

Válasz Dr. Puskás László Géza az MTA doktora opponensi véleményére

Mindenekelőtt szeretném megköszönni Dr. Puskás Lászlónak, hogy elvállalta értekezésem bírálatát és időt, energiát fordított dolgozatom alapos áttanulmányozására. Észrevételeit, véleményét nagyra értékelem.

Megjegyzéseire és kérdéseire az alábbiakban válaszolok:

„A szénéhezt kísérő változások leírása inkább felsorolásként hat és nem érzi az olvasó a különböző folyamatok együttes jelenlétét, egymásra épülését... „

Sajnos ismereteink jelenleg mozaikosak; rengeteg sejtést fogalmaztak meg a kutatók az elmúlt években, de csak kevés, kísérleti adattal is jól alátámasztott következtetés lett publikálva. Így egy, az ok-okozati kapcsolatokat is bemutató összefoglaló ábra elkészítése helyett egy talán kevésbé elegáns, de szakmailag tarthatóbb megoldás, azaz az események egyszerű felsorolása mellett döntöttem. Egyetértek Opponensem véleményével: az egyes események közötti lehetséges kapcsolatokra, összefüggésekre ezen megoldás keretein belül is érdemes lett volna jobban felhívni az olvasó figyelmét.

„A jelölt a 7. ábrán egy, a szénéheztel valószínűleg közvetlenül nem is kapcsolatos apoptózist és az arra jellemző markerek megjelenését mutatja be. Ez azért is furcsa, mert pont saját munkájára hivatkozva vonja kétségbe az apoptózis jelentőségét a szénéhezt folyamatában.”

Egyetértek, az ábrát és a bekezdést érdemes lett volna kihagyni.

K1: Nem lehetséges, hogy az autofágia során fellépő mitokondriumok emésztése (mitofágia), vagy a belső membránrészletek emésztésének következtében megnövekvő intracelluláris Ca^{2+} koncentráció növekedése okozza a megnövekedett oxidatív stresszt?

A Ca^{2+} koncentráció változása sok fajban hatással van a mitokondriumok reaktív oxigén részecske (ROS) termelésére és a szintén ROS termelő NADPH oxidázok aktivitására. A ROS koncentráció változása ugyanakkor az endoplazmatikus retikulum Ca^{2+} csatornáinak működését befolyásolja. E kapcsolat lehet kölcsönösen stimuláló hatású is, így a citoszolikus

Ca^{2+} koncentráció kismértékű növekedése végül jelentős oxidatív stressz kialakulásához vezethet [1]. Hasonló kapcsolatot a gombák esetében is feltételeznek és e folyamatoknak fontos szerepet tulajdonítanak a gombák programozott sejtpusztulási folyamatainak (apoptózis és autofágia) iniciálásában [2]. Gombák esetében ráadásul a fő Ca^{2+} raktárnak többnyire nem az endoplazmatikus retikulumot, hanem az autofágiában is központi jelentőségű vakuólumot tekintik [3]. Így nemcsak a ROS és Ca^{2+} homeosztázis befolyásolhatja egymást kölcsönösen, de az általuk indukált autofágia – a mitofágián túl - is visszahathat e jelátviteli folyamatokra.

