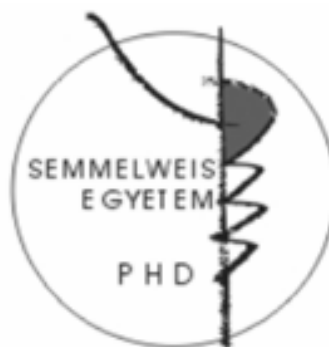


***Tagetes patula* L. géntranszformált hairy root kultúrák tíoén anyagcseréjének vizsgálata**

Doktori tézisek

Szarka Szabolcs

Semmelweis Egyetem
Gyógyszertudományi Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Szőke Éva egyetemi tanár, D.Sc.

Hivatalos bírálók: Dr. Kalász Huba tudományos szaktanácsadó, D.Sc.
Dr. Mészáros Annamária tudományos főmunkatárs, Ph.D.

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Tekes Kornélia egyetemi tanár, Ph.D.
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Varga Erzsébet egyetemi docens, Ph.D.
Dr. László Miklós tudományos főmunkatárs, Ph.D.

Budapest
2010

1. Bevezetés

A növények által szintetizált speciális anyagcseretermékek értékes vegyületeket szolgáltatnak a gyógyszer-, kozmetikai-, élelmiszeripar és a mezőgazdaság számára. A természetes eredetű hatóanyagok iránti igény napról napra nő. A műszeres analitikai módszerek nagymértékű fejlődése újabb és újabb gyógyászatilag fontos hatóanyagok, vagy potenciális hatóanyagok, feltárását teszi lehetővé.

Növényi hatóanyagok előállításának céljára a hagyományos növénytermesztési eljárások mellett előnyös lehetőséget kínál a biotechnológiai módszerek alkalmazása. A totipotens növényi sejtek kontrollált laboratóriumi körülmények között fenntartott *in vitro* tenyésztési felhasználhatók arra, hogy „kis biokémiai üzemek” módjára, értékes vegyületek állítsanak elő. Az utóbbi évtizedekben jelentős eredményeket értek el a géntranszformációs módszerekkel előállított járulékos gyökértenyészetekkel, az úgynevezett *hairy root* kultúrákkal, melyek a nem transzformált kallusz vagy sejtszuspenziós tenyészetekhez képest számos előnyös tulajdonsággal rendelkeznek. Kifejezett endogén növekedési hormon termelésük következtében a géntranszformált szövetek hormonmentes táptalajokon intenzíven növekednek. Sejtjeik nagy része specializálódott, magasabb differenciáltsági szinten van, ami nagyon gyakran elengedhetetlen feltétele a speciális anyagcseretermékek magas szintű képzésének. A *hairy root* kultúrák speciális metabolit szintézise általában meghaladja a kallusz és sejtszuspenziós kultúrákét. Mi több, az anyagcseretermékek mennyisége az intakt anyanövényhez képest is sok esetben magasabb. Biokémiai potenciáljuk hosszútávon is egyenletes, kiszámítható. Miután a differenciáció következtében egyfajta szöveti strukturáltság alakul ki, a sejtek nem korlátlanul osztódnak, így a *hairy root* kultúrák nagyobb mértékű genetikai stabilitással rendelkeznek. A genetikailag módosított szövettenyészetekből pedig genetikailag stabil transzgén növények is regenerálhatóak.

A biológiailag aktív speciális növényi anyagcseretermékek egy része bizonyítottan a külvilág káros hatásainak kivédésére szolgáló mechanizmusok fontos részét képezik. Ilyenek például az *Asteraceae* növény család jellegzetes fototoxikus hatású vegyületei, mint például a poliacetilén eredetű tiofének. Erőteljes biocid hatásuk, és az ehhez kapcsolódó kedvező hatásmechanizmusok következtében mind gyógyászati, mind mezőgazdasági alkalmazása igen perspektivikusnak ígérkezik. A biológiailag aktív bi- és tertiofének szintézise a *Tagetes patula* L. (törpe bársonyvirág) gyökérzetében kiemelkedő, ezáltal jó alapot szolgáltat magas szintű tiofén termelésre képes *in vitro* szövettenyészetek létrehozásához.

2. Célkitűzés

Doktori értekezésem tárgya a *Tagetes patula* L. tiofénvegyületeinek vizsgálata az intakt növényekben és géntranszformált *in vitro* szövettenyészetekben. A kutatási munka összeállítása során feladatainkat oly módon terveztük, hogy egymást megalapozva és kiegészítve a tiofének összehasonlító analízisétől egy produktív és stabil *in vitro* rendszer létrehozásán keresztül a tioféntermelés befolyásolásának, fokozásának kérdéseit öleljék át.

Munkánk során fontosnak tartottuk, hogy a tiofének monitorozására korunk egyik leghatékonyabb analitikai és szerkezetvizsgáló módszerét, a tömegspektrometriát alkalmazzuk. Ennek érdekében gázkromatográfiával kapcsolt tömegspektrometriás (GC-MS) analitikai módszert kívántunk kidolgozni a tiofénvegyületek növényi mátrixból történő minőségi és mennyiségi elemzésére.

A legjobb növekedési és tiofén bioszintetikus potenciállal rendelkező *T. patula hairy root* klónok szelektálása során elengedhetetlen a speciális anyagcsere műszeres analitikai vizsgálata, tekintettel arra, hogy magas szintű, stabil tiofén produkciós képességgel rendelkező, jól növekedő kultúrák létrehozását tűztük ki célul. A szelektált klónok növekedési sajátosságainak és tiofén produkciós képességeinek részletes vizsgálata mellett a szövettenyészet bioszintetikus potenciálját az indításhoz használt intakt anyanövény tulajdonságaival kívántuk összehasonlítani.

