

XXXI. OTDK BIOLÓGIA SEKCIÓ

**BAKTERIÁLIS ÉS GOMBA EREDETŰ
XANTOFILL-BIOSZINTÉZIS GÉNEK KIFEJEZTETÉSE
MUCOR CIRCINELLOIDES-BEN**

TÓTH ESZTER JUDIT

BIOLÓGIA M.Sc.

I. ÉVFOLYAM



**SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM
TERMÉSZETTUDOMÁNYI ÉS INFORMATIKAI KAR
MIKROBIOLÓGIAI TANSZÉK**

TÉMAVEZETŐ: DR. PAPP TAMÁS, EGYETEMI DOCENS

2013

Tartalomjegyzék

1.	Rövidítések jegyzéke	4
2.	Bevezetés	5
3.	Irodalmi áttekintés	6
3.1	A karotinoidok bioszintézise <i>Mucor circinelloides</i> -ben	6
3.2	Asztaxantin bioszintézise <i>X. dendrorhous</i> -ban és <i>Paracoccus</i> sp. N81106-ban	8
3.3	A <i>X. dendrorhous crtS</i> génje és az általa kódolt citokróm P450 oxigenáz enzim főbb jellemzői	9
3.4	A <i>Paracoccus</i> sp. N81106 <i>crtW</i> és a <i>crtZ</i> gének által kódolt β -karotin ketoláz és β -karotin hidroxiláz.....	10
3.5	A <i>crtW</i> gént hordozó transzformánsok	10
4.	Célkitűzések	12
5.	Anyagok és módszerek.....	13
5.1	Alkalmazott gombatörzsek	13
5.2	Kompetens sejtek készítése.....	13
5.3	Baktérium transzformáció.....	13
5.4	RNS kivonás	14
5.5	cDNS szintézis.....	14
5.6	Génklónozás és plazmid konstrukciók létrehozása	14
5.7	Gélelektroforézis és fragmentum visszaizolálás.....	15
5.8	<i>M. circinelloides</i> protoplasztok képzése	15
5.9	<i>M. circinelloides</i> protoplasztok transzformációja.....	15
5.10	Genomi DNS tisztítása a transzformánsokból	16
5.11	A <i>crtS</i> gén felszaporítása a transzformánsok DNS-éből.....	17
5.12	Plazmidkópiaszám meghatározás	17
5.13	A karotinoid tartalom elemzése	17
6.	Eredmények és értékelés	19

6.1	Különböző <i>X. dendrorhous</i> törzsek <i>crtS</i> génjének felszaporítása és összehasonlító vizsgálata	19
6.2	A <i>crtS</i> gént hordozó expressziós vektorok létrehozása	20
6.3	A <i>M. circinelloides</i> MS12 törzsének transzformációja a <i>crtS</i> géneket hordozó cirkuláris plazmidokkal.....	22
6.4	<i>M. circinelloides</i> MS12+pCA8lf törzs transzformációja.....	23
6.5	A transzformánsok karotinoid termelésének vizsgálata	23
6.6	Különböző szénforrások és a hőmérséklet hatása a <i>crtW</i> és <i>crtZ</i> gént hordozó transzformánsok karotinoid termelésére	26
6.7	A <i>crtZ</i> gén integrációja a <i>crtW</i> gént hordozó transzformánsokba	28
7.	Összefoglalás	30
8.	Irodalomjegyzék	31
9.	Köszönetnyilvánítás	34
10.	Függelék.....	35
11.	Nyilatkozat.....	36

1. Rövidítések jegyzéke

CI	kloroform-izoamilalkohol
DEPC	dietil-pirokarbonát
DHA	dihidrox-aceton
DMAPP	dimetilallil-pirofoszfát
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav
FPP	farnezil-pirofoszfát
GGPP	geranilgeranil-pirofoszfát
GPP	geranil-pirofoszfát
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (nagyfelbontású folyadékkromatográfia)
IPP	izopentenil-pirofoszfát
IPTG	izopropil- β -D-tiogalaktopiranozid
LB	Luria-Broth (Luria-féle tápleves)
MOPS	3-N-morfolin-propánszulfonsav
PCI	fenol-kloroform-izoamilalkohol
PCR	Polymerase Chain Reaction (polimeráz láncreakció)
PEG	polietilén-glikol
PMC	PEG – szorbitol – MOPS – kalciumklorid
REMI	Restriction Enzyme-Mediated Integration (restrikciós enzim- közvetített integráció)
RNáz	ribonukleáz
SMC	szorbitol – MOPS – kalcium-klorid
TAE	tris-ecetsav – dinátrium-EDTA
TRIS	tris-(hidroximetil)-amino-metán
X-gal	5-bromo-4-kloro-3-indolil- β -D-galaktopiranozid
YNB	Yeast Nitrogen Base (élesztő nitrogénforrás)
YPG	Yeast extract – Pepton – Glucose medium (élesztő kivonat – pepton – glükóz tápközeg)

2. Bevezetés

A karotinoidok konjugált kettős kötéseket tartalmazó természetes pigmentek. Színük a sárgától a narancs-vörösig terjedhet. Növényekben és algákban jelenlétük főleg a fotoszintézisben betöltött szerepük miatt fontos. Számos baktérium és gomba is képes a szintézisükre. Két csoportjukat különböztetjük meg, a karotinokat és a xantofillokat. A karotinok lineáris, illetve egy vagy mindkét végükön cirkularizált szénhidrogén láncok, a xantofillok pedig a karotinok oxigenált származékai.

Régóta ismert a karotinoidok antioxidáns tulajdonsága, valamint kimutatták daganatos megbetegedésekkel szembeni megelőző tulajdonságukat is. A xantofillok, így a zeaxantin, a kantaxantin és az asztaxantin kiváló antioxidánsok, a β -karotinnál is erősebb szabadgyök ellenes hatással rendelkeznek. Nagy mennyiségben használja fel őket az élelmiszer- és gyógyszeripar. Napjainkban főként kémiai szintézissel előállított xantofillokat használnak, azonban egyre nagyobb igény mutatkozik a természetes úton termeltetett alapanyagok iránt.

A *Xanthophyllomyces dendrorhous* egy asztaxantin-termelő bazídiumos gomba, amellyel számos, az ipari felhasználást lehetővé tevő, illetve azt megalapozó kutatás folyik. A gombában azonosították az asztaxantin bioszintézisért felelős, bizonyítottan β -karotin hidroxiláz és feltételezett β -karotin ketoláz aktivitással bíró enzimet kódoló *crtS* gént. A gén kifejeztetése a β -karotin-termelő járomspórás *Mucor circinelloides*-ben lehetővé tenné egyrészt a fermentációs iparban már alkalmazott fonalas gomba xantofillok termeltetésére történő alkalmazásának vizsgálatát, valamint a *crtS* által kódolt citokróm P450 oxigenáz enzim működésének részletes elemzését. Ezért munkánk során célul tűztük ki több vad típusú és asztaxantin túltermelő mutáns *X. dendrorhous crtS* génjének klónozását, jellemzését és kifejeztetését *M. circinelloides*-ben.

A *Paracoccus* sp. N81106 (korábban *Agrobacterium aurantiacum*) egy asztaxantin-termelő tengeri baktérium, melyben a β -karotin – asztaxantin átalakulásért a β -karotin ketolázt kódoló *crtW* és β -karotin hidroxilázt kódoló *crtZ* gének a felelősek. A bakteriális eredetű gének heterológ expressziójával kantaxantin- és asztaxantin-termelő mutáns *M. circinelloides* törzseket hoztak létre. Munkánk során célul tűztük ki, hogy kísérletet tegyünk ezen transzformáns törzsek karotinoid termelésének fokozására.

3. Irodalmi áttekintés

3.1 A karotinoidok bioszintézise *Mucor circinelloides*-ben

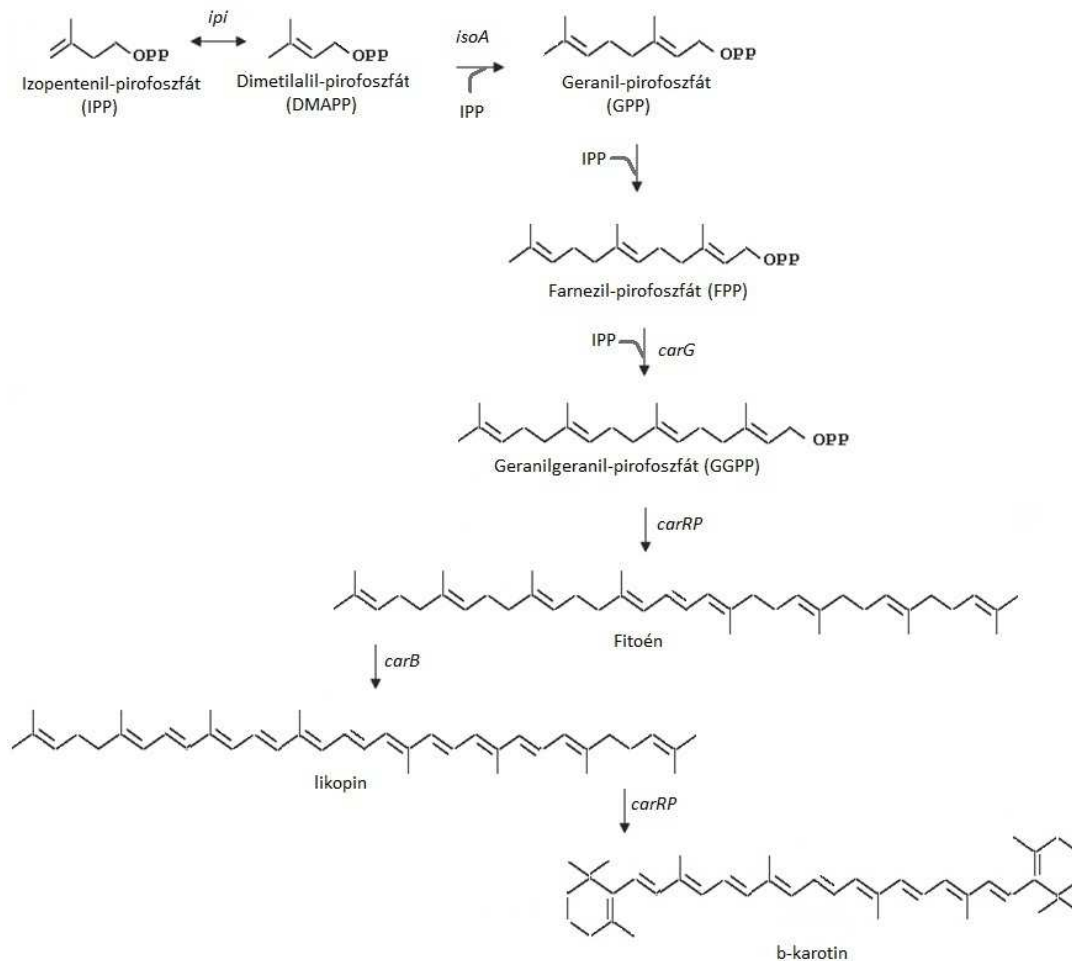
A β -karotin termelő, járomspórás *Mucor circinelloides* (Mucoromycotina, Mucorales) több okból is kedvelt alanya a különböző molekuláris és genetikai vizsgálatoknak. Morfológiai dimorfizmus jellemzi, élesztő alakja a biotechnológiai fermentációs eljárások során hasznos, magasabb biomassa termelést tesz lehetővé. Jól bevált transzformációs technikák állnak rendelkezésünkre, amelyekkel akár heterológ génexpresszió is megvalósítható. Számunkra különösen fontos, hogy karotin bioszintézis útvonala jól ismert (Papp és mtsi. 2005). Ezen kívül nagy mennyiségű lipid és karotin raktározására képes (lásd: <http://genome.jgi-psf.org/Mucci2/Mucci2.home.html>).

