Válasz Prof. Dr. Papp Tamás, az MTA doktora opponensi véleményére

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

Megjegyzéseire és kérdéseire az alábbiakban válaszolok:

Az opponensi véleményben említett formai észrevételekkel (*„Néha a szerzőnek gondja akadt a megfelelő magyaros kifejezések megtalálásával…”; „… a 18. ábra tenyészetekről készült fotói és a 29. ábra törzsfája esetében éreztem esztétikai hiányosságokat.”*) egyetértek; az előadás anyagát ezek figyelembevételével fogom összeállítani.

Egyetértek Opponensem azon észrevételével is, miszerint a dolgozatban szereplő génneveket (betűszavakat) célszerű lett volna egy külön mellékletben összegyűjteni és a hozzájuk tartozó géneket e mellékletben is definiálni.

„Kicsit hiányoltam egy összefoglaló fő célkitűzés, mint az egész kutatás céljának, vagy akár egy távlati célnak a megfogalmazását.”

A stressz mikrobiológiai kutatások célja leggyakrabban annak megértése, hogy hogyan képesek alkalmazkodni a mikroorganizmusok 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.

„…mivel az indukció/represszió kifejezések hagyományosan arra vonatkoznak, hogy egy gén átíródik-e vagy sem az adott körülmények közt, véleményem szerint helyesebb lett volna a felül/alul szabályozott, vagy a túl-, alul működött, vagy hasonló kifejezések használata…"

Alapvetően egyetértek. A „felül/alul" szabályozott, vagy a „túl/alul" működött kifejezéseket megtaláltam magyar nyelvű művekben a dolgozat írásakor, de túlságosan idegennek tűntek számomra ahhoz, hogy használjam őket.

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 változott, vagy (például extrakromoszómális gének esetében) a gén kópiaszámában történt változás. 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.

Összességében az eredeti angol megnevezések tükörfordításai (felül, illetve alulszabályozott gének) jó megoldásnak tűnnek számomra és igyekszem ezt a megfogalmazást használni a jövőben.

A 49-50. oldalon a következőket olvashatjuk: „A 10C ábrán az is látszik, hogy bár az együtt szabályozott gének száma hasonló volt a kontroll és a mutáns törzsben, a két géncsoport között nagy átfedés nem volt. Azaz, a deléció hatására bizonyos gének kikerültek az együtt szabályozott gének csoportjából (összesen 88 gén), míg más gének bekerültek ebbe a csoportba (összesen 152 gén). Ez elsőre meglepő, hiszen, ha az AtfA részt vett az együtt szabályozott gének működtetésében, akkor jelentősen csökkenni kellett volna az együtt szabályozott gének számának a mutánsban. Ha nem vett részt, akkor a két géncsoport között nagy átfedést kellett volna tapasztalnunk." Ez a rész nehezen érthető, különösen mivel a

szerző megváltoztatta az általa korábban bevezetett terminológiát. Az „együtt szabályozott gének" kifejezés korábban azt jelentette, hogy mindhárom stresszorra (MSB/diamid/tBOOH) megváltozott a kifejeződésük. Az ilyen gének száma a két törzs esetében a fent említettekkel ellentétben világosan eltért (a kontroll esetében 79/73, a mutáns esetében 53/163 volt a felül/alul szabályozott „együtt szabályozott gének" száma). Az együtt szabályozott gének csoportjából nem kerültek ki és ide nem kerültek be gének, mivel a 10C ábrán csak együtt szabályozott gének vannak feltüntetve. Ha jól értem az ábrát, akkor az azon látható két halmaz mindegyike „együtt szabályozott gének" számát mutatja, a metszetük pedig azokat, amelyek a kontrollban is és a mutánsban is együtt szabályozottnak bizonyultak. Ebből viszont az következik, hogy az atfA gén delétiója hatással volt számos „együtt szabályozott gén" kifejeződésére. A 10C ábrán a két halmaz metszete olyan géneket mutat, amelyekre az atfA gén delétiója nem volt hatással, hisz ezek működése nem változott. A csak a mutánsban túl-, illetve alulműködő gének kifejeződésére, azaz 18+134 génre viszont mindenképpen hatással volt az atfA hiánya. Ezek szabályozásában közvetlenül, vagy közvetve tehát részt vesz az AtfA. Mivel kezelhető számú génről van szó, érdemes lett volna megnézni, hogy melyek ezek. Van-e információ arra vonatkozóan, hogy konkrétan milyen gén, illetve milyen funkcióval rendelkező gének szabályozásában vesz részt az AtfA? Ebből a szempontból érdekes lehet az is, hogy a csak a kontrollban együtt szabályozottnak bizonyult 88 gén hogyan fejeződik ki a mutánsban, inaktiválódtak, vagy csak bizonyos stresszorok hatására aktiválódnak?

A 10C ábrán azon gének száma van feltüntetve, melyek aktivitása a vizsgált törzs esetében mindhárom kezelés hatására ugyanolyan irányban mutatott változást (aktivitásuk mindhárom kezelésben nőtt, vagy mindhárom kezelésben csökkent). E gének három csoportba lettek sorolva attól függően, hogy melyik törzsben volt megfigyelhető ez a viselkedésük: csak a kontroll törzsben, csak a *ΔatfA* mutánsban és mindkét törzsben együttszabályozott gének. E gének szerepelnek a 10A és 10B ábrák hármas metszeteiben. Továbbra is igaz, hogy a 10C ábrához tartozó gének egy adott törzs esetében mindhárom kezelésben hasonló módon változtatták meg az aktivitásukat. Érdemes lett volna jelölni valahogy, hogy a gének együttszabályozott viselkedését törzsenként kell értelmezni. Az „együttszabályozott gének csoportjából kikerült/bekerült gének" kifejezés helyett precízebb lett volna az a meghatározás, hogy „azon gének melyek csak a kontroll/mutáns törzsben mutattak együttszabályozottságot". A „hasonló génszám" és a „nagy átfedés" sajnos eléggé relatív fogalmak. Szerencsésebb lett volna úgy fogalmazni, hogy „nagyságrendi eltérés nem volt a génszámok között", illetve a mindkét törzsben együttszabályozott gének száma csak mintegy ötöde volt a valamely törzsben együttszabályozott gének számának". A hipotézisünk

