

MTA doktori értekezés opponensi véleményére adott válasz

Jelölt: Dr. Eszterbauer Edit
Értekezés azonosítója: dc_1729_20
Értekezés címe: Nyálkaspórák halélősködők gazdafajlagossága és a gazda–parazita kölcsönhatás megnyilvánulásai
Opponens: Dr. Orbán László, a biológiai tud. kandidátusa, c. egyetemi tanár

Tisztelt Professor Úr!

Nagyon szépen köszönöm, hogy vállalta MTA doktori értekezésem bírálatát. Köszönöm a részletes értékelését, a hasznos észrevételeket, a dicsérő szavakat, és nem utolsósorban a dolgozat nyilvános vitára bocsátásának támogatását. Bírálatában felvetett kérdéseire és megjegyzéseire az alábbiak szerint válaszolok.

Formai értékelés:

Az Anyagok és módszerek fejezetben a molekuláris biológiai módszereket két csoportra bontva tárgyaltam. Mindezt okkal tettem, igyekeztem a dolgozat két fő alfejezetének módszertanát ily módon is elkülöníteni. Köszönöm a jogos észrevételt, valóban kimaradt egyes módszerek részletes ismertetése. Ilyen például a sebes pisztráng genetikai vonalak mikroszatellit markerek alapján történő genotipizálás módszertani leírása, amelynek során kapilláris gélelektroforézist használtunk a fragmentumok méretének meghatározására. Bár az eredeti közleményekben a hiányolt technikák leírása megtalálható, a módszertani fejezet írásakor tudatosan szelektáltam, és csupán az eredmények, valamint azok értékelése szempontjából relevánsnak ítélt módszereket mutattam be. Lehetséges, hogy a szelekció helyenként túlzott volt, és néhány lényeges módszer megfelelő ismertetése emiatt elmaradt.

A „vérvonal” kifejezést valóban nem a klasszikus értelemben használtam, helyesebb lett volna ebben az esetben a „genetikai vonal” kifejezés használata.

A Megbeszélés fejezetben szintén tudatosan kerültem az altémánkénti tagolást, így csupán két fő alfejezetet különítettem el. Bár a hosszú bekezdésekre ez nem mentség, az eredeti közlemények hivatkozásának kiemelésével próbáltam segíteni az olvasót a tájékozódásban.

A 2.2. Táblázatban a másfél évtized alatt, a molekuláris biológiai munka során használt oligonukleotidok főbb adatait gyűjtöttem össze. Egyetértek opponensemvel, informatívabb lett volna a primerpárok megadása. Az átláthatóságot viszont véleményem szerint nehezítette

volna a parazita fajtól, és alkalmazási típustól függő, nagyszámú primerpár kombináció egyenkénti említése, ezért döntöttem végül ennek mellőzése mellett.

Az ábrák szerkesztésénél az eredeti közleményeket igyekeztem követni. Ezért folytatólagos például a 3.1. ábra után a 3.2. ábra számozása. Vannak stílusbeli eltérések is a különböző témában és időszakban készült ábrák között. Egyetértek az észrevétellel, ezek egységesítésére nem törekedtem, és több ábrán angol nyelvű feliratot hagytam. Az ábraaláírások szövegezésével kapcsolatos megjegyzésével is egyetértek, célszerűbb lett volna a lényegi tartalmat mindenhol kiemelni.

Tartalmi értékelés:

A *Sphaerospora dykova*e kórtani jelentőségéről és fejlődéstani vizsgálatának rövid történetéről az 1.4. alfejezetben áttekintést adtam, azonban valóban szükséges lett volna ezt legalább a pontyok kopoltyú sphaerosporosis-át okozó *S. molnari* fajjal kapcsolatban is megtenni.

A nyálkaspórások életciklusának *in vivo* laboratóriumi fenntartása körültekintést kívánó és időigényes feladat. A hosszú évek során gyűjtött tapasztalatokat különböző formában, főleg konferencia előadások és részben közlemények (pl. Eszterbauer et al. 2009, 2015) formájában publikáltuk. A vizsgált, négy kevéssertéjű féreg populáció származásának adatai valóban hiányosak, ezeket az adatokat elmulasztottam átvenni az eredeti közleményből. Két állomány hazai halgazdaságból, egy németországi pisztrángtelepről, egy pedig akvarista kereskedők közvetítésével feltételezhetően Erdélyből származott.

A „marginális szignifikancia” szigorúan véve valóban nem létezik a statisztikában. Mégis ennek említése mellett döntöttünk, mert véleményem szerint trendek jelzésére azért használható, különösen olyan esetekben, amikor az alacsony elemszám „nehezíti” a statisztikai elemzést.