A kultúrák speciális anyagcseréjének fokozása érdekében célul tűztük ki a tenyésztési körülmények optimalizálását. A táptalaj összetételének változása a génműködés befolyásolásán keresztül hatást gyakorol a kultúrák biomassza képzésére és speciális metabolizmusára. A megfelelő alaptáptalaj kiválasztását követően fontosnak tartottuk a tiofének bioszintézisében fontos szerepet játszó kénforrások, mint például a magnézium-szulfát és szerves kénvegyületek (kéntartalmú aminosavak) hatásának vizsgálatát.

A jelen értekezésben, a témában közel három évtizede összegyűlt kutatási eredmények összefoglalásán túl, saját eredményeinkkel szeretnénk hozzájárulni a *T. patula* szövettenyészetek növekedési és bioszintetikus tulajdonságainak alaposabb megismeréséhez.

3. Anyag és módszer

3.1. Intakt növények

A vizsgált *Tagetes patula* L. (*Asteraceae*) növény szaporítóanyaga Murau-ból, Ausztriából származik. A növényeket Magyaratádon neveltük, a szabadföldi magvetést márciusban végeztük, a begyűjtés augusztusban, a teljes virágzási periódusban történt.

3.2. Genetikailag módosított hairy root kultúrák

A genetikailag módosított hairy root kultúrák létrehozása céljából a steril csíranövényeket *Agrobacterium rhizogenes* R-1601 és A4Y baktériumtörzsekkel fertőztük, mikroinjektálással. A megjelenő járulékos gyökérképződményeket, azaz hairy root klónokat izoláltuk, majd baktériummentesítés céljából antibiotikum tartalmú szilárd MS táptalajra helyeztük. A baktériummentes kultúrákat a továbbiakban 2 % szacharóz és felére csökkentett nitrogén tartalmú folyékony MS (1/2 NMS) táptalajon, klimatizált rázószekrényben (100 rpm, sötét, 22±1 °C) 3-4 hetes átoltási periódusokkal tenyésztettük.

3.3. A géntranszformáció igazolása hairy root kultúrákban PCR technikával

A sejtek feltárását dörzsmozsárban, folyékony nitrogénben végeztük. A növényi DNS izolálása Promega Wizard® Genomic DNA Purification Kit segítségével történt. A bakteriális plazmid DNS izolálását és tisztítását a QIAGEN Plasmid Mini Kit használatával végeztük.

A polimeráz láncreakciót Bio-Rad iCycler Thermal Cycler 3.021 készülékkel végeztük a *rol B* és *man 2* gének amplifikálásához tervezett specifikus primerekkel. A PCR termékeket agarózgél elektroforézis segítségével vizsgáltuk és méretük alapján azonosítottuk a keletkezett fragmenseket (*rol B*: 862 bp és *man 2*: 513 bp) UV fényben ($\lambda=312$ nm).

3.4. Mintaelőkészítési és extrakciós módszerek

Vízgőzdesztilláció

Az illékony komponenseket módosított Clevenger készülékkel 3 órás vízgőzdesztillációval vontuk ki a növényekből segédfázis alkalmazásával, mennyiségüket gravimetriásan mértük.

Statikus gőztéranalízis (sHS)

Az analíziseket CTC Combi PAL többfunkciós automata mintaadagolóval végeztük. A minta feletti légtérből 2,5 ml-es gáztömör fecskendővel 250 μ l

gőzmintát vettünk 15 perces 25 vagy 60 °C hőmérsékleten történt termosztálást követően. A fecskendő hőmérséklete 70 °C volt.

Szilárdfázisú mikroextrakció (SPME)

Az SPME CTC Combi PAL többfunkciós automata mintaadagolóval történt. Az extrakciót 65 µm PDMS/DVB bevonatú Stableflex szilika szállal végeztük. Öt perces inkubációt követően az extrakció a minta feletti légtérből 25 vagy 60 °C hőmérsékleten 10 percig tartott. Az adszorbens szálát közvetlenül a GC készülék injektorába juttattuk.

Szuperkritikus fluid fázisú széndioxid extrakció (SFE)

Az SFE kivonatokat ISCO SFX 2-10 kísérleti laboratóriumi szuperkritikus extraktor készülékkel állítottuk elő. A légszáraz porított mintákat széndioxiddal 40 °C hőmérsékleten és különböző nyomáson (10, 20, 30 vagy 40 MPa) vontuk ki, szerves módosító nélkül, illetve 20 % metanol szerves módosító alkalmazásával. A szuperkritikus fluidummal 30 percig statikus, ezt követően 60 perces dinamikus extrakciót végeztünk, majd a kivonatokat 5 ml metanolban fogtuk fel.

Oldószeres extrakció GC-MS analitikai vizsgálatokhoz

A kivonást 70 %-os metanollal ultrahangos sejtfeltáró készülékben végeztük. A kivonatok további tisztítása folyadék-folyadék extrakcióval történt. Az extraktumot n-hexán:terc-butil-metiléter (1:1, v/v) elegyével háromszor kiráztuk, majd az egyesített felső (apoláris) fázist rotációs vákuumbepárló készüléken szárazra pároltuk.

3.5. Kromatográfias vizsgálatok

Az oldószeres kivonatok frakcionálása flash kromatográfiával

A metanosos kivonatok frakcionálására automata frakciószedővel rendelkező FlashMaster II *flash* kromatográfias készüléket alkalmaztunk. A normál fázisú kromatográfia során szilika állófázissal töltött oszlopokat használtunk. Az eluens n-hexán – dioxán volt, melynek összetételét lépcsőzetes gradiens módszer szerint változtattuk. Az eluens áramlási sebessége 5 ml/perc volt, a tőféneket 340 nm hullámhosszon detektáltuk.

A fordított fázisú kromatográfia során módosított, oktadecil (C18) szilika állófázissal töltött oszlopokat használtunk. Az eluens 0,1 % hangyasav és metanol elegye volt, áramlási sebessége 2 ml/perc volt.