az volt, hogy az AtfA szükséges egyes együttszabályozott gének felülszabályozásában és/vagy alulszabályozásában. Ha a kontroll törzs minden együttszabályozott génje AtfA-függést mutatna, akkor a mutánsban nem kellene együttszabályozott géneket találnunk (csak a „kontroll”\„*ΔatfA*” különbséghalmaznak lennének elemei). Ha egyetlen együttszabályozott gén sem mutat AtfA-függést a kontroll törzsben, akkor a mutánsban ugyanazoknak a géneknek kellene együttszabályozottságot mutatniuk, mint a kontroll törzsben (csak a metszetben lennének gének). A valóságban viszont azt kaptuk, hogy nem hogy nem csökkent, de inkább nőtt a mutánsban az együttszabályozott gének száma. Ez utóbbi tulajdonság a hipotézisünkből nem következik. Ebből arra következtettünk, hogy a hipotézisünk hibás, aminek hátterében az állhat, hogy az AtfA jelenléte, illetve hiánya közvetett módon is jelentős hatással van az együttszabályozott génekre. Az együttszabályozott gének számát, összetételét két tényező határozza meg: 1) Milyen a gének szabályozása (befolyásolja-e a stresszor a gén aktivitását az adott tenyésztési körülmények között). 2) Milyen a gének aktivitása a referencia tenyészetben (minél nagyobb a gén aktivitása, annál nehezebb a felülszabályozódását kimutatni a kezelést követően, de annál könnyebb az alulszabályozódást detektálni). Az AtfA génjének deléciója több módon is kifejtheti hatását az együttszabályozott gének számára/összetételére: Eltörli az AtfA-függő szabályozást, alternatív szabályozási útvonalakat aktiválhat (vagy más módon befolyásolja a jelátviteli hálózat működését), illetve megváltoztatja a referencia transzkriptomot. A legfrissebb elemzésünk szerint ez utóbbi hatás összemérhető az előző kettőével [1].

A gének funkcióit természetesen ellenőriztük az *Apergillus* Genome Database (www.aspgd.org) honlapján és ahol lehetett géncsoport dúsulási vizsgálatokat is végeztünk. A dolgozatból ezen vizsgálatok eredményei kimaradtak. Az *Aspergillus* fajok genomjának annotáltsága igen gyenge. Az *Apergillus* Genome Database adatai szerint az *Aspergillus nidulans* genomja 10687 nyitott olvasási keretet (ORF) tartalmaz, amelyből az igazolt nyitott olvasási keret („verified ORF”) mindösszesen csak 1213 (11 %). Ugyanez az arány a *Saccharomyces cerevisiae* esetében 78 % (www.yeastgenome.org). Az *Apergillus* Genome Database honlapján 1063 *A. nidulans* génről van genetikai vizsgálatokkal szerzett információ feltüntetve és mintegy 6000 génhez van rendelve „biological process GO term”. A fentiek alapján nem meglepő módon a gének funkcióinak elemzése (bár sok esetben további vizsgálatok, elemzések elvégzésére inspirált bennünket) ritkán vezetett közvetlenül hasznos eredményre.

Azt is érdemes megfontolni, hogy amikor a transzkriptom változásait vizsgáljuk, különbségeket (arányokat) határozunk meg a kezelt és a referencia tenyészetek között. A

különbségek mértéke szükségszerűen függ a referencia és a kezelt tenyészetekben mért értékektől is. Más szavakkal megfogalmazva, ha egy „A” gén kisebb aktivitású a kezelt tenyészetben, mint a referencia tenyészetben akkor fogalmazhatunk úgy, hogy a kezeléshez való alkalmazkodásnak feltétele az „A” gén kis aktivitása, de fogalmazhatunk úgy is, hogy a referencia körülményekhez való alkalmazkodáshoz szükséges az „A” gén nagy aktivitása. Ez azt is jelenti, hogy az együttszabályozott gének funkciója legalább annyira jellemzi a referencia tenyészeteket, mint a kezelésekre adott általános stresszválaszt [1]. A legfrissebb elemzésünk szerint menadion, *tert*-butilhidroperoxid, H_2O_2, diamid, NaCl, $CdCl_2$, Kongó vörös, vagy amfotericin B kezelésnek kitett tenyészetekben az együttszabályozott gének halmazában szignifikáns mértékben megnövekedett az alulszabályozott, transzlációhoz, mitótikus sejt ciklushoz és replikációhoz köthető, illetve a felülszabályozott, antioxidáns enzimeket kódoló gének száma. A szekunder anyagcserében közreműködő gének közül – többek között - az aszperfuranon és terrikinon klaszterek felülszabályozott és az ausztinol klaszter alulszabályozott génjei dúsultak fel [1]. E változásokat értékelhetjük úgy is, mint a vizsgált kezelések mindegyikében fontos változások, melyek a stresszez való alkalmazkodást segítik valamilyen módon, de fogalmazhatunk úgy is, hogy e változások ellentettje a referencia tenyészetként használt, gyors növekedést lehetővé tévő körülményekhez való alkalmazkodáshoz szükségesek [1]. Ezen elemzések a dolgozatba - terjedelmi korlátok miatt - nem kerültek bele.

A *Schizosaccharomyces pombe* Atf1 transzkripciós faktora esetében a cgs2 cAMP specifikus foszfodiészterázt, a ctt1 katalázt, a cdc13 ciklin fehérjét, az ecl1 (kronológiai élettartamot növelő) fehérjét, valamint az ntp1 trehalázt kódoló gének esetében igazolták az Atf1 direkt (génaktivitást növelő) hazását (Pombase; www.pombase.org). Nem találtam az irodalomban olyan publikált adatot, amely egyértelműen kimutatta volna, hogy valamely gén szabályozásában az *Aspergillus nidulans* AtfA-ja közvetlenül rész venne. A transzkriptomikai vizsgálataink azt mutatták, hogy a *ΔatfA* mutánsban igen nagyszámú gén aktivitása megváltozott mind a kezeletlen, mind a kezelt tenyészetekben a kontroll törzséhez képest. Nagy valószínűséggel e hatások túlnyomó többsége indirekt. Éppen ezért azon vizsgálatok adatait, amelyekben egy kontroll és egy mutáns törzsben hasonlítják össze néhány, vagy akár nagyon sok gén transzkripcióját sem szabad egyértelmű bizonyítéknak tekinteni. A *ΔatfA* törzs megnövekedett oxidatív stressz érzékenysége miatt leggyakrabban azt feltételezik, hogy antioxidatív enzimek génjeinek transzkripcióját szabályozhatja ez a transzkripciós faktor [2-4]. A transzkriptom adataink a kétkomponensű szignál transzdukciós rendszer génjeinek lehetséges AtfA-függő szabályozottságára hívják fel a figyelmet: 1) A menadion stressz alatt

felülszabályozott és jelátviteli folyamatban közreműködő fehérjét kódoló hét gén közül négy ebbe a csoportba sorolható (ld. a dolgozat 15. ábrája). 2) A géncsoport dúsulási vizsgálatok alapján a mutáns törzs kezeletlen tenyészeteiben alulszabályozott gének között szignifikánsan nagyobb volt a kétkomponensű szignál transzdukciós rendszer génjeinek aránya, mint a teljes genomban (összesen nyolc gén) [5]. Szintén géncsoport dúsulási vizsgálatok alapján azon gének csoportjában, amelyek a korábban említett nyolc különböző stressz kezelésben egyaránt AtfA-függést mutattak szignifikánsan nagyobb volt e gének aránya, mint a teljes genomban (összesen 15 gén) [1]. A tanszéken jelenleg folynak olyan (Chip-DNAseq) vizsgálatok, amelyek reményeink szerint egyértelmű adatokkal szolgálnak majd arról, hogy mely gének szabályozásában vesz részt közvetlenül az AtfA.

