

## Válasz Dr. Pesti Miklós professzor úr bírálatára

Először is szeretném megköszönni Pesti Miklós professzor úrnak, hogy elvállalta értekezésem szakmai bírálatát. Külön köszönöm kedves szavait és támogató véleményét. Megjegyzéseire és kérdéseire az alábbiakban válaszolok.

1) Szokatlan, hogy a köszönetnyilvánítás a tartalomjegyzék után található.

### **Válasz:**

A Köszönetnyilvánítás valóban általában a dolgozatok végén található, de én ezzel soha nem értettem egyet. Kísérletes tudományokban, mint amilyen a mikrobiológia is, az eredmények csapatmunka révén születnek akkor is, ha az adott dolgozatnak csak egy szerzője van. Ha már a címlapra nem írhattam fel a munkatársak nevét, igyekeztem minél előbb megemlíteni őket.

2) A rövidítések jegyzéke elfogadható, de érthető módon nem lehet teljes.

### **Válasz:**

Ez egy bosszantó figyelmetlenség a részemről, amit a másik két bírálóm is észrevett, és amiért elnézést kérek.

3) A 7. Függelékben a 150-152. oldalakon nem derül ki a vizsgált fonalas gombafajok, törzsek eredete, igaz a szerző hivatkozik a már megjelent publikációkra.

### **Válasz:**

A munkánk során vizsgált gombatörzsek többsége nyilvános törzsgyűjteményekben deponált, így minimális költséggel beszerezhetők – ilyenek az FGSC, CBS, ATCC előjelű törzsek. A törzsek másik halmazát a munkánk során magunk által előállított mutánsok jelentik, ezeknél a „hivatkozás” oszlopban feltüntettük azt a (saját) közleményt, amelyikben először szerepelt a kérdéses törzs. A szám előtt szereplő betűkombináció a törzs kialakításáért legtöbbet tevő munkatársak nevének kezdőbetűit takarja, pl. ES = Erzsébet Sándor, EF = Erzsébet Fekete, AO = Anita Orosz. Ezeket a mutáns gombatörzseket bármikor, bárkinek el tudjuk küldeni, ez egyébként szakmai kötelessége is egy labornak. A harmadik halmazba azok a mutáns törzsek tartoznak, melyeket más akadémiai laborok hoztak létre. A Hivatkozás oszlopban feltüntetett dolgozat vezető szerzőjétől, esetleg az adott labor vezetőjétől ezek a törzsek is elérhetők. Az értekezésemben felhasznált 36 gombatörzs között egy védett van, a *Penicillium chrysogenum* AS-P-78, melyet az Antibioticos SA spanyol gyógyszer cég adott át Juan F. Martín professzor leoni laborjának, és mi tőlük kértük el tovább-nemadási szerződés aláírása mellett.

4) Az Anyagok és Módszerek fejezetben nincsenek részletezve az anyagok és módszerek, talán segített volna a helyszűkén egy egyoldalas lista hivatkozva azon publikációkra, ahol ezek részletesen megtalálhatók.

### **Válasz:**

Az értekezés terjedelmes, amit az alkalmazott módszerek részletes bemutatása kényelmetlen hosszúságúra növelt volna. Másfelől viszont egy tudományos munkának hozzáférhetővé kell tennie a módszereket. Ezt az ellentmondást próbáltam a 150. oldalon található megjegyzéssel feloldani („a módszerek a vonatkozó közleményekben megtalálhatók”), melyben az értekezés

alapjául szolgáló, a dolgozat végén felsorolt saját cikkeinkre utaltam, de elmulasztottam ezt egyértelművé tenni.

5) A laktóz és a galaktóz mint szénforrás milyen változásokat idéznek elő a genomszintű génexpressziós mintázatban (transcriptional profiles), ha a glükózt laktózzal, vagy galaktózzal helyettesítjük a minimál tápközegben? Ezen eredmények segítették-e a jelölt eredményeinek értékelését? (pl. Bischof et. al., *Biotechnology for Biofuels*, 2013, 6: 127)

**Válasz:**

Professzor Úr engedelmével a választ a tömlősgombák (*Ascomycota*) törzsére szűkíttem le. D-galaktózzal vonatkozóan csak pékélesztős (*Saccharomyces cerevisiae*) példákat találtam.

