

## Opponensi vélemény

Papp Tamás „**A KAROTINOID-BIOSZINTÉZIS GENETIKAI HÁTTERE ÉS MÓDOSÍTÁSÁNAK LEHETŐSÉGEI JÁROMSPÓRÁS GOMBÁKBAN**” c. akadémiai doktori értekezéséről

A karotinoidek számos biológiai funkciója, illetve közvetett, még nem teljesen tisztázott biológiai hatása ismeretes és így több elismert kutatócsoport vizsgálati célpontja.

A dolgozat vizsgálati célcsoportja, a Mucoromycota gombacsoport tagjai között ökológiai jelentőségükön kívül jó néhány orvosi, ipari, biotechnológiai, illetve mezőgazdasági szempontból fontos fajt találunk közöttük. Filogenetikai kapcsolatuk és evolúciós viszonyuk miatt intenzív kutatások tárgyát képezik, mindezt bizonyítja, hogy az utóbbi öt évben legalább 210 tudományos közlemény látott napvilágot évenként ezen a területen. A karotinoidek és azok bioszintéziséről évenként több mint 2000 publikáció jelenik meg. Így a dolgozat témaválasztásának aktualitása vitathatatlan.

Az akadémiai doktori értekezés témája – Papp Tamás eddigi munkásságának közel teljes körű, olvasmányos feldolgozása. A dolgozat a több mint két évtizedes munka tudományos eredményeit és azok gyakorlati hasznosítását foglalja össze; a saját kutatócsoport eredményei mellett a külföldi kollégák segítségével gyarapított munkásságot is bemutatja. Mindez jelölt szervezési és együttműködési készségét dicséri. Az egyes kutatási témakörök egyenként is érdekesek, alapos munkát tükröznek.

Az értekezés a szokványos struktúrától kissé eltérően szerkesztett, 136 oldal terjedelmű, plusz 16 oldalas Függelék, 15 táblázatot és 34 ábrát tartalmazó alkotás. A dolgozat tartalmazza mindazon fejezeteket, amelyek a követelményekben meghatározottak. Az indító Köszönetnyilvánítás után a „Bevezetés és Irodalmi háttér” együttesen 16 oldal terjedelmű. A nagyon tömör és lényegre törő irodalmi áttekintésben 199 hivatkozást találunk (a dolgozat összesen 377 hivatkozást tartalmaz), melyek segítségével naprakészen mutatja be a szerző a járomspórás gombák karotin bioszintézisét és genetikai módosításának lehetőségeit.

Az elmúlt két évtizedben a járomspórás gombákkal kapcsolatos ismereteink illetve tudásunk jelentősen kibővült, melyet Papp Tamás az alábbi területeken ismerteti: A járomspórás gombák rövid jellemzése, A terpénbioszintézis-kutatás főbb területei gombákban, A mikrobiális karotintermelés vizsgálatának jelentősége, Járomspórás gombák a karotinoidek-bioszintézis kutatásában.

Ezt követi a célok rövid megfogalmazása: a karotinoidek-termelő járomspórás gombák biotechnológiai alkalmazása, azok biológiai feltételeinek, valamint alap- és alkalmazott kutatásban felhasználható törzsek és módszerek létrehozása. Mindezek alapján az alábbi feladatok megvalósítását tűzték ki célul.

1. Karotinoidek-termelő járomspórás gombák törzsgyűjteményének létrehozása és jellemzése.
2. Az általános mevalonsav-út és az izopren-bioszintézis kulcslépéseit katalizáló enzimek (HMG-KoA-reduktáz, IPP-izomeráz, valamint FPP- és GGPP-szintázok) génjeinek funkcionális jellemzése és a  $\beta$ -karotin-termelés befolyásolása a bioszintézis-útvonal genetikai módosításával járomspórás gombákban.
3. A specifikus karotin-bioszintézis módosítása és xantofilok termeltetésének lehetősége *Mucor*-ban.
4. A bioszintézis utak elemzéséhez és módosításához, valamint a génfunkciók vizsgálatához szükséges eljárások – mindenekelőtt a járomspórás gombákra adaptált, hatékony transzformációs rendszerek – kidolgozása.

