

Válasz Márialigeti Professor Úr opponensi véleményére.

Köszönöm Márialigeti professzor úrnak munkám alapos értékelését, s elismerő szavait, hiszen ez egy olyan kutató véleménye, aki az általa is említett két hazai eminens *Streptomyces* kutatócsoport munkáját közelről követhette nyomon.

Válaszaimat a megjegyzések és kérdések sorrendjében adom meg.

Az Anyagok és Módszerek fejezet hiányát nem minden alap nélkül kritizálja a professzor úr, de ezt én tudatosan vállaltam azért, hogy a dolgozat terjedelme megfeleljen az előírásoknak, s a hiányát a disszertációhoz *in extenso* csatolt közleményekkel pótoltam.

Azt írja professzor úr, hogy „A sors furcsa fintora, hogy pont Biró Sándor mutatta ki, hogy az általa „alaposan végiggondolt, és helytálló munkahipotézis alapján” végzett kutatásnak minősített C faktor felfedezése egy laboratóriumi fertőzésnek, véletlennek – szerintem inkább a gondviselésnek – volt köszönhető.”

Az úgynevezett „véletlenek” szerepe a kutatásban igen gyakori, hiszen a kutatónak észre kell vennie valamit, azaz Szentgyörgyi Albert szavait kölcsönvéve „látni, amit mindenki lát, és gondolni, amit még senki sem gondolt”. Én azt gondolom, hogy a C faktor felfedezése egy ilyen kutatói éleslátás eredménye, hiszen egy rendkívül érdekes jelenséget vett észre, s vizsgált az akkor rendelkezésre álló módszerekkel. Egyébként az akkori eszközparknak köszönhető az is, hogy ez a fertőzés megtörtént.

Kicsit sajnálom, hogy az A faktor és a sejtsűrűség érzékelés kérdéskörét (pl. homoszerin laktonok) pusztán egy bővített mondatban elintézi a szerző.

Miután erre vonatkozó megjegyzést Emődy professzor úrtól is kaptam, már sajnálom, hogy erről nem iktattam be egy rövid fejezetet, hiszen különösen az A-faktor hatásmechanizmusa kapcsán, s tekintettel az A-faktor és C faktor regulációs útvonalak összefüggésére, ez lehetséges lett volna.

Hiányolom, hogy a mixobaktériumok – mint egy másik komplikált életciklussal rendelkező csoport – nem kerülnek elő. Van-e esetükben pl. valami hasonló szabályozási folyamat, lehet-e onnan ötleteket meríteni. A bakteriális genetika modellszervezetei lettek ezek is.

Valóban sok analógia van a streptomycesek és a Gram negatív mixobaktériumok között, hiszen a mixobaktériumok is talajbaktériumok, szokatlanul nagyméretű a genomjuk (13 millió bp), táplálékfelvételükhöz extracelluláris enzimeket szekretálnak, antibiotikumokat

termelnek, s igen érdekes életciklusuk van, melynek során éhezéskor sejt-sejt kontakt mediált szignalizáció eredményeként termőtestet hoznak létre, melyben a pálcikaformájú vegetatív sejtek gömbölyű, vastag sejtfallal rendelkező túlélő sejté, spórává alakulnak.

Fejlődési ciklusuk tanulmányozása nem sokkal a mi C faktor kutatásaink után kezdődött, s azt figyelemmel kísértük. A hasonlatosságok mellett azonban több volt az eltérés a két rendszer között. A sporuláció folyamatát elindító A szignál mibenlétének tisztázása pl. lassabban haladt előre, mint a mi C faktorunk fehérje voltának felismerése és tisztítása. 1979-ben Parish *Developmental Biology of Prokaryotes* c. könyvében még cAMP szerepelt A szignálként, 1999-ben Dynny and Winans *Cell-Cell Signaling in Bacteria* c. könyvében C szignálként a CsgA 24,6 kD fehérje enzimátikus hatását tartja fontosnak, és csak 2003-ban közölték, hogy ennek a 17 kD C-terminális szakasza, mely enzimátikusan inaktív, a sejtfelszínhez kötődve fejt ki a hatást. A sors iróniája, hogy a szerzők a CsgA fehérjét, ill. ennek 17 kD-os fragmentjét C faktornak nevezték el. Sajnos a vizsgálataink során nem nagyon tudtuk a két rendszer analógiáját új hipotézisek kialakításában felhasználni. Több új gondolatot ébresztett az ugyancsak sok tekintetben különböző, de molekuláris hátterének tisztázásában előttünk járó *Bacillus subtilis* sporulációs modell.

Az utóbbi 1-2 évtizedben az A-faktor hatásmódjával kapcsolatos ismeretek, és a C faktor ebben a rendszerben is mutatott hatásossága vonták inkább magukra figyelmünket.

