

## Válasz Prof. Dr. Emőd Levente bírálatára

Mindenekelőtt szeretném megköszönni Prof. Dr. Emőd Leventének MTA doktori értekezésem bírálatát, szakmai munkásságomat és dolgozatomat méltató elismerő szavait, és azt, hogy értekezésemet mindenben megfelelőnek és nyilvános vitára alkalmasnak találta.

Örülök, hogy munkám bírálatát az eltérő érdeklődési és kutatási területeink határterületeinek tudományos eredményeit boncolgató, gondolatébresztő kérdések felvetésére inspirálta.

A következőkben a bírálóm által feltett kérdésekre válaszolok.

### ***Bírálati kérdések***

*1. A környezeti mintákat 6-8 °C-on hűtve szállították a laboratóriumba, ahol a lehető leghamarabb megkezdték a feldolgozásukat. Ez a hőmérséklet nem befolyásolhatta a mintákban jelenlévő mikrobák mennyiségi összetételét a pszichrofilek javára?*

Bírálóm kérdésére válaszolva elmondható, hogy a mikroorganizmusok növekedését és szaporodását befolyásoló egyik legfontosabb környezeti tényező a hőmérséklet. A prokarióták világában a kardinális (minimum és maximum) hőmérsékleti értékek nagymértékben különbözhetnek egymástól, és egy-egy baktériumfaj esetében általában azt a hőmérsékleti tartományt tükrözik vissza, amiben az adott szervezet természetes környezetében életképes. Ebben a hőmérsékleti tartományban található az az optimális hőmérsékleti érték (jellemzően a maximumhoz közelebb), aminél a sejt életműködését meghatározó enzimek reakciói sebessége maximális, ezáltal a mikroorganizmusra jellemző generációs idő minimális. Az optimálistól eltérő hőmérsékleti értékek a sejtek szaporodási sebességének csökkenését eredményezik. Az általunk vizsgált extrém környezetek többségében (pl. szikes tavakban és talajokban, barlangokban) előforduló mikroorganizmusok hőmérsékleti tartományuk tekintetében a mezofilek körébe tartoztak. A minták szállításakor alkalmazott 6-8 °C-os hőmérséklet, ami a mezofilek hőmérsékleti tartományának alsó részébe esett, ezért a mintákban jelenlévő mikroorganizmusok anyagcsere folyamatainak mérséklése révén csökkentette azok szaporodási rátáját. Ily módon biztosítani tudtuk azt, hogy a mintákban lévő mikroorganizmusok életképessége mennyiségüknek és a mikrobapopulációk arányának jelentős változása nélkül megmaradjon a mintavételtől egészen a laboratóriumi mintafeldolgozásig.

A hévforrások vizében élő termofil/hipertermofil mikroorganizmusok esetében ez a szállítási hőmérséklet azonban már minden valószínűség szerint kívül esett hőmérsékleti tartományukon, így az szaporodóképességüknek akár irreverzibilis elvesztését is eredményezhette. Tenyésztéses vizsgálatokat ezért ezekkel a mintákkal nem végeztünk. Az alacsony hőmérsékletet kedvelő, elsősorban az Andok permafroszt környezetéből származó minták esetében a legnagyobb nehézséget az eredeti alacsony környezeti hőmérséklet folyamatos biztosítása jelentette számunkra. A valódi hidegkedvelők (sztenopszichrofilek) a közel állandó, tartósan alacsony hőmérsékletre alkalmazkodtak. Ezek a szervezetek általában extrém nagy termolabilitással jellemezhetők, vagyis a természetes élőhelyük hőmérsékleti értékeitől való mindössze néhány fokos pozitív eltérés is a makromolekulák szintézisének gátlását, a sejtmembrán dezintegrációját és sejtpusztulást eredményezhet náluk. Sajnos az Andokból származó minták esetén a folyamatosan állandó hőmérsékletű hűtláncot nem tudtuk fenntartani, ezért sztenopszichrofileket nem tudtuk tenyésztésbe vonni. A

hidegtűrő pszichotrófok (fakultatív pszichofilek, pszichrotoleránsok) azonban relatíve széles hőmérsékleti tartományhoz adaptálódtak. Bár a pszichotrófok optimális hőmérséklete szintén az endemikus környezet hőmérsékleténél figyelhető meg, ezek a szervezetek megőrizhetik életképességüket a mezofilek hőmérsékleti tartományának jelentős részében is (max.  $\leq 35^{\circ}\text{C}$ ). Kutatásaink során így mi is sikerrel vontuk tenyésztésbe a különböző permafroszt környezetekből leírt és a Proteobacteria, Bacteroidetes és Actinobacteria törzsekbe sorolt pszichotróf baktériumfajok képviselőit.

*2. Az előző kérdéshez kapcsolódva: Mennyiben volt lehetőség arra, hogy a minta az eredeti környezetében jelen lévő extrémítás jellegének leginkább megfelelő közegben maradjon a szállítás során, különösen a más földrészekén vett minták esetében? Alkalmazhatók-e az orvosi mintavételhez és szállításhoz hasonlóan stabilizátorok vagy transzport közegek a lelőhely extrémítási jellegének megőrzése céljából?*

Az általunk végzett környezetmikrobiológiai vizsgálatoknál mindig törekedtünk arra, hogy a mintákban jelenlévő mikroorganizmusok növekedését és szaporodását meghatározó környezeti tényezők a lehető legkisebb mértékben változzanak meg a mintavétel és a szállítás során. Mintavételt ezért minden alkalommal aseptikus körülmények között végeztünk, steril mintavételi eszközökkel, steril, jól zárható mintavételi edényekbe, hogy elkerüljük a minták szennyeződését. Az „extrémítás” jellegének megőrzése céljából a laboratóriumi feldolgozásra kerülő mintamennyiségeknek (1-5 g talaj, 1-10 ml vízminta) általában többszörösét (100-500 g talaj, 500-1000 ml vízminta) gyűjtöttük a helyszínen, bolygatásmentes körülmények között. Ezekből a nagyobb minta tömegekből/térfogatokból a laboratóriumban, rendszerint a 24 órán belül történő minta feldolgozás során szintén aseptikus körülmények között végeztük el az „érintetlen” kis mintaegységek (mikrokörnyezetek) kiemelését/elkülönítését és laboratóriumi feldolgozását.