A vízgőzdesztillációval előállított illóolaj GC-MS vizsgálata

Az illóolajok vizsgálatát Finnigan MAT GCQ GC-MS készülékkel végeztük. A gázkromatográfias elválasztás MDN-5S analitikai kapilláris kolonnán történt. A hőmérséklet 3 perc izoterm szakasz után 60 °C-ról 8 °C/perc

felfűtési sebességgel 200 °C-ig (2 perc izoterm), 10 °C/perc-cel 230 °C-ig (5 perc izoterm), végül 10 °C/perc sebességgel 250 °C-ig változott (10 perc izoterm). A hélium vivőgáz áramlási sebessége 1,0 ml/perc, az injektor hőmérséklete 220 °C, a *splitarány* 1:62, a mintatérfogot 0,5-1,0 µl volt.

A tömegspektrométer elektronütközéses ionforrással (70 eV) rendelkezett, a tömegspektrumokat pásztázó üzemmódban vettük fel.

Az illékony komponensek SPME-GC-MS és sHS-GC-MS vizsgálata

Az illékony komponensek vizsgálatához SPME-GC-MS és sHS-GC-MS módszereket alkalmaztunk. Az analíziseket CTC Combi PAL többfunkciós automata mintaadagolóval felszerelt Agilent 6890N/5973 GC-MS készülékkel végeztük. A gázkromatográfiás elválasztás Agilent HP-5MS analitikai kapilláris kolonnán történt. A hőmérséklet 3 perc izoterm szakasz után 60 °C-ról 8 °C/perc felfűtési sebességgel 200 °C-ig (2 perc izoterm), 10 °C/perc-cel 230 °C-ig (5 perc izoterm), végül 10 °C/perc sebességgel 250 °C-ig változott (1 perc izoterm). A hélium vivőgáz áramlási sebessége konstans 1,0 ml/perc, az injektor hőmérséklete 250 °C, a *splitarány* 1:50 volt.

A tömegspektrométer elektronütközéses ionforrással (70 eV) rendelkezett, a tömegspektrumokat pásztázó üzemmódban vettük fel.

Tiofének GC-MS vizsgálata oldószeres és SFE kivonatokban

Az analíziseket CTC Combi PAL többfunkciós automata mintaadagolóval felszerelt Agilent 6890N/5973 GC-MS készülékkel végeztük. A gázkromatográfiás elválasztás Agilent HP-5MS analitikai kapilláris kolonnán történt. A kolonnatér hőmérsékletét 1 perc izoterm szakasz után 60 °C-ról 10 °C/perc felfűtési sebességgel 280 °C-ig változtattuk (7 perc izoterm). A hélium vivőgáz áramlási sebessége konstans 1,0 ml/perc, az injektált minta térfogata 1,0 µl volt. Az alábbi mintabeviteli technikákat alkalmaztuk:

- *split* injektálás 1:20 *splitarány*nal 280 °C hőmérsékleten;
- *hot splitless* injektálás (280 °C) különböző *splitless* időértékekkel;
- *hot pulsed splitless* injektálás (280 °C) 40 psi nyomáspulzussal különböző *splitless* időértékekkel;
- hőmérséklet-programozott (120-300 °C, 720 °C/perc) *pulsed splitless* injektálás 40 psi nyomáspulzussal különböző *splitless* időértékekkel.

A GC-MS vizsgálatok során a továbbiakban a hőmérséklet-programozott *pulsed splitless* mintabeviteli technikát alkalmaztuk 0,8 perces *splitless* időtartammal.

A tömegspektrométer elektronütközéses ionforrással (70 eV) rendelkezett, a tömegspektrumokat pásztázó üzemmódban vettük fel. A mennyiségi meghatározásokat szelektív ionkövetéses üzemmódban végeztük.

4. Eredmények

4.1. Kémiai analízis, módszertani fejlesztések

A *Tagetes patula* géntranszformált *hairy root* szövettenyészetek tiofénjeinek vizsgálatára egy új, gázkromatográfiával kapcsolt tömegspektrometriás (GC-MS) analitikai módszert dolgoztunk ki. Számos mintaelőkészítési technika, a statikus gőztéranalízis (sHS), szilárdfázisú mikroextrakció (SPME), vízgőzdesztilláció, oldószeres extrakció és szuperkritikus fluid fázisú széndioxid extrakció (SFE) alkalmazásával az alábbi optimális eljárásokat dolgoztuk ki.

A tiofének mellett, a statikus gőztéranalízis kivételével, mindegyik eljárás során azonosítottunk terpenoidokat is. A legnagyobb intenzitást és szelektivitást az SPME technika biztosította. Közülük, a *T. patula* intakt gyökerekben és géntranszformált *hairy root* kultúrákban három szeszkviterpént, az α -gurjunént, a β -kariofillént és a (E)- β -farnezent elsőként azonosítottuk.

Tiofének vizsgálatára egy új, GC-MS módszert dolgoztunk ki, mely minőségi és mennyiségi meghatározásra intakt és *in vitro* növényi mintákban is egyaránt alkalmas. A *T. patula* intakt gyökérzetének és a géntranszformált *hairy root* kultúrák oldószeres kivonataiban a következő nyolc tiofénvegyületet azonosítottuk: 5-(3-butén-1-inil)-2,2'-bitiofén (BBT), 5'-metil-5-(3-butén-1-inil)-2,2'-bitiofén (MeBBT), 5-(3-pentén-1-inil)-2,2'-bitiofén (PBT), 5-(4-hidroxi-1-butinil)-2,2'-bitiofén (BBTOH), 2,2':5',2''-tertiofén (α -T), 5-(4-acetoxi-1-butinil)-2,2'-bitiofén (BBTOAc), 5-metilaceto-5'-(3-butén-1-inil)-2,2'-bitiofén (AcOCH₂BBT) és 5-(3,4-diacetoxi-1-butinil)-2,2'-bitiofén [BBT(OAc)₂]. A molekulákban található kén heteroatom jellegzetes izotópmintázata lehetővé tette a tiofének egyértelmű tömegspektrometriás felismerését. A tömegspektrometriás adatok alapján lehetőség nyílt a kénatomszám becslésére, ami igen hasznosnak bizonyult a minőségi analízisek során. Az oldószeres kivonási eljárás optimalizálása során az időigényes művelet időtartamát harmadára csökkentettük anélkül, hogy a tiofének elemzésének megbízhatósága csökkent volna.

