

Prof. Dr. Pócsi István, CSc, DSc
tanszékvezető egyetemi tanár
Debreceni Egyetem
Természettudományi és Technológiai Kar
Biotechnológiai és Mikrobiológiai
Tanszék
Pf. 63.
4010 Debrecen

Tel.: 52-512900, 62337-as mellék
Fax.: 52-512925
E-mail: pocsi.istvan@science.unideb.hu
Alternatív e-mail cím: ipocsi@gmail.com

Opponensi vélemény Dr. Gácsér Attila „Opportunista humánpatogén gombák virulenciájának és patogenitásának komplex vizsgálata” című MTA doktori értekezéséről

Dr. Gácsér Attila tudományos munkásságát jól ismerem, kutatásait, különösen a *Candida parapsilosis* faj virulencia faktorainak, továbbá az ezen oportunista patogén gomba által okozott fertőzések patogenezisének a felderítésében eddig elért eredményeit nagyra értékelem.

A bírálatomban először az értekezés **formáját és nyelvhelyességét**, majd **tartalmát** értékelem, ezt követően pedig röviden összefoglalom az **új tudományos eredményeket**.

Forma, nyelvhelyesség

A dolgozat olvasmányos, jól esett magyar nyelven ilyen szépen átgondolt és kidolgozott munkát olvasni. Az értekezés szerkezete és terjedelme (irodalomjegyzékkel együtt 129 oldal) megfelelő, a hivatkozott szakirodalom (205 közlemény) releváns, a szerző a dolgozat végén (95-104. oldalak, 45. ábra) áttekinthető módon foglalta össze a legfontosabb kutatási eredményeit. A téziszfüzet formáját is el tudom fogadni, bár az új kutatási eredmények pontokba foglalása nagymértékben javította volna a munka, különösen az új eredmények áttekinthetőségét.

A kritikai észrevételeim a következők:

1. Az értekezésben több helyen megfigyelhetők az angol kifejezések tükörfordításából származó **nyelvhelyességi problémák**. Tipikusan ilyen az „alacsony” és „magas” jelzők használata a következő paraméterek esetében: mortalitás (14., 18. és 20. oldalak), specificitás (14. oldal), születési súly (19., 20., 49. és

99. oldalak), előfordulási gyakoriság (20. oldal), glükóz, lipid tartalom (24., 27., 49. és 66. oldalak), pH (26. oldal), sejtdenzitás (26. oldal), fungicid aktivitás (35. oldal), antibiotikum koncentráció (48. oldal), kolonizáló képesség (57. oldal), ölési hatékonyság (60. oldal), makrofág migrációs sebesség (64. oldal), citokinek termelése (80., 83., 85. és 102. oldalak), citokineket termelő sejtek száma és aránya (82., 84., 85. és 102. oldalak) és gomba sejtszám (93. oldal). Ezek helyett kifejezetten ajánlom a „kis”/„kicsi” és „nagy” jelzőket, esetleg más, rokon értelmű szavakat (pl. „csekély”). Szintén javaslom az „emelkedik” ige és az ebből képzett szavak („emelkedett”, „emelkedés”) helyett a „növekszik” ige és az ebből képzett szavak használatát a következő paraméterek esetében: gén/gének expressziója (26., 35. és 78. oldalak), fagocita aktiváció (64. oldal), Sapp2 termelés (100. oldal), fago-lizoszóma fúzió (101. oldal) és gombaölési képesség (101. oldal). Emellett fel szeretném hívni a figyelmet a „során” szó túlzott használatára is (22., 28., 32., 35., 37., 50., 63., 64., 66., 67., 72., 83., 85., 87., 91., 92., 93., 94., 95., 96., 97., 101. és 103. oldalak). A 14. oldalon olvasható: „A súlyos gombás fertőzések **magas** mortalitása részben annak **köszönhető**”, ami helyett sokkal jobb lenne „A súlyos gombás fertőzések **nagy** mortalitása részben annak **tulajdonítható**” megfogalmazás.