Az orvosi mikrobiológiai mintavételekhez és szállításhoz alkalmazott stabilizátorok és transzportközegek (megfelelő vízakaktivitásuk és ionösszetételük alapján) arra alkalmasak, hogy a relatíve kis humán mintamennyiségben jelenlévő és a környezeti hatásokkal (elsősorban a kiszáradással) szemben érzékeny baktériumok is megőriznék szaporodóképességüket és ezáltal detektálhatóságukat szobahőmérsékleten, akár 48-72 órán keresztül (Barcs 2009). Esetünkben a fentebb részletezett relatíve nagy mintamennyiség és (az Andokból származó minták kivételével) a szállítási idő rövidege (mindössze néhány óra), valamint a laboratóriumban alkalmazott „érintetlen” mintafeldolgozási stratégia alkalmazása miatt a minták kiszáradásától nem kellett tartanunk, ezért nem tartottuk szükségesnek speciális stabilizátorok vagy transzport közegek használatát.

*3. A legtöbb tenyésztendő humán kórokozó egy-két nap alatt telepeket képez megfelelő tenyésztési körülmények között, de van olyan is, amely akár kéthetes tenyésztési időt igényel (pl. Actinomyces spp.). Időtartamot tekintve mit jelent az, hogy gyakran éltek az inkubációs idő meghosszabbításának lehetőségével is?*

Környezeti minták tenyésztésen alapuló mikrobiológiai diverzitás vizsgálata során általános célként fogalmazható meg, hogy a vizsgált élőhelyen előforduló baktériumoknak minél szélesebb körét próbáljuk meg kitenyészteni. A sikeres tenyésztéséhez energiaforrás, megfelelő típusú, mennyiségű és arányú tápanyagok és kedvező fizikai-kémiai körülmények egyidejű biztosítása szükséges. Bármely természetes mikrokörnyezetben az együtt élő mikrobapopulációk azonban jelentősen különbözhetnek egymástól az általuk igényelt és a

rendelkezésükre álló erőforrások tekintetében, ezért tenyésztéses vizsgálatok során az élőhelyre jellemző körülményeket imitáló tápközegek összeállítása sokszor rendkívül nehéz feladat. Ehhez járul hozzá, hogy a mikroorganizmusok természetes élőhelyükön gyakran a különböző környezeti tényezők gradiensei mentén kialakuló specifikus nicheket foglalják el, aminek megteremtése laboratóriumi körülmények között szintén nagy kihívás elé állíthatja a kutatókat, különösen extrémofilek/poliextrémofilek tenyésztésekor. Mindebből következik, hogy laboratóriumi tenyésztéskor (az egyes taxonokra jellemző generációs időn túl) a felkínált tápanyagok és környezeti feltételek is jelentősen korlátozhatják a baktériumok szaporodóképességét és szaporodási sebességét. A „Nagy Telepszám Anomália”-ként leírt jelenség (Staley és Konopka 1985) is arra mutat rá, hogy akár több nagyságrendnyi különbség is lehet a laboratóriumi táptalajon kifejlődő telepek száma és a természetes környezetben jelen lévő prokarióta sejtek száma között. A tiszta tenyészetek előállítására alkalmazott hagyományos eljárások során a gyors növekedésre képes, ún. „r”-stratégista baktériumfajok gyakran túlnövik és kiszoríthatják a természetben akár nagy számban előforduló, de lassúbb növekedésre képes ún. „K”-stratégistákat. A hagyományos tenyésztési módszerek ezáltal nem tükrözik vissza a tényleges mikrobiális közösségi összetételt (Amann és mtsai 1995).

Napjainkban a klasszikus technikák továbbfejlesztése új lehetőséget teremt korábban még tenyésztésbe nem volt mikroorganizmusok detektálására. Ezek közé tartozik pl. a viszonylag alacsony tápanyag koncentrációjú közegek alkalmazása, a tenyésztéshez használt inkubációs idő megnövelése, ismert szignál molekuláknak a tápközeghez való hozzáadása a baktériumok közötti kommunikáció elősegítéséhez, szilárd táptalajokban gellángumi alkalmazása az agar helyett (Alain és Querellou 2009; Vester és mtsai 2015; Schultz és mtsai 2023). Vizsgálataink során mi a tenyésztési idő meghosszabbítását különösen az Andokból származó permafroszt minták esetében alkalmaztuk, ami a környezeti mikrobiológiában gyakran alkalmazott 1 hetes inkubáción túl további néhány héttel megnövelt inkubációs időt jelentett. Yang és mtsai (2023) is beszámoltak arról, hogy a tenyésztéshez használt eltérő hosszúságú, akár 1-2 hónaposra meghosszabbított inkubációs idő alkalmazása sikeresnek bizonyult a telepképződés diverzitásának növeléséhez és változatosabb izolátumok kinyeréséhez permafroszt talajmintákból.

#### *4. Az anaerob tenyésztés mellőzésének volt-e speciális oka?*

Természetes vizes környezetekben (elsősorban tavi és tengeri üledékekben) és akár teresztrikus élőhelyeken is (a talajok szerkezetétől és víztartalmától függően) gyakran alakulnak ki anoxikus mikrohabitatok elsősorban az oxigén relatív rossz vízoldékonysága és korlátozott mértékű diffúziója miatt. Az oxigénhiány létrejöttében fontos szerepet játszhatnak az üledékekben és talajokban felhalmozódott szerves anyagok intenzív aerob lebontásában résztvevő mikroorganizmusok is fokozott oxigénigényük és felhasználásuk révén. Anoxikus körülmények között a nagy molekulású szerves anyagok lebontása általában különböző anyagcsereképessegekkel rendelkező prokarióták több lépésben lejátszódó, egymással összefüggő katabolikus láncolatként valósul meg (Madigan és mtsai 2021).