Jogos a felvetése a *Myxobolus cerebralis* okozta betegség egyik jellegzetes elváltozásával kapcsolatban. A pisztrángfélék kergekórja nem csak a farokúszó, de sokszor a faroknyél elszíneződésével is jár(hat). Az elváltozások jellege és intenzitása azonban még a fogékony szívárványos pisztrángok között sem egységes, a törzsek/változatok/formák eltérő intenzitású elváltozásokat mutatnak. Így gyakori eset, hogy a faroknyél nem mutat sötét elszíneződést.

Az aranyhal és az ezüstkárász elnevezése és taxonómiai viszonya időről-időre módosul. Valóban volt olyan időszak, amikor alfajként hivatkoztak rájuk. A jelenleg hatályos nomenklatúra szerint azonban két külön fajról van szó, az aranyhal latin neve *Carassius auratus* (Linnaeus, 1758), az ezüstkárászé *Carassius gibelio* (Bloch, 1782) (forrás: [Fishbase](#)).

Nagyon köszönöm az *in vitro* rendszerben vizsgált *M. cerebralis* gazdafelismerés vizsgálatával kapcsolatos észrevételét. Az eredményeket értékelve mi is felvetettük annak lehetőségét, hogy az *in vitro* aktiválási módszer gének szintjén másként vagy részlegesen valósul meg. A

későbbiekben ezért *in vivo* kísérletekből származó mintákon végeztük a génexpressziós vizsgálatokat.

Köszönöm a kiegészítést és a pontosítást a tenyészhál vonalak szelekcióját illetően. A 2015-ben publikált tanulmányunk óta kevésbé követtem a halak szelektív tenyésztésével kapcsolatos tudományos eredményeket. Továbbá a doktori értekezés alapját képező közlemények tematikáját kívántam követni az eredmények tárgyalása során is. Ennek ellenére az atlanti lazacok, az általam „lazac tetű”-nek hívott „sea lice” elleni nagyobb fokú toleranciáját célzó, szelektív tenyésztéséről valóban érdemes lett volna említést tenni.

Feltett kérdéseire adott válaszaim:

K1. A paraziták molekuláris filogenetikai vizsgálatát a 18S rDNS szekvenciák alapján végezték el. Miért ezt a markert választották? Végeztek-e Önök vagy mások összehasonlító vizsgálatokat a 18S rDNS, a Tree of Life projekt által használt citokróm oxidáz (*coi*), illetve a citokróm b (*cytb*) markerek alkalmasságának megállapítására a vizsgált nyálkaspórák kládokban?

Az 1990-es években a 18S riboszomális RNS gént (18S rDNS) kezdték el szekvencia szinten vizsgálni. Valószínűleg azért, mert ez a gén nagy kópiaszámban van jelen a sejtekben, így az akkori technikákkal is elég volt viszonylag kis mennyiségű kiindulási anyag a sikeres detektáláshoz és szekvenáláshoz. Az évek során történtek próbálkozások a riboszomális gének (18S és 28S rDNS) és az azokat összekötő „internal transcribed spacer” (ITS) régiókon kívül egyéb sejtanyagban kódolt gének vizsgálatára. Ilyen például a 70 kDa molekulatömegű hősokk fehérje (HSP-70) (Anderson et al. 1998) vagy az elongációs faktor 2 (EF-2) (Fiala & Bartošová 2010), amelyek alapján filogenetikai rekonstrukciók is történtek, bár a 18S rDNS-hez képest igen kisszámú nyálkaspórák fajon. A HSP-70 alkalmazása egyértelmű zsákutcának bizonyult, sőt utólag kiderült, hogy a kapott DNS szekvenciák a halgazda genomjából származó kontamináció volt (Jimenez-Guri et al. 2007, Fook & Sidall 2015). Az EF-2 már jóval ígéretesebbnek tűnt, azonban ennek alkalmazása máig nem terjedt el széles körben. Talán ez azért is lehet, mert közben akkorára duzzadt az 18S rDNS szekvencia adatbázis (az NCBI adatbázisban „myxozoa 18S” kifejezésre keresve aktuálisan 1907 db találatot kapunk), hogy különösen új faj leírásakor a szerzők értelemeszerűen e gén alapján végezték/végzik el a faj szintű hasonlítást.

