaminációs stratégiák

2.2.1. Fizikokémiai módszerek

A legveszélyeztetettebb termények és termékek a különböző gabonák és olajos magvak: a kukorica, a szója, a repce, a rizs, a mogyoró, a kávé; sörök, borok és szárított gyümölcsök (Abrunhosa et al., 2010). Egy terményállomány szennyezettsége függ a mátrix szabad víztartalmától, porozitásától, kompetíciót jelentő mikroorganizmusok jelenlététől, és az elérhető szubsztrát jellegétől. A mikotoxinok egészségkárosító hatásain kívül a penészek így a termény komponensprofiljának módosulását, ingadozó minőségét, inkonzisztens tápértékét is eredményezhetik. A mikotoxinok eliminációjának négyféle megközelítése létezik: a bioszintézis gátlása; a szennyezett frakció eltávolítása; toxinkötők alkalmazása, és a degradáció. Biokontroll alkalmazása egyelőre korlátokba ütközik amiatt, hogy egy olyan

kultúrnövény-specifikus törzs szelekcióját igényli, amely közben széles fogyasztói kör számára biztonságosan fogyasztható (Yazid et al., 2023). Az élelmiszeripari feldolgozás magas hőmérsékleten ($>160^{\circ}\text{C}$) zajló technológiái – különösen a pörkölés és az extrudálás –, a mikotoxin-koncentráció szignifikáns csökkenését eredményezhetik (Bullerman & Bianchini, 2007). Ezek az invazív és költséges kezelések nem alkalmazhatók minden típusú élelmiszer és takarmány előállításánál azok komponenseinek nemkívánatos reakciói (pl. értékes antioxidánsok és aromaanyagok instabilitása, Maillard-reakció, karamellizáció) miatt. A hőhatáson alapuló módszereken kívül az egyéb fizikokémiai kezelések széleskörű alkalmazása is korlátozott. A sugárzásos eljárások hatékonysága erősen függ a nyersanyag szerkezetétől, kémhatásától, ugyanakkor non-target komponensek bomlását is okozhatják. Toxinkötők alkalmazásánál a specifitás, a hatékonyság és a fogyasztó biztonságának garantálása jelenti a legnagyobb kihívást. Az ásványi toxinkötők kis hatékonysággal kötik meg az OTA-t; az aktív szén pedig főleg folyékony mátrixoknál alkalmazott non-specifikus adszorbens, ahol a beltartalmi jellemzőktől erősen függ adszorpciós kapacitása (Ding et al., 2023).

2.2.2. Biodegradáció

A fizikai és kémiai detoxifikáció jelenlegi akadályaira és hiányosságaira kínálhatnak megoldást a mikrobiális módszerek. Az alkalmazott törzsekre jellemző, hogy nem patogének, könnyen tenyésztethetők és hatékony, ugyanakkor toxikus melléktermékek keletkezését mellőző OTA-bontó útvonallal rendelkeznek. A mikrobiális enzimek szelektív szubsztrátspecifitását kihasználva lehetőség nyílik az OTA *in vivo* biodegradációjára úgy, hogy a bevitt táplálék összetevői közben érintetlenek maradnak. Számos esetben sikeresen alkalmaztak már enzimeket OTA- és más mikotoxinok detoxifikációjának céljából. Az első ilyen enzim a szakirodalomban a szarvasmarha hasnyálmirigyéből kivont karboxipeptidáz A (CPA) volt, mely OTA -t eredményező hidrolitikus aktivitással rendelkezik (Pitout, 1969). Ugyanezt a terméket eredményezi egy sor mikrobiális enzim, melyek előállítása olcsóbb és kíméletesebb, mint az állati eredetűeké. Chang és mtsai. (2014) által azonosított *Bacillus amyloliquefaciens* eredetű CPA enzim OTA-bontó kapacitása 72% volt. Péteri és mtsai. (2007) 66%-os OTA-bontást valósított meg *Phaffia rhodozyma* CBS 5905 eredetű CPA-val. *Saccharomyces cerevisiae* CPA Y enzime 52%-os detoxifikációs hatékonysággal bírt (Abrunhosa et al. 2010). Liuzzi és mtsai. (2016) *Acinetobacter* sp. *neg1*-ből származó CPA-val 33%-os OTA-bontást értek el. Shi és mtsai. (2014) által vizsgált *Bacillus* spp. és *B. subtilis* CW14 eredetű enzimek OTA-bontó kapacitása 47,1% volt. Xu és mtsai. (2021) később a *B. subtilis* CW14 törzs *dacA* és *dacB* CPA-t kódoló génjeit *Escherichia coli*-ban expresszáltatták, mellyel 71,3%-ra növelték a tisztított

enzim bontási hatékonyságát. *E. coli* BL21 törzsben expresszált rekombináns ochratoxinázzal 85,1%-os bontást ért el Zhao és mtsai. (2020).

2.3. A *Cupriavidus* nemzetség általános jellemzése

A *Cupriavidus* nemzetség első képviselőjét 1987-ben írták le. A *C. necator* a Philadelphia állambéli Pennsylvanai Egyetem kampuszáról származó talajmintában találták (Makkar & Casida, 1987), másfél évtizeddel később már önálló nemzetséggé írták le (Coenye et al., 2003; Vandamme és Coenye, 2004). A nemzetséget alkotó 20 faj kemolitoautótróf vagy kemoorganotróf, oxidatív anyagcserét folytat, Gram-negatív, motilis, kokkoid vagy pálca alakú és gyakran flagellált. A név a latin *cuprum* és *avidus* szavak összeolvasztásával született, jelentése „rézvágyó”, amely kelátképző tulajdonságára utal. A nemzetség széleskörű szénhidrogénbontó- és fém-biotranszformációs képessége figyelemreméltó, különösen a vegyipari és fémkohászati innovációk számára kínált lehetőségek miatt. Sikeresen alkalmazták biológiailag kevésbé elérhető aromás szénhidrogének, sőt, kifejezetten toxikus vegyületek biodegradációjára; biopolimerek szintéziséhez, és változatos vegyületek gázfermentációs előállításához (Chen et al., 2007; Wierckx et al., 2010; Bedade & Singhal, 2018; Wang et al., 2015; Nangle et al., 2020; Cavaleiro et al., 2009).

2.3.1. A *Cupriavidus basilensis* ŐR16

A Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézetében több olyan publikáció is született, melyek a *Cupriavidus* nemzetség eredményes mikotoxin-detoxifikációs potenciáljáról számoltak be. A *Cupriavidus basilensis* ŐR16 törzset az intézet kutatói, Cserhádi és mtsai (2012) izolálták érintetlen hazai talajmintából. Molekuláris taxonómiával *C. basilensis* néven azonosították. Genomja 7534 feltételezett kódoló szekvenciát tartalmaz, beleértve egy egyedi glükóz-dehidrogenáz gént és xenobiotikumok bontásáért felelős gének hosszú sorát. A fajt elsőként egy vegyipari tevékenység során kontaminálódott tó üledékéből izolálták, ahol képes volt egyedüli szénforrásként hasznosítani a 2,6-diklórfenolt (Steinle et al., 1998). Egy detoxifikációs kísérletben a *C. basilensis* ŐR16 törzs képes volt az OTA 98%-ának bontására úgy, hogy az OTA-val kezelt egereknél tapasztalt tüneteket az ŐR16 törzsszel detoxifikált „OTA” már nem indukált (Ferenczi et al., 2014). A szakirodalomban ekkor számoltak be először mikotoxinbontó *Cupriavidus* fajról.

2.3.2. A CPA2 karboxipeptidáz enzim

Transzkriptom-analízist követően Al-Nussairawi (2020b) azonosította az ŐR16 mikotoxinbontó enzimeit (1. táblázat), melyek közül az ŐR16_07981 gén által kódolt, a szerző által CPA2-ként hivatkozott, fémion-igényes, extracellulárisan kiválasztódó karboxipeptidázt választottuk annak – a kísérletünk célkitűzései szempontjából – kedvező katalitikus tulajdonságai miatt (Al-Nussairawi, 2020b).

1.táblázat. Az ŐR16 törzs feltételezett OTA-bontásért felelős génjei (Al-Nussairawi, 2020b).

Fehérje megnevezése	Gén	Expressziós ráta	Méret, bázispár (bp)
aromás gyűrű hidroxiláz (ARH)	ŐR16_16257	8,1	1575
membrán-karboxipeptidáz / penicillinkötő protein	ŐR16_12645	1,8	2190
metalloendopeptidázhoz hasonló membránfehérjék (MEP)	ŐR16_24100	3,8	727
D-alanil-D-alanin karboxipeptidáz (CPA1)	ŐR16_23878	1,3	1209
fémion-igényes karboxipeptidáz (CPA2)	ŐR16_07981	2,5	1212
D-alanil-D-alanin karboxipeptidáz (penicillinkötő fehérje 4) (CPA3)	ŐR16_12223	1,1	1536

Az CPA2 egy 403 aminosavból álló, 42,7 kDa molekulatömegű metallokarboxipeptidáz, név szerint hippurát hidroláz (UniProt azonosítója H1S1Q3). A MEROPS proteolitikus enzimeket kategorizáló adatbázisban MER0373049 azonosítóval jegyzik. Az exopeptidázok (M20)



3. ábra. A CPA2 3D szerkezete.

családjába, azon belül a karboxipeptidázok (M20D) alcsaládjába tartozik. Háromdimenziós (3D) szerkezete a 3. ábrán látható.

A karboxipeptidázok (EC 3.4.17.) specifitásukat tekintve olyan exoenzimek, melyek szabad karboxilcsoporttal rendelkező láncvégi peptideket szabadítanak fel az amid kötés hidrolízisével. Legmagasabb affinitást aromás aminosavakra mutatnak. A CPA2 hidrolitikus aktivitását fokozza kétvegyértékű mangán(II) ion (Mn^{2+}) kofaktor jelenléte. A reakcióban résztvevő fém kationok funkcionálisan Lewis-savak, azaz elektrópár akceptorok; a vízmolekulák deprotonációját segítik. Az így felszabaduló, nukleofil hidroxidionok megtámadják a szubsztrát elektrofil karakterű karbonil szénjét. Az enzimreakció nyomán $OT\alpha$ és fenilalanin szabadul fel.

2.3.3. A *C. plantarum* BCCM/LMG 26296^T

Al-Nussairawi és mtsai. (2020) összehasonlította a nemzetség 16 másik törzsét mikotoxin-degradáló képesség alapján nagy teljesítményű folyadék-kromatográfiával kapcsolt tandem tömegspektrometriás (HPLC–MS/MS) módszerrel. A 2. táblázatban közölt eredmények alapján választottuk ki a *Cupriavidus plantarum* BCCM/LMG 26296^T törzset homológ expressziós vizsgálatainkhoz (Al-Nussairawi et al., 2020).

2. táblázat. *Cupriavidus*-fajok OTA-bontó kapacitása (Al-Nussairawi et al., 2020).

Faj	OTA-bontó kapacitás [%]
<i>C. gilardii</i> JCM 11283 ^T	19
<i>C. oxalaticus</i> JCM 11285 ^T	19
<i>C. plantarum</i> BCCM/LMG 26296 ^T	14
<i>C. yeoncheonensis</i> JCM 19890 ^T	12

A vad típusú *C. plantarum* BCCM/LMG 26296^T az ÖR16 törzshöz képest gyakorlatilag elhanyagolható mértékben rendelkezik természetes OTA-bontó kapacitással (Al-Nussairawi et al., 2020). A törzset Mexikóban izolálták először agávé rhizoszférájából. Obligát aerob anyagcserét folytat. Kókkoid sejtjei spórákat nem képeznek. Épszelű, krémfehér, egységesen 1-2 mm átmérőjű telepeket képez Luria-Bertani (LB) táptalajon (Estrada de los Santos et al., 2014).

2.4. Alkalmazott molekuláris biológiai módszerek áttekintése

2.4.1. *In vitro* amplifikáció polimeráz-lánreakcióval (PCR)

A donor genomjának ismeretében a célgént közvetlenül övező oligonukleotid szakaszokkal komplementer primereket terveztünk úgy, hogy a restrikciós hasításhoz használt enzimek felismerőhelyeit és rövid, feltapadási helyet biztosító szekvenciát is tartalmaztak.

2.4.2. *In vivo* amplifikáció klónozó vektorral

A rekombináns plazmidot célszerű sokszorozítani a transzformáció hatékonyságának növelése érdekében. A kereskedelemben kapható számos *E. coli* törzs egyikét, a kémiaiilag kompetens *E. coli* TOP10 törzset választottuk *in vivo* amplifikációhoz, mely nagyszámú kópia replikációjára képes.

2.4.3. Expressziós vektorok

Számos olyan kész konstrukció (pl. bakteriális plazmidok különböző módosulatai, vírusvektorok stb.) érhető el a kereskedelmi forgalomban, amely lehetővé teszi a transzformáns szervezetek szelekcióját riporter gének által kódolt szelekciós markerek (pl.: antibiotikum-rezisztencia, fluoreszcencia, auxotrófia, kolorimetria) segítségével; a rekombináns fehérjetermék azonosítását vagy elválasztását (pl.: fluoreszcens- vagy affinitás-jelölések fúzionáltatása); az expressziós ráta befolyásolását konstitutív vagy indukálható promóterekkel.