Az anoxikus környezetek mikrobiális diverzitásának feltárását célzó különböző szekvenáláson alapuló eredmények a legtöbb esetben még tenyésztésbe nem vont (ún. “unculturable”) taxonokkal mutatnak legnagyobb fokú szekvencia egyezést. Ez ráirányítja a figyelmet arra, hogy az omikai éra sem nélkülözheti a modern tenyésztéses eljárásokat az anaerobok esetében sem (Börner 2016). Az obligát anaerob baktériumok tenyésztésére különféle technikák állnak

rendelkezésünkre. Ezek közül napjainkban is az anaerob munkaállomások használata biztosítja a legtöbb lehetőséget, a minta oxigénmentes környezetben történő feldolgozásától kezdve, az anaerob tenyésztésen és izoláláson keresztül különféle kísérletek (pl. mennyiségi meghatározások, enzimaktivitás mérések, egysejt manipulációk) elvégzéséig. Az ELTE Mikrobiológiai Tanszékén rendelkezésre álló Thermo Scientific anaerob munkaállomás (Forma 1029) segítségével a 2000-es évek elején végeztünk tenyésztéses vizsgálatokat a Velencei-tó egészséges és pusztuló nádasállományának rizoszférájában és a tavi üledékben zajló anaerob lebontási folyamatokban résztvevő, fermentáló *Clostridium* és respiratorikus anyagcserét folytató szulfátredukáló baktériumfajok diverzitásának feltárására (Vladár és mtsai 2008). Ezeknek a kutatásoknak az eredményeiről habilitációs értekezésemben számoltam be. Az MTA doktori értekezésemben bemutatott kutatások során azonban döntően aerob/mikroaerofil környezetekből történtek a mintavételezések, és az anaerob tenyésztéshez szükséges technikai feltételek sem álltak folyamatosan a rendelkezésünkre, ezért nem végeztünk ilyen jellegű vizsgálatokat.

*5. A humán kórokozók esetében ismert az "élő, de nem tenyészthető" (VBNC) létezési fázis. Hogyan alkalmazható ez a fogalom az extremofilek esetében? A „normofilek” számára kedvező körülmények között az extremofilek VBNC változatnak tűnhetnek. Mennyiben adaptálhatók az mRNS kimutatási módszerek az extremofilek életfunkciójának vizsgálatára környezeti mintákból?*

Az utóbbi évtizedekben több száz publikáció foglalkozott a Colwell és mtsai (1985) által bevezetett ún. "életképes, de nem tenyészthető" (VBNC; viable but non-culturable) állapotnak nevezett jelenséggel. A VBNC állapot legfontosabb jellemzője, hogy a baktériumsejtek ugyan életben vannak és képesek arra, hogy megújítsák anyagcseréjüket, de nem képesek növekedni a rutinszerűen alkalmazott laboratóriumi táptalajokon. Számos kutatás igazolta, hogy patogén és nem patogén baktériumok sokasága kerülhet VBNC állapotba. A természetes környezetekben (beleértve az extrém élőhelyeket is) előforduló baktériumok többségéről úgy tartják, hogy VBNC állapotban találhatók. Ennek oka, hogy gyakran számos stresszt kiváltó környezeti tényezővel (pl. oligotróf állapottal, extrém hőmérséklettel, nagy ozmotikus nyomással, erős UV sugárzással, oxidatív stresszel) kell egyidejűleg megbirkóznuk, és túlélésük érdekében genotípusukat és fenotípusukat is ezeknek a kedvezőtlen körülményeknek a leküzdéséhez kell igazítaniuk, ami VBNC állapot kialakulását eredményezheti (Su és mtsai 2013). A valódi extremofilek esetében a „normofilek”-nek kedvező körülmények, vagyis a számukra optimális környezeti feltételektől való jelentős eltérések így VBNC állapotot előidéző tényezők lehetnek.

A nem tenyészthető, „mikrobiális sötét anyag”-nak (microbial dark matter) is nevezett prokarióta életközösségek jelenlétéről főként az utóbbi évtizedek tenyésztéstől független, DNS alapú új generációs szekvenálási módszerekkel (pl. a kis-alegységi 16S rRNS gén amplikon szekvenálásával vagy a közösségek teljes genomjának metagenomikai elemzésével) végzett kutatások révén szereztünk tudomást (Rinke és mtsai 2013; Bernard és mtsai 2018; Schultz és mtsai 2023). A metagenomikai módszerek előnye, hogy a környezeti DNS közvetlen vizsgálatával a nem tenyészthető mikroorganizmusok genomszekvenciái is meghatározhatók, így részletes információ nyerhető az adott élőhelyre jellemző mikrobióta összetételéről, annak térbeli és időbeli változásáról. A környezeti genomika ezáltal nem csupán új mikrobiális törzsek (phylumok), hanem új géncsaládok, új CRISPR-Cas rendszerek és szokatlan génformák feltárását is lehetővé tette (Bernard és mtsai 2018). A metagenomikai

módszerek hátránya ugyanakkor, hogy nem alkalmasak a különböző taxonokba sorolt szervezetek aktivitásának meghatározására. A szintén NGS módszerek felhasználásával végezhető, és a közösségi RNS vizsgálatán alapuló metatranszkriptomika ugyanakkor megfelelő lehet a mikrobiális gének expressziós állapotának, a mikrobiális közösségek aktivitásának és funkcióinak kimutatására, valamint új géneknek és szabályozó elemeknek a detektálására.

