Válasz Emődy Levente Professzor Úr opponensi véleményére

Először is hálásan köszönöm Emődy Professzor Úr disszertációmra fordított idejét és fáradságát, gondolatébresztő kérdéseit, valamint azt, hogy eredményeimet pozitívan értékelte. Válaszaimat a hallgatóság számára könnyebb követhetőség kedvéért a megjegyzések illetve kérdések sorrendjét követve adom meg.

1. „A tanítómestere iránti tisztelet megnyilvánulását látom abban is, hogy az értekezés alapjául szolgáló mikroorganizmus rendszertani helyének és nevének pontos meghatározása és az annak megfelelő korrekció végrehajtása ellenére munkája során és a disszertáció címében is a régi megjelölést használja. Ugyanakkor nem tartottam volna kegyeletsértőnek az új megjelölés párhuzamos feltüntetését a címben, mert az szakmai szempontból fontos információt hordoz."

A C faktor termelő törzs megváltozott taxonómiai besorolásának az eredetivel párhuzamosan való szerepeltetésének felvetése jogos megjegyzés. Valószínűleg helyesebb lett volna ezt választani. Az eredeti név megtartása mellett az szólt, hogy a nemzetközi szakirodalomban ezzel a névvel közöltünk, ezt ismerik.

2. „A disszertáció fejezetekbe osztása során a jelölt mellőzi az „Anyagok és Módszerek" fejezetet. Az egyes eredmények ismertetéséhez rövid metodikai leírást is ad, valamint az ott alkalmazott módszerek a fejezetek elején megadott illeszkedő közleményekben részletesen is megtalálhatók. A felhasznált baktériumtörzseket és származékokat, valamint plazmidokat tulajdonságaikkal együtt egy helyen bemutató összeállítás tovább könnyítette volna az áttekinthetőséget."

Az Anyagok és módszerek fejezet hiányára, illetve az ennek következményeként a baktériumtörzsekre és plazmidokra vonatkozó, egy helyen fellelhető információ hiányára vonatkozó megjegyzés természetesen jogos, de ezek az adatok a disszertációhoz csatolt eredeti közleményekben megtalálhatók, s ezzel igyekeztem a disszertáció terjedelmét az elvárt kereteken belül tartani.

3. „Az új eredményeket a szerző 29 pontban foglalja össze. Ezeket új eredményként elfogadom. Egyetlen kérdésem, hogy a 2. és 7. pont nem lenne-e összevonható egy pontba."

Az új eredmények felsorolásában a 2. és 7. pontok összevonására vonatkozó kérdésre a válaszom az, hogy bár mindkét pontban a C faktor rendkívül specifikus citomorfológiai hatása van hangsúlyozva, az azokat megállapító kísérleteket időben mintegy 20 év különbséggel végeztük, s ugyannak a jelenségnek két különböző aspektusára vonatkoznak: az egyik a hozzáadott C faktor fehérje, a másik pedig a klónozott C faktor gén kifejeztetésének hatását analizálja, ezért éreztem úgy, hogy helyesebb ezeket külön pontokban felsorolni.

4. „A dolgozat gondos összeállítását mutatja, hogy abban megfogalmazási vagy betűhibát alig lehet találni. Számomra az értelmezéshez többszöri elolvasást igénylő részt csak a 77. oldal 2./ pontjának első mondatában találtam."

A 77. oldalon található, csak többszöri elolvasás után értelmezhető mondatról elismerem, hogy szerkezete bonyolult, s valóban többszöri nekifutásra lehet csak megérteni, amikor az olvasó a bővítményektől megtisztítja a mondatot. Sajnos tudom magamról, hogy hajlamos vagyok hosszú körmondatok írására, úgyhogy ha több ilyen nehezen értelmezhető mondatot a tisztelt opponensem nem talált, legyen szabad ezt örömmel konstatálnom.

5. „Bár a mortalitás kifejezést a vezető szakirodalomban (pl. Infection and Immunity) is használják az adott megbetegedésben meghaltak arányának kifejezésére, szorosabb értelmezésben a letalitás kifejezést tartanám pontosabbnak."