A mitokondriális markerek a szekvenálási technikák fejlődésével, elsősorban az újgenerációs szekvenálási módszerek széleskörű elterjedésével egyre inkább elérhetővé válnak (Yahalomi et al. 2017). Ennek ellenére nem vagyok meggyőződve arról, hogy az állatvilág számos csoportjában, evolúciós és filogenetikai rekonstrukciókra kiválóan használható citokróm-oxidáz c alegység (*coi*), vagy a citokróm b (*cytb*) gének a nyálkaspórák esetében is hasonló

hatékonysággal alkalmazhatók lennének. Az állatvilág ősi csoportjaiban (pl. szivacsok és csalánozók) a mitokondriális genom szerveződése egyes csoportoknál lineáris, másoknál körkörös. Ráadásul az igen gyakran fragmentált genomban a kódoló régiók elrendeződése is eltér a gerinceseknél megismert struktúrától, ami nehezíti a megfelelő génszakaszok célzott vizsgálatát. Közelmúltbeli vizsgálatok a nyálkaspórások esetében is igazolták a fragmentált, akár 8 gyűrűből is felépülő, körkörös genomszerveződést (Yahalomai et al. 2017, 2020). Ezenkívül nem elhanyagolható ellenérv, hogy bizonyítottan létezik mitokondriális genom nélküli nyálkaspórás faj is (*Henneguya salminicola*) (Yahalomai et al. 2020).

K2. Mik lehetnek az okai annak, hogy a sebes pisztrángból nyert *M. cerebralis* izolátumok igen nagy hatékonysággal fertőzték meg az ezüstkárászt is?

Több vizsgálatunk is igazolta, hogy a *M. cerebralis* faj nem tesz különbséget halfajok között (Kallert et al. 2015, Sipos et al. 2018, Eszterbauer et al. 2019), és a parazita vízben lebegő actinospórája a pisztrángfélék mellett például a pontyféléket is gazdaként ismeri fel. Spóraképzés ugyan a pontyfélékben nem történik, de a korai fejlődési stádiumok a fertőzést követő néhány napban még igazoltan kimutathatók a halszövetekben. A nyálkaspórások actinospórái számára a halgazda felismeréséhez mechanikai és kémiai ingerek szükségesek. Utóbbit a halnyálkában jelenlévő kisméretű nukleozid molekulák, az inozin, a 2'-deoxiinozin vagy a guanozin váltja ki, amik a legtöbb halfaj kültakarójának külső nyálkarétegében folyamatosan megtalálhatók (Kallert et al. 2011). Hogy a gazdafelismerés miért nem specifikusan a fogékony gazdára koncentrálódik, annak több oka is lehet. Az actinospórák törékeny, vízben lebegő struktúrák, amelyek a külvilágban viszonylag rövid ideig élet- és fertőzőképesek. Mivel aktív mozgásra nem képesek, a gazda közelébe jutás esélye nagyban függ a környezettől (a víz áramlásától, a halak életmódjától stb.). Az ilyen, szinte véletlenszerű találkozás miatti alacsony fertőzési esély „kompenzálására” nagy számban termelődnek a gerinctelen gazdában. Előnyt jelenthetnek az említett nukleozidok mint kémiai ingerek is, amelyek kémiai azonosítása feltételezhetően gyorsan és hatékonyan kivitelezhető, ezzel gyorsítva a gazdafelismerést. A parazita hatékony terjedése érdekében az actinospórák minden potenciális gazdába (vagyis minden elérhető halba) igyekeznek befurakodni, még akkor is, ha a nem megfelelő halfajba való bejutás valójában a parazita szintjén veszteségnek tekinthető.

K3. A Megbeszélés végén (91. oldal alja) a Jelölt utal a nagy hatékonyságú (más néven új generációs) szekvenálási módszerek lehetséges alkalmazására a transzkriptómák részletesebb, mélyebb elemzése céljából. Milyen más területeket tudna felsorolni, ahol az ilyen eljárások leginkább segíthetnék ezen tudományterület fejlődését?

A genomok és transzkriptómok összehasonlító elemzése számtalan lehetőséget nyújt a tudományterület fejlődésére. Azonosításra vár több olyan apomorf jelleg molekuláris háttere, amelyek a szabadon élő csalánozóknban és a parazita nyálkaspórásokban testfelépítésében, fenotípusos jellegében párhuzamosságok lehetnek, mint például a nyálkaspórák sarki tok és a csalánozó nematocita közötti hasonlóságok/különbségek. A sejtbiológiai jellemzők szintjén is van számos potenciális vizsgálati téma, mint például az extracelluláris és „tight junction” sejt kapcsolatok fehérjéinek jellegzetességei a csalánozókéval (Ganot et al. 2014) összevetve, vagy a motilitással összefüggő fehérjék jellemzése, mint pl. a *Sphaerospora molnari* „táncoló” véralakjai esetében (Hartigan et al. 2016). Fontos kutatási irány lehet a patogenitással összefüggő fehérjék, fehérjecsoportok és azok funkcióinak azonosítása, amelyhez segítséget jelent majd, ha magas és alacsony patogenitású fajok transzkriptómája egyaránt rendelkezésre áll az összehasonlításra. A transzkriptómok összehasonlító elemzésével a fertőzött halak immunreakciójának molekuláris szintű vizsgálata is lehetővé válik, a gének egyenkénti vizsgálata helyett, nagyobb léptékű génexpressziós elemzéssel. És nem utolsósorban terápiás potenciállal rendelkező fehérjék azonosíthatók. Ez utóbbi irányba tart az egyik jelenleg futó alapkutatási projektünk is.