SFE módszerrel tiofénekben gazdag kivonatokat állítottunk elő. Az eljárás hatékonyságának fokozása érdekében optimalizáltuk a módszer paramétereit, tanulmányoztuk az alkalmazott nyomás és szerves módosító hatásait, végül leírtuk a rendszer jellemző analitikai paramétereit. Tiofének extrakciójára a szerves módosító nélkül 30 MPa nyomáson végzett SFE kivonás bizonyult alkalmasnak, ami gázkromatográfiás mintaelőkészítésként is tökéletesen alkalmazható.

Autentikus tiofén referenciaanyagok hiányában a *T. patula* gyökerében található fő tiofénészarmazékok izolálását normál, majd azt követően fordított fázisú *flash* kromatográfiás frakcionálás alkalmazásával kíséreltük meg. A nyers metanolos kivonatokból három nagytisztaságú tiofénvegyületet [BBT (97,0 %),

α -T (98,4 %) és BBTOAc (95,1 %)] sikerült előállítanunk. Azonosításuk és tisztasági vizsgálatuk GC-MS módszerrel történt. A három anyag közül azonban csupán a kereskedelmi forgalomban is beszerezhető α -T-t tudtuk kristályosítani.

Optimáltuk a gázkromatográfia egyik legkritikusabb műveletének, azaz a mintabeviteli rendszer paramétereit, melynek eredményeként a hőmérséklet-programozott *pulsed splitless* injektálási technika 0,8 perc *splitless time* alkalmazásával bizonyult a legérzékenyebb és legmegbízhatóbb eljárásnak tiófének analízisére.

A mérőrendszer és az oldószeres extrakciót követő GC-MS módszer validálását az ICH Q2(R1) (2005), az FDA Guidance (2001) és Balla (2006) ajánlásai alapján végeztük. A retenciós adatok ($RSD < 0,005\%$) és a csúcsterületek ($RSD < 10,7\%$) ismételhősége az előírásoknak megfelelt. Az α -T kalibrációs egyenesének korrelációs együtthatója minden esetben meghaladta a 0,99 értéket. Az α -T alsó kimutatási határa (LOD) 3,1 ng/ml, alsó meghatározási határa (LLOQ) 1,2 μ g/ml volt. Az α -T meghatározásának pontossága, torzítatlansága [11,1 % (LLOQ), 2,0 % (közepes tartomány) és 0,4 % (magas tartomány)] is megfelelt a követelményeknek. Az α -T kivonási hatékonysága $96 \pm 0,16\%$ ($RSD = 0,2\%$), visszanyerése három tartományban vizsgálva $94,6 \pm 0,72\%$ (75 μ g), $89 \pm 4,9\%$ (150 μ g) és $95 \pm 8,2\%$ (300 μ g) volt. A 72 órás poszt-preparatív stabilitási vizsgálat során a kivonatok összetételében jelentős minőségi és mennyiségi változások nem következtek be.

4.2. *Tagetes patula* intakt növény tiófénevegyületei

Az intakt növények gyökérzetének oldószeres kivonataiban a BBT, α -T és BBTOAc főkomponenseken kívül a PBT, BBTOH, AcOCH₂BBT és BBT(OAc)₂ minor összetevők is jelen voltak. A gyökérzetben $575 \pm 23,1$ μ g/g száraz súlyra vonatkoztatott α -T tartalmat mértünk.

A virágzat fő tiófének alkotói ugyanakkor a PBT és α -T voltak, mely utóbbi metabolit mennyisége száraz súlyra vonatkoztatva $312 \pm 4,2$ μ g/g volt. Kis mennyiségű BBT-n kívül más tiófének nem detektáltunk. Továbbá jelentős arányban jelentek meg hosszú szénláncú zsírsavszármazékok.

A levelek kivonatában is ezek a zsírsav komponensek domináltak, a tiófének csupán nyomokban voltak jelen. Az α -T mennyisége el sem érte a módszer LLOQ értékét.

4.3. *Tagetes patula* géntranszformált hairy root kultúrák

A *T. patula in vitro* szikleveles csíranövények hipokotil szárának *Agrobacterium rhizogenes* R-1601 és A4Y törzsekkel történt mikroinjektálása következtében létrejött számos hairy root tenyészet közül öt életképes, jó növekedési sajátságokkal rendelkező klónt izoláltunk (#TpR, #TpA1, #TpA5, #TpA6 és #TpA7). A legjobb növekedéssel és speciális metabolit, azaz tiófének

produkciónal rendelkező vonal kiválasztása érdekében klónszelekciós kísérletet végeztünk. Két vonal, a #TpA1 és #TpA6 jelű klónok egyértelműen kitűntek intenzív növekedésük és kiemelkedő α -T produkciós (118 \pm 38,4 μ g/kultúra és 121 \pm 5,2 μ g/kultúra) képességük tekintetében. Perdöntő bizonyítékként a társtiofének relatív mennyisége szolgált, amely a #TpA6 jelű klón esetén többszörösen meghaladta a konkurens vonalra jellemző értékeket.