A transzkriptomikai/metatranszkriptomikai módszerek használata napjainkban azonban még nem terjedt el általánosan az extremofilek életfunkciójának vizsgálatára, de találhatunk rá érdekes példákat. Az *Egicoccus halophilus* EGI 80432<sup>T</sup> haloalkalitoleráns baktériumfaj alkalikus környezethez való adaptációs mechanizmusát Chen és mtsai (2021) vizsgálták transzkriptomikai elemzéssel. Eredményeik azt mutatták, hogy szélsőségesen alkalikus körülmények között a glikolízisben, a TCA-ciklusban, a keményítő- és a trehaló-anyagcserében szerepet játszó transzkriptumok felülszabályozódtak. A kutatók azt is megállapították, hogy az *E. halophilus* baktérium az alkalikus környezeti feltételekhez történő adaptációja során az ún. "savas metabolitok termelésének" stratégiáját alkalmazza, vagyis fokozza a savas és semleges metabolitok (azaz az acetát piruvát, formiát, glutamát, treonin és ektoin) termeléséért felelős gének expresszióját, míg csökkenti a kation/proton antiporter és az ATP-szintáz génekét. Gelsinger és mtsai (2020) az Atacama-sivatagban található halitgömbökben (sóközetekben) élő extremofil mikrobiális közösségben expresszáldó nem-kódoló, kis RNS-ek (sRNS) dinamikáját tanulmányozták metatranszkriptomikai módszerekkel. Prokariótákban ezek az 50-500 nukleotid méretű sRNS-ek a metabolikus funkciókkal és a stressz válaszokkal kapcsolatos génszabályozásban vesznek részt, RNS-RNS közvetített interakciókon keresztül. Egyik típusuk a transz-kódolt sRNS-ek, más néven intergenikus sRNS-ek (itsRNS), melyek mRNS-célpontjaikat tökéletlen bázispárosodáson keresztül kötik meg, és többféle gént (beleértve a kulcsfontosságú transzkripciós faktorokat és szabályozókat) is képesek célba venni. Az itsRNS-ek a riboszóma-kötőhellyel (RBS) való kölcsönhatás és/vagy az mRNS-stabilitás modulálása révén aktiválhatják vagy gátolhatják a transláció megindulását. A cisz-kódolt antiszensz RNS-ek (asRNS-ek) ezzel szemben a célgénnel ellentétes DNS-szálon íródnak át, és így extenzív bázispárosodáson keresztül képesek hatni (kimutatták, hogy elnyomják a transzpozonokat és a toxikus fehérjeszintézist). A kutatók a vizsgált extrém környezetből több száz intergenikus (itsRNS) és antiszensz (asRNS) sRNS kifejeződését mutatták ki. Bizonyított célpont-előrejelzést végeztek és korreláltatták az expressziós szinteket az itsRNS-ek és a feltételezett cél mRNS-ek között. Igazolták, hogy a feltételezett mRNS-célpontok működésére hatással voltak a halitközségek tagjainak környezeti kihívásai, beleértve a nagy esőzésekhez történő ozmotikus alkalmazkodást és a tápanyagokért folytatott versenyt.

*6. Az élelmiszer tartósításban és a bőrparban alkalmazott magas sókoncentráció a kívánt tartósító hatás mellett kedvez a halofil mikrobák túlélésének, esetleg szaporodásának is. Mennyiben befolyásolhatja ez hátrányosan a termékek minőségét?*

A tartósításra alkalmazott módszerek elsődleges célja az, hogy az élelmiszerekben és alapanyagaikban jelenlévő mikroorganizmusok szaporodását reverzibilisen vagy irreverzibilisen gátolja. A sózás élelmiszer tartósító hatása a vízaktivitás ( $a_w$ ), vagyis a mikroorganizmusok számára szabadon hozzáférhető víz mennyiségének csökkentésén alapul, a víz kémiai megkötése révén. Sózás révén a mikrobajelemben lévő vízelvonás az enzimek csökkent hidratáltságát, konformációjának megváltozását és ezáltal katalitikus

aktivitásának gátlását eredményezi. Az élelmiszerekkel terjedő kórokozók (pl. *Salmonella enterica*, *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio cholerae*, *Campylobacter jejuni*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum* és *Clostridium perfringens*) nem halofil baktériumok, ezért a szaporodásukhoz szükséges minimális vízaktivitás érték általában magas ( $a_w \geq 0,91$ ). Ezzel szemben a halofilek vízaktivitás-tűrése 0,75  $a_w$ -ig terjed. A mikroorganizmusok vízigényét és életfolyamatait azonban egyéb belső és külső tényezők (pl. hőmérséklet, pH, redoxpotenciál, kémiai tartósítószer) is befolyásolják. A mikroorganizmusok minimális vízaktivitás-igényét figyelembe véve az élelmiszerek biztonságos eltarthatósága csak  $\leq 0,7 a_w$  értéknél várható. Ilyen vízaktivitásoknál csak néhány xerotróf-xerofil gomba rendkívül lassú szaporodásával kell számolnunk, de ezek a mikroorganizmusok az élelmiszerekben csak ritkán fordulnak elő (Sperber 1983; Deák és mtsai 2006; Beuchat és mtsai 2013).

Az extrém halofil Halobacteriaceae családba tartozó ősbaktériumok ugyanakkor részt vehetnek a sózással tartósított tengeri halak „bíbor” vagy „vöröses” állapotként ismert minőségromlásában. A tengeri sóban, sós páclében és sózott haltermékekben megfigyelhető bíborszínű nyálka kialakulásáért és a romlással általában összefüggésbe hozható szagok és ízek (kénhidrogén és indol) kialakulásáért elsősorban a *Halococcus* és a *Halobacterium* nemzetség tagjai a felelősek. Felix és mtsai (2016) sózással érlelt szardellatermékekben vizsgálták *Halococcus* spp. jelenlétét és aktivitását az érlelési folyamat során. Eredményeik alapján a halofil mikrobák aktivitását egyértelműen összefüggésbe hozták a folyamat során a termékekben észlelt fizikai-kémiai változásokkal és minőségromlással.

7. Az extrém körülményekhez történő alkalmazkodásban jelentős szerepe van a quorum-sensing mechanizmusoknak. Milyen főbb quorum-sensing módok jellemzőek az extremofilekre?

A prokariótákban számos fiziológiai aktivitás (pl. biolumineszcencia, horizontális géntranszfer, virulencia, mozgásképeség, biofilm képződés, antibiotikumok és másodlagos anyagcseretermékek szintézise) áll quorum-sensing (QS) szabályozás alatt. A QS olyan molekuláris kommunikációs mechanizmus, melynek révén számos mikroorganizmus képes populáció-sűrűségtől függő jelátvitel révén génexpressziós mintázatának szabályozására. Az extrém környezetekben végbemenő molekuláris kommunikációs rendszerek azonban még nagyrészt ismeretlenek, de a témával foglalkozó kutatók úgy vélik, hogy az extremofilek QS szabályozása valószínűleg a szélsőséges körülményekhez történő adaptációs mechanizmusokban és a különféle túlélési stratégiákban játszhat kulcsszerepet (Montgomery és mtsai 2013; Abbamondi és mtsai 2019; Kaur és mtsai 2019).