1. Antal K, Gila B Cs, Pócsi I, Emri T (2019) General stress response or adaptation to rapid growth in *Aspergillus nidulans*? Fungal Biol. *in press* (doi.org/10.1016/j.funbio.2019.10.009)

2. Hagiwara D, Asano Y, Yamashino T, Mizuno T. (2008) Characterization of bZip-type transcription factor AtfA with reference to stress responses of conidia of *Aspergillus nidulans*. Biosci Biotechnol Biochem. 72:2756-2760.

3. Balázs A, Pócsi I, Hamari Zs, Leiter É, Emri T, Miskei M, Oláh J, Tóth V, Hegedus N, Prade RA, Molnár M, Pócsi I. (2010) AtfA bZIP-type transcription factor regulates oxidative and osmotic stress responses in *Aspergillus nidulans*. Mol Genet Genomics. 283:289-303.

4. Jaimes-Arroyo R, Lara-Rojas F, Bayram Ö, Valerius O, Braus GH, Aguirre J. (2015) The SrkA kinase is part of the SakA mitogen-activated protein kinase interactome and regulates stress responses and development in *Aspergillus nidulans*. Eukaryot Cell. 14:495-510.

5. Emri T, Szarvas V, Orosz E, Antal K, Park H, Han KH, Yu JH, Pócsi I. (2015) Core oxidative stress response in *Aspergillus nidulans*. BMC Genomics. 16:478.

111. oldal: „A kísérleteinkben alkalmazott oxidatív stresszkezelés (3 mM H_2O_2; 1 h) a kontroll tenyészetek transzkriptomában (32. ábra, 21-22. táblázatok, 9-11 mellékletek) és proteomában is (Kurucz és munkatársai 2018b) csak viszonylag kis stresszválaszt generált." Szerintem ez a hivatkozott 32. ábrából és 21-22. táblázatokból nem olvasható ki, hisz mindegyik esetében a változások a kontroll tenyészetekhez vannak viszonyítva, illetve félrevezető a megfogalmazás, mivel, ha jól értettem a dolgozatot, itt a kontroll éppen az volt, ami nem kapott stresszort.

Egyetértek. A mondat helyesen így hangzik: „A kísérleteinkben alkalmazott oxidatív stresszkezelés (3 mM H_2O_2; 1 h) a nem vaséheztetett tenyészetek transzkriptomában (32.

ábra, 21-22. táblázatok, 9-11 mellékletek) és proteomában is (Kurucz és munkatársai 2018b) csak viszonylag kis stresszválaszt generált."

A szerző a 113. oldalon a következőket írja: „Ez egyben felértékeli azon erőfeszítéseket is melyek célja, hogy a gombák stresszválaszait közvetlenül a kutatás szempontjából releváns környezetben (pl. az emberi szervezetben) tanulmányozzuk (McDonagh és munkatársai 2008)." Reméljük, ilyen vizsgálatra nem kerül sor emberi szervezetben, bizonyára a szerző is sejt/szövet tenyészetre vagy állatmodellre gondolt. A hivatkozott cikkben egyébként egérmodellt használtak.

A mondat helyesen így hangzik: Ez egyben felértékeli azon erőfeszítéseket is melyek célja, hogy a gombák stresszválaszait közvetlenül a kutatás szempontjából releváns környezetben (pl. az élő szervezetben) tanulmányozzuk (McDonagh és munkatársai 2008).

Az említett közleményben az egereket intranazálisan fertőzték és a fertőzést követően 12-14 órával vettek mintát. Ekkor a konidiumok mintegy 80 % már kicsírázott és elkezdett hifát növeszteni. A mintavételhez bronhoalveoláris mosást használtak és a visszanyert folyadékból egyszerű centrifugálással izolálták a gombát, majd a gombából az RNS-t. A bronhoalveoláris mosást – etikai okokból - a már elölt állatokkal végezték [1]. Érdemes megemlíteni azonban, hogy a bronhoalveoláris mosás több évtizedes múlttal rendelkezik a humán diagnosztikában [2]. Az így nyert minták felhasználhatóak a tüdő mikrobiomjának tanulmányozására [3], illetve az invazív aspergillózis kimutatására [4, 5] is. Az említett állatkísérlet [1] alapján a humán minták (technikai szempontból) alkalmasak lehetnek transzkriptomikai vizsgálatokra is. A kinyerhető RNS kis mennyisége a mai modern szekvenálási eljárások mellett (ld. „Single-cell RNA sequencing" [6]) feltehetőleg nem okozna gondot. Problémát inkább a minta heterogenitása jelenthet: Ha különböző korú és fiziológiai állapotú, azaz eltérő transzkriptomú és a kezelésekre eltérő módon reagáló, hifát tartalmaz a minta és/vagy eltér a kimosható és nem kimosható hifák fiziológiája/transzkriptoma az komoly gondot okozhat az adatok értelmezésénél és elképzelhető, hogy pl. egy antifungális kezelés után tapasztalt változás hátterében nem a transzkriptom megváltozása, csak a minták összetételének megváltozása állna. Az idézett állatkísérlet esetében ezt a problémát úgy oldották meg, hogy közvetlenül a fertőzést követően vettek mintát, ami lehetővé tette, hogy csak a frissen kicsírázott és éppen növekedésnek induló telepkezdeményeket tanulmányozzák. Ez a megoldás természetesen humán minták esetében nem megvalósítható. Remélhetőleg azonban az orvostudomány és a molekuláris

biológia fejlődése lehetővé teszi idővel, hogy invazív aszpergillózisban szenvedő betegekben is lehessen *in situ* gombaélettani vizsgálatokat folytatni olyan módon, hogy az kifejezetten annak a betegnek javát szolgálja, akiből a minta származik.