Az **Anyagok és módszerek** mindössze hat oldal terjedelemben tartalmazzák a legfontosabb módszereket és vizsgálati anyagokat, a függelékben található táblázatokkal kiegészítve. A rövid terjedelem nem feltétlenül rossz, hiszen ilyen nagymértékű munka teljes módszertani leírása nem várható el, és a megjelent publikációkban megtalálhatóak az itt nem közölt információk. Ugyanakkor nagyobb odafigyelést igényelt volna ennek a résznek az összeállítása, mivel olyan dolgot is részletez, mely korántsem szükséges egy akadémiai értekezésben (pl. tápközegek összetevőinek leírása). Néhány elem pedig pontosabb, tudományosabb megfogalmazást, leírást igényelt volna.

A dolgozat leghosszabb és legfontosabb része a 68 oldal terjedelmű **Eredmények és megvitatásuk** fejezet, melynek bírálatát az eredmények és célok pontjainak megfelelően részletezem.

## 1. KAROTINOIDTERMELŐ GOMBÁK TÖRZSGYŰJTEMÉNYÉNEK LÉTREHOZÁSA ÉS JELLEMZÉSE

A 445 törzset magába foglaló járomspórás gyűjtemény igen jó alapot biztosít a megfogalmazott célok eléréséhez, így ismereteink bővítését az adott területen, a törzsek hazai és nemzetközi alap kutatásokban való felhasználását és nem utolsósorban ipari alkalmazás szempontjait is fegyelemben véve számos lehetőséget ad.

Megállapítható, hogy a 130 *Mortierellales* rendbe tartozó izolátum vizsgálata jelentős mértékben hozzájárult ezen mikroorganizmusok rendszertanának átalakításában, revíziójában, melyben szép kivitelű képek és szemléletes ábrák segítenek az értelmezésben.

A 445 izolátum karotin termelő képességének vizsgálata nemcsak alap kutatási, hanem ipari szempontból is fontos lehet. A vállalt feladat, a törzsgyűjtemény létrehozása jellegénél fogva kevésbé diszkutálható, éppen ezért nem is lett volna szükség az 5.1.1 fejezet egy részére. Ilyen részletességű kifejtést az irodalmi részben jobban el tudtam volna képzelni és a saját eredményeként csak rövid bemutatást adni erről a területről.

Ugyanakkor néhány kérdés felvetődött bennem a dolgozat ezen fejezetenek olvasása közben. A *Blakeslea trispora* járomspórás gombát nagyüzemi karotin termelésre használják az iparban, vagyis a célkitűzésben vállalt feladatokhoz szorosan kapcsolódik ez a törzs. Meglepő, hogy a törzsgyűjteményük, mely valóban értékes, nem tartalmaz ilyen izolátumot, holott nyilvános törzsgyűjteményekből is könnyen beszerezhető és akár viszonyítási alapként is felhasználható lett volna a karotintermelés mennyiségére vonatkozó kísérleteknél.

Az F1 táblázat alapján úgy értelmeztem, hogy a 130 törzs többsége külföldi, csak egy magyar izolátumot tartalmazva. Tudjuk, a molekuláris biológiai- és barcode vizsgálathoz pontosan jellemzett izolátumok szükségesek, de mindez nem lehetett gát, hogy a 421 reprezentatív képviselő mellett a nemzetközi vizsgálat alapján pár magyar szabadföldi izolátum is bekerüljön. A törzsgyűjtemény többi genusza tartalmaz számos magyar és olyan izolátumot, amely nem található meg más törzsgyűjteményben. Miért pont a legjobban elemzett csoport esetében nincs több saját/magyar izolátum?

A karotinoid termelés vizsgálata több hőmérsékleten és 8 szénforrás felhasználásával történt, és azonosítottak több olyan karotinoidot is, melyet korábban még nem írtak le járomspórás gombákból. Sikertelt egy olyan reprezentatív gyűjteményt összeállítani, mely lehetőséget biztosított az eddigi modell organizmusokhoz képest eltérő összetételű illetve nagyobb karotinoidtartalmú törzseket azonosítani, köztük olyanokat is, amelyek termelik az értékes zeaxantint és  $\beta$ -kriptoxantint.

A dolgozatban nehéz volt követni, hogy pontosan hány izolátumnál történt a karotin tartalom meghatározása HPLC és hány izolátum esetében VRK-val. Kicsit pontosabb módszerleírás/kísérleti rendszer leírás jó lett volna, és néhány kérdés itt is felmerült.

