Válasz Prof. Dr. Kovács M. Gábor, az MTA doktora opponensi véleményére

Mindenekelőtt szeretném megköszönni Prof. Dr. Kovács M. Gábornak, hogy elvállalta értekezésem bírálatát és időt, energiát fordított dolgozatom alapos áttanulmányozására. Észrevételeit, véleményét nagyra értékelem.

Megjegyzéseire és kérdéseire az alábbiakban válaszolok:

„A téma jelentőségét a PubMed publikációs adatbázisban a „stress AND fungi" kulcsszavakkal végzett keresés évenkénti találat számai is illusztrálják. Ezek valójában a stressz-kérdéskör azon részeit is megmutatják, ahol a gomba okozza a stresszt…"

Egyetértek, köszönöm, hogy felhívta rá a figyelmemet!

„A transzkriptom elemzések összehasonlító értékelése során többször használja a Jelölt az „együtt szabályozódó gének" kifejezést. Ez minden esetben valós, igazolt, esetleg a Jelölt véleménye szerint lehetségesen együtt szabályozás, vagy esetleg egyes esetekben csupán együtt/hasonló „irányba" történt expressziós változásokként kellene érteni?"

Az „együtt szabályozott gének" kifejezést több kezelés transzkriptomra gyakorolt hatásának összehasonlításakor használtam azon génekre, melyek mRNS-ének gyakorisága valamennyi vizsgálatban ugyanazon irányban változott meg (nőtt, vagy csökkent). A transzkriptomok változásainak Venn-diagramon történő ábrázolásához, a metszet megnevezésére lett kitalálva. Valóban igaz, hogy ha két gén működésének szabályozása molekulárisan szinten szorosan össze van kapcsolva (pl. egy közös transzkripciós faktor által), akkor „nagy" valószínűséggel (de nem szükségszerűen) mindkét gén az „együtt szabályozott gének" részhalmazába fog kerülni. De önmagában abból a megfigyelésből, hogy két gén az „együtt szabályozott gének" részhalmazának eleme egy kísérletben, nem lehet következtetést levonni arra vonatkozóan, hogy milyen mértékben van molekuláris szinten összekapcsolva a szabályozásuk.

Transzkriptom adatok elemzésénél gyakran van szükség arra, hogy a géneket aszerint, hogy transzkriptumuk (alternatív splicing esetén transzkriptumaik) gyakorisága hogyan változik az egyes kísérletekben, csoportokba rendezzük és a kapott halmazokat elnevezzük. Pl.: „együtt szabályozott gének", „AtfA-függő gének", „stressz-függő gének",

„alulszabályozott/felülszabályozott gének” (a dolgozatban „indukálódott/represszálódott gének”). Ezen elnevezések utalnak a halmazba tartozó gének viselkedésére, de konkrét molekuláris biológiai jelentéssel nem bírnak, csak segítenek a halmaz gyakran körülményesen megfogalmazott definícióját felidézni. Az „alulszabályozott/felülszabályozott gének” kifejezés például csak annyit jelent, hogy olyan gének, melyek mRNS-ének (transzkriptumának) gyakorisága nőtt/csökkent a csoport definíciója által meghatározott módon. Ennek hátterében nem szükségszerűen az áll, hogy megváltozott a kérdéses gének transzkripciója; lehet, hogy az mRNS-ek életideje csökkent, vagy (például extrakromoszómális gének esetében) a gén kópiaszáma változott meg. Érdemes lett volna a dolgozatban használt definíciókat összegyűjteni egy bekezdésben és ott az elnevezések esetleges félrevezető voltára is fel lehetett volna hívni az olvasó figyelmét.

„A három fő „klaszteren belüli megoldás” közül a legfrissebben felfedezett, a predikciós lehetőségeket is adó BGC-n belüli target-gén (és nem a klaszter közvetlen közelében lévő, ahogy a dolgozat említi a 91. oldalon), melyet a prfks1 esetén igazoltak Yue és mtsai (2018).”

Egyetértek az észrevétellel.

„Az A. fumigatus összehasonlító genomikai vizsgálatainak bemutatása során sok helyen duplikálódott fehérjékről ír – feltételezem, génduplikációkról, expanziókról van valójában szó.”

Ebben az esetben is egy halmaznak kellett könnyen használható és találó nevet adni. Egyetértek Opponensemmel, hogy ez a megnevezés („duplikálódott” fehérjék), még ha mindvégig idézőjelbe is volt téve, nem szerencsés.

Kíváncsi lennék, hogy próbáltak-e olyan sokváltozós elemzést alkalmazni a stressztolerancia adatokra, mely a számítások során figyelembe veszi a filogenetikai viszonyokat is (pl. phylPCA).”