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. Kebbe J, Abdo T. (2017) Interstitial lung disease: the diagnostic role of bronchoscopy. J Thorac Dis. 2017 Sep;9(Suppl 10):S996-S1010.
3. Becker A, Vella G, Galata V, Rentz K, Beisswenger C, Herr C, Walter J, Tierling S, Slevogt H, Keller A, Bals R. (2019) The composition of the pulmonary microbiota in sarcoidosis - an observational study. Respir Res. 20:46.
4. Klapholz A, Salomon N, Perlman DC, Talavera W. (1991) Aspergillosis in the acquired immunodeficiency syndrome. Chest. 100:1614-1618.
5. Imbert S, Meyer I, Palous M, Brossas JY, Uzunov M, Touafek F, Gay F, Trosini-Desert V, Fekkar A. (2018) *Aspergillus* PCR in bronchoalveolar lavage fluid for the diagnosis and prognosis of *Aspergillosis* in patients with hematological and non-hematological conditions. Front Microbiol. 9:1877.
6. Hwang B, Lee JH, Bang D. (2018) Single-cell RNA sequencing technologies and bioinformatics pipelines. Exp Mol Med. 50:96.

„Milyen viszonyban van a 10C és a 13. ábra? A 13. ábra szerint 11 együtt szabályozott gén AtfA függő, míg a 10C ábrán jóval több. Szintén érdekes lett volna tudni, hogy a 11 génhez milyen funkciók/folyamatok társíthatók."

A 10C ábrán azon gének száma van feltüntetve, melyek aktivitása a vizsgált törzs esetében mindhárom kezelés hatására ugyanolyan irányban mutatott változást (aktivitásuk mindhárom kezelésben nőtt, vagy mindhárom kezelésben csökkent). E gének három csoportba lettek sorolva attól függően, hogy melyik törzsben volt megfigyelhető ez a viselkedésük: Csak a kontroll törzsben, csak a *ΔatfA* mutánsban és mindkét törzsben együttszabályozott gének. Ebben az esetben elsőként az együttszabályozás ténye lett megállapítva mindkét törzsben, majd az adatok törzsek szerinti bontásban, Venn-diagramon lettek bemutatva.

A 13. ábrán az AtfA-függő gének száma van feltüntetve, azaz azon gének száma, melyek a kontroll törzsben a kezelés hatására felülszabályozottságot (alulszabályozottságot) mutattak, de a mutánsban már nem. E gének lettek csoportosítva az alkalmazott három stresszkezelés alapján. Ebben az esetben elsőként az Atfa-függés ténye lett megállapítva

mindhárom kezelésben, majd az adatok kezelések szerinti bontásban, Venn-diagramon lettek bemutatva.

A 10C ábrán a”kontroll”\”*ΔatfA*” részhalmaz (a metszettől balra; összesen 88 gén) mutatja azon géneket, melyek a kontroll törzsben együtt szabályozódtak, de a mutánsban nem („AtfA-függő együttszabályozott gének”). A 13. ábrán a hármas metszet mutatja azon géneket (összesen 11 gén), amelyek mindhárom kezelésben AtfA-függést mutattak („mindhárom kezelésben AtfA-függést mutató gének”). A 11 gén mindegyikére igaz, hogy a kontroll törzsben mindhárom kezelésben vagy felülszabályozódtak, vagy alulszabályozódtak, míg a mutánsban egyik kezelésben sem. A 88 gén esetében is mindegyik génre igaz, hogy a kontroll törzsben mindhárom kezelésben vagy felülszabályozódtak, vagy alulszabályozódtak. E géncsoport tartalmazza az előbbi 11 gént, ahol a mutáns törzsben egyik kezelés alatt sem viselkedtek a gének a kontroll törzsben megfigyeltekhez hasonlóan, de tartalmaz olyan géneket is, amelyek a mutáns törzsben egy, vagy két (de nem mindhárom) kezelésben is a kontrollhoz hasonló változást mutattak. Összességében a 13. ábra hármas metszete részhalmaza a 10C ábrán feltüntetetett ”kontroll”\”*ΔatfA*” különbséghalmaznak. Bár mindkét ábra magyarázatánál meg lettek adva a bemutatott génhalmazok definíciói, a két ábra közötti különbségre valóban érdemes lett volna felhívni az olvasó figyelmét.

A 11 génről az *Aspergillus* Genome Database (http://www.aspergillusgenome.org) honlapján az alábbi információk találhatóak:

alulszabályozott gének

AN1103 feltételezett acetoacetil-CoA ligáz

AN1918 feltételezett foszfoenolpiruvát karboxikináz

AN3085 -

AN3112 UDP-galaktopiranóz mutáz

AN4513 kinezin

AN5177 feltételezett riboszóma fehérje

AN7159 feltételezett exopeptidáz

AN7668 feltételezett metionin-R-szulfoxid reduktáz

AN8783 mitózishoz szükséges fehérje

felülszabályozott gének

AN0304 feltételezett metallopeptidáz

AN9513 feltételezett aciltranszferáz

„A jelölt az 50. oldalon megállapítja: „Az a kép, amit az ESR fogalma sugall, miszerint a stresszválasznak van egy stresszre specifikus (variábilis) és egy stressz típusától független (konzervatív) eleme, az A. nidulans esetében még különféle oxidatív stresszek esetén sem állja meg a helyét." Ugyanakkor 13 gén hatféle stresszor esetén is „együtt szabályozottnak" bizonyult, ami ezen géneknek a stresszválaszban betöltött általános szerepére utal. Lehet-e tudni, hogy melyek ezek a gének és milyen folyamatokkal állnak kapcsolatban?"

A 13 génről az *Aspergillus* Genome Database honlapján az alábbi információk érhetőek el:

felülszabályozott gének

AN11176 csak ismeretlen funkciójú *Aspergillus* ortológok vannak felsorolva

AN3976 csak ismeretlen funkciójú *Aspergillus* ortológok vannak felsorolva

AN5509 F-box protein

AN5549 feltételezett transzporter

AN7517 csak ismeretlen funkciójú *Aspergillus* ortológok vannak felsorolva

AN7944 feltételezett acetiltranszferáz

AN8486 ismeretlen funkciójú fehérje

alulszabályozott gének

AN12111 csak ismeretlen funkciójú *Aspergillus* ortológok vannak felsorolva

AN2004 ismeretlen funkciójú fehérje

AN3638 feltételezett szterin C-4-metiloxidáz, a *S. cerevisiae erg3* ortológja

AN4025 feltételezett hidroláz aktivitású fehérje

AN8905 feltételezett monooxigenáz, a *S. cerevisiae erg5* ortológja

AN8907 feltételezett szterin C-4-metiloxidáz, a *S. cerevisiae erg25* ortológja

A felülszabályozott gének esetében a korábban leírtakkal összhangban érdemi információval nem szolgáltak az adatbázisban elérhető adatok. Az alulszabályozott gének esetében Fischer egzakt tesztel is igazolható módon a várhatónál nagyobb arányban vannak jelen az ergoszterin bioszintéziséhez köthető gének. A *S. cerevisiae* esetében korábban már igazolták, hogy az oxidatív stressz és a hiperozmotikus stressz (ezt a kétféle stressz használtuk mi is a kísérleteinkben) alulszabályozza az ergoszterin bioszintézisben résztvevő géneket [1]. Kérdés, hogy más stressz kezelések is hasonló hatásúak-e? Ugyanezzel az *A. nidulans* törzzsel, ugyanilyen körülmények között, ugyanilyen DNS chip-el végzett vizsgálataink [2] alapján az amfotericin B kezelés szintén alulszabályozta mindhárom (és sok más ergoszterin bioszintézis) gén működését, a Kongó vörös kezelés hatására, illetve $CdCl_2$ jelenlétében

azonban egyik gén (és más ergoszterin bioszintézishez köthető gén) aktivitása sem változott érdemben.