A szelekció során kiválasztott #TpA6 jelű *hairy root* klón genetikai vizsgálata, a transzformáció igazolása PCR módszert követő gélelektroforézis segítségével történt, mely során azonosítottuk a *hairy root* tenyészet genomjába beépült transzgéneket (*man 2*, *rol B*).

A vizsgálatok következő szakaszában részletesen jellemeztük a #TpA6 jelű *hairy root* klón növekedési és tiofén produkciós tulajdonságait. A tiofén szintézise független volt a tenyészetek növekedésétől, a legmagasabb α -T tartalmat (212 \pm 58,3 μ g/g) a 3. héten, az intenzív növekedési szakaszban mértünk. A társtiofének közül a kétgyűrűs BBT szintje az α -T-hez hasonlóan a 3. héten érte el maximális értékét, ugyanakkor a tiofén-bioszintézis végtermékeinek számító két komponens, a BBTOAc és BBT(OAc)₂ mennyisége a vizsgált időszak végén, a 7. héten volt a legmagasabb. A szövettenyészetek biomassa produkciója és tiofén bioszintézise másfél éves időtartam alatt is meglehetősen stabilnak mutatkozott, az átlagos növekedési érték 10 \pm 2,1 (RSD = 20,8 %) volt. A szöveti α -T tartalom (143 \pm 34,6 μ g/g; RSD = 24,1 %), α -T produkció (95 \pm 25,3 μ g/kultúra; RSD = 26,6 %) és a társtiofének relatív mennyisége is meglehetősen kiegyenlített volt.

Összehasonlítottuk a #TpA6 jelű *hairy root* kultúra és az indításhoz használt szabadföldön termesztett intakt *T. patula* növény gyökerének tiofén összetételét. A *hairy root* kultúrákban a kétgyűrűs tiofén – BBT, BBTOAc és BBT(OAc)₂ – mennyisége az intakt gyökerekhez képest szignifikánsan, közel háromszorosára nőtt. Ezzel szemben a háromgyűrűs α -T tartalom (*hairy root* α -T: 169 \pm 9,6 μ g/g) az intakt gyökérhez képest harmadára esett vissza (intakt gyökér α -T: 590 \pm 11,1 μ g/g).

4.4. A *T. patula hairy root* klón (#TpA6) biomassa képzésének és tiofén produkciójának fokozása

Az optimális alaptáptalaj kiválasztása

A növényi szövettenyésztés során leggyakrabban alkalmazott alaptáptalajok, mint például a Gamborg B5, a Murashige-Skoog (MS) és a felére csökkentett nitrogén tartalmú MS (1/2 NMS) táptalaj, nem befolyásolták jelentősen a *hairy root* kultúrák biomassa képzését, ugyanakkor lényeges változásokat okoztak a tiofén metabolizmusban. A B5 táptalajon a BBT szintjének kismértékű emelkedését tapasztaltuk, míg az MS táptalaj a BBTOAc relatív mennyiségét növelte jelentősen. A módosított MS táptalajon (1/2 NMS)

az α -T tartalom ($122 \pm 31,1 \mu\text{g/g}$) és az α -T produkció ($98 \pm 25,1 \mu\text{g/kultúra}$) egyaránt kétszeresére nőtt.

A MgSO₄ hatása

A kísérletet 0; 370 (kontroll, 1/2 NMS táptalaj); 600 és 1600 mg/l MgSO₄-ot tartalmazó tápközegekkel végeztük. A magnéziumsó hiányában a kultúrák biomassa produkciója és tioféntartalma jelentős mértékben lecsökkent, a szövetek α -T tartalma majd a negyedére esett vissza ($42 \pm 1,2 \mu\text{g/g}$). A kontroll, normál 1/2 NMS táptalajon tenyésztett szövetekben $149 \pm 18,2 \mu\text{g/g}$ α -T tartalmat mértünk. Növekvő MgSO₄ koncentráció hatására a biomassa produkció a kontroll szinten stabilizálódott, és két tiofén, az α -T és a BBTOAc mennyisége a kontrollhoz képest szignifikánsan nőtt, míg a többi társtiofén szintje a kontroll értéken állandósult. Az 1600 mg/l MgSO₄ tartalmú táptalajon tenyésztett kultúrák α -T tartalma ($242 \pm 29,5 \mu\text{g/g}$) a kontroll másfélszeresére nőtt. A *T. patula* #TpA6 *hairy root* kultúrák jól toleráltak magasabb MgSO₄ koncentrációt is. Intézetünkben más növényfajokon végzett kísérletek eredményei ugyanis azt mutatták, hogy a táptalaj magasabb MgSO₄ tartalma (kb. 1000 mg/l) már egyaránt gátolta a biomassa képzést és a speciális metabolit produkciót. Ezt mi nem tapasztaltuk, sőt további α -T és BBTOAc szintézist fokozó hatásra lehet számítani.

Kéntartalmú prekursor aminosavak hatása

A tiofének szintézisében fontos szerepet játszó kéntartalmú prekursor aminosavak, az L-cisztein és az L-metionin, jelentősen befolyásolták a *hairy root* kultúrák biomassa képzését és tiofén produkcióját. A cisztein az összes vizsgált tiofén mennyiségét szignifikáns mértékben növelte, ugyanakkor dózisfüggően gátolta a szövetek növekedését, ami végül a tiofén produkció csökkenéséhez vezetett. 1,0 mM cisztein hatására az α -T produkció a kontroll – az aminosav mentes 1/2 NMS táptalajon észlelt – érték felére csökkent. A táptalajhoz adott metionin nem növelte jelentősen a tenyészetek növekedését. Kiemelést érdemel viszont, hogy 1,0 mM koncentrációban alkalmazva a vezető tiofén komponens – a BBT – mennyisége a kontrollhoz képest 2,4-szeresére, a nyomokban előforduló AcOCH₂BBT aránya pedig 1,3-szeresére emelkedett.