Vizsgálataink alapján szénéhezés alatt a légzésintenzitás jelentősen csökkent, és közben megnőtt az alternatív légzés aránya a citokróm c oxidáz-függő légzéséhez képest [4]. Ezzel párhuzamosan a citomsav ciklus enzimeit, illetve a légzési elektrontranszport lánc enzimeit kódoló gének aktivitása csökkent [5]. Azaz szénéhezés alatt megváltozott a mitokondriumok működése. Arra vonatkozóan, hogy ez kapcsolatban van-e az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció esetleges növekedésével és oxidatív stressz kialakulásához vezet-e, nincsenek adataink. A szénéhezés alatt megfigyelt intenzív fehérjeszekréció és számos endoplazmatikus retikulumhoz köthető gén aktivitásának növekedése ugyanakkor arra utal, hogy ezen jelentős ROS termeléséről is ismert sejtorganelium működése is megváltozik, ami szintén hozzájárulhat a ROS és a Ca^{2+} homeosztázis megváltozásához [4-6]. A feltételezhetően Ca^{2+} /kaldmodulin-függő protein kinázokat kódoló gének (*cmkB*, *cmkC*, *chkC*) aktivitása szénéhezés alatt nőtt, míg a Ca^{2+} transzmembrán transzportjában fontos gének közül a *vcxA* (feltételezett vakuoláris H^+ - Ca^{2+} antiporter gén) és a *yvcI* (feltételezett Ca^{2+} csatorna fehérje génje) aktivitása nőtt, a *figA* és *trp2* (feltételezett Ca^{2+} csatorna fehérjék génjei) aktivitása csökkent [5]. E változások szintén azt sugallják, hogy a Ca^{2+} -függő jelátvitelnek fontos szerepe lehet a szénéhezésre adott stresszválasz szabályozásában. A ROS tartalom növekedését idézheti elő az antioxidáns rendszer aktivitásának/kapacitásának a csökkenése is. Szénéhezés alatt a glutation peroxidáz és kataláz aktivitások, valamint a sejtek glutation tartalmának csökkenését figyeltük meg, ami azonban a szuperoxid dizmutáz aktivitások növekedésével járt együtt [4]. Transzkriptomikai adataink alapján szénéhezés alatt a sejtek lecserélik a növekedő tenyészetekre jellemző antioxidatív enzimeiket más antioxidatív enzimekre: pl. a *catA*, *catB* kataláz és *sodA*, *sodB* szuperoxid dizmutáz gének helyett a *catC* kataláz, a *cpeA* kataláz-peroxidáz, valamint az AN1131 és AN0785 szuperoxid dizmutáz gének aktiválódnak. [5]. E változásoknak a ROS akkumulációra gyakorolt hatása azonban nem ismert. Legfrissebb vizsgálataink alapján ugyanakkor, ha a glutation koncentrációk

csökkenését mérsékeljük a glutation lebontásában résztvevő enzimeket kódoló gének (*dugB* és *dugC*) inaktiválásával, az valóban késlelteti az oxidatív stressz kialakulását [5].

Összességében az oxidatív stressz kialakulásának oka, okai egyelőre nem ismertek. A mitokondrium működésének és a Ca^{2+} -függő jelátviteli folyamatoknak a megváltozása nagy valószínűséggel hatással van a szénéhező gomba tenyészetek ROS termelésére is. Éppen ezért e jelenségek vizsgálata egy igen ígéretes kutatási irányt jelenthet a számunkra is a (közeli) jövőben.

1. Görlach A, Bertram K, Hudecova S, Krizanova O. (2015) Calcium and ROS: A mutual interplay. *Redox Biol.* 6:260-271.
2. Gonçalves AP, Heller J, Daskalov A, Videira A, Glass NL. (2017) Regulated Forms of Cell Death in Fungi. *Front Microbiol.* 8:1837.
3. Forster C, Kane PM. (2000) Cytosolic Ca^{2+} homeostasis is a constitutive function of the V-ATPase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* 275:38245-38253.
4. Emri T, Molnár Zs, Pusztahelyi T, Pócsi I. (2004) Physiological and morphological changes in autolysing *Aspergillus nidulans* cultures. *Folia Microbiol* 49:277-284.
5. Az adatok publikálása folyamatban van. eredményeinket az alábbi konferenciát mutattuk be: Emri T, Hajdu M, Kovács R, Antal K, Jónás PA, Pócsi I. (2018) The glutathione degrading pathway of *Aspergillus nidulans* and its significance under carbon stress. A Magyar Mikrobiológiai Társaság 2018. évi Nagygyűlése és a XIII. Fermentációs Kollokvium. Eger, absztrakt: *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* 2019, 66:20.
6. Szilágyi M, Miskei M, Karányi Z, Lenkey B, Pócsi I, Emri T. (2013) Transcriptome changes initiated by carbon starvation in *Aspergillus nidulans*. *Microbiol-SGM.* 159:176-190.

K2: Mi az oka annak, hogy a különböző Aspergillus fajoknál eltérő referencia géneket használtak?

A referencia gén kiválasztásánál két szempontot vettünk figyelembe:

1. A referencia gén aktivitása legyen stabil és jól detektálható a vizsgált kísérleti elrendezésben.
2. Legyen irodalmi adat arra vonatkozóan, hogy mások is használták már ezt a gént referencia génként a kérdéses fajban.