Az eredményeket 16 fejezetben sorolja fel a szerző, amelyből 14 fejezet teljes logikai rendet alkot, egységes, egymásra épülő. Az utolsó kettő (aszpergillózis és varasodás) a bíráló számára inkább érdekesség.

Legyen szabad ezt egy kicsit másként látnom. Munkánk során igyekeztünk a C faktor funkcióját megérteni, ezért minden C faktort termelő mikroorganizmusra figyelemmel voltunk. Mivel a *S. scabies* ismert növénypatogén, s azok a fonalas gomba fajok pedig, amelyekben C faktor gén található, kezdetben kizárólag ismert humánpatogének voltak, felmerült a C faktor szerepe a patogenitásban. Ezért vizsgáltuk a burgonya varasodásban esetlegesen betöltött szerepét. Az a tény pedig, hogy C faktor gén előfordulása a kísérleteink akkori szakaszában csak és kizárólag humánpatogén gombákban volt ismert, adta a lehetőségét egy érzékeny aszpergillózis kimutatására alkalmas módszer kidolgozásának. Ez a módszer, nevezetesen egy igen érzékeny kvantitatív valós idejű PCR eljárás kidolgozásra is került, s mivel a C faktor gén szekvencia az egyes gomba fajokban divergált, a gomba fajszerű azonosítására is alkalmas. Az eljárás szabadalmaztatva is lett, s legalábbis nem rosszabb mások hasonló céllal kidolgozott módszereinél.

Az első négy eredmény fejezet a termelő szervezet, a teszt szervezet és a C-faktor fehérje pontos megismerését tárja elénk. Ezután megkezdődik a hatásmechanizmus vizsgálati eredményeinek a bemutatása. Rögvest az 5. fejezet kapcsán – amely a C faktor kifejeződését életciklus függőként mutatja be – eszembe jut Szabó István Mihály professzor egyik cikke, amely morfológiai megfigyelések alapján arra a következtetésre jut, hogy a sporuláció folyamatát talán a légmicélium csúcsi sejtje („tip cell unit”) szabályozhatja (Szabó, I.M. 1977. Are the morphogenetic changes in the shieth of sporulating hyphae of *Streptomyces* regulated by the tip cell unit? The biology of the Actinomycetes and related organisms, 12, 21-27.). Meg is erősíti a későbbi fejezetek anyaga ezt az érzést, hiszen a C faktor a reproduktív növekedési fázis kezdetén termelődik, no meg a legutolsó proteomikai elemzések azt is erősítik, hogy valamilyen „éhezési szignál” is szerepet játszhat a C faktor kifejeződésében. Milyen okai lehetnek annak, hogy a szénhidrát és aminosav transzportfehérjék expressziója ilyen kulcsfontosságú. Hogyan működik a streptomicetákban más éhezési reakció szabályozása? Felmerül rögvest az a kérdés is, hogy az expresszió vizsgálatoknál nem kellene-e valahogy szétválasztani és külön vizsgálni a szubsztrát hifát, meg a légmicéliumokat. Hiszen egyik részről evidencia a 60. lap megállapítása „a transzkripció fokozódása a programozott sejthalál időszakára specifikus”. No de ugyanakkor történik a spóráképzés, ami szintén expresszió fokozódással kell együtt járjon!

Rendkívül izgalmas problémát feszegetnek ezek a kérdések. A sporuláció és szekunder metabolizmus összefüggését a tápanyag elfogyásával, azaz az éhezési stresszel, ami egy rég ismert jelenség. Mivel kísérleteinket szilárd táptalajon végeztük, erre vonatkoznak válaszaim is. A szénhidrát és aminosav transzport fehérjék fokozott expressziója a növekedésnek ebben a fázisában azért fontos, mert a táptalajban ezek koncentrációja lecsökkent, a differenciálódó telep pedig éppen ebben a szakaszban hozza létre a túlélő sejteket –légmicélium képzés és sporuláció- s ehhez biztosítja a tápanyagot, többek között a táptalajt átszövő szubsztrát micélium lizisekor felszabaduló anyagok felvételével.

Baktériumokban általában, s így streptomycesekben is, fontos éhezési szignál a szokatlan szerkezetű guanozin-3'-difoszfát 5'-difoszfát ppGpp, amit stringent faktornak is neveznek. A ppGpp szintje aminosav éhezéskor nő meg, melyet töltetlen tRNS molekuláknak a riboszómához kötődése indukál, s szintézisét *S. coelicolorban* kizárólag a riboszómához asszociált RelA fehérje végzi. *S. coelicolor* vad típusú és *ΔrelA* mutánsának génexpressziós vizsgálatával kimutatták, hogy a ppGpp szintézisének indukálása represszálja a vegetatív

szigma faktor *hrdB*, és a *S. coelicolor* 13 conservonjából hatnak az expresszióját. Ugyanakkor indukálja egy alternatív, extracitoplazmatikus funkciójú szigma faktor, továbbá antibiotikum bioszintetikus útvonalak, s néhány feltételezett regulátor gén expresszióját. A *ΔrelA* mutáns nem képez spórát sem, melynek valószínű oka, hogy nem termeli a sporuláció specifikus hidrofób fehérjét, a chaplint és rodint.