A pET-28a(+) vektor

E. coli klónozásának közkezdvelt eszköze a pET-28a(+) plazmidkonstrukció. Sikeres transzgenezist jelző szelekciós markerként a *KanR* gén által kódolt kanamicin-rezisztencia szolgál. A rekombináns fehérje túlexpresszáltatása a *lacI* promóter indukálásával szabályozható. Az *E. coli* laktózanyagcseréjét szabályozó gének egy operonba szerveződnek, melyek transzkripciója laktóz jelenlétéhez kötött. Hiányában lac represszor akadályozza az RNS-polimeráz kötődését, a transzkripció iniciációját. Az izopropil- β -D-1-tiogalaktopiranozid (IPTG) egy laktózmetabolit (allolaktóz) molekuláris analógja, melynek jelenlétében inaktíválódik a represszor, és megkezdődhet a célgén átírása. Az IPTG azonban nem szubsztrátja a laktózanyagcsere enzimeinek, ezért koncentrációja állandó marad. A pET-rendszer T7 RNS polimeráz enzime rendkívül szelektív és hatékony, így a sejt szinte minden erőforrását a célgén kifejezésére fordítja. Ennek eredményeként az indukciót követő néhány

órán belül a kívánt termék a sejt teljes fehérjetartalmának több mint 50%-át is kiteheti (Mierendorf et al., 1998).

A pCAT222 vektor

Korábban főleg széles gazdaspektrumú vektorokkal, konjugáció útján transzformáltak *Cupriavidus* fajokat, mely igen lassú és hatékonytalan folyamatnak bizonyult. A pCAT plazmidok megkonstruálásával azonban Azubuike és mtsai. (2021) elsőként hatékony elektroporációs transzformációt (10^3 – 10^7 telepképző egység, cfu/ μ g) valósított meg egy *C. necator* törzsben. A pCAT222 vektor alapvázát a *KanR* gént hordozó pBBR1MCS-2 plazmid adja, mely determinálta, hogy az ezzel transzformálni kívánt homológ expressziós törzsnek kanamicin-szenzitívnek kell lennie.

2.4.4. Restriktációs emésztés

Ahhoz, hogy a vektorok képesek legyenek befogadni az inszertet, az MCS (multiple cloning site) régióban ugyanazzal a két restriktációs endonukleázzal hasítottuk el őket, melyek felismerőhelyeit a PCR során a primerek segítségével az célgénhez toldottunk. A restriktációs endonukleázok egy specifikus szekvencián belül egy specifikus helyen vágják el a DNS-t. Az inszerció helyétől upstream EcoRV, illetve BamHI; downstream SacI, ill. HindIII enzimeket használtunk. A két enzim egyidejű alkalmazása az ismert méretű plazmidból ismert méretű fragmenteket generál, melyek agaróz gélelektroforézissel könnyen szétválaszthatók (Green & Sambrook, 2012).

2.4.5. Ligálás

A linearizált plazmidfragment és a transzgén egyesíthető egy rekombináns DNS-sé a végeik ligálásával. A reakciót ligáz enzim katalizálja, mely az élő szervezet DNS-ének töréseit javítja a felszakadt foszfodiészter kötések helyreállításával. A leggyakrabban alkalmazott enzim a T4 bakteriofág eredetű T4 ligáz, melynek hőoptimuma 37°C. A ragadós végek túllógó részének hosszától függően a reakció hőmérséklete ettől eltérő is lehet (Green & Sambrook, 2012).

2.4.6. Szekvenálás

A transzgén beépülésének helyén pár bázisnyi delécio/inszercio fordulhat elő. Szekvenálással a nukleinsavak elsődleges szerkezete feltérképezhető, így az esetleges mutációk azonosíthatók. A PCR-hez hasonlóan a Sanger-szekvenálás is egy primerből kiinduló DNS-polimeráz szálszintézisén alapszik. A reakcióelegyben azonban a szabad dezoxiribonukleotid-trifoszfát

(dNTP) építőkövek mellett (100:1) ún. láncterminációs didezoxinukleotidok (ddNTP) is vannak, melyek 3' végéről hiányzik a hidroxil-csoport (–OH). Ennek hiányában a DNS-polimeráz terminálja a további láncszintézist. A négyféle ddNTP fluoreszcens jelölést tartalmaz, melyeket végül kapilláris elektroforézissel azonosítunk (Sanger et al., 1977). A nyers szekvencia ezután bioinformatikai vizsgálatoknak vethető alá.

2.4.7. Transzformációs módszerek

Hősokek-transzfomáció

A baktériumok egyik horizontális génátviteli mechanizmusa a természetes transzformáció, mely során kompetens sejtek képesek a környezetükből szabad DNS-t felvenni, és potenciálisan előnyös tulajdonságokat hordozó génekre cserélni sajátjaikat megfelelő szintű homológia esetén. Az *E. coli* természetes DNS-feltevő képessége, azaz kompetenciája igen alacsony (10^{-5} – 10^{-10}). A plazmamembránt alkotó hidrofób foszfolipid-kettősréteg csak bizonyos molekulák számára biztosít szelektív átjárást, a DNS (pl.: plazmid vagy lineáris kromoszóma) azonban erősen negatívan töltött makromolekula. A rövid hősokekkel kombinált kationos (pl.: Ca^{2+} , Mn^{2+} , Rb^{+}) kezelés, fizikai és kémiai stresszt egyidejűleg alkalmazva növeli a membránok permeabilitását, így a transzformáció hatékonyságát. A magas koncentrációjú kationok semlegesítik a sejtfelszín negatív töltését, valamint fokozzák az exogén DNS kompaktitását; a hirtelen hőhatás eközben megnöveli a sejtfal porozitását. A hősokek pillanatában a DNS a pórusokon keresztül a sejtbe áramlik, majd hirtelen lehűtést követően bennreked (Asif et al., 2017).

Elektroporáció

Az elektroporáció széleskörben alkalmazott technika, mellyel a hősokekknél hatékonyabb DNS-felvétel érhető el akár nehezen transzformálható non-modell szervezeteknél is; a virális transzdukciónál azonban egyszerűbb a kivitelezése. Hátránya, hogy elektroporátor készüléket igényel. Rövid elektromos impulzus hatására reverzibilisen pórusok jönnek létre az elektrokompetens sejtek foszfolipid-kettősrétegén; a megváltozott elektromos potenciálú plazmamembrán egy pillanatra átjárhatóvá válik az inszert számára (Shigekawa & Dower, 1988).

2.4.8. Expresszió

Heterológ expresszió

A heterológ expresszió közkedvelt módja a különböző funkcionális enzimek magasabb hozamú és jobb aktivitású előállítására. Ennek oka a heterológ szervezet költségghatékony és egyszerű tenyésztetősége; a sejteltárást és a tisztítást megkönnyítő élettani jellemzők; az expresszió irányíthatósága stb. Rekombináns fehérjék heterológ expressziójához gyakran alkalmazzák az *E. coli* különböző rekombináns törzseit. Hatékonyan lehetséges velük a rekombináns fehérjék oldott állapotú felhalmozása, membránon belüli-, ill. sejt felszíni akkumulációja, valamint az extracelluláris térbe való szekréciója (Martínez-Espinosa, 2019; Harris & Emtage, 1986; Jia & Jeon, 2016; Gileadi, 2017).

Homológ expresszió

Ha a donor- és a recipiens szervezet között túl távoli a rokoni kapcsolat, előfordulhat, hogy a rekombináns fehérje nem képes kialakítani a helyes működéshez sokszor elengedhetetlen natív konformációt a poszttranszkripciós és poszttranszlációs módosítások eltérő koreográfiája miatt. A hibás térszerkezetű fehérjék ilyenkor vagy áldozatul esnek a sejt proteolitikus rendszerének és metabolizálódnak, vagy aggregálódnak és hidrofób, ún. inklúziós testeket képeznek (Georgiou et al., 1996). A rekombináns fehérje termelésének és aktivitásának optimalizálása érdekében egy, a donor szervezettel azonos nemzetségbe tartozó, azzal magasabb fokú genetikai homológiát mutató recipiensben is expresszáltattuk a transzsgént. Számos okból indokolt lehet a homológ expresszió. Masłowska-Górnicz munkatársaival (2022) több ezer baktérium preferált kodonhasználatát hasonlította össze, melynek eredményeképpen szignifikáns különbségekre bukkant a különböző rendszertani kategóriák között. Összefüggést találtak többek között a *Burkholderiale* és az *Enterobacteriale* rendek szignifikánsan különböző kodonhasználatára és genomjaik GC-tartalma között (Masłowska-Górnicz et al., 2022).

2.4.9. Citotoxicitás vizsgálata *Aliivibrio fischeri*-vel

Az *A. fischeri* egy szubtrópusi tengerekben szabadon vagy tintahalakkal szimbiózisban élő baktérium. Megfelelő sejtsűrűség *quorum sensing* érzékelésekor biolumineszcens aktivitást mutat. Fénykibocsátásért a *lux* operonban kódolt, kékeszöld fényt emittáló luciferáz enzim felel. A luciferáz expresszióját számos külső és belső stressz dóziszfüggő mértékben gátolja, ezért széleskörűen alkalmazzák különböző anyagok akut (30 perc) és krónikus (25 óra) citotoxicitásának meghatározására. A tesztorganizmus sejtjei a toxikáns különböző koncentrációival egyazon cellába kerülnek, majd a mérőműszer a kibocsátott fény intenzitásától függően meghatározza a citotoxicitás mértékét (Háhn et al., 2017).

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Bakteriális törzsek és tenyésztésük körülményei

A kísérletet megelőzően 3 másik potenciális homológ expressziós szerkezetet fontolóra vettünk, melyek a *Cupriavidus yeoncheonensis* JCM 19890^T, a *C. gilardii* JCM 11283^T és a *C. oxalaticus* JCM 11285^T törzsek voltak. Ezen törzsek természetes OTA-bontó kapacitása szintén csekélynek mutatkozott az ÖR16 törzshöz képest Al-Nussairawi et al. (2020) kísérletében. Agarlemezen végzett antibiotikum-szenzitivitási tesztek során bebizonyosodott, hogy az expressziós vektoron hordozott kanamicin-rezisztenciával eleve rendelkeznek, így ez a tulajdonság nem lehet a transzformánsok szelekciójának alapja. A *C. plantarum* BCCM/LMG 26296^T azonban amellet, hogy OTA-bontó kapacitása elhanyagolható, érzékeny kanamicinre, így sikeres transzformáció esetén, a szerzett *KanR* expressziója révén szelektálható. A munka során használt baktériumokat és tenyésztésükre vonatkozó információkat a 3. táblázat listázza. Minden általunk használt baktériumot LB médiumon tenyésztettünk.

3. táblázat. A felhasznált baktériumok listája.

Törzs	Tenyésztési hőmérséklet	Származás
<i>Cupriavidus basilensis</i> ÖR16	28°C	Mezőgazdasági és Ipari Mikroorganizmusok Nemzeti Gyűjteménye (NCAIM B.02487)
<i>Cupriavidus plantarum</i> BCCM/LMG 26296 ^T	28°C	Belgian Coordinated Collections of Microorganisms (BCCM)
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	37°C	Thermo Fisher
<i>E. coli</i> TOP10	37°C	Thermo Fisher
<i>E. coli</i> DH5α (vektorhordozók)	37°C	Thermo Fisher

Tároláshoz 24 órás sejtsuszpenziót készítettünk, melyet 30%-os glicerollal 1:1 arányban steril kriocsövekbe mértünk, majd -80°C-os fagyasztóba helyeztük.

3.1.1. Tenyésztési tápközegek

A sejtek tenyésztéséhez használt tápközegek és elkészítésükhöz szükséges komponensek listája a 4. táblázatban olvasható.

4. táblázat. Az alkalmazott tenyésztési tápközegek és összetételük.

Tápközeg megnevezése	Komponens	Mennyiség [g/L]	Egyéb jellemzők
LB tápleves	tripton	10	pH 7
	NaCl	10	
	élesztőkivonat	5	
LB táptalaj	agar-agar	15	pH 7
	tripton	10	
	NaCl	10	
	élesztőkivonat	5	
Super Optimal Catabolite repression (SOC) broth – transzformációt követő regeneráló oldat	tripton	20	pH 7
	élesztőkivonat	5	
	NaCl	0,5	
	KCl	0,186	
	glükóz	1 M	
	MgCl	2 M	

Inokuláció előtt a tápközegeket autoklávban sterilizáltuk 121°C-on, 1,05 bar nyomáson, 30 percen keresztül. A hősterilizált SOC médiumhoz utólag mértük hozzá a 20 mL membránszűrővel sterilizált 1 M glükózoldatot annak hőlabilitása miatt, továbbá 5 mL autoklávban sterilizált 2 M MgCl-oldatot.

3.2. Reagensek

A *E. coli* TOP10 és BL21(DE3) sejtjeit rubídium-kloridos (RbCl) kezeléssel hoztuk létre. Az ehhez használt reagensek összetételét az 5. táblázat tartalmazza.

5. táblázat. Az reagensek listája és összetétele.

Reagens megnevezése	Komponens	Bemért mennyiség [g]	Végső koncentráció
RF1	RbCl	1,210	100 mM
	MnCl ₂ · 4 H ₂ O	0,990	50 mM
	K-acetát	0,294	30 mM
	CaCl ₂ · 2 H ₂ O	0,148	10 mM
	glicerol	15	15% w/V

	Milli-Q (MQ) víz	jelig tölteni (100 mL)	
RF2	RbCl	0,06	10 mM
	3-(<i>N</i> -morpholino) propán szulfonsav (MOPS)	0,105	10 mM
	CaCl ₂ · 2 H ₂ O	0,55	75 mM
	glicerol	7,5	15% w/V
	MQ víz	jelig tölteni (50 mL)	

Összeállítást követően az RF1 reagens kémhatását 0,2 M ecetsavval pH 5,8-ra, az RF2-ét 1 M-os NaOH-dal pedig pH 6,8-ra állítottuk. Mindkét oldatot szűrőssel sterilizáltuk.

