

MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS

Aspergillus fajok stresszválaszainak vizsgálata

Emri Tamás



Debreceni Egyetem, Természettudományi és Technológiai Kar
Biotechnológiai és Mikrobiológiai Tanszék

Debrecen

2019

A dolgozatot anyám emlékének és apámnak, a
Debreceni Egyetem nyugalmazott docensének
ajánlom.

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke.....	5
1. Bevezetés.....	7
2. Irodalmi áttekintés.....	10
2.1 A gombák oxidatív stresszválasza.....	10
2.1.1 Reaktív oxigénformák, antioxidáns rendszerek, oxidatív stressz	10
2.1.2 Az oxidatív stresszválasz fontosabb elemei	13
2.1.3 Az oxidatív stresszválasz szabályozása gombákban.....	15
2.2 <i>Aspergillus</i> fajok szénéhezésre adott stresszválasza	19
2.2.1 Szénstressz, szénforrás éhezés, szénforrás limitáció	19
2.2.2 A szénéhezést kísérő morfológiai változások	20
2.2.3 A szénéhezést kísérő fiziológiai változások	22
2.2.4 A szénéhezésre adott stresszválasz szabályozása.....	24
2.2.5 A szénstressz-válasz gyakorlati jelentősége	26
2.3 Az <i>Aspergillus fumigatus</i> és stresszválaszai	27
2.3.1 Az <i>Aspergillus fumigatus</i> gyakorlati jelentősége	27
2.3.2 Az <i>Aspergillus fumigatus</i> néhány stresszválaszának rövid áttekintése	29
3. Célkitűzések	36
3.1 Az <i>Aspergillus nidulans</i> oxidatív stresszválasza.....	36
3.2 A szénéhezésre adott stresszválasz vizsgálata az <i>Aspergillus nidulans</i> tenyészeiben	36
3.3 Az <i>Aspergillus pachycristatus</i> echinocandin toleranciájának vizsgálata	37
3.4 Az <i>Aspergillus fumigatus</i> stressz toleranciájának vizsgálata	38
4. Anyagok és módszerek.....	40
4.1 Gombatörzsek, törzsfenntartás	40
4.2 Felületi és süllyesztett kultúrák	40
4.3 A stressz indukálása, a stressztűrő képesség tesztelése.....	40
4.4 A növekedés és az életképesség detektálása	41
4.5 A konidiogenezis és a kleisztotéciumok képződésének vizsgálata	42
4.6 Antifungális szerekkel szembeni érzékenység vizsgálata	42
4.7 Növekedést gátló szerek közötti interakció vizsgálata.....	42
4.8 Metabolit koncentrációk mérése	42
4.9 A sejtfal kitin tartalmának mérése.....	43
4.10 Enzimaktivitások detektálása	43
4.13 Enzimek izolálása, jellemzése.....	44
4.14 RNS izolálás.....	45
4.15 Reverz transzkriptáz kvantitatív polimeráz láncreakció (RT-qPCR).....	45
4.16 DNS chip vizsgálatok.....	46
4.17 RNS szekvenálás	47
5. Eredmények és megbeszélésük	48
5.1 Az <i>Aspergillus nidulans</i> oxidatív stresszválasza.....	48
5.1.1 Az oxidatív stressz hatása a transzkriptomra	48
5.1.2 A transzkriptom változásai által megjósolható néhány stresszválasz elem	50
5.1.3 Az <i>atfA</i> géndelécio hatása az <i>A. nidulans</i> oxidatív stresszválaszaira	55
5.1.4 Az oxidatív stressz és az <i>atfA</i> delécio hatása a szekunder anyagcserére	61
5.2 Az <i>Aspergillus nidulans</i> szénéhezésre adott stresszválaszának vizsgálata	64
5.2.1 A szénéhezés hatása a transzkriptomra.....	64
5.2.2 Az <i>EngA</i> β -1,3-endoglükánáz és szerepe a szénéhezésre adott stresszválaszban ...	71
5.2.2.1 Az <i>EngA</i> fehérje és tulajdonságai.....	71
5.2.2.2 A Δ <i>engA</i> törzs és tulajdonságai.....	72
5.2.2.3 Az autolitikus sejtfaldegradáció (ASD) és a konidiogenezis kapcsolata.....	73

5.2.2.4 A sejtfalhidrolázok antifungális hatása.....	75
5.2.2.5 A sejtfalhidrolázok és a melanintermelés kapcsolata	77
5.2.3 A GgtA γ -glutamil transzpeptidáz és jelentősége a szénéhezésre adott stresszválaszban	81
5.2.3.1 A GgtA fehérje és tulajdonságai.....	81
5.2.3.2 A GgtA-t kódoló gén azonosítása, a Δ ggtA törzs és tulajdonságai.....	85
5.3 Az <i>Aspergillus pachycristatus</i> echinocandin toleranciája.....	88
5.4 Az <i>Aspergillus fumigatus</i> stressz toleranciájának vizsgálata	95
5.4.1 Stresszgének előfordulása <i>Aspergillus</i> fajok genomjában	95
5.4.2 Az <i>Aspergillus fumigatus</i> kombinatórikus stresszválasza	106
5.4.2.1 A vaséhezés hatása az <i>A. fumigatus</i> transzkriptomára	107
5.4.2.2 Az oxidatív stressz hatása a vaséhező tenyészetekre	111
5.4.2.2 A stressz hatása az <i>A. fumigatus</i> néhány, terápiás szempontból is fontos géncsoportjára	115
6. Tézisek	117
7. Saját közlemények jegyzéke	119
7.1 A dolgozat alapjául szolgáló (első, vagy utolsó szerzős) publikációk.....	119
7.2 A dolgozatban idézett első, vagy utolsó szerzős publikációk	119
7.3 A dolgozatban idézett további saját publikációk.....	120
8. Köszönetnyilvánítás	122
9. Irodalomjegyzék.....	123
10. Mellékletek.....	153
1. melléklet.....	153
2. melléklet.....	154
3. melléklet.....	156
4. melléklet.....	157
5. melléklet.....	159
6. melléklet.....	165
7. melléklet.....	166
8. melléklet.....	168
9. melléklet.....	171
10. melléklet.....	172
11. melléklet.....	173

Rövidítések jegyzéke

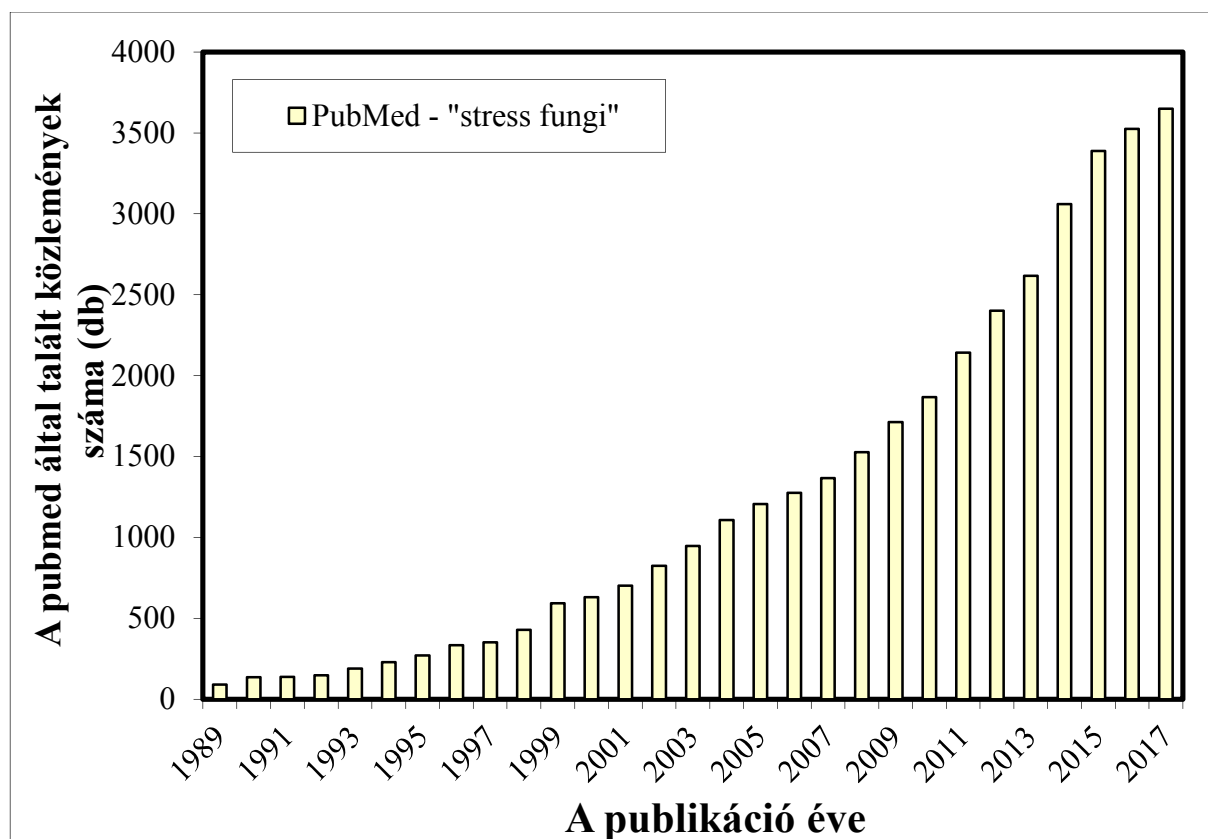
ASD	autolitikus sejtfaldegradáció
CP	a qPCR reakciókban a PCR termék akkumulálódásához szükséges ciklusok száma (crossing point).
CWI	sejtfal integritási (jelátviteli útvonál) (cell wall integrity pathway)
DCM	szárastömeg (dry cell mass)
DHN	1,8-dihidroxinaftalén
DOPA	L-3,4-dihidroxifenilalanin
DUG	A citoszolikus glutation lebontásában közreműködő anyagcsere út <i>Saccharomyces cerevisiae</i> -ben (Deficient in Utilization of Glutathione)
ECB	echinocandin B
ER	endoplazmatikus retikulum
ESR	környezeti stresszválasz (Environmental Stress Response)
FC	egy gén transzkripció változása (fold change) a transzkriptomikai vizsgálatok esetében; leggyakrabban $FC = I_{\text{kezelt}}/I_{\text{kezeletlen}}$, vagy $FC = I_{\text{mutáns}}/I_{\text{kontroll törzs}}$
FGSC	Fungal Genetic Stock Centre (www.fgsc.net)
FPKM	a beazonosított fragmensek száma, osztva a kérdéses gén kbp-ban megadott hosszával és az összes beazonosított fragmens számával (fragments per kilobase per million mapped fragments)
γ GpNA	γ -glutamil- <i>p</i> -nitroanilid (γ GT aktivitásméréshez használt γ -glutamil donor)
γ GT	γ -glutamil transzpeptidáz
GPx	glutation peroxidáz
GR	glutation reduktáz
GSH	(redukált) glutation
GSSG	glutation diszulfid (oxidált glutation)
G6PDH	glükóz-6-foszfát dehidrogenáz
h-H ₂ O ₂	nagy (75 mM) H ₂ O ₂ koncentrációval történő kezelés (high-H ₂ O ₂)
HOG	többek között a hiperozmotikus stresszválaszt szabályozó jelátviteli útvonál (high-osmolarity glycerol signaling pathway)
I	a transzkriptomikai vizsgálatok esetében számolt normalizált jelintenzitás (egy adott gén esetében)
kat	mol/s; 1 s alatt képződött termék, vagy fogyott szubsztrát móljainak a száma
l-H ₂ O ₂	kis (5 mM) H ₂ O ₂ koncentrációval történő kezelés (low-H ₂ O ₂)
MAPK	mitogén aktivált protein kináz

MDS	sokdimenziós skálázás (multidimensional scaling)
MEC	minimális hatásos koncentráció (minimal effective concentration); <i>Aspergillus</i> fajok mikropelletes növekedését indukáló legkisebb (echinocandin) koncentráció
MIC	a legkisebb koncentráció, ami már teljes növekedés gátlást okoz (minimal inhibitory concentration)
MIC _{xx}	a legkisebb koncentráció, ami már xx %-os növekedés gátlást okoz
MSB	menadion nátrium-biszulfit
PKA	protein kináz A
Prx	peroxiredoxin
RIA	reduktív vas asszimilációs útvonal (reductive iron assimilation)
RNI	reaktív nitrogén részecskék (reactive nitrogen intermediates); az angol nyelvű irodalomban szintén használt RNS (reactive nitrogen species) rövidítés a magyarban zavaró lenne.
ROS	reaktív oxigén részecskék (reactive oxygen species)
RT-qPCR	reverztranszkriptáz kvantitatív polimeráz láncreakció
SDS	Na-laurilszulfát (sodium-dodecylsulfate)
SDS-PAGE	Na-laurilszulfátos poliakrilamid gélelektroforézis
SOD	szuperoxid dizmutáz
tBOOH	<i>tert</i> -butil-hidroperoxid
TOR	tápanyagellátottság érzékelésében fontos jelátviteli fehérje/jelátviteli útvonal (target of rapamycin)
Trx	tioeredoxin
TrxR	tioeredoxin reduktáz
UPSR	nem-feltekeredett fehérjék által indukált stresszválasz (unfolded protein stress response)
w/w %	tömegszázalék (weight/weight %)
w/v %	vegyes százalék (weight/volume %)

1. Bevezetés

A stressz, stresszor és stresszválasz fogalmakat több mint 80 évvel ezelőtt a sokak által „az orvosi kutatások Einsteinje”-ként is emlegetett Selye János alkotta meg (Selye 1936, Szabó és munkatársai 2012). Bár a stresszválasz fogalmát kezdetben csak mint „a szervezet aspecifikus neuroendokrin reakciója” („the non-specific neuroendocrine response of the body”) értelemben használták, a stresszel kapcsolatos kutatások hamar általánosan elterjedtek az élettudományok legkülönbözőbb ágaiban, és a stressz fogalma része lett a köznyelvnek is. A stressz kifejezést a mikrobiológusok is rendszeresen használják, bár gyakran eltérő módon értelmezik, definiálják e fogalmat (Hallsworth 2018). A jelen dolgozatban a stresszt a Hohmann és Mager (2003a) által megfogalmazottak alapján fogom használni. Eszerint stressznek tekintjük azokat a külső hatásokat, melyek veszélyeztetik a gombák túlélését, vagy legalábbis megakadályozzák optimális működésüket, csökkentik a fitnesszüket. Stresszválaszon, ennek megfelelően, a gomba stressz által indukált válaszreakcióit értjük, melyek célja a fitnessz csökkenésének megakadályozása, mérséklése. A gombák stresszválaszainak vizsgálatakor tulajdonképpen arra a komplex kérdésre keressük a választ, hogy hogyan alkalmazkodnak a mikroorganizmusok a folyamatosan változó környezetükhöz. E kérdést sokféleképpen közelíthetjük meg. Tanulmányozhatjuk, hogy hogyan érzékelik a gombák a stresszt és a jelátviteli hálózat mely elemeinek közreműködésével mely gének, fehérjék aktivitása változik meg a stresszválasz alatt (molekuláris biológiai megközelítés). Más esetekben a hangsúly annak megértésén van, hogy a stresszválasz keretében szabályozott gének, fehérjék hogyan járulnak hozzá a stressz káros hatásainak elkerüléséhez, a stresszhez való adaptációhoz (élettani megközelítés). A gombák stresszválaszainak kutatása egy izgalmas alapkutatói terület, amely nem az optimális („stresszmentes”) körülmények között vizsgálja a sejtek „normál” működését, hanem viselkedésüknek, a biokémiai és jelátviteli hálózataik szerveződésének lényegét olyan módon próbálja megragadni, hogy kimozdítja a mikrobákat ideális életfeltételeik közül (stressznek teszi ki őket) és megvizsgálja, hogy hogyan reagálnak e változásokra. Ezek a kutatások hozzájárulnak a jelátviteli hálózatok felépítésének és működésének megértéséhez (Yu és munkatársai 2015, Valiante és munkatársai 2015, Hagiwara és munkatársai 2016a, Pardo és munkatársai 2016, Smethurst és Cooper 2016, Atay és Skotheim 2017), segítenek megvilágítani számos gén, fehérje, biokémiai folyamat, sejtservecske élettani jelentőségét (Fountain és munkatársai 2016a, Paegle és munkatársai 2016, Ting és munkatársai 2016, Chernova és munkatársai 2017, Garcia-Neto és munkatársai 2017, Levine és Klionsky 2017), de hozzájárulnak a mikrovilág nagyfokú diverzitása mögötti okok mélyebb megértéséhez is (Katz és Cooper 2015, Berman

2016, Braga és munkatársai 2016, Mattenberger és munkatársai 2016, Ho és munkatársai 2017). Mint minden alapkutatásnak, így a gombák stresszválaszai vizsgálatának is sokféle gyakorlati vonatkozása van. A gombák stressz toleranciája, stresszhez való alkalmazkodó képessége alapvetően meghatározza, hogy milyen élőhelyeken (habitatokban) fordulnak elő és ott milyen anyagcsere folyamatok jellemzik működésüket. Ez az élőhely lehet például egy immunkomprimált beteg szervezete, élelmiszer, takarmány, lakó- és raktárépület, nagy értékű műkincs, vagy akár egy fermentor is. Ezekben az esetekben a vizsgálatok célja lehet annak a megértése, hogy 1) miért képesek bizonyos gombák megjelenni és elszaporodni egy adott élőhelyen, 2) hogyan lehetne gátolni, vagy éppen elősegíteni jelenlétüket akár a környezet tulajdonságainak megváltoztatása, akár az alkalmazkodóképességük célzott megzavarásán keresztül, illetve 3) hogyan lehet számunkra előnyösen befolyásolni biokémiai, élettani folyamataikat beleértve szekunder metabolit termelésüket, vagy antifungális szerekkel szembeni érzékenységüket.



1. ábra A PubMed adatbázis (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>) által a „stress & fungi” kulcsszavakra talált közlemények száma a publikálás éve szerinti megosztásban (Az adatgyűjtés időpontja: 2019. január 14.)

Példaként a humán patogén gombák stresszválaszainak vizsgálata (Abegg és munkatársai 2010, Fréalles és munkatársai 2013, Miyazaki és Kohno 2014, Brandon és munkatársai 2015, Lamoth és munkatársai 2016), a mikotoxinok stresszfüggő termelődésének tanulmányozása

(Hong és munkatársai 2013a, Yin és munkatársai 2013, Montibus és munkatársai 2015) és a szénstresszválasz ipari mikrobiológiai vonatkozásainak vizsgálata (Matsushika és munkatársai 2013, Xiong és munkatársai 2014, van Munster és munkatársai 2014, 2016) említhető meg. Elméleti és gyakorlati jelentőségének köszönhetően a gombák stresszválaszainak vizsgálata iránt a 90-es évektől kezdve folyamatosan nőtt a kutatók érdeklődése (1. ábra).

A jelen dolgozatban az *Aspergillus* fajok stresszválaszainak vizsgálatával kapcsolatos eredményeinket mutatom be. A vizsgálatok túlnyomó többsége az alábbi három gombafajjal kapcsolatos:

- *Aspergillus nidulans*: elsősorban, mint modell organizmus jelentős (Martinelli 1994), de mint humán- (Henriet és munkatársai 2011) és állat patogén faj (Anzai és munkatársai 2000) is ismert.
- *Aspergillus fumigatus*: a legfontosabbnak tartott „nem-*Candida*” humán patogén gomba (Brown és munkatársai 2012, Oren és Paul 2014).
- *Aspergillus pachycristatus*: („*Aspergillus nidulans* var. *roseus*”); echinocandin B termelése miatt ipari jelentőséggel is bíró faj (Cacho és munkatársai 2012, Matsuzawa és munkatársai 2012).

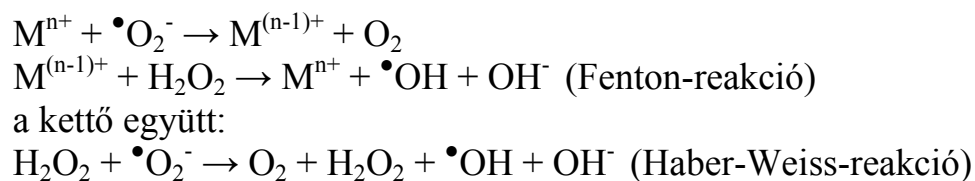
E vizsgálatok az oxidatív stresszel, a szénéhezés és a vashiány okozta stresszel, valamint az echinocandin B által előidézett stresszel foglalkoznak.

2. Irodalmi áttekintés

2.1 A gombák oxidatív stresszválasza

2.1.1 Reaktív oxigénformák, antioxidáns rendszerek, oxidatív stressz

Reaktív oxigénformákon (ROS) az alapállapotú oxigénnél (triplet oxigén) reakcióképesebb oxigén származékokat – szinglet oxigén, szuperoxid anion ($\bullet\text{O}_2^-$), H_2O_2 , szerves peroxidok és hidroperoxidok, hidroxil szabadgyök ($\bullet\text{OH}$), hipoklórossav – értjük (Dickinson és Chang 2011). Képződésük minden aerob élőlényre jellemző. Gombák esetében elsősorban a $\bullet\text{O}_2^-$, H_2O_2 és a $\bullet\text{OH}$ bír nagy biológiai jelentőséggel. A $\bullet\text{O}_2^-$ nagy része a mitokondriális légzési elektrontranszport lánc nem tökéletes működése (az oxigén egy elektronos redukciója) következtében keletkezik, de – többek között – a membránhoz kötött NADPH oxidázok is jelentős mennyiségben állítják elő ezt a ROS-t (Temple és munkatársai 2005, Tan és munkatársai 2009, Dickinson és Chang 2011, Aung-Htut és munkatársai 2012, Rinnerthaler és munkatársai 2012). A H_2O_2 egy része a $\bullet\text{O}_2^-$ szuperoxid dizmutázok (SOD) általi diszproporcionálódásával, vagy a $\bullet\text{O}_2^-$ -hoz hasonlóan a légzési elektrontranszport lánc működése következtében (az oxigén kételektronos redukciója) keletkezik. Jellemzően H_2O_2 képződésével jár a zsírsavak peroxisomális β -oxidációja (zsírsav oxidázok működése) és a fehérjék oxidatív feltekeredése („folding”-ja) (ER specifikus diszulfid izomeráz-tiol oxidáz aktivitás), de H_2O_2 keletkezik, keletkezhet számos más oxidáz, oxigenáz és dehidrogenáz enzim (pl. glükóz oxidáz, glioxál oxidáz, aril alkohol oxidáz, D-aminosav oxidázok, citokróm P450-dependens enzimek) működése következtében is (Lewis 2002, Starkov és munkatársai 2004, Pollegioni és munkatársai 2007, Aung-Htut és munkatársai 2012, Rodrigues és Gomes 2012, Ayer és munkatársai 2014).



2. ábra A Haber-Weiss-reakció

M: redox aktív, átmenetifém (gyakran Fe, vagy Cu)

A reakcióképességét tekintve a legfontosabb ROS, a $\bullet\text{OH}$ elsősorban a Haber-Weiss-reakcióban termelődik átmenetifémek jelenlétében (2. ábra). A fent említett ROS-ok szerves vegyületekkel reagálva számos másodlagos ROS-ká és különféle szabadgyökökké (pl. szerves peroxidok, szerves hidro-peroxidok, peroxil-, alkoxil- és alkil-szabadgyökök) alakulhatnak át (Aung-Htut és munkatársai 2012, Ayer és munkatársai 2014).

E molekulák reakciókészsége és a rájuk jellemző reakciók típusa eltérő ugyan (Dickinson és Chang 2011), de megfelelő koncentrációban mindegyikük súlyosan károsíthatja a kulcsfontosságú makromolekulákat (fehérjék és nukleinsavak), és sejtalkotókat (membránok), ami végső soron a sejtek pusztulásához is elvezethet. Nem meglepő módon számos antioxidáns rendszer védi az aerob élőlényeket a ROS-ok káros hatásaival szemben. Gombákban ezek közül említést érdemelnek a következők:

- A diszproporciót katalizáló, ezért redukáló erőt nem igénylő SOD-ok és katalázok, melyek a $\bullet\text{O}_2^-$ -nal és a H_2O_2 -dal szemben nyújtanak védelmet (Staerck és munkatársai 2017).
- A tioredoxin rendszer enzimeit: peroxiredoxin (Prx), tioredoxin (Trx) és a tioredoxin visszaredukálásához szükséges NADPH-függő enzim a tioredoxin reduktáz (TrxR), melyek elsősorban a peroxidok eliminálásában fontosak (Staerck és munkatársai 2017).
- A glutation (GSH) és a GSH/glutaredoxin rendszer enzimeit, a glutation peroxidáz (GPx), glutaredoxin (Grx) és az oxidálódott glutation (GSSG) visszaredukálásához szükséges, NADPH redukáló erőt használó glutation reduktáz (GR) szintén a peroxidokkal szemben nyújt védelmet (Staerck és munkatársai 2017). A GSH enzimes katalízis nélkül is képes redukálni a peroxidokat (Aung-Htut és munkatársai 2012). Nagy koncentrációjából adódóan (az intracelluláris GSH koncentráció akár 10 mM is lehet; Pócsi és munkatársai 2004) a $\bullet\text{O}_2^-$ és a $\bullet\text{OH}$ is gyakran reakcióba lép vele, kevésbé reaktív glutationil szabadgyököket eredményezve (Sjöberg és munkatársai 1982, Pócsi és munkatársai 2004, Aung-Htut és munkatársai 2012, Fiser és munkatársai 2013).
- Egyéb antioxidáns enzimek, melyek közül a citokróm C peroxidáz (ferri-citokrómok segítségével redukáló enzim) jelentősége bizonyított a mitokondrium ROS elleni védelmében (Giles és munkatársai 2005, Staerck és munkatársai 2017).
- Egyéb antioxidáns molekulák, melyek közül említést érdemelnek a rendszerint a konídiumokban akkumulálódó mannitol (Ruijter és munkatársai 2003), a sejtalfalkotó melanin (de Cássia és munkatársai 2005) és a citoszol tiol-csoportot tartalmazó fehérjéi is. Ez utóbbi esetben a ROS-ok hatására spontán oxidálódó tiol-csoportokat – többek között – a GSH/glutaredoxin és tioredoxin rendszerek redukálják vissza. Az elsődleges cél a fehérjék redukált állapotban tartása és így aktivitásuk megőrzése, de e folyamat számottevő mértékben járul hozzá a ROS-ok eliminálásához is (Aung-Htut és munkatársai 2012). Az eritro-aszkorbinsav egyes elképzelések szerint az aszkorbinsavhoz hasonlóan, vízben oldódó antioxidáns molekulaként funkcionál a gombákban (Murakawa és munkatársai 1977, Dumbrava és Pall 1987, Huh és munkatársai 1998). Újabb vizsgálatok alapján koncentrációja ($<0,1$ mM) túl kicsi ahhoz, hogy ilyen feladatot elláthasson, ráadásul bioszintézisének indukcióját sem sikerült kimutatni oxidatív stressz alatt *S. cerevisiae* esetében (Spickett és

munkatársai 2000). Az ubikinol (redukált koenzim Q) egy fontos lipidoldékony (lipidperoxidációt gátló) antioxidáns, amellet, hogy a légzési elektrontranszport lánc tagja (Bossie és Martin 1989). Az ergotionein (2-merkaptó-L-trimetil-hisztidin) (Cheah és Halliwell 2012) és a γ -glutamil-cisztein (a GSH szintézis köztterméke) (Quintana-Cabrera és munkatársai 2012) szintén ismert antioxidánsok gombák esetében (is).

– Egyéb, csak közvetett módon antioxidáns, rendszerek közül említést érdemelnek a fémionokat keláló fitokelatinok (GSH oligomerek; $[\gamma\text{-Glu-Cys}]_n\text{-Gly}$) és metallotioneinek, melyek a szabad átmenetifémeket (leggyakrabban Cu^{2+} és Zn^{2+}) kötik meg, megakadályozva, hogy ROS-ok képződését katalizálják (Wysocki és Tamás 2010). Valamint a szulfiredoxin, amely a diszulfidnál oxidáltabb állapotú tiol-csoportok (pl. szulfínsav-származékok) visszaredukálásában működik közre.

A ROS-ok nemcsak potenciális veszélyforrást jelentenek a sejtek számára, de képződésük kifejezetten előnyös is lehet. A xilofág gombák például a lignin és a cellulóz lebontásához is használnak ROS-okat. A lignin peroxidázok és mangán peroxidázok H_2O_2 segítségével bontják meg a lignint, míg egyes glikopeptidek a Fenton-reakciót (2. ábra) kihasználva, $\bullet\text{OH}$ -t termelve oxidálják azt (Bugg és munkatársai 2011, Breitenbach és munkatársai 2015). A cellobiáz dehidrogenáz feltehetően szintén végső soron H_2O_2 felhasználásával oxidálja a cellulóz hidrolízisekor keletkező cellobiázt (Baldrian és Valásková 2008). NADPH oxidázuk (ROS termelésük) révén a gombák indukálhatják apoptózisukat és befolyásolhatják differenciációjukat is (aszexuális és szexuális képletek képződése; csírázás, vegetatív növekedés fenntartása, appresszórium és szklerócium képzése), ami hatással lehet – legalábbis a növény patogén fajoknál – a virulenciájukra is (Heller és Tudzynski 2011, Tudzynski és munkatársai 2012). Sőt, a sejtek ROS tartalma befolyásolja a szekunder metabolitok termelődését (Hong és munkatársai 2013a) és az öregedést is (Ayer és munkatársai 2014).

Ha a sejtekben, illetve közvetlen környezetükben a ROS-ok olyan mértékben akkumulálódnak, ami már zavarja azok „normál működését”, oxidatív stresszről beszélünk (Lushchak 2015). Oxidatív stresszt indukál – többek között – sok fémion (pl. $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$, $\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^{+}$, de a nem redox aktív Cd^{2+} is) (Jozefczak és munkatársai 2012, Lazarova és munkatársai 2014) és számos szerves molekula (pl. menadion, diamid, fenil- és fenoxi-ecetsav, amfotericin B, policiklikus aromás szénhidrogének, sok szekunder metabolit) (Jamieson és munkatársai 1994, Emri és munkatársai 2001, Pócsi és munkatársai 2005, Debiante és munkatársai 2009, Omar 2013, Mesa-Arango és munkatársai 2014, Bertóti és munkatársai 2016). A sejtek redox egyensúlyának felborulásához és így oxidatív stressz kialakulásához vezet, vezethet – többek között – az éhezés, az ozmotikus stressz, a kiszáradás,

a hőstressz (Davidson és munkatársai 1996, Emri és munkatársai 2004a, Ádám és munkatársai 2008, Calahan és munkatársai 2011, Lima és munkatársai 2014), vagy akár a fermentorok intenzív kevertetése és levegőztetése is (Li és munkatársai 2009). Nem utolsósorban, az állatok és a növények a szervezetüket megtámadó mikroorganizmusokkal szemben gyakran ROS termelésével is fellépnek (Heller és Tudzynski 2011, van de Veerdonk és munkatársai 2017). Fontos kihangsúlyozni, hogy az oxidatív stressz gyűjtőfogalom, amibe igen sokféle, a ROS-ok akkumulálódása által előidézett stressz tartozik. Attól függően, hogy milyen ROS-ok, milyen mértékben akkumulálódnak, illetve mi váltotta ki a ROS akkumulációt (pl. a ROS termelő folyamatok intenzifikálódása, vagy az antioxidáns védelem gyengülése), nagyon eltérő oxidatív stresszeket lehet megfigyelni, melyekre az élőlények nagyon eltérő stresszválaszt adhatnak (Jamieson és munkatársai 1994, Quinn és munkatársai 2002, Pócsi és munkatársai 2005, Ayer és munkatársai 2014). Az oxidatív stresszt egyre gyakrabban emlegetik a nitrozatív stresszel együtt (Staerck és munkatársai 2017). A nitrozatív stresszt kiváltó reaktív nitrogén részecskék (RNI – reactive nitrogen intermediates) – elsősorban a nitrogén monoxid, peroxinitrit, nitro tirozin és nitrozotiolok – nemcsak a ROS-okhoz hasonló biológiai, kémiai tulajdonságokkal rendelkeznek, de a ROS-okkal együtt vannak jelen a sejtekben és gyakran a ROS-ok közvetítésével, vagy ROS-ok képződése közben alakulnak át egymásba (Novo és Parola 2008).

2.1.2 Az oxidatív stresszválasz fontosabb elemei

A gombák oxidatív stresszválaszának számos elemét azonosították az elmúlt évtizedekben.

Az előző fejezetben (2.1.1) említett antioxidáns rendszerek indukálódása természetesen fontos része az oxidatív stressz elleni védekezésnek gombák esetében is (Emri és munkatársai 1997a, 1999, Herrero és munkatársai 2008, Morano és munkatársai 2012, Fréalle és munkatársai 2013, Sha és munkatársai 2013, Fountain és munkatársai 2016a).

Míthogy a GSH, glutaredoxin és tioredoxin redukált állapotban tartása végső soron NADPH-t igényel, nem meglepő módon a NADPH termelő folyamatok aktivizálódása szintén megfigyelhető oxidatív stressz alatt. Elsősorban az oxidatív pentóz-foszfát út (glükóz-6-foszfát dehidrogenáz és 6-foszfoglükonát dehidrogenáz) és a NADP-specifikus glicerol-foszfát dehidrogenáz aktiválódását lehet kiemelni (Pahlman és munkatársai 2001, Pusztahelyi és munkatársai 2011, Morano és munkatársai 2012, Sha és munkatársai 2013). A glikolitikus enzimeket kódoló gének repressziója és egyes glikolitikus enzimek (mindenekelőtt a gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenáz) oxidatív inaktiválódása szintén fontos eleme az

intenzív NADPH termelésnek, ugyanis a glikolízis gátlása együtt jár az oxidatív pentóz-foszfát út fluxusának növekedésével (Godon és munkatársai 1998, Costa és munkatársai 2002, Shanmuganathan és munkatársai 2004, Ralser és munkatársai 2007).

A DNS „repair” gének, a hősokk fehérje gének és a fehérjék ubiquitin-függő lebontásáért felelős gének, valamint a trehalóz anyagcsere génjeinek indukciója egyaránt megfigyelhető oxidatív stressz alatt és e folyamatok fontosak a mutációk, illetve a károsodott (oxidálódott) fehérjék kijavításában, eltávolításában (Gasch 2003, Toledano és munkatársai 2003, Sha és munkatársai 2013). Az említett gének aktiválódása természetesen nemcsak oxidatív, de más (a DNS, illetve a fehérjék károsodásával járó) stressz helyzetekben is megfigyelhető (Gasch 2003, Toledano és munkatársai 2003).

A vegetatív növekedés gátlása szintén gyakran leírt eleme az oxidatív stresszválasznak (Gasch 2003, Toledano és munkatársai 2003, Morano és munkatársai 2012). A növekedés lassulása és a teljes növekedésgátlás elsősorban erős oxidatív stressz hatására következik be és más erős stresszhatások esetén is megfigyelhető (Gasch 2003). A növekedésgátlás együtt jár a sejtosztódás gátlásával (beleértve számos sejtciklus gén represszállódását), a fehérjeszintézis gátlásával (beleértve a riboszómák képződéséhez szükséges gének represszióját), a DNS replikáció, a sejtfalszintézis, az aminosav és nukleotid bioszintézis gátlásával is (Gasch 2003, Toledano és munkatársai 2003, Morano és munkatársai 2012). E folyamatok repressziója együttesen energiát és anyagokat spórol meg a sejtek számára, melyeket a ROS-ok elleni védelemben tudnak felhasználni (Gasch 2003). Ráadásul a fenti folyamatok gátlásával a sejt el tudja kerülni a nem megfelelően kivitelezett replikáció, transzkripció, transzláció, sejtfal szintézis és sejtosztódás esetleges letális következményeit is (Gasch 2003).

Az ergoszterin szintézis repressziója szintén jellemző eleme az oxidatív stresszválasznak. Feltételezik, hogy a membrán fluiditásra és/vagy az ion homeosztázisra gyakorolt hatása révén járul hozzá a sejtek oxidatív stressz érzékenységeinek csökkenéséhez (Montañés és munkatársai 2011).

A fém ionok (elsősorban a vas és réz ionok) anyagcseréje és az oxidatív stressz elleni védekezés szorosan összefüggnek egymással (Toledano és munkatársai 2003, Wysocki és Tamás 2010). Oxidatív stressz alatt (a stressz típusától, erősségétől és a fémionok mennyiségétől függő módon) megváltozhat a fémionok tápközegből való felvételének mértéke, raktározása és – a vas anyagcsere esetében – a hem, illetve FeS klaszter bioszintézis út aktivitása is (Dancis 1998, Winge 1998, Toledano és munkatársai 2003). Ezzel párhuzamosan a detoxifikálásukban fontos fehérjék (fitokelatin szintézis út fehérjei, metallothioneinek, ATPázok) génjei indukálódnak (Dancis 1998, Winge 1998, Toledano és

munkatársai 2003). Érdemes megemlíteni, hogy a Sod1 SOD a Cu^{2+} direkt megkötésére, kelálására is képes, így metallothionein funkciója révén is részt vesz az oxidatív stressz elleni védelemben (Culotta és munkatársai 1995).

Bár a gombák oxidatív stresszválaszával kapcsolatos ismeretek zöme élesztő fajok (*S. cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Candida albicans*) vizsgálatából származik, a rendelkezésre álló irodalmi adatok alapján az *Aspergillus* és *Penicillium* fajok oxidatív stresszválasza is lényegét tekintve nagyon hasonló (Emri és munkatársai 1997a, 1999, Asano és munkatársai 2007, Hagiwara és munkatársai 2007, Qiao és munkatársai 2008, Hartmann és munkatársai 2011, Nimmanee és munkatársai 2014, Fréalles és munkatársai 2013, Montibus és munkatársai 2013, Fountain és munkatársai 2016a, 2016b). Egy lényeges különbséget azonban érdemes kiemelni. *Aspergillus* fajokban (de más fonalas gombákban is) az oxidatív stresszválasz és a szekunder anyagcsere szabályozása összefügg egymással (Montibus és munkatársai 2013). Számos megfigyelés igazolja, hogy egyes mikotoxinok (pl. aflatoxinok, ochratoxinok, trichotecének) képződése oxidatív stresszrel indukálható, míg antioxidánsok alkalmazásával gátolható. Sőt, több oxidatív stresszválaszt és szekunder metabolit termelést egyaránt szabályozó transzkripciós faktort is azonosítottak már az elmúlt években (Reverberi és munkatársai 2010a, Roze és munkatársai 2011, Hong és munkatársai 2013a, 2013b, Montibus és munkatársai 2013, Subramaniam és Rampitsch 2013, Yin és munkatársai 2013). Az aflatoxin termeléssel kapcsolatban feltételezik, hogy a szintézis út oxidatív lépései segítik a sejtek redox egyensúlyának megőrzését, így e mikotoxin szintézise védelmet nyújthat az oxidatív stresszrel szemben (Reverberi és munkatársai 2010a, Fountain és munkatársai 2016b). Mások szerint a szekunder metabolit termelés oxidatív stressz alatti indukcióját az oxidatív stresszt kiváltó gazdaszervezet, vagy kompetitor faj elleni támadásként kell értelmezni (Montibus és munkatársai 2013).

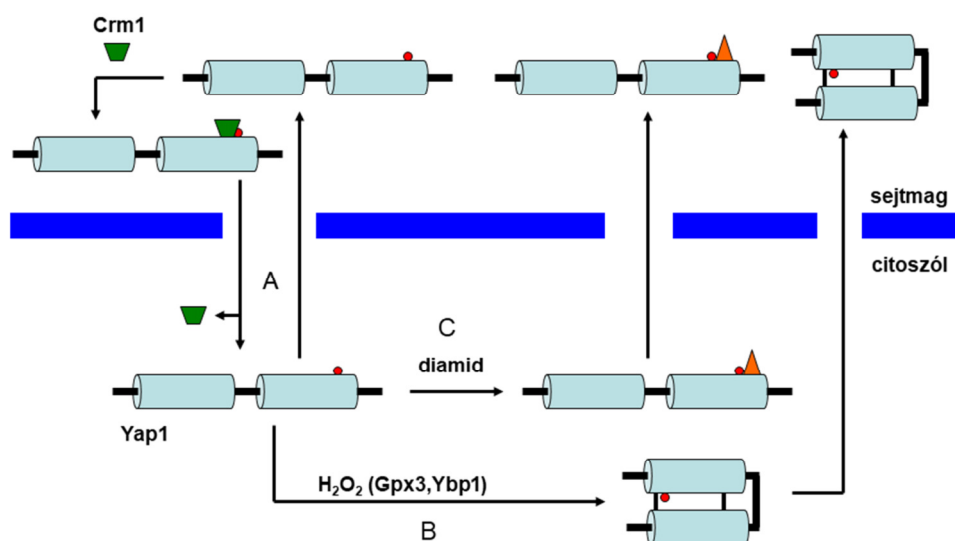
2.1.3 Az oxidatív stresszválasz szabályozása gombákban

Az oxidatív stresszválasz szabályozása, más stresszválaszok szabályozásához hasonlóan, igen komplex és csak részben feltárt folyamat.

S. cerevisiae esetében az oxidatív stresszválasz szabályozásában az alábbi transzkripciós faktorok a legfontosabbak: Yap1, Skn7, valamint Msn2 és Msn4 (Morano és munkatársai 2012).

A Yap1 egy bZip (basic region-leucine zipper-containing) típusú, aktiváló hatású transzkripciós faktor. Számos (legalább 32) oxidatív és Cd^{2+} stresszválasz gén szabályozásában vesz részt. Stresszmentes körülmények között is jelen van a citoplazmában,

de nem tud a sejtmagban akkumulálódni, ugyanis a Crm1 exportin fehérje folyamatosan eltávolítja onnan. Oxidatív stressz alatt a Yap1 szerkezete megváltozik tiol-csoportjainak oxidálódása miatt. A szerkezetváltozás érinti Yap1 Crm1 kötőhelyét is, ami lehetővé teszi magi akkumulálódását (3. ábra).



3. ábra A Yap1 magi akkumulációjának molekuláris háttere

A: A Yap1 redukált állapotban is bejut a magba, de a Crm1 exportin folyamatosan eltávolítja onnan.

B: H_2O_2 jelenlétében a Yap1 „oxidatív folding”-on megy keresztül, amihez a Gpx3 és Ybp1 fehérjékre van szükség. Az oxidált Yap1-hez a Crm1 már nem tud kötődni, így az a magban akkumulálódik.

C: A Yap1 magi akkumulációjához nem feltétlenül szükséges „oxidatív folding”. A Crm1 kötőhely közelében lévő tiol-csoportok módosulása (pl. vegyes diszulfidok képződése) is megakadályozhatja a Crm1 megkötődését a fehérje nagyobb konformáció változása nélkül is.