A karotinoidok kémiai szerkezetüket tekintve tetraterpének, melyek izoprén egységek összekapcsolódásával jönnek létre (Goswami és mtsi, 2010). Színük izomer állapotuktól és a konjugált kettős kötések számától függ: a látható fény elnyeléséhez legalább 7 konjugált kettős kötés szükséges (Siero és mtsi, 2003). Szabadgyök semlegesítő hatásuk miatt jelentős szerepük lehet különböző betegségek pl. az érlemeszedés, szürke hályog, időskori makuláris degeneráció megelőzésében, valamint rák megelőző hatásuk is ismert (Edge és mtsi. 1997).

A karotinoidok, így a β -karotin bioszintézise is az izoprenoid (más néven a terpenoid) útvonalból ágazik le. Az első izoprén egység, az izopentenil pirofoszfát (IPP) létrejöhet a mevalonsav és nem-mevalonsav útvonalon is. A nem-mevalonsav útvonal az eubaktériumokra és a növényi plasztiszokra jellemző, ahol egy piruvát és egy gliceraldehid-3-foszfát molekula kondenzációjával jön létre az IPP prekursora. A mevalonsav útvonal archeákra, gombákra, állatokra és növényekre (de nem növényi plasztiszokra) jellemző (Lee és Schmidt-Dannert, 2002).

A *M. circinelloides* karotinoid bioszintézise a mevalonsav útvonalon képződő IPP-ből indul ki (1. ábra). Az IPP szintézise után prenil transzferázok katalizálta lánchosszabbítás következik. Ennek első lépése az IPP összekapcsolódása dimetilallil-pirofoszfáttal (DMAPP), ami nem más, mint egy reaktív IPP izomer. Az izomerizációs lépést az *ipi* gén által kódolt izopentenil-pirofoszfát izomeráz katalizálja *M. circinelloides*-ben (Csérnetics és mtsi, 2011). A kondenzáció következtében 10 szénatomos geranil-pirofoszfát jön létre (GPP), amiből farnezil-pirofoszfát (FPP, 15C), majd geranilgeranil-pirofoszfát (GGPP, 20C) keletkezik (Lee és Schmidt-Dannert, 2002). *M. circinelloides*-ben a FPP szintázt az

isoA (Valeyos és mtsi, 2004), a GGPP szintáz a *carG* (Valeyos és mtsi, 2003) gén kódolja. A GGPP a karotinoidok közvetlen prekursora, két molekula GGPP kondenzációjával jön létre a karotinoidokra jellemző 40 szénatomos alapváz. Két GGPP molekula összekapcsolódását a fitoén szintáz enzim katalizálja, a folyamat terméke a szintelen fitoén, amely még csak 3 konjugált kettős kötést tartalmaz.



1. ábra. A karotinoidok bioszintézise *M. circinelloides*-ben.

A bioszintézis következő lépéseiben a fitoén dehidrogenáz enzim hatására a konjugált kettős kötések száma többször megduplázódik és a folyamat eredményeként piros színű likopin keletkezik. A következő lépés a likopin ciklizációja, amely során a likopin cikláz a molekula egyik vagy mindkét végén β -jonon gyűrűt hoz létre, így γ -karotin vagy β -karotin keletkezik (Siero és mtsi, 2003). A β -karotin a járomspórás gombák karotinoid bioszintézisének fő terméke. *M. circinelloides*-ben a *carRP* gén kódolja a fitoén szintáz és likopin cikláz aktivitással egyaránt rendelkező CarRP fehérjét (Velayos és mtsi, 2000), míg a *carB* gén terméke a fitoén dehidrogenáz (Velayos és mtsi, 2000). Korábban a tanszéki

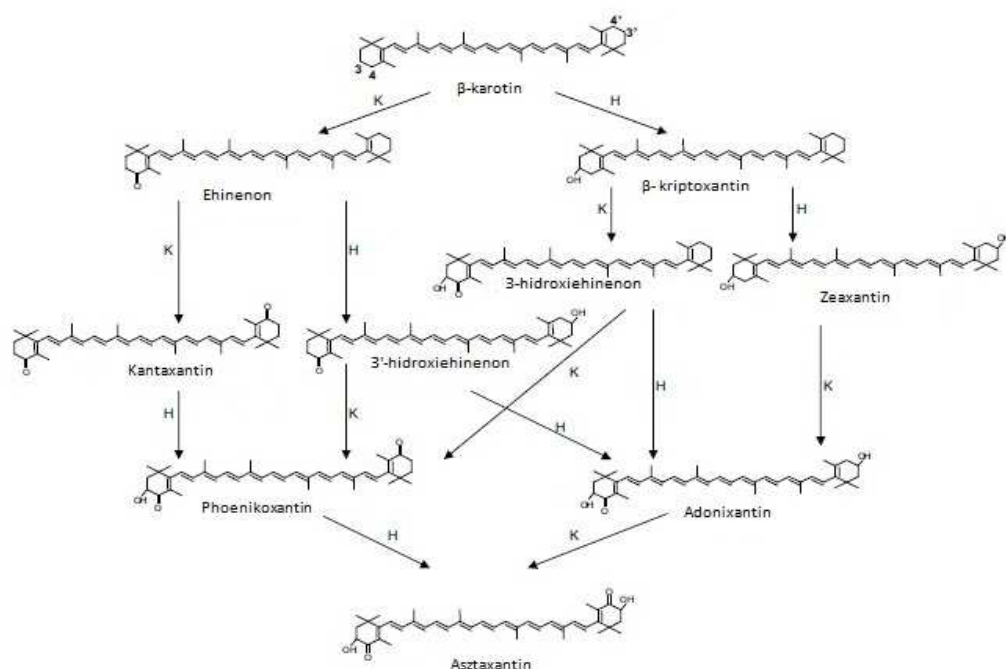
kutatócsoport igazolta, hogy a *M. circinelloides* kis mennyiségben szintetizál β -kriptoxantint (3-hidroxi- β , β -karotin) és zeaxantint (3,3'-dihidroxi- β , β -karotin), vagyis a gomba rendelkezik önálló β -hidroxiláz aktivitással (Papp és mtsi, 2006; Csernetics és mtsi, 2011).

3.2 Asztaxantin bioszintézise *X. dendrorhous*-ban és *Paracoccus* sp. N81106-ban

X. dendrorhous-ban és *Paracoccus* sp. N81106 törzsben (korábban *Agrobacterium aurantiacum*) a β -karotin szintézise a *M. circinelloides*-ben lejátszódó folyamathoz hasonlóan zajlik, mevalonsav útvonalon képződő IPP-ből kiindulva. Mindkét organizmusban ugyanazon enzimek felelősek a β -karotin bioszintéziséért. A *crtE* a GGPP szintáz, a *crtB* a fitoén szintáz, a *crtY* a likopin cikláz, a *crtI* pedig a fitoén deszaturáz enzimeket kódolják (Siero és mtsi, 2003). *X. dendrorhous*-ban a *crtYB* gén által meghatározott enzim rendelkezik likopin cikláz és fitoén szintáz aktivitással is (Martín és mtsi, 2008).

Paracoccus-ban a *crtE*, *crtB*, *crtI*, *crtY*, *crtZ* és *crtW* gének felelősek a karotinoidok bioszintéziséért. Öt gén klasztert alkot (a *crtE* a klaszteren kívül helyezkedik el), amelyben a gének azonos orientációban helyezkednek el és stop kodonjuk átfed a következő gén start kodonjával, így valószínűleg egy promóter régió szabályozása alatt állnak (Misawa és mtsi, 1995). A β -karotin asztaxantinná történő átalakulásához további oxidációs lépések (3,3'-hidroxiláció és 4,4'-ketoláció) szükségesek. A *Paracoccus* sp. N81106 asztaxantin termeléséért a *crtZ* és *crtW* gének felelősek, amelyek β -karotin hidroxiláz és β -karotin ketoláz aktivitású fehérjéket kódolnak (2. ábra). Ezek az enzimek nem csak a β -karotint képesek szubsztrátként felismerni, hanem a β -karotin-asztaxantin átalakulás közttermékeit is (Misawa és mtsi, 1995).

X. dendrorhous-ban még nem teljesen tisztázott, hogy mely gének, illetve enzimek vesznek részt a β -karotin – asztaxantin átalakulásban, de a *crtS* gén terméke igazoltan szükséges (Álvarez és mtsi, 2006). Ez az enzim, mely a citokróm P450 családba tartozik, bizonyítottan rendelkezik β -karotin hidroxiláz aktivitással, ugyanakkor feltételezett, hogy β -karotin ketolációra is képes (Ojima és mtsi, 2006). Az enzim működéséhez elektron donor szükséges, ez egy citokróm P450 reduktáz, amelyet *X. dendrorhous*-ban a *crtR* gén kódol (Alcaíno és mtsi, 2008).



2. ábra: A β -karotin - asztaxantin konverzió lehetséges útvonalai *Paracoccus* sp. N81106-ban.

H- β -karotin hidroxiláz, K- β -karotin ketoláz. (Martín és mtsi, 2008 nyomán).

