

Válasz Kovács Kornél Professzor Úr opponensi véleményére

Megköszönöm Kovács Professzor Úr opponensi munkáját, a dolgozatom részletes értékelését, értékelésének a dolgozat szerkezetére vonatkozó, helyenként kritikai, egyébként nem alaptalan, megjegyzéseit, valamint a munka egészére vonatkozó pozitív, elismerő szavait.

Amennyiben Professzor Úr megengedi, a szerkesztésre vonatkozó kritikai megjegyzések elfogadása mellett azokra csak részben reagálok.

Az Anyagok és Módszerek fejezet elhagyása tudatos volt, hiszen mint a Professzor Úr is megállapította, az összes alkalmazott módszer leírása túlságosan nagy terjedelmű, a dolgozat szerkezetét veszélyeztető lett volna, ezért választottam a szintén lehetséges módszerek közti szemezgetés helyett azt a megoldást, hogy azok, a csatolt közleményekben érhetők el.

A dolgozatban annak ellenére, hogy leírom a C faktor termelő törzs taxonómiai átsorolását, mindvégig az eredeti *S. griseus* néven említem. Ennek racionális magyarázatát az adja, hogy ezt a törzset a szakmában évtizedek óta így ismerik, de kétségtelen helyesebb lett volna az Emődy Professzor Úr által javasolt kettős elnevezés használata. A C faktor termelő törzs taxonómiai átsorolása indokolja egyébként azt is, hogy az Eredmények és Megbeszélés részben az első fejezet a törzs taxonómiai átsorolásáról szól.

A Professzor Úr kérdéseire, a kérdések sorrendjében az alábbiakat válaszolom:

1. Ismert-e a B-2682 AFN (A-faktort nem termelő és ezért kopasz) és B-2682 AFP (A-faktort termelő, de mégis kopasz) mutációk genetikai háttere (38. oldal)?

Ez azért két érdekes kérdés, mert az AFN törzs azt mutatja, hogy az A-faktor a sporulációhoz nélkülözhetetlen, s az AFP pedig azt, hogy szükséges, de nem elégséges. Árnyalja a képet, hogy több kopasz mutáns folyékony tenyészetben spórát képez, s szilárd tenyészetben is létezik sporuláció, bár a telep kopasz. Ezen törzsek és jelenségek genetikai hátterének felderítése egy izgalmas feladat. Pillanatnyilag csak az AFN törzs esetében ismert a mutáció. Ez a mutáns genomi szekvenciájának meghatározásával vált ismertté. A törzsben az *afsR* génben van egy nonszenz mutáció, melynek eredményeként egy 93 aminosavval rövidebb fehérje keletkezik, ami nyilvánvalóan nem látja el funkcióját. Az AfsR fehérje funkciója az *afsS* gén transzkripciójának elősegítése, amely gén a szekunder metabolizmus és morfogenezis egyik globális regulátora.

2. Van-e elképzelése a szerzőnek arról, hogy az aktív térszerkezetét spontán is felvenni képes C faktor fehérje miért a Tat szekréción mechanizmussal kerül ki a sejtből, noha az utóbbi mechanizmus a citoplazmában kialakult háromdimenziós szerkezetet megőrző fehérjék exportjára “szakosodott” (45. és 49. oldal)?

Röviden válaszolva a kérdésre, nincs, csak spekulatív választ tudok adni, s kísérletesen az sem bizonyított, hogy a mi törzsünkben ez valóban a Tat útvonalon történik, de a C faktor *S. scabies*ben található homológjáról ezt kísérletesen is igazolták.

A Tat fehérje-transzlokációs rendszert eredetileg valóban a kofaktort is tartalmazó fehérjékre specifikus transzportként írták le, amely fehérjék háromdimenziós szerkezetüket megtartva kerülnek szekréción. Mivel arra utaló kísérleti eredményeink vannak, hogy a C faktor működéséhez Zn-ion kofaktort igényel, gondolhatjuk azt is, hogy a Tat útvonalon történő szekréción a C faktor termelő *S. griseus*ban/*albidoflavus*ban megfelel ennek a feltételezésnek.

A másik lehetséges magyarázat az, hogy streptomycesekben a Sec szekréción útvonal mellett a Tat szekréción útvonal is igen fontos, amire az ismert genomú fajok (*S. coelicolor* és *S. avermitilis*, *S. scabies*) genomjának analízisével *in silico* azonosított nagyszámú, feltételezhetően a Tat útvonal által szekretált fehérje utal. Ezek jelentős része azonban nem tartalmaz kofaktort. Közöttük nagy számban találunk hidrolitikus enzimeket (foszfataázok, foszfodiészterázok, foszfolipázok, xylanázok és más komplex szénhidrátbontó enzimek), és ABC transzporterek szubsztrátkötő fehérjéit, melyek feltételezhetően a differenciálódó *Streptomyces* telep tápanyagellátásában fontosak. Ezen fehérjék egy jelentős részéről a Tat útvonalon történő exportot *tatC* mutáns proteomikai analízisével igazolták.

További magyarázat lehet az *in silico* azonosított nagyszámú Tat szubsztrát fehérjére streptomycesekben az, hogy a magas GC tartalmú *Streptomyces* genomban arginin gyakran helyettesíti a lizint, ami a Tat szignál *in silico* azonosításának bizonytalanságát megnöveli. Az mindenesetre általánosnak mondható, hogy streptomycesekben a Tat szubsztrát fehérjék aránya többszöröse az egyéb baktériumokban találtak, ami valamiféle evolúciós adaptációra is utalhat.