Az R statisztikai programcsomagban több olyan program is található („phylogenetic comparative methods”; PCM), melyek célja a filogenetikai autokorreláció („filogenetikai szignál”) becslése, illetve hatásának mérséklése. E programok előnyeiről és hátrányairól azonban megoszlanak a vélemények a szakirodalomban [1-4], ezért (legalábbis) ebben a vizsgálatban kerültük alkalmazásukat. Az elmúlt évben több – a dolgozatban bemutatott

projekthez hasonló - nemzetközi projekthez sikerült a Tanszék/Intézet munkatársainak csatlakoznia. E vizsgálatokban a PCM-en alapuló megközelítési módok valószínűleg már megkerülhetetlenek lesznek.

A kérdésben említett filogenetikai főkomponens analízis ([5], pPCA) az adatok feldolgozásánál megpróbálja eliminálni a filogenetikai autokorreláció hatásait [1-2, 5]. Ezzel összhangban, ha a pPCA-t használjuk a hagyományos PCA helyett, megváltoznak a főkomponensek és az egyes fajok koordinátái. Ugyanakkor nem változnak meg a fajok közötti távolságok (a teljes PCA/pPCA térben mérve) és így e távolságadatok alapján szerkesztett kladogramok sem [2]. Számunkra a kérdés az volt, hogy van-e kapcsolat a vizsgált fajok rokonsági foka és stressztoleranciája között, ezért a filogenetikai viszonyok hatását nem akartuk mérsékelni az adatok bemutatásánál/feldolgozásánál.

1. Polly P, Lawing AM, Fabre AC, Goswami A (2013) Phylogenetic principal components analysis and geometric morphometrics. Hystrix. 24.
2. Uyeda JC, Caetano DS, Pennell MW (2015) Comparative analysis of principal components can be misleading. Systematic Biology 64:677–689.
3. Molina-Venegas R, Rodríguez MÁ. (2017) Revisiting phylogenetic signal; strong or negligible impacts of polytomies and branch length information? BMC Evol Biol. 17:53.
4. Rohlf FJ. (2006) A comment on phylogenetic correction. Evolution. 60:1509-1515.
5. Revell LJ (2009) Size-correction and principal components for interspecific comparative studies. Evolution 63: 3258–3268.

„… mit ért a Jelölt az alatt (105. oldal), hogy „A fenotipikus heterogenitás fontos eleme lehet a stresszhez való genetikai adaptációnak.”

A témával több közlemény is foglalkozik [1-4]. Az egyik – a dolgozatban is idézett – közlemény [1] lényege a következő:

Vegyünk egy multidrog rezisztencia kialakulásáért felelős transzporter gént (pl. *pdr5*). Legyen e gén indukálásáért egy olyan szabályozó fehérje (pl. rtTA-MF) felelős, amely egy inducer (pl. doxiciklin) jelenlétében aktív. A szabályozó fehérje génje az egyik kísérletben legyen konstitutív, a másik kísérletben indukálható magával a szabályozó fehérjével (pozitív visszacsatolás). Ez utóbbi esetben - megfelelő inducer koncentráció esetén – fenotípusos heterogenitás figyelhető meg, ugyanis a transzporter gén aktivitása igen érzékenyen reagál az inducer koncentrációjának egy-egy sejt szintjén bekövetkező fluktuációira. A szerzők e kétféle, mesterségesen létrehozott törzs viselkedését tanulmányozták flukonazol jelenlétében

(a PDR5 képes a flukonazolt eltávolítani a sejtekből, de az rtTA-MF szabályozó fehérje működését nem befolyásolja) és hiányában. Fontosabb megállapításaik: A fenotípusos heterogenitást mutató törzs fitnesze flukonazol hiányában kisebb, mint a kontroll törzsé, ugyanakkor a flukonazol rezisztenciája valamivel nagyobb. *In vitro* evolúciós vizsgálatokban a fenotípusos heterogenitást mutató törzs kisebb eséllyel „halt ki" és a túlélő populációk átlagosan nagyobb flukonazol toleranciát tudtak elérni, mint a kontroll törzs. A szerzők konklúziója szerint a fenotipikus heterogenitás segíti a tartósan kedvezőtlen környezethez való sikeres genetikai adaptációt (azáltal, hogy költséghatékony módon átmenetileg megvédi a törzset, időt hagyva az előnyös mutációk/mutáció kombinációk kialakulására).