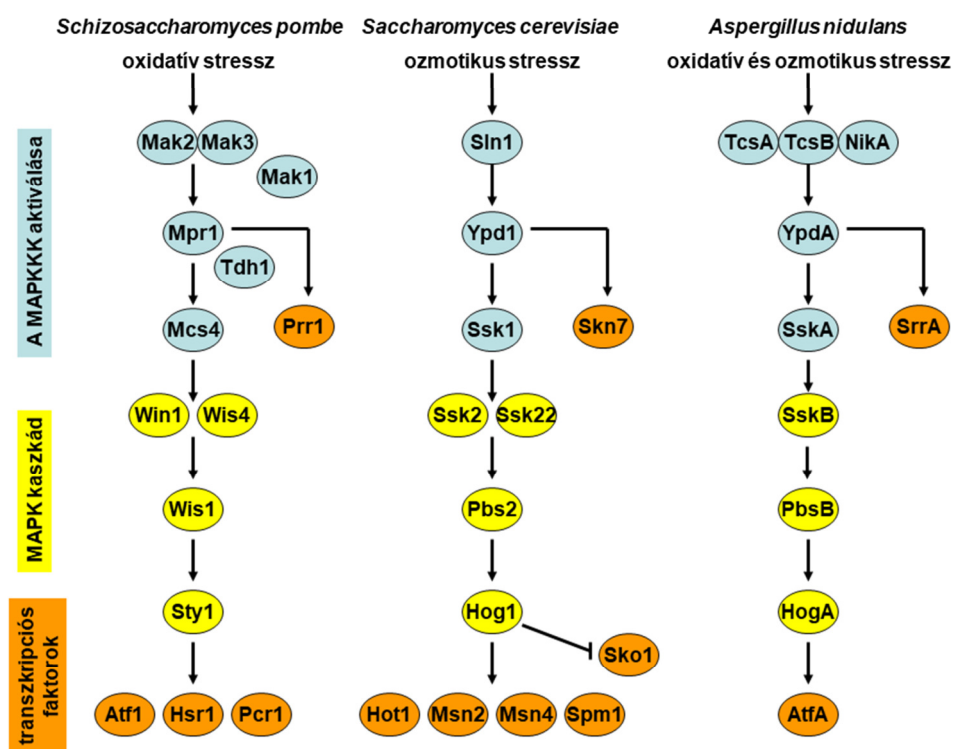
Az ábra Morano és munkatársai (2012) közleménye alapján készült.

Az Skn7 többféle stresszválasz szabályozásában (pl. hipo- és hiperozmotikus stressz, hőstressz) is részt vesz (Morano és munkatársai 2012). Feladata – feltételezések szerint – elsősorban az, hogy más transzkripciós faktorok hatását módosítsa. Oxidatív stressz alatt foszforileződik (He és munkatársai 2009) és legalább 15, a Yap1 által is indukált, gén indukciójában működik közre (Morano és munkatársai 2012). Foszforilezésében azonban nem az az Sln1 hisztidin kináz vesz részt, amely egyébként az ozmotikus stressz alatti aktiválódásáért felelős (Li és munkatársai 1998).

Az Msn2 és Msn4 transzkripciós faktorok a *S. cerevisiae* általános stresszválaszához (környezeti stresszválasz; environmental stress response; ESR) köthetőek, azaz igen sokféle stresszhelyzetben aktiválnak géneket, melyek között számos, antioxidáns enzimeket kódoló gén is található (Gasch és munkatársai 2000, Causton és munkatársai 2001). Magi akkumulációjukhoz oxidatív stressz alatt oxidált tioredoxinra van szükség (Boisnard és munkatársai 2009).

Wu és Chen (2009) gén expressziós adatok (DNS chip és RNSseq adatok), valamint transzkripciós faktorok lehetséges kötőhelyeinek (elsősorban ChIP-on-chip adatok) vizsgálatával (Stress Transcription Factor Identification Algorithm; STFIA) további két transzkripciós faktor (Hsf1 és Pdr3) jelentőségét mutatták ki oxidatív stressz alatt. A Hsf1 transzkripciós faktor elsősorban hőstresszválasz szabályozásában vesz részt (Morano és munkatársai 2012), de foszforiláltsága jelentősen megváltozik oxidatív stressz alatt és igazoltan részt vesz a Cup1 metallotioenin génjének indukciójában is (Liu és Thiele 1996, Güldener és munkatársai 2005). A Pdr3 az általános drogrezisztencia szabályozásában működik közre (Schüller és munkatársai 2007), az oxidatív stresszválasz szabályozásában betöltött szerepét kísérletesen még nem igazolták. A fent említett transzkripciós faktorokon kívül több más transzkripciós faktorról is kimutatták, hogy részt vesz oxidatív stressz alatt egyes géncsoportok szabályozásában. Kiragadott példaként említhető az Stb5, amely az oxidatív pentóz-foszfát út, míg a Met4, amely a kén és a GSH anyagcsere génjeit indukálja oxidatív stressznek kitett sejtekben (Larochelle és munkatársai 1996, Wheeler és munkatársai 2003).

Schizosaccharomyces pombe esetében a Pap1, Prr1, Atf1, Pcr1 és Hsr1 transzkripciós faktorokat kell kiemelni (4. ábra) (Papadakis és Workman 2015).



4. ábra A *S. pombe* Sty1 MAPK útvonala és ortológjai
Az ábra Papadakis és Workman (2015) munkája alapján készült.

A Pap1 a Yap1 ortológja és a Yap1-hez hasonlóan oxidatív módosulást követően képes a magban akkumulálódni (Papadakis és Workman 2015).

A Prr1 az Skn7 ortológja és a Pap1 által is szabályozott gének egy részét indukálja (heterodimert képezve a Pap1-el) (Calvo és munkatársai 2012a). Oxidatív stressz alatt az Mpr1 hisztidin foszfortranszferáz fehérjéje, amely a Sty1 mitogén aktivált protein kináz (MAPK) útvonal tagja (4. ábra), aktiválja (Quinn és munkatársai 2002).

Az Atf1 egy bZip típusú transzkripciós faktor. Részben a Pcr1-el (amely szintén BZip fehérje) heterodimert alkotva, részben attól függetlenül indukál oxidatív stresszválasz géneket (Eshaghi és munkatársai 2010). Oxidatív stressz alatt a Sty1 MAPK foszforilezi és közreműködik a Pcr1 Sty1 általi aktiválásában is (Eshaghi és munkatársai 2010) (4. ábra).

A Hsr1 egy cinkujj típusú transzkripciós faktor, számos oxidatív stresszválasz gén szabályozásában vesz részt (Chen és munkatársai 2008). Oxidatív stressz alatt a Sty1 MAPK aktiválja Atf1-függő módon (Chen és munkatársai 2008) (4. ábra).

Az *Aspergillus* fajokban lényegesen kevesebb adat áll rendelkezésre az oxidatív stresszválasz szabályozásáról. A korábban említett transzkripciós faktorok közül ez idáig az Atf1 (*A. nidulans*: AtfA, Hagiwara és munkatársai 2008, Balázs és munkatársai 2010, Lara-Rojas és munkatársai 2011; *A. fumigatus*: AtfA, Hagiwara és munkatársai 2014 és 2016b), a Yap1 (*A. nidulans*: NapA, Asano és munkatársai 2007, Mendoza-Martínez és munkatársai 2017; *A. fumigatus*: Yap1, Montibus és munkatársai 2015) és az Skn7 (*A. nidulans*: SrrA, Vargas-Pérez és munkatársai 2007, Hagiwara és munkatársai 2011, Montibus és munkatársai 2015, Mendoza-Martínez és munkatársai 2017; *A. fumigatus*: Skn7, Ma és Li 2013) funkcionális ortológjait sikerült azonosítani.

Az *A. nidulans* AtfA fehérjéje a SskA/HogA MAPK útvonal által szabályozott, bZIP típusú transzkripciós faktor (4. ábra) (Eshaghi és munkatársai 2010, Lara-Rojas és munkatársai 2011, Hagiwara és munkatársai 2014, Jaimes-Arroyo és munkatársai 2015, Papadakis és Workman 2015). Más bZIP típusú transzkripciós faktorokhoz hasonlóan feltételezhető, hogy heterodimert alkotva fejti ki aktiváló hatását (Lara-Rojas és munkatársai 2011) és nemcsak az oxidatív stresszválasz szabályozásában vehet részt. A vizsgált fajokban az AtfA/Atf1 befolyásolja a konídiumok és a vegetatív hifák stressz toleranciáját (pl. oxidatív, ozmotikus és hőstressz tolerancia), a hifák szekunder anyagcseréjét, ivaros és ivartalan szaporodáshoz köthető differenciációját, sőt hatással van a növény patogén (*Botrytis cinerea*, *Claviceps purpurea*, *Fusarium graminearum*, *Magnaporthe oryzae*) és humán patogén (*A. fumigatus*) fajok virulenciájára is (Nathues és munkatársai 2004, Hagiwara és munkatársai 2008, 2014, 2016b, Yamashita és munkatársai 2008, Sakamoto és munkatársai 2009, Guo és munkatársai 2010, Balázs és munkatársai 2010, Lara-Rojas és munkatársai 2011, Temme és

munkatársai 2012, Van Nguyen és munkatársai 2013, Qi és munkatársai 2013, Jaimes-Arroyo és munkatársai 2015, Pereira Silva és munkatársai 2017).

2.2 Aspergillus fajok szénéhezésre adott stresszválasza

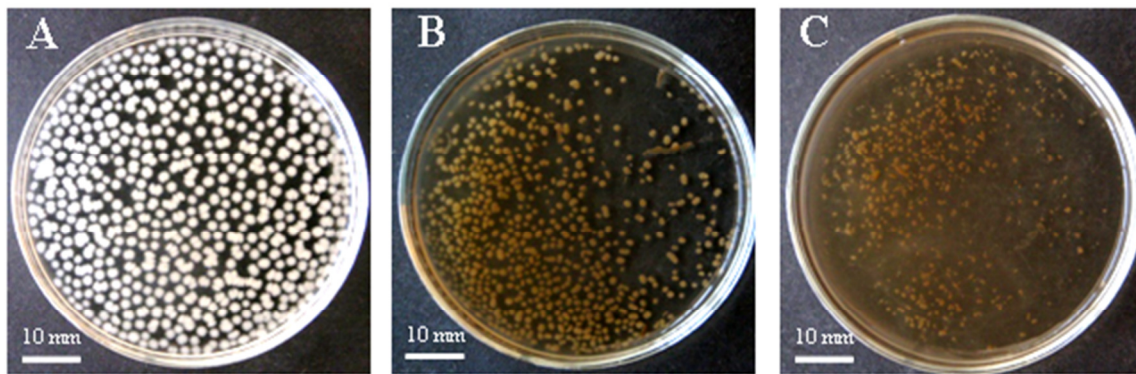
2.2.1 Szénstressz, szénforrás éhezés, szénforrás limitáció

A szénéhezés (szén- és energiaforrás éhezés) alatt egy olyan stresszt értünk, amikor az elérhető szerves vegyületek mennyisége és minősége nem elegendő a gomba számára a vegetatív növekedés fenntartásához (Winderickx és munkatársai 2003, Emri és munkatársai 2008, van Munster és munkatársai 2016). A szénéhezéshez sok szempontból hasonló szénforrás limitáció esetén ugyanakkor a szénforrás minősége és/vagy mennyisége csak lassú növekedést tesz lehetővé (Winderickx és munkatársai 2003). A kétféle stresszt együtt nevezzük szénstressznek (Spitzmüller és munkatársai 2015a). A jól hasznosítható tápanyag felhasználása során a gomba először a szénforrás limitáció okozta stresszel szembesül. Amennyiben nem sikerül valamilyen alternatív szénforrás hasznosítására átállnia, bekövetkezik a szénéhezés is. Ennek megfelelően a szénforrás limitáció a növekedés kései exponenciális fázisára, míg a szénéhezés a növekedés stationer, illetve hanyatló fázisára jellemző (Winderickx és munkatársai 2003). A szénforrás limitációra adott stresszválasz szorosan kapcsolódik a karbon katabolit represszió jelenségéhez: A jól hasznosítható szénforrás elfogyásakor a gomba megpróbálja a növekedését egy gyengébb minőségű szénforrás hasznosításával biztosítani. A szabályozás szemszögéből nézve ez rendszerint úgy valósul meg, hogy a jól hasznosuló szénforrás – mindaddig, amíg jelen van – gátolja a gyengébb szénforrás hasznosítását (Winderickx és munkatársai 2003). A szénéhezésre adott stresszválasz ugyanakkor az autolízis jelenségéhez köthető (Sámi és munkatársai 2001a,b, White és munkatársai 2002, Emri és munkatársai 2008). Autolízisen egy olyan sejtpusztulási folyamatot értünk, amely során a sejtek enzimatikusan lebontják saját biopolimerjeiket, hogy a monomereket felhasználhassák (White és munkatársai 2002). E jelenséget sokféle stressz (pl. nitrogénéhezés, vashiány, oxigénhiány) kiválthatja, de fontos és jellemző eleme a szénéhezésre adott stresszválasznak is (White és munkatársai 2002, Richie és munkatársai 2007a). Laboratóriumi körülmények között a szénéhezést az exponenciális fázisú micélium szénforrás mentes tápközegbe történő átmosásával váltják ki, vagy egyszerűen annyi ideig tartják fenn a tenyészeteket, amíg a gomba teljesen fel nem használja a rendelkezésre álló szénforrást. Az első esetben a szénéhezést nem előzi meg szénforrás limitáció, míg az utóbbi esetben a szénéhezés szénforrás limitáción keresztül alakul ki. A kétféle kísérleti elrendezés esetenként eltérő szén stresszválasz kialakulásához vezet (Szilágyi és munkatársai 2011). A

hosszú ideig fenntartott szénéhező tenyészeteket szokás „öregedő” tenyészetként is emlegetni az irodalomban (Pusztahelyi és munkatársai 1997a, 1997b). A szénéhezés alatt bekövetkező morfológiai és fiziológiai változások aktív, jól szabályozott, energiaigényes, a nekrotikus sejtpusztulás morfológiai és fiziológiai következményeitől eltérő jellegét csak az 1990-es évek végétől kezdve kezdték a kutatók hangsúlyozni (McIntyre és munkatársai 1999, White és munkatársai 2002, Mousavi és Robson 2003, Pócsi és munkatársai 2003, Emri és munkatársai 2004a).

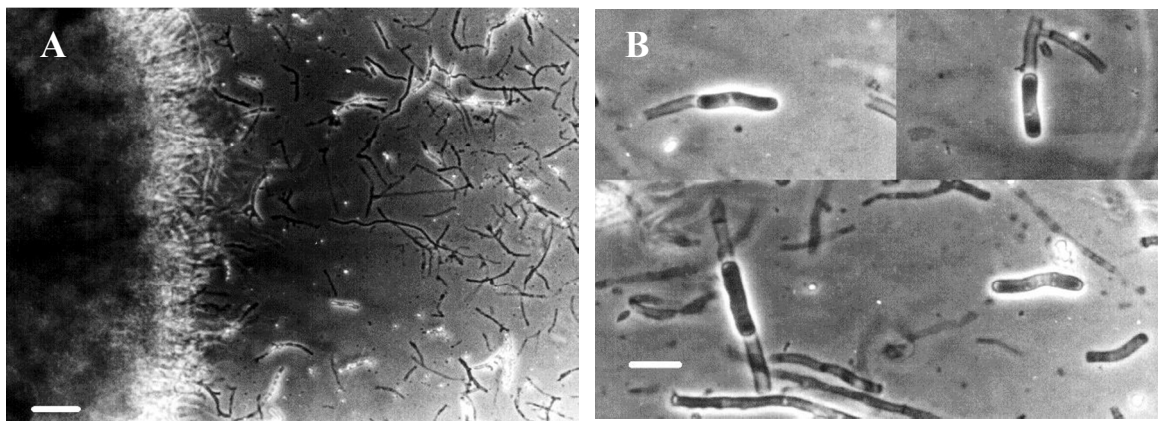
2.2.2 A szénéhezést kísérő morfológiai változások

A szénéhezés sok esetben látványos, esetenként szabad szemmel is követhető változásokat indukál fonalas Ascomycoták tenészeiben (van Munster és munkatársai 2016). E változások magukban foglalják a melanizációt, az intenzív vakuolizációt, a hifák kiürülését (a hifák belseje eltűnik, csak a sejtfal marad meg), vékony hifák képzését, a hifák darabolódását (fragmentáció) és ezzel párhuzamosan a pelleték átmérőjének folyamatos csökkenését, majd a pelleték szétesését és végső soron „élesztő-szerű” sejtek (egy-két sejtből álló hifa töredékek) képződését (5-6. ábrák; White és munkatársai 2002, Emri és munkatársai 2004a, 2008, Pollack és munkatársai 2008, Nitsche és munkatársai 2012, van Munster és munkatársai 2016). Az „élesztő-szerű” sejtek friss tápanyag jelenlétében képesek „kicsírázni”, vékony hifát képezve növekedésnek indulni (Emri és munkatársai 2008, van Munster és munkatársai 2016).



5. ábra Szénéhező *A. nidulans* tenyészetek melanizációja

Az *A. nidulans* tHS30.3 törzs élesztőkivonattal kiegészített Barratt-féle nitrátos táplevesben lett felnevesztve, majd az exponenciális fázisú micélium (16 h) szénforrás mentes minimál tápközegebe lett átmosva. A fotók a tenyésztés 16. (A), 50. (B) és 70. (C) órájában készültek a Petri-csészékbe pipettázott mintákról. (A C fotón a hifák intenzív fragmentálódása miatt a fermentlé opálosnak látszik.) A fotók a Szilágyi és munkatársai (2018) által publikált közleményből származnak.



6. ábra Morfológiai változások szénéhező *A. nidulans* tenyészetekben

Az FGSC A26 törzs élesztőkivonattal kiegészített Barratt-féle nitrátos táplevesben lett tenyésztve. A – Pellet és a pellet felszínéről letöredező hifa szakaszok (100 h; bár = 20 μm). B – “Élesztő-szerű” sejtek, kiüresedett hifa töredékekkel a végükön (120 h; bár = 5 μm). C – Növekedésnek indult “élesztő-szerű” sejtek (120 h; bár = 5 μm ; a tenyészethez 10 g/l glükóz lett adva a 100. órában). A fotók az Emri és munkatársai (2004a) által publikált közleményből származnak.

A vakuolizáció és az üres hifák keletkezésének hátterében a makroautofágia (makroautofágiás sejtpusztulás) áll (Richie és munkatársai 2007a, Shoji és Craven 2011, Nitsche és munkatársai 2013). A fragmentáció együtt jár a tenyészetek szárazanyagtartalmának (DCM) jelentős csökkenésével és csak kellően nagy sejtfalbontó glükohidroláz (pl. kitináz) aktivitások jelenlétében következik be (Emri és munkatársai 2005a, Pócsi és munkatársai 2009). Azaz a hifák nem egyszerűen csak eltörnek fizikai erők hatására az üres szakaszok mentén, hanem a fragmentáció egyes (elhalt, kiüresedett) hifaszakaszok sejtfalának enzimatis leomlásával magyarázható (Emri és munkatársai 2008, Pócsi és munkatársai 2009, van Munster és munkatársai 2015, van Munster és munkatársai 2016).

A sejtfal hidrolázok képződésének és működésének következtében kialakuló hifa darabolódást, pellet szétesést és DCM csökkenést együtt autolitikus sejtfaldegradációnak (ASD) is nevezik (Emri és munkatársai 2008). Ennek megfelelően a fonalas Ascomycoták autolízise egy olyan folyamat, amelyben makroautofágia következtében kiüresedett hifák jönnek létre, melyek extracelluláris enzimek segítségével (egy idő után) szintén lebomlanak (Emri és munkatársai 2008, van Munster és munkatársai 2016). Érdeemes megemlíteni, hogy *A. niger* esetében hifa fragmentációt nem figyeltek meg, ami feltehetőleg azzal van összefüggésben, hogy az *A. niger* tenyésztésére használt tápközeg pH-ja kicsi (pH 3,0), ami megakadályozza a sejtfalbontó enzimek hatékony működését (van Munster és munkatársai 2016).

A szénéhezés a konidiofórok képződését szintén indukálja (Schrickx és munkatársai 1993, Emri és munkatársai 2004a, Jørgensen és munkatársai 2010, Nitsche és munkatársai

2012). Az aszexuális differenciáció süllyesztett kultúrákban kizárólag csak stressz (pl. szénéhezés, ozmotikus, vagy hőstressz) hatására következik be, míg felületi kultúrák esetében a stressz jelentősége másodlagos (Skromne és munkatársai 1995, Adams és munkatársai 1998, Krijgheld és munkatársai 2012). Sok fonalas Ascomycota esetében a szénéhezés az ivaros ciklust és az ezzel járó differenciálódási folyamatokat is indukálja (Dyer és O’Gorman 2012, Dyer és munkatársai 1992). Az *A. nidulans* e tekintetben a kivételek közé tartozik: kleisztotécium képzéséhez kedvező tápanyagellátottság szükséges (Dyer és O’Gorman 2012, Han és munkatársai 2003).

2.2.3 A szénéhezést kísérő fiziológiai változások

Szénéhezés alatt a tenyészetek túlélésének kulcskérdése, hogy hogyan biztosítsák a fennmaradásukhoz szükséges energia- (szén-) forrásokat. Az eddigi vizsgálatok alapján erre három lehetőség kínálkozik: makroautofágia, ASD és extracelluláris hidroláz termelés (van Munster és munkatársai 2016).

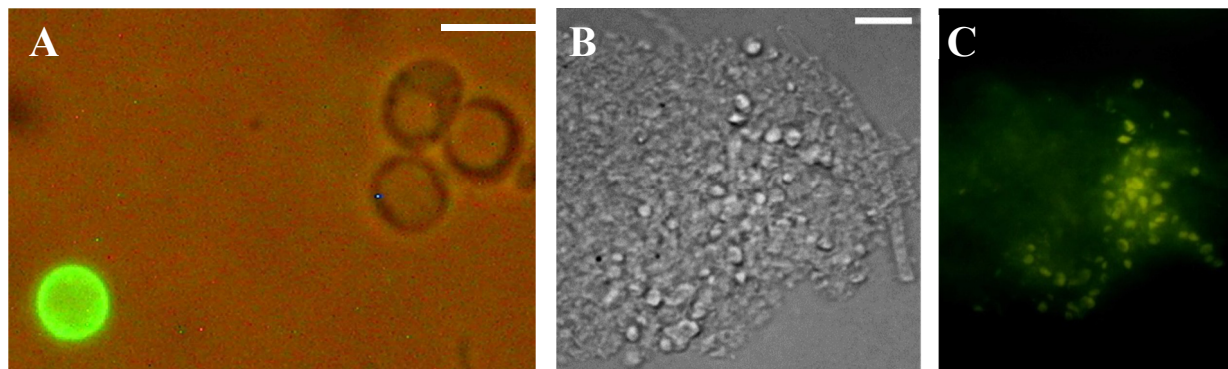
A makroautofágia (Galluzzi és munkatársai 2017) során a gomba a hifák beltartalmát (citoplazma és a sejtorganellumok) bontja le és hasznosítja újra (Richie és munkatársai 2007a, Shoji és Craven 2011, Kim és munkatársai 2011, Krohn és munkatársai 2014, Nitsche és munkatársai 2013, van Munster és munkatársai 2016). E folyamat szükségszerűen intenzív vakuolizációval jár együtt és végső soron üres hifák képződését eredményezi (Richie és munkatársai 2007a, Shoji és Craven 2011, Nitsche és munkatársai 2013). Autofágiában sérült mutánsok vizsgálatával igazolták, hogy szénéhező körülmények között az autofágiának – a vizsgált *Aspergillus* fajtól függően eltérő mértékben ugyan, de – szerepe van a konidiogenezis és a radiális növekedés tápanyag igényének biztosításában felületi kultúrákban (Kikuma és munkatársai 2006, Richie és munkatársai 2007a, Nitsche és munkatársai 2013, Pinar és munkatársai 2013), míg süllyesztett kultúrákban hozzájárul a tenyészetek életképességének megőrzéséhez (Nitsche és munkatársai 2013).

Az ASD a hifák sejtfal biopolimerjeinek hasznosítását teszi lehetővé (van Munster és munkatársai 2016). Az *A. nidulans* esetében a gomba által szekretált ChiB endokitináz nélkülözhetetlen e folyamatban, de feltehetőleg más glükohidrolázok és proteinázok is szükségesek hozzá (Yamazaki és munkatársai 2007, Pócsi és munkatársai 2009). A ChiB fehérjével ortológ CfcA kitináz szintén részt vesz a sejtfal szénéhezés alatti lebontásában *A. niger* esetében (van Munster és munkatársai 2015). Az ASD-ban sérült mutánsokban a mutáció nem befolyásolta a sejtpusztulási folyamatokat és a kiüresedett hifák akkumulálódásához vezetett, így feltételezhető, hogy e folyamat a már elpusztult sejtek

(kiüresedett hifák) falának lebontásáért, újrahasznosításáért felelős (Emri és munkatársai 2008).

A gombasejtfal lebontásában (potenciálisan) résztvevő enzimek mellett többek között proteinázok és a növényi sejtfal lebontásában közreműködő egyes glükohidrolázok (pl. arabinázok, galakturonázok, glükozidázok) szekréciója szintén megfigyelhető szénéhező *Aspergillus* kultúrákban (van Munster és munkatársai 2016). A proteinázok a sejtfalban jelenlévő fehérjék mellett a tápközegebe került saját és idegen fehérjék lebontásában, hasznosításában vehetnek részt, bár funkciójuk kísérletesen még nem lett igazolva (Nitsche és munkatársai 2012, van Munster és munkatársai 2016). A szénéhezés alatt termelt glükohidrolázok önmagukban nem elégségesek a növényi sejtfal hatékony lebontására, így fiziológiai jelentőségük kérdéses. Feltehetőleg az a feladatuk, hogy növényi maradványok jelenlétében olyan metabolitokat szabadítsanak fel, melyek képesek indukálni a gomba teljes, a növényi sejtfal lebontásához szükséges hidroláz készletét (van Munster és munkatársai 2014, 2016). Nem meglepő módon a szénéhezésre adott stresszválasz és a szénforrás limitációra adott korai stresszválasz különösen az extracelluláris hidroláz termelés tekintetében jelentős átfedést mutat (van Munster és munkatársai 2014).

A fenti folyamatokkal összefüggésben szénéhezés alatt a gomba nagy mennyiségben bont le fehérjéket, nukleinsavakat és kitint. Az ezekből a folyamatokból felszabaduló nitrogén ammónia formájában kerül a fermentlébe, ami a pH lúgosodásához vezet (Emri és munkatársai 2004a).



7. ábra Apoptotikus markerek kimutatása szénéhező *A. nidulans* tenyészetekben

Az FGSC A26 törzs élesztőkivonattal kiegészített Barratt-féle nitrátos táplevesben lett felnevesztve. A – Annexin V (foszfatidil-szerin expozíció) pozitív protoplaszt (96 h; bár = 5 μ m). B-C – Tunel-assay (DNS fragmentáció) pozitív protoplasztok (110 h; bár = 10 μ m). A fotók az Emri és munkatársai (2005b) által publikált közleményből származnak.

Bár a makroautofágiát tartják a legjelentősebb (programozott) sejtpusztulási folyamatnak szénéhező tenyészetekben (Nitsche és munkatársai 2013, van Munster és munkatársai 2016), a makroautofágia mellett apoptotikus sejtpusztulásra utaló markerek (pl. foszfatidil-szerin expozíció, DNS fragmentáció; 7. ábra) kifejeződését szintén megfigyelték *A.*

fumigatus és *A. nidulans* esetében is (Mousavi és Robson 2003, Emri és munkatársai 2005b). Az apoptózis jelentősége szénéhező tenyészetekben vitatott (Emri és munkatársai 2008); elképzelhető, hogy csak a szénéhezés által kiváltott oxidatív stressz (ROS akkumuláció), és/vagy az intenzív szekréció által indukált endoplazmatikus retikulum (ER) stressz következménye, velejárója lehet (Mousavi és Robson 2004, Richie és munkatársai 2007b).

A szénéhező tenyészetek egyik jellegzetes tulajdonsága, hogy ROS tartalmuk jelentős növekedést mutat (Emri és munkatársai 2004a). E jelenség együtt jár egyes antioxidáns enzimek (pl. SOD-ok) indukciójával (Emri és munkatársai 2004a). Más antioxidáns enzimek esetében (pl. kataláz, glutation peroxidáz) ugyanakkor (esetenként átmeneti indukciót követő) represszió tapasztalható (Emri és munkatársai 2004a). A tenyészetek GSH tartalma csökken (de jelentős GSSG akkumuláció nem figyelhető meg) és bár a légzésintenzitás is kisebb lesz, megnő az alternatív légzés részaránya (Emri és munkatársai 2004a). A ROS akkumuláció fiziológiai háttere nem ismert: a GSH tartalom csökkenése (tápanyagként való felhasználása), a légzésben, illetve az antioxidáns enzimek aktivitásában bekövetkező változások, vagy az éhezés miatti energia (ATP, NADPH) hiány is okozhatja (Emri és munkatársai 2004a). A ROS mennyiségi változása ugyanakkor befolyásolhatja a tenyészetek öregedését (Chen és munkatársai 2017), apoptotikus folyamatokat indukálhat (Mousavi és Robson 2004), hatással lehet a szekunder anyagcserére (Ni és munkatársai 2005), a differenciációra és befolyásolja az ASD-t és a melanizációt is (Emri és munkatársai 2004b).

2.2.4 A szénéhezésre adott stresszválasz szabályozása

A konidiogenezis szabályozásában a BrlA transzkripciós faktor központi jelentőségű az eddig vizsgált *Aspergillus* fajokban (Adams és munkatársai 1998, Yu és munkatársai 2006, Chang és munkatársai 2012). A BrlA az AbA és WetA transzkripciós faktorokat indukálja *A. nidulans*-ban és e három transzkripciós faktor felelős a konidiogenezishez szükséges valamennyi gén indukálódásáért (Adams és munkatársai 1998, Yu és munkatársai 2006). A *brlA* indukciójában extracelluláris szignálmolekulák vesznek részt, melyek képződéséhez a *fluG*, *afeA* és *tmpA*, valamint a *tmpB* génekre van szükség (Soid-Raggi és munkatársai 2006, Rodríguez-Urra és munkatársai 2012, Soid-Raggi és munkatársai 2016). A FluG, AfeA és TmpA, illetve TmpB fehérjék három különböző molekula képződéséhez szükségesek. Ezek közül egyedül a FluG közreműködésével létrejövő dehidroausztinol ismert, amely egy másik szekunder metabolithoz (diorecinol) kapcsolódva fejti ki hatását, ami végül a *brlA* gén indukciójához vezet (Rodríguez-Urra és munkatársai 2012). Meglepő módon a FluG-BrlA jelátviteli útvonal szükséges a ChiB kitináz és a proteinázok termelődéséhez is szénéhező

tenyészetekben (Emri és munkatársai 2005a, Pócsi és munkatársai 2009, Szilágyi és munkatársai 2011). A ChiB révén a konidiogenezis és az ASD, szabályozásukat tekintve, összefüggnek egymással, ami alapján feltételezhető, hogy funkcionális kapcsolat is van e két jelenség között (Emri és munkatársai 2008, Pócsi és munkatársai 2009, van Munster és munkatársai 2016). Azaz az ASD tápanyagokat szabadíthat fel, amit a szénéhező tenyészetek a konidiogenezisükhöz tudnak felhasználni.

Az XprG transzkripciós faktort eredetileg egy olyan fehérjeként írták le, amely az extracelluláris proteináz termelést szabályozza, többek között szénstressznek kitett tenyészetekben (Katz és munkatársai 1996). Később a transzkriptomikai vizsgálatok rámutattak arra, hogy az XprG a szénéhezésre adott stresszválasz számos elemét (pl. extracelluláris proteináz termelés, *brlA* indukció, ASD, melanizáció) befolyásolja (Katz és munkatársai 2013). Érdeemes megjegyezni, hogy az XprG-nek nincs érdemi hatása az autofágiára, ugyanakkor pro-apoptotikus hatású (Katz és munkatársai 2015, 2016).

Eddig több, mint 30, a makroautofágia szabályozásához szükséges gént azonosítottak gombákban (Feng és munkatársai 2014). E gének – a gombák esetében is – az Atg1-Atg13 komplex kontrollja alatt állnak és a komplex kialakulását a TOR (target of rapamycin), valamint a protein kináz A (PKA) útvonalak egymástól függetlenül gátolják kedvező tápanyagellátottság esetén (Kamada és munkatársai 2000, Richie és munkatársai 2007a, Stephan és munkatársai 2009, Nitsche és munkatársai 2013, van Munster és munkatársai 2016).

Az emlősökben redox szenzorként funkcionáló ATM (ataxia-telangiectasia mutated) kinázzal ortológ AtmA, *A. nidulans* esetében részt vesz a mitokondriális funkciók, a TOR útvonal, és az XprG transzkripciós faktor szabályozásában (Krohn és munkatársai 2014). Azaz szénéhezés alatt e fehérje közreműködik a makroautofágia és az ASD aktiválásában és kapcsolatot biztosíthat a szénéhezés alatt kialakuló oxidatív stressz és az autolízis között (Krohn és munkatársai 2014).

A karbon katabolit represszióért *Aspergillus* fajokban a CreA transzkripciós faktor felelős, amely glükóz jelenlétében számos, a karbon katabolit represszió által szabályozott gén működését gátolja (Ruijter és Visser 1997, Kato 2005). A CreA fehérje részt vesz a szénstresszválasz alatt képződő extracelluláris hidrolázok termelődésének szabályozásában is (Emri és munkatársai 2006, Katz és munkatársai 2008): Génjének deléciója intenzív proteináz és kitináz termeléshez vezet szénéhező körülmények között, noha glükóz jelenlétében nem befolyásolja ezen enzimek termelődését (Emri és munkatársai 2006, Katz és munkatársai 2008).

A fenteken túl számos fehérje (pl. MpkB MAP kináz, FadA és GanB heterotrimer G-protein α -alegységek, a protein kináz C útvonal által szabályozott RlmA transzkripciósfaktor) befolyásolja a szénéhezésre adott stresszválaszt (Molnár és munkatársai 2004, 2006, Kang és munkatársai 2013, Kovács és munkatársai 2013), jelezvén, hogy a megfigyelt fiziológiai változások igen komplex, sokféle jelátviteli útvonal által befolyásolt szabályozás alatt állnak.

2.2.5 A szénstressz-válasz gyakorlati jelentősége

A szénstressz elsősorban a fermentációs ipar számára jelentős. Számos, ipari léptékben előállított termék (pl. penicillin, cefalosporin, giberellin, celluláz, hemicelluláz, sőt élesztő kivonat) képződése szempontjából előnyös a szénstressz, míg más termékeknél (pl. etanol, glükonsav, glükóz oxidáz) a szénforrás limitáció elkerülésével lehet a gyártást gazdaságosan megoldani (Brückner 1992, Martín és munkatársai 1999, Sanchez és munkatársai 2010, Amore és munkatársai 2013, Vieira és munkatársai 2013, Dubey és munkatársai 2017).

A szénéhezésre adott stresszválasz szintén jelentősen befolyásolja az ipari fermentációk tervezését, sikerét. Az ASD a pelletek szétesése, a fonalak fragmentálódása miatt csökkenti a tenyészetek szűrhetőségét és ezáltal a termékkinyerés (költség) hatékonyságát (White és munkatársai 2002). A melaninok képződése fokozott habzással járhat (Pardo-Planas és munkatársai 2017), míg a nagy proteínáz aktivitások gyakorlatilag lehetetlenné teszik a heterológ fehérjék gazdaságos előállítását (Braaksma és Punt 2008, Yoon és munkatársai 2011). Ugyanakkor a szénéhezés alatt nagy mennyiségben termelődő extracelluláris enzimek (kitinázok, glükánázok, proteínázok), de maga a melanin is értékes fermentációs termék lehet, míg a sejtfal enzimatis degradációja elősegítheti a sejtekhez kitapadt termék felszabadulását a fermentáléba (White és munkatársai 2002, Emri és munkatársai 2008, Pombeiro-Sponchiado és munkatársai 2017).

Szénstressz az emberi szervezetben is kialakul, így a szénstresszhez való alkalmazkodás a fertőzés kimenetelét is befolyásolhatja (Brown és Goldman 2016). *A. fumigatus* esetében az izocitrát liáz (AcdD) hiánya nem csökkentette az *in vivo* virulenciát (Schöbel és munkatársai 2007); a metilcitrát szintáz (McsA) jelenléte ugyanakkor esszenciálisnak bizonyult az invazív aszpergillózis kialakulásához (Ibrahim-Granet és munkatársai 2008). Az izocitrát liáz a lipidek/zsírsavak hasznosításában vesz részt (glioxalát-ciklus), míg a metilcitrát szintáz az aminosavak lebontásához (a lebontás során képződő propionil-CoA átalakítása; metilcitrát-ciklus) szükséges. A különféle szénforrások

hasznosítását lehetővé tévő anyagcsere utak szabályozásában fontos protein kináz A jelátviteli útvonal mutációi – függetlenül attól, hogy befolyásolták-e a növekedési rátát, vagy sem – szintén csökkentették az *A. fumigatus in vivo* virulenciáját (Oliver és munkatársai 2002, Liebmán és munkatársai 2004). A fenti adatok arra utalnak, hogy az emberi szervezetben előforduló szabad glükóz nem elégséges a növekedés fenntartásához és a gomba alternatív szén/energia-forrásokat – elsősorban aminosavakat – is kénytelen hasznosítani. Azaz, szénforrás limitációs stressz valóban megfigyelhető az emberi (állati) szervezetben való növekedéskor is és az ehhez való adaptáció fontos a fertőzés kialakulásához. Az autofágia szabályozásában résztvevő kináz génjének (pl. *atg1*) deléciónja ugyanakkor nem befolyásolta az *A. fumigatus in vivo* virulenciáját (Richie és munkatársai 2007a), így, ha szénforrás éhezés ki is alakul átmenetileg (pl. a fagolizoszómákban), az a fertőzés kimenetelére nincs érdemben hatással. Érdemes megjegyezni, hogy *Cryptococcus neoformans* és *Candida glabrata* esetében az autofágiát érintő mutációk a virulenciát is csökkentették (Hu és munkatársai 2008, Roetzer és munkatársai 2010). A makroautofágiás sejtpusztulás indukálása, illetve a proteináz szekréció gátlása ugyanakkor egy új, alternatív antifungális stratégiát jelenthet a jövőben (Reed 2007, Emri és munkatársai 2008, Richie és munkatársai 2011).

2.3 Az *Aspergillus fumigatus* és stresszválaszai

2.3.1 Az *Aspergillus fumigatus* gyakorlati jelentősége

Az *A. fumigatus* egy ubikvista, szaprofita gombafaj; a talajban, mocsaras területeken, az avarban és más lebomló növényi maradványokon sokfelé előfordul (Jensen 1931, Marsh és munkatársai 1979, Gugnani 2003,). Az ember közvetlen környezetéből is gyakran izolálható (többek között komposztdombok, silók, gabonátároló tartályok, kazánházak és szaunák jellemző faja; Marsh és munkatársai 1979); sőt a nedves, dohos épületek indikátor fajai közé tartozik (Samson és munkatársai 1994). Konídiumainak (beltéri, illetve kültéri) koncentrációja elérheti a 100 db/m³-t is (Latgé 2001), jellemzően azonban ennél alacsonyabb (<5 db/m³) (Ruchel és Reichard 1999, Latgé 2001, Hospenthal és munkatársai 1998). Bár a metagenomikai vizsgálatoknak köszönhetően egyre nő az egészséges emberi szervezetből azonosított gomba taxonok száma (Hoffmann és munkatársai 2013), az eddigi irodalmi adatok alapján nem tagja sem a humán, sem az állati mikrobiomnak, de több növényből izolálták már, mint endofiton fajt (Liu és munkatársai 2004, Kusari és munkatársai 2009). Opportunista humán patogén gombaként az allergiás megbetegedésektől kezdve a felületi fertőzéseken át a szisztémás aszpergillózisokig sokféle betegséget okozhat, melyek túlnyomó többsége összefügg az immunrendszer működésének hiányosságával (Ruchel és Reichard 1999).

Súlyosságát alapul véve az immunkomprimált betegekben kialakuló invazív aszpergillózist (jellemzően tüdő aszpergillózist) tekintik a legjelentősebb *A. fumigatus*hoz köthető betegségnek (Brown és munkatársai 2012). Az invazív aspergillosis, az invazív candidiasis után, a második leggyakoribb invazív gombás fertőzés jelenleg (Brown és munkatársai 2012, Oren és Paul 2014). A legveszélyeztetettebb betegcsoportokban (pl. tartós neutropénia esetén) akár a betegek 25 %-ában is kialakulhat ez a fertőzés (Oren és Paul 2014), amely még antifungális kezelés esetén is 50-96 %-ban halálos kimenetelű (Park és Mehrad 2009, Balloy és Chignard 2009, Brown és munkatársai 2012, Paulussen és munkatársai 2017). A 300-nál is több *Aspergillus* fajból alig 20 okozott már bizonyítottan humán fertőzést (Samson és munkatársai 2014). Bár lehetnek eltérések földrajzi régióként és betegcsoportokként is (Paulussen és munkatársai 2017), ráadásul sok esetben a kriptikus fajok nem megfelelő identifikálása is befolyásolja a statisztikát (Howard 2014), az *A. fumigatus* tekintik a leggyakoribb humán kórokozónak a nemzetségen belül, amely a szisztémás *Aspergillus*os fertőzések több mint 90 %-áért felelős (Balajee és munkatársai 2009, Paulussen és munkatársai 2017).