A QS szignálmolekuláknak három fő típusa ismert, és mindhárom kimutatták extremofilekből is. Az autoinduktor-1 (AI-1) típus acil-homoszerin-lakton (AHL) kémiai szerkezetű szignálmolekulája elsősorban Gram-negatív sejtfalszerkezetű baktériumokból ismert, de azonosították cianobaktériumokból és archaeákból is. Az AHL-eket a LuxI (AI-1-szintáz) vagy homológjai termelik, e szignálok receptora pedig a LuxR (AI-1-receptor) vagy homológjai (citoplazmatikus transzkripció faktorok). A szignálmolekulák második típusába a Gram-pozitív baktériumok kommunikációjában résztvevő autoinduktor peptidek (AIP) tartoznak. Ezek a lineáris vagy ciklikus AIP-k inaktív pro-peptidekként szintetizálódnak, és az ABC transzporterek vagy más szekréciós mechanizmusok segítségével végbemenő export során jutnak ki a baktériumsejtekből és válnak aktív peptidekké. Ezeket a peptid szignálokat

általában egy kétkomponensű rendszer továbbítja a sejtbe, melyben a peptid kötődése a hisztidin-kináz receptorhoz annak autofoszforilációs aktivitását váltja ki, ami egy citoplazmatikus konzervatív hisztidin-maradék ATP-hajtott foszforilációját eredményezi. Ez a foszfátcsoport a továbbiakban átkerül a kapcsolódó válaszsabályozó konzervatív aszpartát-maradékára, amely így aktív DNS-kötő transzkripciós faktorrá válik. A peptid szignálok extracelluláris proteázok hasításával aktiválódnak. Ily módon alternatívaként az AIP-k visszashállíthatnak a sejtbe, miután a citoplazmatikus transzkripciós faktorok érzékelik a környezetükben lévő AIP-k küszöbértékét. Mind az első acilált homoszerin-lakton típusú, mind pedig a második autoinduktor peptid típusú QS rendszer fajspecifikus szabályozó mechanizmus. A baktériumok harmadik típusú QS szignálja egy furanozil-borát-diészter kémiai szerkezetű autoinduktor (AI-2). Ennek a Gram-pozitív és Gram-negatív baktériumokban is termelődő molekulának a szintézisében a LuxS enzim vesz részt, ami fontos szerepet játszik az aktivált metilciklusban az S-adenozil-L-metionin (SAM) előállításában, ami a sejtek fő metilcsoport-donoraként működik. Az AI-2 szignálmolekulák receptorai a LuxP, az LsrB vagy az RbsB periplazmatikus proteinek. Az AI-2 mind a fajok közötti, mind a fajon belüli kommunikációban szerepet játszik (Kaur és mtsai 2019).

Az extrémofilek közül termofilekből AIP (*Methanococcus jannashii*, *Geobacillus stearothermophilus*) és AI-2 (*Thermotoga maritima*, *Pyrococcus furiosus*, *Thermus thermophilus*), pszichrofilekből főként AI-1 (*Pectobacterium atrosepticum*, *Pseudomonas* spp., *Alivibrio logei*) és egyéb (di-keto-piperazinok, DKP; *Pseudalteromonas haloplanktis*), acidofilekből AI-1 (*Acidithiobacillus* sp., *Ferrovum* sp., *Leptospirillum ferrooxidans*) és AI-2 (*Helicobacter pylori*), alkalofilekből AI-1 (*Natronococcus occultus*) és ismeretlen (*Alkalibacterium pelagium*), piezofilekből és sugárrezisztensekből AI-1 (*Photobacterium profundum*, *Deinococcus radiodurans*) és AI-2 (*Shewanella piezotolerans*, *Deinococcus radiodurans*) típusú QS szignálokot mutattak ki (Kaur és mtsai 2019).

8. A biofilm társulási mód fontos része az extrémofil mikrobák közösségi létének. Az emberi mikrobióta és a humán kórokozók esetében a biofilmek képződésében fontos szerepe van a bakteriális amiloidoknak (pl. *curlin* és *Sef17* fimbriák), amelyeknek a humán neurodegenerációs betegségek kialakulásában jelentős funkciót tulajdonítanak. A „cross-seeding” jelenségét leírták vegyes baktériumpopulációk és baktérium-ember bioközösség vonatkozásában is. Amiloidokat extrémofilek is képeznek. Vannak-e adatok ezeknek az amiloidoknak az extrémofilek biofilm képzésében, továbbá az állati vagy emberi szervezetben lejátszódó kóros folyamatokban játszott esetleges szerepére vonatkozóan?

A prokarióták általános létezési formájának a biofilmként ismert, extracelluláris polimer mátrixba ágyazott, szervezett közösség szerkezet tekinthető. Az utóbbi években széleskörben kutatott téma az egyes biofilm képzésben is résztvevő baktériumok (pl. *E. coli*, *Salmonella typhimurium*) sejt felszínén megjelenő funkcionális amiloidok (pl. adhéziós *curlin* fimbriák) humán fertőzésekben játszott szerepe. Az amiloidok rendkívül stabil, béta-redőzött rétegek összerendeződésével kialakuló fehérjék vagy peptidpolimerek, melyek a biofilmek extracelluláris polimer mátrixában töltenek be vázszerkezeti és sejtrögzítő funkciót (Fowler és mtsai 2007; Erskine és mtsai 2018).