Az aszpergillózissal foglalkozó szakirodalomban döntően a „mortalitás" kifejezést használják. Disszertációmban ezt követtem, de természetesen a „letalitás" kifejezés használata is pontos és elfogadott.

6. „A táblázatokban a genus és species nevek nem mindig a szokásos dőlt betűs szedésben jelennek meg."

A függelék táblázataiban a genus és species nevek konvenciótól eltérő, nem dőltbetűs írása természetesen helytelen. Mentségem csak annyi, hogy ezek a nagyszámú gomba és baktériumtörzset tartalmazó táblázatok különböző BLAST homológia keresés eredményeinek az importálásából származnak, s a genus és species nevek konvenciónak megfelelő átalakítása elkerülte a figyelmemet.

7. „A 12. oldalon a *S. griseus* 52-1 és *S. griseus* 45H még mint vad törzs és annak mutánsa szerepelnek, az utóbbi végleges azonosításáról és valódi besorolásáról itt még nem esik szó. A bemutatás ilyen módja esetén helyesebbnek tartanám az adott

relációban törzs helyett származéknak nevezni, majd függetlenségének felderítése után az előbbitől független törzsként aposztrofálni."

Ebben a relációban a törzs elnevezés a vélt mutáns esetében valóban helytelen. Talán tekinthető ez freudi elszólásnak, ami arra utal, hogy a dolgozat szerzője tudta, hogy itt valójában nem mutánsról, hanem egy másik, független törzsről van szó.

8. „Az A-faktor hatásának eléréséhez szükséges koncentrációt csak a szaporodás bizonyos szakaszában éri el. A szerző a Gram negatív baktériumoknál megfigyelt analóg jelenség alapján „mikrobiális hormon"-ként jellemzi a faktort. Negatív mutánsok tenyészetéhez hozzáadva a hiányzó funkciók helyreállnak. Ez alapján felvetődik a kérdés, hogy valójában itt is egy feromon-szerű molekula hatására beinduló quorum sensing jelenségről van-e szó."

A válasz egyértelműen igen. A quorum sensing jelensége baktériumokban olyan sejtek közötti kommunikáció, amely a populáció sejtjeinek koordinált viselkedését (koordinált génexpresszióját) váltja ki egy bizonyos sejtsűrűség elérése esetén. Ez általában egy szignál molekula koncentrációjának egy bizonyos küszöb értékénél valósul meg. A szignál molekulát bakteriális hormonnak is nevezik. Ilyen szignál molekulák a Gram negatív baktériumokban az N-acil homoszerin laktonok, bizonyos Gram pozitív baktériumokban oligopeptidek, s ilyenek a streptomycesekben a γ-butirolaktonok. A természetes környezetben együtt élő különböző baktérium populációk különböző szignál molekulákat termelhetnek, s ezek más populációk sejtjeire hatástalanok lehetnek. Az N-acil homoszerin laktonok, és a γ-butirolaktonok egyébként abban is hasonlítanak, hogy több egymástól csak kismértékben eltérő szerkezetű molekula ismert. Az γ-butirolaktonokról elmondható továbbá, hogy ezek a különböző törzsekben, bár az érzékelésüket végző receptorok konzerváltak, az általuk szabályozott válaszok eltérőek lehetnek. A *S. griseus* által termelt A-faktor egy ilyen diffúzibilis kis molekula, amely a sejtmembránon át tud diffundálni, s így bekerül a sejtekbe. Ott receptorához kötődve, amely egy represszor fehérje, egy regulátor szintézisét indítja el, felszabadítva génjét a represszió alól. Ez a regulátor *S. griseusban* antibiotikum bioszintézist (streptomicin, grixazon) és légmicélium képzést, illetve sporulációt vált ki. Ezzel szemben a *S. coelicolor* által termelt γ-butirolakton, az SCB-1 csak az antibiotikum képzésre van hatással.

9. „Az A-faktor 74 transzkripciós egység 152 génjének expresszióját fokozta. A bélbaktériumok esetében a globális regulátorok, mint például az RfaH számos funkció

aktiválása mellett mások működésére represszió hatást gyakorolnak. Ismert-e olyan gén, amelynek regulációjában az A-faktor szuppressziós regulátort aktivál? Ez a lehetőség annál is inkább valószínű, mert az A-faktor mutáns származék számos stressz-válaszban résztvevő fehérjéket termel, vagy túltermel."