A kutatókat régóta foglalkoztatja a kérdés, hogy miért pont az *A. fumigatus* okoz ilyen sok és súlyos egészségügyi problémát. Elképzelhető, hogy az okok a betegekben és nem a gombában keresendők (Tekaia és Latgé 2005): Az *A. fumigatus* világszerte gyakori az ember közvetlen környezetében, jól nő 37 °C-on és konídiumai elég aprók (2-3 µm átmérőjűek) ahhoz, hogy eljussanak az alveolusokig, így egyáltalán nem meglepő, hogy gyakran fertőz meg olyan betegeket, akiknek az immunrendszere nem működik megfelelően (Tekaia és Latgé 2005). Ez az elképzelés összhangban van azon megfigyelésekkel, miszerint az invazív aspergillosis éves gyakorisága elsősorban az immunkomprimált betegek számának gyarapodása miatt nőtt az utóbbi évtizedekben (Paulussen és munkatársai 2017). Valószínűleg azonban ennél azért többről van szó: 1) Sok, bizonyítottan opportunistá humán patogén *Aspergillus* faj (pl. *A. niger*, *A. flavus*, *A. terreus*) lokálisan gyakoribb lehet az *A. fumigatus*nál, mégsem okoz szükségszerűen több fertőzést az adott területeken, noha ezen fajok is jól nőnek 37 °C-on és az *A. terreus* esetében konídiumaik az *A. fumigatus*éhoz hasonlóan igen kicsik (Schweer és munkatársai 2016, Paulussen és munkatársai 2017). 2) Az *A. fumigatus* közvetlen rokonsági körében sok olyan faj található (pl. *A. fischeri*) melyek sokkal ritkábban fertőzik meg az embert, mint ahogy az a gyakoriságuk alapján várható lenne (Lamoth 2016). 3) A környezeti mintákból (nem betegekből) izolált törzsek *in vivo* virulenciája széles skálán mozog; egyes izolátumok kifejezetten kis *in vivo* virulenciát mutatnak (Mondon és munkatársai 1996, Bart-Delabesse és Latgé 2004, Kowalski és munkatársai 2016, Kurucz és munkatársai 2018a). Mindezek alapján sokan úgy gondolják,

hogy még az immunkomprimált szervezet is komoly kihívást jelent a mikroorganizmusok számára, és a gombáknak speciális tulajdonságokkal kell rendelkezniük ahhoz, hogy eredményesen meg tudják fertőzni a betegeket (Paulussen és munkatársai 2017).

Számos, az *A. fumigatus* virulenciáját befolyásoló tulajdonságot azonosítottak az elmúlt időszakban (Cooney és Klein 2008, Abad és munkatársai 2010, Paulussen és munkatársai 2017). Példaként említhető a konídiumok rodlet rétege és melanin tartalma (Aimanianda és munkatársai 2009), a sejtfal galaktóz-aminogalaktán komponenseinek jelenléte (Gresnigt és munkatársai 2014), a gliotoxin és fumagillin termelés (Fallon és munkatársai 2011, Scharf és munkatársai 2012), az extracelluláris proteináz szekréció (Binder és Lass-Flörl 2013), a jól működő vas és cink transzport (Haas 2012, Amich és Calera 2014), valamint a megfelelő oxidatív stressz védelem is (Abad és munkatársai 2010, Hillmann és munkatársai 2016). E tulajdonságok – a jelenlegi elképzelések szerint – nem az emberi (állati) szervezetben való túlélés érdekében alakultak ki, hanem a gomba szaprofita életmódjának a következményei, és csak „véletlenül” jelentenek előnyt az emberi szervezetbe bekerülő konídiumok számára. A legszemléletesebb példa erre az a felismerés, miszerint a konídiumok azon képessége, hogy bekebelezésüket követően is ki tudnak csírázni és ki tudnak nőni a makrofágokból a protozoákkal (amőbákkal) szembeni védelmüket szolgálja (Van Waeyenberghe és munkatársai 2013).

Az *A. fumigatus* (immunkomprimált) emberi szervezetben mutatott sikerességét nem egy-két jól definiálható tulajdonságával, hanem kiváló alkalmazkodó képességével (stressz toleranciájával) magyarázzák (Tekaia és Latgé 2005, Paulussen és munkatársai 2017). Az emberi szervezeten belül igen sokféle stressz éri, érheti a mikroorganizmusokat (Cooney és Klein 2008, Paulussen és munkatársai 2017). A korábban már említett szénstressz és oxidatív stressz mellett, a nitrozatív stressz, a hipoxia és a hőstressz, a vas- és cinkéhezés, a pH stressz, valamint a rézstressz a legismertebbek (Cooney és Klein 2008, Brown és Goldman 2016, Paulussen és munkatársai 2017).

2.3.2 Az *Aspergillus fumigatus* néhány stresszválaszának rövid áttekintése

Az *A. fumigatus* szénstressz- és részben az oxidatív stresszválaszaira az előző fejezetekben már kitértem. Összehasonlító vizsgálatokat az oxidatív stressz toleranciával kapcsolatban 17 fajba tartozó 18 *Aspergillus* törzs bevonásával végeztek (de Vries és munkatársai 2017). E vizsgálatok alapján az *A. fumigatus* Af293 (szisztémás tüdő aspergillózisból izolált törzs) H₂O₂-dal és menadion nátrium-biszulfittal (MSB) szemben mutatott toleranciája (37 °C-on) kifejezetten kicsinek bizonyult. A minimális

gátlókoncentrációk (MIC) értékei $\text{MIC}_{\text{hidrogén-peroxid}} = 3 \text{ mM}$ és $\text{MIC}_{\text{MSB}} = 0,048 \text{ mM}$ voltak (de Vries és munkatársai 2017). Összehasonlításképpen az *A. fischeri* CBS 544.65 esetében $\text{MIC}_{\text{hidrogén-peroxid}} = 30 \text{ mM}$, $\text{MIC}_{\text{MSB}} = 0,29 \text{ mM}$, az *A. niger* CBS 113.46 esetében $\text{MIC}_{\text{hidrogén-peroxid}} = 42 \text{ mM}$, $\text{MIC}_{\text{MSB}} = 0,24 \text{ mM}$ és az *A. nidulans* FGSC A4 esetében $\text{MIC}_{\text{hidrogén-peroxid}} = 24 \text{ mM}$, $\text{MIC}_{\text{MSB}} = 0,24 \text{ mM}$ értékeket mértek (de Vries és munkatársai 2017). Ezen adatok azt sugallják, hogy az *A. fumigatus* oxidatív stressz toleranciája nem meghatározó a virulenciája kialakításában. A *Δyap1*, illetve *Δskn7* törzsekkel végzett vizsgálatok is ezt látszanak alátámasztani: mindkét transzkripció faktor fontos az oxidatív stresszválasz szabályozásában, de hiányuk nem csökkenti a gomba *in vivo* virulenciáját (Lamarre és munkatársai 2007, Lessing és munkatársai 2007). A SOD1-3 szuperoxid dizmutázok deléciója szintén nem befolyásolta a virulenciát immunszuppresszált egér modellben, bár jelentősen csökkentette a makrofágokkal szembeni rezisztenciát (Lambou és munkatársai 2010). Érdeemes azonban megjegyezni, hogy az *A. fumigatus* genomja tartalmaz egy negyedik SOD gént is; ennek deléciója azonban letális hatású (Lambou és munkatársai 2010).

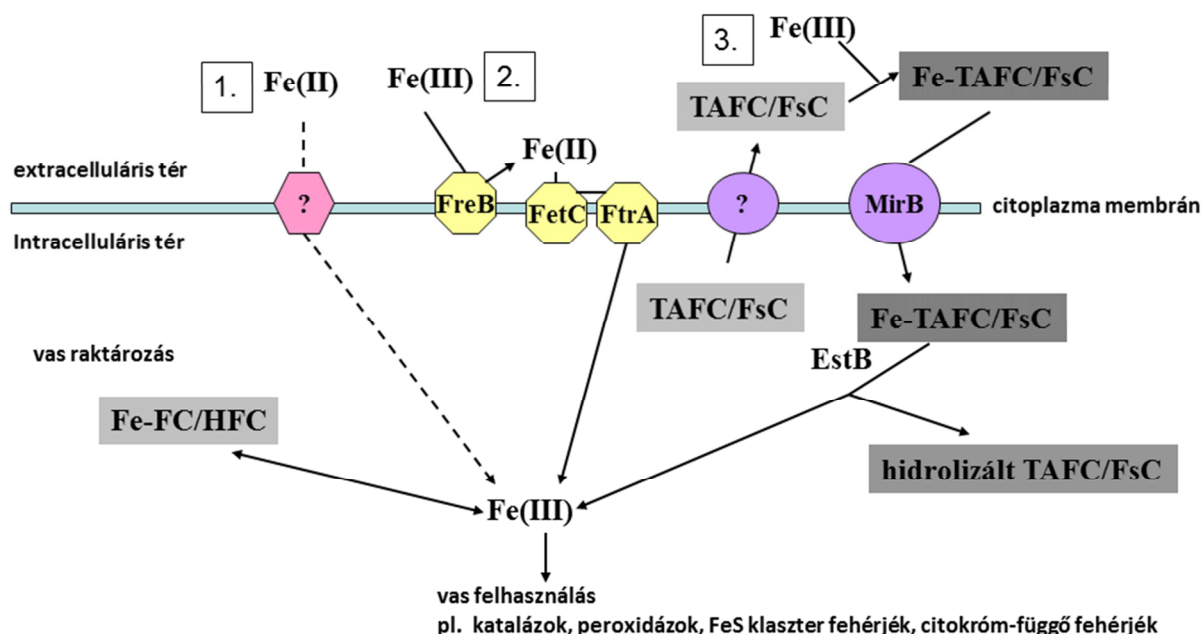
Az alveoláris makrofágok és neutrofil granulociták nemcsak ROS-et, de RNI-et is termelnek, melyek a ROS mellett, illetve velük együtt szintén fontosak az antimikrobiális védelemben (Brown és munkatársai 2009). A legjelentősebbek a nitrogén-monoxid (NO), illetve a O_2^- jelenlétében NO-ból képződő peroxinitrit (ONO_2^-), nitrogén-dioxid szabadgyök (NO_2) és a dinitrogén-trioxid (N_2O_3). Három enzimet – citoszolikus flavohemoglobin (FhpA), mitokondriális flavohemoglobin (FhpB) és S-nitrozoglutation reduktáz (GnoA) – azonosítottak *A. fumigatus*ban, melyek potenciálisan részt vehetnek az RNI detoxifikálásában (Lapp és munkatársai 2014). A flavohemoglobinok a NO - NO_3^- reakciót katalizálják, míg az S-nitrozoglutation reduktázok a NO-ból keletkező S-nitrozoglutationt redukálják ammónia és GSSG képződése közben (de Jesús-Berrios és munkatársai 2003). A deléciós törzsekkel végzett vizsgálatok azt mutatták, hogy az *A. fumigatus* FhpA-ja és GnoA-ja fontos a nitrozatív stressz elleni védelemben, de egyikük sem befolyásolja a gomba *in vivo* virulenciáját, vagy a makrofágokkal szembeni *in vitro* ellenálló képességét (Lapp és munkatársai 2014). Így a nitrozatív stressz tolerancia kapcsán is hasonlóan ellentmondásos a helyzet, mint az oxidatív stressz tolerancia esetében: A *Cryptococcus neoformans* esetében igazolták a nitrozatív, illetve oxidatív stressz elleni védekezés jelentőségét az *in vivo* virulenciában (de Jesús-Berrios és munkatársai 2003, Cheon és munkatársai 2017), így logikus a feltételezés, hogy *A. fumigatus* esetében is hasonló összefüggés várható, a kísérleti adatok azonban ezt (eddig még) nem bizonyították.

A fertőzés okozta nekrotikus lézióknak köszönhetően hipoxiás állapot a tüdőben is kialakulhat (Grahl és munkatársai 2012). Az *in vitro* vizsgálatok alapján hipoxia hatására

indukálódik a glikolízis, az oxidatív pentóz-foszfát út, az etanolos fermentáció és a γ -aminovajsav útvonal (GABA shunt), de indukciót figyeltek meg a légzési elektrontranszport lánc III-as és IV-es komplexét alkotó fehérjék esetében is (Vödisch és munkatársai 2011, Barker és munkatársai 2012, Hillmann és munkatársai 2015). Bár az etanol képződését nemcsak az omikai adatok, de *in vitro* és *in vivo* mérések is alátámasztják, jelentősége a hipoxiához való adaptálódásban csak másodlagos (Grahl és munkatársai 2011). Feltehetőleg az *A. fumigatus* elsősorban a légzés hatékonyságának növelésével alkalmazkodik a hipoxiához, szemben más *Aspergillus* fajokkal, ahol az etanolos fermentáció (és a GABA útvonal) mellett az „ammónia fermentáció” és az „elágazó oldalláncú aminosav fermentáció” is segíti a redukáló erő akkumulálódásának elkerülését (Takasaki és munkatársai 2004, Shimizu és munkatársai 2010, Hillmann és munkatársai 2015). A hipoxiára adott stresszválasz kialakulásában a „sterol regulatory element binding protein” (SREBP) családba tartozó SrbA és SrbB transzkripciós faktorok szerepét igazolták (Willger és munkatársai 2008, Chung és munkatársai 2014). E fehérjék végső soron a szterin koncentráció csökkenését érzékelik az ER-ban, így nemcsak az oxigén, de a vashiány is aktiválódásukhoz vezet (Willger és munkatársai 2008, Chung és munkatársai 2014). Nem meglepő módon a hipoxiás állapot az ergoszterin és a vastranszport (sziderofór termelés) indukálódását is kiváltja (Barker és munkatársai 2012). Összehasonlító vizsgálatok alapján pozitív korreláció van az *A. fumigatus* izolátumok *in vivo* virulenciája (triamticolon-kezelt egér modell esetében) és kis oxigén koncentrációk mellett mutatott *in vitro* növekedése között (Kowalski és munkatársai 2016). Különböző *Aspergillus* fajok szisztematikus összehasonlítása nem történt meg ez idáig; Hillmann és munkatársai (2015) adatai alapján hipoxiás körülmények között a vizsgált két *A. fumigatus* törzs (CEA10 és D141) *in vitro* fitnessze nagyobb volt, mint a kísérletekben használt egy-egy *A. niger* FGSC A1144, *A. flavus* NRRL3357 és *A. terreus* SBUG402 törzse, de csak alig tért el az *A. nidulans* FGSC A4-étől.

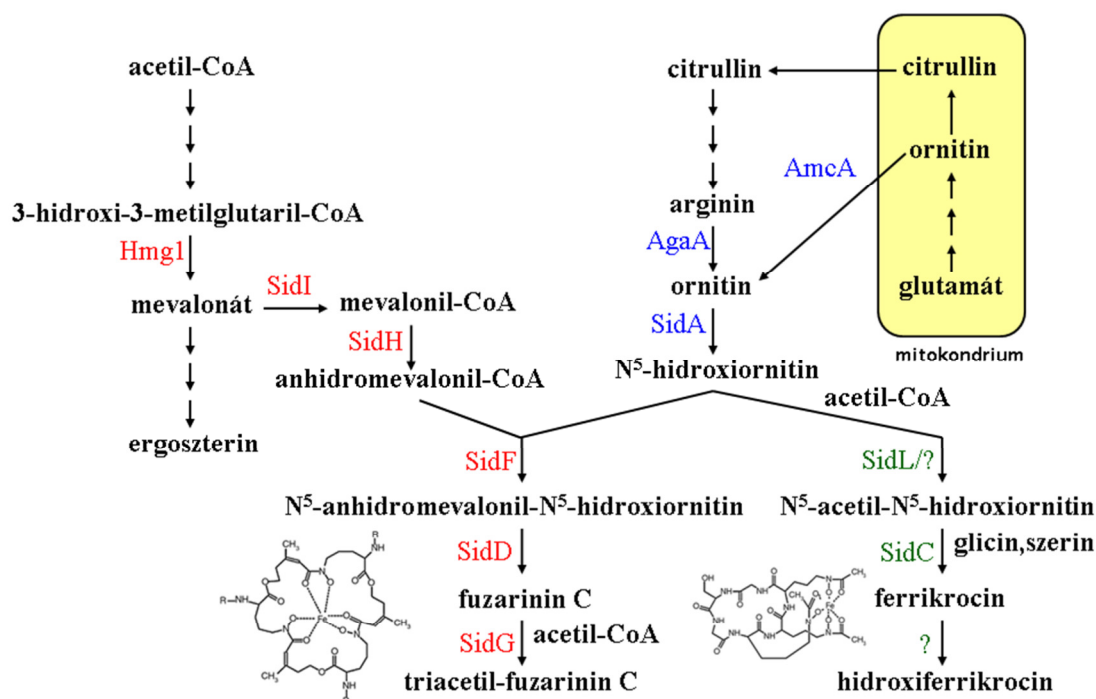
A vas a legnagyobb mennyiségben előforduló átmenetifém a sejtekben; esszenciális valamennyi élőlény számára (Andreini és munkatársai 2008). A vastartalmú metalloproteidek mellett a FeS klaszter, illetve a hem prosztetikus csoporttal rendelkező fehérjék is igényelnek vasat a működésükhöz. E fehérjék biológiai funkciója igen változatos: részt vesznek a mitokondriális elektrontranszport lánc felépítésében, szükségesek a citromsav ciklushoz, a szulfát- és nitrát asszimilációhoz, részt vesznek egyes aminosavak (pl. Leu és Lys) és lipidek (pl. ergoszterin) bioszintézisében, xenobiotikumok és peroxidok lebontásában, de fontosak a DNS szintézisben, a riboszómák összeszerelésében és szükségesek a FeS klaszterek, valamint a hem bioszintéziséhez is (Woodworth és Richter 1990, Dlouhy és Outten 2013). Az emberi szervezet mindent megtesz annak érdekében, hogy a szervezetbe bekerülő mikrobák ne

jussanak vashoz. Ez többek között vas-, illetve sziderofórkötő fehérjék szekréciójával (pl. a neutrofil granulociták és epiteliális sejtek által is termelt laktoferrin és sziderokalin), illetve a vas szekréció (a hepcidin hormon által kiváltott) gátlásával valósul meg (Ganz 2009, Weinberg 2009). Egyes vas transzportereknek (pl. Nramp1) fontos szerepe van abban, hogy a makrofágok és neutrofil granulociták fagolizoszómáinak vastartalma kicsi maradjon fertőzés alatt, ami gátolja a bekebelezett sejtek fagolizoszómán belüli osztódását (Ganz 2009, Weinberg 2009). A makrofágok transferrin receptorának repressziója szintén azt a célt szolgálja, hogy ne legyen elég vas az aktivált makrofágokon belül a mikrobák számára (Ganz 2009, Weinberg 2009). A B limfociták által termelt immunglobulinok ugyanakkor hatékonyan tudják gátolni a mikroorganizmusok sejtfelszíni vas, illetve ferri-sziderofór, transzportereit (Weinberg 2009). Az *A. fumigatus* nem képes a humán vastartalmú/vaskötő fehérjéket (pl. hemoglobin, transferrin, ferritin) közvetlenül vasforrásként használni (Schrettl 2004). A vasat (Fe^{2+} , illetve Fe^{3+}) kis affinitású vas transzporterek, a reduktív vas asszimilációs útvonal (RIA, reductive iron assimilation), illetve sziderofórok segítségével tudja felvenni (Schrettl 2004) (8-9. ábrák).



8. ábra Az *A. fumigatus* vas anyagcseréjének vázlata

1. Kis affinitású, kétértékű fémion (Fe^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+}) transzportot lehetővé tévő permeáz(ok). 2. Reduktív vas asszimilációs útvonal (RIA); FreB – ferri-reduktáz, FetC – ferrooxidáz, FtrA – nagy affinitású vas permeáz. 3. Sziderofór-függő vas transzport; TAFC – triacetyl-fusarinin C, FsC – fusarinin C, FC – ferrirocín, HFC – hidroxi-ferrirocín, MirB – ferri-sziderofór transzporter, EstB – ferri-sziderofór hidroláz. Az ábra Schrettl és Haas (2011), valamint Haas (2012) közleményei alapján készült.



9. ábra Az *A. fumigatus* sziderofór metabolizmusának vázlata

Extracelluláris/intracelluláris sziderofór szintézis (kék): AmcA – mitokondriális ornitin transzporter, AgaA – argináz, SidA – ornitin N⁵-oxigenáz. Extracelluláris sziderofór szintézis (piros): Hmg1–3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reduktáz, SidI – mevalonil-CoA ligáz, SidH – mevalonil-CoA hidratáz, SidF – hidroxiornitin transzaciláz, SidD – fuzarinin C nem riboszómális peptid szintáz, SidG – fuzarinin C acetiltranszferáz. Intracelluláris sziderofór szintézis (zöld): SidL – acetiltranszferáz, SidC – ferrikkrocin nem riboszómális peptid szintáz. Az ábra Schrettl és Haas (2011), valamint Haas (2012) közleményei alapján készült.

A háromféle útvonal közül a sziderofór-függő vas transzport jelentőségét igazolták a fertőzés alatt (Schrettl 2004, Haas és munkatársai 2008, Moore 2013, Park és munkatársai 2016), de egyes vizsgálatok a RIA lehetséges szerepet is felvetették (McDonagh és munkatársai 2008, Bertuzzi és munkatársai 2014).

A vaséhezésre adott stresszválaszt a HapX transzkripciós faktor szabályozza (Schrettl és munkatársai 2010). A HapX hatására indukálódik a sziderofór termelés és a ferri-sziderofór transzport, valamint a RIA, míg represszálódik a légzés, a citromsav ciklus, a FeS klaszterek és a hem bioszintézise is (Schrettl és munkatársai 2010). Vas hiányában a sziderofór szintézis gátlásában fontos SreA transzkripciós faktor szintén represszálódik, illetve az ergoszterin tartalom csökkenése a már említett SrbA indukcióját kiváltva is segíti a sziderofórtermelés (és a szterin szintézis) intenzifikálását (Barker és munkatársai 2012). Összehasonlító adatok a gombák vaslimitációt toleráló képességéről nem állnak rendelkezésre.

Aszpergillózisos megbetegedések esetén jellemzően azol (elsősorban vorikonazol, izavukonazol), polién (elsősorban amfotericin B) és echinocandin (elsősorban kaszopofungin, mikafungin, anidulafungin) típusú antifungális szereket használnak (Kauffman 2017). Bár a terápiát alapvetően befolyásolja a beteg immunstátusza, máj- és vesefunkciói, valamint a

terápiás előzmények is, a vorikonazol készítmények használata mondható a legáltalánosabbnak, noha újabban egyre gyakrabban javasolják a vorikonazol – echinocandin kombinált terápia alkalmazását is (Kauffman 2017). Az antifungális szerek jelenléte komoly stressz a gomba számára és természetesen a terápia kimenetelét alapvetően befolyásolja, hogy milyen mértékben képesek az egyes törzsek tolerálni, túlélni e speciális biológiai hatású molekulák jelenlétét. A dolgozat szempontjából az echinocandinok okozta stressz az érdekes.

Az echinocandinok fonalas Ascomycoták által termelt, β -1,3-glükán szintáz inhibitorok. Kémiai szerkezetüket tekintve lipopeptidek: hexapeptid gyűrűk, melyekhez zsírsavlánc kapcsolódik. Jelenleg több mint 20 echinocandin típusú szekunder metabolitot ismerünk (Emri és munkatársai 2013, Hüttel 2017). A gyógyászatban a természetes echinocandinok félszintetikus származékait használják (Campoy és Adrio 2017). Az anidulafungint és a rezafungint echinocandin B-ből (ECB), a caspofungint a pneumocandin B₀-ból, a micafungint az FR901379 molekulából, míg az aminocandint deoximulundocandinból állítják elő. Az anidulafungin, caspofungin és micafungin az FDA (Food and Drug Administration) és EMA (European Medicines Agency) által jóváhagyott forgalomban lévő termékek, míg az aminocandin és a rezafungin jelenleg klinikai vizsgálat alatt állnak (Mishra és Tiwari 2011, Campoy és Adrio 2017, Sofjan és munkatársai 2018). Az FDA által jóváhagyott félszintetikus echinocandinok számos humán patogén *Aspergillus* (*A. fumigatus*, *A. terreus*, *A. flavus* és *A. niger*) (Chandrasekar és Sobel 2006, Calvo és munkatársai 2011, Chen és munkatársai 2011, Mukherjee és munkatársai 2011, Walter és munkatársai 2011, Calvo és munkatársai 2012b) fajjal szemben hatásosak. A hatás a β -1,3-glükánszintáz komplex gátlásán, azaz a sejtfalszintézis gátlásán alapul. E molekulák a sejtekbe facilitált diffúzióval jutnak be és a citoplazma membránban található enzim komplex katalitikus alegységéhez kötődnek az intracelluláris oldal felől nem kompetitív módon (Sawistowska-Schröder és munkatársai 1984, Beaulieu és munkatársai 1994, Radding és munkatársai 1998, Paderu és munkatársai 2004, DiDone és munkatársai 2011). A gátlás az intenzív sejtfal szintézist végző régióknál (hifa csúcsok) okoz lényeges változást, de a hifa csúcsok jellemzően nem lizálnak, növekedésük azonban lassul (fungisztatikus hatás) (Bowman és munkatársai 2002, Douglas 2006). A kezelés jelentős morfológiai változást okoz: a csíratömlők megvastagodnak, sűrűn elágazó hifákból álló, kisméretű pellet alakulnak ki (mikropelletes növekedés) és a szeptumoknál a sejtek gyakran léggömb-szerűen “felfúvódnak” (Bowman és munkatársai 2002, Kurtz és munkatársai 1994a). A szubletális koncentrációban adott echinocandinok (echinocandin stressz) jelentős fiziológiai következményekkel is járnak: A megfigyelt változások közül kiemelendő a kitin szintézis indukálódása, melynek célja a sejtfal β -1,3-glükán tartalmának kitinnel való helyettesítése

(„compensatory chitin synthesis”) (Ries és munkatársai 2017). Transzkriptomikai vizsgálatok alapján a caspofungin kezelés hatására a gének 40 %-a jelentős transzkripcionális változást mutatott (Altwasser és munkatársai 2015). E vizsgálatok alapján nemcsak a kitin szintézisben, de a β -glükán szintézisben fontos gének is indukálódtak, ami együtt járt a szénhidrát anyagcserét (glikolízis, glükoneogenezis, szacharid bioszintézis) érintő több változással is (Altwasser és munkatársai 2015). Megváltozott számos transzporter gén, szterán bioszintézisben és zsírsav anyagcserében résztvevő gén aktivitása és sok szekunder anyagcsere gén transzkripciója is megnőtt (Altwasser és munkatársai 2015). Bár a melanin képes megkötni az echinocandin típusú molekulákat (is), ami csökkent echinocandin érzékenységhez vezet (Maligie és Selitrennikoff 2005, van de Sande és munkatársai 2010, Fernandes és munkatársai 2015), a melanin szintézis echinocandin kezelésre bekövetkező változásait *A. fumigatus* esetében eddig még nem sikerült kimutatni. A modellszámítások alapján a caspofungin stresszválasz szabályozásában a HOG útvonal („hierozmotikus stresszválasz szabályozása”) és a sejtfal integritási (CWI; „cell wall integrity”) útvonal („hipoozmotikus stresszválasz szabályozása”) egyaránt fontos volt (Altwasser és munkatársai 2015). Mindkét útvonalra jellemző, hogy sokféle stresszválasz szabályozásában, illetve számos virulenciát meghatározó tulajdonság kialakításában (pl. sziderofór termelés, pyomelanin szintézis, szekunder metabolitok képzése) fontosak, így gátlásuk, vagy konstitutív aktiválásuk terápiás jelentőséggel bírhat (Wiedemann és munkatársai 2016).

3. Célkitűzések

3.1 Az *Aspergillus nidulans* oxidatív stresszválasza

A gombák stresszválaszaival kapcsolatos vizsgálataink kezdetén (a 90-es évek közepén) a fonalas gombák (oxidatív) stresszválaszainak vizsgálata messze elmaradt az élesztőkéhez képest. Ahhoz, hogy a fonalas gombákat felhasználhassuk kutatásainkhoz mindenekelőtt demonstrálnunk kellett, hogy e fajokban is kiváltható az oxidatív stressz reprodukálható és stresszor specifikus módon. E vizsgálatokhoz egy ipari jelentőségű (penicillintermelő) *Penicillium chrysogenum* törzset használtunk (Emri és munkatársai 1997a, 1999), majd az itt gyűjtött tapasztalatokat adaptáltuk az *A. nidulans*-ra, hogy lehetőségünk legyen DNS chip vizsgálatok kivitelezésére is (Pócsi és munkatársai 2005). Kimutattuk, hogy az oxidatív stresszválasz nem egységes, hanem nagymértékben függ az oxidatív stresszt előidéző stresszor típusától (Pócsi és munkatársai 2005). Annak érdekében, hogy képet kapjunk az oxidatív stresszválasz szabályozásáról is, egy, a szabályozásban potenciálisan résztvevő transzkripció faktorral kezdtünk el foglalkozni. Választásunk a gombák stresszválaszait, szekunder anyagcseréjét, differenciációját és virulenciáját egyaránt befolyásoló AtfA transzkripció faktorra esett (Balázs és munkatársai 2010). Az irodalmi adatokkal összhangban (Hagiwara és munkatársai 2008, Lara-Rojas és munkatársai 2011) igazoltuk, hogy az AtfA valóban részt vesz az *A. nidulans* oxidatív stresszválaszának szabályozásában, de nem befolyásolja érdemben a gomba ozmotikus stressz érzékenységét (Balázs és munkatársai 2010). E munka folytatásaként az alábbi kérdések megválaszolását terveztük:

- Azonosíthatóak-e az oxidatív stresszválaszra általánosan jellemző gének („core oxidative stress response genes”) az *A. nidulans*-ban? Részt vesz-e az AtfA a szabályozásukban?
- Milyen AtfA-függő és AtfA-független stresszválasz elemek figyelhetők meg oxidatív stressznek kitett *A. nidulans* tenyészetekben?
- Hogyan befolyásolja az oxidatív stressz és az AtfA transzkripció faktor az *A. nidulans* szekunder anyagcseréjét?

3.2 A szénéhezésre adott stresszválasz vizsgálata az *Aspergillus nidulans* tenyészeiben

A tanszék szénéhező („öregedő”, „autolizáló”) tenyészetekkel kapcsolatos vizsgálatai a 90-es évek második felében kezdődtek egy ipari jelentőségű *P. chrysogenum* törzsszel (Pusztahelyi és munkatársai 1997a, 1997b). Az első vizsgálatok rámutattak a szénéhezésre adott stresszválasz aktív, energiaigényes, jól szabályozott természetére és a *P. chrysogenum*,

illetve az *A. nidulans* stresszválaszának sok jellegzetes elemét – többek között az intenzív ASD-t, melanizációt, a jelentős proteináz, kitináz és γ GT termelést – tárták fel (Pócsi és munkatársai 1999, Sámi és munkatársai 2001a, 2001b, Pócsi és munkatársai 2003, Sámi és munkatársai 2003, Emri és munkatársai 2004a, 2004b, 2005a). A stresszválasz szabályozásának több elemét is sikerült azonosítani (Molnár és munkatársai 2004, 2006, Emri és munkatársai 2006, 2008), köztük a FluG-BrlA útvonal jelentőségére is fény derült, ami alapján feltételeztük, hogy a konidiogenezis és a szénéhezésre adott stresszválasz között szoros kapcsolat van (Emri és munkatársai 2005a, Pócsi és munkatársai 2009). A ChiB extracelluláris kitináznak az ASD-ban betöltött szerepe szintén igazolást nyert (Pusztahelyi és munkatársai 2006, Yamazaki és munkatársai 2007, Pócsi és munkatársai 2009, Shin és munkatársai 2009). Sikerült izolálnunk egy extracelluláris proteinázt (PepJ) is, ami szénéhezés alatt a PrtA proteinázzal együtt a termelt extracelluláris proteináz aktivitás több mint felét adja (Emri és munkatársai 2009, Szilágyi és munkatársai 2011). Egy $\Delta prtA \Delta pepJ$ duplamutáns segítségével így igazolni tudtuk, hogy a proteinázoknak szerepe van a kleisztotéciumok képződésében (Emri és munkatársai 2018a). E vizsgálatok folytatásaként az alábbi célok elérését terveztük:

- Az *A. nidulans* tenyészetek transzkriptomában szénéhezés hatására végbemenő változások azonosítása; átfogó kép kialakítása a szénéhezésre adott stresszválaszról.
- Egy szénéhezés alatt szekretálódó glükánáz izolálása *A. nidulans* tenyészetekből; a fehérjét kódoló gén azonosítása, az enzim jellemzése, fiziológiai jelentőségének (különös tekintettel az ASD-ban betöltött szerepére) megismerése.
- Az ASD és a konidiogenezis közötti feltételezett kapcsolat (miszerint az ASD tápanyagokat biztosíthat a konidiogenezis számára szénéhező körülmények között) tesztelése felületi kultúrákban.
- A melanizáció okainak és fiziológiai szerepének feltérképezése.
- Az *A. nidulans* γ GT-ának izolálása, a fehérjét kódoló gén azonosítása, az enzim jellemzése, fiziológiai jelentőségének (különös tekintettel a GSH anyagcserében betöltött szerepére) megismerése.

3.3 Az *Aspergillus pachycristatus echinocandin toleranciájának vizsgálata*

Az echinocandin típusú antifungális anyagok az eddig vizsgált valamennyi *Aspergillus* fajjal szemben hatásosnak bizonyultak (Chandrasekar és Sobel 2006, Calvo és munkatársai 2011, Chen és munkatársai 2011, Mukherjee és munkatársai 2011, Walter és munkatársai 2011, Calvo és munkatársai 2012). Ugyanakkor több *Aspergillus* faj/törzs is termel

echinocandin-típusú szekunder metabolitokat (Hüttel 2017), ami arra utal, hogy szükség esetén képesek hatékonyan védekezni ezen metabolitok antifungális hatásával szemben. Az echinocandin termelő törzsek echinocandin toleranciája nemcsak orvosi mikrobiológiai szempontból lehet érdekes (segíthet megérteni, hogyan alakulhat ki rezisztencia humán patogén *Aspergillus* fajokban), de ipari mikrobiológiai jelentőséggel is bír, hiszen az echinocandin tolerancia növelése fontos része lehet túltermelő törzsek előállításának. Korábbi vizsgálatainkban kimutattuk, hogy az „*A. nidulans* var. *roseus*” ATCC 58397 (NRRL 11440) törzs nem tartozik az *A. nidulans* fajba, inkább az *A. rugulosussal* rokon (Tóth és munkatársai 2011). Később e törzset egy önálló fajba az *A. pachycristatus*ba sorolták (Matsuzawa és munkatársai 2012). Vizsgálatainkat e törzsszel végeztük és az alábbi kérdésekre kerestük a választ:

- Rendelkezik-e az ATCC 58397 törzs veleszületett echinocandin rezisztenciával?
- Hogyan védekezik e törzs a saját maga által termelt echinocandinnal szemben?

3.4 Az *Aspergillus fumigatus* stressz toleranciájának vizsgálata

Egy nemzetközi együttműködés keretében, a már ismert 8 *Aspergillus* genom mellett további 10 *Aspergillus* faj genomja lett megszekvenálva és annotálva (de Vries és munkatársai 2017). E munkához kapcsolódva 17 faj stressz toleranciájáról összehasonlító adatokat gyűjtöttünk (Orosz és munkatársai 2018) és rendelkezésünkre állt a gombák stressz toleranciájában bizonyítottan résztvevő gének (stresszgének) listája is (Karányi és munkatársai 2013). Ezen adathalmazok lehetővé tették számunkra az alábbi kérdések megválaszolását:

- Megjósolható-e egy gombafaj stressz toleranciája annak ismeretében, hogy milyen stresszgének fordulnak elő a genomjában?
- Hasonló-e a közeli rokon fajok stresszgén készlete és stressz toleranciája?
- Eltér-e az *A. fumigatus* stresszgén készlete a kisebb humánpatogén jelentőséggel bíró *Aspergillus* fajokétól?

Természetes élőhelyeiken a mikroorganizmusoknak nem egy-egy karakterisztikus stresszhatással kell szembenéznük, hanem többféle stressz, stresszor kombinációjával egy időben. Ez igaz az emberi szervezetbe bekerülő mikroorganizmusokra is. Elképzelhető, hogy az *A. fumigatus* humán patogénként mutatott sikerességét nem egy-egy stresszorral szemben mutatott kimagasló ellenálló képessége, hanem azon adottsága adja, hogy többféle stresszhez is képes hatékonyan alkalmazkodni egy időben. E lehetőség megvizsgálása érdekében az

oxidatív stresszel kombinált vaséhezés hatását tanulmányoztuk. A választásunk nemcsak azért esett erre a két stresszre, mert mindkettővel gyakran kell megbirkóznunk az emberi szervezetbe bejutó mikrobáknak, hanem mert a vastartalmú antioxidáns enzimek (katalázok, peroxidázok) oxidatív stressz elleni védekezésben mutatott jelentősége miatt várható volt, hogy e két stressz kölcsönösen befolyásolni fogja egymás hatását. Az alábbi kérdésekre kerestük a választ:

- Hogyan befolyásolja az oxidatív stressz az *A. fumigatus* vaséhezésre adott stresszválaszt?
- Megjósolható-e a kombinált stresszkezelésekben mutatott stresszválasz az egyszerű stresszkezelésekre adott stresszválaszok ismeretében?
- Melyek az oxidatív stresszel kombinált vaséhezésre adott stresszválasz lehetséges gyenge pontjai?

4. Anyagok és módszerek

4.1 Gombatörzsek, törzsfenntartás

A vizsgálatokban felhasznált gombatörzseket és legfontosabb tulajdonságaikat az 1. mellékletben foglaltam össze. A törzseket Barratt-féle minimál tápagaron (37 °C, 6 nap) (Barratt és munkatársai 1965) tartottuk fenn. Az FGSC A744 (*fluGI*) törzs esetében az inkubációs hőmérséklet 24 °C volt annak érdekében, hogy spórázását indukáljuk (Adams és munkatársai 1998). Az auxotróf törzsek esetében a tápközegek tartalmazták a megfelelő kiegészítőket (aminosavak, vitaminok, szerves bázisok) is az FGSC (Fungal Genetic Stock Centre; www.fgsc.net) által javasolt koncentrációkban (McCluskey 2003). A kísérletekhez frissen készített (6 napos) tenyészetekből származó konídiumokat, illetve az akonidiogén FGSC A1079 (*ΔbrlA*) törzs esetében micéliumot használtunk fel.

4.2 Felületi és süllyesztett kultúrák

A felületi kultúrákat szintén Barratt-féle minimál tápagaron hoztuk létre. A táptalajok leoltása pont-inokulálással (5 µl, 1×10^5 konídium/ml töménységű szuszpenzió felhasználásával) történt, majd a tenyészeteket 37 °C-on inkubáltuk.

A süllyesztett kultúrák készítéséhez Barratt-féle minimál táplevest (Barratt és munkatársai 1965) (*A. nidulans*, *A. pachyristatus* és *A. fumigatus*), Boeck és Kastner (1981) által leírt, C- és N-forrásként glükózt, szójapeptont és napraforgóolajat is tartalmazó komplex táplevest (*A. pachyristatus*), illetve ezek változatait használtunk. A tápleveseket (100 ml tápleves 500 ml-es Erlenmeyer lombikban) tipikus esetben 50 millió konídiummal (az FGSC A1079 törzs esetében 1 – 85 mm átmérőjű – Petri-csészéről származó micéliummal) oltottuk be; a tenyészetek inkubálása 37 °C-on (*A. pachyristatus* estében 24, vagy 37 °C-on) 3,1 Hz rázatás mellett történt.

4.3 A stressz indukálása, a stressztűrő képesség tesztelése

Oxidatív stresszt a tápközeghez adott MSB-tal, H₂O₂-dal, *terc*-butil-hidroperoxiddal (tBOOH), vagy diamiddal, míg sóstresszt NaCl adagolásával idéztünk elő. A stresszorok koncentrációja a törzstől és a kísérlet céljától függően változott (Emri és munkatársai 2015, Orosz és munkatársai 2017). A stressz erősségének beállításakor arra törekedtünk, hogy egyik stresszor se okozzon teljes növekedésgátlást, előkísérletekben detektálhatóak legyenek a stressz hatására bekövetkezett fiziológiai változások (pl. ROS mennyiségének növekedése

oxidatív stressz alatt) és – ha volt rá lehetőség – az alkalmazott koncentrációk legyenek hasonlóak a korábban mások által alkalmazott koncentrációkhoz. Felületi tenyészetek esetében a stresszort már a leoltás előtt a tápközeghez kevertük, míg süllyesztett kultúráknál az exponenciális fázisú tenyészetekhez adtuk. A törzsek oxidatív-, fém ion- és só stressztűrő képességét a törzsek stresszor jelenlétében mutatott növekedésével jellemeztük, amit a kezeletlen tenyészetekben mért értékek százalékában adtunk meg.

Szénéhező tenyészeteket olyan módon hoztunk létre, hogy az exponenciális fázisú tenyészetekből származó micéliumot összegyűjtöttük és szénforrás mentes tápközegben szuszpendáltuk fel (Szilágyi és munkatársai 2010a, 2010b, 2012, Spitzmüller és munkatársai 2015a, 2015b). Hasonló módon jártunk el a szénforrás limitált tenyészetek kialakításakor is, de ebben az esetben a micéliumot laktóz szénforrást tartalmazó tápközegben vettük vissza (Spitzmüller és munkatársai 2015a). A szénstressz kialakulását a *chiB* (szénstressz alatt aktív, extracelluláris kitináz kódoló gén) indukálódásának, vagy az extracelluláris kitináz aktivitások növekedésének detektálásával ellenőriztük.

A vaséhező tenyészetek kialakításakor a konídiumokkal hozzáadott vasat nem tartalmazó tápközeget inokuláltunk és megvártuk, amíg a tenyészetek felhasználták a szennyezésként jelenlévő, illetve az inokuláláskor a tenyészetbe kerülő vasat (Kurucz és munkatársai 2018b). A vaséhezés kialakulását az extracelluláris sziderofórok képződésének detektálásával ellenőriztük.

4.4 A növekedés és az életképesség detektálása

A felületi tenyészetek növekedését egy adott inkubálási idő alatt létrejövő telep átmérőjével, vagy a telepátmérő változásának sebességével jellemeztük (de Vries és munkatársai 2017, Emri és munkatársai 2018a). Minthogy a szénstressz – vizsgálataink alapján (Emri és munkatársai 2018a) – a telepátmérő növekedését serkenti, a szénstressznek kitett tenyészetek növekedését fehérjetartalmuk növekedésével is jellemeztük. Ebben az esetben a mintákat (a tenyészetekből kivágott 0,5 cm² alapterületű agar hasábokat) liofilezést követően elporítottuk, majd desztillált vízben elkevertük (Emri és munkatársai 2018a). A vizes oldat fehérjetartalmát Bradford-reagenssel határoztuk meg (Bradford 1976).

A süllyesztett kultúrák növekedését, illetve autolízisét szárazanyagtartalmuk (DCM) változásának detektálásával követtük nyomon (Pusztahelyi és munkatársai 1997a).

A süllyesztett kultúrák életképességét az egységnyi térfogatú mintákból származó micélium friss táplevesben, egységnyi idő alatt mutatott DCM növekedésével jellemeztük (Molnár és munkatársai 2006).