Extrémofilek által termelt amiloidokkal kapcsolatban eddig még kevés információval rendelkezünk. A *Sulfolobus solfataricus* hipertermofil ösbaktériummal végzett in vitro vizsgálatok arra utaltak, hogy acilfoszfátáz enzime képes amiloidszerű aggregátumokat

képezni közvetlenül az aktív fehérje konformációjából pH 5,5-nél, 15-25% 2,2,2-trifluoretanol jelenlétében (Bemporad és Chiti 2009). Egy másik kutatás kimutatta, hogy az extrém halofil *Haloferax volcanii* biofilmek extracelluláris mátrixában található komponensek meg tudják kötni a Congo red és a Thioflavin T (ThT) amiloid festékeket, ami arra utal, hogy létezhetnek amiloidok ősbaktérium biofilmekben is (Chimileski és mtsai 2014). Egy *Methanosaeta thermophila* extrémofil metanogénnel végzett kutatás feltárta, hogy az ősbaktérium sejtfalát képező fő burokfehérje (MspA) amiloid szerkezetű. Ez a szerkezet magyarázza a sejtburók nagy ellenállóképességét és rugalmas tulajdonságait, amelyek lehetővé teszik, hogy a diffuzibilis szubsztrátumok a kitáguló peremhatárokon keresztül áthatoljanak a burkon (Dueholm és mtsai 2015). Az amiloidoknak az extrémofilek biofilm képzésében játszott in vivo szerepe azonban még nem vagy alig ismert, erre vonatkozóan sajnos nem találtam publikációkat.

9. Milyen konkrét lehetőségeket lát az extremolitok felhasználására a humán gyógyászat és betegségmegelőzés területén?

A szélsőséges körülmények között élő extremofilek/poliextremofilek a környezeti adaptációjuk során számos különböző extrémofil enzimet (extremozimot) és ozmotikusan aktív, kis molekulású szerves vegyületet (extremolitot) szintetizálnak (Raddadi és mtsai 2015). Ezek a kompatibilis oldott anyagoknak (vagy kémiai chaperonoknak) is nevezett extremolitok a biológiai makromolekuláknak egyszerre többféle környezeti stresszhatástól való védelmére is képesek lehetnek. Kémiai szerkezetüket tekintve az extremolitok főként cukrok, polioloak, heterozidok, aminosavak és származékaik. Kiváló példák erre az ektoin, a hidroxiektoin, a prolin, a mannit, a glicin-betain és a halofilekben gyakran előforduló trehalóz. A hipertermofilek gyakran tartalmazznak heterozidokat (pl. glükózil-glicerint (GG, glikin), glükózil-glicerátot (GGA), mannozil-glicerátot (MG, firoin) és mannozil-glicerinamidot (MGA, firoin-A)). Ezenkívül extremofilekben széles körben elterjedtek a foszforilált vegyületek is (pl. a di-mio-inozitol-1,1-foszfát (DMIP), a diglicerin-foszfát (DGP) és a ciklikus difoszfoglicerát (cDPG)). Sugárrezisztens baktériumokból izoláltak olyan összetett kémiai természetű UV-fényt elnyelő vegyületeket, mint a szitonemint, a bakterioruberint és a melanint, valamint mikosporinszerű aminosavakat (Lentzen és Schwarz 2006; Babu és mtsai 2015; Becker és Wittmann 2020).

Napjainkban az ipari, biotechnológiai és gyógyászati célú felhasználást tekintve az extremolitok között kétségkívül az ektoin a „zászlóshajó” (Lentzen és Schwarz 2006). Az ektoin egy ikerionos aminosav-származék ((4S)-2-metil-1,4,5,6-tetrahidro-pirimidin-4-karboxilsav), ami kozmotróp tulajdonsággal rendelkezik, egyszerre 7-9 vízmolekulával képes koordinációs kötést kialakítani, így a védelemre szoruló fehérjék körül nagy vízburok szerveződik, amit ektoin-hidrokomplexnek neveznek (Bethlehem és van Echten-Deckert 2021). Az ektoin ezáltal képes megóvni a fehérjék térszerkezetének módosulását pl. az emberi hámszövetekben allergének jelenlétében, UV-sugárzás, hőhatás és kiszáradás esetén, ezért gyakran alkalmazzák különféle kozmetikumok (pl. bőr- és hajápolási termékek) összetevőjeként. Az ektoin megtalálható egyes vény nélkül kapható gyógyászati termékekben, pl. orrspraykben és inhalációs folyadékokban is. Az ektoin esetében kísérletesen igazolták, hogy a kettős szálú DNS olvadási hőmérsékletét is csökkenti, mivel az ikerionos oldott anyag nagy koncentrációja megnöveli az oldat dielektromos állandóját, és ezáltal csökkenti az ionos kölcsönhatásokat. Az ektoin emellett növeli a DNS-polimerázok hőstabilitását magas



hőmérsékleten, ezért felhasználható a primer extenzió, a szekvenálás és a polimeráz láncreakciók hatékonyságának javítására is (Lentzen és Schwarz 2006).

Az extremolitikok hatása azonban nemcsak a fehérjék és más makromolekulák stabilizálásában érhető tetten, hanem az egész sejt stresszfaktorokkal szembeni védelmére kiterjedő ún. citoprotektív hatásban is. Az ektoin képes serkenti a hősokk fehérjék expresszióját, miközben gátolja a gyulladáshoz vezető citokineket. A hősokk fehérjék képesek blokkolni a gyulladáshoz vezető felelős nukleáris faktor kappas B-t (NF- $\kappa$ B), így ektoin jelenlétében a sejtekben nem alakul ki gyulladás. Ektoinnal előkezelt humán hámsejtekben az UV-A sugárzással szembeni védelem a keratinocita sejtmembránjának modulációján keresztül érvényesül, mivel ezekben a sejtekben csökken a ceramidok felszabadulása a szfingomielinből. Ez a gyulladáshoz vezető citokinek (pl. ICAM-1) felszabadulásának és az UV-A sugárzás által indukált fokozott bőroregedésben szerepet játszó folyamatoknak a gátlásához vezet (Lentzen és Schwarz 2006).