3.3 A *X. dendrorhous crtS* génje és az általa kódolt citokróm P450 oxigenáz enzim főbb jellemzői

A *X. dendrorhous*-ból származó *crtS* gén egy 62.6 kDa méretű fehérjét kódol, amelynek bizonyítottan van β -karotin 3,3'-hidroxiláz aktivitása (Álvarez és mtsi, 2006), de feltételezések szerint β -karotin 4,4'-ketoláz aktivitással is rendelkezik (Ojima és mtsi, 2006). A fehérje nagy hasonlóságot mutat más organizmusokból származó citokróm P450 monooxigenázokkal: több családból származó citokróm P450 monooxigenázzal történő összehasonlítással sikerült azonosítani az oxigénkötő helyet tartalmazó motívumot (³³⁹AGYETS³⁴⁴), beleértve az invariáns G³⁴⁰ és T³⁴³ aminosavakat, amelyek minden citokróm P450 fehérjében azonosak; a hem-kötő domént (⁴⁸⁸FISGPRACFG⁴⁹⁷) és a citokróm P450 fehérjék háromdimenziós szerkezetének kialakításáért felelős domént (³⁹⁴ESLR³⁹⁷). A gén kódoló szakasza 3166 bp hosszúságú, amely 17 intront tartalmaz, promóter régiójában található 4 megegyező CreA transzkripció faktor-kötő motívum, amely egy lehetséges karbon katabolikus repressziót feltételez (Álvarez és mtsi, 2006).

3.4 A *Paracoccus* sp. N81106 *crtW* és a *crtZ* gének által kódolt β -karotin ketoláz és β -karotin hidroxiláz

A *Paracoccus* sp. N81106 törzsből származó *crtW* gén által kódolt enzim egy membránkötött β -karotin ketoláz, amely vas-kötő His-gazdag motívumokat tartalmaz és 4 transzmembrán régióval valamint 2 további hidrofób egységgel rendelkezik. A hidrofób egységek a II. és III. transzmembrán régió között, valamint a C-terminális közelében helyezkednek el, funkciójukat tekintve a szubsztrátkötésben lehet szerepük. A vastartalmú aktív centrum a membránfelszín közelében található, ezzel biztosítva az elektron donoroknak (szolubilis vagy perifériás membrán fehérjék) a könnyű hozzáférést. A szubsztrátkötő hely a membránon belül található, ami a hidrofób karotinoid szubsztrátok kötését segíti elő (Ye és mtsi, 2006).

Az enzim önmagában a β -karotin kantaxantinná (β,β -karotin-4,4'-dion) történő átalakításáért felel, ehinenon (β,β -karotin-4-on) köztiterméken keresztül, ugyanakkor a már hidroxilált termékek ketolálására is képes (Misawa és mtsi, 1995, 2. ábra), így részt vesz az asztaxantin képződésében. Ugyanakkor kimutatták, hogy az enzim preferálja a nem hidroxilált β -jonon gyűrűket (Ye és mtsi, 2006).

A *crtZ* gén terméke a zsírsav-hidroxilázok szupercsaládjába tartozó enzim. A család tagjaira általánosan jellemző, hogy a HXHH motívumot 2 kópiában tartalmazzák, valamint hogy membránintegrált proteinek (lásd: <http://pfam.sanger.ac.uk/family/PF04116>).

Az enzim 3-3'-hidroxiláz aktivitással rendelkezik, önmagában a β -karotint β -kriptoxantinon keresztül zeaxantinná képes átalakítani. Azonban a ketolált származékokat is képes szubsztrátként hasznosítani, és azok 3-3'-hidroxilálását katalizálni, így asztaxantint szintetizálni (Misawa és mtsi, 1995).

3.5 A *crtW* gént hordozó transzformánsok

Tanszékünkön korábban létrehoztak olyan *M. circinelloides* transzformánsokat, amelyek a *crtW* gént a genomba integrálva hordozzák. Ennek fő oka az volt, hogy a cirkuláris plazmiddal bejuttatott gének esetében a plazmid kópiaszámának ingadozása miatt a törzsek karotinoid termelése is változik. Két módszerrel készítették ezeket a transzformánsokat. Az egyik a kettős homológ rekombinációval történő integráció. Ebben az esetben az integrációt biztosító homológ szakasz a *leuA* gén, illetve ennek 5' határoló szakasza volt, amely egyben szelekciós markerként is funkcionált, hiszen az MS12 leucin auxotrófiáját a rekombináció következtében komplementálni képes. Ilyen technikával

készült az MS12+pCA8lf transzformáns törzs. A másik módszer a REMI (Restriction Enzim-Mediated Integration), amikor egy enzimpárral linearizált fragmentummal protoplaszt transzformációt végeztek úgy, hogy a DNS fragmentummal együtt a linearizáláshoz használt restrikciós endonukleázokat is bejutatták a sejtmagba, ezzel lehetővé téve az integrációt. Ilyen transzformáns az MS12+pPT51R2, amelynél szintén a *leuA* gén szolgált szelekciós markerként (Csernetics, 2011).

4. Célkitűzések

Munkánk során célul tűztük ki, hogy a *M. circinelloides* karotinoid termelését úgy módosítsuk bakteriális és gomba eredetű gének kifejeztetésével, hogy értékes xantofillok termeltetése váljon lehetővé. Célul tűztük ki a transzformánsok molekuláris elemzését, valamint karotinoid termelésük vizsgálatát.

A következő konkrét feladatokat kívántuk megvalósítani:

- különböző *X. dendrorhous* törzsekből származó *crtS* gének felszaporítása, expressziós vektorokba klónozása és kifejeztetése *M. circinelloides* MS12 kétszeresen auxotróf (*leu⁻,ura⁻*), karotintermelő törzsében, valamint a *crtW* gént integrálva tartalmazó, kantaxantin termelő MS12+pCA8lf transzformáns törzsben;
- az így nyert transzformánsok karotinoid termelésének összehasonlító elemzése, valamint a *crtS* gén által kódolt enzim aktivitásának vizsgálata;
- a tanszékünkön korábban létrehozott, a *crtW* gént integráltan hordozó MS12+pCA8lf és MS12+pPT51R2 törzsek transzformációja *crtZ* gént tartalmazó cirkuláris plazmiddal;
- az így létrehozott transzformánsok és az MS12+pCA8lf és MS12+pPT51R2 törzsek karotinoid-termelésének fokozása;
- olyan lineáris fragmentum létrehozása, amellyel megvalósítható a *crtZ* gén integrációja a *crtW* gént genomban integrálva hordozó MS12+pCA8lf és MS12+51R2 transzformáns törzsekben;

5. Anyagok és módszerek

5.1 Alkalmazott gombatörzsek

Munkánk során alkalmazott gombatörzseket az 1. táblázat foglalja össze.

1. táblázat: Alkalmazott gombatörzsek.

Faj	Törzsgyűjteményi szám/ kód	Jellemzők
<i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i>	ATCC 24229	<i>crtS</i> , asztaxantin termelő
<i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i>	ATCC 24229/R119	<i>crtS</i> , asztaxantin túltermelő
<i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i>	CBS 6938	<i>crtS</i> , asztaxantin termelő
<i>Mucor circinelloides</i>	MS12	<i>leu⁻</i> , <i>ura⁻</i> , β -karotin termelő
<i>Mucor circinelloides</i>	MS12+pCA8lf	<i>crtW</i> , kantaxantin és echinenon termelő
<i>Mucor circinelloides</i>	MS12+pPT51R2	<i>crtW</i> , kantaxantin termelő

5.2 Kompetens sejtek készítése

E. coli TOP10F⁻ vagy XL1-Blue törzsek egy éjszakán át nevelt tenyészetének 1 ml-ét 100 ml LB (1% tripton, 0,5% élesztőkivonat, 1% NaCl) tápoldatba átolva OD₆₆₀=0,6 érték eléréséig 37 °C-on növesztettük. A tenyészetet centrifugáltuk (2160 g/10 perc, 4 °C) majd a sejteket, az átolított tenyészettel 1-1 arányban, 100 mM-os CaCl₂ oldatban felfuszpendáltuk. Centrifugálást (2160×g, 10 perc, 4 °C) követően a lépést megismételtük, majd a sejteket egy órán át jeges vízfürdőben inkubáltuk, ezután újra centrifugáltuk (2160×g, 10 perc, 4 °C), majd a kiülepedett sejteket 1/20-nyi térfogatú, 20% glicerinnel tartalmú 100 mM-os hideg CaCl₂ oldatban felfuszpendáltuk. A kompetens sejtek -70 °C-on hónapokig eltarthatók.

5.3 Baktérium transzformáció

200 μ l fagyaszttva tárolt kompetens sejtet jégen felolvasztottunk, majd 5-10 μ l ligátumot (plazmidot), valamint 100 μ l TCM puffert (10 mM Tris (pH 7,5); 10 mM CaCl₂; 10 mM MgCl₂) is adtunk hozzá. 30 perc jégen történő inkubálás után 3 percig 42 °C-on tartottuk (hősokk), majd 10 percig szobahőn inkubáltuk. Ezután ampicillin tartalmú (100

μg/ml) LB táptalajra szélesztettük, majd 37 °C-on, 16 órán keresztül inkubáltuk a Petri-csészéket. A crtS-pKS plazmidkonstrukciónál az inszert beépülése következtében a plazmid LacZ génje sérül, amely lehetőséget ad a transzformáns telepek kék-fehér szelekciójára, ezért a baktériumok szélesztése előtt a táptalaj felületére 40-40μl IPTG-t és X-gal-t is szélesztettünk.

5.4 RNS kivonás

A *Xanthophyllomyces* törzseket malátás tápoldatba (1% glükóz, 1% maláta kivonat, 0,5% élesztő) oltottuk és rázatva tenyésztettük 4 napig (180 rpm, 20 °C). Mivel a gomba sejtfala vastag, ezért az RNS kivonás előtt protoplasztáló oldattal (0,7 M kálium-klorid; 1,5% csigaenzim; 3% Novozym₂₃₄) 2 órán át előkezeltük, majd a sejteket centrifugálással (3200 rpm, 15 perc) kiülepítettük. Az RNS kivonáshoz E.Z.N.A. Total RNA Kit-et (Omega Bio-Tek) használtunk a gyártó utasításai szerint.

5.5 cDNS szintézis

A DNáz kezelt (Fermentas) RNS kivonatokból cDNS-t szintetizáltunk RevertaidTM Premium First Strand cDNA Synthesis Kit-el (Fermentas). A DNáz kezeléshez 3 μg RNS-t 20 μl végtérfogatban 37 °C-on 30 percig DNáz kezeltünk. Az enzimműködést 2 μl EDTA hozzáadásával állítottuk le, amelyet 10 perces 65 °C-on történő inkubáció követett.

A reverz transzkripcióhoz a DNáz kezelt RNS mintához oligo-dT primert és dNTP mixet adtunk és 5 percig 65 °C-on tartottuk, majd reverz transzkriptáz puffer és reverz transzkriptáz hozzáadása után 50 °C-on 30 percig, majd 85 °C-on 5 percig inkubáltuk, a gyártó utasításainak megfelelően.