A DNS fluoreszcens jelöléséhez használt reagens etídium-bromid (EtBr) volt (VWR International).

3.2.1. Enzimek

Az enzimreakciókhoz szükséges enzimek és főbb jellemzőik a 6. táblázatban olvashatók.

6. táblázat. Az enzimreakciókhoz szükséges enzimek listája.

Enzim neve	Megjegyzés	Gyártó
DNS-polimeráz		
Phusion High-Fidelity (HF) DNS-polimeráz	Mg ²⁺ kofaktort igényel	Thermo Fisher Scientific
Restriktációs endonukleáz		
EcoRV	CpG metiláció-érzékeny; tompá vég; $\begin{array}{c} \blacktriangledown \\ 5' \dots GATATC \dots 3' \\ 3' \dots CTATAG \dots 5' \\ \blacktriangle \end{array}$	Thermo Fisher Scientific
SacI	sóérzékeny (>10 mM); ragadós vég; $\begin{array}{c} \blacktriangledown \\ 5' \dots GAGCTC \dots 3' \\ 3' \dots CTCGAG \dots 5' \\ \blacktriangle \end{array}$	Thermo Fisher Scientific
BamHI	<i>star</i> aktivitás extrém reakció- körülmények között; ragadós vég;	Thermo Fisher Scientific

	$ \begin{array}{c} \blacktriangledown \\ 5' \dots G G A T C C \dots 3' \\ 3' \dots C C T A G G \dots 5' \\ \blacktriangle \end{array} $	
HindIII	ragadós vég; $ \begin{array}{c} \blacktriangledown \\ 5' \dots A A G C T T \dots 3' \\ 3' \dots T T C G A A \dots 5' \\ \blacktriangle \end{array} $	Thermo Fisher Scientific
DNS-ligáz		
T4 ligáz	ATP kofaktort igényel	New England Biolabs

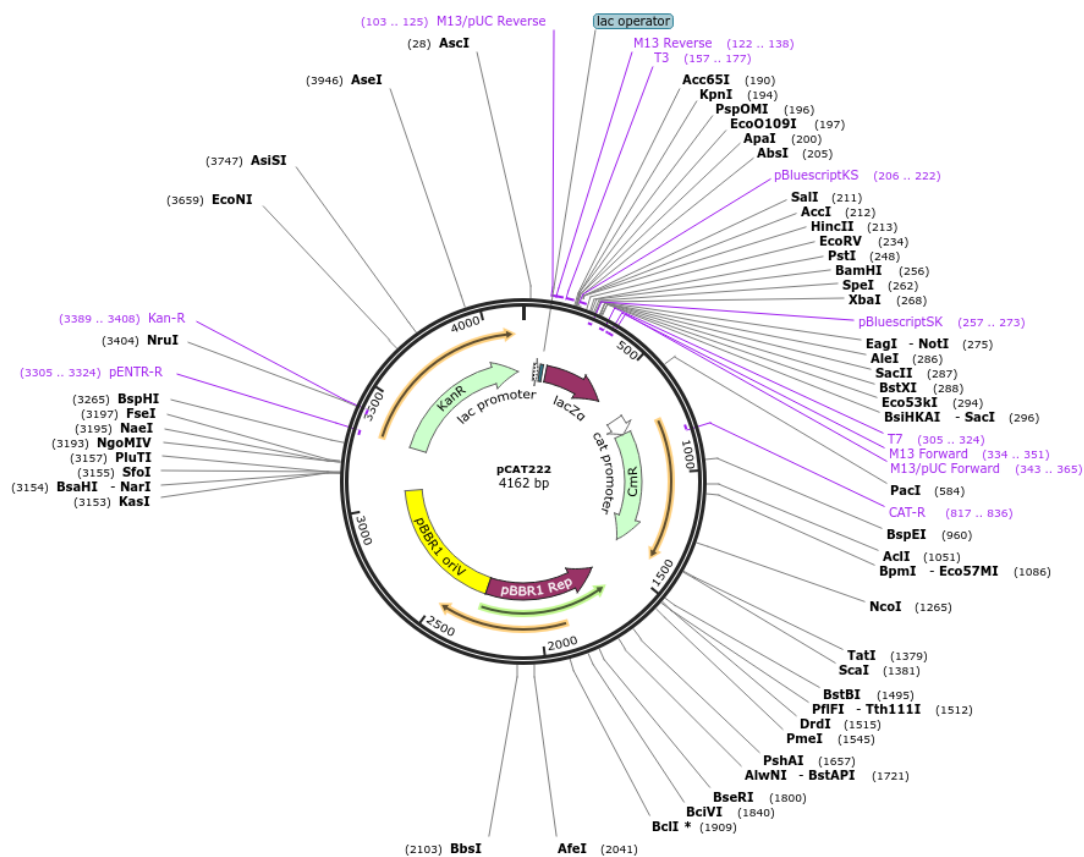
3.2.2. Plazmidkonstrukciók

A klónozás és az expresszió minden esetben bakteriális plazmid eredetű vektorral történt. A felhasznált plazmidok listája a 8. táblázatban olvasható.

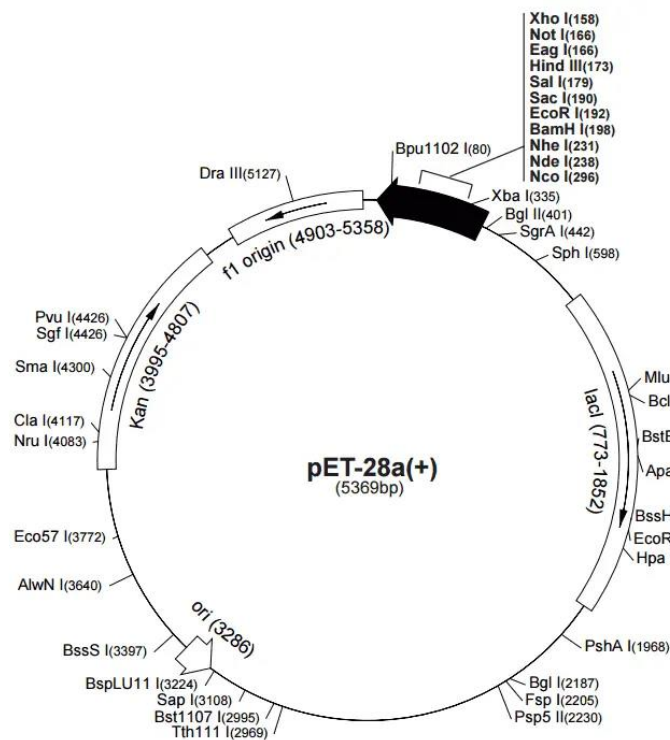
7. táblázat. A felhasznált plazmidvektorok és jellemzőik.

Plazmid	Releváns jellemzők	Szerep	Gyártó
pCAT222	IPTG-indukálható; <i>LacZα</i> ; <i>KanR</i> ;	homológ expresszió	Azubuike et al., 2021
pET-28a(+)	IPTG-indukálható; 6xHis tag; <i>KanR</i>	heterológ expresszió	Novagen
pUC19	IPTG-indukálható; <i>LacZα</i>	kontroll	New England Biolabs

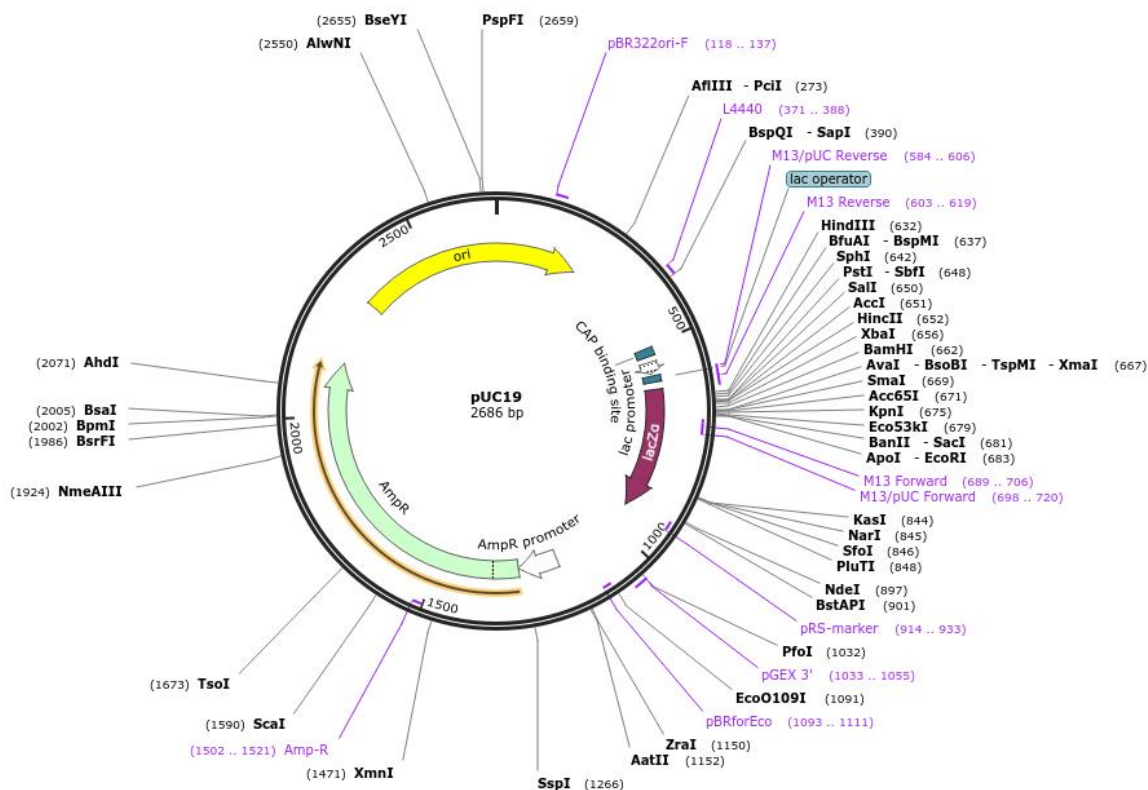
Az egyes plazmidvektorok térképei az 4–6. ábrákon vehetők szemügyre.



4. ábra. A pCAT222 expressziós vektor térképe (SnapGene).



5. ábra. A pET-28a(+) expressziós vektor térképe (web1).



6. ábra. A pUC19 plazmid térképe (SnapGene).

3.2.3. Primerek

A célgén amplifikációjához használt primerpárok felépítése a 8. táblázatban olvasható.

8. táblázat. A primerek szekvenciáinak felépítése.

Primer	Oligonukleotid szekvencia	Restriktációs hasítóhely	Templátspecifikus szekvencia
CPA2_F_EcoRV	5'CGAATTCGATATCATGACCCGCGAACCGAC3'		
CPA2_R_SacI	5'CGAATTCGAGCTCTCAGCCCGCCAGGTAG3'		
CPA2_F_BamHI	5'CGAATTCGGATTCATGACCCGCGAACCGAC3'		
CPA2_R_HindIII	5'CGAATTCAAGCTTTCAGCCCGCCAGGTAG3'		
T7 promoter			5' TAATACGACTCACTATAGGG3'
T7 terminator			5'GCTAGTTATTGCTCAGCGG3'
M13 forward			5'GTAAAACGACGGCCAG3'
M13 reverse			5'CAGGAAACAGCTATGAC3'

A primerek olvadási hőmérsékletére vonatkozó adatok a 9. táblázatban olvashatók.

9. táblázat. A primerek PCR szempontjából lényeges tulajdonságai.

Primer	Méret [bp]	G+C/(A+T) arány [%]	T _m * [°C]	$\bar{x}T_m$ ** [°C]
CPA2_F_EcoRV	30	53	63,6	65,15
CPA2_R_SacI	29	62	66,7	
CPA2_F_BamHI	30	57	66,9	66,15
CPA2_E_HindIII	29	55	65,4	

A szekvenáló PCR-hez M13 és T7 primereket használtunk.

3.2.4. Tisztításhoz és izoláláshoz használt kitek

A célgén és a vektorok tisztítása és izolálása különböző kereskedelmi forgalomban elérhető kitek felhasználásával történt. Ezek listája a 10. táblázatban olvasható.

10. táblázat. A DNS izolálásához és tisztításához használt kitek leírása.

Kit megnevezése	Funkció	Gyártó
QIAquick PCR Purification Kit	PCR-termék tisztítása (0,1–10 kb méretű dsDNS vagy ssDNS fragmentekhez)	Qiagen
Monarch DNA Gel Extraction Kit	dsDNS tisztítása agaróz gélből	New England Biolabs
DNeasy UltraClean Microbial Kit	genomi DNS (gDNS) extrakciója	Qiagen
Geneaid High Speed Plasmid Mini Kit	plazmid izolálása transzformált sejtekből	Geneaid

3.3. Módszerek

3.3.1. Donor szervezet genomi DNS-ének izolálása

A *C. basilensis* ÖR16 donorszervezetből LB táptalajon, 28°C-os hőmérsékleten inkubálva telepeket növesztettünk fel. A sejtek gDNS-ét a DNeasy UltraClean Microbial Kit protokollját követve vontuk ki. A gDNS izolátum 1 µL-éből spektrofotométerrel (Nanodrop One Spectrophotometer, Thermo Fisher) határoztuk meg a DNS-koncentrációt. A következő lépésig -20°C-on tároltuk.