Az ektoin a neurodegeneratív betegségek (pl. az Alzheimer-kór; AD) kezelésében is szerepet kaphat. Az Alzheimer-kórban az extracelluláris, aggregálódott amiloid- $\beta$  peptideket (A $\beta$ ) és az intracelluláris, hiperfoszforilált tau fehérjét tekintik a betegség fő előidézőjének és a kezeléseket egyik lehetséges célpontjának. Egy vizsgálatban, amely az inzulin-amiloid in vitro képződését használta modellrendszerként, kimutatták, hogy az ektoin nagyon hatékony inhibitora volt az amiloid képződésnek, mind a kezdeti, mind az elongációs fázisban. Egy nemrég megjelent tanulmányban Shin és mtsai (2021) egy hiperszalin környezetből izolált *Nocardiosis* sp. (Actinobacteria) által termelt kis molekulású szerves anyag, a borrelidin hatását vizsgálták. Ez a korábban rák-ellenes és antibakteriális hatású leírt bioaktív vegyület, in vitro körülmények között képes volt az A $\beta$  és a tau fibrillumok aggregációját megakadályozni és a már kialakult toxikus aggregátumok disszociációját elősegíteni. Hatásmechanizmusa alapján tehát a borrelidin mind preventív, mind pedig terápiás alkalmazás szempontjából ígéretes hatóanyag-jelöltnek tekinthető az Alzheimer-kór kezelésében.

*10. Az extremofilek által termelt, biotechnológiában hasznosítható molekulák mennyiben termeltethetők meg stabilan olyan mesterségesen előállított baktérium konstrukciókkal, amelyek szokványos laboratóriumi körülmények között szaporodnak? Milyen példák vannak erre vonatkozóan?*

Az extremolitikok nagymértékű felhalmozódása (mennyiségük a sejtek száraz tömegének akár 25%-a is lehet) lehetővé teszi a nagyüzemi termelésre alkalmas biotechnológiai eljárások kifejlesztését. Ennek a megoldásnak az előfeltétele, hogy a megfelelő mikroorganizmusokat ipari fermentorokban és nagy sejtsűrűségben, nem szokványos körülmények között, pl. >10% (w/v) NaCl koncentrációnál és/vagy magas hőmérsékleten lehessen tenyészteni. Alternatív megoldásként az extremolitikokat rekombináns gazdaszervezetekben, pl. *E. coli*-ban vagy élesztőgombában is elő lehet állítani. Ehhez az szükséges, hogy rendelkezésünkre álljanak a szintetikus útvonal génjei a klónozáshoz és a megfelelő rekombináns szervezet létrehozásához (Lentzen és Schwarz 2006).

Az extremolitikok előállítására talán legjobb példaként az ektoin ipari méretű termeltetése említhető. Az ektoint először az *Ectothiorhodospira halochloris* extrém halofil fototróf baktériumból izolálták. Ipari felhasználásra ma már a *Halomonas elongata* mérsékelt halofil baktériummal termeltetik. A „bakteriális fejés”-nek (bacterial milking) nevezett módszert a Bitop német cég fejlesztette ki az ektoin előállítására. Ebben az eljárásban az

ektoin termelő *H. elongata* baktériumot először egy nagy sótartalmú (15-20% NaCl) tápközegben tenyésztik, majd az intracellulárisan felhalmozódott ektoint egy ozmotikus „down-shock” (hirtelen sókoncentráció csökkentés) alkalmazásával szabadítják fel, ami a baktériumsejt belső membránjában lévő mechanoszenzitív csatornák megnyílásához köthető. A biomasszát ezután visszavezetik a fermentorba a következő fermentációs körhöz, míg a termékoldatot szűréssel, elektrodiálízissal, kromatográfiával, bepárlással és kristályosítással megtisztítják (Lentzen és Schwarz 2006). Az ektoin molekula túltermeltetése ma már alacsony sókoncentráció mellett is megvalósítható a termelésért felelős gének erősítésével. Ez a módszer csökkenti az előállítás költségeit, mivel egyrészt a kisebb sókoncentrációjú tápoldatok alkalmazása mérsékli a fermentorokban a korrozív hatást, másfelől kisebb kihívást jelent a későbbiekben a szennyvíztisztítás szempontjából is (Liu és mtsai 2021). Az ektoin fermentorban történő előállításának a költségigénye a relatíve nagy időigény miatt azonban még mindig magas, ezért a kutatók géntechnológiai módszerek alkalmazásával is próbálkoztak. Chen és mtsai (2020) sikeresen létrehoztak egy olyan génmódosított *E. coli* tenyészetet, mely alkalmas volt az ektoin heterológ előállítására. Ehhez először a *H. elongata* *ectABC* génjeit klónozással bevitték az *E. coli* MG1655 sejtjébe, hogy nagy ozmolaritás nélkül tudjanak ektoint előállítani. Ezt követően a *lysA* gént kiütötték, hogy gyengítsék a kompetitív L-lizin bioszintézis útját, és tovább optimalizálták az ektoin biokonverzióját.

Végül még egyszer szeretnék köszönetet mondani bírálómnak opponensi munkájáért és kérem válaszaim elfogadását.

Budapest, 2023. augusztus 30.



Borsodi Andrea

### Hivatkozások jegyzéke

- Abbamondi GR, Kambourova M, Poli A, et al (2019) Quorum sensing in extremophiles. In: Quorum Sensing. Elsevier, pp 97–123
- Alain K, Querellou J (2009) Cultivating the uncultured: limits, advances and future challenges. *Extremophiles* 13:583–594. <https://doi.org/10.1007/s00792-009-0261-3>
- Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH, et al (1995) Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev* 59:143–169
- Babu P, Chandel AK, Singh O V. (2015) Therapeutic implications of extremophiles. pp 25–35
- Barcs I (2009) A mikrobiológiai mintavétel szabályai. Semmelweis Egyetem Egészségtudományi Kar Népegészségtani Intézet, Budapest
- Becker J, Wittmann C (2020) Microbial production of extremolytes — high-value active ingredients for nutrition, health care, and well-being. *Curr Opin Biotechnol* 65:118–128. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2020.02.010>
- Bemporad F, Chiti F (2009) “Native-like aggregation” of the acylphosphatase from *Sulfolobus solfataricus* and its biological implications. *FEBS Lett* 583:2630–2638. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.07.013>
- Bernard G, Pathmanathan JS, Lannes R, et al (2018) Microbial dark matter investigations: How microbial studies transform biological knowledge and empirically sketch a logic of scientific discovery. *Genome Biol Evol* 10:707–715. <https://doi.org/10.1093/gbe/evy031>
- Bethlehem L, van Echten-Deckert G (2021) Ectoines as novel anti-inflammatory and tissue protective lead compounds with special focus on inflammatory bowel disease and lung inflammation. *Pharmacol Res* 164:105389. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.105389>
- Beuchat LR, Komitopoulou E, Beckers H, et al (2013) Low-water activity foods: Increased concern as vehicles of foodborne pathogens. *J Food Prot* 76:150–172. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-12-211>
- Börner RA (2016) Isolation and cultivation of anaerobes. pp 35–53
- Chen D-D, Ahmad M, Liu Y-H, et al (2021) Transcriptomic responses of haloalkalitolerant bacterium *Egicoccus halophilus* EGI 80432T to highly alkaline stress. *Extremophiles* 25:459–470. <https://doi.org/10.1007/s00792-021-01239-8>
- Chen J, Liu P, Chu X, et al (2020) Metabolic pathway construction and optimization of *Escherichia coli* for high-level ectoine production. *Curr Microbiol* 77:1412–1418. <https://doi.org/10.1007/s00284-020-01888-6>
- Chimileski S, Franklin MJ, Papke RT (2014) Biofilms formed by the archaeon *Haloferax volcanii* exhibit cellular differentiation and social motility, and facilitate horizontal gene transfer. *BMC Biol* 12:65. <https://doi.org/10.1186/s12915-014-0065-5>