5.6 Génklónozás és plazmid konstrukciók létrehozása

A crtS gént cDNS-ből szaporítottuk fel PCR technika segítségével. A reakcióhoz használt indítószekvenciák:

XantcrtS 1 5' GGCATCGATATGTTTCATCTTGGTCTTGCTC 3'
XantcrtS 2 5' CTTGCGGCCGCTCATTCGACCGGCTTGACCT 3'

Az amplifikálás körülményei:

94 °C 3perc elődenaturáció

94 °C 1 perc denaturáció	}	35 ciklus
58 °C 1 perc primer kötődés		
72 °C 4 perc láncszintézis		
72 °C 10 perc végső láncszintézis		
4 °C-ra hűtés.		

A PCR reakcióhoz *Pfu* DNS polimerázt (ZenonBio) valamint Fusion High Fidelity Taq (Fermentas) rendszert használtunk a gyártók utasításait követve. Az így felszaporított *crtS* géneket használtuk a plazmidkonstrukciók létrehozásához. A baktériumból történő plazmid DNS tisztításához E.Z.N.A. Plazmid Mini Kit-et (Omega Bio-Tek) vagy Mini Plus Plazmid DNA Extraction System-et (Viogene) használtunk a gyártók utasításai szerint.

5.7 Gélelektroforézis és fragmentum visszaizolálás

A DNS minták elválasztását 0,8%-os agaróz/TAE gélben (40 mM Tris-ecetsav, pH 7,6; 1mM Na₂EDTA), 95 V feszültséggel 1 órán át végeztük. Etídium-bromidos festést alkalmaztunk (0,5 µg/ml), a DNS molekulákat UV fény alatt detektáltuk, a fragmentumok méretének meghatározásához 1 kb-os molekulasúly markert (Fermentas) használtunk.

A kívánt DNS szakaszokat a Silica Bead DNA Gel Extraction Kit (Fermentas) segítségével izoláltuk vissza, a gyártó utasításai szerint.

5.8 *M. circinelloides* protoplasztok képzése

M. circinelloides spóra szuszpenzióból (10⁸ spóra/ml) YPG táptalajra helyezett celofánkorongra oltottunk 64 tűs oltótűvel, majd szobahőmérsékleten, 13-14 órán át tenyésztettük. A telepeket protoplasztáló oldatba (10 mM Na-foszfát puffer, 0,8 M szorbitol, 1,5% csigaenzim) mostuk, majd 2-3 órán át szobahőmérsékleten protoplasztáltuk. A protoplasztokat gézlapon szűrtük és SMC oldattal (0,8 M szorbitol, 10 mM MOPS, 50 mM CaCl₂) mostuk.

5.9 *M. circinelloides* protoplasztok transzformációja

PEG/CaCl₂-közvetített transzformációt alkalmaztunk a plazmid konstrukciók és a lineáris DNS fragmentumok protoplasztokba történő bejuttatásához.

A protoplasztokat centrifugálással kiülepítettük (minden esetben a következő paraméterekkel centrifugáltunk: 2160×g, 15 perc, 4 °C), 5 ml SMC pufferrel mostuk, majd újból centrifugáltuk. Ezután a protoplasztokat felvettük 200 µl SMC pufferbe.. A protoplasztokhoz 10-10 µg plazmidot és 20 µl PMC puffert (0,6 M szorbit, 50 mM CaCl₂, 10 mM MOPS, 40 %-os PEG 4000) adtunk, majd fél órán át jégen inkubáltuk. Ezt követően 2,5 ml PMC puffert mértünk hozzájuk és fél órát tartottuk szobahőmérsékleten. A mintákat 25 ml SMC pufferrel hígítva centrifugáltuk. A kezelt sejteket ezután 5-5 ml 0,8 M szorbitolt tartalmazó YPG tápoldatban (0,3% élesztő, 1% pepton, 2% glükóz) vettük fel és fél órán át szobahőmérsékleten regeneráltattuk, újra kiülepítettük, SMC pufferrel mostuk, végül újból lecentrifugáltuk. A kiülepített sejteket kis mennyiségű SMC-be vettük fel és 0,8 M szorbitollal kiegészített YNB fedőaggarral (1% glükóz; 1% agar; 0,15% ammónium-szulfát; 0,15% Na-L-glutamát; 0,05% YNB; szükség esetén 0,05% leucinnal kiegészítve) összekeverve kiöntöttük 0,8 M szorbitolt tartalmazó YNB csészékre (2% agar; 1% glükóz; 0,15% ammónium-szulfát; 0,15% Na-L-glutamát; 0,05% YNB; szükség esetén 0,05% leucinnal kiegészítve). A csészéket 4-5 napig szobahőmérsékleten inkubáltuk.

5.10 Genomi DNS tisztítása a transzformánsokból

A *M. circinelloides* összDNS kivonásához a micéliumot folyékony nitrogénben tártuk fel. A feltárás után 2,5 ml/g lízis puffert (50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 20 mM EDTA; 1% Na-lauril-szarkozin) adtunk az elporított micéliumhoz és üvegbottal addig kevergettük, amíg homogén nem lett. RNáz hozzáadása után (20 µg/ml) a homogenizátumot 20-25 percig 65 °C-on inkubáltuk a lízis elősegítéséhez (közben időnként megkeverve), majd szobahőmérsékletűre hűtés után centrifugáltuk (8000 g, 10 perc, 4 °C). A felülúszóhoz azonos mennyiségű PCI-t (fenol-kloroform-izoamilalkohol 25:24:1 arányú keveréke) adtunk, majd 4 °C-on a fázisok elkeveredéséig (2-3 órán át) gyengén kevertettük (45 rpm). Centrifugálás után (8000 g, 15 perc, 4 °C) a vizes fázist azonos mennyiségű CI-vel (kloroform-izoamilalkohol 24:1 arányú keveréke) mostuk. Újabb centrifugálást (8000 g, 15 perc, 4 °C) követően a vizes fázishoz kétszeres mennyiségű 96%-os etanolt adtunk (2 óra - 20 °C-on vagy 30 perc -70 °C-on), majd centrifugálással ülepítettük a DNS-t (13000 rpm, 20 perc, 4 °C). A csapadékot vákuum alatt beszárítottuk, majd a DNS-t 500 µl steril desztillált vízbe visszaoldottuk (Iturriaga és mtsi, 1992).

5.11 A *crtS* gén felszaporítása a transzformánsok DNS-éből

A transzformánsok vizsgálata során a transzformánsokból tisztított genomi DNS-ből PCR technikával felszaporítottuk a *crtS* gént a XantcrtS1 és XantcrtS2 indítószekvenciákkal. A reakcióhoz *Pfu* DNS polimerázt használtunk a gyártó utasításai szerint.

Az amplifikálás körülményei:

94 °C 3 perc denaturáció

94 °C 1 perc denaturáció

61 °C 1 perc primer kötődés

72 °C 4 perc láncszintézis

} 35 ciklus

72 °C 10 perc végső láncszintézis

4 °C-ra hűtés.

5.12 Plazmidkópiaszám meghatározás

A transzformánsokba bejuttatott plazmidok kópiaszámát valós-idejű kvantitatív PCR (qPCR) segítségével határoztuk meg. A reakcióhoz Maxima SYBR Green qPCR Master Mix-et (ThermoScientific) és CFX96 real-time PCR detektáló rendszert alkalmaztunk. Az adatokat a $2^{-\Delta C_t}$ módszer segítségével értékeltük ki. Az amplifikálás során a következő indítószekvenciákat alkalmaztuk:

crtS real-time1 5' CCGATCCGAAAGTCTTCAACC 3'

crtS real-time2 5' CGCCGTAACAACACCATCTC 3'

Kontrollként alkalmazott indítószekvenciák:

isoA real-time1 5' ATCTCGACTGTTACGGTGCTCCT 3'

isoA real-time2 5' CTTGCGTTGTTTCGGGATTAGCCA 3'

ipi real-time1 5' ATGTGGACCAACACTTGCTGCTC 3'

ipi real-time2 5' TTGATGCCAAGCTCATGCTCCAG 3'

5.13 A karotinoid tartalom elemzése

Karotinoid kivonás

M. circinelloides MS12 törzsét leucinnal és uracillal kiegészített YNB táptalajon, a transzformáns törzseket pedig leucinnal kiegészített YNB táptalajon 4 napig, folyamatos

megvilágítás mellett növesztettük. Esetenként a törzseket különböző szénforrást 1-1%-ban tartalmazó YNB táptalajokra oltottuk. A micéliumot lekapartuk a táptalaj felületéről, majd folyékony nitrogénnel dörzsmozsárban eldörzsöltük. A karotinoidok extrahálásához 500 mg micéliumporhoz 500 µl acetont adtunk és vortexeltük. A mintákat centrifugáltuk (1000 g, 1 perc), majd a felülúszót átvittük egy 50 ml-es csőbe. Az extrahálást addig ismételtük, míg a hozzáadott aceton színtelen nem maradt. Az extraktumhoz ezután azonos mennyiségű petrolétert (40-70 °C) adtunk. 1 ml desztillált víz hozzáadásával segítettük a fázisok szétválását. A szerves fázist centrifugálás után átmértük egy új csőbe és az oldószert nitrogén gáz áramoltatása mellett elpárologtattuk. A bepárolt karotinoid mintákat -70 °C-on tároltuk.

Nagyfelbontású folyadék kromatográfia (HPLC)

A bepárolt karotinoid mintákat 100 µg/ml 150 µl butilált hidroxitoluénal kiegészített tetrahidrofuranban oldottuk, amelyből 2 µl-t injektáltunk az oszlopra. Az elválasztás Prodigy ODS3 (4,6x150, ODS 3µm) oszlopon (Phenomenex) történt. A folyadék fázisként használt „A” oldószer metanol és víz 96:4 arányú elegye, a „B” oldószer pedig 100% metil-*terc*-butil éter, az áramlási sebesség 1 ml/perc volt. A grádiens elválasztás paramétereit a következők szerint állítottuk be (perc/A oldószer mennyisége %-ban/B oldószer mennyisége %-ban): 0/99/1; 8/60/40; 13/46/54; 15/0/100; 18/0/100; 21/99/1 és 25/99/1. A detektálás 450 nm-en történt, az oszlop hőmérséklete 35 °C volt. A karotinoidok azonosításához a következő gyári standardokat használtunk: asztaxantin, likopin és β-karotin (Sigma); β-kriptoxantin, kantaxantin és zeaxantin (Carl Roth); míg a γ-karotin azonosításához *M. azygosporus* micéliumából HPLC-vel tisztított standardot használtunk.