1. Bódi Z, Farkas Z, Nevozhay D, Kalapis D, Lázár V, Csörgő B, Nyerges Á, Szamecz B, Fekete G, Papp B, Araújo H, Oliveira JL, Moura G, Santos MAS, Székely T Jr, Balázsi G, Pál C. (2017) Phenotypic heterogeneity promotes adaptive evolution. PLoS Biol. 15:e2000644.
2. Becskei A, Séraphin B, Serrano L. (2001). Positive feedback in eukaryotic gene networks: cell differentiation by graded to binary response conversion. EMBO J. 20:2528-2535.
3. Mustonen V, Lässig M. (2010) Fitness flux and ubiquity of adaptive evolution. Proc Natl Acad Sci USA. 107:4248–4253.
4. Sánchez-Romero MA, Casadesús J. (2014) Contribution of phenotypic heterogeneity to adaptive antibiotic resistance. Proc Natl Acad Sci USA. 111:355-360.

„A kettős stressz alkalmazásáról akár az intracelluláris vas és hidrogén peroxid által meghatározott „ferroptosis" nevű nem-apoptotikus sejthalál típus (Dixon és mtsai. 2012. Cell) is eszébe juthat az olvasónak."

Az átmeneti fémek jelenléte és a reaktív oxigénformák (ROS) közötti kapcsolat régóta ismert (ld. Fenton-Haber-Weiss-reakció). Azt azonban, hogy a vas-ROS rendszer által mediált oxidatív károsodások speciális, főleg a mitokondriumok degeneratív elváltozásaival járó programozott sejtpusztuláshoz, ferroptózishoz vezetnek, csak pár éve ismert [1-2]. A metazoákban leírt ferroptózishoz hasonló jelenséget növényekben is megfigyeltek [3-4] és gombák esetében is valószínűsíthető a jelenléte [5-6]. A gombák programozott sejtpusztulási folyamatai potenciális terápiás célpontot jelentenek [7-8] és e szempontból a gomba-ferroptózis kutatások – amennyiben valóban létezik e folyamat gombákban – is ígéretesek lehetnek a jövőben.

A kérdést kicsit másfelől közelítve érdemes megemlíteni, hogy egyes vizsgálatok alapján a patogén mikroorganizmusok számára az emberi szervezetben nemcsak a vashiány

okoz stresszt, de a vas túladagolás („overload”) legalább ennyire veszélyes. Több humánpatogén baktériumban (pl. *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium tuberculosis*) is megfigyelték, hogy egyes Fe^{2+}-efflux pumpák virulencia faktorként szolgálnak. Feltételezik, hogy a vashiányos környezethez szokott sejtek számára, ha hirtelen könnyen elérhetővé válik a vas (pl. amikor a makrofágok és neutrofil granulociták fagolizoszómáiból kiszabadulva a citoszolba kerülnek) káros lehet, mert a sejtekbe hirtelen nagy mennyiségben bekerülve fokozott ROS termeléshez vezethet. Más elképzelések szerint a Fe^{2+}-efflux pumpáknak az immunrendszer oxidatív támadása miatt a baktérium sejtekben „elszabaduló” vas gyors eltávolítása a feladatuk. A tanszéken folyamatban vannak olyan kutatások, melyek az *Aspergillus fumigatus* vas efflux rendszereit próbálják azonosítani. Érdekes tény, hogy a szóba jöhető gének mindegyikéről leírták már, hogy deléciójuk csökkenti a törzs *in vivo* virulenciáját.

1. Dixon SJ. Ferroptosis: bug or feature? Immunol Rev. 277:150–157.

2. Mou Y, Wang J, Wu J, He D, Zhang C, Duan C, Li B. (2019) Ferroptosis, a new form of cell death: opportunities and challenges in cancer. J Hematol Oncol. 12:34.

3. Mushegian AA. (2017) Ferroptosis-like cell death in plants. Sci Signal. 10:pii: eaan0450.

4. Caseys C. (2019) Ferroptosis: A companion of ROS in fighting *Magnaporthe* in rice. Plant Cell. 31:13-14.

5. Skouta R, Dixon SJ, Wang J, Dunn DE, Orman M, Shimada K, Rosenberg PA, Lo DC, Weinberg JM, Linkermann A, Stockwell BR (2014) Ferrostatins inhibit oxidative lipid damage and cell death in diverse disease models. J Am Chem Soc 136:4551–4556.

6. Hardwick JM. (2018) Do fungi undergo apoptosis-like programmed cell death? MBio. 9:pii: e00948-18.

7. Kulkarni M, Stolp ZD, Hardwick JM. (2019) Targeting intrinsic cell death pathways to control fungal pathogens. Biochem Pharmacol. 162:71-78.