5. Következtetések

Az *Agrobacterium rhizogenes* mediált géntranszformáció alkalmas magas tiofénprodukcióval rendelkező *Tagetes patula hairy root* klónok előállítására.

Megállapítottuk, hogy az illékony terpenoid komponensek vizsgálatára a szilárdfázisú mikroextrakció (SPME) kitűnően alkalmazható. Bár az SPME analízisek során és a vízgőzdesztillátumokban tioféneket is detektáltunk, azt tapasztaltuk, hogy az eljárások folyamán az egyes tiofénekre vonatkozó

szelekció nyilvánult meg, amely torz komponensarányokban, az apolárisabb, illékonyabb összetevők (BBT és α -T) dominanciájában tükröződött. A polárisabb BBTOH, és a nagyobb molekulatömegű BBT(OAc)₂ komponenseket egyáltalán nem detektáltuk. Tiofének vizsgálatára a különböző mintaelőkészítési technikák (vízgőzdesztilláció, gőztéranalízis, SPME, SFE és oldószeres extrakció) közül az SFE és az oldószeres extrakció bizonyult alkalmasnak.

A szöveti tiofének azonosítására és mennyiségi változásainak nyomonkövetésére kidolgozott szerves oldószeres extrakciót követő GC-MS módszer analitikai paraméterei, validálási adatai alapján megállapíthatjuk, hogy a vizsgált öt tiofén anyagcseretermék [BBT, α -T, BBTOAc, AcOCH₂BBT és BBT(OAc)₂] analízise pontos és ismételhető adatokat szolgáltat, megfelelő szelektivitással és érzékenységgel rendelkezik, így a tervezett biotechnológiai kísérletek rutin analitikai feladataira alkalmas.

A *T. patula* intakt növényben azonosított tiofén vegyületek megoszlása szervspecifikus mintázatot mutat. GC-MS analitikai vizsgálatokkal igazoltuk, hogy a tiofének legnagyobb számban és mennyiségben a gyökérzetben fordulnak elő, így ezt a szervet elsődleges tiofénforrásnak tekinthetjük. A virágzat jelentős α -T tartalma mellett egy kevésbé ismert tiofén, a PBT aránya emelkedik ki, ugyanakkor a többi tiofén egyáltalán nem vagy csupán nyomokban kimutatható. A levelekben tiofénszármazékokat szintén csak nyomokban találtunk. Tekintettel arra, hogy az általunk vizsgált intakt gyökerekben, a szakirodalomban fellelhető adatokhoz hasonló nagyságrendű tioféntartalmat, ugyanakkor kiemelkedően magas α -T tartalmat mértünk, a növényt alkalmasnak találtuk magas tiofénproduktív képességgel rendelkező gyökérszerű, úgynevezett *hairy root* kultúrák indításához.

Az *A. rhizogenes* mediált géntranszformáció következtében létrejött számos *hairy root* közül a legjobb növekedési tulajdonsággal és speciális metabolit, azaz tiofén produkciós képességgel rendelkező #TpA6 klónt választottuk ki további vizsgálatok céljára. Kiemelést érdemel, hogy megalapozott klónszelekció csak a teljes tiofénprofil ismeretében volt kivitelezhető. Megállapítottuk, hogy a tiofének szintézise a tenyészetek növekedésétől függetlenül játszódik le, már az intenzív növekedési fázisban is jelentős tiofénszinteket figyeltünk meg. Miután a tenyészetek táptalajában tiofének csak nyomokban fordultak elő, arra a következtetésre jutottunk, hogy a tiofének tápközegbe történő oldódásának mértéke elhanyagolható, így a szöveti szintek változását a molekulák asszimilációjának és degradációjának mértéke határozza meg.

A retrospektív vizsgálatok eredményei meggyőző bizonyítékot szolgáltatottak arra, hogy a *T. patula* növényből létrehozott #TpA6 jelű

géntranszformált *hairy root* szövettenyészet hosszútávon is meglehetősen stabil biomassza produkciós képességgel rendelkezik, amihez ráadásul egyenletes bioszintetikus potenciál társul. A szakirodalomban fellelhető adatokkal összevetve a *T. patula hairy root* kultúrák hosszú távú stabil bioszintézise jóval felülmúlta a kallusz és sejtszuszpenziós tenyészetek képességeit. Eredményeink alapján tehát a vizsgált #TpA6 jelű *hairy root* klón megfelel a szakirodalomban közölt, géntranszformált *hairy root* kultúrákkal szembeni elvárásoknak, így tífén vegyületek nagyobb léptékben történő biotechnológiai előállításában történő felhasználása igen perspektivikusnak tűnik.

Megállapítottuk, hogy a #TpA6 jelű *hairy root* kultúrában a kétgyűrűs tífének – BBT, BBTOAc és BBT(OAc)₂ – mennyisége az indításhoz használt szabadföldön termesztett intakt gyökerekhez képest szignifikánsan, közel háromszorosára nőtt. Ezzel szemben a háromgyűrűs α -T tartalom az intakt gyökérhez képest harmadára esett vissza. Mindez azt jelzi, hogy a géntranszformált kultúrák tífén anyagcseréje a két tíféngyűrűből felépülő szerkezetek bioszintézise felé tolódik el. A #TpA6 jelű géntranszformált *hairy root* klón az anyanövényhez mérten megfelelő bioszintetikus potenciállal rendelkezik, így alkalmas objektumnak találtuk a tífének produkciójának befolyásolását, növelését célzó biotechnológiai kísérletekhez.

Igazoltuk, hogy a felére csökkentett nitrogén tartalmú, módosított MS (1/2 NMS) táptalaj szelektíven növeli a kultúrák α -T tartalmát és produkcióját, mely hatás egyértelműen a nitrogénforrás mennyiségi különbségére vezethető vissza.