A hivatkozott adatok mikroarray-n alapuló globális génexpressziós vizsgálat eredményei. A génexpressziót egy A-faktor szintézisére nem képes *ΔafsA S. griseus* mutáns tenyészetében és ugyanezen törzs exogén A-faktor hozzáadásakor nőtt tenyészetében hasonlították össze. Összesen 477 gén expressziója változott, melyek közül 74 transzkripciós egységbe tartozó 152 gén expressziója fokozódott. Ezt a 74 transzkripciós egységet tovább vizsgálták elektroforetikus mobilitás változást vizsgálva annak eldöntésére, hogy az expresszió növekedése az AdpA fehérjének közvetlenül a transzkripciós egységhez való kötődésének a következménye-e, vagy transzkripciós faktorok hatására aktiválódnak, mint például a streptomicin bioszintézis génjei. A kísérletekből az derült ki, hogy nagyjából a 74 transzkripciós egység felét az AdpA fehérje közvetlen módon szabályozza, a másik felének a fokozott expressziójára pedig AdpA függő transzkripciós faktorok által fejti ki hatását.

A vizsgálat szerint 325 gén expressziója csökkent. A csökkenés mértéke kisebb, mint a növekedés mértéke a fokozott expressziójú gének esetében. Ez arra utalhat, hogy a csökkent génexpresszió esetleg az A-faktor hatására létrejövő fiziológiai változásokkal magyarázható, semmint az AdpA közvetlen represszió hatásának, de ez sem zárható ki. Ezt azonban a hivatkozott közleményben nem vizsgálták tovább. Nincs továbbá információ arról sem, hogy a csökkent génexpresszió esetlegesen egy szupressziós regulátor aktiválásának a következménye lenne.

10. „A C faktor fokozza a *Sterptomyces griseus* streptomycin termelését. Ismert-e a C faktor hasonló szerepe más antibiotikum vagy egyéb bioaktív szekunder metabolit termelésében?"

Nem ismert, mert az adat nem nyilvános, bár tudomásom van róla, hogy olyan, a gyógyászatban fontos antibiotikum termelő törzsekben, melyek C-faktort termelnek, mint a *Saccharopolyspora erythraea* és a *Streptomyces clavuligerus* vizsgálták.

11. „*Aspergillus fumigatus* törzsekben kimutatták a *facA* (?facC?) gén homológjainak jelenlétét. Jelen van-e ilyen homológ a species eddig vizsgált minden képviselőjében és milyen fokú közöttük a szekvencia azonosság?"

A 2011. március 20.-i állapot szerint csak négy *Aspergillus fumigatus* törzs genomi szekvenciája érhető el. Ezek az *A. fumigatus* Af293, A1163, AF210 és Af10 jelű törzsek. Az Af293 és A1163 törzsek szekvenálása befejeződött, s a géneket annotálták. Ebben a két törzsben megtalálható a C faktor homológ. Ezen törzsek 3. és 5. kromoszómáján is található C faktor gén, s a homológia foka a fehérjék aminosav sorrendjét tekintve magas, 57% a 3. és 51% az 5. kromoszómán lévő kópiával. Megtalálható továbbá a *facC* gén ugyancsak 2 példányban az *A. fumigatus* legközelebbi rokonának tartott *Neosartorya fischeri* NRRL 181 jelű törzsében is, melyről korábban azt tartották, hogy ritkán patogén, de az utóbbi években egyre több közlés van ennek a törzsnek a patogenitásáról is.

12. „Van-e olyan, a szabadalmaztatási eljárás titkosságával nem ütköző újabb eredmény, amely a *facC* gén kimutatásán alapuló diagnosztikai eljárás gyakorlati alkalmazhatóságára vonatkozik? Elindult-e már a fajlagosság és érzékenység klinikai körülmények között történő felmérése?

Igen, ilyen kísérletek elkezdődtek, de még kevés adatunk van, így specificitást és szenzitivitást nem számoltunk.