3.3.2. Célgén amplifikációja

A CPA2 gén PCR amplifikációjához reakcióelegyet állítottunk össze a 11. táblázatban foglaltaknak megfelelően. A minta és a kontroll végtérfogata 50 μL volt.

11. táblázat. A célgén amplifikációjához szükséges PCR-reakcióelegy összeállítása.

Komponens		Mennyiség [μL]
MQ víz		31
5X Phusion puffer		10
primerek	F	2,5
	R	2,5
dimetil-szulfoxid (DMSO; 100%)		1,5
dNTP (10 mM)		1
gDNS (100 ng/ μl)		1
Phusion HF DNS polimeráz		0,5

A reakció pontos paraméterei a 12. táblázatban olvashatók.

12. táblázat. A PCR-ciklus paraméterei.

PCR szakasz		Hőmérséklet [$^{\circ}\text{C}$]	Időtartam [s]	Ciklusszám [db]
Elődenaturáció		98	30	1
Denaturáció		98	10	40
Annelálás	CPA2_F_EcoRV CPA2_R_SacI	65	30	
	CPA2_F_BamHI CPA2_R_HindIII	66	30	
	M13	55	30	
	T7	50	30	
Láncextenzió		72	30	
Tartás		72	420	1
Hűtés		4	∞	—

A reakció befejeztével meghatároztuk az ampikon DNS-koncentrációját és agaróz gélelektroforézissel vizualizáltuk a várt méretű fragmenteket. Az agaróz gélelektroforézishez előzőleg 1%-os agaróz gél készítettünk 1x TBE pufferrel, melyhez 5 μL /100 mL EtBr

fluoreszcens interkalálószerrel adtuk. A minták 3 µL-ét 20 percig 120 V feszültség alatt futtattuk horizontális kádban.

3.3.3. Restriktions emésztés

A vektorok restriktions hasítása FastDigest protokoll szerint történt. Plazmid DNS esetén 20 µL, PCR termék esetén 30 µL végtér fogatú mintákat készítettünk. A reakcióelegyek összetétele a 13. táblázatban olvasható.

13. táblázat. A FastDigest restriktions hasítás reakcióelegyének komponensei.

Komponens		Mennyiség [ul]	
		Plazmid DNS	PCR termék
Nukleázmentes víz		14	16
10X FastDigest Green Buffer		2	2
DNS		2	10
FastDigest enzim	EcoRV + SacI	1+1	1+1
	BamHI + HindIII	1+1	1+1

A mintákat gyengéden homogenizáltuk, majd 15 percre 37°C-os termosztátba helyeztük. Az inkubációt követően agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük a különböző méretű DNS-fragmentek számát, hosszát. A DNS létra segítségével azonosítottuk azt a méretet, amely a megfelelő plazmid fragmentet jelöli. Ennek kivágása és tisztítása a Monarch Spin DNA Gel Extraction Kit (New England Biolabs) protokollja szerint zajlott. A hasított, tisztított DNS-t a következő lépésig -20°C-on tároltuk.

3.3.4. Rekombináns DNS létrehozása ligálással

Az inszertet és a plazmidot az ATP-igényes T4 ligázzal (New England Biolabs) ligáltuk a New England Biolabs T4 ligáz protokollját követve. A reakcióelegy összetételét a 14. táblázat listázza. A reakcióhoz mintánként 20-100 ng, hasított, tisztított plazmid DNS-re volt szükség, melyhez 3:1 arányban került inszert. A reakcióter fogatot nukleázmentes vízzel 20 µL-re egészítettük ki.

14. táblázat. A T4 ligáz reakcióelegyének összeétele.

Komponens		Mennyiség
DNS	vektor	50 ng

	inszert	37,5 ng
T4 DNA Ligase Buffer (10X)		2 μ L
T4 ligáz		1 μ L

A mintákat szobahőmérsékleten inkubáltuk fél órán keresztül.

3.3.5. Kémiaailag kompetens *E. coli* TOP10 és BL21(DE3) sejtek létrehozása

Transzformáció előtt RbCl-os kezeléssel kompetens sejteket hoztunk létre az klónozó törzsből. Előzőleg *overnight* tenyészetet hoztunk létre LB táptalajon, 37°C-on inkubálva. A felnőtt telepekkel 5 mL LB táplevest oltottunk be, melyet 37°C-on, 300 rpm sebességen rázatva inkubáltunk. A levestenyészet 3 mL-ét átoltottuk 100 mL LB táplevesbe, melynek kiindulási OD₆₀₀ értéke 0,05 volt, a korábban említett paraméterek szerinti inkubálását követően pedig ennek tízszerese. A 0,5-ös turbiditást elért tenyészetet steril Falcon-csővekbe osztottuk szét, melyeket aztán 4°C-on, 10 percen keresztül 4000 rpm sebességgel centrifugáltunk. A pelletet a felülúszó eltávolítása után gyengéd mozdulatokkal 33 mL RF1 reagensben reszuszpendáltuk, majd 1 órás jégen való inkubációt követően a korábbi paramétereket alkalmazva centrifugáltuk. A pelletet ezúttal 8 mL RF2 reagensben igen gyengéden reszuszpendáltuk. 15 perc jégen való inkubációt követően előhűtött, jégen tárolt Eppendorf csövekbe mértünk 220 μ L sejszuszpenziót. A kompetens sejtek ez követően N₂-ben fagyasztottuk le, hogy ezzel elkerüljük a fagyasztó lassú hőátadásával járó jégkristály-formációt. A csöveket azonnal -80°C-os fagyasztóba helyeztük.

3.3.6. *E. coli* TOP10 és BL21 (DE3) transzformációja hősokkal

50 μ L jégen felengedett kompetens sejthez 5 μ L rekombináns plazmidot adtunk, szuszpendáltuk, majd 20 percig jégen inkubáltuk. Inkubációt követően 20 másodpercre 42°C-os hősokknak tettük ki, majd pár percig jégen hűtöttük. Végül 450 μ L, 37°C-ra előmelegített SOC tápoldatot adtunk a hősokkolt sejtekhez (Hanahan, 1983). A transzformált sejteket 37°C-on, 300 rpm rázási sebesség mellett 1 órán keresztül inkubáltuk. 100 μ L inokulummal 100 mg/mL kanamicin-tartalmú LB táptalajt oltottunk be a transzformánsok rezisztencia-alapú szelekciójához.

3.3.7. Az újonnan létrehozott expressziós plazmidok ellenőrzése

A klónozó vektorban amplifikált rekombináns DNS-t a megfelelő restrikciós enzimekkel (lásd: 4.4.) a 6.3. pontban tárgyalt FastDigest protokoll szerint emésztettük. A szekvenáláshoz tisztító

PCR-rel, univerzális M13 és T7 primerekkel amplifikáltuk a kérdéses szakaszokat. Ennek paraméterei a 12. táblázatban olvashatók.

3.3.8. OTA bontási kísérlet

5 mL starter kultúrát növesztettünk az adott törzsnek megfelelő inkubációs hőmérsékleten (3. táblázat), amíg turbiditásuk el nem érte az OD₆₀₀ 1,0-et. Ekkor a sejtszuszpenzió 300 µL-ével 30 mL, 1 ppm OTA-t tartalmazó LB tápoldatot oltottunk be. Kísérleti beállításonként (15. táblázat) 3 párhuzamos mintát készítettünk. Mintavétel a 0. és a 24. órában történt.

15. táblázat. Az OTA-biodegradáció HPLC-s meghatározásához készített minták kísérleti beállításai.

Termelő szervezet	OTA (1 ppm)	IPTG (100 mM)
ŐR16	✓	—
BL21(DE3)_pET-28a(+)_CPA2	✓	✓
LMG 26296 ^T _pCAT222_CPA2	✓	✓

3.3.9. Bomlástermékek detektálása HPLC-vel

Elválasztástechnikában a Kertészettudományi Intézet kutatójához, Dr. Hussein G. Daoodhoz fordultunk. Az alábbi (7. ábra) HPLC berendezéssel végezte el mintáink folyadékkromatográfiás elválasztását.



7. ábra. A HPLC (Hitachi Chromaster) berendezés.

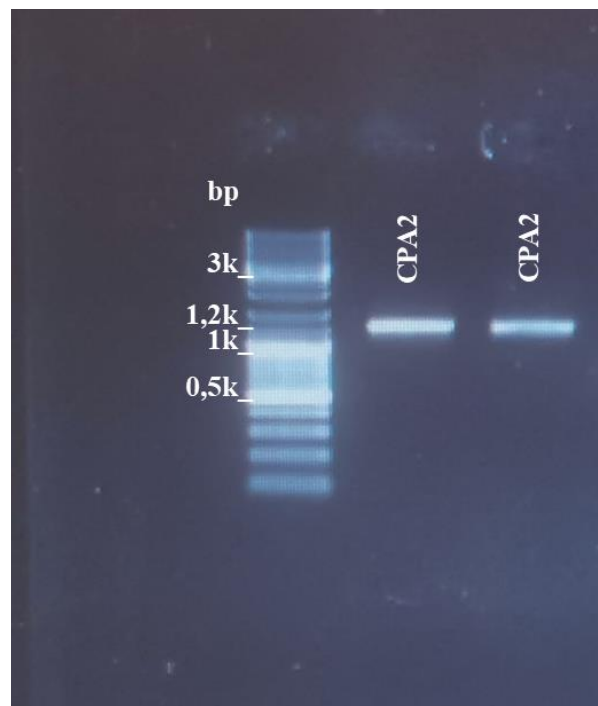
3.3.10. Krónikus *A. fischeri* citotoxicitási teszt

A kezeletlen OTA citotoxicitását krónikus, 25 órás kontaktidejű *A. fischeri* biolumineszcencia-gátlási kísérlettel igazoltuk, melyet Dr. Háhn Judit, az Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézet tudományos főmunkatársa vezényelt le kérésünkre. A biolumineszcencia-értékek (fotonbecsapódás/másodperc, CPS) felvétele a 0., 0,5., 3,5., 5., 10., 15., 18. és 25. órában történt.

4. EREDEMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

4.1. Izolált és PCR-amplifikált CPA2 inszert

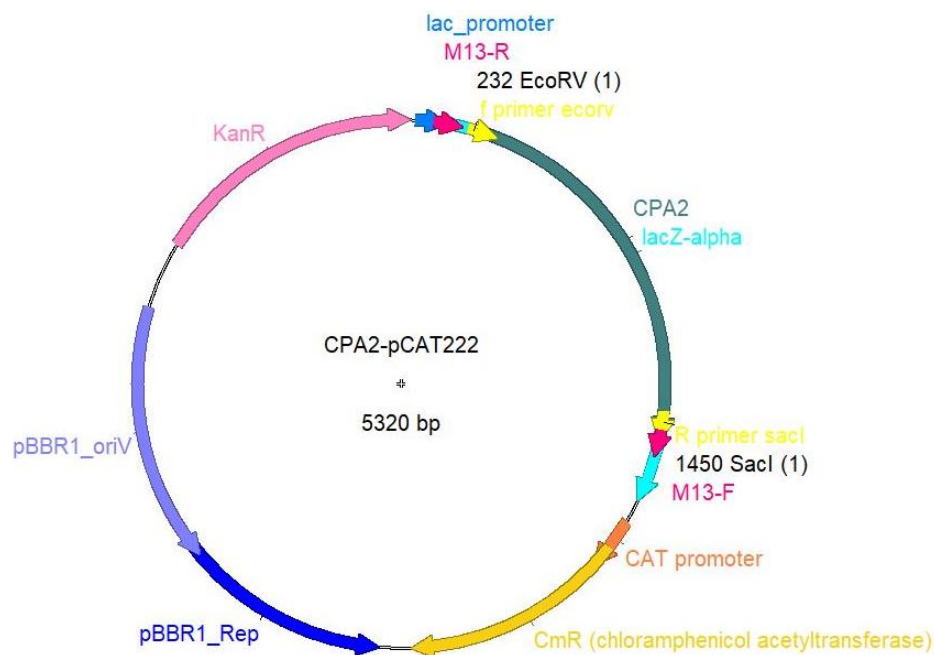
Kísérleteink első lépéseként a transzkriptoma analízis alapján kiválasztott CPA2 gént sikeresen felszaporítottuk az általunk tervezett primer párral, majd kitisztítottuk. Az agaróz gélben megfuttatott minta kicsivel a DNS-létra 1200 bp méretű fragmentje fölött helyezkedik el, ami megfelel a várt fragmentméretnek. (8. ábra).



8. ábra. Az ŐR16 gDNS-éből amplifikált CPA2 gén agaróz gélben (1%-os, EtBr-festett agaróz gél, futtatási paraméterek: 120 V, 20 perc)

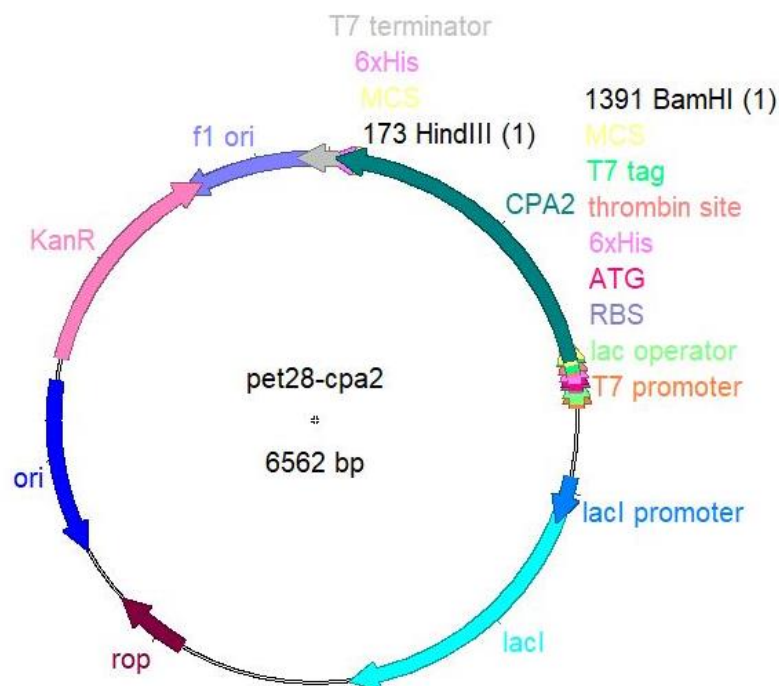
4.2. Rekombináns DNS-konstrukciók létrehozása

Ezt követően a CPA2 inszert és a hasított vektor ligálásával létrehoztuk a pCAT222_CPA2 rekombináns plazmidot, mellyel később a homológ expressziót végeztük. Térképe a 9. ábrán látható.



