

Válasz Prof. Dr. Bíró Sándor opponensi véleményére

Mindenekelőtt szeretném megköszönni Bíró Sándor professzor úrnak, hogy elvállalta értekezésem bírálatát. Külön köszönöm személyes hangú, dicsérő szavait és támogató véleményét.

Észrevételeire és kérdéseire az alábbiakban válaszolok:

Takó és mtsai. 2010-es cikke, melyet a szövegben kétszer is említ, hiányzik a listából.

A hivatkozás sajnos valóban hiányzik a 7., „IDÉZETT IRODALOM” fejezetből, amiért elnézést kérek. Ugyanakkor természetesen szerepel a 8. fejezetben, mely a dolgozat alapjául szolgáló közleményeket tartalmazza, így végső soron visszakereshető.

*Kérdésem tulajdonképpen a jövőre vonatkozik: látszik-e esély, vagy van-e a láthatáron a dolgozatban előállított karotin túltermelő, vagy xantofill termelő törzsek biotechnológiai célú felhasználására? Kérdezem ezt különös tekintettel arra is, hogy alap kutatási szinten már a dolgozatban leírt génmanipulációs technikákon való túllépés is megtörtént, amit CRISPR/Cas technológia *Mucor circinelloides*-ben történő újszerű adaptációja is bizonyít, mellyel stabil kromoszómális mutációkat hoztak létre, s amely dolgozatuk 2017 decemberében jelent meg a *Scientific Reports*-ban.*

Ahogy a dolgozatban is említettem az egyetlen olyan gomba, melyet ipari karotintermelésre használnak (*Blakeslea trispora*) szintén a Mucorales rend tagja (Dufossé és mtsi. 2006, Avalos és mtsi. 2017). Ugyanakkor e gomba esetében a genetikai módosítás a mai napig nem megoldott (Avalos és mtsi. 2017), ezért más kutatócsoportokkal együtt a rekombináns és molekuláris technikákkal jobban vizsgálható *Mucor circinelloides*-t használtuk modellorganizmusoként (Barredo 2012). Az ismertetett kutatások ezért alapvetően alap kutatások voltak. Ezek fő célja az volt, hogy megvizsgáljuk a járomspórás gombák biotechnológiai alkalmazásának érdekében a karotinoid-bioszintézis javításának biológiai feltételeit. Utóbbi területtel kapcsolatban számos olyan információt sikerült nyerni, amelyek figyelembe vételével létrehozható egy a gyakorlatban is alkalmazható, fejlesztett karotinoid termelésre képes *M. circinelloides* törzs.

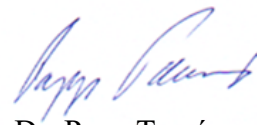
A dolgozatban bemutatott törzsek karotinoid termelését a gyakorlati alkalmazás érdekében még fokozni kellene. Eredményeink alapján a karotin-bioszintézis legeredményesebben a terpén bioszintézis korai szakaszában a HMG-KoA reduktáz *hmgR2* és/vagy *hmgR3* génjének, valamint a specifikus lépéseket közvetlenül megelőző lépésért felelős *carG* gén túlműködtetésével fokozható. A további karotinoidtartalom-növekedés lehetséges az általunk is tanulmányozott fényfüggés kikapcsolásával (Velayos és mtsi. 2000a, 2000b, 2003.). Ez megvalósítható egyrészt a fényindukálta gének (*carG*, *carB*, *carRP*) promótereinek cseréjével (Avalos és mtsi. 2017), másrészt a fényindukcióban szerepet játszó szabályozó fehérjék génjeinek deléciójával/elrontásával. Ilyen gén lehet a *crgA*, melynek mutációja esetén folyamatos, fokozott karotinoid termelés valósítható meg (Navarro és mtsi. 2001, Murcia-Flores és mtsi. 2007, Zhang és mtsi. 2016). Egy további fontos módosítás lehet a karotinoid degradáció gátlása. A járomspórás gombák által termelt β -karotin nem raktározódik, illetve akkumulálódik minden határon túl, hanem folyamatosan átalakul egyéb származékokká, elsősorban különböző apokarotinoidokká, pl. C18 trisporoidok (a trispórsav származékok e gombák ivaros folyamatokat kiváltó, feromonhatású anyagai), C15 ciklofarnezoidok és C7 metilhexanoidok (Barrero et al. 2011) Ezek képződése a β -karotin egy vagy több, karotinoid oxigenázok által katalizált hasításán keresztül történik (Medina és mtsi. 2011, Tagua és mtsi. 2012). Az első hasítást a *carS* gén terméke végzi; a gén kiiktatásával a karotinoid akkumuláció jelentősen javítható (Avalos és mtsi. 2017).