A D-galaktóz hatására bekövetkező változások első publikált genomszintű vizsgálata (Ideker és mtsai, *Science* 292: 929-934, 2001) során a *S. cerevisiae* 6200 vizsgált mRNS-éből 997-nek (> 16%) változott meg szignifikánsan a mennyisége galaktózon a glükóz kontrollhoz képest. A cikk elsősorban az akkor még új kísérleti eljárásnak számító microarray adatok Northern analízissel történő igazolására, és a transzkriptum mennyiség vs. fehérje mennyiség összefüggéseire fókuszált, de az eredmények így is jelezték: a szerkezeti hasonlóság ellenére a glükózt és a galaktózt az élő sejtek eltérően érzékelik. Ehhez hasonló tanulmány Griffin et al. dolgozata is, alaposabb funkcionális annotáció mellett (*Mol. & Cellular Proteomics* 1: 323-333; 2002).

Lai et al. (*Eukaryotic Cell* 5: 1468-1489, 2006) cikke a *S. cerevisiae* genomszintű változásait vizsgálta oxigén megvonás hatására glükózon illetve galaktózon. Az előbbi szénforráson jóval kevesebb gén kifejeződése változott meg, mint az utóbbin (1603 vs. 2388). A különbség a stressz válaszokhoz kötődő génekben volt; ezek D-galaktózon „érzékenyebbek” bizonyultak, mint glükózon. Érdekes módon az oxigénszint visszaállítására csaknem pontosan ugyanazon gének reagáltak mindkét szénforráson.

Jens Nielsen professzor laboratóriuma (Chalmers University, Göteborg, Svédország) adaptív evolúciós mechanizmusokat vizsgált hatékony törzsfeljesztési stratégiák kidolgozása céljából. Ehhez vették modellnek a *S. cerevisiae* galaktóz hasznosítását. A vad típusú pékélesztő csak fele olyan gyorsan nő galaktózon, mint glükózon, noha a természetben a galaktóz is könnyen hozzáférhető szénforrás. Miután két hónapon át naponta átoltották a törzseket friss, galaktózt kizárólagos szénforrásként tartalmazó táptalajra, az adaptív mutánsok maximális növekedési rátája 24%-al megnőtt, csakúgy, mint a specifikus galaktóz felvételi illetve etanol produkciós ráták. A génexpressziós mintázat is változott: a tartalék szénhidrátok anyagcseréjéhez tartozó enzimeket kódoló gének, valamint az ergosterol bioszintézis génjeinek szignifikánsan nőtt a kifejeződése. Mutációkat azonosítottak továbbá a globális szénanyagcsere-szignálokért felelős Ras/PKA útvonal fehérjéiben, melyek közül az egyik (RAS2<sup>Tyr112</sup>) felelős a megemelkedett specifikus növekedési rátáért galaktózon. Munkáik két fő tanulsága: (a) a transzkriptum és a metabolom analízist (= a fenotípus vizsgálatot) össze kell kapcsolni a genom szekvenálással, mert csak így kapunk világos képet az evolúciós mutációk természetéről és hatásairól, (b) a törzsfeljesztés során minden adaptív mutánsban többféle mutáció is létrejöhet, melyek nagy



része nem befolyásolja a várt fenotípust. Ahhoz, hogy a fenotípust meghatározó mutációk kiválaszthatók legyenek, az összes mutánsban meglévő közös mutációkat kell megtalálni.

Ugyanebben a laborban *Martínez et al (FEMS Yeast Research, 14: 654-662; 2014)* a Crabtree effektust (alkoholos erjesztés aerob körülmények és magas glükózszint mellett) vizsgálták *S. cerevisiae*-ben. Galaktózon oxigén jelenlétében a pékélesztő párhuzamosan lélegez és erjeszt, míg glükózon csak erjeszt. A galaktóz-glükóz átállás során észlelt transzkripciós változások a Pho2p, Bas1p, és Gcn4p transzkripciós faktorokhoz köthetők, melyek a glükóz represszió már leírt közvetítői (Hap komplex, Nrg1p) fölött helyezkednek el a szabályozási hierarchiában. Ez alapján a galaktóz *S. cerevisiae*-ben globális hatással van a szénanyagcsere szabályozására.

Azon *S. cerevisiae* adaptív mutánsok, melyek a vad típushoz képest hatékonyabban képeztek xilózból etanolt, lecsökkent a galaktóz lebontásért felelős gének kifejeződése (*Zeng et al., Appl. Microbiol. Biotechnol. 101: 1753–1767, 2017*).

Egy másik dolgozat (*Lu et al., BMC Genomics 16, Art. No. 1064, 2015*) azt mutatta ki, hogy a Maotai (erjesztett kínai ciroklikőr) előállítási környezetéből izolált *S. cerevisiae* galaktóz anyagcsereje teljesen független a glükóz jelenlététől.