Bizonyítottuk, hogy a tápközegek ásványi összetevői közül a MgSO₄ kiemelkedő jelentőséggel bír. Hiányában a kultúrák biomassza produkciója és tíféntartalma jelentős mértékben lecsökkent. A szulfátmentes táptalajon a szűkös kénforrások miatt a kisebb „kénigényű” kétgyűrűs tífének felépülése preferált. A „kénszóróló” mechanizmusok aktiválódásának következtében a három kénatomot tartalmazó α -T mennyisége csökkent legjelentősebben. Növekvő MgSO₄ koncentráció hatására a biomassza produkció a kontroll szinten stabilizálódott, és két tífén, az α -T és a BBTOAc mennyisége a kontrollhoz képest szignifikánsan nőtt.

Megállapítottuk, hogy a tífének szintézisében fontos szerepet játszó kéntartalmú prekursor aminosavak közül az L-cisztein bár az összes vizsgált tífén szöveti mennyiségét szignifikáns mértékben növelte, ugyanakkor növekedésgátló hatása miatt gyakorlati jelentősége elhanyagolható. Ezzel szemben, az L-metionin szelektíven fokozta a *hairy root* kultúrák BBT tartalmát és produkcióját is.

A táptalaj összetételének optimális megválasztásával tehát jelentősen növelhetjük a *T. patula hairy root* kultúrák tioféntartalmát, sőt az egyes tiofének mennyiségének szelektív fokozása is megvalósítható. A tiofén produkció növelését célzó kísérletek eredményei alapján az alábbi javaslatokat tesszük:

- magas α -T produkciójú *hairy root* szövettenyészet létrehozásához alacsony nitrogén tartalmú 1/2 NMS táptalaj használata mellett az igen magas, akár 1600 mg/l MgSO_4 alkalmazása javasolt;
- magas BBTOAc tartalmat MS táptalajon történő hosszabb (5-6 hetes) kultivációval és 1600 mg/l MgSO_4 alkalmazásával érhetjük el;
- az AcOCH_2BBT mennyisége MS táptalajon történő tenyésztéssel és 1,0 mM metionin alkalmazásával fokozható;
- a BBT szintézise B5 táptalaj használatával és 1,0 mM metionin alkalmazásával növelhető;
- a BBT(OAc)_2 mennyisége kizárólag hosszabb tenyésztési (5-6 hetes) periódussal növelhető.

Saját publikációk jegyzéke

Az értekezés alapját képező saját közlemények

1. **Szarka Sz**, Gyurján I, László M, Héthelyi É, Kuzovkina IN, Lemberkovics É, Szőke É. (2010) GC-MS studies of thiophenes in the supercritical fluid CO_2 and solvent extracts of *Tagetes patula* L. *Chromatographia*, 71: 1039-1047 (IF: 1,098).
2. **Szarka Sz**, Héthelyi É, Kuzovkina IN, Lemberkovics É, Szőke É. (2008) GC-MS method development for the analyses of thiophenes from solvent extracts of *Tagetes patula* L. *Chromatographia*, 68: S63-S69 (IF: 1,312).
3. **Szarka Sz**, Héthelyi É, Lemberkovics É, Kuzovkina IN, Farkas E, Bálványos I, Szőke É. (2007) Essential oil constituents of intact plants and *in vitro* cultures of *Tagetes patula* L. *Journal of Essential Oil Research*, 19: 85-88 (IF: 0,368).
4. **Szarka Sz**, Héthelyi É, Lemberkovics É, Kuzovkina IN, Bányai P, Szőke É. (2006) GC and GC-MS studies on the essential oil and thiophenes from *Tagetes patula* L. *Chromatographia*, 63: S67-S73 (IF: 1,171).

Folyóiratban megjelent előadás-kivonatok

1. **Szarka Sz**, Héthelyi É, Kuzovkina IN, Lemberkovics É, Szőke É. (2009) GC-MS studies of thiophenes for the hairy root clone selection of *Tagetes patula* L. *Gyógyszerészet, Supplementum*: 111.
2. **Szarka Sz**, Héthelyi É, Lemberkovics É, Kuzovkina IN, Bálványos I, Szőke É. (2005) Investigation of volatile compounds in *Tagetes* species. *Sci Pharm*, 73: 260.

Könyvfejezet

1. **Szarka Sz**, Héthelyi É, Kuzovkina IN, Szőke É. Effects of different media on *Tagetes patula* hairy root cultures. In: Szilágyi M, Szentmihályi K (szerk.), Trace Elements in the Food Chain Vol. 3. Institute of Material and Environmental Chemistry of the HAS, Budapest, 2009: 322-326.