Vizsgálatukban 28 °C helyett 35 °C alkalmazása néhány esetben háromszoros mennyiségű karotintermelést eredményezett. A cukrok, így például aszparaginsav vagy trehalóz többszörösére növelte az összkarotionid vagy  $\beta$ -karotin tartalmat. Mindezen tapasztalatok alapján, véleménye szerint ipari méretekben, ipari és gazdasági szempontokat is figyelembe véve reális-e ezen törzsek használata karotin előállításra?

Megjegyzem ebbe a kísérletsorozatba is jó lett volna bevonni az iparban alkalmazott *Blakeslea trispora* faj néhány izolátumát, hiszen a vizsgálatok során több olyan izolátumot is azonosítottak, melyek termelőképessége összevethető az ipari törzssel (40. - 41. oldal).

## 2. AZ ÁLTALÁNOS MEVALONSAV-ÚT KULCSLÉPÉSEIT MEGHATÁROZÓ GÉNEK JELLEMZÉSE ÉS AZ ÚTVONAL MÓDOSÍTÁSA JÁROMSPÓRÁS GOMBÁKBAN

### A HMG-KoA-reduktáz gének izolálása és transzkripciójuk elemzése

Genom szekvencia alapján három feltételezett HMG-KoA reduktáz gént (*hmgR1-3*) izoláltak és transzkripciójukat elemezték. *In silico* azonosították a HMG-KoA-reduktáz fehérjékre jellemző motívumokat és meghatározták a fehérjék egyéb jellegzetes tulajdonságait. Különböző környezeti tényezők közül a hőmérséklet és NaCl-koncentráció valamint C-források génexpresszióra gyakorolt hatását is vizsgálták. Ez a fejezet összefügg korábbi vizsgálatokkal. Ezért is meglepő, hogy a 3. táblázatban bemutatott eredmények alapján legnagyobb mértékű karotinoid szintet eredményező galaktóz, mint C-forrás nem került be a relatív transzkriptumok szintjének mérésénél vizsgált szénforrások közé. Mi ennek az oka?

A vizsgált C-források közül a trehalóz alkalmazásakor kismértékű expressziót mértek, ugyanakkor 3. táblázat szerint azonos izolátumnál (SZMC12082 = MS12) a legmagasabb szintű össz-karotinoid illetve  $\beta$ -karotin szint jelentkezett. Mi lehet ennek a magyarázata, hiszen a HMG-KoA képződés feltételezett prekursoraként szolgáló dihidroxi acetonnal és nátrium acetátnál nagymértékű expressziót mértek.

Vizsgálták a gomba ergoszterin-tartalmát is aerob, és anaerob tenyésztést követően megállapítva, hogy a *hmgR3* transzkripciója erősödött, a teljes ergoszterintartalom anaerob közegben azonban radikálisan csökkent. Mivel magyarázható ez a jelenség, és hogyan változik az összes karotinoid tartalom?

### *M. circinelloides* *hmgR* gének túlműködtetése

Azért, hogy megvizsgálják a *hmgR* gének hatását a *M. circinelloides* karotin- és ergoszterin-termelésére, valamint egyéb tulajdonságaira, genetikai transzformációval olyan törzseket hoztak létre, melyekben az egyes gének túlműködtetése, vagy éppen csendesítése megvalósítható. Megállapították, hogy a *hmgR2* és a *hmgR3* gének túlműködtetése egyaránt emelte a karotinoidszintet, és csökkentette a gomba érzékenységet a vizsgált sztatinokkal szemben. A *hmgR1* gén kópiaszámának emelése ugyanakkor nem volt hatással a vizsgált tulajdonságokra. Eredményeik alapján bizonyítást nyert, hogy a *hmgR2* és a *hmgR3* terméke részben ugyanazon folyamatokban vesz részt, illetve funkciójuk átfednek, ugyanakkor eltérő szabályozás alatt állnak.

### A *M. circinelloides* *hmgR* gének csendesítése

A *hmgR* gének csendesítését antiszensz RNS technikával, a csendesítési hatékonyságot qRT-PCR analízissel vizsgálták meg. Az egyes *hmgR* gének átíródását vizsgálva azt tapasztalták,

hogy az MS12+pAS3 törzsekben, melyekben a *hmgR3* gént csendesítették, radikálisan megnőtt a *hmgR2* gén átíródása, ugyanakkor a *hmgR2* csendesítése esetén a *hmgR3* transzkriptum szintje nem változott szignifikáns mértékben. Eredményük alapján hipotézisüket igazolták, mely szerint a HmgR3 funkciójának kiesését a gomba a *hmgR2* expressziójának fokozásával ellensúlyozza. Karotin- és az ergoszterintermelés szempontjából a *hmgR2* és *hmgR3* működése a meghatározó, a két gén termékének funkciója e tekintetben átfed. Ugyanakkor, a *hmgR3* által kódolt enzimnek létfontosságú szerepe van a normál morfogenezis és sejtingegritás biztosításában is, melyet fénymikroszkópos és fluorescens mikroszkópi vizsgálatokkal is dokumentáltak.