9. ábra. A rekombináns pCAT222_CPA2 plazmid térképe.

Ezzel párhuzamosan a restrikciós emésztés során kivágtuk a pET-28a(+) 173 és 1391. bp-ja közötti szakaszt, helyére pedig T4 ligázzal beépítettük a CPA2 inszertet. Így jött létre a rekombináns pET-28a(+)_CPA2 plazmid, melyet a heterológ expresszióhoz használtunk és melynek térképe a 10. ábrán látható.

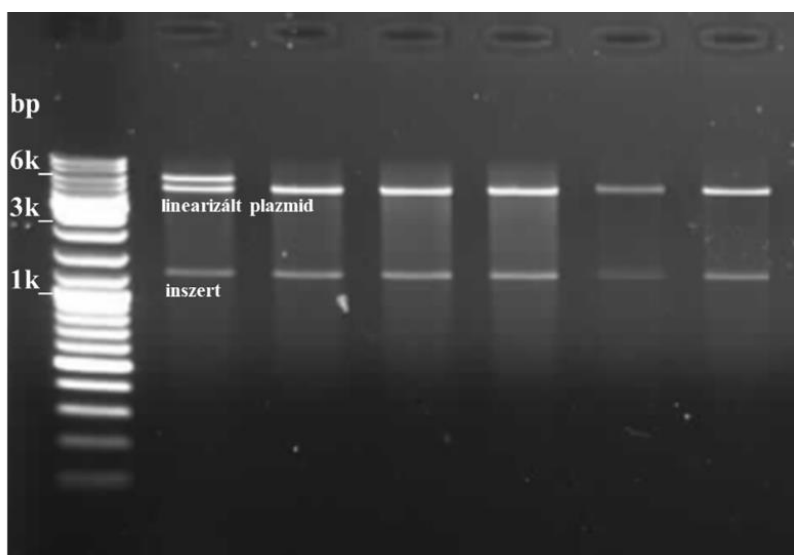


10. ábra. A rekombináns pET-28a(+)_CPA2 plazmid térképe.

4.3. Az újonnan létrehozott expressziós plazmidok ellenőrzése

4.3.1. Restriktációs hasítással létrehozott fragmentek

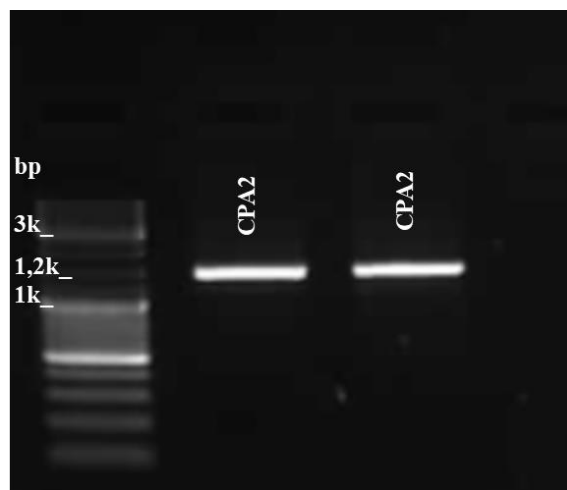
Az elkészült plazmidokat első lépésként *E.coli* TOP10 sejtekbe transzformáltuk. Igazolni szeretnénk volna, hogy az inszert beépülése mutáció nélkül történt, ezért az amplifikált transzgénre specifikus restriktációs enzimpárral hasítottuk ki a plazmidból, hogy a kapott fragmentek mérete és száma alapján ellenőrizzük az inszerciót. A DNS-fragmentek gélképe a 11. ábrán látható. Az első mintát leszámítva a fragmentméretek megfelelnek a vártaknak, az első minta esetében valószínűleg túl magas volt a plazmid-koncentráció, így az emésztetlen plazmid DNS-t is látjuk.



11. ábra. Restriktációs hasítással létrehozott inszert és plazmid fragmentek (1%-os, EtBr-festett agaróz gél, futtatási paraméterek: 120 V, 20 perc).

4.3.2. Szekvenáló PCR-rel amplifikált inszert

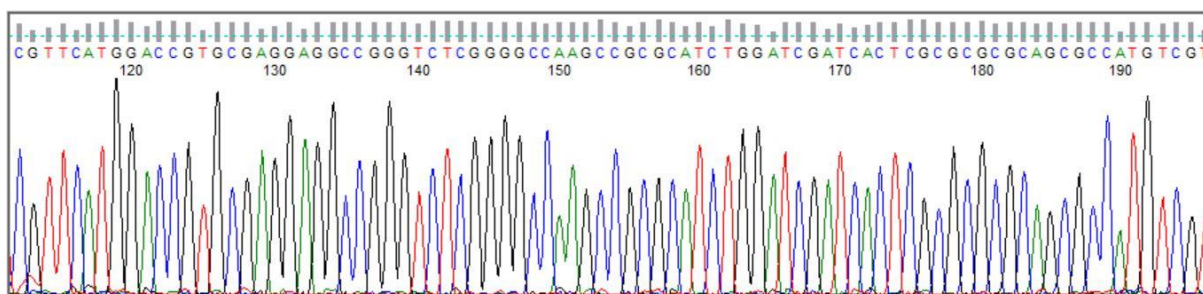
Ezzel párhuzamosan a plazmidra specifikus M13 (pCTA222_CPA2) és T7 (pET28_CPA2) primerekkel felsokszoroztuk az inszertet későbbi szekvenálás céljából. A tisztított inszert gélképe a 12. ábrán látható.



12. ábra. A plazmidra specifikus M13 primerrel készült fragment képe, mely tartalmazza a CPA2 célgén (1%-os, EtBr-festett agaróz gél, futtatási paraméterek: 120 V, 20 perc).

4.3.3. A CPA2 gén ellenőrzése plazmid konstrukcióban szekvencia analízissel

A CPA2 gén helyes, in/del mutációktól mentes inszercióját az expressziós plazmidba való integrációjának helyén, nukleotidonként, Sanger-szekvenálással ellenőriztük. A csúcsok tiszták, egyértelműek. A szekvenáló kromatogram egy részlete a 13. ábrán látható. A szekvenciaanalízis alapján kiválasztottuk azt a konstrukciót, melynél a célgén helyesen, mutációmentesen épült be.



13. ábra. Sanger-szekvenálással készült kromatogram a CPA2 inszert plazmidba való integrációjának helyéről.

4.4. Transzformások

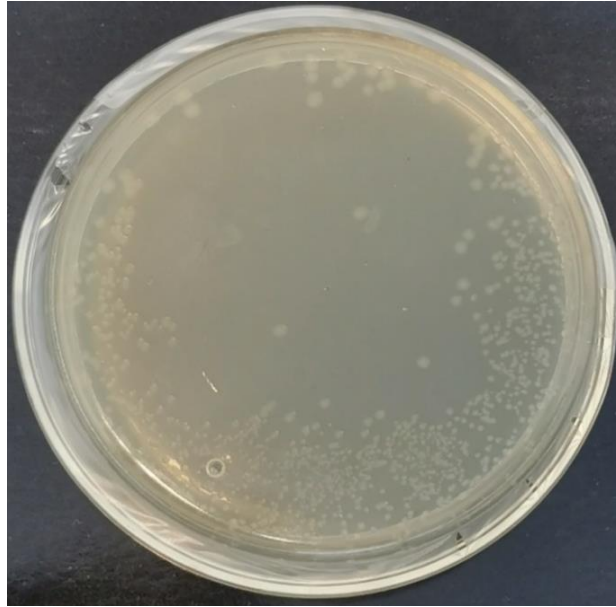
4.4.1. Elektrokompens *C. plantarum* sejtek létrehozása

Az Azubuike és mtsai. (2021) által *C. necatorra* alkalmazott, jéghideg glicerolos kompetens sejt-készítés-, ill. elektroporációs transzformáció protokolljának *C. plantarum*-ra optimalizált verzióját elsőként valósítottuk meg ezen a fajon. Előzőleg LB táptalajon telepeket növesztettünk fel 28°C-on. 48 óra elteltével egy telepet 5 mL LB táplevesbe oltottunk át, majd

30 °C-on, 12 órán át inkubáltuk 300 rpm rázási sebesség mellett. Másnap ennek 500 µL-ét 250 mL friss LB táplevesbe oltottuk át, majd 28°C-on, 200 rpm rázatás közben inkubáltuk addig, míg turbiditása el nem érte az OD₆₀₀ 0,4–0,8 intervallumot. Ezután 10 percig jégen hűtöttük, majd 4°C-on 4000 × g erősségű centrifugálással elválasztottuk a fázisokat. A sejteket kétszer 50 mL jéghideg 10%-os glicerollal mostuk át. A mosási lépések között 15 percig jégen hűtöttük, majd 3000 × g-vel, 4°C-on centrifugáltuk. A sejteket 1 mL 10%-os steril glicerolba vettük fel és előhűtött, 1,5 mL-es centrifugacsövekbe 50 µL-ekre osztottuk szét. A sérülékeny kompetens sejtek pillanatnyi lehűtését ekkor N₂-nel oldottuk meg, hogy ezzel elkerüljük a fagyasztó lassú hőátadásával járó jégkristály-formációt, mely kárt tehetett volna bennük. Ezután azonnal -80°C-os hűtőbe tettük.

4.4.2. *C. plantarum* elektroporációs transzformációja pCAT222_CPA2-vel

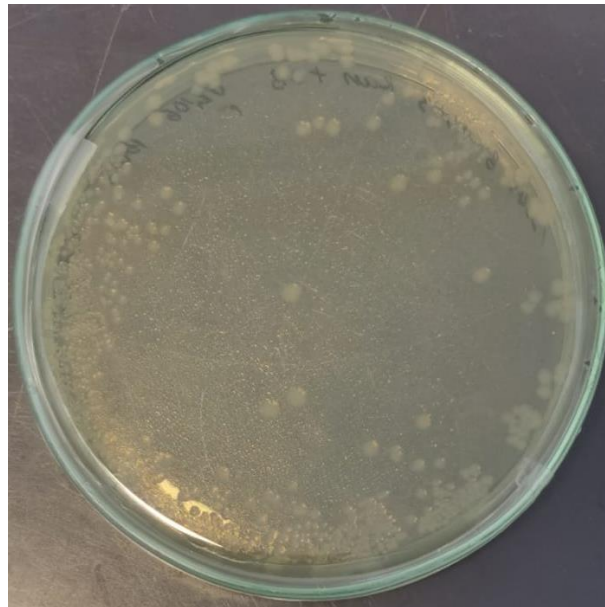
A *C. necator*-ról (Azubuike et al., 2021) *C. plantarum*-ra optimalizált elektroporációs transzformáció protokollját a következő lépésekben ismertetem. A jégen felolvasztott, kompetens LMG 26296^T sejtek 50 µL-éhez 5 µL rekombináns pCAT222_CPA2 plazmidot adtunk, majd gyengéd homogenizációt és 15 perc jégen tárolást követően előhűtött küvettába mértük. Az elegyet Gene Pulser Xcell Electroporation System (Bio-Rad) elektroporátor berendezésben sokkoltuk 2,5 kV feszültséget, 25 µF kapacitást és 200 Ω ellenállást alkalmazva. A sejteket ezután 450 µL 30°C-ra előmelegített SOC táplevessel öntöttük fel. 2 órán keresztül, 30°C-on, 300 rpm rázási sebesség mellett regeneráltattuk őket. 100 µL sejtszuszpenziót 30°C-ra előmelegített, 100 mg/mL kanamincin-tartalmú szelekciós LB táptalajokra szélesztettünk, majd 30°C-on 48 órán keresztül inkubáltuk. A *C. plantarum* sejtei sikeresen felvették a rekombináns pCAT222 plazmidot, transzformáns telepei azonosíthatók voltak kanamicin-tartalmú LB táptalajról (14. ábra).



14. ábra. A *C. plantarum* BCCM/LMG 26296T transzformáns telepei 100 mg/mL kanamicin-tartalmú LB táptalajon.

4.4.3. *E. coli* transzformációja pET-28a(+)_CPA2-vel

A kompetens BL21(DE3) sejtek sikeresen felvették a rekombináns plazmidot. A *KanR* gént expresszáló transzformánsok azonosíthatók voltak a szelekciós médiumról (15. ábra).