Ebben az esetben is igaz, hogy a megfigyelt alulszabályozottság a referencia tenyészetünkhöz mérten értendő [2]. Azaz, az ergoszterin szintézis gének alulszabályozódása legalább annyira jellemzi a stressz kezeléseket, mint e gének felülszabályozása a referencia tenyészetet. Ha a kísérleteket alacsonyabb, vagy magasabb hőmérsékleten végeztük volna el (ahol az ergoszterin bioszintézis út génjeinek más az aktivitása és a sejtek ergoszterin igénye is eltérő) nem szükségszerűen lettek volna jelen eroszterin bioszintézis gének az együttszabályozott gének között.

1. Montañés FM, Pascual-Ahuir A, Proft M. (2011) Repression of ergosterol biosynthesis is essential for stress resistance and is mediated by the Hog1 MAP kinase and the Mot3 and Rox1 transcription factors. Mol Microbiol. 79:1008-1023.

2. Antal K, Gila B Cs, Pócsi I, Emri T (2019) General stress response or adaptation to rapid growth in *Aspergillus nidulans*? Fungal Biol. *in press* (doi.org/10.1016/j.funbio.2019.10.009)

„Mit ért a jelölt „általános stresszválasz elemeken" (lásd 55. oldal)? A stresszválasz gének és elemek megkülönböztetését azzal indokolja, hogy „Azaz nem közvetlenül a gének indukcióját/represszióját célszerű vizsgálni, hanem inkább az általuk meghatározott folyamatokét." Ugyanakkor, ha az adott gének meghatároznak egy folyamatot, akkor a gének és a folyamat kifejeződése erősen átfedő fogalmat alkot."

A kérdéses bekezdést célszerű lett volna részletesebben kifejteni az alábbiak szerint:

Legyen a stresszválasz elem a riboszóma biogenezis gének csoportja. Két dolgot tételezzünk fel: 1) Ahhoz, hogy a riboszómák képződése visszaszoruljon nem szükséges az összes gén működését mérsékelni. Elegendő az is, ha kellően sok gén működését kellő mértékben mérsékeljük. (A „kellően" a gyakorlatban például azt jelenti, hogy a statisztikai próbákkal igazolhatóan alulszabályozott gének halmazában statisztikai próbákkal igazolható módon nagyobb arányban vannak jelen az alulszabályozott riboszóma biogenezis gének, mint a gomba teljes génkészletében.) 2) Nincs jelentősége annak, hogy mely riboszóma biogenezis gének mutatnak alulszabályozottságot. E két feltételezésből következik, hogy ha azt tapasztaljuk, hogy két tenyészet mindegyikében visszaszorul a riboszómák képződése egy stressz kezelést követően, akkor annak hátterében nem biztos, hogy ugyanazon gének alulszabályozottsága áll (ld. a dolgozat 12A ábráját). Ezt megfordítva: Ha két tenyészetben

eltérő gének működése változik meg egy stressz kezelés hatására, nem szükségszerű, hogy a sejtfiziológia szintjén értelmezett stresszválaszaik olyan mértékben eltérjenek egymástól, mint amire az eltérő transzkriptomaik alapján gondolhatnánk.

„RT-qPCR mérések alapján az oxidatív stresszválasz és a szekunder anyagcsere szabályozásában egyaránt fontos napA (Yin és munkatársai 2013), valamint a szekunder anyagcserét aktiváló hatású rsmA (Shaaban és munkatársai 2010, Yin és munkatársai 2013) oxidatív stressz alatt indukálódik és ezen indukció elmarad, vagy jelentősen mérséklődik AtfA hiányában (Emri és munkatársai 2015)." (63. oldal) Lehetséges-e, hogy az AtfA más szabályozó fehérjék génjeinek kifejeződésére hat és így modulálja a szabályozó hálózatokat? Vizsgálták-e esetleg, hogy konkrétan milyen gének működését befolyásolja? A szerző maga is így fogalmaz: „Az atfA deléció transzkriptomra gyakorolt hatásainak nagy része megmagyarázható, ha feltételezzük, hogy az AtfA fő feladata a jelátviteli hálózat működésének módosítása oxidatív stressz alatt. (Orosz és munkatársai 2017)" Van-e esetleg arra információ, hogy ez a módosítás milyen génekre, vagy jelátviteli hálózatra gyakorolt hatást jelent?

Az AtfA transzkripciós faktor kétféleképpen is befolyásolhatja a jelátviteli hálózatok működését: 1) Transzkripciós faktorként jelátvitelben fontos gének transzkripcióját módosíthatja. 2) bZip típusú transzkripciós faktorként kapcsolódhat más, bZip típusú fehérjékhez, vagy egyéb jelátviteli fehérjékhez, ami megváltoztathatja mind az AtfA, mind az interakciós partner működését.

Az AtfA ortológjai között mindkét esetre található példa az irodalomban: A *S. pombe* Atf1 transzkripciós faktora heterodimert képez a Pcr1 bZip típusú transzkripciós faktorral, de a Pcr1-től függetlenül is képes befolyásolni egyes gének transzkripcióját [1, 2]. Képes fizikai interakcióba lépni a Cid12 poliA polimerázzal, ami fontos lépése több hő stressz válaszban közreműködő gén elcsendesítésének („silencing") [3]. Az igazoltan közvetlenül az Atf1 által szabályozott gének között található a Cgs2 cAMP specifikus foszfodiészteráz génje [4]. Az Atf1 így a cAMP koncentráción keresztül is módosíthatja a jelátviteli hálózat működését.

Az *A. nidulans* AtfA-jával kapcsolatban nincs irodalmi adat arra vonatkozóan, hogy milyen gén/gének működését befolyásolja közvetlenül ez a transzkripciós faktor. A fizikai interakciókat tekintve igazoltan kölcsönhatásba lép a SakA MAP kinázzal, de feltehetőleg az AtfB bZip transzkripciós faktorral is képez heterodimert [5]. A tanszéken jelenleg folynak olyan Chip-DNAseq (kromatin immunprecipitációt követő DNS szekvenálás) vizsgálatok,

amelyek reményeink szerint egyértelmű adatokkal szolgálnak majd arról, hogy mely gének szabályozásában vesz részt közvetlenül az AtfA. Folyamatban van az AtfA-AtfB interakció *in vivo* vizsgálata is BiFC (bimolecular fluorescence complementation) technika felhasználásával.