8. Leiter É, Csernoch L, Pócsi I. (2018) Programmed cell death in human pathogenic fungi - a possible therapeutic target. Expert Opin Ther Targets. 22:1039-1048.

9. Pi H, Helmann JD (2017) Ferrous iron efflux systems in bacteria. Metallomics 9:840-51.

10. McLaughlin HP, Xiao Q, Rea RB, Pi H, Casey PG, Darby T, Charbit A, Sleator RD, Joyce SA, Cowart RE, Hill C, Klebba PE, Gahan CG. (2012) A putative P-type ATPase required for virulence and resistance to haem toxicity in Listeria monocytogenes. PLoS One. 7:e30928.

11. Patel SJ, Lewis BE, Long JE, Nambi S, Sassetti CM, Stemmler TL, Argüello JM. (2016) Fine-tuning of substrate affinity leads to alternative roles of *Mycobacterium tuberculosis* Fe^{2+}-ATPases. J Biol Chem. 291:11529-11539.

„Mi a véleménye a Jelöltnek, illetve foglalkoznak-e kutatások a különböző, legfőképp a dolgozatban is bemutatott stressz-hatások, stressz-válaszok epigenetikai szabályozásáról?”

Az epigenetikai kutatások iránti érdeklődés a mikológusok körében is növekvő tendenciát mutat [1-4]. Bár a legtöbb tanulmány az epigenetikai szabályozási módok mechanizmusát, molekuláris biológiáját igyekszik feltárni [1-4], egyre több vizsgálat foglalkozik egy-egy fontos tulajdonság (pl. szekunder metabolit termelés, differenciáció, patogenitás, antifungális szerekkel szembeni érzékenység) epigenetikai szabályozásával [5-7].

Az epigenetikai szabályozás és a stressz között kölcsönös kapcsolat áll fenn. A stressz hatással van epigenetikus szabályozó mechanizmusokra és ezeken keresztül befolyásolja a stresszválaszt. Ugyanakkor stressz hatására több generációra megváltozhat a sejtek epigenetikai állapota, ami együtt járhat a stressz tolerancia átmeneti megváltozásával is [8-10]. Néhány, gombákkal kapcsolatos példa:

- A *Saccharomyces cerevisiae sir2* hiszton deacetiláz génje hőstressz hatására alulszabályozódik, ami a szubtelomerikus régiók több generáción át megmaradó eukromatinizálódásához vezet [11].
- Az *Aspergillus nidulans* HdaA hiszton deacetiláza oxidatív stressz alatt szükséges a *catB* kataláz gén és más oxidatív stresszválaszban fontos gén hatékony felülszabályozásához [12].
- A *S. cerevisiae* antiszensz CDC28 lncRNS képződést az ozmotikus stressz aktiválja, ami a *cdc28* gén hatékony átírását teszi lehetővé [13].
- A *Schizosaccharomyces pombe* egyik lncRNS-e, az SPNCRNA.1164, részt vesz az Atf1 transzkripciós faktort (azaz egy többféle stresszválasz szabályozásában is fontos transzkripciós faktort) kódoló gén transzkripciójának szabályozásában [14].
- Az mlonRNS (szintén egy *S. pombe* lncRNS) ugyanakkor az *fbp1* (fruktóz-1,6-biszfoszfatáz) gén hatékonyabb átírását teszi lehetővé szénéhezés alatt [15].
- Rapamycin jelenlétében a *Mucor circinelloides* siRNS-ek segítségével elcsendesíti (epimutáció) a rapamycin célpontját (egy peptidilprolin izomerázt) kódoló *fkbA* gént, ami csökkenti a rapamycinnel szembeni érzékenységét. Az siRNS-ek képződése néhány átoltás erejéig rapamycin hiányában is megmarad fenntartva a megnövekedett rezisztenciát [16].

Vizsgálatainkban epigenetikai szabályozással nem foglalkoztunk. Az általunk is detektált transzkriptom szintű változások hátterében – a fentiek alapján – valószínűsíthetően epigenetikus mechanizmusok is részt vesznek. Az epigenetikai vizsgálatok azon kísérletek esetében lehetnek különösen érdekesek, ahol eltérő körülmények között vizsgáljuk ugyanazon stresszor hatását (pl. kombinatorikus stressz vizsgálatok), vagy ugyanolyan körülmények között, de különböző előéletű tenyészetek stresszválaszait detektáljuk (pl. stressz adaptációs vizsgálatok). Mindkét esetben érdekes kérdés lehet, hogy az eltérő tenyésztési körülmények,

illetve a stresszel történő előkezelés hatására bekövetkezett epigenetikai változások milyen mértékben magyarázzák a stresszválaszokban megfigyelt eltéréseket.