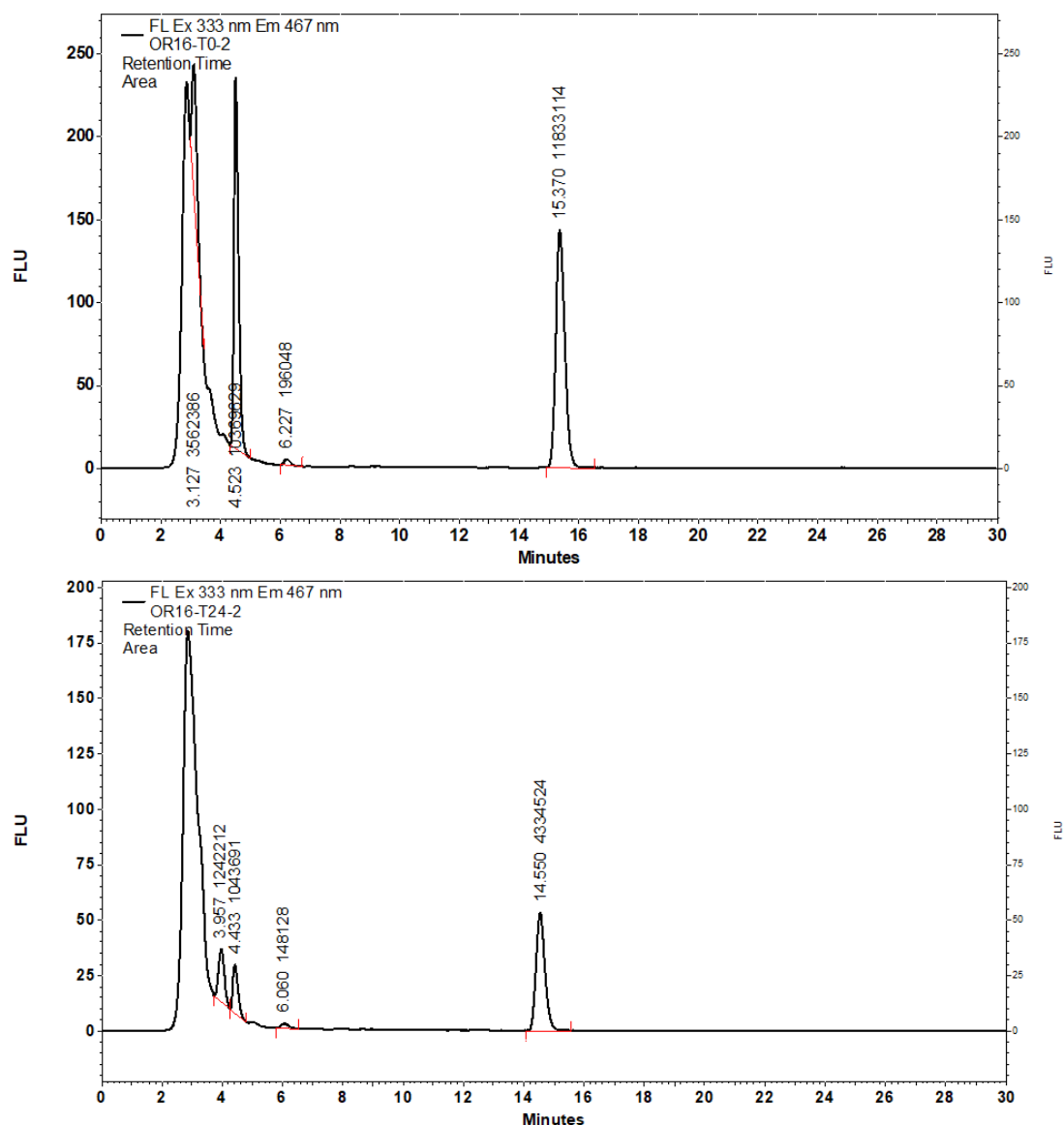


15. ábra. Az *E. coli* BL21(DE3) transzformáns telepei 100 mg/mL kanamicin-tartalmú LB táptalajon (24 óra inkubáció, 37°C).

4.5. CPA2 OTA-bontó kapacitásának vizsgálata

4.5.1. Natív ÖR16 CPA2

Az OTA-kezelt ÖR16 törzs sejtmentes fermentlevének OTA- és metabolittartalma a 16. ábrán látható kromatogramok szerint alakult. A kezdeti OTA-csúcs a 24. órára jelentősen csökkent.

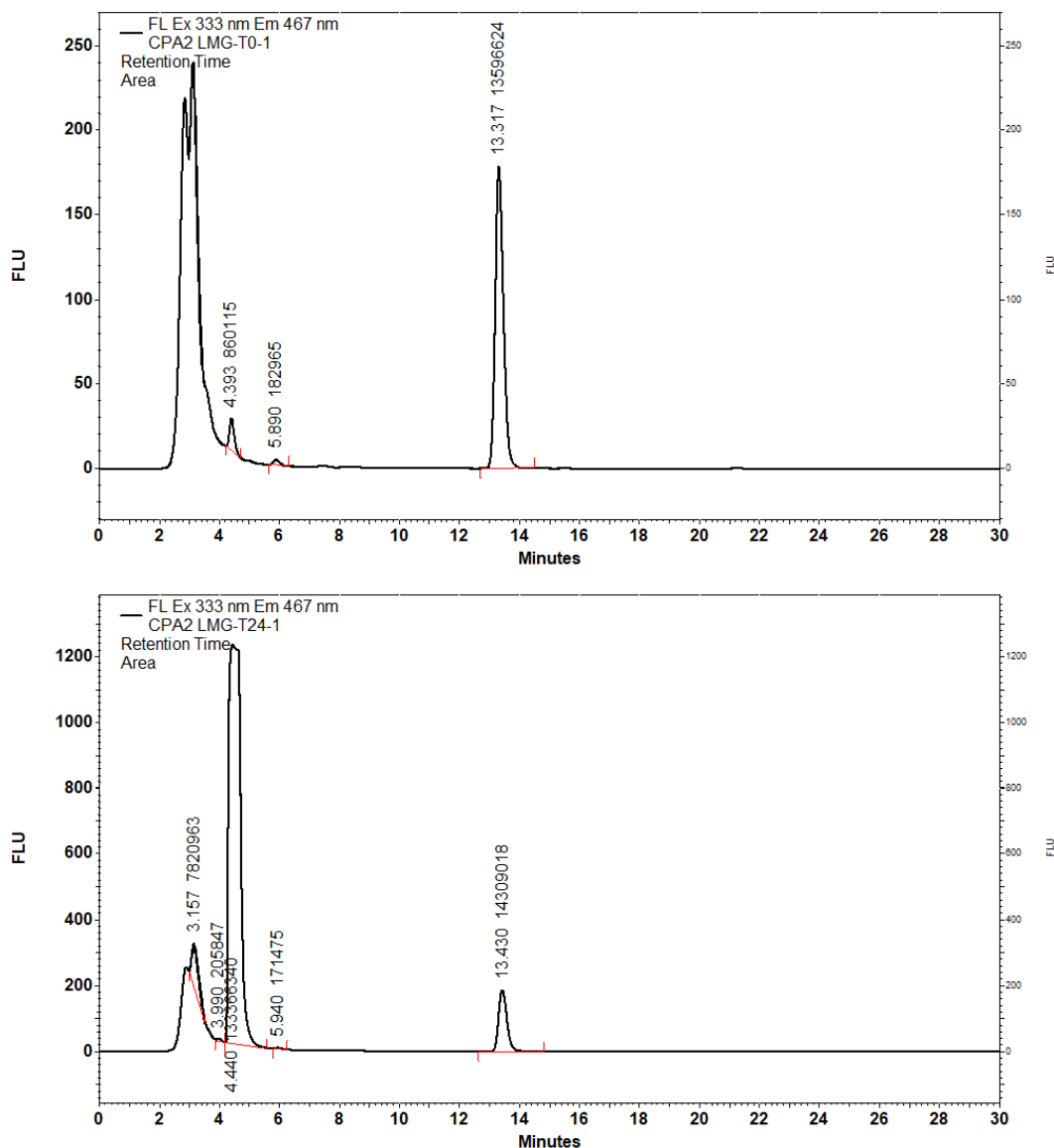


16. ábra. Az OTA ÖR16 általi biodegradációjának vizualizációja HPLC kromatogramon. 0. (felül) és 24. órai (alul) mintavétel. Az első csúcs jellemzően az oldószert jelöli; a 4. perc után jelentkező csúcs a különböző metabolitokat, a 15. perctől megjelenő az OTA-t jelöli.

4.5.2. Homológ expresszált CPA2

A 17. ábra alapján elmondható, hogy a homológ *C. plantarum* BCCM/LMG 26296^T törzsben expresszált CPA2 nem volt képes az OTA degradációjára a vizsgált időszak alatt, a beállított

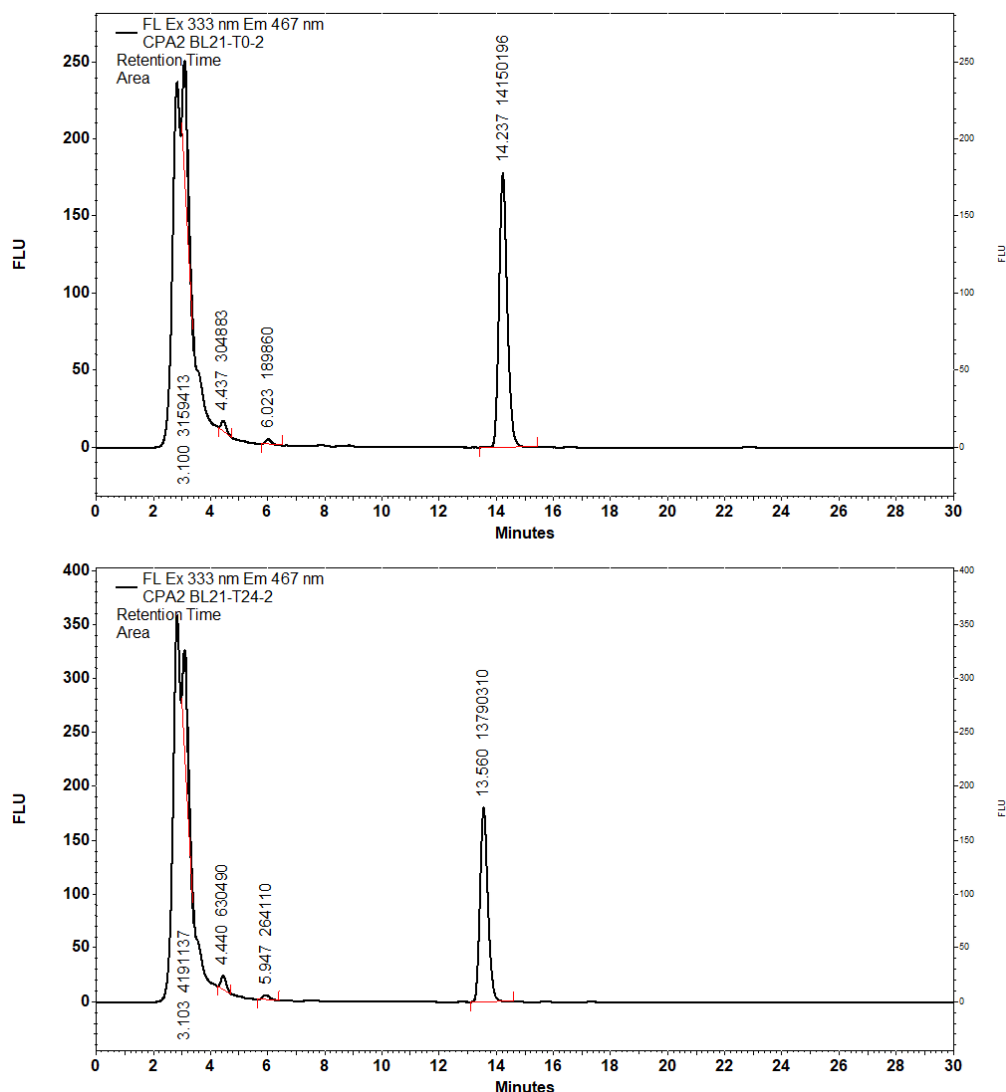
fermentációs paraméterek mellett. A 24. órára felszökő második csúcs azonban valamilyen ismeretlen molekula nagymértékű felhalmozódását jelzi, melyet a többi törzsnél nem tapasztaltunk.



17. ábra. Az OTA alakulása az LMG 26296T_pCAT222_CPA2 sejtmentes fermentlevében, HPLC kromatogramon. 0. (felül) és 24. (alul) órai mintavétel. 0. (felül) és 24. (alul) órai mintavétel.

4.5.3. Heterológ expresszált CPA2

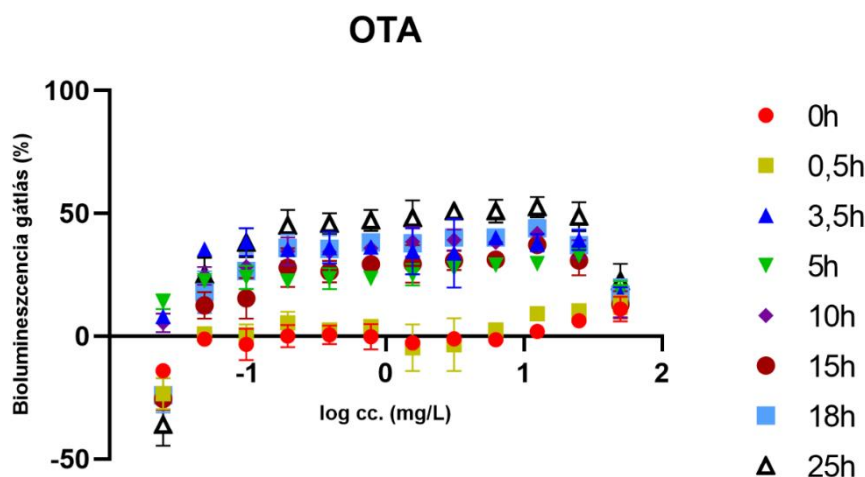
A 18. ábra alapján elmondható, hogy a heterológ *E. coli* BL21(DE3)-ban expresszált CPA2 nem volt képes lebontani a fermentlé OTA-tartalmát a vizsgált körülmények között, valamint egyéb metabolitokat sem halmozott fel.