2. A szakszavak használatában szintén találtam bizonytalanságokat és ezek pontosítását kérni is szeretném. Például az értekezésben olvasható „*Candida* **patogenezis**” (25. oldal) továbbá „Lipázok szerepének vizsgálata a *C. parapsilosis* **patomechanizmusában**” (47. oldal). Nem lenne helyesebb **fertőzések** patogeneziséről és patomechanizmusáról beszélni? A 67. oldalon és a 31. ábrán is (73. oldal) a *C. parapsilosis* Sapp enzimekkel kapcsolatban olvasható mind a „**proteinázok**”, mind a „**proteázok**” kifejezés. Egyszerre érvényes lehet mind a két meghatározás? (Lásd: Barrett és McDonald, 1986, PMID: 3541905.) Az értekezésben több helyen (7., 27., 35. és 84. oldalak) olvashatunk „**reaktív oxigéngyökök**”-ról. Ez tévedés, ezek helyesen „**reaktív oxigén formák/fajták**”, vagy „**reaktív oxigén részecskék**”. Az „**inozitol**” helyesen „**inozit**” (22. oldal), a 26. oldalon pedig valószínűleg „**farnezol**”-ra gondolt a szerző „**fernesor**” helyett. Néhány esetben az angol vegyületnevek olvashatók az dolgozatban, pl. ugyancsak a 26. oldalon „thyrosol” a „tirozol” és „dodecanol” a „dodekanol” helyett. A **Rövidítések jegyzékében** (4-7. oldalak) számos kiváló magyar fordítás mellett találtam egy nem teljesen megfelelő fordítási javaslatot, „**apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD (inflammaszóma asszociált fehérje)**”, és néhány esetben nem találtam meg a magyar fordítást (**MYD88, RIG-I, ROR γ t, Syk**).

3. Ki szeretném emelni az értekezés ábráinak (összesen 45 db ábra) a minőségét és esztétikai szépségét, különös tekintettel a bemutatott mikroszkópi felvételek kiváló minőségére. Ez nagyban elősegítette az elért eredmények áttekintését a számomra. Ugyanakkor nyomtatásban több ábra (pl. 6., 11., 12. és 15. ábrák) részletgazdagsága nem érzékelhető megfelelően és a mondanivaló megértése sem könnyű a kicsinyítésből származó problémák, pl. túl kicsi betűméretek, miatt. Dicséretes az ábrák magyar nyelvű feliratozása, de

néhány esetben angol nyelvű feliratozás figyelhető meg főképpen a grafikonok esetében (9., 10., 11., 12., 13., 14., 15., 17., 19., 32., 33. és 34. ábrák). A 12. ábrán az ábrarészek jelzése „elcsúszott”, hiszen A-I-től tejed A-K helyett.

4. Számomra túl szűkre szabottnak tűnik a „**6. Anyagok és módszerek**” fejezet (42-44. oldalak), ahol az alkalmazott, nagyszámú kísérleti metodika egyszerű **felsorolása** történik. Örültem volna, ha legalább egy-két megfelelő hivatkozást találtam volna az egyes módszerekre vonatkozóan.

5. Még a formai értékelésben említtem, de már átvezet a tartalmi értékeléshez a szerző azon igyekezete, **hogy kutatási részterületenként kitérjen a folyó kutatásokra, együttműködő partnerekre, illetve a kidolgozandó kutatási tervekre.** Mint a 13. oldalon írja, „...a munka jelenleg is folyamatban van...” és a bemutatott eredmények „...fontos szerepet játszanak a jövő kutatási irányvonalának a meghatározásában is.”. A szerző emellett külön, igen érdekes és gondolatébresztő fejezetet („8. További terveink”; 93-94. oldalak) szán annak bemutatására, hogy az értekezésbe foglalt eredmények milyen további kutatásokat alapozhatnak meg. Emellett már szükségtelennek tűnik a folyó és jövőbeni kutatások részterületenként is történő említése, ismertetése (lásd az 40., 58., 60., 85., 86., 92. és a 103. oldalakat). **Az értekezésben bemutatott kísérleti eredmények jelen formájukban is koherensek, sikeresen prezentálhatók és védhetőek.**