Tapasztalataink szerint stressznek kitett tenyészetekben sok „klasszikus” referencia gén (pl. glicerinaldehid-3-foszfát dehidrogenáz gén, foszfoglicerinsav kináz gén, riboszómális fehérjék génjei) aktivitása jelentősen megváltozik. Sokszor még ugyanazon faj esetében is igaz, hogy az a referencia gén, ami az egyik (pl. növekedő tenyészeteket vizsgáló) kísérletben még használhatónak bizonyul, az egy másik (pl. növekedő és éhező tenyészeteket

összehasonlító) kísérletben már nem az. Azaz a referencia gének kiválasztását inkább a tenyésztési körülmények és az alkalmazott kezelések befolyásolták és nem a vizsgált faj. Nincs tapasztalatunk arra vonatkozóan, hogy ugyanazon referencia gének, ugyanolyan tenyésztési körülmények között, különböző *Aspergillus* fajokban eltérő módon viselkednének. (Valószínűleg fajtól és a tenyésztési körülményektől függ, hogy mikor igen és mikor nem.) Annak oka, hogy az *Aspergillus fumigatus* esetében más referencia géneket használtunk, mint az *Aspergillus nidulans*sal végzett kísérleteknél technikai jellegű: Azon *A. fumigatus* gének közül, amelyek referencia génként történő felhasználását már publikálták az irodalomban ez a három gén volt az első három olyan gén, amely az RNS szekvenálási és RT-qPCR adatok alapján alkalmasnak bizonyult a kísérletek kiértékelésére.

K3: A referencia gének esetében a transzlációban szereplő eEF-3, eEF-4A és eEF-1 szintje nem változott az egyes alkalmazott stressz hatására? Ugyanez felmerül az 1,3-β-glükán szintáz katalitikus alegységet kódoló gén esetében is.

A növekedő és szénéhező *Aspergillus nidulans* tenyészetekben mért transzkripció adatok összehasonlításakor az AN6700 (feltételezett eEF-3 transzlációs elongációs faktor) gén aktivitása megfelelően stabilnak bizonyult az ezen kísérletekben használt referencia törzs esetében. (Egy jelenleg folyamatban lévő vizsgálatban ugyanakkor e gén aktivitása szénéhezés hatására jelentősen csökkent az egyik (*ΔdugB-ΔdugC*) mutáns törzsben.) Az oxidatív stressz hatásának tanulmányozásakor valóban csökkent az AN6700 gén aktivitása több stresszor jelenlétében is. E kísérletekben emiatt az *actA* (γ-aktin) gént használtuk referencia génként.

Az *Aspergillus fumigatus* esetében az Afu6g12400 (*fksI*; feltételezett 1,3-β-glükán szintáz katalitikus alegység) és az Afu3g08160 (*tifI*; eIF4A transzlációs iniciációs faktor) gének aktivitása stabil volt; sem a vaséhezés, sem a hidrogén-peroxid stressz, sem a kettő kombinációja nem befolyásolta érdemben az mRNS-ük mennyiségét. Az Afu1g06390 (*tefI*; feltételezett eEF-1 transzlációs elongációs faktor α-alegység) gén esetében a kombinált kezelés már túlságosan erősnek bizonyult és szignifikánsan csökkentette aktivitását. Ebben az esetben az elemzést mindhárom génnel elvégeztük, de csak az *fksI* génnel számolt adatokat használtuk fel az eredmények diszkutálásakor.

K4: A DNS chip vizsgálatoknál az egyes mintákból (3-3) poolt készítettek. Ez azt is jelenti, hogy így nem volt biológiai ismételés? Nem derült ki, hogy volt-e technikai ismételés és, hogy az első kísérletben alkalmaztak-e színcserés ismételést?