1. Jeon J, Lee YH (2014) The rise of epigenetics in microbial eukaryotes. Fungal Genom Biol, 4:1

2. O'Kane CJ, Hyland EM. (2019) Yeast epigenetics: the inheritance of histone modification states. Biosci Rep. 39. pii: BSR20182006.

3. Holoch D, Moazed D. (2015) RNA-mediated epigenetic regulation of gene expression. Nat Rev Genet. 16:71-84.

4. Smith K, Phatale PA, Bredeweg E, Connolly L, Pomraning K, Freitag M (2012) Epigenetics of filamentous fungi. Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine. 1063-1107.

5. Pfannenstiel BT, Keller NP. (2019) On top of biosynthetic gene clusters: How epigenetic machinery influences secondary metabolism in fungi. Biotechnol Adv. 37:107345.

6. Dubey A, Jeon J. (2017) Epigenetic regulation of development and pathogenesis in fungal plant pathogens. Mol Plant Pathol. 18:887-898.

7. Chang Z, Yadav V, Lee SC, Heitman J. (2019) Epigenetic mechanisms of drug resistance in fungi. Fungal Genet Biol. 132:103253.

8. Denhardt DT (2017). Effect of stress on human biology: Epigenetics, adaptation, inheritance, and social significance. J. Cell. Physiol. 233:1975–1984.

9. Frías-Lasserre D, Villagra CA. (2017) The importance of ncRNAs as epigenetic mechanisms in phenotypic variation and organic evolution. Front Microbiol. 8:2483.

10. Gutzat R, Mittelsten Scheid O. (2012) Epigenetic responses to stress: triple defense? Curr Opin Plant Biol. 15:568-573.

11. Laskar S, K S, Bhattacharyya MK, Nair AS, Dhar P, Bhattacharyya S. (2015) Heat stress-induced Cup9-dependent transcriptional regulation of SIR2. Mol Cell Biol. 35:437-450.

12. Tribus M, Galehr J, Trojer P, Brosch G, Loidl P, Marx F, Haas H, Graessle S (2005) HdaA, a major class 2 histone deacetylase of *Aspergillus nidulans*, affects growth under conditions of oxidative stress. Eukaryot. Cell, 4:1736–1745.

13. Nadal-Ribelles M, Solé C, Xu Z, Steinmetz LM, de Nadal E, Posas F. (2014) Control of Cdc28 CDK1 by a stress-induced lncRNA. Mol Cell. 53:549-561.

14. Leong HS, Dawson K, Wirth C, Li Y, Connolly Y, Smith DL, Wilkinson CR, Miller CJ. (2014) A global non-coding RNA system modulates fission yeast protein levels in response to stress. Nat Commun. 5:3947.

15. Hirota K, Miyoshi T, Kugou K, Hoffman CS, Shibata T, Ohta K. (2008) Stepwise chromatin remodelling by a cascade of transcription initiation of non-coding RNAs. Nature. 456:130-134.

16. Calo S, Shertz-Wall C, Lee SC, Bastidas RJ, Nicolás FE, Granek JA, Mieczkowski P, Torres-Martínez S, Ruiz-Vázquez RM, Cardenas ME, Heitman J. (2014) Antifungal drug resistance evoked via RNAi-dependent epimutations. Nature. 513:555-558.

„Lehet-e szerepe, és ha igen, milyen, a különböző stresszhatások során a gombák mikrobiomjának?”

Az utóbbi években megélénkült az érdeklődés a téma iránt, amit nem csak elméleti, de komoly potenciális gyakorlati jelentősége is magyaráz: Egyre több adat mutatja, hogy a gomba – baktérium interakció hatással van a gomba – növény interakcióra és ezen keresztül a terméshozamokra is [1-3].

Kísérletek igazolják, hogy a hifoszféra („hyphosphere”) fungifil („fungiphile”) baktériumainak antibiotikumos kezeléssel történő eltávolítása, vagy e közösség összetételének módosítása hátrányosan befolyásolhatja a gomba vegetatív növekedését, ivaros folyamatait és szekunder metabolit termelését is, valamint csökkenti az ellenálló képességét a mikofág („mycophagous”) fajokkal szemben [4, 5]. Arra vonatkozóan nem találtam adatot, hogy egy általunk is vizsgált, vagy más, jól definiált abiotikus stresszel szembeni toleranciát befolyásol-e a mikrobiom jelenléte/összetétele, de a fentiek alapján valószínűsíthető.