A növényi hemicellulóz monomerek (elsősorban a D-xilóz és az L-arabinóz) fermentációs szénforrásként való használata fontos területe az ipari biotechnológiának. *Wisselink et al. (Metabolic Engineering 12: 537-551, 2010)* genom szintű vizsgálatai kimutatták, az L-arabinózt hasznosítani képes *S. cerevisiae* mutáns D-galaktóz transzporterének kifejeződése megnő, maga a transzporter pedig esszenciális a folyamathoz.

A laktóz hatása bekövetkező genom szintű transzkripciós változásokat *Trichoderma reesei*-ben vizsgálták, ahol a gazdasági jelentőségű enzimfermentációk egyetlen vízóldékony, olcsó, indukáló szénforrása a laktóz. A dolgozatok zöme a finn VTT kutatóintézet illetve az osztrák ACIB (virtuális) kutatóintézet különböző egyetemeken dolgozó munkatársaihoz kötődik – utóbbira példa a Professzor Úr által is említett *Bischof et. al. (2013)* cikk is.

*Ivanova et al. (PLoS ONE 8, e62631, 2013)* megállapította, laktózon az összes olyan glikozil hidrolázt kódoló génnek megnő a kifejeződése, melyek általában a celluláz és hemicelluláz lebontáshoz szükségesek, különösen pedig azoknak, melyek az egyszikű növények xiloglükán vegyületeinek degradációjához szükségesek. A laktóz számos feltételezett MFS-transzporter fehérjét (Major Facilitator Superfamily) is indukál.

*Bischof et. al. (Biotechnology for Biofuels 6: 127, 2013)* dolgozata a búzaszalma (wheat straw) alapú szénforráson létrejövő transzkriptumot vizsgálta a laktózon kialakulóhoz képest. Eredményeik szerint a szalma jobb élettani induktora a szénhidrát lebontó enzimeknek a laktóznál – a releváns enzimeket kódoló gének többsége ugyan mindkettőn kifejeződik, de szalmán a kétharmaduk jóval erősebben, néhány xilanáz, kitináz és mannozidáz pedig csak azon. A szalma fermentációs induktorként történő használatát azonban limitálja gyenge vízóldékonysága és az, hogy a keletkező enzimek megtapadnak a felületén.

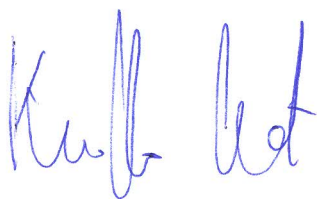
*Xu et al. (Eukaryotic Cell 13: 1001-1013, 2014)* genom szintű transzkriptum elemzéssel megállapította: a celluláz gének laktóz általi indukciós folyamatában két intracelluláris  $\beta$ -glükózidáz (CEL1a és CEL1b) valamelyike esszenciális.

*Limón et al. (Microbial Cell Factories 10: 40, 2011)* a glükóz 6-foszfát izomeráz enzimet kódoló gén deléciójának hatását vizsgálták a transzkriptomra. Arra voltak kíváncsiak, hogy a glikolízis blokkolásával a *T. reesei* képes-e kizárólag a pentóz-foszfát utat hasznosítva nőni és enzimet termelni. A válasz laktóz vonatkozásában nemleges volt.

Végezetül megemlítem, hogy először laktóz szénforráson végezték el két fontos ipari *T. reesei* törzs, a RUT C30 és az NG 14 összehasonlító transzkriptom elemzését is (*Le Crom et al., PNAS USA 106: 16151-16156, 2009*).

Mi is többször végeztünk genom szintű génexpressziós vizsgálatokat, mindannyiszor *T. reesei* gombával és microarray módszerrel (*Fekete et al: BMC Genomics 15: Art. No. 447, 2014; Karimi Aghcheh, Németh, et al: PLoS One 9: e112799, 2014*). Ezek azonban nem érintették közvetlenül a gomba galaktóz és/vagy laktóz anyagcseréjét. Legközelebb a területhez azon munkánk állt (*Portnoy et al: BMC Genomics 12: Art. No. 269, 2011*), melynek során a karbon katabolit represszor *cre1* deléciójának genom szintű hatását vizsgáltuk a specifikus növekedési ráta függvényében; az alacsony növekedési rátájú tenyészeteket glükóz-limitált folytonos fermentációs rendszerben (kemosztát) hoztuk létre. Laktózt nem használhattunk erre a célra, hiszen magas specifikus növekedési rátájú tenyészetet nem tudtunk volna rajta létrehozni. Ezek a cikkek ezért nem is szerepeltek nagydoktori értekezésemben.

Végezetül, szeretném még egyszer megköszönni Pesti Miklós professzor úr bírálatát.



Dr. Karaffa Levente

Debrecen, 2017. augusztus 4.