



OPPONENSI VÉLEMÉNY

Dr. Emri Tamás

„*Aspergillus* fajok stresszválaszainak vizsgálata” című MTA doktori értekezéséről

Dr. Emri Tamás MTA doktori értekezése az elmúlt mintegy tíz év kutatási eredményeit foglalja össze. A dolgozathoz kitérnek, hogy a témával sokkal régebb óta, több mint két évtizede foglalkozik és már az itt ismertetett kutatásokat megalapozó eredmények létrehozásában is aktívan részt vett. A dolgozatban vizsgált organizmusok jelentőségét nem kell hangsúlyozni, a különböző *Aspergillus* fajok szerepe, mint modellorganizmusok, biotechnológiában alkalmazott szervezetek, illetve humán patogén fonalas gombák, közismert. A stresszválasz megértése mindegyik említett terület fejlődése és gyakorlati kiaknázása szempontjából alapvető jelentőségű.

Az értekezés követi a szokásos struktúrát és tartalmazza a követelményekben meghatározott fejezeteket. A teljes mű 177 oldal, melyből a tartalmi rész 118, a közlemények jegyzékei és a köszönetnyilvánítás 34, a mellékletek pedig 25 oldalt tesznek ki. Az értekezésben bemutatott eredmények megértését 33 ábra és 22 táblázat segíti. Az értekezés alapját 13 első vagy utolsó szerzős tudományos publikáció képezi, melyek összesített impakt faktora 40,8. Megjegyzendő, hogy további 20 impakt faktoros publikáció van feltüntetve, mint a dolgozathoz kapcsolódó első, vagy utolsó szerzős közlemény. Mindez jól mutatja a dolgozatban ismertetett kutatások színvonalát és eredményességét, az a tény pedig, hogy a jelölt ilyen nagyszámú publikáció első vagy utolsó szerzője, meghatározó hozzájárulását ezen eredményekhez. A dolgozat alapjául szolgáló publikációk tudományometriai adatai és színvonala tehát kiváló és messzemenően kielégítik az MTA doktori disszertációkra vonatkozó követelményeket.

Formai szempontból a dolgozat igényesen kivitelezett, elírást csak elvétve találtam benne. Néha a szerzőnek gondja akadt a megfelelő magyaros kifejezések megtalálásával (pl. mannitol, szorbitol helyett magyarul a mannit és szorbit kifejezést használjuk, ubiqtin helyett a megfelelő írásmód: ubikvitin, a „fitness” kifejezést egy sz-szel írjuk, az „intenzifikálás” szó pedig meglehetősen idegenül cseng), ezek száma azonban kevés és nem volt értelemzavaró. Az ábraanyag szemléletes és jól segíti a megértést. Egyedül a 18. ábra tenyészetekről készült fotói és a 29. ábra törzsfája esetében éreztem esztétikai hiányosságokat.

A dolgozat elején található a Rövidítések jegyzéke. Ezzel kapcsolatban meg kell jegyezni, hogy a dolgozatban rengeteg gén van megemlítve túlnyomórészt rövidítve, melyek nem szerepelnek ebben a jegyzékben. Mivel a szerző az első teljes megnevezést követően csak a rövidítésekkel hivatkozik rájuk és egy-egy oldalon akár 5-6 génre utaló betűszó is előfordul, segítséget jelentett volna, különösen az Irodalmi áttekintés és az Eredmények és megbeszélésük fejezetek olvasása során, ha a többször is előforduló gének jelölését is feltüntette volna a jegyzékben, vagy akár egy külön mellékletben.

Az együttesen 29 oldal terjedelmű **Bevezetés** és **Irodalmi áttekintés** rész jól elhelyezi a későbbiekben ismertetett témákat a nemzetközi irodalomban és bemutatja a kutatások esetleges gyakorlati jelentőségét is. Az Irodalmi áttekintés igyekszik összefüggő keretbe ágyazni a különböző kutatási irányokat, aminek megfelelően ismerteti a gombák oxidatív



stresszre adott válaszát és ennek szabályozását, az *A. nidulans* szénéhezésre adott válaszát, valamint az *A. fumigatus* stresszválaszait és utóbbiak kutatásának gyakorlati jelentőségét.

A 4 oldalas **Célkitűzések** fejezet 4 fő kutatási célt fogalmaz meg, melyek mindegyike több kisebb célkitűzésben konkretizálódik. Mindegyik fő célkitűzés esetében kitér a kutatásokat megalapozó saját eredményekre és tulajdonképpen ezek folytatásaként határozza meg a kitűzött konkrét célokat. Az említett fő célok a következők: 1. Az *A. nidulans* oxidatív stresszválaszának és ezen belül elsősorban az AtfA transzkripciós faktor szerepének vizsgálata; 2. az *A. nidulans* szénéhezésre adott stresszválaszának vizsgálata; 3. az *A. pachycristatus*, echinocandin termelő gomba echinocandin toleranciájának vizsgálata és 4. az *A. fumigatus* stressz toleranciájának vizsgálata, mely magában foglalta 13 *Aspergillus* faj genomikai és stressz adatainak elemzését is. A célkitűzések világosak és logikusan felépítettek, de kicsit hiányoltam egy összefoglaló fő célkitűzés, mint az egész kutatás céljának, vagy akár egy távlati célnak a megfogalmazását.