18. ábra. Az OTA alakulása a BL21(DE3) pET-28a(+)_CPA2 sejtmentes fermentlevében, HPLC kromatogramon. 0. (felül) és 24. (alul) órai mintavétel.

4.5.4. OTA krónikus hatása *A. fischeri* biolumineszcenciájára

A CPA2 OTA-bontásából keletkező bomlástermékek-, valamint magának a fehérjének az ártalmatlanságát később ugyancsak *A. fischeri* biolumineszcencia-gátlási vizsgálattal tervezzük igazolni. Ezen vizsgálat előtt szükséges volt, hogy a tiszta OTA hatását vizsgáljuk. A tiszta inhibitor dóziszfüggő mértékben, a kontaktidővel arányosan gátolta az *A. fischeri* biolumineszcenciáját (19. ábra). A 25. órára a gátlás mértéke megközelítette az 50%-ot. Az 50%-os gátló koncentráció (IC50) értékei a különböző időpontokban eltérően alakulnak. Korai időpontokban az IC50 magasabb (kevesebb gátlás), majd az idő múlásával csökken (a toxikus hatás erősödik). Az x-tengelyen logaritmikus skálán van feltüntetve az OTA-koncentráció, mert így széles koncentráció-tartományokat tudtunk összehasonlítani és ábrázolni.



19. ábra. Az OTA különböző koncentrációinak hatása az *A. fischeri* biolumineszcenciájára a kontaktidő függvényében.

4.6. Eredmények értékelése és javaslatok

Sem a homológ, sem a heterológ törzsben expresszált rekombináns CPA2 karboxipeptidáz enzim nem volt képes az OTA degradációjára az általunk alkalmazott fermentációs körülmények között, ezért a későbbiekben megfontolhatjuk a fermentációs paraméterek optimalizálását. Tudjuk, hogy a CPA2 aktivitását Mn^{2+} kofaktor segíti, azonban erre vonatkozó kísérleti beállítást nem alkalmaztunk, és a tápoldat mangántartalmát sem ismerjük pontosan. A rekombináns *C. plantarum* BCCM/LMG 26296^T sejtmentes fermentlevében egy ismeretlen másodlagos metabolit fokozott felhalmozódását figyeltük meg a HPLC-kromatogramon. Ennek természetét később HPLC-MS/MS-sel tervezzük vizsgálni. Megfontolhatjuk továbbá egy másik homológ expressziós törzs alkalmazását. Tudjuk, hogy a *C. basilensis* ÖR16 OTA jelenlétére expresszáldó génjei különböző mértékben aktiválódtak, így a jövőben egy másik, transzkriptoma analízis során felindukálódott génnel is tervezzük a kísérlet megismétlését. Jelen kísérlet egyik részében az ÖR16 által termelt valamennyi extracelluláris komponens egyszerre lépett kölcsönhatásba az OTA-val, elősegítve annak biodegradációját. Ezzel szemben a transzformált sejtekbe bejuttatott CPA2 gén önmagában valószínűleg nem volt elegendő a hatékony lebontáshoz, feltételezhető, hogy az OTA lebontásához több enzimre van szükség és habár a szakirodalomban többször hivatkoztak a CPA2 gén termékére, mint a OTA lebontás első, kritikus lépését katalizáló enzim. További kísérleteket tervezünk, hogy felfedjük, hogy a szakirodalmi adatok ellenére mégsem a CPA2 gén terméke katalizálja az iniciális lépést. Ennek okán dolgozunk a tisztított CPA2 fehérjetermék létrehozásán, melynek biodegradációs képességét és citotoxicitását a jövőben szintén tesztelni kívánjuk.

5. ÖSSZEFOGLALÁS

Egy korábbi kutatás során az *C. basilensis* ÓR16 törzsön végzett, ochratoxin A indukálta transzkriptomának analízisekor leírt xenobiotikumbontó enzimek közül azt választottuk, mely non-toxikus metabolitokat eredményez, és melynek specifitására (karboxipeptidáz) a legtöbb szakirodalmi példát találtuk mikotoxin-biodegradációs kontextusban. A legtöbb mikrobiális fehérjetermelési gyakorlatnak megfelelően egy könnyen tenyészthető és egyszerű feltárást biztosító, általánosan alkalmazott baktériumot, az *E. coli* BL21(DE3) törzset választottuk a heterológ expresszióhoz. Ugyancsak szakirodalmi példák által megerősítve szükségesnek éreztük egy, a donor szervezettel közelebbi rokonságban álló, szintén *Cupriavidus* faj kiválasztását. A génátvitel szemléltetéséhez a vad típusú homológ törzsnek OTA-bontásra képtelennek kellett lennie, valamint a könnyebbség kedvéért az expressziós vektoron hordozott, szelekciós markerként szolgáló antibiotikumra is szenzitívnek kellett lennie. Így esett a választásunk első körben a *C. plantarum* BCCM/LMG 26296^T törzsre. A heterológ expresszióhoz egy népszerű *E. coli* expressziós vektort, a pET-28a(+) plazmidot választottuk, mely indukálható túlexpresszáltatást és magas fehérjekihozatalt tesz lehetővé. A homológ expresszióhoz egy újonnan megkonstruált, kifejezetten a *Cupriavidus* nemzetség jobb transzformációját célzó plazmid konstrukciót, a pCAT222-t választottuk, mely tartalmaz igazoltan olyan elemeket, melyek elősegítik a plazmid kromoszómától független replikálódását ezáltal biztosan tudjuk, hogy a *Cupriavidus* sejtek képesek felismerni. A rekombináns DNS létrehozásához először *in vitro* amplifikáltuk a CPA2 célgént úgy, hogy tartalmazza a vektor emésztéséhez használt restrikciós enzimek – lehetőleg ragadós végű – hasítóhelyét. Ezeket a primereket mi terveztük a PCR-hez. A linearizált plazmidból és az inszertből ezután T4 ligáz segítségével létrehoztuk a rekombináns DNS-konstrukcióinkat, a pET-28a(+)_CPA2-t és a pCAT222_CPA2-t. Ezeket *in vivo* amplifikáltuk *E. coli* TOP10 klónozó vektorban, hogy a későbbi transzformáció sikerességét növelhessük a magas koncentrációjú DNS-sel. Azt, hogy az inszert sikeresen, in/del mutációktól mentesen beépült a vektorba, az inszerció helyét övező szekvenciák Sanger-szekvenálásával ellenőriztük. Ezután kompetens *C. plantarum* BCCM/LMG 26296^T sejteket hoztunk létre kifejezetten erre a fajra optimalizált protokollal, majd elsőnek hajtottuk végre e törzs pCAT222_CPA2 vektor általi elektroporációs transzformációját. A heterológ expressziós törzs, az *E. coli* BL21(DE3) kompetens sejtjeit RbCl-os protokoll szerint hoztuk létre, majd hősokk segítségével transzformáltuk. Mindkét törzs esetében szerzett kanamicin-rezisztencia alapján voltak azonosíthatók a transzformáns telepek. A transzformánsokat, valamint a transzgén donorját, az ÓR16 törzset ezután OTA-t

tartalmazó rázatott lombikos rendszerben tenyésztettük. A biodegradációs kísérlet végén a sejtmentes fermentleveket HPLC-s vizsgálatnak vetettük alá, hogy meghatározzuk az OTA koncentrációjának alakulását. Végül igazoltuk a kezeletlen OTA biolumineszcencia-gátló hatását *A. fischeri* toxikológiai modellszervezeten.

6. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretném megköszönni konzulenseimnek, Ábrahám Renátának és Dr. Baka Erzsébetnek, amiért egyszerre emlékeztettek a dolgok mélyére ásásának, ugyanakkor a fókusz megtartásának fontosságára. Szeretném továbbá megköszönni Csépanyi Andreának, aki türelemmel vezetett be a tanszéki gyakorlatokba. Köszönöm Dr. Háhn Juditnak és Dr. Hussein G. Daoodnak, hogy szakértelmükkel hozzájárultak a kutatás sikerességéhez. Továbbá szeretném megköszönni a Molekuláris Ökológia Tanszék teljes kollektívájának támogatásukat és az Akvakultúra és Környezetbiztonság Intézet minden dolgozójának, hogy TDK dolgozatomhoz kapcsolódó kutatásokat itt lefolytathattam.

7. IRODALOMJEGYZÉK

- Abrunhosa, L., Paterson, R. R., & Venâncio, A. (2010). Biodegradation of ochratoxin A for food and feed decontamination. *Toxins*, 2(5), 1078–1099. <https://doi.org/10.3390/toxins2051078>
- Alltech. (2023). Alltech 2023 European harvest analysis reveals that challenging weather conditions contributed to high levels of mycotoxins in grains. *Alltech*. <https://www.alltech.com/press-release/alltech-2023-european-harvest-analysis-reveals-challenging-weather-conditions>
- Al-Nussairawi, M. T. J. (2020). Identification of genes responsible for ochratoxin-A biodegradation by *Cupriavidus basilensis* ÖR16 and evaluation of *Cupriavidus* genus for mycotoxins biodegradation potential. *Szent István University*. <https://doi.org/10.14751/SZIE.2020.033>
- Al-Nussairawi, M. T. J., Risa, A., Garai, E., Varga, E., Szabó, I., Csenki-Bakos, Z., Kriszt, B., & Cserhádi, M. (2020). Mycotoxin biodegradation ability of the *Cupriavidus* genus. *Current Microbiology*, 77(9), 2430–2440. <https://doi.org/10.1007/s00284-020-02063-7>
- Asif, A., Mohsin, H., Tanvir, R., & Rehman, Y. (2017). Revisiting the mechanisms involved in calcium chloride induced bacterial transformation. *Frontiers in Microbiology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02169>
- Azubuike, C. C., Gatehouse, A. M., & Howard, T. P. (2021). pCAT vectors overcome inefficient electroporation of *Cupriavidus necator* H16. *New Biotechnology*, 65, 20–30. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2021.07.003>
- Bedade, D. K., & Singhal, R. S. (2018). Biodegradation of acrylamide by a novel isolate, *Cupriavidus oxalaticus* ICTDB921: Identification and characterization of the acrylamidase produced. *Bioresource Technology*, 261, 122–132. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.04.012>
- Bernardini, C., Grilli, E., Duvigneau, J. C., Zannoni, A., Tugnoli, B., Gentilini, F., Bertuzzi, T., Spinozzi, S., Camborata, C., & Bacci, M. L. (2014). Cellular stress marker alteration and inflammatory response in pigs fed with an ochratoxin-contaminated diet. *Research in Veterinary Science*, 97, 244–250. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2014.07.018>
- Bullerman, L. B., & Bianchini, A. (2007). Stability of mycotoxins during food processing. *International Journal of Food Microbiology*, 119(1-2), 140–146. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.035>
- Cavalheiro, J. M., De Almeida, M. C. M., Grandfils, C., & Da Fonseca, M. (2009). Poly(3-hydroxybutyrate) production by *Cupriavidus necator* using waste glycerol. *Process Biochemistry*, 44(5), 509–515. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2009.01.008>
- Chang, X., Wu, Z., Wu, S., Dai, Y., & Sun, C. (2015). Degradation of ochratoxin A by *Bacillus amyloliquefaciens* ASAG1. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 32(4), 564–571.

- Chen, W., Wu, C., James, E. K., & Chang, J. (2007). Metal biosorption capability of *Cupriavidus taiwanensis* and its effects on heavy metal removal by nodulated *Mimosa pudica*. *Journal of Hazardous Materials*, 151(2–3), 364–371. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.05.082>
- Coenye, T., Vandamme, P., & LiPuma, J. J. (2003). *Ralstonia respiraculi* sp. nov., isolated from the respiratory tract of cystic fibrosis patients. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 53(Pt 5), 1339–1342. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02440-0>
- Cserhádi, M., Kriszt, B., Szoboszlay, S., Tóth, Á., Szabó, I., Táncsics, A., Nagy, I., Horváth, B., Nagy, I., & Kukolya, J. (2012). *De novo* genome project of *Cupriavidus basilensis* ÓR16. *Journal of bacteriology*, 194(8), 2109–2110. <https://doi.org/10.1128/JB.06752-11>
- Ding, L., Han, M., Wang, X., & Guo, Y. (2023). Ochratoxin A: Overview of Prevention, Removal, and Detoxification Methods. *Toxins*, 15(9), 565. <https://doi.org/10.3390/toxins15090565>
- El-Sayed, Y. S., Khalil, R. H., & Saad, T. T. (2009). Acute toxicity of ochratoxin-A in marine water-reared sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Chemosphere*, 75(7), 878–882. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.01.049>
- Eskola, M., Kos, G., Elliott, C. T., Hajslova, J., Mayar, S., & Krska, R. (2020). Worldwide contamination of food crops with mycotoxins: Validity of the widely cited ‘FAO estimate’ of 25%. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60, 2773–2789. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1658570>
- Estrada de los Santos, P., Solano-Rodríguez, R., Matsumura-Paz, L. T., Vásquez-Murrieta, M. S., & Martínez-Aguilar, L. (2014). *Cupriavidus plantarum* sp. nov., a plant-associated species. *Archives of Microbiology*, 196(11), 811–817. <https://doi.org/10.1007/s00203-014-1018-7>
- Európai Unió, (EU) 2023/915 Rendelet, 2024. július 22., az élelmiszerekben található szennyező anyagok megengedett legnagyobb szintjeiről, Az Európai Unió Hivatalos Lapja, L 184, 2024.07.22, 1–29. <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2023/915/2024-07-22>.
- Európai Unió, 2006/576/EK Bizottsági ajánlás, 2006. augusztus 17., az állati takarmányokban előforduló nemkívánatos anyagok megengedett szintjeiről, Az Európai Unió Hivatalos Lapja, L 229, 2006.08.23, 7–9. <https://eur-lex.europa.eu/eli/reco/2006/576/oj>.
- Ferenczi, S., Cserhádi, M., Krifaton, C., Szoboszlay, S., Kukolya, J., Szőke, Z., Kőszegi, B., Albert, M., Barna, T., Mézes, M., Kovács, K. J., & Kriszt, B. (2014). A new ochratoxin A biodegradation strategy using *Cupriavidus basilensis* ÓR16 strain. *PloS One*, 9(10), e109817. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109817>
- Galtier, P. (1991). Pharmacokinetics of ochratoxin A in animals. *IARC Scientific Publications*, (115), 187–200.