A DNS chip vizsgálatoknál nem volt lehetőségünk technikai és biológiai ismételések kivitelezésére, illetve a kétszínű jelölés esetén színcserés ismételésre sem. Anyagi okokból csak arra volt lehetőségünk, hogy a több (három) független kísérletből származó mintát, RNS koncentrációjuk alapján 1:1:1 arányban, elegyítsük és ezt az egyesített mintát vizsgáljuk meg. A kapott eredményekből a három kísérlet egyfajta „átlagát” tudtuk meghatározni, de az adatok szórására természetesen nem tudtunk következtetni. Az ebből adódó hiányosságokat (fals pozitív eredmények) két módon próbáltuk kompenzálni: 1) A DNS chip adatokat elsősorban arra használtuk, hogy segítségükkel kiválasszuk azokat a géneket, amelyeknek a transzkripció változásait RT-qPCR segítségével is érdemes megvizsgálni és a következtetéseinket ezen, RT-qPCR-rel ellenőrzött gének adataira alapoztuk. 2) A adatok kiértékelésénél kerültük az egy-egy konkrét gén viselkedésére vonatkozó megállapításokat, helyette inkább a nagyobb géncsoportokra jellemző transzkripció változásokra koncentráltunk.

K5: Az RNS szekvenáláskor a minták elemzése nem világos: a 3 ismételést szintén egyesítették 1 poolban. és azon végezték el a szekvenálást?

Az RNS szekvenálás esetében összesen 12 mintát szekvenáltunk meg, azaz a négyféle kezelés hatását három biológiai ismételéssel tanulmányoztuk. Ez lehetővé tette, hogy meghatározzuk az egyes kezelésekben differenciáltan expresszált géneket, de ebben az esetben is törekedtünk arra, hogy a diszkusszió szempontjából valóban fontos gének transzkripciójának (mRNS-ének mennyiségi) változásait RT-qPCR-rel is ellenőrizzük.

K6: Az RNS szekvenálás esetében mire normálták az eredményeket?

A dolgozatban szereplő FPKM kifejezés („Fragments Per Kilobase Million”), illetve a cufflinks program említése félrevezető. A cufflinks valóban FPKM értékeket számol, ami a mi esetünkben (a fragmenseknek csak az egyik vége lett megszekvenálva; „single-end read sequencing”) megegyezik az RPKM („Reads Per Kilobase Million”) értékekkel. E program a génekhez tartozó „count” adatokat az adott minta illesztett „read”-jeinek millióban megadott számával osztja, hogy a minták eltérő „szekvenálási mélységéből” adódó hibákat

kiküszöbölje. Ezt a „normalizálást” a differenciáltan expresszált gének meghatározására nem használják. A differenciáltan expresszált géneket a cuffdiff program (2.2.1 verzió) segítségével azonosítottuk. Ez a program egy „méretfaktorral” („size factor”) normalizál. A „méretfaktor” kiszámításánál valamennyi minta valamennyi génjének „count” adatait figyelembe veszi: Egy mintán belül kiszámítja az összes génre a „count” érték és az adott gén összes mintából meghatározott „count” értéke mértani közepének hányadosát és ezek mediánját veszi („median of geometric means”) [1,2]. Ma már a cuffdiff (cuffdiff2 is) elavultnak számít, így a tophat illesztő program és a cuffdiff differenciált génexpressziót meghatározó programok helyett a hisat2 illesztő programot és a deseq2 programot használjuk. A deseq és deseq2 programok hasonlóan normalizálják az adatokat, mint a cuffdiff.

1. Anders S, Huber W. (2010) Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biol.* 11:R106.
2. Evans C, Hardin J, Stoebe DM. (2018) Selecting between-sample RNA-Seq normalization methods from the perspective of their assumptions. *Brief Bioinform.* 19:776-792.

K7: Hány több stresszválaszban együttes kifejeződést mutató, de eddig funkcionálisan nem annotált gént sikerült azonosítaniuk? Ezek közül volt-e olyan új RNS, amelyről kiderítették, vagy kiderült, hogy kódoló génje valamely stresszfolyamatban szerepet játszik?