Az **Anyagok és módszerek** fejezet 8 oldalon, tömören, de követhetően mutatja be a dolgozatban ismertetett kutatások módszertani háttérét megfelelően hivatkozva mindazon publikációkra, ahol a felhasznált eljárások részletes leírása megtalálható.

Az értekezés lényegi része, természetesen, a 69 oldal terjedelmű **Eredmények és megbeszélésük** című fejezet, melynek alfejezetei a Célkitűzések fejezetben megfogalmazott célok logikáját és beosztását követi. A fő célkitűzéseknek megfelelően a fejezet 4 fő és több kisebb alfejezetre tagolódik. Az eredmények értékelése alapos és szinte mindig kitér az adott kutatási eredmény jelentőségére mind az alapkutatások, mind a gyakorlat szempontjából. Kiemelendő az eredmények megvitatása során felhasznált irodalom naprakész jellege, ami a kutatást a mai nemzetközi kutatási trendek és irányok összefüggésébe helyezi, egyben az is kitetszik belőle, hogy a szerző igen magas szinten ismeri és gyakorolja szakterületét.

A dolgozat legfontosabb eredményeit a kétoldalas **Tézisek** című fejezet foglalja össze és sorolja fel, összesen 19 pontban. A szerző minden tézispont esetében meghivatkozta az eredményt közlő publikációt is.

A disszertációban bemutatott és felsorolt eredmények közül a következőket emelem ki, mint új tudományos eredményeket:

1. Vizsgálta az oxidatív stressz hatását a transzkriptomra *Aspergillus nidulans* esetében és megállapította, hogy az a kép, amit a környezeti stresszválasz fogalma sugall, miszerint a stresszválasznak volna egy stresszre specifikus (variábilis) és egy stressz típusától független (konzervatív) eleme, az *A. nidulans* esetében nem állja meg a helyét, hanem a különböző stresszorokkal kiváltott oxidatív stresszválaszok a transzkriptom szintjén egyediek.
2. Jellemezte az AtfA transzkripciós faktor hatását a génkifejeződésre oxidatív stressz során.
3. Megállapította, hogy az *atfA* gén inaktiválása segítségével egyes szekunder metabolit gének transzkripciója befolyásolható *A. nidulans*-ban.
4. Jellemezte az *engA* gént, megállapította, hogy az egy szénéhezés hatására extracellulárisan termelődő β -1,3-endoglükánáz kódol, mely szükséges a szénéhező tenyészetek autolitikus sejtfaldegradációjához.



5. Fontos megállapításokat tett az *A. nidulans* szénéhezésével kapcsolatban. Megállapította, hogy a szénéhezés és a konidiogenezis mind a szabályozást tekintve, mind funkcionálisan összefügg egymással, valamint vizsgálta a gombaszaporok melanizációjának indukcióját és szerepét a szénéhezés során.
6. Igazolta, hogy az echinocandin termelő *A. pachycristatus* nem eleve echinocandin rezisztens és β -1,3-glükán szintáza echinocandinnal gátolható. Ugyancsak megállapította, hogy az echinocandin kezelésre indukálódó kitinszintézis fontos eleme az echinocandin toleranciának.
7. Megállapította, hogy az *Aspergillus* fajok stresszgén készletének összetétele és stressztoleranciája között nincs szoros kapcsolat, ami arra utal, hogy utóbbit a stresszgének kópiaszámán kívül más, pl. szabályozási, folyamatok határozzák meg.
8. Az *A. fumigatus* vaséhezésrel kombinált oxidatív stresszre adott stresszválaszának elemzésével megállapította, hogy az nem írható le a csak vaséhezésre, illetve oxidatív stresszre adott stresszválaszok egyszerű kombinációjaként, hanem mind erősségében, mind jellegében eltér azoktól.