4.5 A konidiogenezis és a kleisztotéciumok képződésének vizsgálata

A konidiofórok, valamint az érett és éretlen kleisztotéciumok mennyiségét sztereomikroszkóp segítségével számoltuk meg a telep 9 eltérő pontján (Emri és munkatársai 2018a). A kleisztotéciumok képződést a Petri-csészék lezárásával („levegőtől való elzárásával”) indukáltuk a Kawasaki és munkatársai (2002) által leírt eljárást követve. A termelt konídium mennyiségét ismert méretű ($0,5 \text{ cm}^2$ alapterületű) agar hasábok felszínéről lemosott konídiumok koncentrációjának Bürker-kamrával történő becslésével határoztuk meg (Hagiwara és munkatársai 2007, Emri és munkatársai 2018a).

4.6 Antifungális szerekkel szembeni érzékenység vizsgálata

Az *Aspergillus* törzsek echinocandin B, illetve caspofungin érzékenységét mikrodilúciós (Arikan és munkatársai 2001) módszerrel vizsgáltuk.

4.7 Növekedést gátló szerek közötti interakció vizsgálata

A törzsek növekedését gátló szerek közötti interakció mértékét (IR) az Abbott-formula segítségével számszerűsítettük: $IR = I_o / (I_a + I_b - [I_a I_b / 100])$, ahol I_a és I_b az „a” és a „b” anyag által külön-külön, míg az I_o a két anyag által együtt okozott százalékos növekedésgátlás. Az $IR > 1,5$ esetben a két szer kölcsönhatását szinergizmusnak, míg a $IR < 0,5$ esetben antagonizmusnak tekintettük (Moreno és munkatársai 2003).

4.8 Metabolit koncentrációk mérése

A GSH, GSSG és a teljes glutation (GSH + GSSG) tartalom meghatározása a GR-DTNB (glutation reduktáz-5,5'-ditio-bis(2-nitrobenzoészav)) fotometriás módszerrel (Anderson 1985) történt. A mintákat (micéliumot) 5'-szulfoszalicilsav segítségével tártuk fel (Emri és munkatársai 1997a).

A redox egyensúly felborulását a tenyészetekhez adott 2',7'-diklórfluoreszcein diacetátból, illetve dihidroetidinből egységnyi idő alatt képződő 2',7'-diklórfluoreszcein (DCF) és etidium (Et) mennyiségével jellemeztük (Royall és Ischiropoulos 1993, Carter és munkatársai 1994). A sejtek DCF és Et tartalmát fluorimetriás módszerrel határoztuk meg az 5'-szulfoszalicilsavval feltárt mintákból (Emri és munkatársai 1997a, Halliwell és Gutteridge 2007).

A fermentlé glükóz, illetve laktóz tartalmának csökkenését a GOX-TrP (glükóz oxidáz-tormaperoxidáz) módszer (Leary és munkatársai 1992), illetve *p*-hidroxibenzoészav hidrazid (PAHBAH) tartalmú reagens (Lever és munkatársai 1973) segítségével fotometriásan követtük nyomon. A tápagar glükóz tartalmának ellenőrzésekor szintén a GOX-TrP módszert használtuk, de ebben az esetben a mintákat (0,5 cm² alapterületű agar hasábok) desztillált vízben inkubáltuk fél órán át és a folyadékfázis glükóz koncentrációját határoztuk meg (Emri és munkatársai 2018a).

Az extracelluláris sziderofórok detektálásához a mintákat (fermentlé) FeCl₃-dal kezeltük, majd a ferri-sziderofórok koncentrációját HPLC segítségével mértük meg (Hördt és munkatársai 2000, Pócsi és munkatársai 2008).

A szekunder metabolitok vizsgálatokor a liofilezett mintákat (micélium, fermentlé, vagy a teljes, a gombát is tartalmazó fermentlé) 70 v/v %-os acetonnal extraháltuk és a szterigmatocisztin mennyiségét vékonyréteg kromatográfia segítségével határoztuk meg (Klich és munkatársai 2001).

A melanin termelés vizsgálatokor a fermentlé abszorbanciájának változását követtük nyomon 405 nm-en, illetve fényképfelvételek segítségével a micélium színváltozását is rögzítettük (Szilágyi és munkatársai 2018).

4.9 *A sejtfa*l kitin tartalmának mérése

Az *A. pachycristatus* ATCC 58397 és az *A. nidulans* FGSC A4 sejtfa

l összetételét a Stevens és munkatársai (2006) által leírt protokollt követve határoztuk meg.

4.10 Enzimaktivitások detektálása

A minták enzimaktivitási értékeit fotometriás (a β -1,3-glükán szintáz esetében fluorimetriás) módszerek segítségével határoztuk meg a fermentléből, vagy az X-press-el (AB Biox, Göteborg, Svédország) feltárt micéliumból (Emri és munkatársai 1997a). Az alábbi enzimek aktivitását mértük:

– intracelluláris mérések

β -1,3-glükán szintáz (Shedletzky és munkatársai 1997), γ -glutamil transzpeptidáz (γ GT; Emri és munkatársai 1997b), glutation peroxidáz (GPx; Chiu és munkatársai 1976), glutation reduktáz (GR; Pinto és munkatársai 1984), glükóz-6-foszfát dehidrogenáz (G6PD; Emri és munkatársai 1994), kataláz (Roggenkamp és munkatársai 1974), nitrát reduktáz (Bruinenberg és munkatársai 1983) és SOD (Oberley és Spitz 1984). Az aktivitási adatokat ezen esetekben

a minták Bradford-módszerrel (Bradford 1976) meghatározott fehérjetartalmára vonatkoztattuk.

– extracelluláris mérések

β -glükózidáz (Fontaine és munkatársai 1997), β -1,3-endoglükánáz (Fontaine és munkatársai 1997), β -1,4-endoglükánáz (Fontaine és munkatársai 1997), γ GT (Spitzmüller és munkatársai 2015a), kitináz (Emri és munkatársai 2004a), proteináz (Tomarelli és munkatársai 1949). Az aktivitási adatokat ezekben az esetekben a minták térfogatára vonatkoztatva adtuk meg.

4.13 Enzimek izolálása, jellemzése

Az *A. nidulans* EngA β -1,3-endoglükánázát, ChiB kitinázát és GgtA γ GT-át (frakcionált) ammónium-szulfátos kicsapást és dialízist követően oszlopkromatográfia segítségével tisztítottuk meg. A ChiB és az EngA esetében kromatofókuszálást (Polipuffer Exchanger 94 oszlop)(Binod és munkatársai 2005, Szilágyi és munkatársai 2010a) a GgtA esetében ioncsere kromatográfiát (DEAE-Sephadex oszlop)(Spitzmüller és munkatársai 2016) használtunk.

A preparátumok tisztaságát Na-laurilszulfátos poliakrilamid gélelektroforézis (SDS-PAGE) (LeBlanc és Cochrane 1987) segítségével ellenőriztük; a fehérjesávokat Coomassie Blue festéssel tettük láthatóvá (Laemmli 1970). A gélből kivágott fehérje mintákat Dr. Darula Zsuzsa (SZBK, Szeged) azonosította MALDI-TOF MS analízissel (Pusztahelyi és munkatársai 2011).

A tisztított EngA fehérje molekulaméretét SDS-PAGE segítségével határoztuk meg, izoelektromos pontját a kromatofókuszálás eredményeként kapott legaktívabb frakció pH-jával jellemeztük (Szilágyi és munkatársai 2010a).

Az enzimek pH és hőmérséklet optimumát, valamint Michaelis konstansát a különböző pH-n, hőmérsékleten, illetve szubsztrát koncentrációk jelenlétében mért enzimaktivitás (kezdeti reakciósebesség) értékek alapján határoztuk meg (Szilágyi és munkatársai 2010a, Spitzmüller és munkatársai 2016).

Az EngA pH- és hőmérséklet-függő stabilitásának jellemzésekor a mintákat adott pH-n, illetve hőmérsékleten előinkubáltuk, majd az aktív formában megmaradt enzim mennyiségét standard körülmények között végzett enzimaktivitás méréssel határoztuk meg (Szilágyi és munkatársai 2010a).

Az EngA szubsztrát specifitását laminarin, karboximetil-cellulóz, illetve *p*-nitrofenil- β -D-glükóz szubsztrátokkal teszteltük (Fontaine és munkatársai 1997). A GgtA szubsztrát specifitását Ala, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, Met, Orn, Ser, Thr aminosavak, Gly-Gly és Cys-

Gly dipeptidek, valamint $\text{NH}_2\text{-OH}$, mint potenciális γ -glutamil akceptorok és γ -glutamil-*p*-nitroanilid (γGpNA), Gln, GSH, illetve GSSG, mint potenciális γ -glutamil donorok segítségével jellemeztük (Spitzmüller és munkatársai 2016). Az egyes reakciókban képződő tripeptid azonosítását, valamint a Gln koncentráció változását Gonda Sándor (Debreceni Egyetem, Debrecen) és Kiss-Szikszai Attila (Debreceni Egyetem, Debrecen) végezte LC-ESI-MS/MS (High-performance liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry) segítségével (Spitzmüller és munkatársai 2016).

A ChiB és EngA potenciális antifungális hatását különböző gombafajoknak (*A. nidulans* FGSC A26, *A. rugulosus* CBS171.71, *A. fumigatus* Af293, *P. nalgiovense* NCAIM F-001333, *P. chrysogenum* NCAIM 00237) a tisztított enzimek jelenlétében mutatott növekedésével jellemeztük (Szilágyi és munkatársai 2012).

4.14 RNS izolálás

Az RNS-t (teljes RNS) liofilezett micéliumból izoláltuk TRISOL reagens (Invitrogen) felhasználásával a Chomczynski (1993) által kidolgozott protokollt követve (Emri és munkatársai 2017). Az RNS minták DNáz kezelését DNáz kittel (pl. Turbo DNA-free Kit; Life Technology) végeztük.

4.15 Reverz transzkriptáz kvantitatív polimeráz láncreakció (RT-qPCR)

A gének transzkripcióját SyberGreen fluorescens festéket használó egylépéses (a reverz transzkripciót közvetlenül követi a PCR reakció) kit-ek (pl. Brilliant[®] II SYBR[®] Green QRT-PCR Master Mix kit; Stratagene) segítségével vizsgáltuk a gyártók által mellékelt leírást követve. A DNáz kezelt RNS minták minőségét előzetesen denaturáló agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük (Sambrook és Russel 2001). Referencia génként az *A. nidulans* esetében a feltételezett eEF-3 transzlációs elongációs faktor gént (AN6700) és az *actA* γ -aktin gént (AN6542; Kovács és munkatársai 2013), az *A. pachyristatus* esetében az AN6700 gén ortológját (Gene Bank JN862796; Tóth és munkatársai 2012), az *A. fumigatus* esetében az *fksI* feltételezett 1,3- β -glükán szintáz katalitikus alegység gént (Afu6g12400), a *tefl* feltételezett eEF-1 transzlációs elongációs faktor α -alegység gént (Afu1g06390), illetve a *tifl* eIF4A transzlációs iniciációs faktor gént (Afu3g08160) használtuk. A felhasznált primer (indító szekvencia) párok az alábbi közlemények mellékleteiben érhetők el: Tóth és munkatársai (2012), Szilágyi és munkatársai (2013), Emri és munkatársai (2015), Orosz és munkatársai (2017), Kurucz és munkatársai (2018a). A primereket az *Aspergillus* Genome

Database honlapján (www.aspergillusgenome.org) elérhető *A. nidulans* FGSC A4 és *A. fumigatus* Af293 genomszekvenciák alapján terveztük. Az *A. pachycristatus* esetében az *A. nidulans* FGSC A4 genom alapján tervezett primereket használtunk, de minden primerpár esetében szekvenálással (Gene Bank JN862788-94 és JN862808) ellenőriztük, hogy valóban a vizsgálni kívánt gén egy szakasza szaporodott fel a PCR reakcióban. A gének relatív transzkripcióját a ΔCP , vagy a $\Delta\Delta CP$ értékekkel jellemeztük. $\Delta\Delta CP = \Delta CP_{\text{kezelt}} - \Delta CP_{\text{kontroll}}$ és $\Delta CP = CP_{\text{referencia gén}} - CP_{\text{vizsgált gén}}$, ahol CP (crossing point) a PCR termék akkumulálódásához szükséges ciklusok száma.

4.16 DNS chip vizsgálatok

Az *A. nidulans* szénéhező tenyészeinek vizsgálatokor 4 x 44 K Agilent chip-et (Kromat Kft., Budapest) használtunk (Szilágyi és munkatársai 2013). A 60 nukleotid hosszúságú génspecifikus oligomereket tartalmazó chip-et Dr. Miskei Márton és Karányi Zsolt (Debreceni Egyetem) tervezte az eArray software és az *A. nidulans* FGSC A4 genom szekvenciájának felhasználásával (azonosító szám: 024712). A DNáz kezelést, a minták minőségének ellenőrzését, a hibridizációt, illetve a leolvasást a Kromat Kft. végezte a megfelelő Agilent protokollokat követve (Emri és munkatársai 2017). A vizsgálatokban három szénéhező, illetve három kontroll (glükózon növekvő) tenyészetből származó teljes RNS lett kezelésként 1:1:1 arányban összekeverve és a belőlük készült cRNS minták cy3, illetve cy5 festékekkel történő jelölést követően lettek a chip egy blokkjára hibridizálva („two color protocol”). Az előnormalizált nyers adatok (Agilent Feature Extraction software 9.1) LOESS normalizálását Karányi Zsolt (Debreceni Egyetem) végezte.

Az *A. nidulans* oxidatív stresszválaszának vizsgálatához szintén 60-mer, 4 x 44 K Agilent chip-et (Kromat Kft., Budapest) használtunk (Emri és munkatársai 2015, Orosz és munkatársai 2017). Az *A. nidulans* FGSC A4 legfrissebb genom adatai alapján újratervezett chip azonosítószáma 031140. A három-három biológiai ismétlésből származó és kezelésként 1:1:1 arányban elegyített teljes RNS minták – megfelelő előkészítést követően – cy3 festékkel lettek jelölve és külön-külön egy-egy blokkhoz lettek hibridizálva („one color protocol”). A prenormalizált adatok normex+offset módszerrel (Ritchie és munkatársai 2007) történő korrigálását és quantile normalizálását (Bolstad és munkatársai 2003, Smyth 2005) Dr. Antal Károly (Eszterházy Károly Egyetem, Eger) végezte. A nyers és a normalizált adatok a Gene Expression Omnibus (GEO; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) adatbázisban érhetőek el a GSE63019 azonosító számon.

4.17 RNS szekvenálás

Az *A. fumigatus* kombinatorikus stresszválaszának vizsgálatához szükséges transzkriptom adatokat új generációs RNS szekvenálással nyertük (Kurucz és munkatársai 2018b). A teljes RNS minták 12 tenyészetből (négyféle kezelés, kezelésenként három ismétléssel) származtak. A minták feldolgozását, a könyvtárkészítéstől a fastq.gz file-ok megírásáig, a Debreceni Egyetem Genomi Medicina és Bioinformatikai Szolgáltató Laboratóriumának munkatársai végezték a megfelelő Illumina protokollokat követve. A cDNS könyvtárak szekvenálása (20 millió leolvasás/minta, leolvasásonként 50 bp hosszúságig) egy Illumina HiScan SQ készülék segítségével történt. A nyers szekvencia adatok korrigálását, a szekvenciáknak az *A. fumigatus* Af293 genomjára való illesztését, az FPKM értékek (fragments per kilobase per million mapped fragments; a beazonosított fragmensek száma, osztva a kérdéses gén kbp-ban megadott hosszával és az összes beazonosított fragmens számával) kiszámítását és a differenciáltan expresszáldó gének meghatározását a CASAVA, a tophat (version 2.0.9) és a cuffdiff (version 2.2.1) programok (Trapnell és munkatársai 2009, Trapnell és munkatársai 2013) felhasználásával Dr. Antal Károly (Eszterházy Károly Egyetem) végezte. A nyers és a feldolgozott adatok a Gene Expression Omnibus (GEO; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) adatbázisban érhetőek el a GSE94818, GSM2484449, GSM2484453, GSM2484455, GSM2484458, GSM2484461, GSM2484465, GSM2484468, GSM2484470, GSM2484473, GSM2484476, GSM2484479 és GSM2484481 azonosító számokon.

5. Eredmények és megbeszélésük

5.1 Az *Aspergillus nidulans* oxidatív stresszválasza

A 3.1 alfejezetben megfogalmazott célok elérése érdekében az alábbi kísérleti elrendezésben vizsgáltuk az *A. nidulans* viselkedését: Egy $\Delta atfA$ mutáns és egy kontroll törzs exponenciális fázisú tenyészeit 0,12 mM MSB-tal, 5, illetve 75 mM H_2O_2 -dal (l- H_2O_2 és h- H_2O_2), 0,8 mM tBOOH-dal, 1,8 mM diamiddal, vagy 0,6 M NaCl-dal kezeltünk, vagy stresszkezelés nélkül (kontroll) inkubáltuk. A tenyészetekből transzkripciós (DNS chip, RT-qPCR), illetve élettani vizsgálatokhoz (enzimaktivitás mérés) is vettünk mintát annak érdekében, hogy az oxidatív stresszválasz eseményeit tanulmányozhassuk (Emri és munkatársai 2015, Orosz és munkatársai 2017).

5.1.1 Az oxidatív stressz hatása a transzkriptomra

A 6 féle stresszkezelés (5 féle oxidatív stressz és egy sóstressz) transzkriptomra gyakorolt hatását az 1. táblázatban és a 2. mellékletben foglaltam össze. Az 1. táblázat tartalmazza az adott kezelésben indukálódott („up-regulated”), illetve represszálódott („down-regulated”) gének számát.

	MSB	tBOOH	diamid	l- H_2O_2	h- H_2O_2	NaCl
<i>kontroll (THS30.3) törzs</i>						
indukált gének ¹	1574	1366	1877	153	799	1097
represszált gének ¹	1696	1441	2022	317	789	1032
<i>$\Delta atfA$ (TNJ92.4) törzs</i>						
indukált gének	1001	1902	1767	354	863	774
represszált gének	1050	1784	1845	329	835	845

1. táblázat A stresszkezelések hatása az *A. nidulans* transzkriptomára

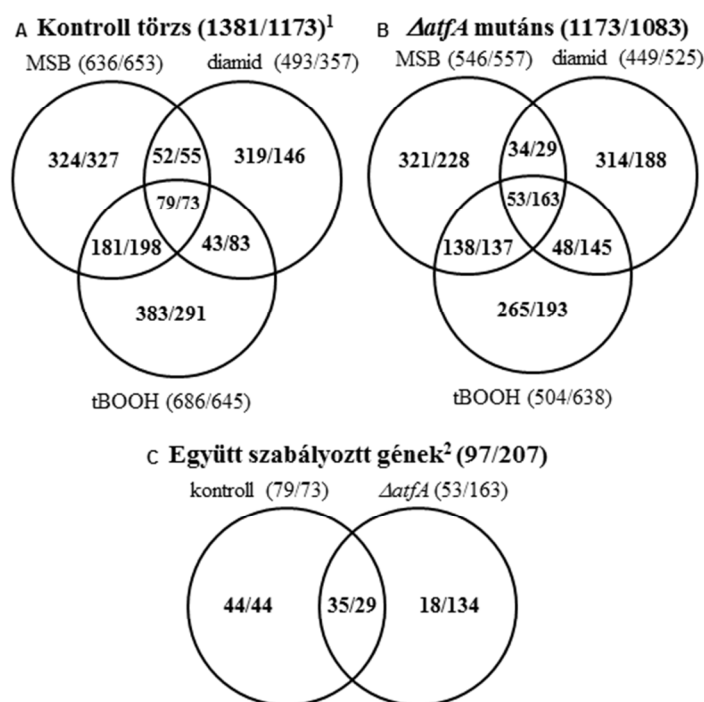
¹ – Azon gének száma, ahol a transzkripciós változás (FC) legalább kétszeres volt a kezeletlen tenyészetekhez képest. $|\log_2 FC| > 1$; $FC = I_{\text{kezelt}}/I_{\text{kezeletlen}}$; I: normalizált jelintenzitás; $\log_2 FC > 1$ – indukció („up-regulation”), $\log_2 FC < -1$ – represszió („down-regulation”).

Egyes gének (összesen 100 gén) esetében RT-qPCR segítségével is meghatároztuk a transzkripciójukban bekövetkezett változásokat (Emri és munkatársai 2015, Orosz és munkatársai 2017). A DNS chip és az RT-qPCR adatok között szoros korrelációt tapasztaltunk; a Pearson-féle korrelációs együttható értéke (a törzstől és a kezeléstől függően) 0,71 és 0,88 között változott.

A 2. melléklet azt szemlélteti, hogy ha kettő, vagy több kezelést összehasonlítunk, hány olyan gén van, amely minden esetben indukálódott, vagy minden esetben represszálódott

(együtt szabályozott gének; „co-regulated genes”), illetve hány olyan gén van, amely csak egy kezelés esetén mutatott indukciót, vagy repressziót (stressz specifikus gének). A stressz specifikus gének száma minden esetben nagynak (>3000 gén; a stressz függő gének $>50\%$ -a) adódott. Ugyanakkor az együtt szabályozott gének száma az összehasonlított kezelések számával egyre inkább csökkent (2 stressz, 1485 gén $\rightarrow$ 6 stressz, 13 gén). Ez egyben azt is jelzi, hogy attól függően, hogy melyik két/három kezelés eredményét hasonlítjuk össze, más és más lesz az együtt szabályozott gének összetétele. E tendenciákat az *atfA* gén deléciója nem változtatta meg érdemben (2. melléklet).

Egy szigorúbb paraméterek mentén megvalósított elemzés eredményét mutatja a 10. ábra. Ebben az esetben a D1 teszt (Patel és Lyons-Weiler 2004, Jordan és munkatársai 2008) alapján jelöltük ki a stressz-függő géneket és azt a három kezelést (MSB, tBOOH és diamid kezelések) hasonlítottuk össze, ahol a stressz-függő gének száma a leginkább hasonlított egymásra (10. ábra).



10. ábra Az MSB, tBOOH és diamid kezelés hatása az *A. nidulans* transzkriptomára

¹ – Az ábrákon az indukálódott/represszáldott gének száma van feltüntetve (kezelt vs. kezeletlen). $D1 > 3$ – indukció („up-regulation”); $D1 < -3$ – represszió („down-regulation”). ² – Együtt szabályozott gének („co-regulated genes”) – mindhárom kezelésben indukálódott, vagy mindhárom kezelésben represszáldott gének.

A végeredmény itt is hasonló volt: a stressz specifikusan szabályozott gének száma mintegy 3-4,4-szerese (kontroll törzs), illetve 2-2,5-szerese ($\Delta atfA$ mutáns) volt az együtt szabályozott gének számának. A 10C ábrán az is látszik, hogy bár az együtt szabályozott gének száma hasonló volt a kontroll és a mutáns törzsben, a két génecsoporthoz 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.

Gasch és munkatársai (2000) 13 stressznek a *S. cerevisiae* transzkriptomára gyakorolt hatását megvizsgálva azt tapasztalták, hogy a gének egy része (868 gén) minden esetben indukálódott (283 gén), vagy minden esetben represszálódott (585 gén) a stresszor típusától függetlenül. E gének által közvetített stresszválaszt nevezték el környezeti stresszválasznak (ESR; Environmental Stress Response) (Gasch és munkatársai 2000, Gasch 2003). A transzkriptom hasonló viselkedését írták le a *Candida glabrata* (752 ESR gén; Roetzer és munkatársai 2008) és a *Lachancea kluyveri* (880 ESR gén; Brion és munkatársai 2016) élesztőkkel folytatott vizsgálatok alapján is. A *S. pombe* esetében ugyanakkor csak 140 (Chen és munkatársai 2003), míg a *C. albicans* esetében csak 61 (Enjalbert és munkatársai 2006) olyan gént találtak melyek a stressz típusától függetlenül ugyanúgy reagáltak a kezelésekre. Érdeemes kiemelni, hogy a fenti vizsgálatokban az indukálódott, represszálódott és együtt szabályozott géneket igen eltérően definiálták. Elképzelhető, hogy egy egységes szempontok szerinti elemzés egységesebb képet eredményezett volna. Az *A. nidulans* esetében tapasztaltak, miszerint 1) az együtt szabályozott gének száma meredeken csökkent az összehasonlított stressz-kezelések számával, 2) A stressz specifikus gének száma, részaránya nagy volt és 3) egy stressz érzékenységet befolyásoló mutáció (*atfA* deléción) hatására jelentősen megváltozott az együtt szabályozott gének összetétele, azonban arra engednek következtetni, hogy a stresszválaszok közötti átfedés a gének szintjén nem konzervatív. Azaz ha egy összehasonlításban néhány gén együtt szabályozódik, az nem jelenti szükségszerűen azt, hogy más kezelések hatásának összevetésekor is ugyanezt fogjuk tapasztalni. 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. A transzkriptom szintjén detektált (oxidatív) stresszválaszok – legalábbis e fajnál – egyediek, ami a gének igen komplex és flexibilis szabályozottságára utal.

5.1.2 A transzkriptom változásai által megjósolható néhány stresszválasz elem

A stressz-függő génekhez köthető biológiai folyamatok azonosítása érdekében géncsoport dúsulási vizsgálatokat („gene set enrichment analysis”) végeztünk az MSB,

tBOOH és diamid stresszkezelésekben indukálódott, illetve represszálódott gének csoportján belül (2. táblázat). Az egyedi (stressz specifikus) transzkriptom adatokkal összhangban (10. ábra) több olyan biológiai folyamatot is azonosítottunk, mely a három vizsgált stresszválasz közül csak az egyikre volt jellemző:

MSB kezelés hatására számos, az ER működéséhez köthető gén represszálódott. Az ER a mitokondrium után az egyik legfontosabb ROS (többek között $\bullet\text{O}_2^-$) termelő sejtorganelum, részben a fehérjék oxidatív feltekeredése („oxidative folding”), részben az ER membránon lokalizált NADPH oxidáz enzimek jelenléte miatt (Tan és munkatársai 2009, Rinnerthaler és munkatársai 2012). Az ER-függő folyamatok gátlása a $\bullet\text{O}_2^-$ -t termelő MSB jelenlétében így egy hatékony, a ROS homeosztázis megőrzését célzó védekezési mechanizmusnak fogható fel. Minthogy a FeS klaszter fehérjék különösen érzékenyek a $\bullet\text{O}_2^-$ -ra (Perez-Gallardo és munkatársai 2013, Popovic-Bijelic és munkatársai 2016) az sem meglepő talán, hogy az MSB kezelés a FeS klaszter fehérjék képződésében résztvevő gének egy részét aktiválta („a meghibásodott FeS klaszter fehérjék pótlása”), míg a citromsav ciklus génjeinek egy részét, beleértve a szukcinát dehidrogenáz komplex alegységeit kódoló géneket is, represszálta („a felesleges FeS klaszter fehérjék szintézisének visszaszorítása”) (2. táblázat).

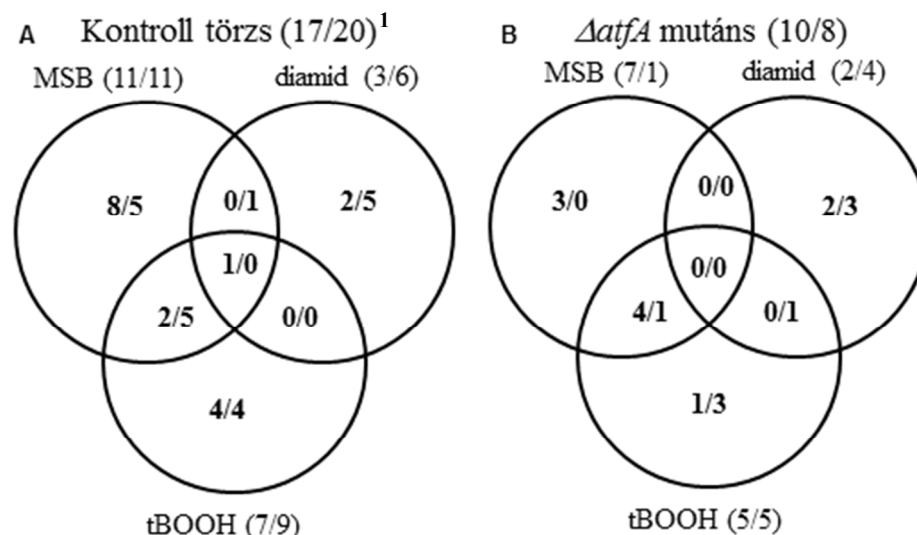
A tBOOH kezelés a peroxiszómák működéséhez köthető folyamatok (transzkripcionális szintű) aktiválódásával járt együtt (2. táblázat). Feltehetőleg e változások háttérében a tBOOH lipidperoxidációt indukáló hatása (Davies 1989) és a károsodott és/vagy az oxidatív stresszre érzékeny telítetlen zsírsavak lebontása állhatott. Meglepő módon a sziderofór bioszintézis út génjeinek indukálódása szintén jellemző volt a tBOOH indukált stresszre (2. táblázat). Több irodalmi adat is utal arra, hogy a sziderofór anyagcsere részt vesz az oxidatív stressz elleni védekezésben. Az *Escherichia coli* esetében az enterobaktin bioszintézise csökkenti a sejtek oxidatív stresszel szembeni érzékenységet és e hatás független a sziderofór vaskötő képességétől (Peralta és munkatársai 2016). Sőt, indirekt adatok szintén azt sugallják, hogy a sziderofór anyagcsere gátlása csökkenti az *A. fumigatus* oxidatív stressz toleranciáját is (Brandon és munkatársai 2015). A két folyamat (oxidatív stressz elleni védekezés és sziderofór anyagcsere) közötti kapcsolat természetének megértése azonban még további vizsgálatokat igényel. A sérült FeS klaszterrel rendelkező, vagy más vastartalmú fehérjék pótlása, illetve az oxidatív stressz alatt felszabaduló vas, Fe(III) formában történő megkötése és biztonságos tárolása kézenfekvőnek tűnő lehetőségek. Az *E. coli* példája ugyanakkor azt sugallja, hogy ennél lényegesen összetettebb is lehet a kapcsolat (Peralta és munkatársai 2016).

A géncsoport ¹ neve	típusa ²	Kontroll törzs ³			<i>ΔatfA</i> mutáns ³		
		MSB	tBOOH	Diamid	MSB	tBOOH	Diamid
ER fehérjék	GO	represszió					
ER-Golgi transzport	GO	represszió			represszió		
FeS klaszter szintézis	GO	indukció			indukció		
Citromsav ciklus	FunCat	represszió					
Peroxiszómális fehérjék	GO		indukció				
Peroxiszómális transzport	FunCat		indukció			indukció	
Zsírsavak β-oxidációja	GO		indukció			indukció	
Sziderofór bioszintézis	S		indukció			indukció	
Riboszóma biogenezis	GO	represszió	represszió	represszió	represszió	represszió	represszió
Mitotikus sejtosztódás	GO	represszió	represszió	represszió			
Antioxidáns enzim	S	indukció	indukció	indukció	indukció	indukció	indukció
Jelátvitel	GO	indukció/ represszió	indukció/ represszió	represszió	indukció/ represszió	indukció	
Kétkomponensű szignál transzdukciós rendszer	FunCat	indukció					

2. táblázat Az MSB, tBOOH és dimaid kezelés által a kontroll (THS30.3), illetve a *ΔatfA* (TNJ92.4) törzsben indukált, vagy represszált gének funkció szerinti csoportosítása

¹ – A táblázat csak néhány fontosnak ítélt géncsoportot tartalmaz. A géncsoport dúsulási vizsgálatok összes adata elérhető az Orosz és munkatársai (2017) közlemény mellékleteiben. ² – GO – A géncsoport a kérdéses „biological process GO term” génjeit tartalmazza (*Aspergillus* Genome Database; <http://www.aspergillusgenome.org>). FunCat – A géncsoport a megfelelő „FunCat term” (FungiFun2 szerver; <https://elbe.hki-jena.de/fungifun/fungifun.php>) génjeiből áll. S – Általunk létrehozott géncsoport. A géncsoport definíciója és a géncsoportba tartozó gének listája az Orosz és munkatársai (2017) közleményben és mellékleteiben érhető el. ³ – Indukció/Represszió – szignifikáns (Fisher-féle egzakt teszt; $p < 0,05$) dúsulás az adott kezelésben indukálódott/represszáldott gének (10. ábra) csoportján belül.

A jelátvitelben résztvevő gének esetében fontos kihangsúlyozni, hogy ez a géncsoport funkcionálisan nem szükségszerűen összetartozó génekből áll. Bár mindhárom kezelésben jelentős volt a represszált gének száma, sőt MSB, illetve tBOOH kezeléseknél az indukálódott gének száma is (2. táblázat), e gének stressz specifikusan viselkedtek (11. ábra).

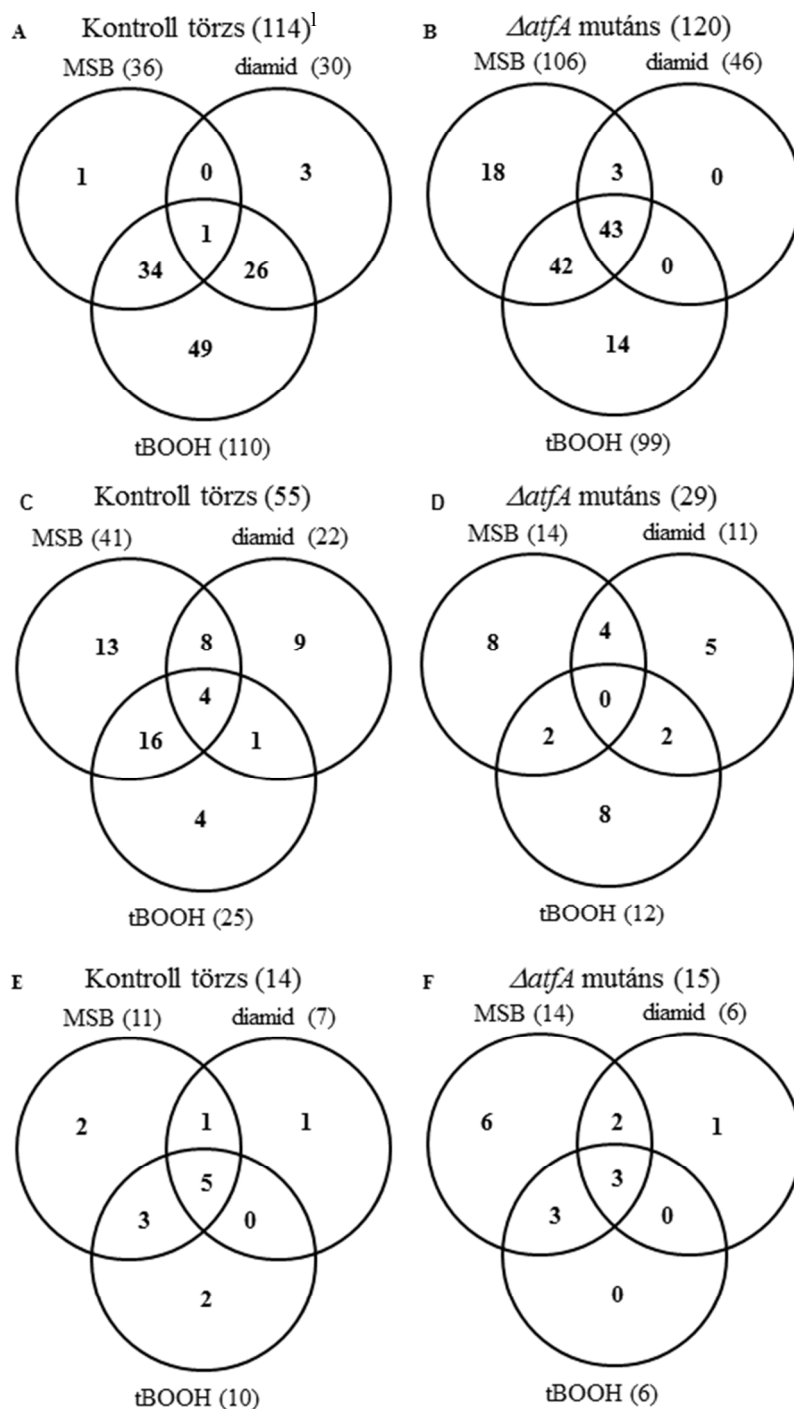


11. ábra A jelátvitelben érintett indukálódott/represszált gének megoszlása a három stresszkezelés között a kontroll (THS30.3; A), illetve a $\Delta atfA$ (TNJ92.4; B) törzsben.

¹ – Az ábrákon az indukálódott/represszált gének száma van feltüntetve (kezelt vs. kezeletlen). D1 > 3 – indukció („up-regulation”); D1 < -3 – represszió („down-regulation”).

E viselkedés összhangban van azzal, hogy az eltérő oxidatív stresszek esetében eltérő gének transzkripciója változik meg (10. ábra), ami a jelátviteli hálózat eltérő működését is feltételezi.

A stresszválaszok transzkriptom szinten megfigyelt egyedisége ellenére több géncsoport esetében is azt tapasztaltuk, hogy indukciójuk, illetve repressziójuk mindhárom stresszkezelésre jellemző volt (2. táblázat). A riboszómák képződéséhez szükséges gének és a mitotikus sejtosztódásban közreműködő gének represszióját, valamint az antioxidáns gének indukcióját sokféle, oxidatív stressznek kitett sejtben megfigyelték már (Farr és Kogoma 1991, Toledano és munkatársai 2003, Morano és munkatársai 2012, Imlay 2013). Az első két géncsoport represszállódását egyfelől azzal magyarázzák, hogy a növekedés ütemének lassulásával, a növekedés leállításával anyagot és energiát spórol meg a sejt, amit az oxidatív stressz elleni védekezéshez tud felhasználni. Másfelől e folyamatok gátlása segít megakadályozni a hibás működésből (a nem megfelelő replikáció, transzláció, citokinezis, stb.) származó nem kívánt, gyakran letális következményeket (Gasch 2003). Fontos kihangsúlyozni, hogy a mindhárom kezelés hatására indukciót/repressziót mutató folyamatok hátterében nem szükségszerű, hogy együtt szabályozott gének álljanak (12. ábra).



12. ábra A represszáldott riboszóma biogenezis (A, B) és mitotikus sejtosztódás (C, D) gének, valamint az indukálódott antioxidáns enzim gének (E, F) megoszlása a három stresszkezelés között a kontroll (THS30.3; A, C, E), illetve a *ΔatfA* (TNJ92.4; B, D, F) törzsben

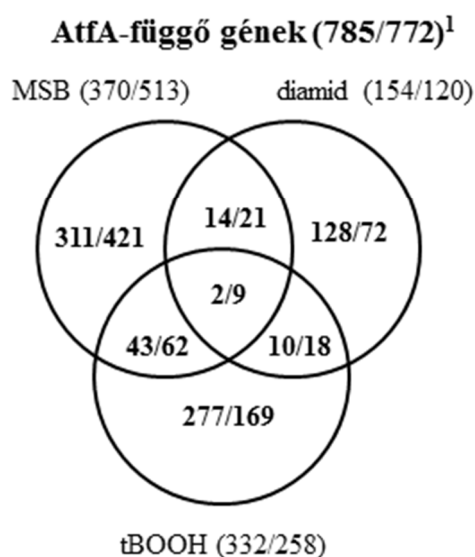
¹ – Az ábrákon az indukálódott, illetve represszáldott gének száma van feltüntetve (kezelt vs. kezeletlen). D1 > 3 – indukció („up-regulation”); D1 < -3 – represszió („down-regulation”).

A legkarakterisztikusabb példát a riboszóma biogenezis gének képviselik: 114 repressziót mutató gén közül, csak egy olyan volt, amely mindhárom stressz alatt represszáldott (12A ábra). Azaz, ha a stresszválaszok transzkriptom szinten egyediek, az nem jelenti azt, hogy a sejtek fiziológiájában ne lehetnének jelentősebb átfedések. A riboszóma biogenezis gének

azért is egy érdekes csoport, mert ebben az esetben az AtfA hiánya érdemi változást a stressz-függő gének számában nem okozott, viszont jelentősen megnövelte (egyről 43-ra) az együtt szabályozott gének számát (12A és 12B ábrák). Ennek legvalószínűbb magyarázata az lehet, hogy a Δ atfA törzs oxidatív stressz érzékenysége nagyobb, mint a kontroll törzsé, így nem meglepő, hogy a riboszóma biogenezis gének esetében is erősebben reagált az MSB és diamid kezelésekre, mint a kontroll törzs. E géncsoport viselkedése is arra utal, hogy a stresszválaszok flexibilis szabályozás alatt állnak és az, hogy mikor milyen gének kerülnek be az együtt szabályozott gének csoportjába, az a kísérlet paramétereitől nagymértékben függ. Érdemesebb lehet ezért, az *A. nidulans* esetében, általános stresszválasz gének helyett inkább általános stresszválasz elemekről beszélni. Azaz nem közvetlenül a gének indukcióját/represszióját célszerű vizsgálni, hanem inkább az általuk meghatározott folyamatokét.

5.1.3 Az atfA géndelécio hatása az *A. nidulans* oxidatív stresszválaszaira

Az MSB-tal, tBOOH-dal és a diamiddal kezelt tenyészetekben az AtfA transzkripció faktor hiánya 785 gén indukcióját, illetve 772 gén represszióját akadályozta meg (13. ábra).



13. ábra Az AtfA-függő gének megoszlása az MSB-tal, tBOOH-val, illetve diamiddal kezelt tenyészetek között

¹ – Az ábrán az indukálódott/represszáldott AtfA-függő gének száma van feltüntetve. AtfA-függő indukció: $D1_{\text{kezelt (kontroll törzs) vs. kezeletlen (kontroll törzs)}} > 3$ és $D1_{\text{kezelt (\Delta atfA mutáns) vs. kezeletlen (\Delta atfA mutáns)}} \leq 3$; AtfA-függő represszió: $D1_{\text{kezelt (kontroll törzs) vs. kezeletlen (kontroll törzs)}} < -3$ és $D1_{\text{kezelt (\Delta atfA mutáns) vs. kezeletlen (\Delta atfA mutáns)}} \geq -3$ (függetlenül attól, hogy mekkora a $FC_{\text{kezelt (kontroll törzs) vs. kezelt (\Delta atfA mutáns)}}$ értéke).