3. Vizsgálták-e a korábbi mutánsok (pl. 25-1, 45-H) proteomját és ha igen mik voltak a főbb változások?

A *S. griseus* 45H és 52-1 törzsek proteomjának vizsgálata szerepelt a terveinkben, de miután kiderült, hogy két egymással nem rokon törzsről van szó, ezeket a kísérleteket elvetettük.

4. Az Eredmények 3.9 alfejezetében leírtak szerint a C faktor indukálja az A-faktor termelést, az A-faktor viszont beindítja – többek között – számos extracelluláris proteáz bioszintézisét. Ezek a proteázok nem bontják el a C faktor fehérjét? Ha igen, akkor a C faktor egyik fiziológiai hatása az őt lebontó proteázok termelésének serkentése?

A kérdés érdekes, és jogos. A választ azonban szét kell válasszuk az egyes törzsekre vonatkozóan.

A C faktort termelő *S. griseus/albidoflavus* 45H törzsben a C faktor sem indít be A-faktor termelést. Ez a törzs nem képes A-faktor termelésére! Az A-faktor termelését a C faktor az AFN, azaz A-faktor negatív *S. griseus* mutánsokban indítja be.

A tesztelésre használt *S. griseus* 52-1 törzs bár folyékony tenyészetben termel A-faktort és streptomycint, mégsem sporulál. Spórázik viszont szilárd táptalajon.

A *S. griseus* 52-1 és a C faktor termelő *S. griseus/albidoflavus* 45H proteáz termelését korábban Dr. Vitális Sándor csoportja részletesen tanulmányozta. Ugyancsak vizsgálták a C faktor hatását olyan szempontból, hogy mikor kell a C faktort a tesztörzs tenyészetéhez hozzáadni, hogy hatását kifejtse, s mikor tűnik el a hozzáadott C faktor a tenyészetből.

Kimutatták, hogy a C faktor hatásának kifejtéséhez az exogén C faktort a tenyészet 16-20 óras kora előtt kell hozzáadni, s az 24-28 óras korra a tenyészet felülúszójából eltűnik, adszorbeálódik a növekvő hifacsúcsokra. A különböző proteázok termelése a *S. griseus* 52-1 törzsben ennél később indul be.

A C faktort termelő törzs folyékony táptalajon nőtt tenyészetében viszont viszonylag kevés az exocelluláris proteáz, különösen abban az időszakban, amikor a C faktor megjelenik és kezdi kifejteni a hatását. A kiválasztott C faktort védi a proteázok hatásától a táptalaj összetevőjeként jelenlévő nagy mennyiségű egyéb fehérje. (10 liter 72 óras tenyészlemben több mint 100 g egyéb fehérje mellett kb. 1 mg C faktor van.) A proteázok a tisztítás során jelentettek komoly problémát, amikor az egyéb fehérjék zömét a C faktor mellől eltávolítottuk.

Ezek alapján nem gondolom, hogy a C faktor feladata az A-faktor termelésének stimulálásán keresztül az őt lebontó proteázok termeltetése lenne. Ugyanakkor tény, hogy a proteázok szintézisének indukálása beletartozik hatáskörébe.

5. Mi indokolta, hogy a proteomikai vizsgálatokban csak a szekretált fehérjéket tanulmányozták (61. oldal)?

Ezt egyrészt az indokolta, hogy laboratóriumunk, illetve együttműködő partnereink is elsősorban a streptomycesek extracelluláris biológiájának tanulmányozásában volt érdekelt,

amely extracelluláris biológia egyébként rendkívül összetett, s olyan fontos kérdéseket érint, mint a fehérje szekréció, komplex, nehezen feltárható szubsztrátok hasznosítása, antibiotikumok termelése, a sejtdifferenciálódás.

További indok természetesen az volt, hogy az extracelluláris proteomban sokkal kevesebb fehérje van, mint a citoplazmában illetve a nehezen szolubilizálható membránban, illetve a C faktor maga is extracelluláris regulátor.

6. Az *E. coli* *facC* gén homológot tartalmaz (64. oldal). Ugyancsak *E. coli*-ban sikerült kifejeztetni a *facC*-ről termelődő C faktor fehérjét (45. oldal). Mi a különbség a “természetes”, azaz az *E. coli* genomában levő génről és a “rekombináns”, azaz a *S. griseus*-ból származó gén termékei között?

Az *E. coli* *facC* homológgal, hasonlóképpen a többi nem Actinomycetes bakteriális homológhoz, bár a BLAST homológia kereső program egyértelműen közös evolúciós eredetet jelez, csak igen kisfokú a homológia. A fehérje mérete hasonló a *Streptomyces* fehérjéhez, de aminosav szekvenciában csak 15% az azonosság, és 27% a hasonlóság, ami a konzervatív aminosav cseréket is figyelembe veszi. A rekombináns C faktor fehérje viszont, leszámítva a tisztításhoz hozzákapcsolt hisztidin farkat, tökéletesen megegyezik a *Streptomyces* fehérjével, s specifikus biológiai hatása is megegyezik annak hatásával.

7. Van-e elképzelés arról, hogy a streptomyceseken kívül is széles körben megtalált C faktornak a többi organizmusban mi lehet az élettani szerepe?

Tekintettel a streptomycesekben betöltött szerepére, nevezetesen a fonalas növekedésű baktériumok komplex életciklusának szabályozásában betöltött regulátor funkcióra, amelyhez hasonló a baktériumokban nem ismert, funkciójáról a többi mikroorganizmusban nincs elképzelésünk.

Végezetül még egyszer köszönöm Professzor Úr munkáját, s munkám pozitív elbírálását.

Debrecen, 2011. május 8.

Dr. Biró Sándor