Sajnálatos módon a fonalas gombák genomjának annotáltsága igen gyenge. Az *Apergillus* Genome Database (www.aspgd.org) adatai szerint az *Aspergillus nidulans* genomja 10687 nyitott olvasási keretet (ORF) tartalmaz, amelyből az igazolt nyitott olvasási keret („verified ORF”) mindösszesen csak 1213 (11 %). Ugyanez az arány a *Saccharomyces cerevisiae* esetében 78 % (www.yeastgenome.org). Az *Apergillus* Genome Database honlapján 1063 *A. nidulans* génről van genetikai vizsgálatokkal szerzett információ feltüntetve és mintegy 6000 génhez van rendelve „biological process GO term”. A fentiek alapján nem meglepő módon nagyon könnyen lehet ismeretlen funkciójú géneket azonosítani transzkriptomikai munkák segítségével. Az *A. nidulans*ban menadion, *tert*-butilhidroperoxid és diamid kezelésekben egyaránt felülszabályozott vagy alulszabályozott gének közül minden harmadikra igaz, hogy nincs a funkciójáról érdemi adat az irodalomban, illetve az adatbázisokban. E gének funkciójának felderítésébe nem kezdtünk bele, de jelenleg több más olyan genetikai munka is folyamatban van tanszékünkön, melyeket transzkriptomikai vizsgálatok iniciáltak: 1) A közelmúltban sikerült igazolnunk deléciós mutánsok vizsgálatával, hogy a *dugB* és *dugC* (glutamin amidotranszferáz) gének felelősek szénéhező

tenyészetekben a glutation koncentrációk gyors csökkenésért. E génekre a szénéhező tenyészetekkel végzett transzkriptom vizsgálataink hívták fel a figyelmünket. 2) Szintén a transzkriptom adataink alapján gyanítjuk, hogy a *zipB* (feltételezett bZIP transzkripciós faktor) gén fontos szerepet játszhat az oxidatív stresszválasz szabályozásában szénéhező tenyészetekben. (A *ΔzipB* mutánsok készítése folyamatban van, hogy tesztelni tudjuk hipotézisünket.). Folytak genetikai munkák poliketid szintázokat, illetve nem riboszómális peptid szintázokat kódoló génekkel kapcsolatban is annak érdekében, hogy az *A. nidulans* által termelt, eddig még nem leírt szekunder metabolitokat tudjunk azonosítani. A gének kiválasztásánál fontos szempont volt, hogy legyenek olyan tenyésztési körülmények, amikor a kérdéses klaszter génjei nagy aktivitást mutatnak és ennek eldöntéséhez a már meglévő transzkriptom adatsorainkat használtuk fel.

K8: Van-e információ arról, illetve terveznek-e olyan kísérleteket, ahol különböző, már engedélyezett antifungális szereket használnak valamilyen (oxidatív stressz, vas/cink éheztetés) stresszel kombinálva, a terápia hatékonyságának növelése céljából?

A „kombinatorikus” stressz kezelések alkalmazása és a kapott stresszválaszok szisztematikus elemzése az utóbbi években kezd a kutatók érdeklődésének középpontjába kerülni. Az eddig publikált legtöbb kísérlet azt vizsgálta, hogy a tápközeg szénforrás tartalma (szénstressz) hogyan befolyásolja a különböző *Candida* fajok antifungális szerekekkel, vagy más stresszorokkal szembeni érzékenységét [1-3]. Más kísérletekben kifejezetten az emberi szervezetben is fellépő stresszek együttes hatását tanulmányozták *Candida* fajokon [4-5]. A nem *Candida* fajokkal végzett és különösen az omikai megközelítést is alkalmazó vizsgálatok száma ma még kevés [6-8].

A szénforrás limitációs stressz (glükóz helyett tejsav volt a szénforrás) megnövelte a vizsgált *Candida albicans* törzsek caspofungin, tunicamycin és amphotericin B toleranciáját, de a sejtek érzékenyebbé váltak a miconazolra [2]. E változások pontos oka nem ismert, a szerzők a sejtfal összetételének megváltozását detektálták a kísérletekben. A cikk fontos üzenete, hogy az antifungális szerekekkel szembeni érzékenység *in vitro* vizsgálatok a nem megfelelő tenyésztési körülmények megválasztása félrevezető eredményekre vezethet.

Több tanulmány is foglalkozik azzal a lehetőséggel, hogy a gombákban az emberi szervezetben való növekedés alatt kialakuló vas, illetve cink éhezést a megfelelő kelátorok adásával felerősítsék [9-10]. E készítmények önmagukban is antifungális hatásúak lehetnek, de sok esetben kifejezetten más, már bevált antifungális szerekekkel együtt kívánják alkalmazni

őket. A *Cryptococcus neoformans* esetében például megfigyelték, hogy a vas kelátor EDTA, deferiprone, illetve deferasirox és az amfotericin B antifungális hatása között szinergizmus van [9]. Az azolok (pl. vorikonazol és itraconazol) esetében viszont antagonizmust mutattak ki [9].