1. Sansó M, Vargas-Pérez I, García P, Ayté J, Hidalgo E. (2011) Nuclear roles and regulation of chromatin structure by the stress-dependent MAP kinase Sty1 of *Schizosaccharomyces pombe*. Mol Microbiol. 82:542-554.
2. Sansó M, Gogol M, Ayté J, Seidel C, Hidalgo E. (2008) Transcription factors Pcr1 and Atf1 have distinct roles in stress- and Sty1-dependent gene regulation. Eukaryot Cell. 7:826-835.
3. Vo TV, Das J, Meyer MJ, Cordero NA, Akturk N, Wei X, Fair BJ, Degatano AG, Fragoza R, Liu LG, Matsuyama A, Trickey M, Horibata S, Grimson A, Yamano H, Yoshida M, Roth FP, Pleiss JA, Xia Y, Yu H. (2016) A Proteome-wide fission yeast interactome reveals network evolution principles from yeasts to human. Cell. 164:310-323.
4. Davidson MK, Shandilya HK, Hirota K, Ohta K, Wahls WP. (2004) Atf1-Pcr1-M26 complex links stress-activated MAPK and cAMP-dependent protein kinase pathways via chromatin remodeling of cgs2+. J Biol Chem. 279:50857-50863.
5. Lara-Rojas F, Sánchez O, Kawasaki L, Aguirre J. (2011) *Aspergillus nidulans* transcription factor AtfA interacts with the MAPK SakA to regulate general stress responses, development and spore functions. Mol Microbiol. 80:436-454.

„A szerző vizsgálta az autolitikus sejtfaldegradáció (ASD) jelentőségét széneházés esetén, illetve kapcsolatát a konidiogenezissel. Kísérleteiben a széneházó vad típusú törzs kevésbé bizonyult életképesnek, mint a ΔengA, ΔchiB törzs, ahol nem volt ASD és a telepek sem növekedtek jobban. Igaz, a konídiumszám a mutánsok esetében valamivel kisebb volt, de nem volt nagyságrendbeli az eltérés. Ennek fényében milyen előnyt biztosít és mi lehet a szerepe az ASD-nek, illetve van-e egyáltalán védelmi funkciója széneházés esetén?"

Kísérleteink egy részében rázatott lombikos, süllyesztett kultúrákkal másik részében felületi kultúrákkal dolgoztunk. Süllyesztett kultúrákban a tenyészet többé-kevésbé homogén, így az elérhető tápanyagok mennyiségétől függően a tenyészet egésze vagy növekszik, vagy éhezik. Felületi kultúrákban együtt vannak jelen a telep szélén lévő, intenzív vegetatív növekedést mutató hifák, a telep közepén elhelyezkedő, éhező hifákkal. (Amennyiben a minimál tápközeg 10 g/l glükózt tartalmaz leoltáskor, a tenyésztés harmadik napján már nem lehet glükózt kimutatni a telep közepe alatt, de a telep közvetlen közelében is csak mintegy 6 g/l a koncentrációja [1].)

A süllyesztett kultúrákban mért és az autolitikus sejtfaldegradációnak (ASD) tulajdonított vitalitás csökkenés valószínűleg csak a kísérleti elrendezés melléktermére: Az autolitikus sejtfalhidrolázok aktivitása a nagy sejtkoncentráció miatt irreálisan nagy. E kísérleti eredményekből ezért nem azt a következtetést vontuk le, hogy az ASD káros, hanem azt, hogy bizonyos körülmények között veszélyes lehet, amiből akár előnyt is kovácsolhatnak a gombák, ha ezen enzimekkel más fajok ellen próbálnak védekezni.

Az autolitikus sejtfalhidrolázok képződésének gátlása nem volt hatással a felületi tenyészetek növekedésre. Ez egy jó érv az ASD hasznossága ellen. Önmagában azonban csak arra utal, hogy az elhalt sejtek falát a telep szélén lévő hifák nem használják arra, hogy gyorsabban növekedjenek. Ennek lehet oka az is, hogy nem használják fel a telepek az elhalt sejtek sejtfalát, de lehet az is, hogy nem a friss tápközeggel érintkező hifacsúcsok hasznosítják azt. Itt érdemes megemlíteni, hogy a tápközeg glükóz tartalma és a telep átmérője között negatív korrelációt tapasztaltunk: Minél nagyobb volt a glükóz koncentráció annál kisebb volt a radiális növekedés sebessége. Ez elsőre meglepő, de a kisebb radiális növekedés gyorsabb telepvastagodással járt együtt, és így összességében a telepek fehérje tartalma (biomasszája) pozitív korrelációt mutatott a glükóz tartalommal [1]. A fentiek miatt abból, hogy az ASD nem befolyásolta felületi kultúrákban a növekedést, nem vontunk le következtetést az ASD hasznosságáról.

Az autolitikus sejtfalhidrolázok képződésének gátlása nem okozott nagyságrendi visszaesést a termelt konidiumok számában. Ezzel kapcsolatban érdemes kihangsúlyozni két dolgot: 1) A kontroll és a mutáns törzs között detektált különbség a tápközeg kiindulási glükóz koncentrációjától függött; 40 g/l kiindulási glükóz koncentrációnál nem volt különbség a termelt konidium mennyiségében, míg 2,5 g/l glükóz koncentráció esetén igen. (A mérés a tenyésztés ötödik napján történt, ekkor 40 g/l kiindulási glükóz koncentráció esetén a telepek közepe alatt még detektálható volt a glükóz jelenléte, 2,5 g/l kiindulási glükóz koncentrációnál már nem [1].) Elképzelhető, hogy más tápközegben, illetve tenyésztési körülmények között (pl. hemicellulóz szénforráson és 24 °C-on) nagyobb eltérést tapasztaltunk volna. 2) A *chiB* (kitináz) és *engA* (β-1,3- glükanáz) gének együttes deléciója csak közvetve érinti a sejtfal száraztömegének mintegy 40 %-át kitevő (ld. a dolgozat 15. táblázata) α-glükán lebontását. Elképzelhető, hogy az ASD teljes gátlása a fenotípusban is nagyobb változást eredményezett volna. Érdemes megjegyezni, hogy önmagában a *chiB*, vagy az *engA* gének deléciója 2,5 g/l glükóz jelenlétében is csak minimális mértékben okozott visszaesést a termelt konidiumok számában, jól detektálható különbséget csak a duplamutánsban tapasztaltunk.