Az említett CRISPR-Cas9 alapú rendszer alkalmas lehet a módosítások megvalósítására (Nagy és mtsi. 2017). E módszerrel a hagyományos genetikai transzformációs eljárásnál hatékonyabban lehet stabil integratív transzformánsokat létrehozni. Megjegyzendő, hogy az ilyen törzsek genetikailag módosított szervezetek. Ebből a szempontból az általunk *M. circinelloides*-re kidolgozott plazmid nélküli, *in vitro* rendszer azért is előnyös lehet, mert így amennyiben a természetes módon termelődő karotinoidok, pl. a likopin vagy a β -karotin termelésének fokozása a cél, a módosítások kizárólag endogén eredetű genetikai anyaggal megvalósíthatók és nem szükséges heterológ DNS bevitel.

Meg kell jegyezni, hogy a dolgozatban is említett kantaxantintermelő törzsből, (MS12+pCA8lf/1) a dolgozatban bemutatott tápközegben nevelve, nagy tisztaságban lehetett kantaxantint tisztítani, amelyet mi és az együttműködő partnerek analitikai standardként tudunk felhasználni.

Végezetül még egyszer szeretném megköszönni Bíró Sándor professzor úrnak dolgozatom alapos bírálatát.

Szeged, 2018. 03. 27.



Dr. Papp Tamás

Hivatkozások

- Avalos J, Nordzike S, Parra O *et al.* (2017) Carotenoid production by filamentous fungi and yeasts. In: *Biotechnology of Yeasts and Filamentous Fungi* (Sibirny AA, ed.), Springer, pp. 225-279.
- Barredo J-L (2012) *Microbial carotenoids from fungi: methods and protocols*. Humana Press, New York
- Barrero AF, Herrador MM, Arteaga P *et al.* (2011) New apocarotenoids and β -carotene cleavage in *Blakeslea trispora*. *Org Biomol Chem* 9: 7190-7195.
- Dufossé L (2006) Food grade pigments. *Food Technol Biotechnol* 44: 313-321.
- Medina HR, Cerdá-Olmedo E, Al-Babili S (2011) Cleavage oxygenases for the biosynthesis of trisporoids and other apocarotenoids in *Phycomyces*. *Mol Microbiol* 82: 199-208.
- Murcia-Flores L, Lorca-Pascual JM, Garre V *et al.* (2007) Non-AUG translation initiation of a fungal RING finger repressor involved in photocarotenogenesis. *J Biol Chem* 282: 15394-15403.
- Nagy G, Szebenyi C, Csernetics Á *et al.* (2017) Development of a plasmid free CRISPR-Cas9 system for the genetic modification of *Mucor circinelloides*. *Sci Rep* 7: 16800.
- Navarro E, Lorca-Pascual JM, Quiles-Rosillo MD *et al.* (2001) A negative regulator of light-inducible carotenogenesis in *Mucor circinelloides*. *Mol Genet Genomics* 266: 463-470.
- Tagua VG, Medina HR, Martín-Domínguez R *et al.* (2012) A gene for carotene cleavage required for pheromone biosynthesis and carotene regulation in the fungus *Phycomyces blakesleeanus*. *Fungal Genet Biol* 49: 398-404.
- Velayos A, Blasco JL, Alvarez MI *et al.* (2000a) Blue-light regulation of the phytoene dehydrogenase (*carB*) gene expression in *Mucor circinelloides*. *Planta* 210: 938-946.
- Velayos A, Eslava AP, Iturriaga EA (2000b) A bifunctional enzyme with lycopene cyclase and phytoene synthase activities is encoded by the *carRP* gene of *Mucor circinelloides*. *Eur J Biochem* 267: 1-12.
- Velayos A, Papp T, Aguilar-Elena R *et al.* (2003) Expression of the *carG* gene, encoding geranylgeranyl pyrophosphate synthase, is up-regulated by blue light in *Mucor circinelloides*. *Curr Genet* 43: 112-120.
- Zhang Y, Navarro E, Cánovas-Márquez JT *et al.* (2016) A new regulatory mechanism controlling carotenogenesis in the fungus *Mucor circinelloides* as a target to generate β -carotene over-producing strains by genetic engineering. *Microb Cell Fact* 15: 99.