Fontosabb előadások hazai és nemzetközi konferenciákon

1. **Szarka Sz**, Héthelyi É, Kuzovkina IN, Lemberkovics É, Szőke É. (2010) GC-MS monitoring of thiophenes in French Marigold hairy root cultures. 28th Informal Meeting on Mass Spectrometry, Kőszeg.
2. **Szarka Sz**, Héthelyi É, Kuzovkina IN, Lemberkovics É, Szőke É. (2009) *Tagetes patula* L. hairy root klónok szelekciója GC-MS vizsgálati módszerekkel. PhD Tudományos Napok 2009, Budapest.
3. **Szarka Sz**, Héthelyi É, Kuzovkina IN, Lemberkovics É, Szőke É. (2009) *Tagetes patula* L. hairy root clone selection using gas chromatography-mass spectrometry. 27th Informal Meeting on Mass Spectrometry, Retz, Ausztria.
4. **Szarka Sz**, Héthelyi É, Gyurján I, Kuzovkina IN, Szőke É. (2008) Biocid hatású tiofének GC-MS vizsgálata. Elválasztástudományi Vándorgyűlés, Sárovar.
5. **Szarka Sz**, Héthelyi É, Kuzovkina IN, Szőke É. (2007) GC-MS method development for the analyses of thiophenes from solvent extracts of *Tagetes patula* L. hairy root cultures. 7th Balaton Symposium on High-Performance Separation Methods, Siófok.
6. **Szarka Sz**, Héthelyi É, Lemberkovics É, Kuzovkina IN, Bálványos I, Szőke É. (2005) Investigation of volatile compounds in *Tagetes* species. Joint Meeting on Medicinal Chemistry, Vienna, Ausztria.
7. **Szarka Sz**, Héthelyi É, Lemberkovics É, Kuzovkina IN, Bálványos I, Szőke É. (2005) GC and GC-MS studies on the essential oil of *Tagetes patula* L. 6th Balaton Symposium on High-Performance Separation Methods, Siófok.
8. **Szarka Sz**, Héthelyi É, Lemberkovics É, Kuzovkina IN, Bálványos I, Szőke É. (2005) Essential oil constituents of two *Tagetes* species. 36th International Symposium on Essential Oils, Budapest.
9. **Szarka Sz**, Héthelyi É, Lemberkovics É, Gerencsér G, Farkas E, Kuzovkina IN, Bálványos I, Szőke É. (2004) Essential oil constituents of *Tagetes patula* L. hairy root cultures. Symposium of Pharmaceutical Biotechnology, Trieste, Olaszország.
10. **Szarka Sz**, Gerencsér G, Kuzovkina IN, Bálványos I, Szőke É. (2003) The secondary metabolism of *Tagetes patula* L. hairy root cultures. VIII. International Conference, The biology of plant cells *in vitro* and biotechnology, Saratov, Oroszország.

Köszönetnyilvánítás

Hálás köszönettel tartozom témavezetőmnek, **Dr. Szőke Éva** professzor asszonynak, a biológiai tudományok doktorának, aki korábbi intézetvezetőként lehetőséget biztosított arra, hogy doktori kutatómunkámat elkezdhessem. Továbbá hálával tartozom hasznos tanácsaiért, a tudományos életben való eligazodást segítő nélkülözhetetlen irányításáért és szakmai fejlődésemhez nyújtott felbecsülhetetlen támogatásáért.

Köszönettel és hálával tartozom továbbá:

- a Semmelweis Egyetem Farmakognózia Intézetben **Dr. Blázovics Anna** intézetigazgató asszonynak, **Dr. Lemberkovics Éva** professzor asszonynak, **Héthelyi Évának**, az MKE műszaki szakértőjének, **Dr. Kursinszki László** docens úrnak, **Mathuny Rudolfnének**, **Dr. Bányai Péter** és **Dr. Blazics Balázs** doktorandusz kollégáimnak és **valamennyi munkatársamnak**;
- a Semmelweis Egyetem Gyógyszerészeti Intézetben **Dr. Ludányi Krisztina** docens asszonynak;
- a Semmelweis Egyetem Igazságügyi és Biztosítás-orvostani Intézetben **Dr. Sára-Klausz Gabriellának**;
- az Eötvös Loránd Tudományegyetem Növényismereti Tanszéken **Dr. Gyurján István**[†] *emeritus* professzor úrnak;
- külföldi kutatópartnerünknek, **Dr. Inna N. Kuzovkina**-nak, az Orosz Tudományos Akadémia Timiryazev Növényélettani Intézet tudományos főmunkatársának;
- valamint **Dr. Bálványos Istvánnak**, tudományos diákköri munkám témavezetőjének.

Végül, de nem utolsó sorban végtelen hálával tartozom **családomnak**, hogy doktori értekezésem elkészítése alatt kitartó megértéssel, türelemmel, szeretettel és biztatással támogattak. Külön köszönettel tartozom **nagymamámnak**, aki lehetővé tette, hogy a konyhakerti növények helyett büdöskét nevelhessek, és távollétem alatt odaadóan gondozta a növényeket.

Summary

The roots of *Tagetes patula* L. (French marigold) accumulate a wide range of sulphur-containing thiophenes having remarkable biocide effects. The purpose of our work was to produce *T. patula* hairy root clones by the *Agrobacterium rhizogenes* mediated genetic transformation and to study the biomass and special metabolite production in order to select the optimal hairy root line.

A new gas chromatographic method coupled with mass spectrometric detection (GC-MS) was developed, optimized and validated for the simultaneous analysis of thiophene compounds in the complex biological matrix.

Several hairy root clones formed after the genetic transformation by *A. rhizogenes*. The #TpA6 hairy root had the highest biomass formation and thiophene production among the clones studied; therefore it was selected for further experiments. The maximal α -T content ($212 \pm 58.3 \mu\text{g/g}$) was observed at the end of the third week, during the intensive growing period. The content of three thiophenes [BBT, BBTOAc, and BBT(OAc)₂] in hairy root tissues exceeded significantly the contents in the roots of intact field-grown plants.

A 2-fold increase of the α -T content was observed on the MS medium with reduced nitrogen content (1/2 NMS). The selection of the optimal culture medium was followed by the study of the effects of different sulphur-sources. Increasing the MgSO₄ concentration resulted 1.5-fold increase of α -T and BBTOAc contents. Cysteine increased the thiophene amounts significantly, however, considerably inhibited the biomass formation in a dose-dependent manner. Whereas, the biomass yield was not affected by the methionine added. Moreover, 1.0 mM methionine caused a 2.4-fold increase in the BBT content, and a 1.3-fold increase in the AcOCH₂BBT content.

The results of our studies suggest that the *T. patula* #TpA6 hairy root tissue cultures had fairly stable biomass production and remarkable long-term biosynthetic potential. Consequently it seems to be a promising *in vitro* plant tissue culture system that can be used for the large-scale biotechnological production of thiophenes.