Összességében úgy gondoljuk, hogy az ASD-nek köszönhetően a gomba hatékonyabban tudja konidiogenezisét fenntartani olyan körülmények között, amikor már felhasználta a környezetében fellelhető tápanyagokat. Ez megmagyarázná azt is, hogy az ASD kifejeződését miért gátolja a glükóz jelenléte [2] és miért esszenciális hozzá a konidiogenezis iniciálásában fontos FluG-BrlA útvonal [3, 4]. A kérdés megnyugtató lezárásához mindenekelőtt a sejtfal α-glükán lebontásáért felelős génjét (génjeit) kellene megtalálni és a konidiogenezist, sokféle tenyésztési körülmény között, egy kitin, α-glükán és β-1,3-glükán lebontására sem képes triplamutánsban kellene megvizsgálni.

1. Emri T, Vékony V, Gila B, Nagy F, Forgács K, Pócsi I. (2018) Autolytic hydrolases affect sexual and asexual development of *Aspergillus nidulans*. Folia Microbiol. 63:619-626.

2. Emri T, Molnár Zs, Veres T, Pusztahelyi T, Dudás G. Pócsi I (2006) Glucose-mediated repression of autolysis and conidiogenesis in *Emericella nidulans*. Mycological Research 110, 1172-1178.

3. Emri T, Molnár Zs, Pusztahelyi T, Varecza Z, Pócsi I. (2005) The FluG-BrlA pathway contributes to the initialisation of autolysis in submerged *Aspergillus nidulans* cultures. Mycol Res. 109:757-763.

4. Pócsi I, Leiter É, Kwon NJ, Shin KS, Kwon GS, Pusztahelyi T, Emri T, Abuknesha R, Price R, Yu JH. (2009) Asexual sporulation signaling regulates autolysis of *Aspergillus nidulans via* modulating the chitinase ChiB production. J Appl Microbiol. 107:514-523.

Vizsgálták-e, illetve igazolták-e, hogy a tisztított GgtA fehérjét kódolja-e a ggtA-nak elnevezett gén (történt-e fehérje szekvenálás)? Kérdés, hogy a teljes γGT aktivitásért ez a fehérje, illetve gén felel-e?

A GgtA-t sem olyan mennyiségben, sem olyan tisztaságban nem sikerült előállítanunk, hogy szevenáltathassuk, vagy MALDI-TOF MS analízissel azonosíttathassuk. Indirekt bizonyítékaink vannak arra nézve, hogy a GgtA-t valóban az AN10444 (*ggtA*) gén kódolja: A *ggtA* gén γGT-okra jellemző domain-el (pfam01019; https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi) rendelkezik, ortológjai, a *Schizosaccharomyces pombe ggt1* és a *Saccharomyces cerevisiae ecm30* igazoltan γGT-t kódoló gének. A gén transzkripciós aktivitása jól korrelált a tenyészetek γGT aktivitásával és a *ggtA* deléciója gyakorlatilag teljes mértékben eliminálta a tenyészetek γGT aktivitását, míg a deléciós törzsek komplementációja visszaállította a vad típusra jellemző aktivitást (ld. a dolgozat 12. táblázatát).

A γGT aktivitás mérést γ-glutamil-*p*-nitroanilid γ-glutamil donor és Gly-Gly γ-glutamil akceptor jelenlétében végeztük a Spitzmüller és munkatársai [1] közleményében leírt

módszert követve. Az előző bekezdésben leírtak alapján az e módszerrel detektálható γGT aktivitásért a GgtA volt felelős, ami nem zárja ki annak lehetőségét, hogy más mérési módszerekkel más γGT-ok jelenlétét is ki lehessen mutatni az *Aspergillus nidulans* hifáiból. Vizsgálataink célja azonban az általunk detektált γGT aktivitásért felelős enzim élettani jelentőségének megismerése volt.

[1] Spitzmüller Zs, Kwon NJ, Szilágyi M, Keserű J, Tóth V, Yu JH, Pócsi I, Emri T. (2015a) γ-Glutamyl transpeptidase (GgtA) of *Aspergillus nidulans* is not necessary for bulk degradation of glutathione. Arch Microbiol. 197:285-297.

Vaséhezéses és az azzal kombinált oxidatív stresszes állapotban számos multidrog transzporter indukálódott és a szerző felveti, hogy ezen transzporterek indukciója terápiás körülmények közt megnövelheti a gombaellenes szerekkel szembeni ellenálló képességet a gombában. Van-e arra adat, hogy vashiány esetén, illetve az oxidatív stresszes állapotban nagyobb az azoltolerancia, vagy más antifungális szerekkel szembeni ellenálló képesség A. fumigatus-ban, vagy más patogén gomba esetében?

A „kombinatorikus" stressz kezelések (pl. antifungális szer jelenléte és egy másik stresszor) alkalmazása és a kapott stresszválaszok szisztematikus elemzése az utóbbi években kezd a kutatók érdeklődésének középpontjába kerülni. Az eddig publikált legtöbb kísérlet azt vizsgálta, hogy a tápközeg szénforrás tartalma (szénstressz) hogyan befolyásolja a különböző *Candida* fajok antifungális szerekkel, vagy más stresszorokkal szembeni érzékenységét [1-3]. Más kísérletekben kifejezetten az emberi szervezetben is fellépő stresszek együttes hatását tanulmányozták *Candida* fajokon [4-5]. A nem *Candida* fajokkal végzett és különösen az omikai megközelítést is alkalmazó vizsgálatok száma ma még kevés [6-8].

Arra vonatkozóan, hogy a stressz hogyan befolyásolja egy-egy gombafaj antifungális szerekkel szemben mutatott érzékenységét az alább irodalmi adatokat találtam:

- A szénforrás limitációs stressz (glükóz helyett tejsav volt a szénforrás) megnövelte a vizsgált *Candida albicans* törzsek caspofungin, tunicamycin és amphotericin B toleranciáját, de a sejtek érzékenyebbé váltak a miconazolra [2]. E változások pontos oka nem ismert, a szerzők a sejtfal összetételének megváltozását detektálták a kísérletekben.

-. A *S. cerevisiae* és a *C. albicans* esetében az oxidatív stresszválasz szabályozásában is fontos Yap1, illetve Cap1 transzkripciós faktorok részt vesznek multidrog transzportert kódoló gének

(*flr1*, illetve *mdr1*) indukálásában. A transzkripciós faktorok hiperaktív változatainak termeltetése flukonazol rezisztenciához vezetett [9, 10]. Arra azonban nincs adat ezen közleményekben, hogy az oxidatív stressz szintén okoz-e azol rezisztencia növekedést. Az *A. fumigatus* esetében a hiperaktív AfYap1 termeltetése szintén azol (vorikonazol) és oxidatív stressz tolerancia növekedést eredményezett [11]. Ebben a közleményben sincs adat arról, hogy önmagában az oxidatív stressz is hasonló hatású lenne, de arról sem, hogy a megnövekedett azol tolerancia hátterében multidrog transzportert kódoló gének indukálódása állna.