K4. A 'csali vegyületek' alkalmazása a nyálkaspórások actinospóráinak 'kisütésére' ígéretes eredménynek látszik. Mely halfajok esetében lát lehetőséget ennek a védekezési eljárásnak a tenyésztési folyamatba történő beillesztésére? Történtek-e a dolgozat beadása óta további előkísérletek ezen a területen?

Ez a védekezési mód beépíthető lenne a tenyésztési folyamatba magas patogenitású parazita fajjal (pl. *M. cerebralis*, *Tetracapsuloides bryosalmonae*) feltehetően még nem találkozott, értékes tenyészállományok (pl. szivárványos pisztráng, pataki szajbling) védelme érdekében. A módszert már kipróbáltuk pisztrángos gazdaságban „félüzemi” körülmények között is, azonban főként az alacsony víz hőmérséklet okozta oldódási nehézségek miatt további optimalizálás szükséges. A módszer gyakorlati alkalmazhatóságának kísérleti fejlesztési feladatait német kollégáimmal közösen tervezzük elvégezni, amennyiben ennek anyagi feltételei is rendelkezésre állnak.

Végezetül nagyon köszönöm a dolgozat alapos bírálatát, munkám pozitív értékelését, és kérem válaszaikat szíves elfogadását.

Budapest, 2021. február 11.

Tisztelettel:



Dr. Eszterbauer Edit

Hivatkozások

- Anderson C, Canning E, Okamura B (1998) A triploblast origin for Myxozoa? *Nature* 392:346–347
- Eszterbauer E, Atkinson S, Diamant A, Morris D, El-Matbouli M, Hartikainen H (2015) Myxozoan life cycles: practical approaches and insights. In: Okamura B, Gruhl A, Bartholomew J (eds): *Myxozoan evolution, ecology and development*. Springer International Publishing, Switzerland, pp. 175–198
- Eszterbauer E, Kallert DM, Grabner D, El-Matbouli M (2009) Differentially expressed parasite genes involved in host recognition and invasion of the triactinomyxon stage of *Myxobolus cerebralis* (Myxozoa). *Parasitol* 136:367–377
- Fiala I, Bartošová P (2010) History of myxozoan character evolution on the basis of rDNA and EF-2 data. *BMC Evol Biol* 10:228
- Foxx J, Siddall ME (2015) The Road To Cnidaria: History of Phylogeny of the Myxozoa. *J Parasitol* 101:269-274
- Ganot P, Zoccola D, Tambutté E, Voolstra CR, Aranda M, Allemand D, Tambutté S (2014) Structural Molecular Components of Septate Junctions in Cnidarians Point to the Origin of Epithelial Junctions in Eukaryotes. *Mol Biol Evol* 32:44–62
- Hartigan A, Estensoro I, Vancová M, Bílý T, Patra S, Eszterbauer E, Holzer AS (2016) New cell motility model observed in parasitic cnidarian *Sphaerospora molnari* (Myxozoa: Myxosporidia) blood stages in fish. *Sci. Rep.* 6:39093
- Jimenez-Guri E, Philippe H, Okamura B, Holland P (2007) *Buddenbrockia* is a Cnidarian worm. *Science* 317:116–118
- Kallert DM, Bauer W, Haas W, El-Matbouli E (2011) No shot in the dark: Myxozoans chemically detect fresh fish. *Int J Parasitol* 41:271–276
- Yahalomi D, Atkinson SD, Neuhof M, Sally Chang E, Philippe H, Cartwright P, Bartholomew JL, Huchon D (2020) A cnidarian parasite of salmon (Myxozoa: *Henneguya*) lacks a mitochondrial genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 117:5358–5363
- Yahalomi D, Haddas-Sasson M, Rubinstein ND, Feldstein T, Diamant A, Huchon D (2017) The Multipartite Mitochondrial Genome of *Enteromyxum leei* (Myxozoa): Eight Fast-Evolving Megacircles. *Mol Biol Evol* 34:1551–1556