6. Eredmények és értékelés

6.1 Különböző *X. dendrorhous* törzsek *crtS* génjének felszaporítása és összehasonlító vizsgálata

A három felhasznált *X. dendrorhous* törzsből származó *crtS* gént az „Anyagok és módszerek” fejezetben leírt módon felszaporítottuk, majd a pBluescript II KS plazmidba történő klónozás után 10-10 klón szekvenciáját meghatároztuk. A négy gén által kódolt fehérjék feltételezett aminosav sorrendjének összehasonlítását a 3. ábra tartalmazza.

```
crtS1      MFILVLLTGALGLAAPSMASTAFFSLYLAPRSSLYNLQGPNTNFTCNFLDILSARTG 60
crtS2      MFILVLLTGALGLAAPSMASTAFFSLYLAPRSSLYNLQGPNTNFTCNFLDILSARTG 60
crtS3      MFILVLLTGALGLAAPSMASTAFFSLYLAPRSSLYNLQGPNTNFTCNFLDILSARTG 60
crtS4      MFILVLLTGALGLAAPSMASTAFFSLYLAPRSSLYNLQGPNTNFTCNFLDILSARTG 60
*****

crtS1      EEHAKYREKYGSTLRFAGIAGAPVLNSTDKVFNHVNKEAYDYKPKGHAARVLRIATGCG 120
crtS2      EEHAKYREKYGSTLRFAGIAGAPVLNSTDKVFNHVNKEAYDYKPKGHAARVLRIATGCG 120
crtS3      EEHAKYREKYGSTLRFAGIAGAPVLNSTDKVFNHVNKEAYDYKPKGHAARVLRIATGCG 120
crtS4      EEHAKYREKYGSTLRFAGIAGAPVLNSTDKVFNHVNKEAYDYKPKGHAARVLRIATGCG 120
*****

crtS1      VVTAGEAHKQHRIRIKIPSLSAQAVKSNWPIFLKGMELVDFTTEDAAEKDHAWGESAGE 180
crtS2      VVTAGEAHKQHRIRIKIPSLSAQAVKSNWPIFLKGMELVDFTTEDAAEKDHAWGESAGE 180
crtS3      VVTAGEAHKQHRIRIKIPSLSAQAVKSNWPIFLKGMELVDFTTEDAAEKDHAWGESAGE 180
crtS4      VVTAGEAHKQHRIRIKIPSLSAQAVKSNWPIFLKGMELVDFTTEDAAEKDHAWGESAGE 180
*****

crtS1      KKATRLETHGWDVNDVGRATLDVTALAGFDYKSDSLQNKTNELVAFVGLTDCGFAPTL 240
crtS2      KKATRLETHGWDVNDVGRATLDVTALAGFDYKSDSLQNKTNELVAFVGLTDCGFAPTL 240
crtS3      KKATRLETHGWDVNDVGRATLDVTALAGFDYKSDSLQNKTNELVAFVGLTDCGFAPTL 240
crtS4      KKATRLETHGWDVNDVGRATLDVTALAGFDYKSDSLQNKTNELVAFVGLTDCGFAPTL 240
*****

crtS1      $FKAINWDFVFFYFRTIKRHEIPLTQGLAVSRVVGIELMEQKQAVLGSASDAQVDKDV 300
crtS2      $FKAINWDFVFFYFRTIKRHEIPLTQGLAVSRVVGIELMEQKQAVLGSASDAQVDKDV 300
crtS3      $FKAINWDFVFFYFRTIKRHEIPLTQGLAVSRVVGIELMEQKQAVLGSASDAQVDKDV 300
crtS4      $FKAINWDFVFFYFRTIKRHEIPLTQGLAVSRVVGIELMEQKQAVLGSASDAQVDKDV 300
*****

crtS1      QGRDILSLIVRAMIAANLPESQKLSDEEVLAQISNLLFAGYETSSTVLTUMFHLSEDKA 360
crtS2      QGRDILSLIVRAMIAANLPESQKLSDEEVLAQISNLLFAGYETSSTVLTUMFHLSEDKA 360
crtS3      QGRDILSLIVRAMIAANLPESQKLSDEEVLAQISNLLFAGYETSSTVLTUMFHLSEDKA 360
crtS4      QGRDILSLIVRAMIAANLPESQKLSDEEVLAQISNLLFAGYETSSTVLTUMFHLSEDKA 360
*****

crtS1      VQDKLPEEICCIDTDMPTLDELNALPYLEAFWESLRDPPSPYANRECLNDCFIPLAE 420
crtS2      VQDKLPEEICCIDTDMPTLDELNALPYLEAFWESLRDPPSPYANRECLNDCFIPLAE 420
crtS3      VQDKLPEEICCIDTDMPTLDELNALPYLEAFWESLRDPPSPYANRECLNDCFIPLAE 420
crtS4      VQDKLPEEICCIDTDMPTLDELNALPYLEAFWESLRDPPSPYANRECLNDCFIPLAE 420
*****

crtS1      PVIGRDGGSVINFVRITNGTNHPLPLFNINPSKFTYGEDAEFRPERMLECVTDSLNSIEA 480
crtS2      PVIGRDGGSVINFVRITNGTNHPLPLFNINPSKFTYGEDAEFRPERMLECVTDSLNSIEA 480
crtS3      PVIGRDGGSVINFVRITNGTNHPLPLFNINPSKFTYGEDAEFRPERMLECVTDSLNSIEA 480
crtS4      PVIGRDGGSVINFVRITNGTNHPLPLFNINPSKFTYGEDAEFRPERMLECVTDSLNSIEA 480
*****

crtS1      PYGHQASFISGPRACFGWFAVAEMKAPLFVTLRVQFEPIISHPYEHITLIISRPRIV 540
crtS2      PYGHQASFISGPRACFGWFAVAEMKAPLFVTLRVQFEPIISHPYEHITLIISRPRIV 540
crtS3      PYGHQASFISGPRACFGWFAVAEMKAPLFVTLRVQFEPIISHPYEHITLIISRPRIV 540
crtS4      PYGHQASFISGPRACFGWFAVAEMKAPLFVTLRVQFEPIISHPYEHITLIISRPRIV 540
*****

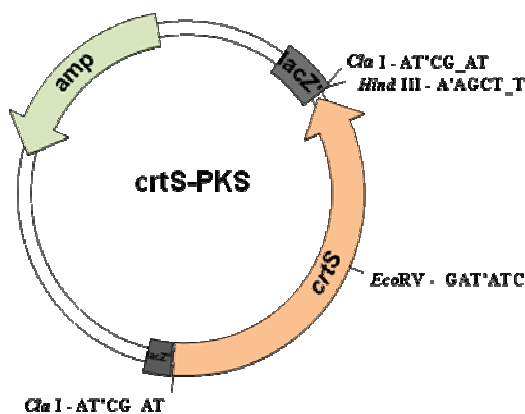
crtS1      GREKEGYQMLQKFP--- 555
crtS2      GREKEGYQMLQKFPANG 558
crtS3      GREKEGYQMLQKFPVLI- 557
crtS4      GREKEGYQMLQKFPVLI- 557
*****
```

3. ábra: A *X. dendrorhous* törzsekből felszaporított *crtS* gének által kódolt fehérjék feltételezett aminosav sorrendjének összehasonlítása.

A *X. dendrorhous* ATCC 24229 vad típusú és az ATCC 24229/R119 asztaxantint túltermelő mutáns törzsekből egy kópiában izoláltuk a *crtS* gént, ezek a *crtS1* és *crtS2* neveket kapták, azonban a CBS 6938 vad típusú törzsből két, egymástól szekvenciájában eltérő gént izoláltunk. Ezeket *crtS3*-nak és *crtS4*-nek neveztük el. Ezek az eredmények azt jelzik, hogy ez a törzs heterozigóta erre a génre nézve. A *X. dendrorhous* törzsek ploiditása kérdéses (Lukács és mtsi, 2006), különböző szerzők diploid, aneuploid és poliploid állapotot is feltételeznek (Nagy és mtsi, 1997; Medwid és mtsi, 1998; Hermosilla és mtsi, 2003). A négy gén szekvenciája nagyfokú hasonlóságot mutatott, azonban a *crtS4* aminosav szekvenciája egy rövidebb szakaszon eltért a többi hárométól. Ez az eltérés a feltételezett oxigénkötő helyet tartalmazó motívumot (³³⁹AGYETS³⁴⁴) is érinti. Az ATCC 24229 és az asztaxantin túltermelő mutáns ATCC 24229/R119 törzsek *crtS* génjei által kódolt fehérjék esetében 3 aminosavban tapasztaltunk eltérést. A géneket a továbbiakban olyan expressziós vektorokba klónoztuk, amik lehetővé teszik *M. circinelloides*-ben történő kifejeztetésüket.

6.2 A *crtS* gént hordozó expressziós vektorok létrehozása

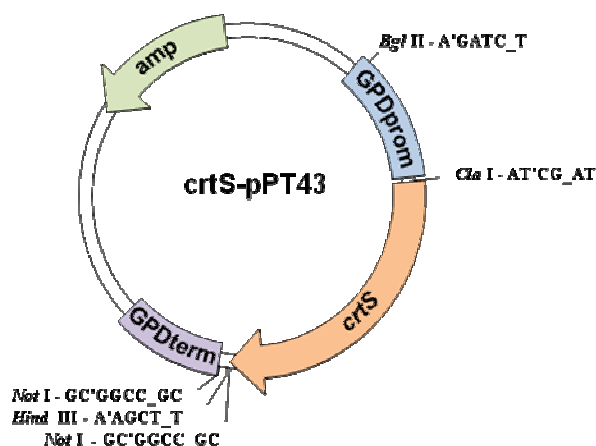
Az expressziós vektorok építésénél a *Pfu*-val felszaporított *crtS2*, *crtS3* és *crtS4* géneket először *EcoRV* emésztett pBluescript II KS plazmidba (Fermentas) klónoztuk, majd az így kapott *crtS*-pKS konstrukciókat baktériumba transzformáltuk (4. ábra).



4. ábra. A *crtS*-pKS plazmidkonstrukciók általános sémája az alkalmazott restriktív endonukleázok hasítási helyeivel.

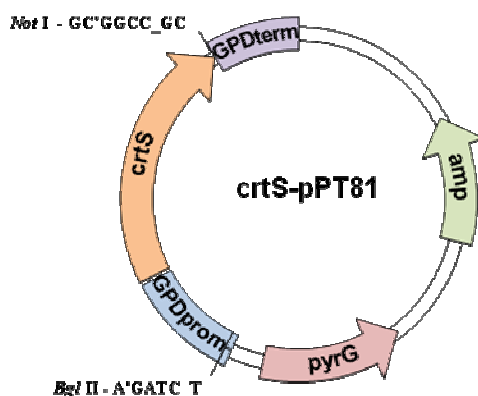
A transzformánsokat minden esetben ampicillin tartalmú LB táptalajon neveltük, a rezisztenciát a plazmidokon található β -laktamáz biztosította. A transzformáns telepekből

plazmidot tisztítottunk, majd *Cla*I és *Hind*III restrikciós endonukleázokkal kihalásítottuk a *crtS* géneket és a pPT43 plazmid (Papp és mtsi, 2006) *gpd1* (glicerinaldehid-3-foszfát dehidrogenáz) promóter és terminális régiók közé ligáltuk, hogy a heterológ géneket kifejeztethessük a gombában. A *crtS*-pPT43 plazmidokat (5. ábra) ezután *E. coli*-ba transzformáltuk.