A gombákban élő endoszimbionta baktérium fajok hatása a gombára és a gombával kapcsolatban álló növényre valamivel részletesebben kutatott terület [1-3]. A *Gigaspora margarita* arbuszkuláris mikorrhiza képző gomba endoszimbiontája (*Candidatus Glomeribacter gigasporarum*) esetében [6] például kimutatták, hogy a baktérium látványosan befolyásolta a csírázó spórák és a preszimbiotikus hifák transzkriptomát és kisebb mértékben ugyan, de hatással volt a szimbiotikus hifák transzkriptomára is. Az endoszimbionta jelenléte hozzájárult a sejtek Ca^{2+} homeosztázisának megőrzéséhez (a szerzők hipotézise szerint a baktériumok Ca^{2+} raktárként funkcionálhatnak), fokozta a mitokondriumok aktivitását és növelte a gomba sejtek ATP tartalmát. Aktiválta továbbá a vas és foszfát transzportot, míg gátolta az ammónia felvételét. A gomba intenzívebb foszfát felvétele a gazdanövény kedvezőbb foszfát ellátottságával is együtt járt. Számos antioxidatív enzim génjét, köztük szuperoxid dizmutázokat, illetve a tioredoxin-glutation-glutaredoxin rendszer elemeit kódoló géneket is aktivált. Mindezek a szerzők véleménye alapján hozzájárulhatnak a külső hatásoknak jobban kitett preszimbiotikus hifa fitneszének és stressz toleranciájának (pl. hideg stressz és oxidatív stressz tolerancia) növekedéséhez. Ez lehetővé teszi intenzívebb növekedését (nagyobb távolság esetén is el tudja még érni a gazdanövény gyökerét) és hatékonyabb spórázását. Ez utóbbi a baktérium számára is előnyös, mert a spórákba bekerülve tud átjutni a legegyszerűbben az egyik generációból a másikba.

Az opportunista növény és humánpatogén *Rhizopus microsporus* és egyes törzseinek sejtjeiben élő *Burkholderia* fajok (pl. *B. rhizoxinica*, *B. endofungorum*) estében a baktérium hatása a növényen megtelepedő gombán is érvényesül: A baktérium egy poliketid típusú

szekunder metabolitot termel, amit a gomba egy monooxigenáz segítségével módosít, ezáltal megnövelve a molekula (rhizoxin) fitotoxikus hatását [7], ami hozzájárul a gomba patogenitásához. Ezek a baktériumok is hatékonyabbá teszik a sporulációt és intenzívebbé teszik a zigospóra képzést is [3], azaz valószínűleg komplex módon befolyásolják a gomba anyagcseréjét, ami hathat a gomba stressz toleranciájára is. Erre vonatkozóan kísérleti adatokat nem találtam az irodalomban.

Nem szükségszerű, hogy az endoszimbionta baktérium és a gomba között állandóan mutualista legyen az interakció. A *Mortierella elongata* és a *Mycoavidus cysteinexigens* baktérium kapcsolatára jellemző, hogy a baktérium eltávolítása a sejtekből kifejezetten növeli a gomba növekedési rátáját, ami antagonizmust sejtet a két faj között [8]. Ugyanakkor a szekunder metabolit termelés tekintetében hasonló, kölcsönös előnyökkel járó együttműködést feltételeznek, mint a *Rhizopus microsporus* és a *Burkholderia* fajok esetében [8].

1. Bonfante P, Desirò A. (2017) Who lives in a fungus? The diversity, origins and functions of fungal endobacteria living in Mucoromycota. ISME J. 11:1727-1735.

2. Deveau A, Bonito G, Uehling J, Paoletti M, Becker M, Bindschedler S, Hacquard S, Hervé V, Labbé J, Lastovetsky OA, Mieszkin S, Millet LJ, Vajna B, Junier P, Bonfante P, Krom BP, Olsson S, van Elsas JD, Wick LY. (2018) Bacterial-fungal interactions: ecology, mechanisms and challenges. FEMS Microbiol Rev. 42:335-352.

3. Pawlowska TE, Gaspar ML, Lastovetsky OA, Mondo SJ, Real-Ramirez I, Shakya E, Bonfante P. (2018) Biology of fungi and their bacterial endosymbionts. Annu Rev Phytopathol. 56:289-309.

4. Schulz-Bohm K, Tyc O, de Boer W, Peereboom N, Debets F, Zaagman N, Janssens TKS, Garbeva P. (2017) Fungus-associated bacteriome in charge of their host behavior. Fungal Genet Biol. 102:38-48.

5. Vahdatzadeh M, Deveau A, Splivallo R. (2015) The role of the microbiome of truffles in aroma formation: a meta-analysis approach. Appl Environ Microbiol. 81:6946-6952.