- Colwell RR, Brayton PR, Grimes DJ, et al (1985) Viable but non-culturable *Vibrio cholerae* and related pathogens in the environment: Implications for release of genetically engineered microorganisms. *Nat Biotechnol* 3:817–820. <https://doi.org/10.1038/nbt0985-817>
- Deák T, Kiskó G, Maráz A, Mohácsiné Farkas Cs (2006) Élelmiszer-mikrobiológia. Budapest
- Dueholm MS, Larsen P, Finster K, et al (2015) The tubular sheaths encasing *Methanosaeta thermophila* filaments are functional amyloids. *Journal of Biological Chemistry* 290:20590–20600. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.654780>
- Erskine E, MacPhee CE, Stanley-Wall NR (2018) Functional amyloid and other protein fibers in the biofilm matrix. *J Mol Biol* 430:3642–3656. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2018.07.026>
- Felix MM, Czerner M, Ameztoy I, et al (2016) Investigation of *Halococcus morrhuae* in salted-ripened anchovy products. *Int Food Res J* 23:2668–2674
- Fowler DM, Koulov A V., Balch WE, Kelly JW (2007) Functional amyloid – from bacteria to humans. *Trends Biochem Sci* 32:217–224. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2007.03.003>
- Gelsinger DR, Uritskiy G, Reddy R, et al (2020) Regulatory noncoding small RNAs are diverse and abundant in an extremophilic microbial community. *mSystems* 5:. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00584-19>
- Kanapathipillai M, Lentzen G, Sierks M, Park CB (2005) Ectoine and hydroxyectoine inhibit aggregation and neurotoxicity of Alzheimer’s  $\beta$ -amyloid. *FEBS Lett* 579:4775–4780. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.07.057>
- Kaur A, Capalash N, Sharma P (2019) Communication mechanisms in extremophiles: Exploring their existence and industrial applications. *Microbiol Res* 221:15–27. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.01.003>
- Lentzen G, Schwarz T (2006) Extremolytes: natural compounds from extremophiles for versatile applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 72:623–634. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0553-9>
- Liu M, Liu H, Shi M, et al (2021) Microbial production of ectoine and hydroxyectoine as high-value chemicals. *Microb Cell Fact* 20:76. <https://doi.org/10.1186/s12934-021-01567-6>
- Madigan MT, Bender KS, Buckley DH, et al (2021) *Brock Biology of Microorganisms*, 16th edn. Pearson Education, Harlow
- Montgomery K, Charlesworth J, LeBard R, et al (2013) Quorum sensing in extreme environments. *Life* 3:131–148. <https://doi.org/10.3390/life3010131>
- Raddadi N, Cherif A, Daffonchio D, et al (2015) Biotechnological applications of extremophiles, extremozymes and extremolytes. *Appl Microbiol Biotechnol* 99:7907–7913. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6874-9>
- Rinke C, Schwientek P, Sczyrba A, et al (2013) Insights into the phylogeny and coding potential of microbial dark matter. *Nature* 499:431–437. <https://doi.org/10.1038/nature12352>
- Schultz J, Modolon F, Peixoto RS, Rosado AS (2023) Shedding light on the composition of extreme microbial dark matter: alternative approaches for culturing extremophiles. *Front Microbiol* 14:. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1167718>

Shin J, Yang S-H, Du YE, et al (2021) Borrelidin from saltern-derived halophilic *Nocardiosis* sp. dissociates amyloid- $\beta$  and tau fibrils. *J Alzheimers Dis Rep* 5:7–13. <https://doi.org/10.3233/ADR-200247>

Sperber WH (1983) Influence of water activity on foodborne bacteria — A review. *J Food Prot* 46:142–150. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-46.2.142>

Staley JT, Konopka A (1985) Measurement of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. *Annu Rev Microbiol* 39:321–346. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.39.100185.001541>

Su X, Chen X, Hu J, et al (2013) Exploring the potential environmental functions of viable but non-culturable bacteria. *World J Microbiol Biotechnol* 29:2213–2218. <https://doi.org/10.1007/s11274-013-1390-5>

Vester JK, Glaring MA, Stougaard P (2015) Improved cultivation and metagenomics as new tools for bioprospecting in cold environments. *Extremophiles* 19:17–29. <https://doi.org/10.1007/s00792-014-0704-3>

Vladár P, Rusznyák A, Márialigeti K, Borsodi AK (2008) Diversity of sulfate-reducing bacteria inhabiting the rhizosphere of *Phragmites australis* in Lake Velencei (Hungary) revealed by a combined cultivation-based and molecular approach. *Microb Ecol* 56:64–75. <https://doi.org/10.1007/s00248-007-9324-0>

Yang Z, Lian Z, Liu L, et al (2023) Cultivation strategies for prokaryotes from extreme environments. *iMeta*. <https://doi.org/10.1002/imt2.123>