5. ábra: *crtS*-pPT43 plazmid konstrukciók általános rajza a használt enzimek hasítási helyeivel.

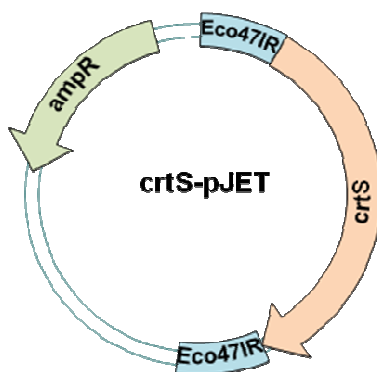
A tisztított plazmidokból *Bgl*III és *Not*I enzimekkel kivágtuk az összeépített *gpd1* promóter-*crtS* régiókat és ezt a pPT81 plazmid (Csernetics és mtsi, 2011) megfelelő helyére ligáltuk.



6. ábra: *M. circinelloides* transzformációjához használt *crtS*-pPT81 plazmid konstrukciók. A plazmidok a *crtS* gént a *Mucor gpd1* promóter és terminális régiók között hordozzák és tartalmazzák a *Mucor pyrG* szelekciós markergént is.

A pPT81 plazmid tartalmazza a *pyrG* gént, amely az MS12 uracil auxotrófiájának komplementálásával lehetővé teszi a transzformáns gombatörzsek szelekcióját. A kész plazmid konstrukciókat (6. ábra) kompetens *E. coli* sejtekbe transzformáltuk.

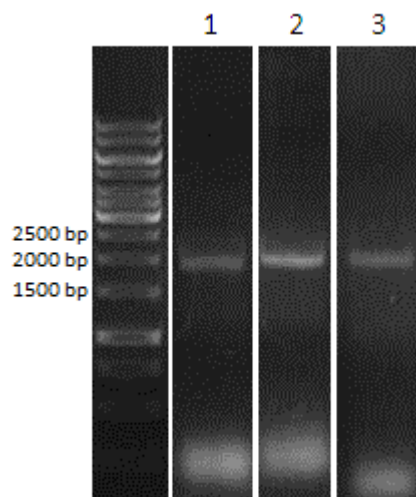
A *X. dendrorhous* ATCC 24229 vad típusú törzsből a *crtS1* gént Fusion High Fidelity Taq-kal felszaporítottuk és pJET klónozóvektorba ligáltuk (7. ábra), amely klónozó régiójában letális gént tartalmaz szelekciós markerként. Terveink között szerepel az MS12-ben való kifejeztetésre alkalmas plazmid konstrukció létrehozása ezzel a génnel is.



7. ábra: pJET vektorba ligált *crtS* gén

6.3 A *M. circinelloides* MS12 törzsének transzformációja a *crtS* géneket hordozó cirkuláris plazmidokkal

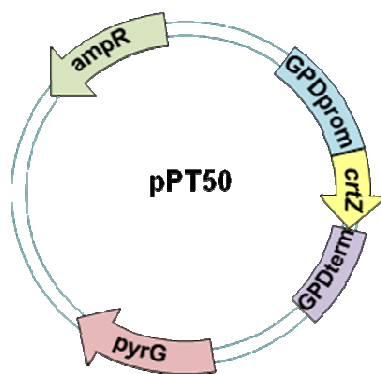
A transzformációt az „Anyagok és módszerek” fejezetben ismertetett módon hajtottuk végre. Egy transzformációs kísérletben 10^5 protoplasztot transzformáltunk 10-15 μ g DNS-el. A transzformációs gyakoriság 20-30 transzformáns/ 10^5 protoplaszt volt. Minden transzformánsból 7-7 egyedi telepet oltottunk tovább, így mindegyik plazmid esetében 7 transzformáns törzset vizsgáltunk részletesen. Ezek a transzformánsok az MS12-*crtS*21-7, MS12-*crtS*31-7 és MS12-*crtS*41-7 jelzést kapták. A vad típushoz képest a transzformáns telepek esetében az első átoltás után jelentős színváltozás nem volt megfigyelhető. A transzformánsokból összDNS-t tisztítottunk, amelyekből PCR technikával igazoltuk a *crtS* gén jelenlétét. A gélfotón 3 transzformáns törzsből felszaporított *crtS* gén fragmentum látható (8. ábra). A futtatásnál 1kb-os markert használtunk (Fermentas).



8. ábra: A transzformánsokból PCR technikával felszaporított *crtS* génszakaszok. 1- MS12-*crtS*4/1; 2- MS12- *crtS*2/1; 3- MS12-*crtS*3/5.

6.4 *M. circinelloides* MS12+pCA8lf törzs transzformációja

A kantaxantin-termelő mutáns törzset tanszékünkön állították elő, amely a genomba integráltan hordozza a *Paracoccus* sp. N81106 *crtW* génjét (Papp és mtsi, 2012; Csernetics, 2011). Ebbe a transzformánsba jutattuk be a *crtS* géneket, valamint a *crtZ* gént (9. ábra) hordozó cirkuláris plazmidokat protoplaszt transzformációval. A transzformációs gyakoriság 10 transzformáns telep/ 10^5 protoplaszt volt.

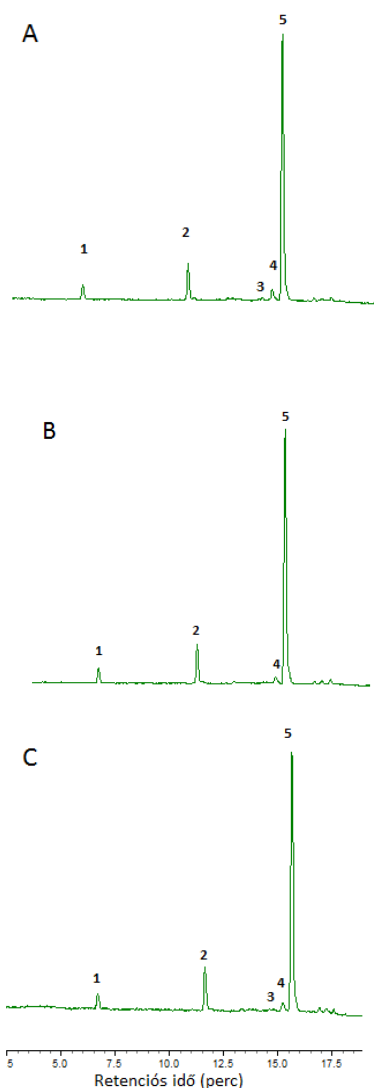


9. ábra: A *crtZ* gént hordozó cirkuláris plazmid.

6.5 A transzformánsok karotinoid termelésének vizsgálata

Karotinoidokat tisztítottunk néhány kiválasztott transzformáns törzsből a transzformációt követő 4. átvétel után, valamint kontrollként az MS12 és az MS12+pCA8lf törzsekből.

A karotinoid kivonás után a nitrogén gáz alatt beszárított mintákat petroléterben újra felvettük, majd spektrofotométerrel 450 nm-en megmértük az optikai denzitásukat (OD). A kapott OD értékekből 1 g szárazanyagra vonatkoztatott összkarotinoid tartalmat számoltunk. Extinkciós koefficiensként 2500-al számoltunk (Rodriguez-Amaya, 2001). A karotinoid összetételt HPLC analízissel határoztuk meg. Ennek eredményét a 2. táblázat foglalja össze. A 10. ábrán az MS12 és 2 *crtS*-t tartalmazó transzformáns HPLC kromatogramja látható.



10. ábra: Néhány transzformáns karotinoid termelésének HPLC kromatogramja. A - MS12; B - MS12-*crtS4/6* ; C - MS12-*crtS3/1*. 1-zeaxantin; 2- β -kriptoxantin; 3-likopin; 4- γ -karotin; 5- β -karotin

A csak a *crtS* gént hordozó transzformáns törzsekben továbbra is a β -karotin maradt a legnagyobb mennyiségben termelt karotinoid, azonban az MS12-*crtS2/1* és az MS12-*crtS3/1* törzsekben megnőtt a β -kriptoxantin mennyisége. A zeaxantin koncentrációja jelentős mértékben nem változott a transzformánsokban az MS12 törzshöz képest. A 7

vizsgált transzformáns közül hatban mutattuk ki kis mennyiségű kantaxantin jelenlétét, amely a β -karotin kétszeresen ketolált származéka. Ezek az eredmények igazolják, hogy a *X. dendrorhous crtS* génje által kódolt enzim β -karotin hidroxiláz és β -karotin ketoláz aktivitással egyaránt rendelkezik.

2. táblázat: Az MS12 és a *crtS* és *crtW* géneket hordozó transzformánsok karotinoid termelése. Az összkarotinoid tartalmak 1 g szárazanyag tartalomra vonatkoztatva ($\mu\text{g/g}$) és az egyes karotinoidok mennyisége (μg). A táblázat tartalmazza a transzformánsokba bejuttatott *crtS* gént hordozó plazmidok kópiaszámát is (kópiaszám/genom).

Törzs	<i>crtS</i> kópiaszám	Össz- karotinoid	β - karotin	Ehinenon	β - kriptoxantin	Kantaxantin	Zeaxantin	Asztaxantin
MS12	-	412	289	-	38	-	19	-
MS12- <i>crtS</i> 2/1	4	360	199	3	44	-	16	-
MS12- <i>crtS</i> 2/6	5	345	213	5	34	7	19	1
MS12- <i>crtS</i> 4/4	9	361	256	-	40	4	13	-
MS12- <i>crtS</i> 4/6	4	481	315	6	55	2	20	3
MS12- <i>crtS</i> 3/1	6	455	319	3	60	4	20	-
MS12- <i>crtS</i> 3/3	2	401	275	2	38	5	15	-
MS12- <i>crtS</i> 3/5	5	512	353	3	53	3	21	-
MS12+pCA8lf	-	529	29	112	40	162	4	8
MS12+pCA8lf+ <i>crtS</i> 2/1	8	408	29	77	33	106	4	4
MS12+pCA8lf+ <i>crtS</i> 2/2	4	581	35	127	46	179	4	2
MS12+pCA8lf+ <i>crtS</i> 4/1	2	494	37	115	37	131	2	4
MS12+pCA8lf+ <i>crtS</i> 3/1	1	694	48	123	52	202	8	6
MS12+pCA8lf+ <i>crtS</i> 3/2	1	398	29	79	33	85	4	4

Az MS12+pCA8lf transzformáns az MS12 törzs genomjába integrálva hordozza a bakteriális β -karotin ketolázt kódoló *crtW* gént. Ebben a törzsben a β -karotin koncentrációja alacsonyabb, mint az ehinenon és a kantaxantin mennyisége, amelyek a β -karotin ketolált származékai. A *crtS* gén kifejeztetése után a hidroxilált termékek mennyisége nem változott, azonban egy MS12+pCA8lf+*crtS*2-es és egy MS12+pCA8lf+*crtS*3-es transzformáns esetében a ketolált származékok és az összkarotinoid mennyiségében is növekedés volt megfigyelhető a csak *crtW* gént hordozó törzzsel összehasonlítva.