A legtöbb AtfA-függő gént (883 gén) az MSB stresszkezelés alatt figyeltük meg; ez az AtfA-függő gének 57 %-a. A legtöbb gén csak egyféle stresszkezelés alatt mutatott AtfA-függést és

összesen csak 11 gén esetében tapasztaltuk, hogy mindhárom kísérletben AtfA-függő volt az indukciójuk, illetve repressziójuk (13. ábra). Azaz az *atfA* gén deléciója stressz specifikusan befolyásolta a transzkriptom változását. Az *atfA* deléció hatására amellet, hogy egyes gének elvesztették stressz-függő viselkedésüket (13. ábra), más gének éppen a mutáns törzsben váltak stresszre indukálhatóvá/represszálhatóvá (3. táblázat). Összesen 704 olyan gén indukálódott, vagy represszálódott a mutánsban, amely a kontroll törzsben jelentős transzkripciós változást nem mutatott (3. táblázat). Sok gén a kontroll és a mutáns törzsben is stressz-függő módon viselkedett, de e viselkedés eltérő stresszek esetén volt megfigyelhető (3. táblázat). A legnagyobb számban azon gének voltak (312 gén), melyek a kontroll törzsben csak tBOOH hatására, míg a $\Delta atfA$ mutánsban MSB hatására (is) indukálódtak/represszálódtak (3. táblázat).

A gén viselkedése ¹		
a kontroll törzsben	a $\Delta atfA$ mutánsban	A gének száma
tBOOH kezelésben stressz-függő gén (de MSB kezelés alatt nem)	MSB kezelésben stressz-függő gén	312
tBOOH kezelésben stressz-függő gén (de diamid kezelés alatt nem)	diamid kezelésben stressz-függő gén	120
MSB kezelésben stressz-függő gén (de tBOOH kezelés alatt nem)	tBOOH kezelésben stressz-függő gén	94
MSB kezelésben stressz-függő gén (de diamid kezelés alatt nem)	diamid kezelésben stressz-függő gén	88
diamid kezelésben stressz-függő gén (de MSB kezelés alatt nem)	MSB kezelésben stressz-függő gén	81
diamid kezelésben stressz-függő gén (de tBOOH kezelés alatt nem)	tBOOH kezelésben stressz-függő gén	52
nem stressz-függő gén	MSB kezelésben stressz-függő gén	345
nem stressz-függő gén	tBOOH kezelésben stressz-függő gén	265
nem stressz-függő gén	diamid kezelésben stressz-függő gén	225
	összesen:	704

3. táblázat Az *atfA* deléció hatása a gének stressz-függő viselkedésére

¹ – A táblázatban a stressz-függő gének ($|D1_{\text{kezelt vs. kezeletlen}}| > 3$) száma van feltüntetve. Egy részletesebb elemzés az Orosz és munkatársai (2017) közlemény mellékletei között található.

Az AtfA-függő szabályozást mutató génekkel kapcsolatos géncsoport dúsulási vizsgálatok fontosnak ítélt eredményeit a 4. táblázat mutatja. A nitrát hasznosítási génklaszter (*niaD*, *niiA*, *crnA*; Johnstone és munkatársai 1990) génjei és a „kétkomponensű szignál transzdukciós rendszer” FunCat kategóriába sorolt sok gén esetében a DNS chip segítségével mért transzkripciós változás az indukció/represszió definíciójában meghatározott határérték

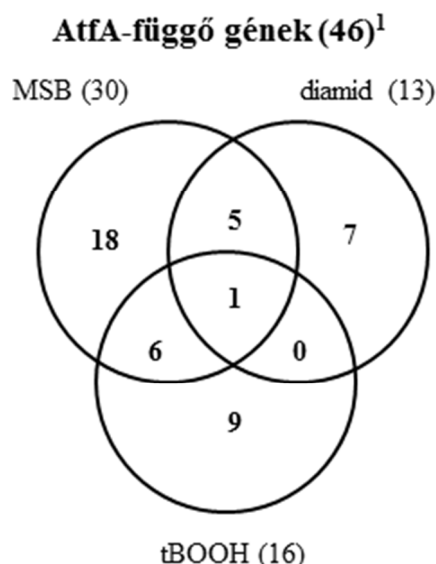
közelében mozgott. E gének által kódolt mRNS-ek mennyiségében bekövetkezett változást RT-qPCR segítségével is meghatároztuk, illetve a nitrát reduktáz esetében a specifikus enzimaktivitási értékeket is lemértük (3. melléklet). A fenti adatok alapján az AtfA igen sokféle folyamatot befolyásol és hatása stressz specifikus.

A géncsoport ¹ neve	típusa ²	AtfA-függésének stresszfüggése ³		
		MSB	tBOOH	diamid
FeS klaszter szintézis	GO	indukció		
ER-Golgi transzport	GO	represszió		
Citromsav ciklus	FunCat	represszió		
α -Aminosav metabolizmus	GO		indukció	
Peroxiszómális transzport	FunCat		indukció	
Zsírsvav metabolizmus	GO		indukció	
Légzés	FunCat		represszió	
Riboszóma biogenezis	GO		represszió	
Mitotikus sejtosztódás	GO	represszió	represszió	represszió

4. táblázat Az AtfA-függő gének funkció szerinti csoportosítása

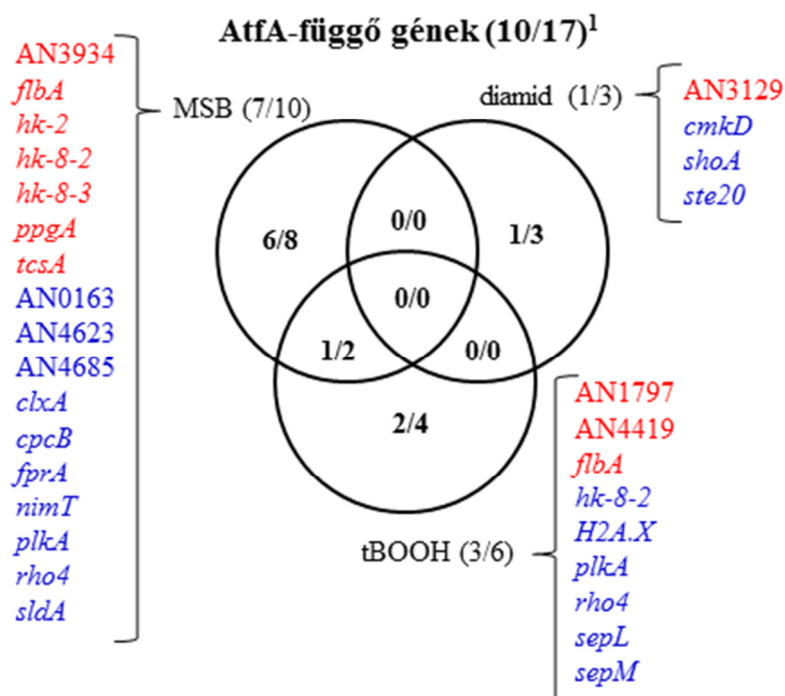
¹ – A táblázat csak néhány fontosnak ítélt géncsoportot tartalmaz. A géncsoport dúsulási vizsgálatok összes adata elérhető az Orosz és munkatársai (2017) közlemény mellékleteiben. ² – GO – A géncsoport a kérdéses „biological process GO term” génjeit tartalmazza (*Aspergillus* Genome Database; <http://www.aspergillusgenome.org>). FunCat – A géncsoport a megfelelő „FunCat term” (FungiFun2 szerver; <https://elbe.hki-jena.de/fungifun/fungifun.php>) génjeiből áll. S – Általunk létrehozott géncsoport. A géncsoport definíciója és a géncsoportba tartozó gének listája az Orosz és munkatársai (2017) közleményben és mellékleteiben érhető el. ³ – Indukció/Represszió – szignifikáns (Fisher-féle egzakt teszt; $p < 0,05$) dúsulás az adott kezelésben AtfA-függő indukciót/repressziót mutató gének csoportján belül.

Még a mitotikus sejtosztódásban közreműködő génekre is az volt jellemző, hogy eltérő stressz alatt eltérő gének mutattak AtfA-függést (14. ábra), bár e géncsoport represszálódó, AtfA-függő génjeinek száma (aránya) mindhárom kezelésben szignifikánsnak adódott (4. táblázat). A fentiekkel összhangban a jelátvitelben fontos gének AtfA-függése szintén stressz specifikus volt (15. ábra). Meglepő módon az antioxidáns enzimeket kódoló gének transzkripcióját és az antioxidáns enzimek specifikus aktivitását (3. melléklet) sem befolyásolta érdemben az *atfA* gén hiánya, noha több vizsgálat is rámutatott arra, hogy az AtfA/Atf1 képes aktiválni a katalázt, illetve a GPx-t kódoló gének transzkripcióját (Nakagawa és munkatársai 2000, Balázs és munkatársai 2010, Jaimes-Arroyo és munkatársai 2015).



14. ábra A stressz hatására repressziót mutató, AtfA-függő mitotikus sejtosztódás gének megoszlása az MSB-tal, tBOOH-val, illetve diamiddal kezelt tenyészetek között

¹ – Az ábrán a represszáldott AtfA-függő gének száma van feltüntetve. AtfA-függő represszió: $D1_{\text{kezelt (kontroll törzs) vs. kezeletlen (kontroll törzs)}} < -3$ és $D1_{\text{kezelt (\Delta atfA mutáns) vs. kezeletlen (\Delta atfA mutáns)}} \geq -3$ (függetlenül attól, hogy mekkora a $FC_{\text{kezelt (kontroll törzs) vs. kezelt (\Delta atfA mutáns)}}$ értéke).



15. ábra Az AtfA-függő jelátvitelben közreműködő gének megoszlása az MSB-tal, tBOOH-val, illetve diamiddal kezelt tenyészetek között

¹ – Az ábrán az indukálódott/represszáldott AtfA-függő gének száma van feltüntetve. AtfA-függő indukció: $D1_{\text{kezelt (kontroll törzs) vs. kezeletlen (kontroll törzs)}} > 3$ és $D1_{\text{kezelt (\Delta atfA mutáns) vs. kezeletlen (\Delta atfA mutáns)}} \leq 3$; AtfA-függő represszió: $D1_{\text{kezelt (kontroll törzs) vs. kezeletlen (kontroll törzs)}} < -3$ és $D1_{\text{kezelt (\Delta atfA mutáns) vs. kezeletlen (\Delta atfA mutáns)}} \geq -3$ (függetlenül attól, hogy mekkora a $FC_{\text{kezelt (kontroll törzs) vs. kezelt (\Delta atfA mutáns)}}$ értéke). A halmazok mellett az adott halmazhoz tartozó AtfA-függő indukciót (piros), illetve AtfA-függő repressziót (kék) mutató gének vannak feltüntetve.

A háttérben feltehetőleg az áll, hogy az antioxidáns fehérjék génjeinek működését többféle transzkripció faktor is szabályozza oxidatív stressz alatt (*A. nidulans* esetében ilyen transzkripció faktor például a NapA és az SrrA; Asano és munkatársai 2007, Mendoza-Martínez és munkatársai 2017), így indukciójuk AtfA hiányában is végbemehet és a kísérleti elrendezéstől (stressz erőssége, mintavétel ideje, törzs genotípusa) függ, hogy lehet-e különbséget detektálni a kontroll és a mutáns törzs között.

A fentiek alapján az *atfA* gén deléciója következtében az oxidatív stressznek kitett tenyészetek transzkriptomában bekövetkezett változásokra a következők voltak jellemzőek:

1) Jelentős a közvetett hatás. AtfA hiányában igen sok (13. ábra) és sokféle biológiai folyamathoz köthető (4. táblázat, 3. melléklet) gén aktivitása változott meg és nagyjából azonos arányban voltak detektálhatóak AtfA-függő indukciót, illetve AtfA-függő repressziót mutató gének (13. ábra). E változások megmagyarázhatóak, ha feltételezzük, hogy az AtfA (közvetlenül, vagy közvetve) jelátvitelben fontos gének működését (is) befolyásolja. Az AtfA-függő viselkedést mutató jelátviteli gének közül a kétkomponensű szignál transzdukciós rendszer elemei (*tcsA*, *hk-2*, *hk-8-2*, *hk-8-3*, valamint a *phkB* és *hk-8-6*; 15. ábra, 3. melléklet) különösen érdekesek. Sok, ebbe a csoportba tartozó fehérjéről, köztük a TcsA hisztidin kinázról is kimutatták, hogy részt vesz a HogA(SakA) MAPK útvonal és így az AtfA működésének a szabályozásában (Hagiwara és munkatársai 2009, Miskei és munkatársai 2009). Az *A. fumigatus* esetében a SakA és az MpkC MAPK-ok az *atfA* és *atfB* gének mellett szintén részt vesznek olyan hisztidin kinázok indukálásában, melyek befolyásolják e két MAPK aktivitását (Pereira Silva és munkatársai 2017). Elképzelhető, hogy az AtfA a kétkomponensű szignál transzdukciós fehérjékre gyakorolt hatása révén jelentősen modulálja a jelátviteli hálózat működését és ezen keresztül a stresszválaszokat. Minthogy a legtöbb hisztidin kináz az MSB stressznek kitett tenyészetekben indukálódott (4. táblázat, 3. melléklet), így az sem meglepő, hogy az AtfA hiányának következményei éppen az MSB stressz alatt voltak a legnagyobbak (13. ábra).

2) Jelentős az indirekt hatás. AtfA hiányában igen sok gén vált stressz-függővé, illetve sok stressz-függő gén olyan kezelésekben is stressz-függést mutatott, amelyekben AtfA jelenlétében nem (3. táblázat). Az együtt szabályozott gének viselkedésének háttérében is ez állt: Az *atfA* deléció hatására új gének kerültek be ebbe a csoportba (azaz megváltozott e gének stressz-specifitása), így az együtt szabályozott gének mennyisége nem csökkent, a géncsoport összetétele azonban megváltozott (10. ábra). E változások alapján feltételezhető, hogy az AtfA részt vesz jelátviteli folyamatok gátlásában. Ez jelenthet direkt gátlást (az AtfA megakadályozza valamely jelátviteli útvonal működését), de jelenthet – és feltehetőleg ebből van több – indirekt gátlást is: AtfA hiányában a stresszválasz nem elég gyors/adekvát, ami

erősebb stresszhatáshoz, illetve másodlagos stresszhatások aktiválódásához és ezen keresztül új stresszválasz elemek aktiválódásához vezet.

3) Jelentős a stressz specifikus hatás. Az *atfA* gén inaktiválása eltérő stresszkezelésekben eltérő gének működését változtatta meg (13-15. ábra, 4. táblázat). E változások megmagyarázhatóak, ha feltételezzük, hogy az AtfA együttműködik más transzkripciós faktorokkal és/vagy jelátviteli fehérjékkel és bizonyos géneket csak ezen együttműködés révén tud szabályozni. Attól függően, hogy milyen fehérjével lép kölcsönhatásba, eltérő gének működése fog megváltozni. Amennyiben az együttműködő partner jelenléte/aktivitása stressz specifikus, úgy az *atfA* delécio hatása is stressz specifikus lesz. Az együttműködés lehet direkt fizikai interakció, azaz egy fehérje-komplex kialakulására van szükség ahhoz, hogy az AtfA hatása érvényesüljön, de a kooperáció más módon is megvalósulhat (pl. egy aktiváló transzkripciós faktor hatása csak akkor tud érvényesülni, ha előtte egy gátló transzkripciós faktor hatása megszűnik). Az, hogy bZIP típusú transzkripciós faktorok heterodimert képezve (is) ki tudják fejteni hatásukat, régóta ismert (Reinke és munkatársai 2013). A *S. pombe* Atf1 fehérjeje a Pcr1 bZIP transzkripciós faktorról képez heterodimert, és a legtöbb, az Atf1 által közvetlenül szabályozott gént ez a dimer aktiválja (Sansó és munkatársai 2008). Az Atf1 ugyanakkor a Cid2 poli(A) polimerázhoz kapcsolódva is ki tudja fejteni aktiváló hatását néhány gén esetében (Vo és munkatársai 2016). Az AtfB (az AtfA paralógja) az AP-1 bZIP fehérjével alkot heterodimert az *A. parasiticus* gombában (Roze és munkatársai 2011), míg az *A. nidulans* esetében az AtfA és az AtfB között tételeznek fel fizikai interakciót (Lara-Rojas és munkatársai 2011).

A fent említett „közvetett”, „indirekt” és „stressz specifikus” hatások természetesen más transzkripciós faktor, illetve jelátviteli fehérje gének inaktiválása esetén is megfigyelhetők és e transzkripciós változások komoly problémát okoznak a transzkripciós faktor/jelátviteli útvonal által közvetlenül szabályozott gének azonosításakor. Jelenlétük, erősségük ugyanakkor igen informatív; azt demonstrálják, hogy a kérdéses fehérje fontos eleme a jelátviteli hálózat működésének, hiánya csak a transzkriptom jelenős mértékű megváltozásával ellensúlyozható. Az AtfA feladata feltehetőleg nem az, hogy egy jól meghatározott géncsoportot bekapcsoljon oxidatív stressz alatt és e gének által kódolt fehérjék megvédjék a sejteket a ROS-tól, hanem inkább az, hogy modulálja a jelátviteli hálózat működését stressz alatt és ezáltal lehetővé tegye az adott stresszben legelőnyösebb stresszválasz kialakulását. A jelátviteli hálózatok ezen flexibilis működésének megértése a jövőbeni transzkriptomikai vizsgálatok fontos feladata lehet.

5.1.4 Az oxidatív stressz és az *atfA* delécio hatása a szekunder anyagcserére

Az *A. nidulans* genomjában több mint 60 szekunder metabolit génklaszter található (Inglis és munkatársai 2013). Néhány esetben ismert a klaszterhez tartozó termék: penicillinek (Brakhage 1998), szterigmatocisztin (Brown és munkatársai 1996), aszperfuranon (Chiang és munkatársai 2009), aszpertecin (Szewczyk és munkatársai 2008), aszpiridon (Bergmann és munkatársai 2007), ausztinol és dehidroausztinol (Lo és munkatársai 2012), emericecellamid (Chiang és munkatársai 2008), monodiktifenon és származékai (Chiang és munkatársai 2010, Sanchez és munkatársai 2011), orzellinsav és származékai (Sanchez és munkatársai 2010), valamint a terrekinon A (Bok és munkatársai 2006). A legtöbb klaszter termékét azonban eddig még nem azonosították, így e klaszterek működése is csak transzkripciós szinten vizsgálható.

Az oxidatív stressz számos mikotoxin képződését befolyásolja („oxidative stress theory of mycotoxin biosynthesis”; Reverberi és munkatársai 2010a). A legtöbb adat az *A. parasiticus* és az *A. flavus* aflatoxin (aflatoxin B₁, aflatoxin G₁), az *A. ochraceus* ochratoxin (ochratoxin A), illetve *Fusarium* fajok trichotecén (nivalenol, deoxinivalenol, 15-acetil-deoxinivalenol) és fumonizin (fumonizin B₁) termeléséről áll rendelkezésre. Ezen esetekben igazolták, hogy az oxidatív stressz indukálja a mikotoxin termelést, míg a gomba antioxidáns aktivitásának növelése, vagy antioxidáns molekulák adagolása gátolja azt (Beekrum és munkatársai 2003, Torres és munkatársai 2003, Fanelli és munkatársai 2004, Reverberi és munkatársai 2005, Ponts és munkatársai 2006, 2007, Reverberi és munkatársai 2010a, 2010b). A részletesebb vizsgálatok számos transzkripciós faktorról mutatták ki, hogy azok az oxidatív stresszválaszt és a mikotoxin termelést is szabályozzák (Hong és munkatársai 2013a). Említést érdemel a NapA/YapA (*A. nidulans*, *A. parasiticus*, *A. ochraceus*; Reverberi és munkatársai 2007, 2012, Yin és munkatársai 2013), az MsnA (*A. parasiticus*, *A. flavus*, Chang és munkatársai 2011), valamint az Atf1 (AtfA) (*Botrytis cinerea*, *Fusarium graminearum*, Temme és munkatársai 2012, Van Nguyen és munkatársai 2013) és az AtfB is (*A. parasiticus*, Hong és munkatársai 2013a). Az *A. nidulans* AtfA és AtfB transzkripciós faktorairól szintén feltételezhető, hogy részt vesznek mind a szekunder anyagcsere, mind az oxidatív stresszválasz szabályozásában (Lara-Rojas és munkatársai 2011).

Kísérleteinkben 5 szekunder metabolit génklaszter (AN7884 klaszter, dba-F9775 hibrid klaszter 2, AN1680 klaszter, AN6236 klaszter és AN10486 klaszter) indukcióját figyeltük meg az MSB, a tBOOH, illetve a diamid által okozott oxidatív stressz alatt, de valamennyi kezelésben (beleértve a sóstresszkezelést is) találtunk indukálódott szekunder metabolit klasztergéneket, illetve kulcsgéneket (5. táblázat, 4. melléklet).

	MSB	I-H ₂ O ₂	h-H ₂ O ₂	tBOOH	Diamid	NaCl	Összesen
<i>kontroll törzs (kezelt vs. kezeletlen)</i>							
<i>indukció¹</i>							
kulcs gén ²	11	2 ⁷	5	16	16	4	29
összes gén ³	65	17 ⁷	25 ⁷	65	71	34 ⁷	155
klaszter ⁴	2	0	0	3	1	0	5
<i>represszió¹</i>							
kulcs gén	11	3	8	8	8	9	19
összes gén	46	22	37	38 ⁶	52	39	112
klaszter	5	1	0	1	3	2	7
<i>ΔatfA mutáns (kezelt vs. kezeletlen)</i>							
<i>indukció</i>							
kulcs gén	16	15 ⁵	16 ⁵	11	11	1	42
összes gén	53	48 ⁵	68 ⁵	60	54	29	179
klaszter	2	3	2	2	0	0	7
<i>represszió</i>							
kulcs gén	5 ⁶	3 ⁶	5 ⁶	19 ⁵	20 ⁵	17 ⁶	31
összes gén	16 ^{5,6}	22 ⁶	26 ⁶	71 ⁵	82 ⁵	70 ^{5,6}	139
klaszter	0	1	2	5	7 ⁶	5	9

5. táblázat Az oxidatív stressz és a sóstressz hatása a szekunder metabolit klasztergének transzkripciójára a THS30.3 (kontroll), illetve TNJ92.4 (*ΔatfA*) törzsek tenyésztéseiben

¹ – Azon gének, ahol a transzkripció változás (FC) legalább kétszeres volt a kezeletlen tenyészetekhez képest. $|\log_2FC| > 1$; $FC = I_{\text{kezelt}}/I_{\text{kezeletlen}}$; I: normalizált jelintenzitás; $\log_2FC > 1$ – indukció („up-regulation”), $\log_2FC < -1$ – represszió (down-reguláció), illetve azon klaszterek száma ahol a gének legalább fele és köztük legalább egy kulcsgén is indukálódott/represszálódott. ² – Az Inglis és munkatársai (2013) közleményében szereplő, kísérletesen igazolt, vagy manuálisan azonosított, transzkripció faktort, nem riboszómális peptid szintázt, poliketid szintázt, terpén szintázt, vagy prenilttranszferázt kódoló szekunder metabolit klasztergének (összesen 94 gén). ³ – Az Inglis és munkatársai (2013) közleményében szereplő, kísérletesen igazolt, vagy manuálisan azonosított szekunder metabolit klasztergének (összesen 467 gén). ⁴ – Az Inglis és munkatársai (2013) közleményében szereplő, kísérletesen igazolt, vagy manuálisan azonosított szekunder metabolit gén klaszterek (összesen 66 klaszter). ⁵ – Szignifikáns eltérés (Fisher-féle egzakt teszt; $p < 0.05$) a stresszre reagáló gének/kulcs gének/klaszterek arányában a kontroll törzs és a *ΔatfA* mutáns között. ⁶ – Szignifikáns eltérés (Fisher-féle egzakt teszt; $p < 0.05$) az indukálódó, vagy a represszálódó gének/kulcs gének/klaszterek arányában egy törzsen belül. ⁷ – Szignifikáns eltérés (Fisher-féle egzakt teszt; $p < 0.05$) a stresszre reagáló gének/kulcs gének/klaszterek arányában egy soron belül az MSB-tal, a tBOOH-del és a diamiddal kezelt tenyészetektől.

Az indukálódott szekunder metabolit klasztergének aránya (indukálódott klasztergének/összes klasztergén) a „gyengébb” (kevesebb gén transzkripcióját befolyásoló; 1. táblázat) stresszkezelések (H₂O₂ stressz, NaCl stressz) esetében szignifikánsan kisebb volt, mint az „erősebb” kezeléseknél (MSB, tBOOH és diamid stressz) (5. táblázat). A stressz nemcsak indukált, de represszált is szekunder metabolit géneket, klasztereket (eas klaszter, AN2924

klaszter, wA klaszter, AN12331/AN7838 klaszter, mic klaszter és “No PKS/NRPS backbone” 4 klaszter)(5. táblázat, 4. melléklet). Egyedül a tBOOH-val kezelt tenyészetekben volt szignifikánsan nagyobb az indukálódott klasztergének aránya a represszálódottakénál; minden más esetben az indukció és a represszió mértéke hasonló volt (5. táblázat). Az indukció, illetve a represszió a kulcsgének és a klasztergének felét, a klaszterek mintegy ötödét érintette (5. táblázat). Összességében elmondható, hogy az (oxidatív) stressz hatással volt a szekunder metabolit klasztergének transzkripciójára, de ez a hatás klaszter specifikus: egyes klaszterekre az indukció, más klaszterekre a represszió volt jellemző és a klaszterek jelentős része nem reagált az adott kezelésre. Ez egyben azt is jelenti, hogy azok a stratégiák, amelyek a szekunder anyagcsere stressz-függő szabályozottságát használják ki a mikotoxin termelés visszaszorítására (pl. antioxidáns anyagok alkalmazása; Torres és munkatársai 2003) hatékonyak lehetnek egy, vagy több mikotoxin esetében is, de elő is segíthetik új, eddig nem ismert hatású szekunder metabolitok képződését. E nem kívánt hatás lehetőségét érdemes lehet minden új módszer kidolgozásánál figyelembe venni.

Az *atfA* gén deléciója jelentős változást okozott a szekunder anyagcserében (5. táblázat, 4. melléklet). A I-H₂O₂ és a h-H₂O₂ kezeléseknél nőtt az indukálódott, míg az MSB stressz esetében csökkent a represszálódott szekunder metabolit klasztergének (és klaszterek) száma (5. táblázat, 4. melléklet). A tBOOH, diamid és NaCl stresszek alatt ugyanakkor a represszálódott szekunder metabolit klasztergének (és klaszterek) száma növekedett meg (5. táblázat, 4. melléklet). Stresszmentes körülmények között az *atfA* gén hiánya 43 klasztergént, köztük 11 kulcsgént és 4 klaszter (monodiktifenon, pkf, ivo klaszterek és a benzaldehid-F9775 hibrid klaszter 1) transzkripcióját indukálta, míg 22 klasztergént (5 kulcsgént) és nulla klaszter esetében okozott repressziót. A fentiek alapján az AtfA – más fajokhoz hasonlóan (Temme és munkatársai 2012, Van Nguyen és munkatársai 2013) – az *A. nidulans* gombában is befolyásolja nemcsak az oxidatív stressz toleranciát, de a szekunder anyagcserét is. 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). Feltételezhető, hogy az AtfA ebben az esetben sem közvetlenül szabályozza a szekunder metabolit klaszterek aktivitását, hanem a jelátviteli hálózat működésének modulálásán keresztül befolyásolja a szekunder anyagcserét.

Az alvó („cryptic”) szekunder metabolit klaszterek aktiválása és termékük azonosítása az ipari kutatások fontos részét képezik. Számos stratégiát dolgoztak ki a klaszterek aktivitásának növelésére: A teljes génklaszter homológ/heterológ túltermeltetése, a

génklaszterben található transzkripció faktor, vagy kulcsgén túltermeltetése, illetve a szekunder anyagcserét globálisan szabályozó fehérjék (legismertebb a *LaeA*, illetve az *RsmA*) túltermeltetése (Bok és munkatársai 2006, Bergmann és munkatársai 2007, Chiang és munkatársai 2009, Lim és munkatársai 2012, Nakazawa és munkatársai 2012, Chiang és munkatársai 2013). Vizsgálataink alapján az *atfA* deléciója önmagában, vagy oxidatív stresszel kombinálva szintén alkalmas lehet alvó szekunder metabolit klaszterek aktiválására.

5.2 Az *Aspergillus nidulans* szénéhezésre adott stresszválaszának vizsgálata

Kísérleteinkben klasszikus mikrobiális fiziológiai megközelítést alkalmaztunk: A szénéhező *A. nidulans* tenyészetek fermentlevéből oszlopkromatográfia segítségével enzimeket (egy glükánázt és egy γ GT-t) izoláltunk és a fehérjét kódoló gént (a genomszekvencia ismeretében) azonosítottuk (Szilágyi és munkatársai 2010a, Spitzmüller és munkatársai 2016). Az enzimek lehetséges funkcióit a megfelelő deléciós törzsek vizsgálatával (Szilágyi és munkatársai 2010a, Spitzmüller és munkatársai 2015a, Emri és munkatársai 2018a, Szilágyi és munkatársai 2018), illetve a tisztított enzimek jellemzésével próbáltuk kideríteni (Szilágyi és munkatársai 2010a, 2012, Spitzmüller és munkatársai 2016). A transzkriptom szénéhezésre bekövetkezett változásának detektálásával nyert adatok, illetve az azokból kialakított átfogó kép (Szilágyi és munkatársai 2013) igen hasznos segítséget nyújtott e vizsgálatokban: Ötleteket adott az enzimek lehetséges fiziológiai funkciójával kapcsolatban, megerősítette a korábban levont következtetéseinket, vagy éppen a korábbi adatok újraértékelését mozdította elő.

5.2.1 A szénéhezés hatása a transzkriptomra

Kísérletünkben az *A. nidulans* FGSC A26 törzs szénéhező tenyészeinek transzkriptomát hasonlítottuk össze a glükózon növekvő tenyészetek transzkriptomával. A kétféle tenyészet fiziológiájában a mintavétel időpontjában (4 h) jelentős különbségek voltak, amik a redox egyensúly felborulásában, az extracelluláris hidroláz termelésben és a vakuolizációban is megmutatkoztak (6. táblázat). A szterigmatocisztin termelés, a konidiofórok differenciálódása, a DCM csökkenése, a hifák darabolódása és a pH növekedése azonban csak a 24 h-s tenyészetekben volt detektálható (6. táblázat).

	Növekvő tenyészet ^a	Szénéhező tenyészet ^a	
	4 h	4 h	24 h
β-1,3-Glükánáz aktivitás (U/ml)	2 ± 0,3	9 ± 1 ^c	90 ± 5 ^c
β-Glükózidáz aktivitás (U/ml)	0,24 ± 0,03	0,9 ± 0,08 ^c	26 ± 2 ^c
Proteináz aktivitás (U/ml)	0,2 ± 0,03	1,3 ± 0,2 ^c	4,8 ± 0,8 ^c
Kitináz aktivitás (U/ml)	0,2 ± 0,03	0,9 ± 0,3 ^c	1,4 ± 0,2 ^c
Et termelés ^b (pmol Et/mg DCM)	0,03 ± 0,01	0,06 ± 0,01 ^c	0,1 ± 0,01 ^c
DCF termelés ^b (pmol DCF/mg DCM)	0,5 ± 0,1	0,8 ± 0,1 ^c	1,7 ± 0,2 ^c
DCM változás (g/l)	1 ± 0,1	0 ± 0,1 ^c	-0,6 ± 0,1 ^c
pH	6,6 ± 0,1	6,7 ± 0,1	8,5 ± 0,2 ^c
Vakuolizáció	nincs	van	van
Konidiofór képzés	nincs	nincs	van
Szterigmatocisztin (mg/g DCM)	0	0	2 ± 0,1 ^c
Hifa fragmentáció	nincs	nincs	van

6. táblázat A szénéhező *A. nidulans* FGSC A26 tenyészetek néhány fiziológiai jellemzője

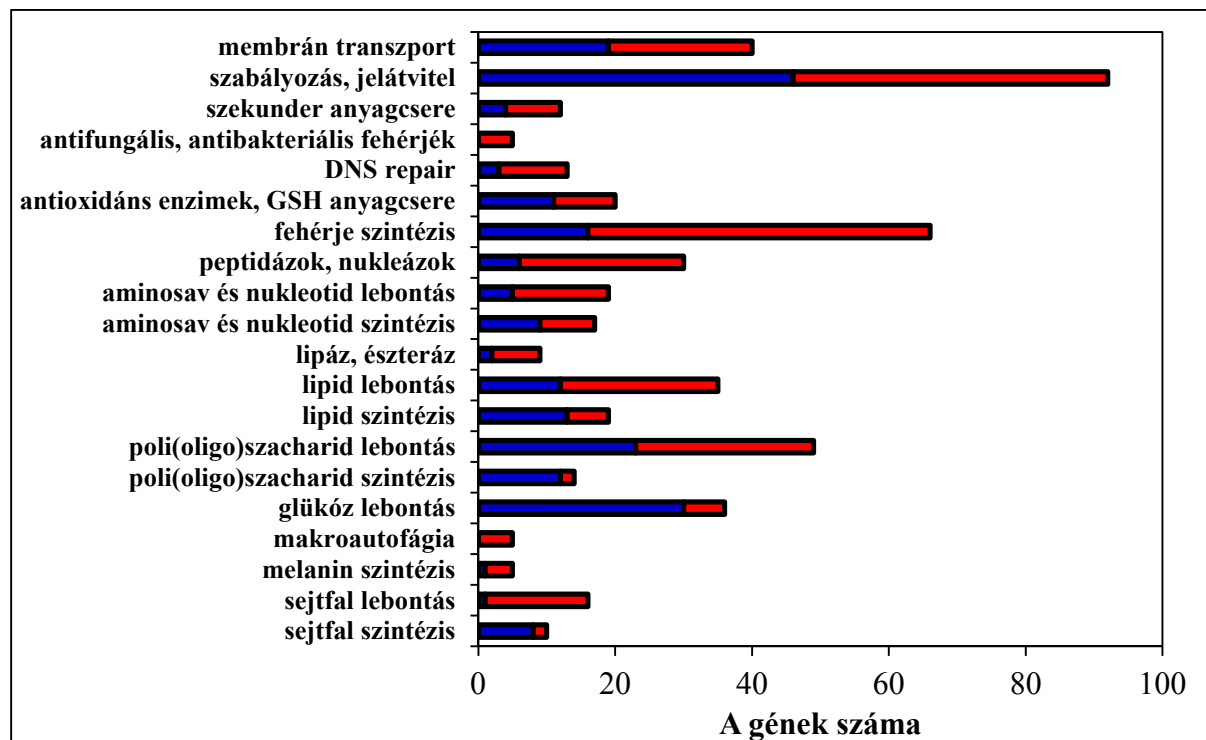
^a – Az exponenciális fázisú micélium friss glükóz tartalmú (növekvő tenyészetek), illetve szénforrás mentes tápközegbe (szénéhező tenyészetek) lett átmosva. A táblázat 5 független mérés eredményeinek átlagait és szórásait tartalmazza. ^b – A redox egyensúly felborulását a tenyészetekhez adott 2',7'-diklórfloreszcein diacetátból, illetve dihidroetidinből képződő DCF és Et mennyiségével jellemeztük. ^c – Szignifikáns eltérés (Student-féle t-teszt; $p < 0,05$) a növekvő és szénéhező tenyészetek között.

DNS chip segítségével összesen 860 gén indukcióját ($\log_2FC > 2$; $FC = I_{\text{szénéhező}}/I_{\text{glükóz}}$; $I > 1000$ unit), illetve 816 gén represszióját ($\log_2FC < -2$; $FC = I_{\text{szénéhező}}/I_{\text{glükóz}}$; $I > 1000$ unit) figyeltük meg. A transzkripciós változásokat 99 gén esetében RT-qPCR-rel is megvizsgáltuk (5. melléklet). Az RT-qPCR ($\Delta\Delta CP$) és a DNS chip adatok ($\log_2FC$) között szoros pozitív korrelációt találtunk; a Pearson-féle korrelációs koefficiens értéke 0,78 volt.

A transzkriptomban bekövetkező változások alapján a szénéhezésre adott stresszválasz – más stresszválaszokhoz hasonlóan – egy igen komplex és sokrétű folyamat (5. melléklet, 16. ábra). A legfontosabb változások az alábbiak voltak:

1) A sejtfalszintézis – sejtfallebontás egyensúlya a lebontás irányába tolódott el (16-17. ábrák). Számos, a sejtfal bioszintézisben potenciálisan résztvevő gén represszióját figyeltük meg (5. melléklet). Ezek közül említést érdemelnek a kitin szintáz, valamint a β-1,3- és α-1,3-glükán szintáz gének (*chsB*, *chsF*, *fksA*, *agsB*; de Groot és munkatársai 2009), a sejtfalszintézishez köthető transzglykozidázt kódoló gének (*gelA*, *gelE* és AN10779; de Groot és munkatársai 2009) és szintén a sejtfalszintézishez köthető hidroláz gének (*eglC*, Choi és munkatársai 2005; *chiA*, Yamazaki és munkatársai 2008) is. Ezzel párhuzamosan a sejtfal lebontásában közreműködő, illetve potenciálisan közreműködő gének indukálódtak (5. melléklet): kitin hidrolízis – *chiB* (Pócsi és munkatársai 2009) és *nagA* (Kim és munkatársai

2002), β -1,3-glükán hidrolízis – *engA*, AN0779, AN4825 és AN0245, α -1,3-glükán lebontás – *mutA* (Wei és munkatársai 2001).



16. ábra A DNS chip adatok alapján indukálódott (piros), illetve represszálódott (kék) gének funkció szerinti csoportosítása

Az ábrán összesen 476 gén szerepel. A többi gén esetében vagy nem ismert a gén funkciója, vagy az ábrán szereplő kategóriáktól eltérő és a jelen fejezet szempontjából nem lényeges kategóriába sorolhatóak be. Az indukálódott ($\log_2FC > 2$; $FC = \frac{I_{\text{szénéhező}}}{I_{\text{glükózos}}}$; $I_{\text{szénéhező}} > 1000$ unit) géneket piros, a represszálódott géneket ($\log_2FC < -2$; $FC = \frac{I_{\text{szénéhező}}}{I_{\text{glükózos}}}$; $I_{\text{glükózos}} > 1000$ unit) kék szín jelöli. Az egyes csoportokhoz tartozó gének listái a Szilágyi és munkatársai (2013) közlemény mellékletében találhatóak.

A kitin deacetilázt kódoló AN9380 gén (Wang és munkatársai 2010) szénéhezés hatására bekövetkezett indukciója (5. melléklet) azt sugallja, hogy a kitin (kitin oligomer) $\rightarrow$ kitozán (kitozán oligomer) átalakulásnak szintén lehet jelentősége a sejtfal szénéhezés alatti lebontásakor, ahogy ezt Alfonso és munkatársai (1995) is feltételezték korábban. A szénéhezés alatt indukálódó β -glükozidáz gének (pl. *bglM*; 5. melléklet) arra utalnak, hogy ezen enzimek is részt vehetnek a gombasejtfal-polimerek hidrolízisében. A fenti hidrolázok autolitikus sejtfal degradációban betöltött szerepét igazoló kísérleti adatok azonban csak a ChiB (Yamazaki és munkatársai 2007, Pócsi és munkatársai 2009) esetében állnak rendelkezésre. Érdeemes megemlíteni, hogy a *chiB* gén indukciója együtt járt a *brlA*, a konidiogenezisért felelős transzkripciósfaktort kódoló gén (Adams és munkatársai 1998) indukciójával (5. melléklet), ami azért fontos, mert ismert, hogy a BrlA részt vesz a *chiB*

indukálásában és ezen keresztül az ASD iniciálásában is (Emri és munkatársai 2008, Pócsi és munkatársai 2009).

Fontos kihangsúlyozni azt is, hogy a sejtfal lebontásában potenciálisan közreműködő gének mellett a glükózamin-6-foszfát izomeráz, illetve az N-acetil-glükózamin-6-foszfát deacetiláz génjei (AN1418 és AN1428) illetve számos nagy affinitású glükóz transzporter génje (*mstA*, *mstC* és *hxtA*) is indukálódott, miközben az *mstE* kis affinitású glükóz transzporter gén repressziót mutatott (5. melléklet). A fenti transzkripciós változások azt sugallják, hogy a sejtek nemcsak lebontják az elhalt sejtek sejtfalát (Emri és munkatársai 2008, van Munster és munkatársai 2016), de fel is használják az így nyert monomereket. A gombasejtfal hidrolízisében potenciálisan résztvevő gének, valamint a nagy affinitású glükóz transzportert kódoló gének szénéhezés alatti indukcióját Nitsche és munkatársai (2012) az *A. niger* esetében szintén kimutatták.

2) Programozott sejthalálban fontos gének indukálódtak. A szénéhezés alatt megfigyelhető intenzív vakuolizáció (Pollack és munkatársai 2009, van Munster és munkatársai 2016), valamint az *A. nidulans* (Kim és munkatársai 2011, Pinar és munkatársai 2013) és más *Aspergillus* fajokkal kapcsolatos irodalmi adatok (Kikuma és munkatársai 2006, Richie és munkatársai 2007a, Nitsche és munkatársai 2013) alapján a makroautofágia fontos eleme a szénéhezésre adott stresszválasznak. Kísérletünkben 5 autofágiához köthető gén indukcióját figyeltük meg, AN2876, AN5174, *tipA*, AN4601 és AN7428 (Pollack és munkatársai 2009); az első három gén esetében RT-qPCR méréssel is meggyőződünk az indukcióról (5. melléklet). Az AN2876 a *S. cerevisiae atg22* génjének ortológja, ami egy autofágiában fontos vakuoláris aminosav permeázt kódol (Yang és munkatársai 2006). Az AN5174 és az AN7428 *S. cerevisiae*ben található ortológjai (*atg5* és *atg7*) az autofagoszómák képződésében vesznek részt (Pollack és munkatársai 2009). Az AN4601 egy *atg26* ortológ, ami a *Pichia pastoris* esetében szintén részt vesz az autofágiában, a *S. cerevisiae* élesztőben azonban nem (Warnecke és munkatársai 1999, Cao és Klionsky 2007). A *S. cerevisiae* TipA fehérjéje a TOR útvonal gátlásával az autofágia iniciálásában működik közre (Fitzgibbon és munkatársai 2005). E gének indukciója azt sugallja, hogy a makroautofágia aktiválása már a szénéhezésre adott korai stresszválasznak is a része és nemcsak a hosszan éhező tenyészetek sajátossága.

Kevés irodalmi adat áll rendelkezésre az *A. nidulans* apoptózisában közreműködő génekről. Vizsgálatainkban sem az *aifA* (mitokondriális NADH dehidrogenáz gén; apoptózis indukáló faktor; Savoldi és munkatársai 2008), sem a *casA* (metakaspáz gén; Cheng és munkatársai 2003), sem a *pyrpa* (poli(ADP-ribóz) polimeráz gén; Semighini és munkatársai 2006) nem indukálódott. Az apoptotikus markerek (membrán inverzió, DNS fragmentáció) is

csak mintegy 16 h éhezés után voltak detektálhatóak szénéhező tenyészetekben és még 72 h múlva is csak a sejtek (protoplasztok) 10-20 %-ára voltak jellemzőek (Emri és munkatársai 2005b). Elképzelhető, hogy az apoptózis elsődleges feladata a működésképtelenné váló sejtek inaktiválása, eltávolítása. Így az apoptózis nem szükségszerűen kell, hogy része legyen a szénéhezésre adott korai stresszválasznak és jelentősége a szénéhezés alatt megfigyelhető programozott sejtpusztulásban csak másodlagos a makroautofágiához képest.