6. Salvioli A, Ghignone S, Novero M, Navazio L, Venice F, Bagnaresi P, Bonfante P. (2016) Symbiosis with an endobacterium increases the fitness of a mycorrhizal fungus, raising its bioenergetic potential. ISME J. 10:130-144.

7. Scherlach K, Busch B, Lackner G, Paszkowski U, Hertweck C. (2012) Symbiotic cooperation in the biosynthesis of a phytotoxin. Angew Chem Int Ed Engl. 51:9615-9618.

8. Uehling J, Gryganskyi A, Hameed K, Tschaplinski T, Misztal PK, Wu S, Desirò A, Vande Pol N, Du Z, Zienkiewicz A, Zienkiewicz K, Morin E, Tisserant E, Splivallo R, Hainaut M, Henrissat B, Ohm R, Kuo A, Yan J, Lipzen A, Nolan M, LaButti K, Barry K, Goldstein AH, Labbé J, Schadt C, Tuskan G, Grigoriev I, Martin F, Vilgalys R, Bonito G. (2017) Comparative genomics of *Mortierella elongata* and its bacterial endosymbiont *Mycoavidus cysteinexigens*. Environ Microbiol. 19:2964-2983.

„A többféle stresszhatás együttes vizsgálatának eredményeit bemutató részben említi a Jelölt azokat a nagyon fontos törekvéseket, hogy in situ tanulmányozzuk a gombák különböző stresszválaszait. Miként tudna ilyen vizsgálatokat elképzelni, bármilyen környezetben (pl. állati vagy növényi gazdaszervezet, talaj)?"

Ha egy komplex rendszerben, egy konkrét faj transzkriptomában, valamilyen kezelés hatására bekövetkező változást szeretnénk detektálni, többek között az alábbi problémák merülhetnek fel:

- nehéz a mintából jó minőségű RNS-t izolálni,
- az izolálható RNS mennyisége kicsi,
- az RNS minta nemcsak a vizsgálandó faj, de más fajok RNS-ét is tartalmazza és
  elenyésző arányban van jelen a vizsgálandó faj RNS-e,
  nem lehet eldönteni, hogy egy megszekvenált fragmens („read") biztosan a vizsgálandó fajhoz, vagy egy másik fajhoz tartozik,
- a vizsgálandó faj a mintában heterogén módon, többféle korú, fiziológiai állapotú sejt formájában van jelen, a kezelés nem csak ezen eltérő transzkriptomú sejtek működésére hat (ráadásul eltérő módon), de arányukat is befolyásolja.

Kifejezetten terepi vizsgálatok elvégzésénél e problémák hangsúlyosan jelentkezhetnek. Az ilyen típusú kísérletek megtervezése és megvalósítása ma még nem tekinthető rutinfeladatnak. A metatranszkriptomikai vizsgálatok (pl. új RNS izolálás technikák), az egy sejt transzkriptom vizsgálatok (kevés RNS-ből kiinduló transzkriptom meghatározási módszerek), az allélspecifikus expresszió tanulmányozását célzó vizsgálatok (hasonló szekvenciájú RNS-ek mennyiségi meghatározása), a szekvencia specifikus RNS izolálási technikák, a hatékonyabb RNS szekvenálási technikák (pl. hosszabb „read"-ek) iránti növekvő érdeklődésnek köszönhetően azonban várható, hogy a metodikai problémák egy részére lesz kielégítő megoldás a közeljövőben.

A laboratóriumi körülmények között kivitelezett komplex vizsgálatok (pl. állatkísérletek [1], kontrollált körülmények között nevelt modell növényekkel [2-4], vagy mesterséges talaj [5] felhasználásával végzett kísérletek) esetében azonban már most is meg van a lehetőség arra, hogy a metodikai problémák nagy részét a kísérletek megfelelő megtervezésével elkerüljük.

A gomba – növény interakciók transzkriptomikai módszerekkel történő vizsgálatának viszonylag nagyobb az irodalma [2]. Igaz, e vizsgálatok sok esetben növény centrikusak, azaz csak a növényi transzkriptom változásait detektálják. Ha a kísérlet célja lehetővé teszi, esetenként egy egyszerű trükk is elegendő a nehezen kezelhető metodikai problémák