Mindkét mérési eredményből kitűnik, hogy a *crtS* gén terméke ketoláz aktivitással is rendelkezik, azonban minden transzformáns esetében alacsony maradt az asztaxantin mennyisége.

6.6 Különböző szénforrások és a hőmérséklet hatása a *crtW* és *crtZ* gént hordozó transzformánsok karotinoid termelésére

Egyik célkitűzésünk volt, hogy a tanszéki kutatócsoport által korábban előállított MS12+pPT51R2 és az MS12+pCA8lf transzformánsok karotinoid termelését megvizsgáljuk különböző, a korábbi kísérletek során karotinoid termelést fokozónak, vagy nagyobb mértékű β -karotin – kantaxantin konverziót eredményezőnek talált, tenyésztési körülmények között. Az eredményeket a 1. melléklet foglalja össze.

A csak dihidroxi-acetont (DHA) tartalmazó táptalajon nevelt MS12+pCA8lf összkarotinoid tartalma ugyan lecsökkent 1% és 0,5%-os koncentrációnál is, azonban a kantaxantin, a zeaxantin és az asztaxantin százalékos aránya jelentős mértékben megnőtt, míg az MS12+pPT51R2 esetében a γ -karotin és a kantaxantin koncentrációja növekedett meg.

Általánosan elmondható, hogy a glükóz+DHA tartalmú táptalajon nevelt törzsek összkarotinoid-termelése megnőtt, ezen belül pedig a γ -karotin, ehinenon, β -kriptoxantin és a kantaxantin arányának növekedését tapasztaltuk. Az ammónium-szulfát koncentrációjának növelése mindkét törzs összkarotinoid tartalmát csökkentette, azonban a kantaxantin termelésben itt is növekedést tapasztaltunk..

Az MS12+pCA8lf és MS12+pPT51R2 törzsek nagy mennyiségben termeltek kantaxantint, az asztaxantin koncentrációja viszont alacsony maradt; feltételezhetően a *Mucor* β -karotin hidroxiláza nem képes a kantaxantint szubsztrátjaként hasznosítani. Ezért ezekbe a transzformánsokba bejuttattuk a *Paracoccus* sp. N81106 *crtZ* génjét hordozó pPT50 cirkuláris plazmidot. Az így nyert törzsek az MS12+pCA8lf+pPT50 és MS12+pPT51R2+pPT50 jelzéseket kapták. A transzformánsok asztaxantin termelése megnőtt az eredeti, recipiens törzsekéhez képest. Ezen transzformánsok karotinoid termelését is megvizsgáltuk különböző tenyésztési körülmények mellett.

Az MS12+pPT51R2+pPT50 transzformáns karotinoid termelésének változásait a 3. táblázat foglalja össze. Az transzformáns összkarotinoid tartalmát a glükózhoz képest a

trehalóz és a mannóz nagymértékben fokozta, a trehalóz emellett a β -kriptoxantin, a mannóz pedig az ehinenon, kantaxantin és asztaxantin termelésében eredményezett növekedést. Az összkarotinoid tartalomra a DHA negatívan hatott, viszont a kantaxantin és zeaxantin mennyiségét növelte. A γ -karotin termelése cellobióz, glicerín-L-monoacetát, DHA és maltóz hatására csökkent.

A hőmérséklet hatásának vizsgálata során megállapítottuk, hogy a transzformáns karotinoid termelése 30 °C-on volt a legmagasabb. A magasabb hőmérséklet a hidroxilált és ketolált karotin származékok mennyiségének csökkenését eredményezte. 20 °C-on a β -karotin maradt a fő termelt karotinoid.

3. táblázat: Az MS12+pPT51R2+pPT50 transzformánsok összkarotinoid tartalma 1 g szárazanyagra vonatkoztatva ($\mu\text{g/g}$) és a termelt karotinoidok mennyisége (μg) látható különböző szénforrások jelenlétében valamint különböző hőmérsékleten történő tenyésztés során.

Szénforrás	Össz-karotinoid	Likopin	β -karotin	γ -karotin	Ehinenon	β -kriptoxantin	Kantaxantin	Zeaxantin	Asztaxantin
glükóz	611	19	201	65	137	10	27	12	14
fruktóz	694	16	233	68	165	10	23	16	17
L-aszparaginsav	400	10	72	44	101	7	19	13	17
trehalóz	806	17	309	71	159	21	29	16	12
mannóz	734	21	175	80	202	7	39	17	28
galaktóz	635	12	261	50	123	17	22	13	8
cellobióz	345	7	103	18	66	14	16	12	7
glicerín-L-monoacetát	465	6	200	22	67	14	23	9	6
DHA	395	5	54	17	70	16	69	29	11
maltóz	449	9	183	25	52	16	16	9	8
glükóz 20°	614	20	262	51	90	20	20	10	6
glükóz 30°	694	21	206	73	105	18	31	12	30
glükóz 37°	447	16	199	55	26	10	3	4	4

Az MS12+pCA8lf+pPT50 karotinoid termeléséből mért adatok az 4. táblázatban láthatók. Az összkarotinoid tartalmat az L-aszparaginsav, a trehalóz és a mannóz és DHA jelentősebb mértékben csökkentette. Glükózzal együtt a DHA az összkarotinoid, ezen belül pedig a likopin, β -kriptoxantin, kantaxantin és asztaxantin termelésre serkentőleg hatott. A β -karotin tartalom glicerín-L-monoacetát jelenlétében növekedett jelentősen.

A 20 és 37 °C-on történő nevelés során a β -karotin, γ -karotin és ehinenon volt a fő termék. A 30 °C-on a likopin, a γ -karotin, valamint az asztaxantin koncentrációjának emelkedését tapasztaltuk.

4. táblázat: Az MS12+pCA8lf+pPT50 összkarotinoid tartalma 1 g szárazanyagra vonatkoztatva ($\mu\text{g/g}$) és az egyes karotinoidok mennyisége (μg) különböző szénforrások és szénforráskombinációk jelenlétében valamint különböző hőmérsékleteken.

Szénforrás	Össz-karotinoid	Likopin	β -karotin	γ -karotin	Ehinenon	β -kriptoxantin	Kantaxantin	Zeaxantin	Asztaxantin
glükóz	737	24	146	87	203	24	103	14	6
fruktóz	705	22	134	81	195	19	97	11	6
L-aszparaginsav	259	6	32	26	64	9	47	6	5
trehalóz	409	10	57	33	108	12	80	10	6
mannóz	497	19	75	59	143	23	74	10	5
galaktóz	579	17	124	54	150	15	86	16	7
glicerín-L-monoacetát	588	13	201	45	124	8	75	12	5
DHA	207	4	24	11	30	6	58	8	5
glükóz+DHA	1145	129	52	141	223	127	319	2	28
glükóz 20°	653	19	168	71	171	13	68	13	3
glükóz 30°	507	32	94	87	98	16	49	10	6
glükóz 37°	500	23	182	73	73	9	16	3	1

Mindezek alapján elmondható, hogy azonosítottunk olyan tenyésztési körülményeket, amelyek mellett a *crtW* és a *crtZ* gént is hordozó transzformánsokban a kantaxantin, illetve az asztaxantin mennyisége emelkedett.

6.7 A *crtZ* gén integrációja a *crtW* gént hordozó transzformánsokba

Terveink között szerepelt a *crtZ* gén integrációja a *crtW* gént hordozó MS12+pCA8lf és MS12+51R2 törzsek genomjába. Az integráció nehezen kényszeríthető ki járomspórás gombákban, de a tanszéki kutatócsoport több módszert is sikerrel alkalmazott *M. circinelloides* esetében. Az egyik módszer ezek közül a REMI, ennek során a linearizált fragmentum mellett azokat a restriktációs endonukleázokat is a protoplasztokhoz adjuk, amelyekkel linearizáltuk a transzformáló fragmentumot. Ezek az endonukleázok a genomi

DNS hasításával lehetőséget nyújtanak a bejuttatott fragmentum integrációjára a gomba genomjába az újbóli összerendeződés során.

Esetünkben a transzformáláshoz használt fragmentum tartalmazta a *crtZ* gént a *Mucor gpd1* promóter és terminális régiók közé építve, valamint a az uracil auxotrófiát komplementáló *pyrG* szelekciós gént.

A transzformáló vektorok készítéséhez a *crtZ* gént tartalmazó pPT50 plazmidot a *NaeI-NcoI* és a *PvuI-NcoI* enzimpárokkal emésztettük. Az így kapott fragmentumokat a 11. ábra mutatja be. A linerizált DNS-ekkel megkezdtük a *crW* gént hordozó kantaxantin termelő mutáns törzsek REMI transzformációját.



pPT50 REMI

11. ábra: A *crtZ* gént hordozó lineáris fragmentum.

7. Összefoglalás

Munkánk során felszaporítottuk a *X. dendrorhous* ATCC 24229, ATCC 24229/R119 és CBS 6938 törzsek *crtS* génjét. A géneket plazmidokba klónoztuk és elvégeztük a kódolt aminosav sorrendek összehasonlító vizsgálatát. A *X. dendrorhous* CBS 6938 törzséből két, szekvenciájában eltérő gént szaporítottunk fel. A géneket hordozó expressziós vektorokat építettünk és sikerrel transzformáltuk a β -karotin termelő *M. circinelloides* MS12 kétszeresen auxotróf törzsét.

Korábban igazolták, hogy a *crtS* gén által kódolt enzim β -karotin hidroxiláz aktivitással és feltételezett β -karotin ketoláz aktivitással is rendelkezik. Vizsgálataink során kimutattuk kis mennyiségű kantaxantin termelődését a vizsgált transzformánsok többségében. Mivel ez a molekula a β -karotin kétszeresen ketolált származéka, kísérleteink igazolják a *crtS* gén által kódolt enzim β -karotin ketoláz aktivitását is.

Létrehoztunk egy, a *crtZ* gén integrációjára alkalmas vektort, amellyel megkezdtük a *crtW* gént már hordozó mutáns törzsek integratív transzformációját.