3) A szén és nitrogén anyagcserében az egyensúly a glükóztól eltérő potenciális energiaforrások katabolizmusa felé tolódott el (16. ábra). Tekintettel arra, hogy a referencia tenyészetünk glükózt tartalmazott, mint egyedüli szénforrást, így nem meglepő, hogy szénforrás hiányában számos, a glükóz energiaforrásként történő hasznosításában érintett gén represszióját sikerült detektálnunk (16. ábra). Ezek közül említést érdemel a 6-foszfofrukto-2-kináz (AN5144), a glicerinaldehid-3-foszfát dehidrogenáz (*gpdA*), a G6PD (AN2981), a citrát szintáz (*citA*), a citokróm C oxidáz (AN10585) és az alternatív oxidáz (*aoxA*), azaz a glikolízis, oxidatív pentóz-foszfát út, citromsav ciklus és légzés egy-egy meghatározó génje (5. melléklet). A specifikus G6PD aktivitások, valamint a cián érzékeny és cián rezisztens légzés intenzitásának csökkenését korábbi élettani vizsgálataink is kimutatták (Emri és munkatársai 2004a). A fenti útvonalak repressziója együtt járt nukleáz, proteináz, lipáz, di-, oligo- és poliszacharid hidrolizáló enzim gének, valamint az aminosav, nukleotid és lipid anyagcserében érintett katabolikus gének indukálódásával (16. ábra, 5. melléklet).

Hidrolitikus enzimek termelése és szekréciója gyakran detektált jellemzője a szénéhező tenyészeteknek (White és munkatársai 2002, Katz és munkatársai 2008, Kim és munkatársai 2011, Nitsche és munkatársai 2012). Képződésüket részben a tápközegeben potenciálisan jelenlévő alternatív tápanyagok (pl. növényi maradványok) „keresésével” (van Munster és munkatársai 2016), részben a saját anyagaik „újrahasznosításával” magyarázzák (Kim és munkatársai 2011). Ez utóbbit (konkrétan a gomba saját, nitrogén tartalmú szerves vegyületeinek lebontását) támasztja alá a szénforrás mentes körülmények között inkubált gombák tenyészeiben megfigyelt ammónia felszabadulás és az ezzel járó lúgosodás is (Pusztahelyi és munkatársai 1997b, Emri és munkatársai 2004a). Néhány hidroláz kódoló gén külön is említést érdemel: A *prtA*, *pepJ*, *pepI*, AN8445, AN6438, AN2572, AN8498 és az AN2237 olyan proteináz gének, melyek szignálszekvenciával rendelkeznek a SignalP 4.0 program alapján (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-4.0/>). A *PrtA*, mellett a *PepJ* (Emri és munkatársai 2009), valamint az AN8445, AN6438 és az AN2237 extracelluláris termelődését is igazolták már szénforrás limitált körülmények között (Schneider és munkatársai 2010). Indukálódásuk összhangban van az *xprG* transzkripciós faktor, a *hxcC* regulatórikus hexokináz gén és a korábban már említett *brlA* gén indukálódásával (5.

melléklet). E gének termékeiről korábban már igazolták, hogy részt vesznek az extracelluláris proteináz termelés aktiválásában szénéhezés alatt (Katz és munkatársai 2006, Bernardo és munkatársai 2007, Szilágyi és munkatársai 2011). Az *A. niger* esetében szintén igen sok szénéhezés hatására indukálódó proteináz gént találtak (Nitsche és munkatársai 2012). Az intenzív extracelluláris proteináz termelés régóta ismert tulajdonsága a szénéhező tenyészeteknek (White és munkatársai 2002); az érintett proteináz gének nagy száma azonban meglepő. Számos elképzelést publikáltak már ezen enzimek élettani jelentőségéről, de éppen az érintett gének nagy száma miatt egyértelmű igazolást ezen funkciókról nem sikerült adni. E proteinázok a tápközegben lévő exogén eredetű fehérjék hasznosításán túl részt vehetnek az ASD-ban (Szilágyi és munkatársai 2011), az autolizáló sejtekből esetlegesen kiszabaduló fehérjék lebontásában (Emri és munkatársai 2018a), a kompetitív, illetve parazita fajok által termelt extracelluláris fehérjék hatástalanításában (Elad 2000, Hegedűs és munkatársai 2011), de mint antifungális/antibakteriális fehérjék is funkcionálhatnak (De Marco and Felix 2002). Érdemes megemlíteni, hogy a tisztított PepJ-vel végzett vizsgálatok alapján e proteináznak – legalábbis a vizsgált fajok és körülmények esetében – nem volt antifungális hatása (Szilágyi és munkatársai 2012). A *ApepJAprtA* duplamutáció, ami legalább 50 %-al csökkentette a tenyészet proteináz termelését, mérsékelte a kleisztotéciumok képződését még kedvező tápanyag (glükóz) ellátottság mellett és exogén fehérjék hiányában is (aminosavak jelenlétében azonban nem), ami arra utalhat, hogy ezen enzimek közreműködnek a telep saját fehérjéinek lebontásában az ivaros ciklus alatt (Emri és munkatársai 2018a).

4) A fehérje szekrécióban fontos gének indukálódtak. Stressz, különösen erős stressz hatására a gombák gyakran a növekedés leállításával válaszolnak, ami együtt jár a fehérjeszintézisben résztvevő gének repressziójával (Gasch 2003, Toledano és munkatársai 2003, Morano és munkatársai 2012). Szénéhezés hatására a mi esetünkben is leállt a növekedés (6. táblázat) és 16 fehérjeszintézishez köthető gén represszáldott, ami azonban együtt járt 50 fehérjeszintézishez köthető gén indukciójával (16. ábra). E gének egy jelentős része az ER-hez köthető; az ER és a Golgi közötti vezikuláris transzportban, a fehérjék oligoszacharid oldalláncainak kialakításában, valamint a fehérjék ER lumenben történő feltekeredésében működnek közre. RT-qPCR segítségével 5 gén indukálódását erősítettük meg: A *pdiA* egy feltételezett protein diszulfid izomerázt kódol, amely a nem-feltekeredett fehérjék által indukált stresszválaszban („unfolded protein stress response”; UPSR) fontos (Colabardini és munkatársai 2010); a *hacA*, amely az UPSR iniciálásáért felelős bZIP transzkripció faktort kódolja (Saloheimo és munkatársai 2003, Colabardini és munkatársai 2010); az *mns1B* a fehérjék N-glikozidációjában résztvevő feltételezett α -1,2-mannozidáz

génje (Eades és Hintz 2000), míg az AN2738 és az AN1117 (a *S. cerevisiae* *erv46* és *erv29* génjeinek ortológjai) feltételezett COPII-burkos vezikulum membránfehérjék génjei. A fenti változások feltehetőleg arra utalnak, hogy bár a szénéhezéssel párhuzamosan leáll a növekedéshez köthető nagy volumenű fehérjeszintézis, a szénéhezést kísérő intenzív fehérje szekréció miatt nincs lehetőség a fehérjeszintézisben résztvevő gének olyan nagy számban történő represszállására, mint amit az oxidatív stressz kapcsán megfigyeltünk (5.1.2 fejezet).

5) Több, a redox homeosztázis fenntartásában fontos gén transzkripciója megváltozott. A ROS akkumulálódás tipikus velejárója a szénéhező tenyészeteknek (6. táblázat; Jakubowski és munkatársai 2000, Sámi és munkatársai 2001a, Emri és munkatársai 2004a). Az *A. nidulans* és a *P. chrysogenum* esetében a ROS akkumuláció együtt járt a sejtek GSH tartalmának jelentős csökkenésével, a specifikus kataláz és GPx aktivitások átmeneti indukciót követő repressziójával, illetve a specifikus SOD aktivitások tartós növekedésével (Sámi és munkatársai 2001a, Emri és munkatársai 2004a). A DNS chip és RT-qPCR adatok (5. melléklet) alapján a kataláz gének (*catA-B*) represszállódtak, míg a SOD gének közül az AN1131 indukálódott. Több, a GSH lebontásában potenciálisan résztvevő gén is indukciót mutatott (5. melléklet): Az AN5658 és AN10444 feltételezhetően γ GT-t, míg az AN5652 feltételezhetően 5-oxoprolinázt kódolnak. Ez amiatt is érdekes, mert elképzelhető, hogy a GSH tartalom csökkenése (tartalék tápanyagként való felhasználása) hozzájárulhat a szénéhezés alatt megfigyelt oxidatív stressz kialakulásához. A γ GT-ok szénéhezésre adott stresszválaszban betöltött szerepéről részletesebben az 5.2.3 fejezetben lesz szó.

6) A fajok közötti interakciókat befolyásoló gének indukálódtak. Noha sem a tenyésztési körülmények (tápközeg összetétele, tenyésztési hőmérséklet; Tóth és munkatársai 2011), sem az FGSC A26 törzs *veA1* mutációja (Stinnett és munkatársai 2007) nem kedvezett a szekunder metabolitok termelésének, szénéhezés hatására több szekunder metabolit klaszter kulcsgénje (klaszter specifikus transzkripciós faktor, PKS és NRPS gének) is indukálódott (16. ábra, 5. melléklet). Külön említést érdemel az *aflR* gén, amely a szterigmatocisztin bioszintézis klaszter transzkripciós faktora, ugyanis ezen gén indukcióját RT-qPCR-rel is igazoltuk (5. melléklet), valamint a szterigmatocisztin jelenlétét a 24 h tenyészetekben sikerült kimutatnunk (6. táblázat). Nemcsak egyes szekunder metabolitok termelődése aktiválódott transzkripciós szinten, de „kis antifungális fehérje” gének (pl. AN5046 anizin gén; Eigentler és munkatársai 2011), valamint peptidoglükán bontó enzimek génjeinek (pl. AN6470 *N,O*-diacetilmuramidáz gén; Bauer és munkatársai 2006) indukcióját is megfigyeltük (16. ábra, 5. melléklet). A szterigmatocisztinről kimutatták, hogy a telepet (elsősorban a kleisztotéciumot) védi a fungivor ízeltlábúakkal szemben (Staaden és munkatársai 2011, Döll és munkatársai 2013, Ámon és munkatársai 2018). Az anizin és az AN6470 *N,O*-

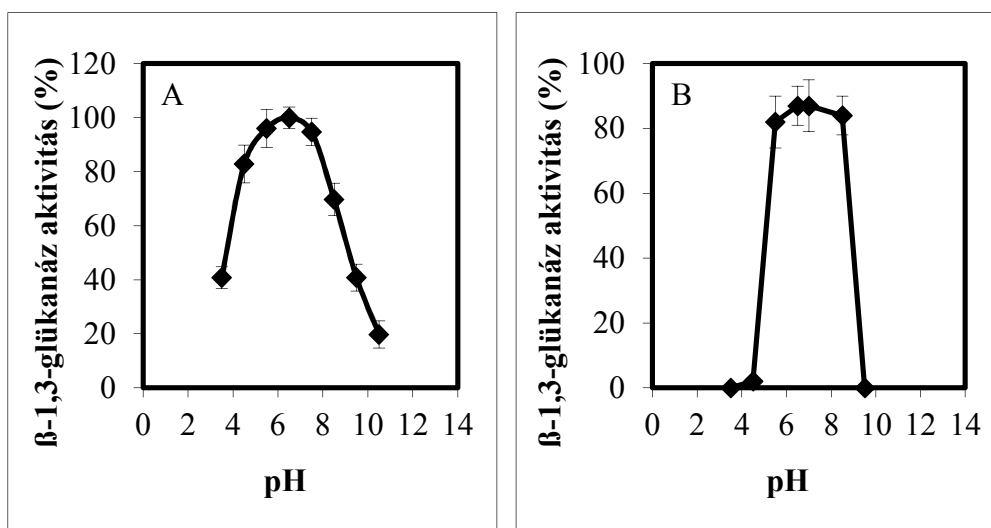
diacetilmuramidáz antifungális, illetve antibakteriális hatásáról szintén vannak kísérletes adatok (Bauer és munkatársai 2006, Eigentler és munkatársai 2011). Sőt a korábban már említett extracelluláris proteinázokkal ellentétben, a szekretált kitinázok és glükánázok antifungális hatása kísérletesen is igazolt (Elad 2000). A fentiek alapján úgy tűnik szénéhező körülmények között fontosabb a gomba számára a környezetében élő fajok aktivitásának kontrollálása, mint egy gyors növekedést lehetővé tévő közegben.

5.2.2 Az *EngA* β -1,3-endoglükánáz és szerepe a szénéhezésre adott stresszválaszban

5.2.2.1 Az *EngA* fehérje és tulajdonságai

Az *A. nidulans* FGSC A26 törzs szénéhező tenyészeiből kromatofókusztólás segítségével sikerült megtisztítanunk egy laminarináz (β -1,3-glükánáz) aktivitást mutató fehérjét. A tripszines emésztést követő MALD-TOF analízis alapján a fehérje az AN0472 (*engA*) gén terméke lehetett. A gén szekvenciája (*Aspergillus* Genome Database; <http://www.aspergillusgenome.org>) alapján az EngA fehérje az eukarióta β -1,3-glükánázokat magába foglaló 81-es glikozilhidrolázok családjába tartozik, rendelkezik szignál szekvenciával és ortológja a *S. verevisiae* DSE4p, valamint a *S. pombe* Eng1p β -1,3-endoglükánázainak. E két élesztő endoglükánáz a citokinezis alatti sejt-sejt szeparációhoz szükséges (Colman-Lerner és munkatársai 2001, Baladrón és munkatársai 2002, Martín-Cuadrado és munkatársai 2003). Az EngA fehérje SDS-PAGE segítségével mért molekulamérete 91 kDa, kromatofókusztólással meghatározott izoelektromos pontja 7,1 volt. Sem β -1,4-glükánáz (karboximetil-celullóz szubsztáttal), sem β -glükózidáz (*p*-nitrofenil- β -D-glükóz szubsztáttal) aktivitást nem mutatott. A fentiek alapján a megtisztított fehérje egy, az *engA* gén által kódolt, extracellulárisan termelődő β -1,3-endoglükánáz volt.

Az enzim pH optimuma 6,5-nek adódott, jelentős aktivitást mutatott a 4-9 pH tartományban (17A ábra), ráadásul a 6,5-8,5 pH tartományban stabilnak is mutatkozott (17B ábra). Az EngA pH-függő aktivitása/stabilitása alapján számottevő β -1,3-endoglükánáz aktivitást képes kifejteni a szénéhező tenyészetekre jellemző gyengén lúgos pH-n is (Pusztahelyi és munkatársai 1997b, Emri és munkatársai 2004a). Az enzim hőmérséklet optimuma 45-65 °C között volt.



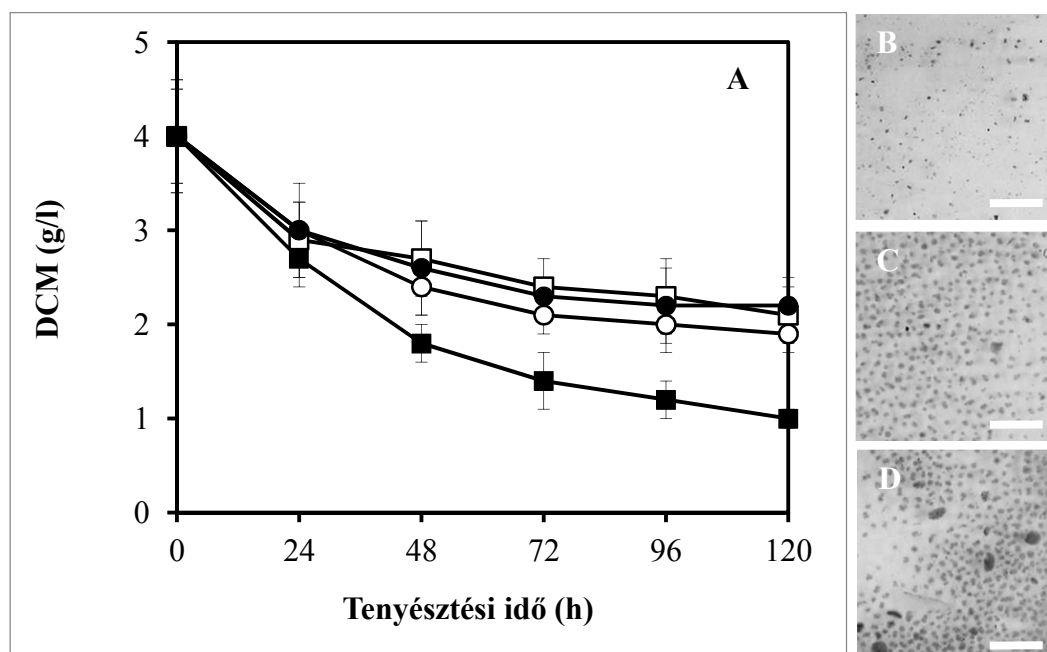
17. ábra Az EngA pH-függő aktivitása (A) és pH-függő stabilitása (B)

Az ábrákon 4 független mérés átlagai és szórásai láthatóak. A reakcióközeg hőmérséklete 37 °C volt. A B ábrán szereplő mérés esetében a reakcióközeg pH-ja 6,5-re lett állítva. A nem előkezelt minták pH 6,5-ön (37 °C) meghatározott aktivitását (95 U/ml) vettük 100 %-nak.

5.2.2.2 A *ΔengA* törzs és tulajdonságai

Az EngA hiánya jelentős változásokat okozott szénéhező tenyészetekben. A *ΔengA* törzsben a pelleték szétesése, a fonalak darabolódása, valamint a DCM csökkenése is elmaradt a kontroll törzsben megfigyeltektől (18. ábra), hasonlóan ahhoz, amit korábban a *ΔchiB* törzsnél tapasztaltunk (Pócsi és munkatársai 2009). A *ΔengAΔchiB* duplamutáns viselkedése nem tért el érdemben a *ΔengA* vagy a *ΔchiB* törzsétől (18. ábra). Mindezek alapján elmondható, hogy a ChiB edokitináz és az EngA β -1,3-endoglükánáz egyaránt szükséges a szénéhező tenyészetek ASD-hoz.

A ChiB kitináz termelődéséhez nélkülözhetetlen a konidiogenezist is szabályozó (Adams és munkatársai 1998) FluG-BrIA jelátviteli útvonal aktivitása (Pócsi és munkatársai 2009). Hasonló szabályozás a proteináz termelésben is megfigyelhető (Szilágyi és munkatársai 2011), sőt vizsgálataink alapján jellemző a β -glükánázok (β -1,3-glükánázok és β -glükózidázok) képződésére is (7. táblázat). A szénéhező tenyészetek extracelluláris hidroláz termelését szabályozó folyamatok jobb megértése gyakorlati szempontból is ígéretes jövőbeni kutatási terület lehet, hiszen hozzájárulhat az ipari jelentőségű glükánázok és kitinázok gyártásának költséghatékonyabbá tételéhez (Dahiya és munkatársai 2006, Martin és munkatársai 2007).



18. ábra Az EngA hiányának hatása a szénéhező *A. nidulans* tenyészetek DCM csökkenésére (A) és pellet morfológiájára (B-D)

Az A ábrán 4 független mérés átlagai és szórásai szerepelnek. A mintákat az exponenciális fázisú micéliumok szénforrás mentes tápközegbe történő átmosását követően (0 h) vettük. A kontroll tenyészetek DCM-a 48 h-tól kezdve szignifikánsan (Student-féle t-teszt, $p < 0,05$) kisebb volt, mint a mutáns törzseké. Az ábrán szereplő szimbólumok, a kontroll (tNJ36; „■”), a $\Delta engA$ (tNJ33.3; „○”), a $\Delta chiB$ (tNJ12; „●”) és a $\Delta engA\Delta chiB$ (tNJ34.8; „□”) törzs adatait jelölik. A B (kontroll), C ($\Delta engA$) és D ($\Delta engA\Delta chiB$) ábrákon szereplő reprezentatív fotók a 120 h tenyészetekről készültek. Bár = 1 cm

	β -1,3-glükánáz aktivitás (U/ml)	β -glükozidáz aktivitás (U/ml)
FGSC A26 (kontroll)	90 $\pm$ 5	26 $\pm$ 2
FGSC A744 (<i>fluG1</i>)	4 $\pm$ 0,4*	2 $\pm$ 0,4*
FGSC A1079 (<i>ΔbrlA</i>)	15 $\pm$ 2*	2 $\pm$ 0,6*

7. táblázat Szénéhező *A. nidulans* tenyészetek extracelluláris β -1,3-glükánáz és β -glükozidáz termelése

A kései exponenciális fázisú tenyészeteket szénforrás mentes tápközegbe mostuk át. A mintákat az átmosást követő 24. órában vettük. A táblázatban három független mérés átlagai és szórásai szerepelnek. Az inaktív *fluG*, illetve *brlA* génnel rendelkező FGSC A744, illetve FGSC A1079 törzsek esetében a „*”-al jelölt értékek szignifikánsan (Student-féle t-teszt, $p < 0,05$) kisebbek voltak, mint a *fluG*⁺ és *brlA*⁺ (FGSC A26) törzs aktivitásértékei.

5.2.2.3 Az autolitikus sejtfaldegradáció (ASD) és a konidiogenezis kapcsolata

A FluG-BrlA útvonal EngA (7. táblázat) és ChiB képződésére (Pócsi és munkatársai 2009) gyakorolt hatása alapján feltételezhető, hogy az ASD és a konidiogenezis között

funkcionális kapcsolat is van. Minthogy süllyesztett tenyészetekben, bár megjelennek ugyan konidiofórok stressz hatására (Emri és munkatársai 2004a, Lee és Adams 1996; 6. táblázat), intenzív konidiogenezis nem figyelhető meg, ezért a konidiogenezis és ASD közötti kapcsolatot felületi kultúrákban vizsgáltuk egy $\Delta engA\Delta chiB$ törzs segítségével. A kezdeti glükóz koncentráció alkalmas megváltoztatásával szénforrás limitált/szénéhező (2,5 g/l kezdeti glükóz koncentráció), illetve glükózban gazdag (40 g/l kezdeti glükóz koncentráció) tenyészeteket hoztunk létre (Emri és munkatársai 2018a). E tenyészetek alkalmasak voltak arra, hogy megvizsgáljuk a szénforrás (glükóz) hatását a telepek növekedésére, konídium és kleisztotécium képzésére, valamint arra is, hogy tanulmányozzuk az ASD jelentőségét e folyamatokban.

A $\Delta chiB\Delta engA$ duplamutáció nem befolyásolta érdemben a tenyészetek növekedését (8. táblázat).

Vizsgált tulajdonság; kezdeti glükóz koncentráció ^a	tHS30.3 (kontroll)	tNJ34.8 ($\Delta chiB\Delta engA$)
telepátmérő (mm); 2,5 g/l ^c	53 ± 3	54 ± 4
fehérjetartalom (ng/mm ²); 2,5 g/l ^c	86 ± 9	78 ± 7
konidiofór sűrűség (1/mm ²); 2,5 g/l ^c	90 ± 10	96 ± 10
konídium sűrűség (1000/mm ²); 2,5 g/l	22 ± 3	16 ± 3 ^d
konídium sűrűség (1000/mm ²); 10 g/l	39 ± 5	29 ± 4 ^d
konídium sűrűség (1000/mm ²); 40 g/l	170 ± 20	180 ± 20
kleisztotécium sűrűség (1/mm ²); 2,5 g/l ^b	2 ± 0,5	1,8 ± 0,6
kleisztotécium sűrűség (1/mm ²); 10 g/l ^b	8 ± 2	7 ± 2
kleisztotécium sűrűség (1/mm ²); 40 g/l ^b	14 ± 3	11 ± 2
kitináz aktivitás (U/mm ²); 2,5 g/l	1,2 ± 0,2	< 0,2
kitináz aktivitás (U/mm ²); 10 g/l	1,5 ± 0,4	< 0,2
kitináz aktivitás (U/mm ²); 40 g/l	< 0,2	< 0,2

8. táblázat Hidroláz termelésben sérült *A. nidulans* törzsek növekedésének, konidiogenezisének és kleisztotécium képzésének összehasonlítása

^a – A növekedést és a konidiogenezist a 120 h tenyészetekben, míg a kleisztotécium képzést a 168 h tenyészetekben vizsgáltuk. A táblázatban 4 független mérés átlagai és szórásai szerepelnek. ^b – A tenyészeteket az ivaros szaporodás elősegítése érdekében a második napon Parafilmmel lezártuk. ^c – A mutáns törzs viselkedése 10 g/l, illetve 40 g/l glükóz esetén sem tért el szignifikánsan (Student-féle t-test, $p < 0,05$) a kontroll törzstől. ^d – Szignifikáns eltérés (Student-féle t-test, $p < 0,05$) a kontroll törzs adataitól.

Azaz, az ASD – szemben a makroautofágiával (Kikuma és munkatársai 2006, Nitsche és munkatársai 2013, Richie és munkatársai 2007a) – nem segíti (kimutatható mértékben) a telep radiális irányban való terjeszkedését a telep középső részeinek újrahasznosításakor felszabaduló tápanyagokkal. Bár a konidiofórok számában nem okozott változást és nem befolyásolta a kleisztotéciumok képződését sem, a $\Delta chiB \Delta engA$ duplamutáció szignifikánsan csökkentette a termelt konídiumok mennyiségét kis glükóz koncentrációk esetén (8. táblázat). A fentiek alapján valóban van funkcionális kapcsolat a konidiogenezis és az ASD között: Az ASD tápanyagokkal segítheti a konidiofórok működését és ezen keresztül növeli a termelt konídiumok mennyiségét. A két folyamat kapcsolata nem jelenti azt, hogy a konidiogenezis szükségszerűen ASD-val jár együtt. A hidrolitikus enzimek termelése a FluG-BrlA útvonalon túl több más jelátviteli útvonal által is szabályozott, melyek közül a CreA-függő glükóz repressziót (Ries és munkatársai 2016) érdemes kiemelni. Feltehetőleg e represszióknak is köszönhető, hogy kedvező glükózellátottság esetén a konidiogenezist nem kíséri autolitikus hidroláz termelés (Emri és munkatársai 2006, Yamazaki és munkatársai 2007, Katz és munkatársai 2008, Brown és munkatársai 2013), ami a felületi kultúrák kitináz aktivitás értékein is megfigyelhető (8. táblázat). Nem meglepő módon a ChiB és EngA fehérjék hiánya érdemben nem befolyásolta a tenyészetek viselkedését kedvező tápanyagellátottság mellett (8. táblázat).

5.2.2.4 A sejtfalhidrolázok antifungális hatása

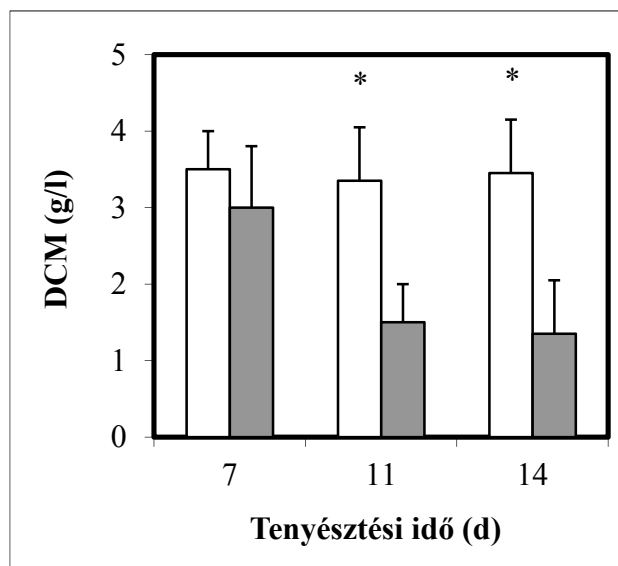
A tisztított EngA, illetve ChiB hidrolázok jelentősen gátolták a *Penicillium nalgiovense* konídiumok csírázását és/vagy növekedését (9. táblázat). Antifungális hatást mutattak az EngA-t és/vagy ChiB-t tartalmazó fermentlevek is (9. táblázat). Ezen antifungális hatások nemcsak a *P. nalgiovense*, de több más gombafaj (*A. fumigatus*, *A. niger*, *A. rugulosus*, *P. chrysogenum*, *Fusarium oxysporum*, *Trichoderma atroviride*; Szilágyi és munkatársai 2012) esetében – beleértve az *A. nidulans*-t is (9. táblázat) – megfigyelhető volt. A bakteriális, gomba, illetve növényi eredetű β -1,3-glükánázok és kitinázok antifungális hatása régóta ismert (Nielsen és munkatársai 1997, El-Katatny és munkatársai 2001, Hong és Meng 2003, Karasuda és munkatársai 2003, Sharma és munkatársai 2011). Vizsgálataink felhívják a figyelmet arra, hogy szaprofitonként ismert gombafajok hidrolázai is jelentős antifungális aktivitással rendelkezhetnek, így ezen enzimek, illetve az őket túltermelő törzsek akár biológiai kontroll ágensként is felhasználhatóak.

eredete	A tesztelt minta		A teszteléshez használt gomba törzs ^a	Növekedés (%) ^b			
	β-1,3-glükanáz aktivitása (U/ml) ^c	kitináz aktivitása (U/ml) ^c		A hígítás mértéke ^a			
				2x	4x	10x	20x
FGSC A26 (kontroll törzs)	55 ± 5	0,9 ± 0,06	<i>P. nalgiovense</i>	30 ± 5 ^d	52 ± 9 ^d	73 ± 11 ^d	85 ± 10 ^d
			<i>A. nidulans</i>	38 ± 7 ^d	49 ± 9 ^d	63 ± 10 ^d	85 ± 10 ^d
FGSC A744 (<i>fluG1</i>)	12 ± 1	< 0,1 ± 0,01	<i>P. nalgiovense</i>	90 ± 9	94 ± 11	95 ± 8	98 ± 10
			<i>A. nidulans</i>	92 ± 8	94 ± 7	99 ± 10	101 ± 11
tNJ12 (<i>ΔchiB</i>)	49 ± 3	< 0,01 ± 0,02	<i>P. nalgiovense</i>	67 ± 12 ^d	78 ± 8 ^d	84 ± 9 ^d	94 ± 7
			<i>A. nidulans</i>	69 ± 8 ^d	78 ± 9 ^d	83 ± 9 ^d	95 ± 11
tNJ33.3 (<i>ΔengA</i>)	41 ± 3	0,7 ± 0,03	<i>P. nalgiovense</i>	64 ± 11 ^d	81 ± 9 ^d	89 ± 12	91 ± 11
			<i>A. nidulans</i>	53 ± 6 ^d	64 ± 9 ^d	75 ± 8 ^d	88 ± 11
tNJ34.8 (<i>ΔengAΔchiB</i>)	36 ± 2	< 0,02 ± 0,01	<i>P. nalgiovense</i>	96 ± 7	92 ± 9	104 ± 12	99 ± 10
			<i>A. nidulans</i>	87 ± 9 ^d	92 ± 8	99 ± 11	97 ± 10
tisztított EngA	32 ± 1	-	<i>P. nalgiovense</i>	48 ± 6 ^d	56 ± 8 ^d	72 ± 10 ^d	81 ± 11 ^d
			<i>A. nidulans</i>	49 ± 5 ^d	68 ± 7 ^d	89 ± 8	94 ± 9
tisztított ChiB	-	1 ± 0,06	<i>P. nalgiovense</i>	59 ± 12 ^d	66 ± 9 ^d	79 ± 8 ^d	86 ± 9
			<i>A. nidulans</i>	43 ± 6 ^d	51 ± 7 ^d	64 ± 9 ^d	87 ± 9

9. táblázat *A. nidulans* törzsek fermentlevei, illetve a fermentléből tisztított EngA β-1,3-glükanáz és ChiB kitináz növekedést gátló hatásának tesztelése

^a – A növekedést gátló hatást a *P. nalgiovense* NCAIM F-001333 és az *A. nidulans* FGSC A26 törzsek segítségével mikrotiter plate-ekben teszteltük. A kezeléshez a mintákat a táblázatban jelölt mértékben előzetesen meghígítottuk. ^b – A törzsek növekedését a hővel inaktivált (és kétszeresére hígított) minták jelenlétében mutatott növekedés százalékában adtuk meg. A táblázatban 4 független mérés átlagai és szórásai szerepelnek. ^c – A megadott aktivitási értékek a hígítatlan mintákra vonatkoznak. ^d – Szignifikánsan kisebb (Student-féle t-teszt; $p < 0,05$) mint 100 %.

Az EngA és a ChiB mellett, hogy részt vesznek az ASD-ban és segítik a konidiogenezist, hatékonyan hozzájárulhatnak a telep parazita gombák elleni védelméhez, vagy kompetitív fajok jelenlétének visszaszorításához is. Az EngA és a ChiB ugyanakkor a termelő törzsre is veszélyt jelenthet (9. táblázat). Nemcsak konídiumaik kicsírázását/növekedését gátolhatják, de magát az EngA-t, illetve ChiB-t termelő tenyészet túlélését is veszélyeztethetik. Ez utóbbit mutatja a 19. ábra: Szénéhező kultúrákban a $\Delta chiB \Delta engA$ duplamutáns sokkal jobban megőrzi életképességét, mint a ChiB-t és EngA-t is termelő kontroll törzs. Hasonló jelenséget (kisebb sejtpusztulási rátát) figyeltek meg Shin és munkatársai (2009) is a *nagA* (hexózáminidáz gén) inaktiválását követően. Ez egyben azt is jelenti, hogy a hidrolázokat termelő és (ha nem azonosak a termelőkkel) a hidrolázok által elérhetővé vált tápanyagokat hasznosító sejteknek képeseknek kell lenni hatékonyan védekezni a sejtfalhidrolázok aktivitásával szemben.



19. ábra Az *A. nidulans* tNJ34.8 ($\Delta engA \Delta chiB$; fehér oszlopok) és tNJ36 (kontroll; szürke oszlopok) életképességének változása szénéhező körülmények között. Az életképességet a friss, glükóz tartalmú tápközegebe átmosott micélium 1 nap alatt mutatott növekedésével jellemeztük. Az ábrán 4 független mérés átlagai és szórásai szerepelnek. A két törzs életképessége közötti szignifikáns (Student-féle t-teszt, $p < 0,05$) különbséget a „*” szimbólumok jelölik.

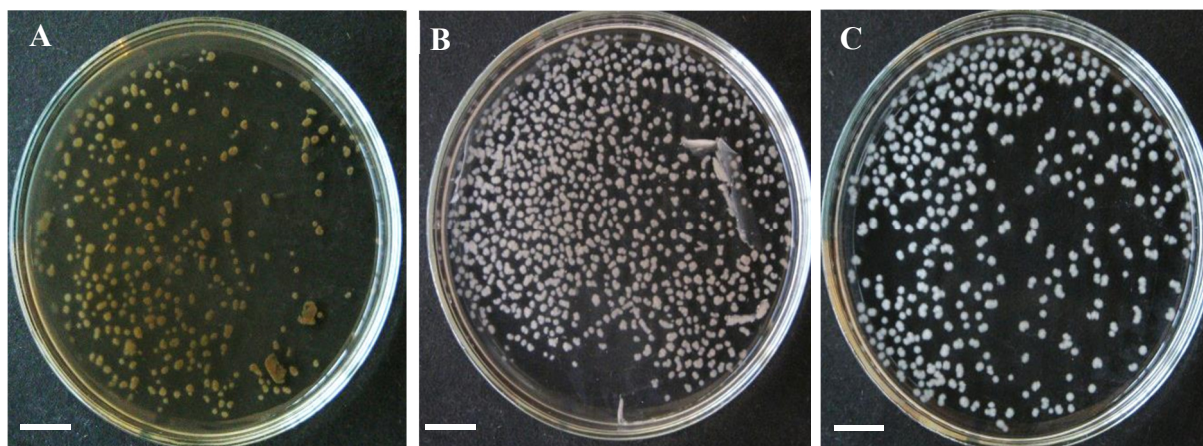
5.2.2.5 A sejtfalhidrolázok és a melanintermelés kapcsolata

A melanin az élővilágban általánosan elterjedt barnás-feketes pigment. Típusától függően 1,8-dihidroxinaftalén (DHN), L-3,4-dihidroxifenilalanin (DOPA), glutaminil-3,4-dihidroxibenzén, illetve katekol köztitermékeken keresztül képződhet gombákban (Langfelder és munkatársai 2003, Eisenman és Casadevall 2012). Az *A. nidulans* elsősorban DOPA típusú

melaninokat állít elő; képződésük az ivo szekunder metabolit génklaszterhez köthető (Birse és Clutterbuck 1990, Gonçalves és munkatársai 2012, Pombeiro-Sponchiado és munkatársai 2017). A melaninok fontos védelmi feladatokat látnak el; védnek az UV- és az ionizáló sugárzással szemben, antioxidáns hatásúak, képesek toxikus molekulák (pl. nehézfémek, echinocandinok) megkötésére, de gátolhatják sejtfalbontó hidrolázok működését is (Kuo és Alexander 1967, Dixon és munkatársai 1991, van Duin és munkatársai 2002, Gómez és Nosanchuk 2003, Maligie és Selitrennikoff 2005, Eisenman és Casadevall 2012).

Az *A. nidulans* gombában a melanin termelést – többek között – a szénéhezés is indukálja (van Munster és munkatársai 2016). A melanizáció nemcsak a konidiofórok sejtfalára jellemző (Birse és Clutterbuck 1990), de melanizálódnak a vegetatív hifák is (5. ábra) és a melanin jelenléte a fermentléből is kimutatható. Ezzel párhuzamosan az ivo klaszter indukálódása transzkripciós szinten is megfigyelhető (5. melléklet).

A melanin termelés és a fermentlé kitináz, illetve β -1,3-glükánáz aktivitása között szoros pozitív korrelációt találtunk (20. ábra, 10. táblázat). Hasonlóan szoros korreláció a melanin termelés és a proteináz aktivitások között nem volt (10. táblázat). A *chiB* és/vagy az *engA* gén deléciója gyakorlatilag megszüntette a melanizációt (10. táblázat, 20. ábra). A tápközeghez adott *Trichoderma* litikáz, amely jelentős β -glükánáz és kitináz aktivitással (is) rendelkezik, indukálta az egyébként gyenge melanin termelő FGSC A4 törzs (10. táblázat) melanin termelését szénéhező körülmények között és növekvő tenyészetekben egyaránt (6. melléklet).



20. ábra Melanizáció az *A. nidulans* FGSC A26 (A), FGSC A4 (B) és tNJ34.8 ($\Delta chiB \Delta engA$) törzseinek szénéhező tenyészeiben

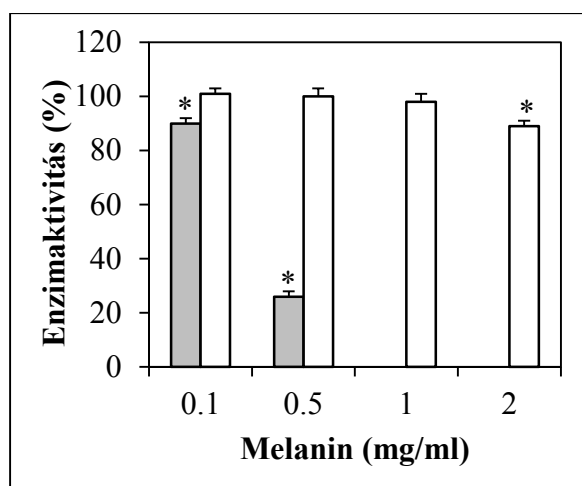
A szénéhezést a kései exponenciális fázisú tenyészetek szénforrás mentes tápközegbe történő átmosásával indukáltuk; a reprezentatív fotók az átmosást követő 50. órában készültek. Bár = 10 mm

Vizsgált törzsek	melanin (A ₄₀₅)	kitináz aktivitás (U/ml)	β-1,3-glükanáz aktivitás (U/ml)	proteínáz aktivitás (U/ml)
tHS30.3 (<i>chiB</i> ⁺ , <i>engA</i> ⁺)	0,320 ± 0,020	1,4 ± 0,1	100 ± 12	5,8 ± 0,6
FGSC A4 (<i>chiB</i> ⁺ , <i>engA</i> ⁺)	0,110 ± 0,010	0,4 ± 0,05	68 ± 8	3,8 ± 0,3
FGSC A26 (<i>chiB</i> ⁺ , <i>engA</i> ⁺)	0,470 ± 0,030	1,5 ± 0,1	142 ± 15	6,5 ± 0,7
tNJ11 (<i>chiB</i> ⁺ , <i>engA</i> ⁺)	0,350 ± 0,020	1,5 ± 0,1	96 ± 10	6,1 ± 0,7
tNJ12 (Δ <i>chiB</i>)	0,032 ± 0,002	-	88 ± 9	4,5 ± 0,5
tNJ33.3 (Δ <i>engA</i>)	0,040 ± 0,002	0,9 ± 0,1	53 ± 5	2,1 ± 0,2
tNJ34.8 (Δ <i>chiB</i> Δ <i>engA</i>)	0,026 ± 0,002	-	52 ± 4	1,9 ± 0,2
tNJ78.4 (Δ <i>pepJ</i> Δ <i>prtA</i>)	0,345 ± 0,030	1,2 ± 0,1	93 ± 9	1,1 ± 0,3
Pearson-féle korrelációs koefficiens (melanin tartalom – enzimaktivitás)	-	0,88 (<i>p</i> = 0,0035)	0,87 (<i>p</i> = 0,0053)	0,53 (<i>p</i> = 0,1731)

10. táblázat Különböző *A. nidulans* törzsek melanin és extracelluláris hidroláz termelésének összehasonlítása szénéhező körülmények között
A szénéhezést a kései exponenciális fázisú tenyészetek szénforrás mentes tápközegebe történő átmosásával (0 h) indukáltuk; a mintavétel az átmosást követő 50. órában történt. A táblázat három párhuzamos mérés átlagait és szórásait tartalmazza.

Mindezek alapján úgy gondoljuk, hogy a melanin termelést nem közvetlenül a szénéhezés váltja ki, hanem a szénéhezés által indukált ASD-ban résztvevő enzimek (EngA, ChiB) sejtfalkárosító hatásának a következménye. Az a korábbi megfigyelés, miszerint az XprG transzkripciós faktor részt vesz a melanin termelés indukálásában szénéhezés alatt (Katz és munkatársai 2013) szintén azzal magyarázható, hogy az XprG közvetlenül (vagy a BrlA közvetítésével közvetve) indukálja a *chiB* és *engA* géneket.