Tartalom

Dr. Gácsér Attila az értekezésében a hagyományosnak tekinthető „mikroorganizmus központú” szemlélet helyett „mikrobiológus-immunológus megközelítés” révén szeretné megérteni első helyen a *C. parapsilosis* faj patogenitását. Egyetértek a szerzővel abban, hogy a *Candida* fajok által okozott fertőzések patogenezisének a megértése komplex mikrobiológiai, immunológiai, összehasonlító genomikai, evolúciobiológiai megközelítést igényel. **Fontos megjegyeznem azt, hogy a szerző mindezeket a területeket egyaránt műveli és ezeken már eddig is jelentős kutatási eredményeket ért el.**

1. A szerző kutatásai közül ki szeretném emelni a *C. parapsilosis* *CpLIP1* és *CpLIP2* (a *C. albicans* *LIP1* lipázt kódoló gén homológjai), valamint a duplikálódott *SAPP1a* és *SAPP1b* aszpartil proteináz gének delécióját és a létrehozott hiánymutánsok szerteágazó vizsgálatát. Ezen vizsgálatok eredményeképpen megállapítást nyert, hogy a *C. parapsilosis* által szekretált lipáz aktivitás fontos virulencia faktor, amely fontos szerepet játszik a mikroba táplálkozásában, adhéziójában, biofilm képzésében, az immunsejtek károsításában, a gomba fagocita sejten belüli túlélésében, sőt a gyulladásos folyamatok

késleltetésében is (23. ábra, 66. oldal). Hasonlóképpen, a Sapp1p aszpartil proteináz aktivitása fontos a gazdaszervezet által termelt antimikrobiális fehérjék hatástalanításban, a fagocitózis gátlásában, továbbá, a lipáz aktivitáshoz hasonlóan, segíti a gomba fagocita sejten belüli túlélését is (31. ábra, 73. oldal). Ezekhez a fontos megfigyelésekhez kapcsolódóan a következő gondolatokat, kérdéseket szeretném megfogalmazni:

- A *C. parapsilosis* esetében a lipáz és proteináz gének száma jóval kisebb, mint a *C. albicans* esetében. A genomanalízisek eredményeinek ismeretében **várható-e a *C. parapsilosis* hidroláz gének számának és ezáltal a mikroba patogenitásának a növekedése** (lásd a *SAPP1* gén duplikációját), vagy éppen, a *Candida dubliniensis*-hez hasonlóan (Jackson és munkatársai, 2009, PMID: 19745113; Moran és munkatársai, 2011 és 2012, PMID: 21076011 és 21904553), **pszeudogének kialakulása és génvesztés révén a virulencia csökkenése, továbbá bizonyos anatómiai nichekhez** (Moran és munkatársai, 2012, PMID: 21904553) **és korcsoportokhoz** (lásd pl. a nagyon kis súllyal született újszülötteleket, 19. oldal) **történő adaptáció zajlik?** Ez a mikrobiális evolúcióbiológiai megközelítés kiegészíthetné az újszülöttek immunrendszerének a sajátosságain (pl. Th2/Th17 dominancia) alapuló elgondolásokat (lásd a 84. oldalon). Ugyanezt a kérdést szeretném feltenni a *C. metapsilosis*, *C. orthopsilosis* és *C. parapsilosis* fajok vonatkozásában is (77. oldal).

- A lipáz deficiens sejtek szaporodása nagy lipidtartalmú tápközegben lassabb, mint a vadtypusú sejteké (49. oldal; Gácsér és munkatársai, 2007, PMID: 17853941). Bár a *SAPP1* hiánymutáns törzsek 20 % hővel inaktivált humán szérumot tartalmazó PBS-ben a vadtypushoz hasonló sejtszám növekedést mutattak (27. ábra a 70. oldalon; Horváth és munkatársai, 2012, PMID: 22301631) más tenyésztési körülmények között, pl. eltérő fehérjeforrások jelenlétében, eltérő (lassabb) szaporodás ebben az esetben is lehetséges. **Ennek megvizsgálását mindenképpen javasolni szeretném.** Felvetődik ugyanis az a kérdés, hogy mivel a lassú szaporodás önmagában is globális transzkriptom és metabolikus változásokat vált ki *Saccharomyces cerevisiae* élesztőben (Lu és munkatársai, 2009, PMID: 19056679; Slavov és munkatársai, 2012, PMID: 22456505) **vajon az észlelt fenotípusok legalábbis egy része nem a *C. parapsilosis* mutánsok lassabb szaporodásának tulajdonítható-e az adott körülmények között a deletált hidroláz(ok) típusától függetlenül?**