A ppGpp differenciálódásban betöltött szerepére mi is nagyon korán gondoltunk, hiszen a ppGpp és ppGppp szintézisét végző enzimnek a differenciálódással való kapcsolata volt annak idején egyetemi doktori disszertációm témája, s ebből két dolgozatom is megjelent, de magának a nukleotidnak a mérésére alkalmas műszer hiányában nem volt alkalmunk.

Az éhezési szignálra vonatkozó kérdést igazán érdekessé a disszertáció beadása után kapott eredményünk teszi. Az általunk vizsgált *S. griseus* AFN mutánsban genom szekvenálással ugyanis azonosítottuk a mutációt. A mutáció az *afsR* génben egy nonszensz mutáció. Ennek következtében a három doménnel (*Streptomyces* antibiotikum regulációs fehérje [SARP], ATPase domén, és C terminális tetratricopeptid domén) rendelkező AfsR fehérje elveszíti a tetratricopeptid doménjét. Az AfsR fehérje funkciója az *afsS* gén transzkripciójának szabályozása. DNS kötő doménjével kapcsolódik az *afsS* gén promotor régiójában található direkt ismétlődő szekvenciát tartalmazó kötőhelyéhez, mellyel elősegíti az RNS polimeráz kötődését, s az *afsS* gén transzkripcióját. Az *afsS* gén terméke egy szigma faktorszerű fehérje, melyről újabban transzkriptóm analízissel kimutatták, hogy a korábban ismert antibiotikum bioszintézist és sporulációt szabályzó funkciója mellett nagyszámú, a foszfor-, nitrogén- és kénékezésben szerepet játszó gén, transzkripciós regulátorok, és két szigma faktor expresszióját is szabályozza. Mivel C faktor génnel a *S. griseus* AFN törzs sporulációja, egy ez idáig még ismeretlen módon helyreállítható, feltételezhető, hogy a C faktor valamilyen módon az éhezési szignáltranszdukciós útvonal szabályozásában szerepet játszhat. A hatásmód vizsgálatára irányuló kísérletek már elkezdődtek.

Erre utal egyébként egy másik mostanában megjelent tanulmány is, amely szerint az *afsS* regulációjában az AfsR fehérje mellett a foszfát ékezésben szabályzó szereppel bíró kétkomponensű PhoR-PhoP szabályzó rendszer válasz regulátora a PhoP is szerepet játszik. Leírják továbbá, hogy az AfsR fehérje a foszfát transzportban résztvevő *pstS* gén expresszióját is szabályozza, melynek megváltozott expresszióját az AFN mutánsban mi is kimutattuk.

Ami a szubsztrát micélium és légmicélium különválasztását illeti, a vegetatív és reprodukzív fonalak, ill. sejtek szétválasztása az ultrahang érzékenyséjük különbözősége alapján lehetséges. Ilyen kísérleteket végzett korábban kollégám Dr. Vitális Sándor, amikor is

ezen formák kémiai összetételét vizsgálta. Ilyen szétválasztással az általunk végzett proteomikai vizsgálattal a kétféle sejtípus sejtjeiben történő differenciális génexpresszió tanulmányozható. Mi a jelen munkában az extracelluláris proteomot vizsgáltuk, mivel a C faktor is egy extracelluláris pleiotróp regulátor.

Elgondolkodtató a C faktor hatásának erőteljes koncentrációfüggése és az a furcsa dolog, hogy a nagyobb kópiaszámú vektorok esetén nem nyilvánult meg. Mintha kópiaszám szabályozó funkciója is volna ennek az anyagnak. Van-e relevanciája a kétkomponensű toxinszerű szabályozó rendszereknek ez esetben? Lehet-e egyik (toxin) eleme ez az anyag?

A C faktor fehérje dózisfüggő hatását nagyon rég ismerjük, nagy koncentrációban a tesztörzshöz adva részleges illetve teljes növekedésgátlást okoz. Ezzel analóg jelenségnek tűnik a nagy kópiaszámú vektorról való kifejeztetés sikertelensége is. A jelenség magyarázatát azonban nem tudjuk.

A kérdés második felét illetően, nevezetesen, hogy *van-e relevanciája a kétkomponensű, toxinszerű szabályozó rendszereknek ez esetben*, bizonytalan vagyok, hogy jól értem-e a kérdést. Gondolhatok itt a toxin termelés szabályozására a baktériumokban széles körben elterjedt kétkomponensű regulátor rendszerek által, esetleg a kétkomponensű fehérje toxinokra (AB toxinok), melyek egyik komponense maga az aktív toxin, a másik pedig a sejtbe való bejutásért felelős, de a programozott sejthalált eredményező toxin-antitoxin rendszerekre is. Azonban bármelyiket is tekintem, nem látok analógiát a C faktorról.