A tisztított EngA és ChiB enzimekkel végzett *in vitro* vizsgálataink alapján a melanin a ChiB kitináz működését gátolta, de nem volt érdemi hatással az EngA β -1,3-glükanáz aktivitására (21. ábra). A melanin kitinázgátló hatása összhangban van Kuo és Alexander (1967) megfigyeléseivel és feltehetőleg azzal magyarázható, hogy a melanin a kitinhez kapcsolódva elérhetetlenné tette azt az enzim számára. A *Trichoderma* litikázzal kezelt tenyészetekhez adott melanin – Kuo és Alexander (1967) vizsgálataival összhangban – hatékonyan gátolta a hifák darabolódását és a pelleték szétesését, azaz a sejtfaldegradációt (6. melléklet).



21. ábra A DOPA melanin hatása a ChiB kitináz (szürke) és az EngA β -1,3-glükanáz (fehér) aktivitásokra *in vitro*

Az ábrán 4 párhuzamos mérés átlagai és szórásai szerepelnek. A kezeletlen enzimpreparátumok aktivitása (100 %) $2 \pm 0,1$ U/ml (ChiB) és 200 ± 15 U/ml (EngA) volt. A „*” szimbólumok a 100 %-nál szignifikánsan kisebb (Student-féle t-teszt, $p < 0,05$) értékeket jelölik.

A fentiek alapján a melanin szintézis egyik feladata, hogy védelmet nyújt a sejtfalhidrolázokkal szemben. E folyamat része lehet azon mechanizmusoknak, amelyek lehetővé teszik, hogy az ASD valóban csak az elhalt sejtek falát bontsa le, megkímélve a melanin termelésre képes, még élő sejteket beleértve a konidiofórokat hordozó talpsejteket is.

A melanizáció a biotechnológia számára is fontos folyamat. A fermentációs iparban a melanin képződése fokozott habzáshoz, a vékonyabb csövek eltömődéséhez, valamint az enzimtermelés hatékonyságának csökkenéséhez vezethet (Pardo-Planas és munkatársai 2017).

A *ΔchiBΔengA* mutánsok így nemcsak stabilabb pellet morfológiájuk (és jobb szűrhetőségük), de csökkent melanin termelésük miatt is előnyösek lehetnek az ipar számára. A melaninok fémionkötő képessége (Fogarty és Tobin 1996, Costa és munkatársai 2012) miatt a melanin termelés intenzifikálása – megnövelve a gombák bioszorpciós kapacitását – hatékonyabb bioremediációs, illetve biomining („biobányászat”) stratégiák kidolgozását teheti lehetővé.

A növényi, sőt humán kitinázok antifungális jelentősége egyaránt ismert (Punja és Zhang 1993, Vega és Kalkum 2012). Ugyanakkor a növényvédelemben gyakran használnak melaninszintézist gátló szereket (Motoyama és Yamaguchi 2003) és több kutatócsoport is tanulmányozza a melaninszintézist gátló szerek humánterápiás felhasználásának lehetőségeit (Nosanchuk és Casade 2006, Eisenman és Casadevall 2012). Vizsgálataink alapján a melaninok védelmet nyújtanak a gomba számára a kitinázokkal szemben. Éppen ezért minden olyan esetben, amikor az antifungális stratégia a kitinázok gombaölő hatásán alapul (pl. kitináz túltermelő transzgénikus növények (Cletus és munkatársai 2013, Hamid és munkatársai 2013), kitotriozidáz génterápia (Gordon-Thomson és munkatársai 2009), kitináz tartalmú antifungális krémek (Hamid és munkatársai 2013)), a melaninszintézist gátló anyagok kombinált terápiában történő felhasználása jelentősen növelheti a terápia sikerességét.

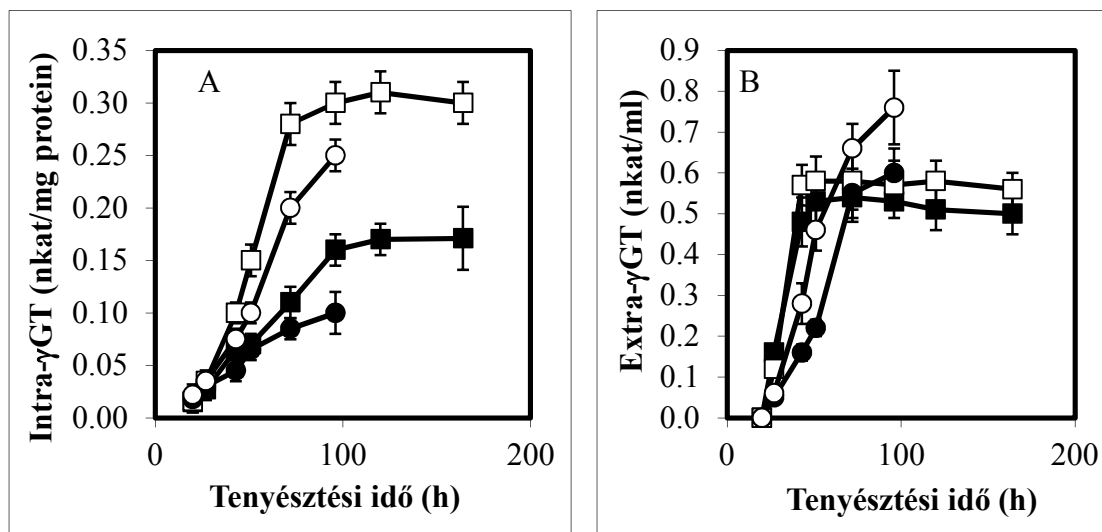
5.2.3 A *GgtA* γ -glutamil transzpeptidáz és jelentősége a szénéhezérésre adott stresszválaszban

5.2.3.1 A *GgtA* fehérje és tulajdonságai

A γ GT-ok lokalizációja igen változatos: Emlős sejtekben megtalálható a citoplazma membránhoz kötötten (Heisterkamp és munkatársai 2008), míg a *S. cerevisiae* és a *S. pombe* esetében a vakuólum membránon lokalizálódik (Springael és Penninckx 2003, Matsuyama és munkatársai 2006). Kimutatták jelenlétét a növényi, illetve gomba sejtfalban (Ohkama-Ohtsu és munkatársai 2008, Bello és munkatársai 2013) és baktériumok periplazmikus terében (Shibayama és munkatársai 2007) is. Extracelluláris képződését – többek között – a *Histoplasma capsulatum*, *Penicillium roqueforti* és az *A. nidulans* esetében figyelték meg korábban (Tomita és munkatársai 1990, Zarnowski és munkatársai 2008, Saykhedkar és munkatársai 2012).

Az *A. nidulans* szénéhező és szénforrás limitált (laktóz szénforráson növekvő) tenyészetekben egyaránt megnövekedett a specifikus γ GT aktivitás (22. ábra). Az enzim nemcsak a sejtekhez kötötten, de extracellulárisan is jelen volt (22. ábra). A tápközeghez adott

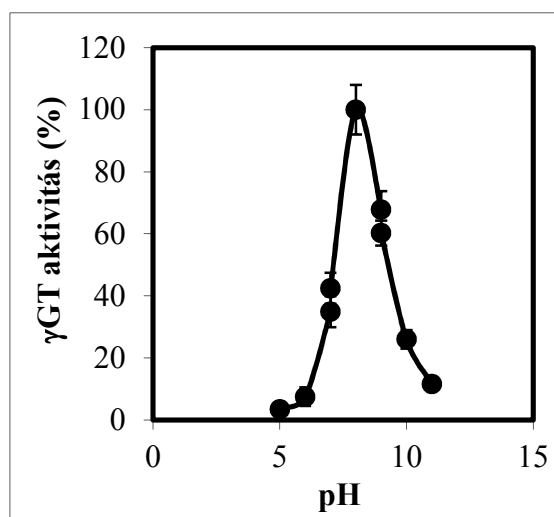
kazein pepton a szénéhező és a laktózos tenyészetek esetében is megnövelte a specifikus γ GT aktivitásokat (22. ábra).



22. ábra Az intracelluláris (A) és az extracelluláris (B) γ GT aktivitások változása szénstressznek kitett *A. nidulans* tNJ36 tenyészetekben

A kései exponenciális fázisú micéliumot szénforrás mentes tápközegbe (■, □), illetve 20 g/l laktózt tartalmazó tápközegbe (●, ○) mostuk át (20 h). Egyes tenyészetekhez (□, ○) 5 g/l kazein peptont adtunk. Az ábrákon 4 független mérés átlagai és szórásai szerepelnek.

Szénéhező *A. nidulans* (FGSC A26) tenyészetek fermentlevéből frakcionált amónium-szulfátos kicsapás és ioncsere kromatográfia segítségével részlegesen megtisztítottunk egy γ GT aktivitást mutató enzimet (GgtA). A részleges tisztítás a specifikus aktivitást 30 szorosára növelte. Az enzim pH optimumát pH 8,0-nál detektáltuk (23. ábra).



23. ábra A γ GT pH-függő aktivitása

Az ábrán 4 független mérés átlagai és szórásai láthatóak. A reakcióközeg hőmérséklete 37 °C volt. A minták pH 8,0-on (37 °C) meghatározott aktivitását (95 U/ml) vettük 100 %-nak.

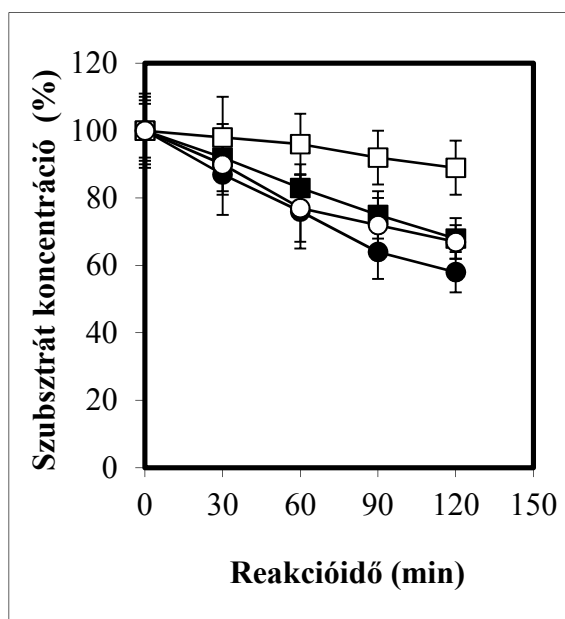
Számottevő aktivitást pH 7,0 alatt és pH 10,0 felett nem mutatott (23. ábra). Az enzim hőmérséklet optimuma 45 °C-nak (pH 8,0) adódott; 65 °C felett enzimaktivitást már nem tudtunk mérni. Az enzimpreparátum Michaelis-Menten kinetikát mutatott a γ -glutamil-*p*-nitroanilid (γ GpNA; γ -glutamil donor) szintetikus szubsztrát jelenlétében; a Michaelis konstans értéke 2 mM volt (pH 8,0; 37 °C; Gly-Gly γ -glutamil akceptor).

A GgtA a *Penicillium roqueforti* (Tomita és munkatársai 1990) γ GT-ához hasonlóan, számottevő hidroláz aktivitással (γ GpNA γ -glutamil donor jelenlétében) nem rendelkezett (11. táblázat). A γ GT mérésnél rutinszerűen használt Gly-Gly, mint γ -glutamil akceptor mellett jelentős aktivitást tapasztaltunk Glu jelenlétében és számottevő reakciósebességet mértünk Cys-Gly, Cys, Met és Ala tartalmú reakcióelegyekben is (11. táblázat). A Gln és a GSH, valamint kisebb mértékben, de a GSSG is jó γ -glutamil donornak bizonyult Gly-Gly γ -glutamil akceptor jelenlétében (24. ábra). A reakciókban képződő γ Glu-Gly-Gly tripeptid jelenlétét a reakcióelegyben Gonda Sándor (Debreceni Egyetem, Debrecen) és Kiss-Szikszai Attila (Debreceni Egyetem, Debrecen) LC-ESI-MS/MS (High-performance liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry) segítségével mindhárom γ -glutamil donor esetében igazolni tudta (Spitzmüller és munkatársai 2016).

γ -glutamil akceptor	relatív enzimaktivitás ^a (%)
20 mM Gly-Gly	100 ± 6 ^b
20 mM Glu	98 ± 6 ^b
20 mM Cys-Gly	36 ± 5 ^b
20 mM Met	36 ± 6 ^b
20 mM Cys	28 ± 5 ^b
20 mM Aln	25 ± 5 ^b
20 mM NH ₂ -OH ^c	9 ± 3
H ₂ O (kontroll)	10 ± 2

11. táblázat A GgtA γ GT aktivitása különböző γ -glutamil akceptorok jelenlétében

^a – Az enzimaktivitást a γ GpNA-ből felszabaduló *p*-nitroanilid koncentrációváltozásának detektálásával határoztuk meg (37 °C; pH 8,0). A Gly-Gly γ -glutamil akceptor jelenlétében mért aktivitást (25 nkat) tekintettük 100 %-nak. A táblázat 4 párhuzamos mérés átlagait és szórásait tartalmazza. ^b – Az enzimaktivitás szignifikánsan nagyobb (Student-féle t-teszt, $p < 0,05$) a kontroll értékeknél. ^c – Imaoka és munkatársai (2010) módszerét követve γ -glutamilhidroxamát képződést nem tudtunk kimutatni. Gln, Asp, Gly, Ser, Thr és Orn esetében a detektált enzimaktivitások szintén nem haladták meg a kontrollnál mért értékeket szignifikáns (Student-féle t-teszt, $p < 0,05$) mértékben.



24. ábra A γ -glutamil donor koncentrációváltozása a GgtA által katalizált reakcióban

A reakcióelegy 1 mM GSH-t (■), 1 mM GSSG-t (□), 1 mM Gln-t (●) vagy 1 mM γ GpNA-t (○) tartalmazott, mint γ -glutamil donort. A γ -glutamil akceptor 20 mM Gy-Gly volt. A reakcióelegy hőmérsékletét 25 °C-ra, pH-ját 8,0-ra állítottuk. Gly-Gly hiányában számottevő γ -glutamil donor fogyást nem tapasztaltunk. Az ábrán három párhuzamos mérés átlagai és szórásai szerepelnek.

A fentiek alapján a GgtA egy lúgos pH-n aktív enzim, amely GSH és GSSG mellett Gln γ -glutamil donort is képes felhasználni és elsődlegesen nem hidroláz, hanem transzpeptidáz aktivitással rendelkezik.

A *Helicobacter pylori* periplazmikus γ GT-a a sejtek szén és nitrogén anyagcseréjében vesz részt; feladata az extracelluláris GSH és a Gln hidrolízise ugyanis a sejtek a GSH-t és a Gln-t közvetlenül nem tudják felvenni, csak a hidrolízisükkor képződő Glu-ot, Cys-Gly-t, illetve ammóniát (Shibayama és munkatársai 2007). A *Bacillus subtilis* γ GT-a a poli- γ -Glu-Glu hidrolíziséért és a felszabaduló Glu hasznosításáért felelős (Kimura és munkatársai 2004). A növényi apoplastban (Ohkama-Ohtsu és munkatársai 2008), illetve egyes gombák sejt falában (*Sclerotinia sclerotiorum*; Li és munkatársai 2012) a γ GT a GSSG hidrolízisével biztosítja a megfelelő redox miliő (GSH/GSSG arány) fenntartását. Az általunk tapasztalt kis hidroláz aktivitás (11. táblázat) és a GSSG-vel, mint szubsztráttal mutatott kis aktivitása (24. ábra) miatt hasonló élettani jelentősége az *A. nidulans* extracelluláris γ GT-ának nagy valószínűséggel nincsen. A kis hidroláz aktivitása és a Gln-nal (γ -glutamil donor), illetve Glu-tal (γ -glutamil akceptor) mutatott nagy aktivitása miatt (11. táblázat, 24. ábra) ez az enzim ugyanakkor alkalmas lehet γ -glutamil vegyületek (pl. γ -Glu-Glu; El Sayed és munkatársai 2010) ipari léptékű előállítására.

5.2.3.2 A *GgtA*-t kódoló gén azonosítása, a $\Delta ggtA$ törzs és tulajdonságai

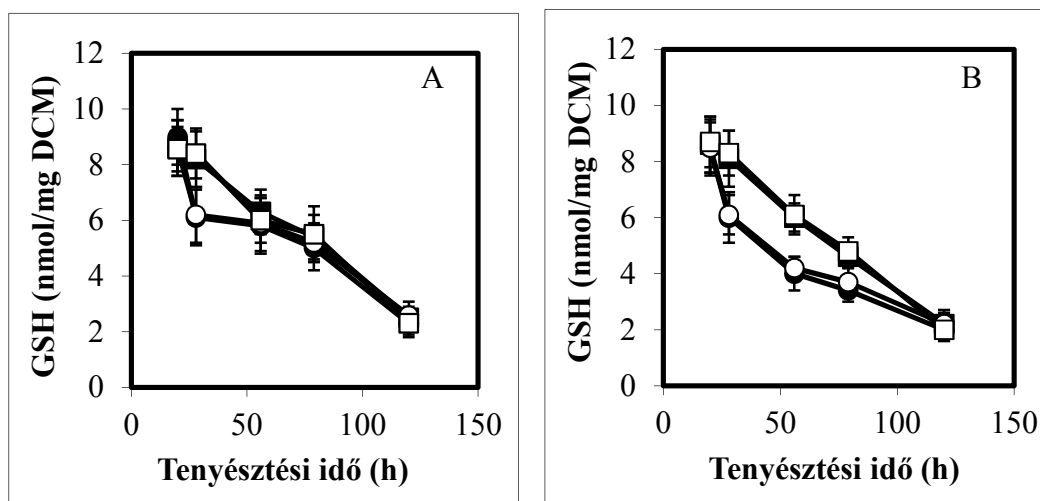
Az *A. nidulans* genomja két γ GT domainnel rendelkező gént is tartalmaz: Az AN10444 gén egy “*Pezizomycotina*-only” klád (GGT1 szubklád) csoportba sorolható fehérjét kódol, míg az AN5658 gén feltételezett terméke a *Pezizomycotina-Saccharomycotina* (GGT3) klád tagja (Bello és Epstein 2013). Mindkét gén indukálódott szénéhezés hatására (5. melléklet). Az AN10444 (*ggtA*) deléciója teljes egészében megszüntette a sejtek és a fermentlé γ GT aktivitását, míg az AN5458 gén deléciója érdemben nem befolyásolta azt (12. táblázat). Mindezek alapján az AN1444 gén volt a felelős a (szénéhező) tenyészetekben megfigyelt γ GT aktivitásokért. Ez azonban nem zárja ki annak a lehetőségét, hogy az AN5458 gén is egy γ GT-t kódol, csak aktivitása az általunk használt módszerrel (Spitzmüller és munkatársai 2015a) nem detektálható.

vizsgált törzs	glükóz	kazein pepton	
	intra- γ GT (nkat/mg protein)	extra- γ GT (nkat/ml)	intra- γ GT (nkat/mg protein)
tNJ36 (kontroll)	0,016 $\pm$ 0,004	0,58 $\pm$ 0,05	0,30 $\pm$ 0,04
tNJ190-1 ($\Delta ggtA$)	< 0,005	< 0,006	< 0,005
tNJ190-2 ($\Delta ggtA$)	< 0,005	< 0,006	< 0,005
tNJ190-3 ($\Delta ggtA$)	< 0,005	< 0,006	< 0,005
tNJ151-1 (<i>ggtA</i> ⁺)	0,014 $\pm$ 0,004	0,58 $\pm$ 0,05	0,37 $\pm$ 0,04
tNJ151-2 (<i>ggtA</i> ⁺)	0,012 $\pm$ 0,005	0,43 $\pm$ 0,06	0,31 $\pm$ 0,03
tNJ188-1 (Δ AN5658)	0,015 $\pm$ 0,004	0,57 $\pm$ 0,05	0,33 $\pm$ 0,03
tNJ188-2 (Δ AN5658)	0,012 $\pm$ 0,004	0,51 $\pm$ 0,05	0,29 $\pm$ 0,05
tNJ188-3 (Δ AN5658)	0,013 $\pm$ 0,003	0,52 $\pm$ 0,05	0,36 $\pm$ 0,03
tNJ189-1 (AN5658 ⁺)	0,013 $\pm$ 0,005	0,55 $\pm$ 0,05	0,34 $\pm$ 0,004
tNJ189-2 (AN5658 ⁺)	0,012 $\pm$ 0,004	0,51 $\pm$ 0,06	0,33 $\pm$ 0,005

12. táblázat Deléció és komplementált *A. nidulans* törzsek specifikus γ GT aktivitásai

A glükóz szénforráson felnevesztett kései exponenciális fázisú (18 h) micéliumot egyedüli szénforrásként 5 g/l kazein peptont tartalmazó tápközegebe mostuk át. Az extracelluláris γ GT aktivitások méréséhez a mintákat a 100 h tenyészetekből vettük. Az intracelluláris γ GT aktivitásokat a 18 h, illetve a 48 h tenyészetekből határoztuk meg. A táblázat 4 független mérés átlagait és szórásait tartalmazza. A 18 h (átmosás előtti) tenyészetekből extracelluláris γ GT aktivitást nem tudunk kimutatni.

Meglepő módon a *ggtA* deléciója nem befolyásolta a szénstressznek kitett tenyészetek GSH anyagcseréjét (25. ábra), azaz a GgtA enzim nem szükséges a sejtek szénstressz alatt bekövetkező GSH tartalmának csökkenéséhez. Bár sokáig a γ GT-t tartották a legfontosabb GSH lebontó enzimnek (Pócsi és munkatársai 2004), az újabb vizsgálatok alapján a citoszolikus GSH lebontásában sok faj esetében más enzimek működnek közre.



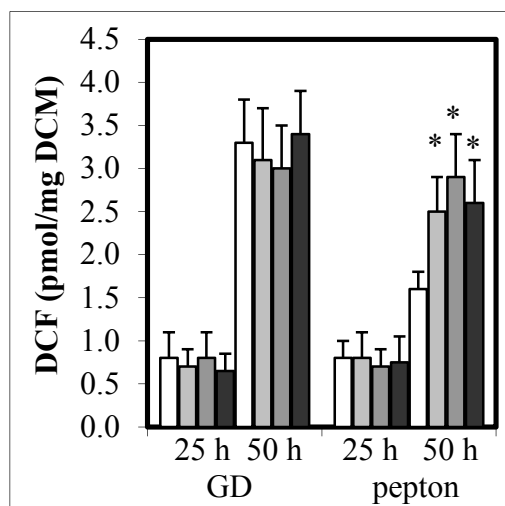
25. ábra A *ggtA* gén deléciójának hatása az *A. nidulans* tenyészetek GSH tartalmának csökkenésére. A glükóz szénforráson felnövesztett kései exponenciális fázisú micélium (tNJ190-1 *AggtA* törzs – fekete szimbólumok; tNJ36 kontroll törzs – fehér szimbólumok) szénforrás mentes tápközegbe (A), illetve 20 g/l laktózt tartalmazó tápközegbe (B) lett átmosva („●” és „○” szimbólumok). A táplevesek egy része 5 g/l kazein peptonnal lett kiegészítve („■” és „□” szimbólumok). Az ábrákon 4 független mérés átlagai és szórásai szerepelnek. A sejtek GSSG tartalma 0,3-0,5 nmol/mg DCM között volt minden mintavételi pont esetében. Extracelluláris GSH és GSSG jelenlétét nem sikerült detektálnunk. A kontroll és a *AggtA* törzs között nem volt szignifikáns (Student-féle t-teszt, $p < 0,05$) különbség. A tNJ190-2, tNJ190-3, tNJ151-1 és tNJ151-2 törzsek viselkedése hasonló volt a tNJ190-1 és a tNJ36 törzsek viselkedéséhez.

Emlős sejtekben a ChaC γ -glutamil ciklotranszferáz vesz részt az intracelluláris GSH lebontásában, míg a citoplazma membránhoz kötött γ GT az extracelluláris GSH lebontásáért felelős (Kumar és munkatársai 2012). Növényekben (*Arabidopsis thaliana*) szintén egy γ -glutamil ciklotranszferáz bontja le a citoszolikus GSH-t; a sejtfal γ GT-ai az extracelluláris GSSG hidrolízisét végzik (Ohkama-Ohtsu és munkatársai 2008). A *S. cerevisiae* esetében a γ GT a vakuoláris GSH lebontását biztosítja, míg a citoszolikus GSH a DUG (Deficient in Utilization of Glutathione) útvonalon keresztül bomlik le. A DUG útvonal három génből áll: a *dug2* és a *dug3* egy glutamin amidotranszferáz alegységeit kódolja, míg a *dug1* egy Cys-Gly dipeptidáz génje (Kumar és munkatársai 2003, Ganguli és munkatársai 2006, Kaur és munkatársai 2012). A DUG útvonal a *Candida albicans* GSH anyagcseréjében is fontos (Desai és munkatársai 2011) és a *dug* gének ortológjai elterjedtek a gombák körében és megtalálhatóak az *A. nidulans* genomjában is. Elképzelhető, hogy ezen útvonal felelős a szénstressznek kitett *A. nidulans* tenyészetekben tapasztalt GSH koncentráció csökkenésért. Ezt a lehetőséget támasztja alá az a megfigyelés is, miszerint szénéhezés hatására a *dugA* (AN1092; *dug1* ortológ) és a *dugC* (AN3459; *dug3* ortológ) gének indukálódtak (Spitzmüller és munkatársai 2015b).

Több megfigyelés is arra utal, hogy a γ GT fiziológiai funkciója kapcsolatba hozható az extracelluláris fehérjék lebontásával és az extracelluláris proteinázok képződésével:

- 1) A GgtA szénstressz alatt termelődött (22. ábra), azaz olyan körülmények között, amikor az alternatív energiaforrások (pl. extracelluláris fehérjék) hasznosítása kritikus a gomba számára.
- 2) Képződését kazein peptonnal indukálni lehetett (22. ábra), de indukáló hatásának bizonyult a marha szérumalbumin (BSA), az élesztőkivonat, a Glu és a Gln is (Spitzmüller és munkatársai 2015a).
- 3) Az extracelluláris proteináz termelés szintén indukálódott szénstressz hatására (Szilágyi és munkatársai 2010b) és a peptidek jelenléte növelte a szekretált proteinázok mennyiségét is (Szilágyi és munkatársai 2010b, 2011, Spitzmüller és munkatársai 2015a), ugyanakkor a proteináz termelést befolyásoló számos mutáció (pl. a FdaA és GanB jelátviteli útvonalak mutációi) a γ GT aktivitásokat is megváltoztatta (Molnár és munkatársai 2004, 2006).
- 4) A kleisztotéciumok képződését a *ggtA* génelécio, valamint az extracelluláris proteinázokat kódoló *pvtA* és *pepJ* gének delécioja egyaránt kedvezőtlenül befolyásolta (Spitzmüller és munkatársai 2015a, Emri és munkatársai 2018a).

Szénéhező körülmények között az *A. nidulans* tenyészetek redox egyensúlya felborul (Emri és munkatársai 2004a, 2004b). Vizsgálataink alapján kazein pepton adagolásával a redox egyensúlyvesztés mérsékelhető volt (26. ábra).



26. ábra A kazein pepton hatása a szénéhező *A. nidulans* tenyészetek redox homeosztázisára. A glükóz szénforráson felnövesztett kései exponenciális fázisú (20 h) micéliumot (tNJ190-1, tNJ190-2, tNJ190-3 Δ ggtA törzsek – szürke oszlopok; tNJ36 kontroll törzs – fehér oszlopok) szénforrás mentes tápközegbe (GD; „glucose depleted”), illetve egyedüli szénforrásként kazein peptont tartalmazó tápközegbe (pepton) mostuk át. A mintákat az atmoszféra követő 25 h és 50 h időpontokban vettük. Az ábra 4 független mérés átlagait és szórásait tartalmazza. A redox egyensúly felborulását a DCF képződésével jellemeztük. A képződött DCF mennyisége az 50 h tenyészetekben szignifikánsan (Student-féle t-teszt, $p < 0,05$) nagyobb volt, mint a 25 h tenyészetek esetén. A „*” szimbólumok a kontroll törzstől való szignifikáns (Student-féle t-teszt, $p < 0,05$) eltérést jelölik egy adott mintavételi időpontban.

A kazein pepton ezen jótékony hatása a *AggtA* törzsekben azonban szignifikánsan kisebb mértékben érvényesült, noha a *ggtA* gén deléciója önmagában nem befolyásolta a szénéhező tenyészetek redox homeosztázisát (26. ábra). E vizsgálatok szintén arra utalnak, hogy az extracelluláris γ GT és az extracelluláris proteinázok nemcsak képződésük szabályozását, de funkciójukat tekintve is összefügghetnek egymással. A GgtA lúgos pH optimuma (23. ábra), nagy transzpeptidáz, de kis hidroláz aktivitása (11. táblázat), valamint a Gln γ -glutamil donorként történő felhasználása (24. ábra) alapján elképzelhető, hogy ez az enzim nem γ -glutamil vegyületek bontásával, hanem γ -glutamil vegyületek szintézisével járul hozzá az extracelluláris fehérjék/peptidek hasznosításához. Irodalmi adatok alapján a γ -glutamil vegyületek fontos szabályozó feladatokat láthatnak el (Viña és munkatársai 1985), illetve az eredeti peptideknél, aminosavaknál kedvezőbb tulajdonságokkal (pl. nagyobb oldékonyság, illetve stabilitás) rendelkezhetnek (Hara és munkatársai 1992, Suzuki és munkatársai 2007); mindkettő érdemben befolyásolhatja a peptidek/fehérjék extracelluláris hasznosítását.

5.3 Az *Aspergillus pachycristatus* echinocandin toleranciája

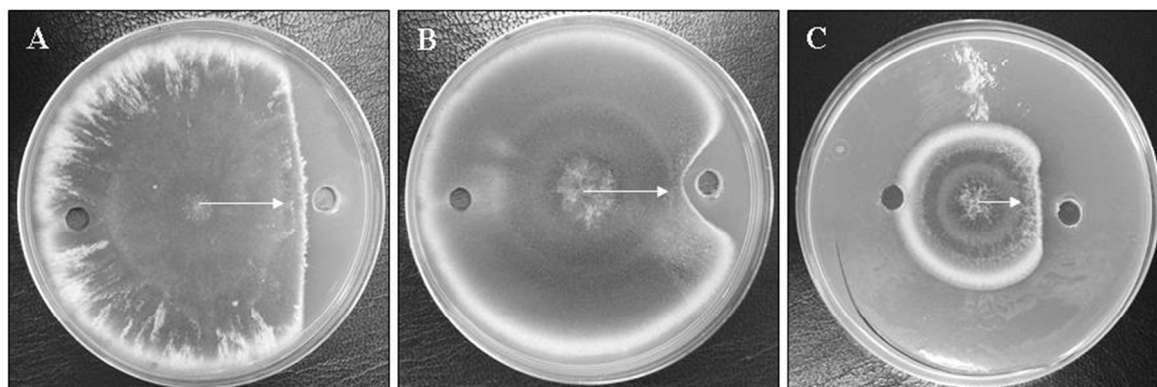
A 3.3 alfejezetben megfogalmazott célok elérése érdekében az ECB termelő *A. pachycristatus* ATCC 58397 törzs („*A. nidulans* var. *roseus*”) viselkedését tanulmányoztuk. E törzs ipari léptékű ECB termelésre is felhasználható; akár 500 mg/l ECB előállítására is képes 24 °C-on, de 37 °C-on nem termel echinocandinokat (Boeck és Kastner 1981, Tóth és munkatársai 2011). Kísérleteinkben az *A. pachycristatus* ATCC 58394 törzs 24 °C-on, illetve 37 °C-on mutatott viselkedését, illetve az ATCC 58394 törzs és az echinocandinokat nem termelő és echinocandinokra érzékeny *A. nidulans* (FGSC A4 törzs) tulajdonságait hasonlítottuk össze. Vizsgáltuk a törzsek echinocandin érzékenységet, β -1,3-glukánszintáz aktivitását, kitin szintézisét és sejtfal összetételét is (Tóth és munkatársai 2012, Emri és munkatársai 2013).

A mikrodilúciós módszerrel meghatározott MIC (minimális gátló koncentráció) értékek mindkét faj esetében nagyak (> 200 μ g/ml) adódtak, összhangban az irodalmi adatokkal (Shalit és munkatársai 2003), ezért meghatároztuk a MEC (minimális hatásos koncentráció; mikropelletes növekedést kiváltó legkisebb koncentráció) értékét is (Arikan és munkatársai 2001). Meglepő módon az *A. pachycristatus* ECB-re és caspofunginra nézve is érzékenynek, az *A. nidulans*-nál 5-ször érzékenyebbnek bizonyult 37 °C-on (13. táblázat).

Törzs	MEC _{ECB} ^a (µg/ml)	MEC _{caspofungin} ^a (µg/ml)	MIC _{ECB} ^a (µg/ml)	IC ₅₀ ^b (ng/ml)	β-1,3-glükán szintáz aktivitás (nkat/g fehérje)	
					37 °C	24 °C
<i>A. nidulans</i> FGSC A4	2,5	5	> 200	4,8 ± 0,2	58 ± 7	63 ± 7
<i>A. pachyristatus</i> ATCC 58397	0,5	1	> 200	5,1 ± 0,2	33 ± 5 ^{c,d}	52 ± 7 ^c

13. táblázat Az *A. pachyristatus* és az *A. nidulans* echinocandin érzékenysége

^a – A MEC és MIC értékek mikrodilúciós módszer segítségével lettek meghatározva 37 °C-on. A MEC esetében a mikropelletes növekedéshez, a MIC esetében a teljes növekedésgátláshoz szükséges legkisebb koncentrációkat detektáltuk (Arikan és munkatársai 2001). A három független mérés adatai, illetve a 24 °C-on mért értékek nem tértek el egymástól. A MIC_{caspofungin} értékek – a MIC_{ECB} értékekhez hasonlóan – nagyobbak voltak, mint 200 µg/ml mindkét hőmérsékleten. ^b – Az az ECB koncentráció (átlag ± szórás; n = 3), amely a β-1,3-glükán szintáz 50 %-os gátlását okozta. A 24 °C-on, illetve a 37 °C-on inkubált tenyészetekből származó minták értékei érdemben nem tértek el egymástól. A táblázat a 37 °C-on inkubált tenyészetekből származó minták adatait tartalmazza. ^c – A jelölt specifikus enzimaktivitási értékek (átlag ± szórás; n = 3) szignifikánsan kisebbek (Student-féle t-teszt, $p < 0,05$), mint az *A. nidulans* esetében mért értékek. ^d – A jelölt aktivitási érték (átlag ± szórás; n = 3) szignifikánsan kisebb (Student-féle t-teszt, $p < 0,05$), mint a 24 °C-on mért érték.



27. ábra Az ECB hatása az *A. pachyristatus* ATCC 58397 (A) és az *A. nidulans* FGSC A4 (B és C) növekedésére felületi kultúrákban

A tenyészetek 3 napig voltak 37 °C-on inkubálva nitrátos tápagon, majd a telep szélétől 1 cm-re fűrt lyukakba metanolt (bal oldali lyukak), illetve metanolba oldott ECB-t (5 mg; jobb oldali lyukak) adtunk. A nyilak a telep ECB kezelés előtti sugarát mutatják. A fotók a leoltást követő 5. napon készültek. A C ábrán szereplő tápagar már a leoltáskor is tartalmazott 25 µg/ml ECB-t.

Az ECB felületi kultúrákban (37 °C-on) hatásosan gátolta a már kinőtt micélium növekedését mindkét fajnál (27. ábra). A gátlási zóna alakja jól mutatja a paradox effektus (Wiederhold 2009) meglétét az *A. pachyristatus* esetében: Az ECB a lyuktól távolabb (kis koncentrációban) már gátolta a gomba növekedését, de növekedés még a lyukhoz közel (nagy ECB koncentrációnál) is megfigyelhető volt, ami egyenes telepszél kialakulását eredményezte (27A ábra) szemben a várt homorútól (27B ábra). Az *A. nidulans* esetében paradox effektusra

utaló növekedést csak abban az esetben tapasztaltunk, ha a gombát előkezeltük szubletális koncentrációjú ECB-vel (27C ábra).

A fentiek alapján az *A. pachycristatus* nem rendelkezik veleszületett echinocandin rezisztenciával sok más *Aspergillus* fajhoz hasonlóan (Imhof és munkatársai 2003, Antachopoulos és munkatársai 2008), ami az *A. pachycristatus* echinocandin termelése miatt meglepő (Boeck és Kastner 1981). Nem találtam irodalmi adatokat arra vonatkozóan, hogy a szintén echinocandin termelő *A. aculeatus*, *A. rugulosus* és *A. sydowi* (Emri és munkatársai 2013, Hüttel 2017) érzékeny-e a tápközeghez adott echinocandinra. A *Leotiomyces* család echinocandin termelő fajai (pl. a sporiofungin termelő *Pezicula radiciola*) ugyanakkor jól tolerálják a külsőleg adott echinocandinokat is (Yue és munkatársai 2018). Érdeemes megemlíteni, hogy a 24 °C-on („echinocandin termelő körülmények”) való tenyésztés nem befolyásolta a mért MEC értékeket. Elképzelhető, hogy az echinocandin tolerancia az echinocandin termeléssel párhuzamosan viszonylag lassan alakul ki, így a csírázó konídiumok még érzékenyek ezen gátlószer jelenlétére nemcsak 37 °C-on, de 24 °C-on is. A kinőtt micélium echinocandin érzékenységeinek pontos meghatározását ugyanakkor a faj 24 °C-on mutatott igen lassú növekedése (Tóth és munkatársai 2011), a paradox effektus és az endogén echinocandin jelenléte is megnehezíti.

A β -1,3-glükánszintáz mindkét faj esetében gátolható volt ECB-vel, összhangban a törzsek echinocandin érzékenységeivel, és a két enzim IC₅₀ értékei hasonlóak voltak (13. táblázat). Különbség volt ugyanakkor a specifikus β -1,3-glükánszintáz aktivitásokban: Az *A. pachycristatus* esetében kisebb értékeket mértünk, mint az *A. nidulans*-nál, ami magyarázhatja a MEC értékekben tapasztalt különbségeket (13. táblázat).

A sejtfalszintézisben potenciálisan résztvevő néhány gén relatív transzkripcióját megvizsgálva azt tapasztaltuk, hogy ECB termelés alatt több, potenciálisan kitin szintáz kódoló gén (*chsA*, *chsB*, *csmB*), illetve egy kitin szintázist szabályozó fehérje génje (az AN8710 ortológja) is indukálódott az ATCC 58397 törzsben (14. táblázat). A fenti gének – a *csmB* kivételével – ECB kezelés hatására is indukálódtak ECB-t nem termelő tenyészetekben (14. táblázat). Meglepő módon az *fksA* gén (feltételezett β -1,3-glükán szintáz gén) transzkripciójában nem tapasztaltunk változást (14. táblázat), noha a specifikus β -1,3-glükán szintáz aktivitások megnöttek ECB termelő körülmények között (13. táblázat).

Gén ^a	<i>A. pachycristatus</i> ATCC 58397		
	24 °C	37 °C	37 °C + ECB ^b
	Relatív expresszió (ΔCP) ^c		
<i>chsA</i> kitin szintáz (AN7032)	5,1 ± 0,8 ^d	7,6 ± 0,8	6,4 ± 0,7 ^d
<i>chsB</i> kitin szintáz (AN2523)	0,2 ± 0,7 ^d	1,7 ± 0,9	0,8 ± 0,7 ^d
<i>csmA</i> kitin szintáz (AN6318)	2,6 ± 1	2,3 ± 0,7	2,8 ± 0,8
<i>csmB</i> kitin szintáz (AN6317)	3,3 ± 0,8 ^d	4,6 ± 0,7	4,7 ± 0,7
kitin szintáz (AN4367)	10,6 ± 0,9	10,8 ± 0,9	10,9 ± 0,9
kitin szintézis regulátor (AN8710)	3,5 ± 0,8 ^d	6,6 ± 1	3,6 ± 1 ^d
kitin szintézis regulátor (AN1069)	4,9 ± 1	6,3 ± 0,9	6,2 ± 0,8
<i>fksA</i> β-1,3-glükán szintáz (AN3729)	4,5 ± 0,8	4,6 ± 0,7	4,5 ± 0,7

14. táblázat Az *A. pachycristatus* ATCC 58397 törzs sejtfal szintézisében potenciálisan résztvevő néhány gén relatív transzkripciója ECB termelő (24 °C) és ECB-t nem termelő körülmények (37 °C) között, illetve ECB kezelés (37 °C + ECB) hatására.

^a – A zárójelben feltüntetett génazonosítók az *A. nidulans* ortológ génjeit jelölik. ^b – A kezelés (az ECB végkoncentrációja 350 mg/l volt) a mintavétel (45 h) előtt 8 órával történt. ^c – $\Delta CP = CP_{\text{vizsgált gén}} - CP_{\text{referencia gén}}$, ahol a CP a PCR termék akkumulálódásához szükséges ciklusok száma és a referencia gén az *A. nidulans* eukarióta transzlációs elongációs faktor 3 (eEF-3) génjének (AN6700) ortológja volt. A kisebb ΔCP érték nagyobb relatív expresszióra utal. A táblázat 4 független mérés átlagait és szórásait tartalmazza. ^d – Szignifikáns (Student-féle t-teszt; $p < 0,05$) eltérés a 37 °C-on inkubált tenyészetekben mért értékektől.

Az élesztő fajok akár három β-1,3-glükán szintáz paralóg génnel is rendelkezhetnek (Katiyar és munkatársai 2012). Sőt a sporiofungin termelő *P. radiciola* genomjában szintén előfordul egy extra *fksI* gén (*fksIα*). Az *fksIα* gén a sporiofungin génklaszter közvetlen szomszédságában található. Transzkripciója független ugyan a sporiofungin termeléstől, de a tápközeghez adott echinocandinokkal indukálható és fontos szerepe van a gomba echinocandin toleranciájában (Yue és munkatársai 2018). Az *A. pachycristatus* esetében nincs irodalmi adat a genomban előforduló *fksA* paralógok jelenlétéről. Élesztő fajokban az Fks1 fehérje katalitikus aktivitását a Rho1 kis G fehérje (a β-1,3-glükán szintáz komplex regulációs alegysége) szabályozza többek között sejtfal stressz alatt is; azaz a β-1,3-glükán szintáz aktivitás erős poszttranszlációs szabályozás alatt áll (Qadota és munkatársai 1996). Így – függetlenül a β-1,3-glükán szintáz gének számától – elképzelhető, hogy a megnövekedett enzimaktivitás nem egy paralóg gén indukciójának, hanem a poszttranszlációs (poszttranszkripció) szabályozás megváltozásának következménye volt.