Néhány a dolgozat tartalmi részével kapcsolatos megjegyzés:

Az Eredmények és megbeszélésük fejezetben, a transzkriptomok elemzése kapcsán a szerző mindenhol indukálódott és represszáldott génekről ír. A 48. oldalon zárójelben megadja, hogy az „indukálódott” kifejezést „up-regulated”, a „represszáldott” kifejezést pedig „down-regulated” értelemben használja és nagyon helyesen, minden vizsgálatnál definiálja, hogy milyen fold change értékek fölött, illetve alatt teszi ezt. Ennek ellenére, mivel az indukció/represszió kifejezések hagyományosan arra vonatkoznak, hogy egy gén átíródik-e vagy sem az adott körülmények közt, véleményem szerint helyesebb lett volna a felül/alul szabályozott, vagy a túl-, alul működött, vagy hasonló kifejezések használata, hisz minden esetben a megadott FC érték alatt is értelmezhető a génműködés (indukálódott a gén), csak legfeljebb kisebb mértékben fejeződött ki.

A 49-50. oldalon a következőket olvashatjuk: „A 10C ábrán az is látszik, hogy bár az együtt szabályozott gének száma hasonló volt a kontroll és a mutáns törzsben, a két géncsoport között nagy átfedés nem volt. Azaz, a deléció hatására bizonyos gének kikerültek az együtt szabályozott gének csoportjából (összesen 88 gén), míg más gének bekerültek ebbe a csoportba (összesen 152 gén). Ez elsöre meglepő, hiszen, ha az AtfA részt vett az együtt szabályozott gének működtetésében, akkor jelentősen csökkenni kellett volna az együtt szabályozott gének számának a mutánsban. Ha nem vett részt, akkor a két géncsoport között nagy átfedést kellett volna tapasztalnunk.” Ez a rész nehezen érthető, különösen mivel a szerző megváltoztatta az általa korábban bevezetett terminológiát. Az „együtt szabályozott gének” kifejezés korábban azt jelentette, hogy mindhárom stresszorra (MSB/diamid/tBOOH) megváltozott a kifejeződésük. Az ilyen gének száma a két törzs esetében a fent említettekkel ellentétben világosan eltért (a kontroll esetében 79/73, a mutáns esetében 53/163 volt a felül/alul szabályozott „együtt szabályozott gének” száma). Az együtt szabályozott gének csoportjából nem kerültek ki és ide nem kerültek be gének, mivel a 10C ábrán csak együtt szabályozott gének vannak feltüntetve. Ha jól értem az ábrát, akkor az azon látható két halmaz mindegyike „együtt szabályozott gének” számát mutatja, a metszetük pedig azokat, amelyek a kontrollban is és a mutánsban is együtt szabályozottnak bizonyultak. Ebből viszont az következik, hogy az *atfA*



gén deléciója hatással volt számos „együtt szabályozott gén” kifejeződésére. A 10C ábrán a két halmaz metszete olyan géneket mutat, amelyekre az *atfA* gén deléciója nem volt hatással, hisz ezek működése nem változott. A csak a mutánsban túl-, illetve alulműködő gének kifejeződésére, azaz 18+134 génre viszont mindenképpen hatással volt az *atfA* hiánya. Ezek szabályozásában közvetlenül, vagy közvetve tehát részt vesz az AtfA. Mivel kezelhető számú génről van szó, érdemes lett volna megnézni, hogy melyek ezek. Van-e információ arra vonatkozóan, hogy konkrétan milyen gén, illetve milyen funkcióval rendelkező gének szabályozásában vesz részt az AtfA? Ebből a szempontból érdekes lehet az is, hogy a csak a kontrollban együtt szabályozottnak bizonyult 88 gén hogyan fejeződik ki a mutánsban, inaktíválódtak, vagy csak bizonyos stresszorok hatására aktiválódnak?

111. oldal: „A kísérleteinkben alkalmazott oxidatív stresszkezelés (3 mM H₂O₂; 1 h) a kontroll tenyészetek transzkriptomában (32. ábra, 21-22. táblázatok, 9-11 mellékletek) és proteomában is (Kurucz és munkatársai 2018b) csak viszonylag kis stresszválaszt generált.” Szerintem ez a hivatkozott 32. ábrából és 21-22. táblázatokból nem olvasható ki, hisz mindegyik esetében a változások a kontroll tenyészetekhez vannak viszonyítva, illetve félrevezető a megfogalmazás, mivel, ha jól érttem a dolgot, itt a kontroll éppen az volt, ami nem kapott stresszort.

A szerző a 113. oldalon a következőket írja: „Ez egyben felértékeli azon erőfeszítéseket is melyek célja, hogy a gombák stresszválaszait közvetlenül a kutatás szempontjából releváns környezetben (pl. az emberi szervezetben) tanulmányozzuk (McDonagh és munkatársai 2008).” Reméljük ilyen vizsgálatra nem kerül sor emberi szervezetben, bizonyára a szerző is sejt/szövet tenyésztésre vagy állatmodellre gondolt. A hivatkozott cikkben egyébként egérmodellt használtak.