- Egy másik tanulmányban azt igazolták, hogy a caspofungin oxidatív stresszt indukál *A. fumigatus*ban, aminek hatására megváltozik a membrán összetétele és e változás a β-1,3-glükánszintáz komplex caspofunginnal történő gátolhatóságát is csökkenti [12]. Sajnos itt sem vizsgálták, hogy egy hagyományos oxidatív stresszt indukáló ágens is hasonló hatású-e.
- A legtöbb *Cryptococcus neoformans* izolátum számára az emberi szervezetben előforduló 5 v/v % CO_2 elviselése komoly kihívást jelent. A klinikai izolátumok ugyanakkor jól tolerálják ezt a stresszt. Az 5 v/v % CO_2 jelenléte a klinikai és nem klinikai izolátumok azol érzékenységét is megnövelte, de ennek oka nem ismert [13].
- Szintén a *Cryptococcus neoformans* esetében figyelték meg, hogy a vaséhezést kiváltó vas kelátorok (EDTA, deferiprone, illetve deferasirox) és az azolok (vorikonazol, itrakonazol és néhány törzs esetében a flukonazol esetében is) antifungális hatása között antagonizmus van [14]. Az amphotericin B esetében viszont szinergizmust mutattak ki [14]. Az antagonizmus és a szinergizmus háttere nem ismert.

Összességében elmondható, hogy a stressz hatással van a gombák antifungális szerekkel szembeni érzékenységére. E hatás erőssége és jellege (növeli-e, vagy csökkenti-e az antifungális szerekkel szembeni érzékenységet) a tenyésztési körülmények (pl. stresszor koncentrációk) mellett, a vizsgált törzstől/fajtól és a vizsgált stressszorok/antifungális szerek típusától is függ.

A „kombinatorikus” stresszválaszok tanulmányozása jelenleg is folyamatban van a tanszékünkön. Egy olyan gyorsteszt optimalizálásán dolgozunk, amely lehetővé tenné nagyszámú törzs (pl. eltérő *in vivo* patogenitást mutató *A. fumigatus* törzsek) „kombinatorikus” stressz toleranciájának gyors összehasonlítását. E módszert szeretnénk felhasználni arra is, hogy megvizsgáljuk az *A. fumigatus* antifungális szerekkel szembeni érzékenységét stressz, illetve „kombinatorikus” stressz alatt. Természetesen, ha azt tapasztaljuk, hogy az antifungális szerekkel szembeni érzékenység jelentős mértékben

csökken, vagy nő a gombát ért stresszhatások következtében, akkor ennek hátterét szeretnénk majd részletesen megvizsgálni transzkriptomikai módszerek segítségével is.

1. Maris AF, Assumpção AL, Bonatto D, Brendel M, Henriques JA. (2001) Diauxic shift-induced stress resistance against hydroperoxides in *Saccharomyces cerevisiae* is not an adaptive stress response and does not depend on functional mitochondria. Curr Genet. 39:137-149.

2. Ene IV, Adya AK, Wehmeier S, Brand AC, MacCallum DM, Gow NA, Brown AJ. (2012) Host carbon sources modulate cell wall architecture, drug resistance and virulence in a fungal pathogen. Cell Microbiol. 14:1319-1335.

3. Zhang N, Cao L. (2017) Starvation signals in yeast are integrated to coordinate metabolic reprogramming and stress response to ensure longevity. Curr Genet. 63:839-843.

4. Kaloriti D, Tillmann A, Cook E, Jacobsen M, You T, Lenardon M, Ames L, Barahona M, Chandrasekaran K, Coghill G, Goodman D, Gow NA, Grebogi C, Ho HL, Ingram P, McDonagh A, de Moura AP, Pang W, Puttnam M, Radmaneshfar E, Romano MC, Silk D, Stark J, Stumpf M, Thiel M, Thorne T, Usher J, Yin Z, Haynes K, Brown AJ. (2012) Combinatorial stresses kill pathogenic *Candida* species. Med Mycol. 50:699-709.

5. Leach MD, Budge S, Walker L, Munro C, Cowen LE, Brown AJ. (2012) Hsp90 orchestrates transcriptional regulation by Hsf1 and cell wall remodelling by MAPK signalling during thermal adaptation in a pathogenic yeast. PLoS Pathog. 8:e1003069.

6. Owens RA, Hammel S, Sheridan KJ, Jones GW, Doyle S. (2014) A proteomic approach to investigating gene cluster expression and secondary metabolite functionality in *Aspergillus fumigatus*. PLoS One. 9:e106942.

7. Brown NA, Goldman GH. (2016) The contribution of *Aspergillus fumigatus* stress responses to virulence and antifungal resistance. J Microbiol. 54:243-253.

8. Krysan DJ, Zhai B, Beattie SR, Misel KM, Wellington M, Lin X. (2019) Host carbon dioxide concentration is an independent stress for *Cryptococcus neoformans* that affects virulence and antifungal susceptibility. MBio. 10: e01410-19.

9. Alarco AM, Balan I, Talibi D, Mainville N, Raymond M. (1997) AP1-mediated multidrug resistance in *Saccharomyces cerevisiae* requires FLR1 encoding a transporter of the major facilitator superfamily. J Biol Chem. 272:19304-19313.

10. Alarco AM, Raymond M. (1999) The bZip transcription factor Cap1p is involved in multidrug resistance and oxidative stress response in *Candida albicans*. J Bacteriol. 181:700-708.

11. Qiao J, Liu W, Li R. (2010) Truncated Afyap1 attenuates antifungal susceptibility of *Aspergillus fumigatus* to voriconazole and confers adaptation of the fungus to oxidative stress. Mycopathologia. 170:155-160.

12. Satish S, Jiménez-Ortigosa C, Zhao Y, Lee MH, Dolgov E, Krüger T, Park S, Denning DW, Kniemeyer O, Brakhage AA, Perlin DS. (2019) Stress-induced changes in the lipid microenvironment of β-(1,3)-d-glucan synthase cause clinically important echinocandin resistance in *Aspergillus fum*igatus. MBio. 10. pii: e00779-19.

13. Krysan DJ, Zhai B, Beattie SR, Misel KM, Wellington M, Lin X (2019) Host carbon dioxide concentration is an independent stress for *Cryptococcus neoformans* that affects virulence and antifungal susceptibility. MBio. 10: pii:e01410-19.

14. Lai YW, Campbell LT, Wilkins MR, Pang CN, Chen S, Carter DA. (2016) Synergy and antagonism between iron chelators and antifungal drugs in *Cryptococcus*. Int J Antimicrob Agents. 48:388-394.