- A fagoszómák és lizoszómák ko-lokalizációjának a tanulmányozására vonatkozóan a szerző két eljárást, Alexa Fluor 647 – LysoTracker Green áramlási citométeres „kvantitatív imaging” (61. oldal) és Calcofluor White – LysoTracker Red fluoreszcens mikroszkópos (72. oldal) módszereket használt. **Ezekben az esetekben szeretném megkérdezni az elvégzett független kísérletek számát és azt is, hogy a bemutatott változások szignifikánsak voltak-e? Az értekezés egyik legnagyobb értéke egyébként éppen a nagyszámú kísérleti adat megfelelő és alapos statisztikai elemzése.**

2. A *C. albicans* és *C. parapsilosis* sejtek által kiváltott citokin termelési vizsgálatokban hővel elölt *Candida* sejteket használtak (79. oldal), ami jelentősen befolyásolhatja az eredményeket, pl. a sejtfallszerkezet megváltozása miatt (83. és 92. oldalak). **Erre a szerző maga is helyesen mutat rá.** A hőkezelés a gombafajok felismerésében szerepet játszó receptorok azonosítását is megnehezítheti (91 és 92. oldalak). A szerző írja a 83. oldalon: „Legújabb kísérleteinkben azonban kidolgoztunk egy olyan ko-inkubációs rendszert, ahol az élő sejtek kölcsönhatásait vizsgálhatjuk a humán fagocita sejtekkel.” **Megtudhatunk-e erről részleteket? Sikerült-e megerősíteni az elölt sejtekkel kapott eredmények legalább egy részét?**

Új tudományos eredmények

Dr. Gácsér Attila tézisei közül a következőket fogadom el új tudományos eredménynek:

1. A szerző a *C. parapsilosis* opportunistá humánpatogén gomba genetikai módosítására alkalmas, transzformáción alapuló génkiütési módszert dolgozott ki, amit sikeresen alkalmazott a *LIP1* és *LIP2*, továbbá a *SAPP1a* és *SAPP1b* gének deléciójára.

2. Igazolta a *C. parapsilosis* szekretált lipázok szerepét a gomba táplálkozásában, a gazdaszervezet inváziójában, valamint a gazdaszervezet immunválaszának a módosításában. **Ezt ítélem a szerző eddigi legjelentősebb tudományos eredményének.**

3. Ezen túlmenően igazolta a Sapp1 aszpartil proteinázok szerepét az antifungális hatású szérumfehérjék elleni védekezésben továbbá a fagocitózis gátlásában makrofágok esetében. Ezek a proteinázok szintén elősegítik a patogén gomba fagocita sejten belüli túlélését is.

4. A szerző a *Candida* sejtekkel szembeni immunválasz összehasonlító elemzése révén igazolta, hogy amíg a *C. albicans* alapvetően Th1/Th17 T-sejt polarizációt indukál, a *C. parapsilosis* esetében eltolódás van a Th2/Treg polarizáció irányába.

5. A szerző igazolta a Dectin-1 receptor szerepét a *C. parapsilosis* felismerésében, továbbá megmutatta, hogy a mononukleáris sejtek MAP kinázai különböző mértékben vesznek részt a *C. albicans* (a JNK szerepe jelentősebb) és a *C. parapsilosis* (a p38 és az ERK szerepe jelentősebb) sejtek által kiváltott citokin indukció szabályozásában.

Nyilatkozat

Tekintettel Dr. Gácsér Attila kutatásai eredetiségére, eredményességére, valamint az MTA doktori értekezése színvonalára, az abban bemutatott nagyszámú, gondosan megtervezett, kivitelezett és kiértékelt kísérletre a doktori értekezésben foglalt eredményeket elegendőnek tartom az MTA doktora cím megszerzéséhez, továbbá javaslom a nyilvános védés kitűzését is. Az értekezés nívós nemzetközi szakmai folyóiratokban közölt, hiteles adatokat tartalmaz.

Debrecen, 2016. augusztus 29.

Prof. Dr. Pócsi István
egyetemi tanár, az MTA doktora