Talán a legizgalmasabb számomra a C faktor homológok (-analógok?) előfordulása a filogenetikai fán. A *Listeria*, *Lactobacillus* vonal összekötődése valamilyen fágokkal nyilvánvalónak tűnik. A *Staphylococcus* és a *Streptomyces* vonalakra történő csatolás már jóval nagyobb filogenetikai távolságok megtételét feltételezi, nem is beszélve azután az eukariótákról. Van-e itt több bizonyíték Aharonovicz és mtsai 1992-es hipotézise óta? Vannak-e genomikai vizsgálatok a C faktor génjének környezetét illetően, amelyek valószínűsíthetik horizontális közlekedését. Netán találtak-e olyan *Streptomyces* fajokban jellemző extrakromoszómális genomot, amelyben van ebből a környezetből is?

A C faktor gén előfordulása a filogenetikai fán valóban szokatlan. Megléte streptomycesekben sem általános, hiszen csak néhány fajban s a *Streptomyces albidoflavus* csoport tagjaiban van meg. Ez utóbbi arra utal, hogy a gén a streptomycesekbe mintegy 140 millió évvel ezelőtt, a *S. albidoflavus* különválásakor kerülhetett (1% 16S rRNS szekvencia

eltérést 50 millió évnél tekintve). Előfordulása a gombákban sem általános. Nincs C faktor gén pl. *Saccharomyces cerevisiae*-ben, *Saccharomyces pombe*-ben, *Aspergillus nidulans*-ban, *Aspergillus niger*-ben, *Neurospora crassa*-ban, hogy csak a rendkívül jól ismert és részletesen tanulmányozott fajokat említsem. Az alacsony GC tartalmú Gram pozitív baktériumokban és fágjaikban a C faktor domén egy nagyméretű fehérje része, amely további doméneket is tartalmaz. A gomba és *Streptomyces* C faktor mérete viszont azonos. Míg azonban streptomycesekben a Tat szekréciós útvonalon szekretálódnak, gombákban az általános szekréciós útvonalon.

A sporadikus előforduláson kívül a horizontális géntranszferre utal, hogy a gomba és *Streptomyces* fehérjék szekvenciája nagyfokban hasonló, a gomba gének GC tartalma magasabb a gazdasejt genomjának GC tartalmánál, a gén tripletjeinek harmadik pozíciójában a streptomycesekre jellemzően nagy valószínűséggel G vagy C található, s az ismert kevés genom esetén a streptomycesekben a gén környezete eltérő. *Aspergillus fumigatus*-ban és *Neosartorya fisheriana*-ban a C faktor gén két kópiában fordul elő. A két kópia környezete eltérő. Az egyik kópia mindkét fajban az endogliceramidáz, és az inulináz gének között, a másik kópia pedig a pektát liáz és egy ismeretlen fehérje génje között található, ami arra utal, hogy a két kópia egy közös ősből, egymástól függetlenül, HGT-vel kerülhetett. A gén terjedésére a bakteriális világban a fágok általi transzfer tűnik magyarázatnak, az eukarióta gombákba kerülésükre pedig a streptomycesek és fonális gombák közös élőhelye adhatja a magyarázatot, hiszen mind a gombák, mind a streptomycesek rendelkeznek olyan eszközökkel (kitinázok és β -laktám antibiotikumok, melyek segítségével, protoplasztiképzéssel DNS felvétel történhet).

Az Aharonovics professzor által leírt hipotézis óta is több esetben írtak le HGT-t streptomycesek és gombák között. Ilyen pl. a virulencia asszociált szenzor hisztidin kináz átkerülése *Streptomyces coelicolor*-ból *Candida albicans*-ba és *Fusarium solani*-ba. Továbbá az antibiotikum rezisztencia génekről is azt tartják, hogy az antibiotikum termelő *Streptomyces* törzsekből kerülnek át más mikrobákba.

A dolgozat összefoglalását illetően még megjegyzem, hogy a 28. ábra (amelyik egyébként a 4. ábra egy ponton módosított változata) az ismertetett eredmények alapján - véleményem szerint - ennél differenciáltabb kellene legyen.

A megjegyzéshez csak annyit fűzök hozzá, hogy jelen tudásunk szerint mindenképpen differenciáltabb is lenne az ábra.

Végül még egyszer köszönöm Professzor Úr munkáját, izgalmas, gondolatébresztő kérdéseit, megjegyzéseit, s munkám pozitív értékelését.

Debrecen, 2011. május 9.

Dr. Biró Sándor