#### **A *R. miehei* HMG-KoA-reduktáz gén vizsgálata**

Izolálták és jellemezték a *R. miehei* HMG-KoA-reduktáz génjét, megállapítva hogy a gomba genomja egyetlen *hmgR* gént tartalmaz. A *Rhizomucor hmgR* gént *M. circinelloides*-ben kifejeztetve sikerült csökkenteni utóbbi érzékenységet lovasztatinnal és szimvasztatinnal szemben. Ugyanakkor a heterológ expresszióknak a *M. circinelloides* karotinoid-bioszintézisére nem volt hatása, ami alátámasztja az utóbbinak a többi prenilszármazék bioszintézisétől való feltételezett függetlenségét.

A szép eredmények értelmezését és összehasonlíthatóságát nagyban segítené, ha a 6. táblázat és 19. ábra egységesítve lenne, vagyis mindkét helyen MIC vagy növekedési ráta lenne feltüntetve (esetleg mindkettő).

#### **A *M. circinelloides* IPP-izomeráz, valamint FPP- és GGPP-szintáz géneinek vizsgálata**

IPP izomeráz és FPP, GGPP-szintáz gének szerepet játszanak a karotinoidok bioszintézisében. Izolálták és jellemezték a *M. circinelloides* IPP-izomeráz (*ipi*) és GGPP-szintáz (*carG*) géneit és vizsgálták kifejeződésüket a tenyésztési ciklus során. Megállapították, hogy a *carG* gén promóterében olyan ún. APE motívumok vannak, melyek feltehetően a gén átíródásának fény általi indukciójában játszanak szerepet. Northern-analízissel bizonyították a *carG* gén kék fény általi indukcióját és a *carG*, valamint az említett karotinoidspecifikus gének összehangolt fényszabályozását.

Itt is szerepel, hogy a transzformánsok karotin termelő képessége összemérhető az iparban alkalmazott törzs vad típusának nem optimalizált körülmények közti termelésével, konkrét adatot azonban nem mutat be. Feltételezem, a vad törzs is többet termel optimalizált körülmények között. A megadott µg/g mértékegység csak akkor használható fel összehasonlításra, ha egy egységnyi tápoldatban/táptalajon mindig ugyanannyi mennyiségű micélium képződne adott idő alatt. Ez pedig biztosan nem teljesül, főleg ha különböző fajokat hasonlítunk össze. Az eredmény „tényleges használhatóságának” értékelésén kívül ez a fejezet nagyon jól megtervezett és felépített. Az eredmények szépen dokumentáltak, mindemellett számomra a legértékesebb diszkussziót tartalmazza.

#### **A SPECIFIKUS KAROTINOID-BIOSZINTÉZIS VIZSGÁLATA: XANTOFILLOK TERMELTETÉSÉT LEHETŐVÉ TEVŐ GÉNEK KIFEJEZTETÉSE *M. CIRCINELLOIDES*-BEN**

##### **A *Paracoccus* sp. N81106 β-karotin-ketoláz (CrtW) és -hidroxiláz (CrtZ) kifejeztetése *M. circinelloides*-ben**

A fejezetben cél volt β-karotinból képződő oxigenált vegyületek a xantofillok termeltetése *M. circinelloides*-ben. Az asztaxantin termelő *Paracoccus* sp. N81106, valamint az ugyancsak asztaxantin termelő bazídiomos élesztő, a *X. dendrorhous* bioszintézis géneit *M. circinelloides*-ben kifejeztetve létrehoztak egy módosított karotinoid-összetételű (xantofilltermelésre képes törzsekből álló) mutánsparcot. A törzseket felhasználták bioszintézis utak elemzésére, a képződő termékek arányának meghatározására. A kutatócsoportjuknak elsőként sikerült

xantofilltermelő járomspórás gombatörzseket genetikai transzformációval előállítani. A mutánsok előállítása PEG közvetítette transzformációval illetve REMI technikával történt. A 14. táblázatban az MS12 alaptörzs termelése is fel van tüntetve. Elméletileg ez a törzs azonos a 3. táblázatban lévő SZMC 12082 törzssel. Ugyanakkor a két táblázatban a termelt összkarotinoid illetve  $\beta$ -karotin mennyiségek jelentős mértékben eltérnek. Véleménye szerint mi lehet ennek az oka?