elkerüléséhez. Larsen és munkatársai például [3] az amerikai rezgő nyár (*Populus tremuloides*) és a kétszínű pénzecskegomba *(Laccaria bicolor*) interakciójának vizsgálatakor a két fajt közös tápagaron, egy féligáteresztő membránnal elválasztva tenyésztette. E kísérletben a gomba által termelt kisméretű molekulák hatását tanulmányozták a növényi transzkriptomra, de ugyanilyen kísérleti elrendezésben a gomba transzkriptom változásai is egyszerűen detektálhatóak lehetnek. Kawahara és munkatársai [4] ugyanakkor *Magnaporthe oryzae*val fertőzött rizs növényekben vizsgálta szimultán módon a gomba és a gazdaszervezet transzkriptomának változását. A fertőzött mintából a gomba és a növény RNS-ét egyaránt tartalmazó preparátumot készítettek és a szekvenálást követően a két genom ismeretében válogatták szét a csak az egyik, vagy csak a másik faj genomjára illeszthető szekvenciákat. Mindez annak ellenére is sikeres volt, hogy az izolált RNS kevesebb, mint 0,5 %-a volt gomba eredetű.

A dolgozatban is említett állatkísérlet [1] kivitelezését is egy egyszerű megoldás tette lehetővé: az intranazálisan megfertőzött egerekből a fertőzést követően rövid időn belül, 12-14 óra múlva vettek mintát. Ekkor a konidiumok több, mint 80 % már kicsírázott és elkezdett hifát növeszteni, azaz kicsi volt a minta fiziológiás heterogenitása. Másfelől, e telepkezdeményeket egy egyszerű bronhoalveoláris mosás segítségével könnyen el lehetett még távolítani a tüdőből. Feltehetőleg nincs elvi akadálya, hogy a gombával fertőzött növényi mintáknak a növényre és a gombára is kiterjedő transzkriptomikai vizsgálatához hasonló vizsgálatokat állatkísérletekben is el lehessen végezni, de ilyen közleményeket nem találtam. A szekvencia specifikus RNS izolálási technikák [6] fejlődése valószínűleg komoly áttörést hozhat e területen a jövőben.

1. McDonagh A, Fedorova ND, Crabtree J, Yu Y, Kim S, Chen D, Loss O, Cairns T, Goldman G, Armstrong-James D, Haynes K, Haas H, Schrettl M, May G, Nierman WC, Bignell E. (2008) Sub-telomere directed gene expression during initiation of invasive aspergillosis. PLoS Pathog. 4:e1000154.

2. Chai-Ling H, Yee WY (2017). RNA-seq analysis in plant–fungus interactions. In: Crop Improvement: Sustainability Through Leading-Edge Technology, (Edd.: Abdullah SNAP et al) Springer International Publishing, pp.1-25.

3. Larsen PE, Sreedasyam A, Trivedi G, Desai S, Dai Y, Cseke LJ, Collart FR. (2016) Multi-omics approach identifies molecular mechanisms of plant-fungus mycorrhizal interaction. Front Plant Sci. 6:1061.

4. Kawahara Y, Oono Y, Kanamori H, Matsumoto T, Itoh T, Minami E (2012) Simultaneous RNA-seq analysis of a mixed transcriptome of rice and blast fungus interaction. PLoS One 7:e49423

5. Guenet B, Leloup J, Hartmann C, Barot S, Abbadie L (2011) A new protocol for an artificial soil to analyse soil microbiological processes. Applied Soil Ecology 48:243-246.

6. van Doorn R, Slawiak M, Szemes M, Dullemans AM, Bonants P, Kowalchuk GA, Schoen CD. (2009) Robust detection and identification of multiple oomycetes and fungi in environmental samples by using a novel cleavable padlock probe-based ligation detection assay. Appl Environ Microbiol. 75:4185-4193.

„Az eredmények és értékelése rész után hiányoltam egy összefoglaló jellegű, konklúziószerű részt, ami összességében elhelyezi egy nagyobb „képben" az elért eredményeket és akár kitekintést ad az esetleges folytatásról, „merre továbbról"."

A stressz mikrobiológiai kutatások célja leggyakrabban annak megértése, hogy hogyan képesek alkalmazkodni a mikroorganizmusok a változó környezetükhöz és ezen alkalmazkodóképességet, vagy annak korlátait hogyan lehetne felhasználni a gyakorlatban. Számomra a legfontosabb kérdés annak megértése, hogy miért képesek a gombák teljesen új, váratlan helyzetekhez is alkalmazkodni. Gyakran nem jelent számukra megoldhatatlan problémát, hogy a természetes élőhelyüktől nagyon eltérő körülményekhez alkalmazkodjanak, vagy az sem, ha a stresszválaszuk kialakulását megzavarjuk egy tetszőleges másik stresszor jelenlétével, esetleg egy jelátvitelben fontos fehérje génjének inaktiválásával. E flexibilitás valószínűleg a jelátviteli hálózat működésének tulajdonságaiból fakad. A távlati cél e jelátviteli hálózatok működési elvének megértése.