Tanszékünkön korábban létrehozott, a *crtW* gént integrálva hordozó mutáns MS12 törzsek karotinoid termelését megvizsgáltuk különböző szénforrást tartalmazó táptalajon, hogy fokozzuk a kantaxantin és az asztaxantin mennyiségét. Az MS12+pCA8lf esetében a 0,5% DHA és az 1% ammónium-szulfát hatására, az MS12+pPT51R2 esetében pedig a 0,5% és 1% DHA és az 1% és 1,5% ammónium-szulfát hatására a kantaxantin mennyiségének növekedését tapasztaltuk.

Ugyanezen törzseket a *crtZ* gént hordozó pPT50 cirkuláris plazmiddal transzformálva korábban sikerült fokozni az asztaxantin koncentrációját. Ezeket a transzformáns törzseket különböző szénforrást tartalmazó táptalajon és különböző hőmérsékleten tenyésztve (pl. L-aszparaginsavon, mannózon és 30°C-os hőmérsékleten) tovább sikerült fokoznunk az értékes ketolált, valamint a ketolált és hidroxilált karotinoidok mennyiségét. A szénforrások kombinációban történő alkalmazása (pl. glükóz+dihidroxi aceton) eredményezte a legnagyobb mennyiségű karotinoid termelést és egyben a legtöbb asztaxantint.

További terveink között szerepel az ATCC 24229 törzsből származó *crtS1* gén kifejeztetése a β -karotin és a kantaxantin termelő mutáns MS12 törzsekben, valamint a *crtZ* gén integrációja a *crtW* gént hordozó mutánsokban.

8. Irodalomjegyzék

- Alcaíno, J., Barahona, S., Carmona, M., Lozano, C., Marcoleta, A., Niklitschek, M., Sepúlveda, D., Baeza, M., Cifuentes, V. (2008) Cloning of the cytochrome p450 reductase (*crtR*) gene and its involvement in the astaxanthin biosynthesis of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. BMC Microbiology 8:169 DOI: 10.1186/1471-2180-8-169.
- Álvarez, V., Rodríguez-Sáiz, M., de la Fuente, J.L., Gudiña, E.J., Godio, R.P., Martín, J.F., Barredo, J.L. (2006) The *crtS* gene of *Xanthophyllomyces dendrorhous* encodes a novel cytochrome-P450 hydroxylase involved in the conversion of β -carotene into astaxanthin and other xanthophylls. Fungal. Genet. Biol. 43: 261–272.
- Csernetics, Á., Nagy, G., Iturriaga, E.A., Szekeres, A., Eslava, A.P., Vágvölgyi, Cs., Papp, T. (2011) Expression of three isoprenoid biosynthesis genes and their effects on the carotenoid production of the zygomycete *Mucor circinelloides*. Fungal. Genet. Biol. 48: 696-703.
- Csernetics, Á. (2011) Karotintermelő járomspórás gombák genetikai módosításának lehetőségei. Ph.D. értekezés. SZTE, Szeged.
- Edge, R., McGarvey, D.J., Truscott, T.G. (1997) The carotenoids as anti-oxidants - a review J. Photoch. Photobio. B. 41: 189-200.
- Goswami, G., Chaudhuri, S., Dutta, D. (2010) The present perspective of astaxanthin with reference to biosynthesis and pharmacological importance World J. Microbiol. Biotechnol. 26: 1925–1939.
- Hermosilla, G., Martinez, C., Retamales, P., León, R., Cifuentes, V. (2003) Genetic determination of ploidy level in *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Antonie van Leeuwenhoek, 84: 279–287.
- Iturriaga E.A., Díaz-Minguez J.M., Benito E.P., Álvarez M.I., Eslava A.P. (1992) Heterologous transformation of *Mucor circinelloides* with the *Phycomyces blakesleeanus leu1* gene. Curr. Genet. 21: 215-223.
- Lee, P.C., Schmidt-Dannert, C. (2002) Metabolic engineering towards biotechnological production of carotenoids in microorganisms. Appl. Microbiol. Biot. 60: 1–11.
- Lukács, Gy., Linka, B., Nyilasi, I. (2006) *Phaffia Rhodozyma* and *Xanthophyllomyces dendrorhous*: astaxanthin-producing yeasts of biotechnological. Acta Alimentaria, 35: 99–107.

- Martín, J.F., Gudiña, E., Barredo, J.L. (2008) Conversion of β -carotene into astaxanthin: Two separate enzymes or a bifunctional hydroxylase-ketolase protein? *Microbial. Cell Factories* 7:3 DOI:10.1186/1475-2859-7-3.
- Medwid, R.D. (1998) *Phaffia rhodozyma* is polyploid. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 21: 228–232.
- Misawa, N., Satomi, Y., Kondo, K., Yokoyama, A., Kajiwarra, S., Saito, T., Ohtani, T., Miki, W. (1995) Structure and Functional Analysis of a Marine Bacterial Carotenoid Biosynthesis Gene Cluster and Astaxanthin Biosynthetic Pathway Proposed at the Gene Level. *J. Bacteriol.* 177:6575.
- Nagy, Á., Palágyi, Zs., Ferenczy, L., Vágvölgyi, Cs. (1997) Radiation-induced chromosomal rearrangement as an aid to analysis of the genetic constitution of *Phaffia rhodozyma*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 152:249–254.
- Ojima, K., Breitenbach, J., Visser, H., Setoguchi, Y., Tabata, K., Hoshino, T., van den Berg, J., Sandmann, G. (2006) Cloning of the astaxanthin synthase gene from *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*) and its assignment as a beta-carotene 3-hydroxylase/4-ketolase. *Mol. Genet. Genomics.* 275:148-58.
- Papp, T., Velayos, A., Bartók, T., Eslava, A.P., Vágvölgyi, Cs., Iturriaga, E.A. (2006) Heterologous expression of astaxanthin biosynthesis genes in *Mucor circinelloides*. *Appl. Microbiol. Biot.* 69:526–531.
- Papp, T., Csernetics, Á., Nagy, G., Bencsik, O., Iturriaga, E.A., Eslava, A.P., Vágvölgyi, Cs. (2012) Canthaxanthin production with modified *Mucor circinelloides* strains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* DOI 10.1007/s00253-012-4610-2.
- Rodríguez-Amaya, D.B. (2001) A guide to carotenoid analysis in foods. International Life Sciences Institute Press (ILSI Press), Washington, D.C, USA.
- Sieiro, C., Poza, M., de Miguel, T., Villa, T.G. (2003) Genetic basis of microbial carotenogenesis. *Int. Microbiol.* 6:11–16.
- Velayos A., Fuentes-Vicente, M., Aguilar-Elena, R., Eslava, A.P., Iturriaga, E.A. (2004) A novel fungal prenyl diphosphate synthase in the dimorphic zygomycete *Mucor circinelloides*. *Curr. Genet.* 45:371–377.
- Velayos, A., Blasco, J.L., Alvarez, M.I., Iturriaga, E.A., Eslava, A.P. (2000) Blue-light regulation of phytoene dehydrogenase (*carB*) gene expression in *Mucor circinelloides*. *Planta* 210:938-946.
- Velayos, A., Papp, T., Aguilar-Elena, R., Fuentes-Vicente, M., Eslava, A.P., Iturriaga E.A., Álvarez, M.I. (2003) Expression of the *carG* gene, encoding geranylgeranyl

pyrophosphatesynthase, is up-regulated by blue light in *Mucor circinelloides*. Curr. Genet. 43:112-120.

- Velayos, A., Eslava, A.P., Iturriaga, E.A. (2000) A bifunctional enzyme with lycopene cyclase and phytoene synthase activities is encoded by the *carRP* gene of *Mucor circinelloides*. Eur. J. Biochem. 267:5509-5519.
- Ye, R.W., Stead, K.J., Yao, H., He, H. (2006) Mutational and Functional Analysis of the β -Carotene Ketolase Involved in the Production of Canthaxantin and Asthaxantin. Appl. Environ. Microb. 72:5829-5837.

9. Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt köszönet illeti prof. Dr. Vágvölgyi Csabát, a Szegedi Tudományegyetem Természettudományi és Informatikai Kar Mikrobiológiai Tanszék vezetőjét, hogy a tanszéken lehetővé tette szakdolgozói tevékenységemet.

Hálával tartozom témavezetőmnek, Dr. Papp Tamásnak, aki szakmai tudásával és szakszerű iránymutatásával támogatta munkámat, és Dr. Csernetics Árpádnak, aki önzetlen támogatásával, türelmével és nélkülözhetetlen szakmai tapasztalatával hozzájárult sikeres munkámhoz.

Továbbá köszönet illeti Bencsik Ottót a HPLC méréseknél nyújtott segítségéért, a 309-es labor összes dolgozóját, hogy kérdéseimre náluk mindig válaszra találtam, valamint a Mikrobiológiai Tanszék munkatársait, hogy tőlük a munkámhoz szükséges minden segítséget és támogatást megkaptam.

10. Függelék

1. melléklet Az MS12+pCA8lf és az MS12+pPT51R2 transzformánsokösszkarotinoid tartalma 1 g szárazanyagra vonatkoztatva (µg/g), valamint a termelt karotinoidok mennyisége (µg) különböző táptalajokon. Szénforrások és adalékok:

Törzs	Szénforrások és adalékok	Összkarotinoid	Likopin	β-karotin	γ-karotin	Ehinenon	β-kriptoxantin	Kantaxhantin	Zeaxantin	Astaxantin
MS12+pCA8lf	glükóz	510	33	85	-	123	31	70	2	6
	1% DHA	172	7	8	7	20	11	89	2	0,3
	0,5% DHA	46	2	2	2	5	2	18	0,7	1
	glükóz+DHA	1282	161	44	159	225	151	443	2	3
	glükóz+1% ammonium szulfát	254	15	8	8	20	16	133	3	5
	glükóz+1,5% ammonium szulfát	230	7	5	5	15	11	131	3	2
MS12+pPT51R2	glükóz	289	26	18	36	61	28	70	10	3
	1% DHA	261	8	10	13	33	18	126	3	5
	0,5% DHA	87	2	3	3	8	5	39	2	2
	glükóz+DHA	959	133	36	128	161	123	300	10	2
	glükóz+1% ammonium szulfát	82	5	3	3	5	5	38	2	2
	glükóz+1,5% ammonium szulfát	61	3	3	3	5	7	21	0,5	2

11. Nyilatkozat a pályázó egyéni hozzájárulásáról a pályaműben leírt eredményekhez

Alulírott Tóth Eszter Judit a dolgozatban leírt munkafolyamatok közül a:

- kompetens *E. coli* sejtek készítését
- baktérium transzformációt és a plazmidok tisztítását
- RNS tisztítást
- cDNS szintézist
- a *crtS* gének felszaporítását
- plazmidkonstrukciók létrehozását
- protoplasztok PEG/CaCl₂-közvetített transzformációját
- genomi DNS tisztítást
- karotinoid kivonást
- plazmidkópiaszám meghatározást
- az eredmények értékelését

végezte el.

.....

Aláírás