Kérdéseim a jelölthöz a következők:

Milyen viszonyban van a 10C és a 13. ábra? A 13. ábra szerint 11 együtt szabályozott gén AtfA függő, míg a 10C ábrán jóval több. Szintén érdekes lett volna tudni, hogy a 11 génhez milyen funkciók/folyamatok társíthatók.

A jelölt az 50. oldalon megállapítja: „Az a kép, amit az ESR fogalma sugall, miszerint a stresszválasznak van egy stresszre specifikus (variábilis) és egy stressz típusától független (konzervatív) eleme, az *A. nidulans* esetében még különféle oxidatív stresszerek esetén sem állja meg a helyét.” Ugyanakkor 13 gén hatféle stresszor esetén is „együtt szabályozottnak” bizonyult, ami ezen géneknek a stresszválaszban betöltött általános szerepére utal. Lehet-e tudni, hogy melyek ezek a gének és milyen folyamatokkal állnak kapcsolatban?

Mit ért a jelölt „általános stresszválasz elemeken” (lásd 55. oldal)? A stresszválasz gének és elemek megkülönböztetését azzal indokolja, hogy „Azaz nem közvetlenül a gének indukcióját/represszióját célszerű vizsgálni, hanem inkább az általuk meghatározott folyamatokét.” Ugyanakkor, ha az adott gének meghatároznak egy folyamatot, akkor a gének és a folyamat kifejeződése erősen átfedő fogalmat alkot.

„RT-qPCR mérések alapján az oxidatív stresszválasz és a szekunder anyagcsere szabályozásában egyaránt fontos *napA* (Yin és munkatársai 2013), valamint a szekunder



anyagcserét aktiváló hatású *rsmA* (Shaaban és munkatársai 2010, Yin és munkatársai 2013) oxidatív stressz alatt indukálódik és ezen indukció elmarad, vagy jelentősen mérséklődik AtfA hiányában (Emri és munkatársai 2015).” (63. oldal) Lehetséges-e, hogy az AtfA más szabályozó fehérjék génjeinek kifejeződésére hat és így modulálja a szabályozó hálózatokat? Vizsgálták-e esetleg, hogy konkrétan milyen gének működését befolyásolja? A szerző maga is így fogalmaz: „Az *atfA* deléción transzkriptomra gyakorolt hatásainak nagy része megmagyarázható, ha feltételezzük, hogy az AtfA fő feladata a jelátviteli hálózat működésének módosítása oxidatív stressz alatt. (Orosz és munkatársai 2017)” Van-e esetleg arra információ, hogy ez a módosítás milyen génekre, vagy jelátviteli hálózatra gyakorolt hatást jelent?

A szerző vizsgálta az autolitikus sejtfaldegradáció (ASD) jelentőségét szénéhezés esetén, illetve kapcsolatát a konidiogenezissel. Kísérleteiben a szénéhező vad típusú törzs kevésbé bizonyult életképesnek, mint a *ΔengA*, *ΔchiB* törzs, ahol nem volt ASD és a telepek sem növekedtek jobban. Igaz a konídiumszám a mutánsok esetében valamivel kisebb volt, de nem volt nagyságrendbeli az eltérés. Ennek fényében milyen előnyt biztosít és mi lehet a szerepe az ASD-nek, illetve van-e egyáltalán védelmi funkciója szénéhezés esetén?

Vizsgálták-e, illetve igazolták-e, hogy a tisztított GgtA fehérjét kódolja-e a *ggtA*-nak elnevezett gén (történt-e fehérje szekvenálás)? Kérdés, hogy a teljes gGT aktivitásért ez a fehérje, illetve gén felel-e?

Vaséhezés és az azzal kombinált oxidatív stresszes állapotban számos multidrog transzporter indukálódott és a szerző felveti, hogy ezen transzporterek indukciója terápiás körülmények közt megnövelheti a gombaellenesszerekkel szembeni ellenállóképességet a gombában. Van-e arra adat, hogy vashiány esetén, illetve az oxidatív stresszes állapotban nagyobb az azoltolerancia, vagy más antifungális szerekkel szembeni ellenállóképesség *A. fumigatus*-ban, vagy más patogén gomba esetében?

Összefoglalva, Dr. Emri Tamás fontos eredményekkel járult hozzá az *Aspergillus* nemzetség és általában a gombák stresszfolyamatainak és ezek genetikai hátterének megértéséhez. Megállapítom, hogy a doktori disszertáció eredeti kutatásokon alapszik és jelentős, új tudományos eredményeket fogalmaz meg. Tudományos teljesítménye és a benyújtott értekezés alapján tehát **Dr. Emri Tamást méltónak tartom az MTA doktori fokozat elnyerésére és egyben javaslom a nyilvános vita kitézését és a disszertáció alapján az MTA doktora cím odaítélését.**

2019. szeptember 10.

Papp Tamás
egyetemi tanár
az MTA doktora