#### ***A X. dendrorhous $\beta$ -karotin-oxigenáz (CrtS) kifejeztetése M. circinelloides-ben***

Megállapították, hogy a *M. circinelloides* képes az exogén eredetű CrtS enzim redukciójára, azaz az aktív enziforma létrehozására, tehát egyetlen gén, a *crtS*, kifejeztetése elegendő a *M. circinelloides* karotinoid termelésének módosításához.

A néhány, inkább gyakorlati és alkalmazott kutatási területet érintő kérdésektől eltekintve mindkét transzformációs rendszer igen érdekes, több, különböző technikával kivitelezett munka, melyben a transzformánsok jellemzése is megtörtént. A vektorok összeállításával, a transzformációs rendszer kidolgozásával és a karotin szintézis kulcsfontosságú enzimjeinek vizsgálatával, az elért eredmények tudományos értéke igen jelentős.

### **A JÁROMSPÓRÁS GOMBÁK GENETIKAI MANIPULÁCIÓJÁHOZ SZÜKSÉGES TRANSZFORMÁCIÓS RENDSZEREK KIDOLGOZÁSA**

Ebben a fejezetben kerülnek bemutatásra a kifejlesztett technikák. Olyan általánosan felhasználható vektorokat és transzformációs rendszereket dolgoztak ki, melyek heterológ gének kifejeztetését teszik lehetővé különböző járomspórás gombákban. Kicsit meglepő, hogy a dolgozat végén található ez a jól dokumentált, szép és a megértést megkönnyítő képekkel és ábrákkal ellátott fejezet. Apró dolog, de megjegyzem, hogy nem indokolt itt 5.4.1 alfejezet bevezetésére, mivel nincs folytatása.

A **Legfontosabb eredmények összefoglalása** fejezetben 6 oldalon, 23 pontban összefoglalva található meg a dolgozat eredményeinek tömör összefoglalását, melyek többsége új tudományos eredmény.

Ezt követi az **Idézett irodalom** jegyzéke. Mint már a bíráló első részében utaltam rá a dolgozat összesen 377 hivatkozást tartalmaz. Az alapos, csaknem hibátlan jegyzékből kimaradt Takó, (2010) bár a felhasznált irodalomban szerepel. Ugyanakkor az alábbi cikk szerepel az irodalomjegyzékben és a dolgozat témájához kapcsolódó cikkek közt, de a dolgozat szövegében viszont nincs hivatkozás.

Schoch CL, Robbertse B, Kovács GM, Krizsan K, Papp T, Petkovits T, Vágvölgyi C, Federhen S [101] (2014) Finding needles in haystacks: linking scientific names, reference specimens and molecular data for Fungi. Database 2014: Paper bau061. IF: 3,372, Független idéző: 12

A dolgozat benyújtása 2016-ban történt, ugyanakkor a bíráló 2018-ban született, és így a dolgozatban közölt tudománymetrikai adatok változtak. Az MTMT adatbázis alapján a Hirsch index 21, az összes független hivatkozás 2010 - 1563 helyett -, melynek értékéből nem veszt, hogy 1063 független hivatkozás egy sokszerzős cikkre van.

Összefoglalva véleményemet megállapítható, hogy a szerző bevezetőben megfogalmazott azon reménye, hogy kutatásai hozzájárulnak a járomspórás gombákkal kapcsolatos ismeretek bővítéséhez, teljesült. Dr. Papp Tamás munkássága, és a SZTE TTIK Mikrobiológiai Tanszékén végzett kutatások jelentős mértékben hozzájárultak, és remélhetően a továbbiakban is hozzájárulnak a járomspórás gombák pontosabb megismeréséhez.

A Jelölt eddigi tudományos és oktatói teljesítménye, valamint az MTA Doktora cím elnyerésére benyújtott értekezése alapján megállapítható, hogy Dr. Papp Tamás méltó az MTA doktori cím elnyerésére. A doktori értekezést nyilvános vitára bocsátását javaslom, sikeres védés esetén pedig javaslom az MTA doktora cím odaítélését.

Posta Katalin

Gödöllő, 2018. március 22.