Előzetes adatokat tudok mondani. Ami az esszénk érzékenységét illeti, az igen jónak mondható. A Myconostica cég által forgalmazott, kereskedelmi forgalomban kapható kit érzékenysége 50 cfu/10 mikroliter, s ugyanez az adat a mi *A. fumigatus* esszénknél 30 cfu/10 mikroliter.

Egy würzburgi csoport eredményeivel való összehasonlításban pedig, akiknek az esszéje a mienknél érzékenyebb, mintegy 10 cfu/10 mikroliter, azokban az EORTC (European Organization for Research and Treatment of Cancer) szabványrendszer alapján feltételezett aszpergillózisos esetekben, amelyekben az ő esszéjük igazolta az aszpergillózist, az esetek több mint 60%-ában nekünk is sikerült azt igazolnunk.

13. „Feltehetően a szabadalmaztatási eljárás miatt nem szerepelnek a Függelék táblázatai között az *Aspergillus* fajok C faktor homológjai. Adható-e ezekről információ a nyilvános vita időpontjában?”

Nyilván elkerülte Professzor Úr figyelmét a függelék 8. táblázata, amelyben a 2009. augusztus 20.-i állapotnak megfelelően a *facC* gomba homológok vannak feltüntetve. A már korábban említett *A. fumigatus* és *N. fischeri* mellett további néhány gomba faj rendelkezik *facC* génnel. Ezek a *Chaetomium globosum, Podospora anserina, Penicillium chrysogenum, Paracoccoides brasiliensis, Ajellomyces dermatitidis és capsulatus, valamint A. terreus*. Ez

utóbbival kapcsolatos érdekesség, hogy ebben a törzsben a *facC* gén annotálása feltehetőleg hibás, mert csak egy rövid, 128 aminosavat tartalmazó fehérjeként van annotálva, holott korábban ez is a teljes 310 aminosavat tartalmazóan szerepelt az adatbázisban. A szabadalom egyébként időközben megjelent (Biró S, Birkó Z, Paholcsek M. Oligonucleotides for the detection of Aspergillus species. Lajstromszám: WO 2010/061351 A1)

14. „Az analógiák alapján úgy tűnik, hogy a C faktor gén horizontális géntranszfer során kromoszómális, vagy amennyiben a virulenciában betöltött szerepe igazolható, patogenitási sziget részeként épült be a genomba. A bélbaktériumoknál ezen szigetek beépülési helye típusosan transzfer RNS régiókban van. Van-e hasonló megfigyelés a *Streptomyces* és *Aspergillus* fajok esetében is? Ha igen, hol történik a beépülés, és milyen locust/locusokat érint? Valószínűsíthető-e a szekvencia és a G+C hányados alapján egy feltételezhető *facC* archetípus?"

A rendelkezésre álló *Streptomyces* (*S. albus, S. scabies, Saccharopolyspora erythraea,* ami nemrég lett átsorolva, eredendően *S. erythreus* volt) valamint fonalas gomba (*A. fumigatus, A. terreus, N. fischeri*) adatokat átnézve az derült ki, hogy a *facC* ezekben a törzsekben nem tRNS géneket tartalmazó régióban van, s a beépülés környezetében nagyon eltérő gének találhatók. Ugyanakkor egy *facC* archetípus valószínűsíthető, mivel a gomba *facC* GC tartalma néhány százalékkal magasabb, mint a genomi DNS GC tartalma, s a gomba gének tripletjeinek harmadik pozíciójában a GC arány a streptomycesekre jellemző módon sokkal magasabb a gén átlagos GC tartalmánál is.

15. „A tűzelhalás megelőzésére biokontroll eszközként alkalmaznak *Pseudomonas fluorescens* törzseket alma és körte ültetvényeken. Elképzelhetőnek tartja-e a jelölt C faktor negatív *Streptomyces* törzs vagy származék felhasználását a burgonya varasodásának megelőzésében."

A kérdés érdekes, de a választ nem tudom. Ehhez az lenne szükséges, hogy a *facC* negatív törzs kiszorítsa, vagy gátolja a burgonya varasodást okozó patogén *S. scabies* törzset, amire vonatkozó adatokkal nem rendelkezünk.

Végezetül még egyszer köszönöm Professzor Úr munkáját, s támogató véleményét.

Debrecen, 2011. május 8.

Dr. Biró Sándor