- Galtier, P., Alvinerie, M., & Charpentreau, J. (1981). The pharmacokinetic profiles of ochratoxin A in pigs, rabbits and chickens. *Food and Cosmetics Toxicology*, 19, 735–738. [https://doi.org/10.1016/0015-6264\(81\)90528-9](https://doi.org/10.1016/0015-6264(81)90528-9)
- Georgiou, G., & Valax, P. (1996). Expression of correctly folded proteins in *Escherichia coli*. *Current Opinion in Biotechnology*, 7(2), 190–197. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(96\)80012-7](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(96)80012-7)
- Gileadi O. (2017). Recombinant Protein Expression in *E. coli*: A Historical Perspective. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 1586, 3–10. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6887-9_1
- Green, M. R., & Sambrook, J. (2012). *Molecular cloning: A laboratory manual* (4. kiad.). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Háhn, J., Szoboszlay, S., Tóth, G., & Kriszt, B. (2017). Assessment of bacterial biotransformation of herbicide atrazine using *Aliivibrio fischeri* cytotoxicity assay with prolonged contact time. *Ecotoxicology*, 26, 648–657. <https://doi.org/10.1007/s10646-017-1797-0>
- Harris, T. J., & Emtage, J. S. (1986). Expression of heterologous genes in *E. coli*. *Microbiological Sciences*, 3(1), 28–31.
- Huff, W. E., & Hamilton, P. B. (1979). Mycotoxins: Their biosynthesis in fungi: Ochratoxins—metabolites of combined pathways. *Journal of Food Protection*, 42, 815–820.
- International Agency for Research on Cancer. (1993). *OCHRATOXIN a*. Some Naturally Occurring Substances - NCBI Bookshelf. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK513594/>
- Jia, B., & Jeon, C. O. (2016). High-throughput recombinant protein expression in *Escherichia coli*: current status and future perspectives. *Open biology*, 6(8), 160196. <https://doi.org/10.1098/rsob.160196>
- Khoury, A. E., & Atoui, A. (2010). Ochratoxin A: General overview and actual molecular status. *Toxins*, 2(4), 461–493. <https://doi.org/10.3390/toxins2040461>
- Kőszegi, T., & Poór, M. (2016). Ochratoxin A: Molecular Interactions, Mechanisms of Toxicity and Prevention at the Molecular Level. *Toxins*, 8(4), 111. <https://doi.org/10.3390/toxins8040111>
- Liuzzi, V. C., Fanelli, F., Tristezza, M., Haidukowski, M., Picardi, E., Manzari, C., & Ippolito, A. (2016). Transcriptional analysis of *Acinetobacter* sp. neg1 capable of degrading ochratoxin A. *Frontiers in Microbiology*, 7, 2162. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02162>
- Luo, H., Wang, G., Chen, N., Fang, Z., Xiao, Y., Zhang, M., Gerelt, K., Qian, Y., Lai, R., & Zhou, Y. (2021). A Superefficient Ochratoxin A Hydrolase with Promising Potential for Industrial Applications. *Applied and Environmental Microbiology*, 88(2). <https://doi.org/10.1128/aem.01964-21>

- Makkar, N. S., & Casida, L. E. (1987). *Cupriavidus necator* gen. nov., sp. nov.; a Nonobligate Bacterial Predator of Bacteria in Soil. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 37(4), 323–326. <https://doi.org/10.1099/00207713-37-4-323>
- Manderville, R., & Pfohl-Leszkowicz, A. (2008). Bioactivation and DNA adduction as a rationale for ochratoxin A carcinogenesis. *World Mycotoxin Journal*, 1(3), 357–367. <https://doi.org/10.3920/wmj2008.x039>
- Maresca, M., Mahfoud, R., Pfohl-Leszkowicz, A., & Fantini, J. (2001). The mycotoxin ochratoxin A alters intestinal barrier and absorption functions but has no effect on chloride secretion. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 176, 54–63. <https://doi.org/10.1006/taap.2001.9254>
- Martínez-Espinosa R. M. (2019). Heterologous and Homologous Expression of Proteins from Haloarchaea: Denitrification as Case of Study. *International journal of molecular sciences*, 21(1), 82. <https://doi.org/10.3390/ijms21010082>
- Masłowska-Górnica, A., Van Den Bosch, M. R., Saccenti, E., & Suarez-Diez, M. (2022). A large-scale analysis of codon usage bias in 4868 bacterial genomes shows association of codon adaptation index with GC content, protein functional domains, and bacterial phenotypes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, 1865(6), 194826. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2022.194826>
- Mierendorf, R. C., Morris, B. B., Hammer, B., & Novy, R. E. (1998). Expression and Purification of Recombinant Proteins Using the pET System. *Methods in molecular medicine*, 13, 257–292. <https://doi.org/10.1385/0-89603-485-2:257>
- Nangle, S. N., Ziesack, M., Buckley, S., Trivedi, D., Loh, D. M., Nocera, D. G., & Silver, P. A. (2020). Valorization of CO₂ through lithoautotrophic production of sustainable chemicals in *Cupriavidus necator*. *Metabolic Engineering*, 62, 207–220. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2020.09.002>
- National Center for Biotechnology Information (2024). PubChem Compound Summary for CID 442530, Ochratoxin A. Retrieved October 8, 2024 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ochratoxin-A>.
- Péteri, Z., Téren, J., Vágvolgyi, C., & Varga, J. (2007). Ochratoxin degradation and adsorption caused by astaxanthin-producing yeasts. *Food Microbiology*, 24, 205–210. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2006.06.003>
- Pitout M. J. (1969). The hydrolysis of ochratoxin A by some proteolytic enzymes. *Biochemical pharmacology*, 18(2), 485–491. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(69\)90224-x](https://doi.org/10.1016/0006-2952(69)90224-x)
- Pitt, J. I. (2000). Toxigenic fungi: which are important? *Medical Mycology*, 38(s1), 17–22. <https://doi.org/10.1080/mmy.38.s1.17.22>
- Rawlings, N. D., Barrett, A. J., Thomas, P. D., Huang, X., Bateman, A., & Finn, R. D. (2017). The MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors in 2017 and a comparison with peptidases in the PANTHER database. *Nucleic Acids Research*, 46(D1), D624–D632. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1134>

- Ringot, D., Chango, A., Schneider, Y. J., & Larondelle, Y. (2006). Toxicokinetics and toxicodynamics of ochratoxin A, an update. *Chemico-biological interactions*, 159(1), 18–46. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2005.10.106>
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(12), 5463–5467. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>
- Sava, V., Reunova, O., Velasquez, A., Harbison, R., & Sánchez-Ramos, J. (2006). Acute neurotoxic effects of the fungal metabolite ochratoxin A. *Neurotoxicology*, 27, 82–92. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2005.07.004>
- Shi, L., Liang, Z., Li, J., Hao, J., Xu, Y., Huang, K., Tian, J., He, X., & Xu, W. (2014). Ochratoxin A biocontrol and biodegradation by *Bacillus subtilis* CW 14. *Journal of the science of food and agriculture*, 94(9), 1879–1885. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6507>
- Shigekawa, K., & Dower, W. J. (1988). Electroporation of eukaryotes and prokaryotes: a general approach to the introduction of macromolecules into cells. *BioTechniques*, 6(8), 742–751.
- Smith, M.-C., Madec, S., Coton, E., & Hymery, N. (2016). Natural co-occurrence of mycotoxins in foods and feeds and their in vitro combined toxicological effects. *Toxins*, 8(4), 94. <https://doi.org/10.3390/toxins8040094>
- Steinle, P., Stucki, G., Stettler, R., & Hanselmann, K. W. (1998). Aerobic mineralization of 2,6-dichlorophenol by *Ralstonia* sp. strain RK1. *Applied and environmental microbiology*, 64(7), 2566–2571. <https://doi.org/10.1128/AEM.64.7.2566-2571.1998>
- Steyn, P. S. (1971). Ochratoxin and other dihydroisocoumarins. In A. Ciegler, S. Kadis, & S. J. Ajl (Eds.), *Microbial toxins* (Vol. VI, pp. 179–205). Academic Press.
- Tao, Y., Xie, S., Xu, F., Liu, A., Wang, Y., Chen, D., Pan, Y., Huang, L., Peng, D., Wang, X., & Yuan, Z. (2018). Ochratoxin A: Toxicity, oxidative stress and metabolism. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 112, 320–331. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.01.002>
- The UniProt Consortium, UniProt: the Universal Protein Knowledgebase in 2023, *Nucleic Acids Research*, Volume 51, Issue D1, 6 January 2023, Pages D523–D531, <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1052>
- van der Merwe, K. J., Steyn, P. S., Fourie, L., Scott, D. B., & Theron, J. J. (1965). Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* Wilh. *Nature*, 205(976), 1112–1113. <https://doi.org/10.1038/2051112a0>
- Vandamme, P. & Coenye, T. (2004). Taxonomy of the genus *Cupriavidus*: a tale of lost and found. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY*, 54(6), 2285–2289. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63247-0>

- Wang, X., Chen, M., Xiao, J., Hao, L., Crowley, D. E., Zhang, Z., Yu, J., Huang, N., Huo, M., & Wu, J. (2015). Genome Sequence Analysis of the Naphthenic Acid Degrading and Metal Resistant Bacterium *Cupriavidus gilardii* CR3. *PLoS ONE*, 10(8), e0132881. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0132881>
- Wang, Y., Wang, L., Liu, F., Wang, Q., Selvaraj, J. N., Xing, F., Zhao, Y., & Liu, Y. (2016). Ochratoxin A Producing Fungi, Biosynthetic Pathway and Regulatory Mechanisms. *Toxins*, 8(3), 83. <https://doi.org/10.3390/toxins8030083>
- Wang, Y., Wang, L., Wu, F., Liu, F., Wang, Q., Zhang, X., Selvaraj, J. N., Zhao, Y., Xing, F., Yin, W. B., & Liu, Y. (2018). A Consensus Ochratoxin A Biosynthetic Pathway: Insights from the Genome Sequence of *Aspergillus ochraceus* and a Comparative Genomic Analysis. *Applied and environmental microbiology*, 84(19), e01009-18. <https://doi.org/10.1128/AEM.01009-18>
- web1: ResearchGate. (2023). *Vector map of pET28a*. Retrieved October 8, 2024, from https://www.researchgate.net/figure/Vector-map-of-pET28a_fig5_379178914
- Wierckx, N., Koopman, F., Bandounas, L., de Winde, J. H., & Ruijsenaars, H. J. (2010). Isolation and characterization of *Cupriavidus basilensis* HMF14 for biological removal of inhibitors from lignocellulosic hydrolysate. *Microbial biotechnology*, 3(3), 336–343. <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2009.00158.x>
- Xu, H., Wang, L., Sun, J., Wang, L., Guo, H., Ye, Y., & Sun, X. (2021). Microbial detoxification of mycotoxins in food and feed. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1–19. doi:10.1080/10408398.2021.1879730
- Xu, X., Pang, M., Liu, J., Wang, Y., Wu, X., Huang, K., & Liang, Z. (2021). Genome mining reveals the genes of carboxypeptidase for OTA-detoxification in *Bacillus subtilis* CW14. *International journal of biological macromolecules*, 186, 800-810.
- Yazid, S. N. E., Tajudin, N. I., Razman, N. A. A., Selamat, J., Ismail, S. I., Sanny, M., & Samsudin, N. I. P. (2023). Mycotoxigenic fungal growth inhibition and multi-mycotoxin reduction of potential biological control agents indigenous to grain maize. *Mycotoxin research*, 39(3), 177–192. <https://doi.org/10.1007/s12550-023-00484-4>
- Zhao, M., Wang, X. Y., Xu, S. H., Yuan, G. Q., Shi, X. J., & Liang, Z. H. (2020). Degradation of ochratoxin A by supernatant and ochratoxinase of *Aspergillus niger* W-35 isolated from cereals. *World Mycotoxin Journal*, 13(2), 287-298.
- Zingales, V., Taroncher, M., Martino, P. A., Ruiz, M. J., & Caloni, F. (2022). Climate Change and Effects on Molds and Mycotoxins. *Toxins*, 14(7), 445. <https://doi.org/10.3390/toxins14070445>