A „kombinatorikus” stresszválaszok tanulmányozása jelenleg is folyamatban van a tanszékünkön. Egy olyan gyorsított optimalizálásán dolgozunk, amely lehetővé tenné nagyszámú törzs (pl. eltérő *in vivo* patogenitást mutató *A. fumigatus* törzsek) „kombinatorikus” stressz toleranciájának gyors összehasonlítását. E módszert szeretnénk felhasználni arra is, hogy megvizsgáljuk az *A. fumigatus* antifungális szerekek szembeni érzékenységét stressz, illetve „kombinatorikus” stressz alatt. Természetesen, ha azt tapasztaljuk, hogy az antifungális szerekek szembeni érzékenység jelentős mértékben csökken, vagy nő a gombát ért stresszhatások következtében, akkor ennek hátterét szeretnénk majd részletesen megvizsgálni transzkriptomikai módszerek segítségével is.

1. Maris AF, Assumpção AL, Bonatto D, Brendel M, Henriques JA. (2001) Diauxic shift-induced stress resistance against hydroperoxides in *Saccharomyces cerevisiae* is not an adaptive stress response and does not depend on functional mitochondria. *Curr Genet.* 39:137-149.
2. Ene IV, Adya AK, Wehmeier S, Brand AC, MacCallum DM, Gow NA, Brown AJ. (2012) Host carbon sources modulate cell wall architecture, drug resistance and virulence in a fungal pathogen. *Cell Microbiol.* 14:1319-1335.
3. Zhang N, Cao L. (2017) Starvation signals in yeast are integrated to coordinate metabolic reprogramming and stress response to ensure longevity. *Curr Genet.* 63:839-843.
4. Kaloriti D, Tillmann A, Cook E, Jacobsen M, You T, Lenardon M, Ames L, Barahona M, Chandrasekaran K, Coghill G, Goodman D, Gow NA, Grebogi C, Ho HL, Ingram P, McDonagh A, de Moura AP, Pang W, Puttnam M, Radmaneshfar E, Romano MC, Silk D, Stark J, Stumpf M, Thiel M, Thorne T, Usher J, Yin Z, Haynes K, Brown AJ. (2012) Combinatorial stresses kill pathogenic *Candida* species. *Med Mycol.* 50:699-709.
5. Leach MD, Budge S, Walker L, Munro C, Cowen LE, Brown AJ. (2012) Hsp90 orchestrates transcriptional regulation by Hsf1 and cell wall remodelling by MAPK signalling during thermal adaptation in a pathogenic yeast. *PLoS Pathog.* 8:e1003069.
6. Owens RA, Hammel S, Sheridan KJ, Jones GW, Doyle S. (2014) A proteomic approach to investigating gene cluster expression and secondary metabolite functionality in *Aspergillus fumigatus*. *PLoS One.* 9:e106942.
7. Brown NA, Goldman GH. (2016) The contribution of *Aspergillus fumigatus* stress responses to virulence and antifungal resistance. *J Microbiol.* 54:243-253.
8. Krysan DJ, Zhai B, Beattie SR, Misel KM, Wellington M, Lin X. (2019) Host carbon dioxide concentration is an independent stress for *Cryptococcus neoformans* that affects virulence and antifungal susceptibility. *MBio.* 10: e01410-19.
9. Lai YW, Campbell LT, Wilkins MR, Pang CN, Chen S, Carter DA. (2016) Synergy and antagonism between iron chelators and antifungal drugs in *Cryptococcus*. *Int J Antimicrob Agents.* 48:388-394.

10. Cohrt KAO, Marín L, Kjellerup L, Clausen JD, Dalby-Brown W, Calera JA, Winther AL. (2018) Novel zinc-attenuating compounds as potent broad-spectrum antifungal agents with *in vitro* and *in vivo* efficacy. Antimicrob Agents Chemother. 62:pii: e02024-17.