Az *A. nidulans* sejtfalának kitin és glükán tartalmára a tenyésztési hőmérséklet nem volt érdemi hatással; sejtfalösszetétele hasonló volt a 37 °C-on tenyésztett *A.*

*pachycristatus*éhoz (15. táblázat). Az *A. pachycristatus* sejtfalösszetételét a tenyésztési hőmérséklet ugyanakkor jelentősen befolyásolta: ECB termelő hőmérsékleten (24 °C) a sejtfal β -glükán tartalma csökkent, míg kitin tartalma növekedett a 37 °C-os tenyészetekben mért értékekhez képest (15. táblázat).

Strain	α -Glükán ^a (w/w %)	β -Glükán ^a (w/w %)	Kitin ^a (w/w %)
<i>A. nidulans</i> FGSC A4 37 °C	44 $\pm$ 5	19 $\pm$ 3	36 $\pm$ 5
<i>A. nidulans</i> FGSC A4 24 °C	44 $\pm$ 6	18 $\pm$ 3	35 $\pm$ 5
<i>A. pachycristatus</i> ATCC 58397 37 °C	48 $\pm$ 7	17 $\pm$ 3	31 $\pm$ 6
<i>A. pachycristatus</i> ATCC 58397 24 °C	48 $\pm$ 7	6 $\pm$ 2 ^{b,c}	45 $\pm$ 5 ^{b,c}

15. táblázat Az *A. pachycristatus* ATCC 58397 és az *A. nidulans* FGSC A4 sejtfalának összetétele 24 °C-on, illetve 37 °C-on inkubált tenyészetekben

^a – A táblázat 4 független mérés átlagait és szórásait tartalmazza. ^b – Szignifikáns (Student-féle t-teszt, $p < 0,05$) eltérés a 37 °C-on, illetve a 24 °C-on tenyésztett kultúrák között (Student-féle t-teszt, $p < 0,05$). ^c – Szignifikáns (Student-féle t-teszt, $p < 0,05$) eltérés a két törzs azonos hőmérsékleten tenyésztett kultúrái között.

Azaz, a kitin szintézisben potenciálisan résztvevő gének transzkripció változásai (14. táblázat) jól korreláltak a sejtfalösszetétel változásával. Hasonló szoros kapcsolat a β -glükánok esetében nem volt: az *fksA* transzkripciója nem változott (14. táblázat), míg a specifikus β -1,3-glükán szintáz aktivitás nőtt a hőmérséklet csökkentésével (13. táblázat), a β -glükán tartalom ugyanakkor csökkent ugyanilyen körülmények között (15. táblázat). Elképzelhető, hogy a megnövekedett specifikus aktivitás sem tudta ellensúlyozni az ECB gátló hatását. Bármilyen is állt a háttérben a β -glükán anyagcsere változásai jól demonstrálják, hogy egy biológiai folyamat alakulását nem lehet minden esetben megjósolni pusztán a folyamatban résztvevő gének transzkripciójában, illetve a folyamatban résztvevő fehérjék mennyiségében/aktivitásában bekövetkezett változások alapján. (Hasonló jelenséget a vaséhez *A. fumigatus* tenyészeteknél tapasztaltunk, ahol a vastartalmú fehérjék transzkripciója nőtt, mennyiségük azonban csökkent; 5.4 fejezet).

Kevés információ áll rendelkezésre arról, hogy az echinocandin termelő fajok hogyan védekeznek az általuk termelt, vagy a tápközeghez adott echinocandinnal szemben. Az echinocandin génklaszterekben gyakori transzporter gének felvetik annak lehetőségét, hogy a klaszter megfelelő aktivitása esetén az intenzív efflux elegendő a védekezéshez (Hüttel 2017). Ez a lehetőség az *A. pachycristatus* esetében is fennáll: ECB termelés alatt a klaszterspecifikus transzporterek biztosítják a gomba védelmét; 37 °C-on, amikor a klaszter

inaktív (Boeck és Kastner 1981, Tóth és munkatársai 2011), a gomba védtelenné válik. A helyzet azonban valószínűleg ennél bonyolultabb. A *P. radiciola* esetében a korábban már említett *fksl* α gén szükséges az exogén echinocandinokkal szembeni rezisztenciához és feltehetőleg védi a gombát az általa termelt sporiofungin extracelluláris akkumulációja esetén is (Yue és munkatársai 2018). Az *A. pachycristatus* ECB termelés alatt mutatott igen lassú növekedése (Boeck és Kastner 1981, Tóth és munkatársai 2011) és a sejtfalösszetételének jelentős megváltozása (15. táblázat) arra utal, hogy az endogén ECB komoly problémát okoz a gomba számára. Sőt, a növényi olajok és a paraffinolaj echinocandin kihozatalt növelő hatását is leginkább azzal magyarázzák, hogy e lipofil anyagok micellái megkötik a termelt hatóanyag egy részét és ezáltal mérséklék annak toxikus hatását a gombára (Emri és munkatársai 2013). Az echinocandin rezisztencia növelése így fontos része lehet az ipari törzsfajlesztő munkának. Az általunk gyűjtött adatok az sugallják, hogy a sok más fajnál is megfigyelt „compensatory chitin biosynthesis” (Fortwendel és munkatársai 2010, Walker és munkatársai 2012, Ries és munkatársai 2017) lényeges eleme az *A. pachycristatus* túlélésének ECB termelő körülmények között (14. és 15. táblázatok). A lassú növekedéssel járó csökkent sejtfalszintézis igény (Boeck és Kastner 1981, Tóth és munkatársai 2011), illetve a megnövekedett β -1,3-glükán szintáz aktivitás (13. táblázat) szintén előnyös lehet. Az echinocandinokra kevésbé érzékeny β -1,3-glükán szintáz termelése azonban nem része a gomba védelmi rendszerének (13. táblázat). E vonatkozásokban az *A. pachycristatus* viselkedése az echinocandinokat nem termelő *A. fumigatus*-ra hasonlít (Kurtz és munkatársai 1994b, Bowman és munkatársai 2002, Verwer és munkatársai 2012, Altwasser és munkatársai 2015). Az *A. pachycristatus* és az *A. fumigatus* echinocandinokra adott stresszválaszainak összehasonlító vizsgálata ezért hozzásegíthet a humán patogén *Aspergillus* fajok echinocandin kezelés alatti viselkedésének alaposabb megismeréséhez is a jövőben.

A paradox effektus klinikai jelentősége a mai napig vitatott (Wiederhold 2009, Steinbach és munkatársai 2015, Loiko és Wagener 2017). A klinikai vizsgálatok, melyekben jellemzően egy kisebb és egy, vagy több nagyobb dózis hatásosságát hasonlították össze nem vezettek meggyőző eredményre (Steinbach és munkatársai 2015). A 32. ábrán bemutatott eredmények (miszerint ha az *A. nidulanst* előzetesen szubletális koncentrációjú ECB jelenlétében tenyésztjük, kiváltható a paradox effektus, az ECB-vel nem előkezelt tenyészetekben azonban nem) megerősítik azon elképzeléseket, hogy a paradox effektus hátterében az echinocandin stresszhez való sikeres adaptáció állhat (Steinbach és munkatársai 2015). Vizsgálataink ugyanakkor arra is utalnak, hogy a nem megfelelő dozírozás (az echinocandinok szubletális koncentrációban történő alkalmazása, majd a koncentráció

növelése) nemcsak a rezisztencia kialakulásának, de a paradox effektus indukálódásának nagyobb kockázata miatt is növelheti a terápiás kudarc esélyét.

Nem egyértelmű, hogy az *A. pachycristatus* miért nem rendelkezik konstitutív echinocandin rezisztenciával. Elképzelhető, hogy azok a fiziológiai változások, amelyek védelmet nyújtanak számára az echinocandinokkal szemben, echinocandinok hiányában nem előnyösek. Az ECB termelő körülmények között tapasztalt lassú növekedés – amennyiben az az echinocandin rezisztencia kialakulásának a része és nem az echinocandin káros hatásainak a következménye – erre utalhat. Szintén ezt sugallja az ECB-vel és SDS-sel (Na-laurilszulfát) történt kombinált kezelések hatása is (16. táblázat).

Növekedés ¹ (%)	ECB 10 µg/ml SDS 50 µg/ml	ECB 2,5 µg/ml SDS 50 µg/ml	ECB 10 µg/ml SDS 60 µg/ml	ECB 2,5 µg/ml SDS 60 µg/ml
<i>A. pachycristatus</i> ATCC 58397				
ECB jelenlétében	15,1	44,1	15,1	44,1
SDS jelenlétében	90,2	90,2	46,3	46,3
Io	73,1	94,6	44,1	49,5
IR	0,85	1,57	0,47	0,61
Hatás ²	additív	szinergista	antagonista	additív
<i>A. nidulans</i> FGSC A4				
ECB jelenlétében	24,2	62,2	24,2	62,2
SDS jelenlétében	68,9	68,9	44,3	44,3
Io	76,5	66,7	79,1	70,2
IR	0,92	1,17	0,88	0,97
Hatás ²	additív	additív	additív	additív

16. táblázat Az ECB és az SDS antifungális hatása közötti interakció vizsgálata

¹ – A vizsgálatokat mikrotiter plate-ekben végeztük. A növekedés (A_{620}) a kezeltlen tenyészetek növekedésének százalékában van megadva. A táblázatban három független mérés átlaga szerepel, a szórás egyik esetben sem haladta meg az átlag 12 %-át ² – Az ECB és az SDS együttes hatásának természetét az alábbiak szerint jellemeztük: Az 1,5-nél nagyobb IR érték szinergizmusra, a 0,5-nél kisebb érték antagonizmusra utal, minden más esetben additív hatásként értelmezzük a kapott növekedésbeli változásokat (Moreno és munkatársai 2003). $IR = I_o / (I_{ECB} + I_{SDS} - [I_{ECB} I_{SDS} / 100])$, ahol I_{ECB} és I_{SDS} az ECB és az SDS által külön-külön, míg az I_o a két anyag által együtt okozott százalékos növekedésgátlás.

Ha az ECB-t az SDS-el, azaz egy másik sejtfal stresszt kiváltó anyaggal együtt használtuk, a két stresszor megfelelő koncentrációk esetén egyszer rontotta (antagonizmus), máskor erősítette (szinergizmus) egymás hatását az *A. pachycristatus* tenyészetekben. Ezzel szemben az *A. nidulans*sal végzett vizsgálatok eredménye, a tesztelt koncentrációk esetén, csak additív hatást mutatott (16. táblázat). Azaz, az ECB-vel indukált stresszválaszok megnövelhetik a gomba érzékenységét más stresszorokkal szemben. Hasonló módon (a konstitutív rezisztencia fitneszt csökkentő hatásával) magyarázzák, hogy miért ritkák a mai napig az amfotericin B

rezisztens *C. albicans* törzsek (Vincent és munkatársai 2013). Az Fks1 echinocandinokkal való gátolhatóságának csökkenését okozó pontmutációk szintén negatívan befolyásolják a *C. albicans* fitnessét (Ben-Ami és munkatársai 2011, 2012), noha e hatást a *C. glabrata* esetében nem tudták igazolni (Borghi és munkatársai 2014).

5.4 Az *Aspergillus fumigatus* stressz toleranciájának vizsgálata

Vizsgálataink első felében adatbázisok – 18 *Aspergillus* faj genom adatai (de Vries és munkatársai 2017; *Aspergillus* Genome Database), 17 *Aspergillus* faj stressz tolerancia adatai (Orosz és munkatársai 2018; Fungal Stress Database) és a gomba stresszgének adatai (Karányi és munkatársai 2013; Fungal Stress Response Database) – segítségével próbáltunk kapcsolatot találni a genomban jelenlévő stresszgének kópiaszáma és az adott gombafaj stressztoleranciája között (Emri és munkatársai 2018b). Többek között arra voltunk kíváncsiak, hogy az *A. fumigatus* stresszgén készlete eltér-e a közeli rokon, de kevésbé patogén fajokétól. Vizsgálataink második felében azt tanulmányoztuk RNS szekvenálás segítségével, hogy hogyan alkalmazkodik az *A. fumigatus* egy komplex (vaséhezással kombinált oxidatív stressz) stresszhelyzethez. Adatainkat proteomikai (Dr. Olaf Kniemeyer; Leibniz Institute for Natural Product Research and Infection Biology – Hans Knöll Institute, Jena, Germany) és élettani (Prof. Dr. Hubertus Haas; Medical University of Innsbruck, Innsbruck, Ausztria) vizsgálatokkal is egybevetettük a teljesebb kép kialakítása érdekében (Kurucz és munkatársai 2018b).

5.4.1 Stresszgének előfordulása *Aspergillus* fajok genomjában

A Fungal Stress Response Database adatainak a felhasználásával a stresszfehérjék három csoportját hoztuk létre: 1) A *S. cerevisiae*-ben és legalább még egy gombafajban kísérletesen is igazolt funkciójú stressz fehérjék. 2) A *S. pombe*-ben és legalább még egy gombafajban kísérletesen is igazolt funkciójú stressz fehérjék. 3) Az *A. nidulans*-ban kísérletesen is igazolt funkciójú stressz fehérjék (függetlenül attól, hogy más gombafajban igazolt-e a fehérje stresszválaszban betöltött szerepe, vagy sem). Dr. Scott E. Baker (Pacific Northwest National Laboratory, USA), Karányi Zsolt, Dr. Miskei Márton, Prof. Dr. Pócsi István (Debreceni Egyetem) és Dr. Robert Riley (US Department of Energy Joint Genome Institute, USA) meghatározták ezen stresszfehérjék ortológjainak számát az alábbi 18 *Aspergillus* fajban: *A. niger*, *A. luchuensis*, *A. kawachii*, *A. tubingensis*, *A. brasiliensis*, *A.*

aculeatus, *A. versicolor*, *A. sydowii*, *A. nidulans*, *A. flavus*, *A. oryzae*, *A. terreus*, *A. fumigatus*, *A. fischeri*, *A. clavatus*, *A. glaucus*, *A. wentii* és *A. zonatus* (Emri és munkatársai 2018b). Végeredményként három táblázatot kaptunk, melyeket a továbbiakban *S. cerevisiae*, *S. pombe* és *A. nidulans* modellnek nevezzük. E táblázatok az Emri és munkatársai (2018b) közlemény mellékletében érhetőek el.

A három modell közül az *Aspergillus nidulans* modell a legkisebb (összesen 133 fehérjét tartalmaz) és egyben ez az a modell, amely legkisebb átfedést mutat a másik két modellel: A modellben felsorolt fehérjék több mint felére igaz, hogy a *S. cerevisiae*-ben, illetve a *S. pombe*-ben előforduló ortológja(i) nem szerepelnek az élesztős modellekben (17. táblázat).

Összehasonlított modellek ¹		A fehérjék száma		Az unikális fehérjék száma (százalékos aránya)	
1. modell	2. modell	1. modell	2. modell	1. modell	2. modell
<i>S. cerevisiae</i> vs. <i>S. pombe</i>		301	248	89 (30%)	39 (16%)
<i>S. cerevisiae</i> vs. <i>A. nidulans</i>		301	133	238 (79%)	70 (53%)
<i>S. pombe</i> vs. <i>A. nidulans</i>		248	133	195 (79%)	79 (59%)

17. táblázat A *S. cerevisiae*, a *S. pombe* és az *A. nidulans* modellek összevetése

¹ – Tekintettel arra, hogy az egyik modellben szereplő fehérjének több ortológja is jelen lehet a másik két modellben a modellek Venn-diagramon való összehasonlítása nem lehetséges, csak az unikális fehérjék száma határozható meg. Egy adott modellpár esetén, az egyik modellben szereplő fehérjét unikálisnak tekintjük, ha ortológja nem található meg a másik modellben.

A modellek stresszfehérjéit, a hozzájuk tartozó ortológok száma alapján három csoportba soroltuk:

- „deletálódott fehérjék” csoportja: Azon fehérjék, melyek esetében van legalább egy olyan *Aspergillus* faj, amelynek genomjában nem találtuk meg a fehérje ortológját kódoló gént. Ennek hátterében több dolog is állhat: Egyes fajok elvesztették a kérdéses fehérje génjét (vagy más fajok tették szert erre a génre), de az ortológ megtalálásának hiányát magyarázhatja a szekvencia jelentős megváltozása, génfüzió, vagy egyszerűen csak a genomszekvenálás hiányosságai („gap”-ek).
- „duplikálódott fehérjék” csoportja: Azon fehérjék, melyek esetében van legalább egy olyan *Aspergillus* faj, amelynek genomjában egynél több ortológ fehérjét kódoló gént is találtunk.
- „konzerválódott fehérjék” csoportja: Azon fehérjék, melyek esetében mind a 18 *Aspergillus* fajban csak egy ortológot találtunk.

A három modell a „duplikálódott” fehérjék arányában eltért egymástól: A legtöbb „duplikálódott” fehérjét az *A. nidulans* modellben találtunk, a legkevesebbet a *S. pombe* modellben (18. táblázat). Az *S. pombe* modellben a „duplikálódott” fehérjék kis aránya együtt járt a „konzerválódott” fehérjék nagyobb arányával (18. táblázat).

Modell	A modell fehérjéinek száma	„konzerválódott” fehérjék száma (százalékos aránya)	„deletálódott” fehérjék száma (százalékos aránya)	„duplikálódott” fehérjék száma (százalékos aránya)
<i>S. cerevisiae</i>	301	197 (65%) ¹	78 (26%) ¹	29 (10%) ¹
<i>S. pombe</i>	248	184 (74%) ²	54 (22%) ¹	11 (4%) ²
<i>A. nidulans</i>	133	88 (66%) ^{1,2}	27 (20%) ¹	24 (18%) ³

18. táblázat A modellekben szereplő „konzerválódott”, „deletálódott”, illetve „duplikálódott” fehérjék száma és százalékos aránya

¹⁻³ – A felső indexben azonos számmal jelölt adatok esetében a fehérjék aránya szignifikánsan (Fisher-féle egzakt-teszt; ($p < 0,05$) nem tér el egymástól egy-egy oszlopon belül.

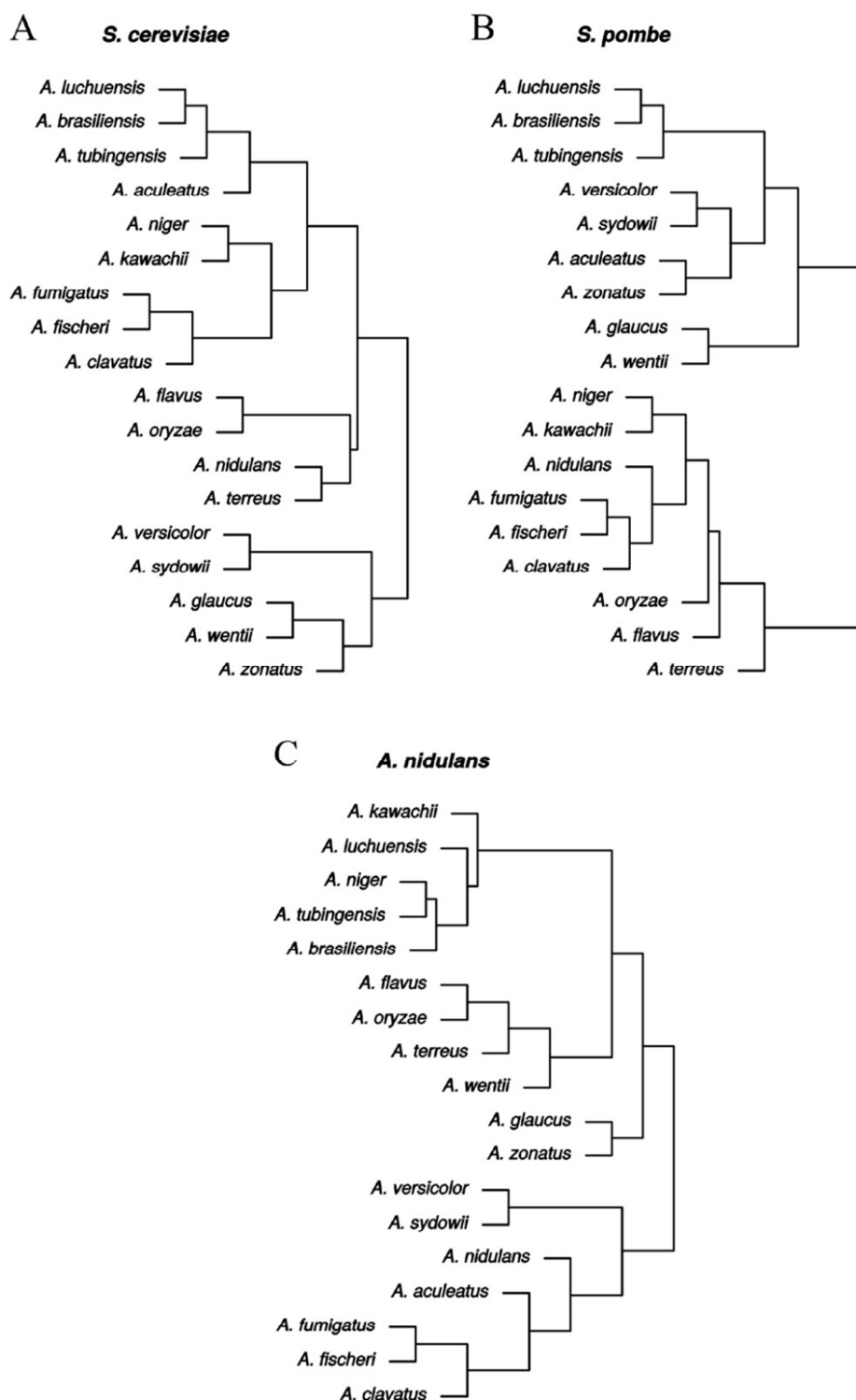
A „deletálódott”, a „duplikálódott”, vagy a „konzerválódott” fehérjék csoportjaiba sorolt fehérjék kevés közös tulajdonsággal rendelkeztek (19. táblázat): Ezek közül említést érdemel, hogy a *S. cerevisiae* modell esetében a „deletálódott fehérjék” csoportján belül jelentős számban voltak transzkripciót szabályozó proteinek (Aft2, Bdf1, Hap1, Msn2, Rds2, Sfl1, Sko1). Ez összhangban van azon eredményekkel, miszerint a jelátviteli hálózatok központi elemei (pl. MAP kináz kaszkádok) erősen konzerváltak, míg az őket szabályzó fehérjék (pl. receptorok, szenzorok), illetve az általuk szabályozott fehérjék (pl. transzkripciós faktorok) lényegesen nagyobb változatosságot mutatnak (Nikolaou és munkatársai 2009, Hagiwara és munkatársai 2016, Zhang és munkatársai 2016, Xu és munkatársai 2017). A szénhidrát anyagcseréhez köthető enzimek nagy számban voltak jelen a „duplikálódott fehérjék” csoportján belül (*S. cerevisiae* modell). E fehérjék egy jelentős része (Tdh3 – glicerinaldehid-3-foszfát dehidrogenáz, Gpp1 – glicerín-foszfát foszfatáz, Gpd2 – glicerín-foszfát dehidrogenáz, Dak2 – dihidroxiaceton kináz, Tps1 – trehalóz-6-foszfát szintáz és Tps3 – trehalóz-6-foszfát szintáz szabályozó fehérje) a glicerín, illetve a trehalóz metabolizmushoz köthető. E molekulák fontos „stressz metabolitok”; képződésük számos stressz (pl. ozmotikus stressz, hőstressz, oxidatív stressz, kiszáradás, éhezés) alatt meghatározó részét képezi a stresszválasznak (Hohmann és Mager 2003). A kérdéses proteinek kódoló gének kópiaszámában megfigyelt növekedés arra utalhat, hogy e metabolitok különösen fontosak lehetnek abban, hogy az *Aspergillus* fajok alkalmazkodni tudjanak változatos környezetükhöz.

Modell	Szignifikánsan feldúsult GO kategóriák		
	„konzerválódott” fehérjék	„deletálódott” fehérjék	„duplikálódott” fehérjék
<i>S. cerevisiae</i>	-	“transzkripció szabályzó régiót kötő fehérje”	“ion transzmembrán transzport fehérje”, “szénhidrát metabolizmus fehérje”
<i>S. pombe</i>	-	“pre-autofagoszómális membránfehérje”	-
<i>A. nidulans</i>	“intracelluláris sejtalkotóban lokalizálódó fehérje”	-	-

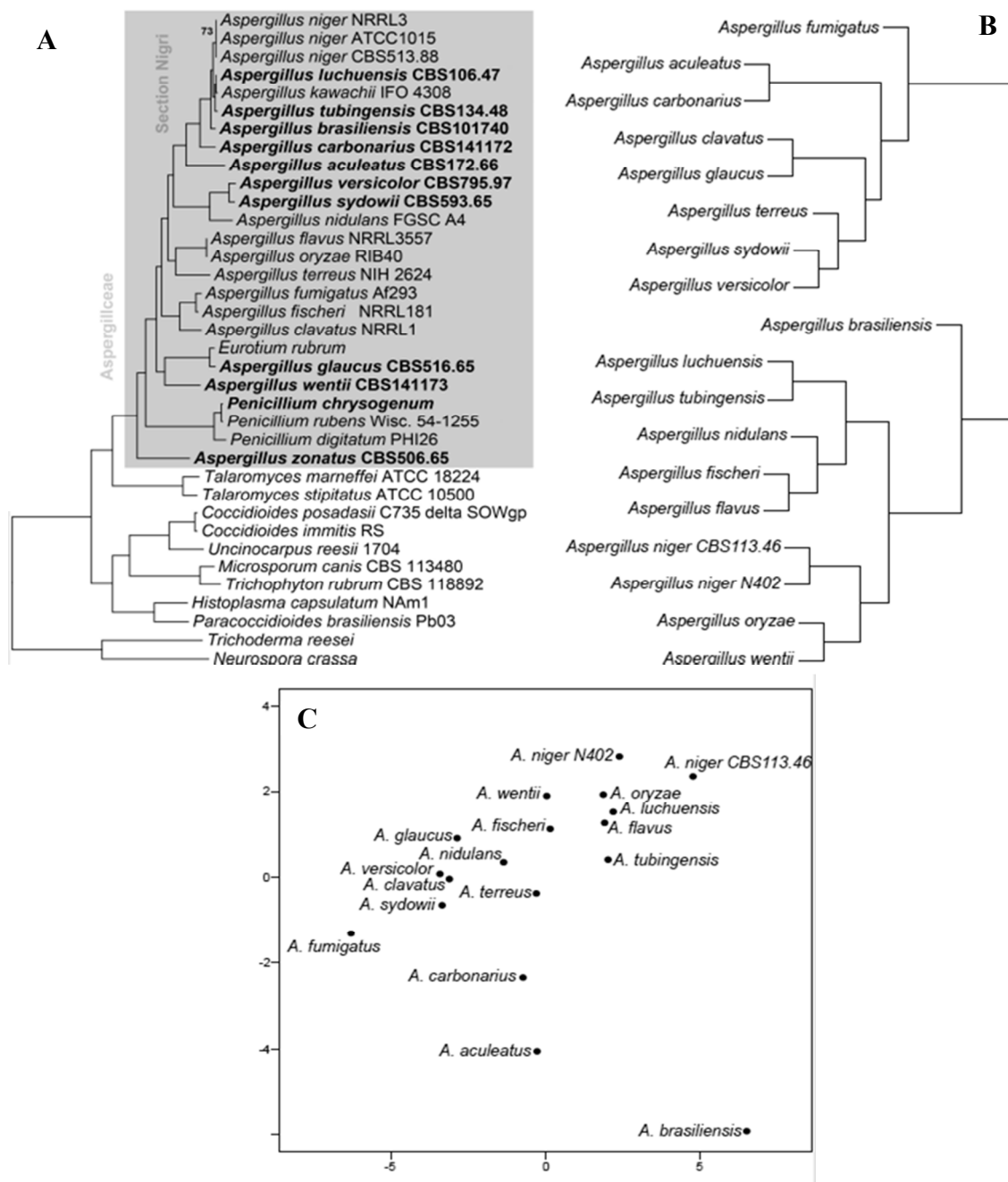
19. táblázat A „konzerválódott”, „deletálódott”, illetve „duplikálódott” fehérjék csoportjában szignifikánsan ($p < 0,05$) feldúsult GO kategóriák.

¹ – A teljes adatsor az Emri és munkatársai (2018b) közlemény mellékletében érhető el. Az elemzést az SGD Gene Ontology Term Finder (*Saccharomyces* Genome Database; <https://www.yeastgenome.org/>), a Generic Gene Ontology Term Finder (Princeton University; <http://go.princeton.edu/cgi-bin/GOTermFinder>) és az AspGD Gene Ontology Term Finder (*Aspergillus* Genome Database; <http://www.aspergillusgenome.org>) segítségével végeztük.

Annak érdekében, hogy a három modell stresszfehérjei (ortológ fehérjék száma) alapján jellemezhessük az *Aspergillus*okat, elvégeztük a 18 faj klaszterezését (28. ábra), illetve sokdimenziós skálázását (MDS) (7. melléklet). A kapott dendrogramok többé-kevésbé a *Aspergillus* fajok filogenetikai fájára (29A ábra) emlékeztettek: Sok közeli rokon faj (pl. *A. flavus* - *A. oryzae*, *A. fumigatus* - *A. fischeri*, *A. versicolor* - *A. sydowii*) a dendrogrammokon, illetve az MDS ábrákon is egymás közelében helyezkedett el (29. és 30A ábrák). A Fungal Stress Database-ben (Orosz és munkatársai 2018) szereplő stressz tolerancia adatok felhasználásával szintén elvégeztük az *Aspergillus* fajok klaszterezését és MDS-át (29B és 29C ábrák).

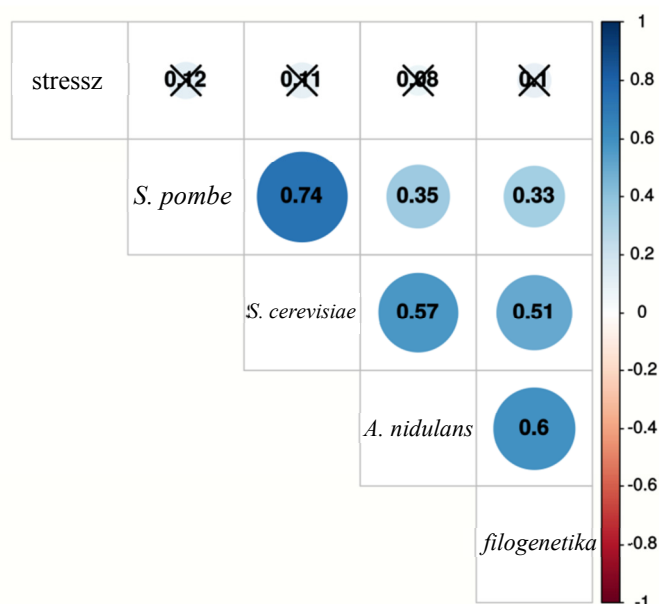


28. ábra A vizsgált *Aspergillus* fajok stresszgén ortológ számok szerinti hierarchikus klaszterezése. A dendrogrammok a *S. cerevisiae* (A), a *S. pombe* (B) és az *A. nidulans* (C) modellekben szereplő fehérjék ortológjainak száma alapján számolt Manhattan távolságmátrixok felhasználásával „teljes láncmódszer” (complete linkage clustering) segítségével lettek kialakítva az R programcsomag („dist” és „hclust” függvények) segítségével. A *S. cerevisiae*, *S. pombe* és az *A. nidulans* modellek adatai az Emri és munkatársai (2018b) közlemény mellékletében érhetők el.



29. ábra A vizsgált *Aspergillus* fajok filogenetikai kapcsolata (A), valamint stressz-tolerancia adatai közti hasonlóságok szemléltetése dendrogrammon (B) és MDS diagrammon (C)

A: A de Vries és munkatársai (2017) közleményéből származó filogenetikai fa 149 konzervált fehérje szekvenciája alapján lett létrehozva. Az *A. niger* ATCC 1015 az *A. niger* CBS 113.46 szinonimja. B: Az *Aspergillus* fajok a Fungal Stress Database-ben (Orosz *et al.* 2018; <http://www.fung-stress.org/>) szereplő adatok normalizált értékeiből képzett Euklideszi távolságok alapján lettek klaszterezve „teljes láncmódszer” (complete linkage clustering) segítségével. A normalizáláshoz az R statisztikai programcsomag „scale” függvényét, a távolságmátrixok létrehozásához a „dist” függvényt, a hierarchikus klaszterezéshez a „hclust” függvényt használtuk. C: Az MDS diagrammok az Euklideszi távolságokat tartalmazó mátrix alapján lettek létrehozva az R statisztikai programcsomag „cmdscale” függvényével. A normalizált stressz tolerancia adatok az Emri és munkatársai (2018b) közlemény mellékletében érhetők el.



30. ábra Mantel-féle korrelációs koeficiens értékek.

A páronkénti Mantel tesztben az alábbi távolságmátrixok lettek összehasonlítva: A vizsgált *Aspergillus* fajokra a *S. cerevisiae*, a *S. pombe* és az *A. nidulans* modellekben szereplő fehérjék ortológjainak száma alapján számolt Manhattan távolságmátrixok (28. ábra, 7. melléklet)(az *A. kawachii* és az *A. zonatus* – fiziológiai adatok hiányában – ki lett hagyva az elemzésből), ugyanezen fajok normalizált stressz tolerancia adataiból számolt Manhattan távolságmátrix („stressz”)(a két *A. niger* törzs közül az N402 törzs adatai lettek elhagyva), és az ugyanezen *Aspergillus* fajok 30A. ábrán bemutatott filogenetikai fájához tartozó kofenetikus távolságmátrix („filogenetika”). A Mantel tesztet az R programcsomag „ade4” függvényével végeztük el (Emri és munkatársai 2018b).

Az elemzések alapjául szolgáló normalizált stressz tolerancia adatokat (normalizált relatív növekedési ráták, MIC₅₀ és MIC₉₀ értékek) Karányi Zsolt (Debreceni Egyetem) határozta meg és az Emri és munkatársai (2018b) közlemény mellékletében érhetőek el. A kapott dendrogram sem a filogenetikai fára, sem a 29. ábrán bemutatott dendrogramokra nem hasonlított, azaz a modellekben szereplő stresszfehérjék ortológjainak száma inkább a vizsgált *Aspergillus* fajok közötti filogenetikai kapcsolatokat tükrözte semmint a fajok hasonló stressz toleranciáját. E hipotézist Mantel tesztel ellenőriztük (30. ábra). A teszt alapján a *S. cerevisiae* és az *A. nidulans* modellek jól korreláltak a filogenetikai törzsfával és egymással is. A *S. pombe* modell, bár jó korrelációt mutatott az *S. cerevisiae* modellel, csak gyengén korrelált a filogenetikai fával. A három modell közül egyik sem mutatott szignifikáns korrelációt a stressz tolerancia adatokkal. Megvizsgáltuk az egyes stresszfehérjéket külön-külön is (8. melléklet). A Spearman-féle korrelációs koeficiens értéke alapján a fehérjék túlnyomó többsége nem mutatott szoros (>0,6, vagy <-0,6) korrelációt egyik stressz tolerancia adatsorral sem. A hozzájuk tartozó korrelációs koeficiens értékek alapján a fehérjéket jellemzően három csoportba lehetett sorolni: Érdemi korrelációt egyik stressz adatsorral sem mutató fehérjék, némi pozitív korrelációt többféle stressz adatsorral is mutató fehérjék, illetve

(az *A. nidulans* és a *S. cerevisiae* modellek esetében) némi pozitív korrelációt a CdCl₂ tolerancia adatsorokkal (normalizált MIC₅₀ értékek) mutató fehérjék (8. melléklet). A korrelációs koefficiens értéke e két utóbbi csoport esetében is csak ritkán haladta meg a +0,6 értéket (8. melléklet). Az említésre méltó kivételek az alábbiak voltak:

- Ftr1 {nagy affinitású vas permeáz (Stearman és munkatársai 1996); S000000947, *S. cerevisiae* modell} – az ortológok száma a szorbitol és a H₂O₂ stressz tolerancia adatokkal mutatott pozitív korrelációt (korrelációs koefficiens > 0,6, $p < 0,006$);
- Fet3 {Ferro ion-O₂-oxidoreduktáz (Askwith és munkatársai 1994); S000004662, *S. cerevisiae* modell} – az ortológok száma a H₂O₂ stressz tolerancia adatokkal (25 °C) mutatott pozitív korrelációt (korrelációs koefficiens > 0,67, $p < 0,004$);
- Gpp1 {glicerín-3-foszfát foszfátáz (Norbeck és munkatársai 1996); S000001315, *S. cerevisiae* modell} – az ortológok száma a Kongó vörös stressz tolerancia adatokkal (25 °C) korrelált (korrelációs koefficiens > 0,63, $p < 0,009$);
- Ena1 {P-típusú ATPáz Na-pumpa (Haro és munkatársai 1991); S000002447, *S. cerevisiae* modell} – az ortológok száma és a CdCl₂ stressz tolerancia adatok (MIC₅₀ értékek) között találtunk pozitív korrelációt (korrelációs koefficiens > 0,66, $p < 0,005$);
- Dis2 {szerin/treonin protein foszfátáz 1 (Ohkura és munkatársai 1988); SPBC776.02c, *S. pombe* modell} – az ortológok száma pozitívan korrelált (korrelációs koefficiens > 0,54, $p < 0,031$) a Kongó vörös stressz tolerancia adatokkal;
- MpkC {feltételezett HogA-szerű MAPK (Pereira Silva és munkatársai 2017); AN4668, *A. nidulans* modell} – az ortológok száma a Kongó vörös és szorbitol stressz tolerancia adatokkal mutatott pozitív korrelációt (korrelációs koefficiens > 0,53, $p < 0,036$), de számottevő pozitív korrelációt tapasztaltunk a H₂O₂ stressz tolerancia adatokkal is (a 6 adatsor közül három esetében a korrelációs koefficiens értéke 0,54 és 0,60 között volt; $p < 0,03$);
- CatB {kataláz (Kawasaki és munkatársai 1997); AN9339; *A. nidulans* modell} – az ortológok száma és a szorbitol (25 °C), valamint a Kongó vörös stressz tolerancia adatok között találtunk pozitív korrelációt (korrelációs koefficiens > 0,57, $p < 0,021$);
- NikA {feltételezett hisztidin-specifikus protein kinase (Hagiwara és munkatársai 2007); AN4479; *A. nidulans* modell} – az ortológok száma a H₂O₂ stressz tolerancia adatokkal (25 °C) korrelált (korrelációs koefficiens > 0,53, $p < 0,034$).

A fenti fehérjék közül az *A. fumigatus*-MpkC sejtfal-, illetve ozmotikus stresszválaszban betöltött szerepe, valamint az *A. nidulans*-NikA oxidatív stresszválaszban betöltött jelentősége is ismert az irodalomból (Hayashi és munkatársai 2014, Pereira Silva és munkatársai 2017), így elképzelhető, hogy a megfigyelt pozitív korrelációk hátterében

valóban meghúzódik valamilyen biológiai összefüggés. Az *A. fumigatus*-*frtA* (az *frt1* ortológja) és *fetC* (a *fet3* ortológja) gének esetében azt találtuk, hogy a vaséhezással kombinált oxidatív stressz szignifikánsan megnövelte e két gén relatív transzkripcióját, noha a vaséhezés önmagában nem okozott változást (Kurucz és munkatársai 2018b, illetve az 5.4.2 fejezet). Ebben az esetben is elképzelhető, hogy a két génnek valóban lehet köze (legalábbis limitált vasellátottság esetén) az oxidatív stresszhez. Skamnioti és munkatársai (2007) kimutatták, hogy a *Magnaporthe grisea*-CatB kataláz (az *A. nidulans*-CatB ortológja) nem elsősorban, mint antioxidáns enzim jelentős, hanem – nem ismert módon – a sejtfal szilárdságát befolyásolja sejtfalstressz esetén. Bár hasonló megfigyelést *Aspergillus* fajokkal kapcsolatban még nem írtak le, az *Aspergillus* CatB-k esetében is elképzelhető oksági kapcsolat van a kongó vörös stressz tolerancia és az ortológok száma között.

A *S. cerevisiae*, az *A. nidulans* modellek és a filogenetikai törzsfá közötti Mantel korreláció (30. ábra), valamint a fent említett fehérjék ortológjainak száma és egyes stressz tolerancia adatsorok közötti pozitív Spearman korreláció alapján úgy gondoljuk, hogy a stresszgének kópiaszámában bekövetkező változások fontos részét képezik az *Aspergillus* fajok stresszhez való adaptációjának és ezen keresztül evolúciójának. Hasonló következtetésre jutottak Zhang és munkatársai (2016) is, akik azt tapasztalták, hogy a *Drechmeria coniospora* (a nematódák többé-kevésbé obligátnak mondható endoparazitája) stresszgén készletében megnőtt a *S. pombe* Mak1-3 oxidatív stresszre érzékeny szenzor kinázok, valamint az *A. nidulans* HogA-típusú MAK ortológjainak a száma, ugyanakkor sok stresszválaszhoz köthető szenzor, illetve transzkripciós faktor génje eltűnt. A laboratóriumi evolúciós kísérletek eredményei szintén arra utalnak, hogy a kópiaszám változás fontos eleme lehet a stresszhez való adaptációnak: Gresham és munkatársai (2008) kísérletében a nagy affinitású hexóz transzportereket kódoló *hxt5-6* gének kópiaszáma, illetve a nagy affinitású szulfát permeázt kódoló *sul1* gén kópiaszáma is megnőtt a glükóz, illetve a szulfát limitációhoz való adaptáció alatt. Ugyanakkor az extracelluláris savas foszfátot kódoló *pho5* gén esetében a gén delécióját és amplifikációját egyaránt megfigyeltek foszfát-limitációnak kitett tenyészetekben (Gresham és munkatársai 2008). A kópiaszám változás speciális esetének tekinthető az a lehetőség is, amikor a stresszgén készlet új stresszgének megjelenése (pl. horizontális géntranszfer révén) következtében módosul. A horizontális géntranszfer evolúciós jelentősége nemcsak prokarióták, de a gombák esetében is jól ismert (Fitzpatrick 2012). Példaként említhető, hogy Novo és munkatársai (2009) a *S. cerevisiae* EC118 ipari törzsének genomjában 34 olyan gént találtak, amely más gomba genomjából származnak és részt vehetnek a törzs ozmotikus stresszhez, nitrogénéhezéshez és etanol stresszhez való alkalmazkodásában.

A fentiek alapján meglepő, hogy a stresszgén készlet összetétele és a vizsgált *Aspergillus* fajok stressz toleranciája között érdemi kapcsolat csak egy-egy fehérje esetében volt (30. ábra, 8. melléklet), azaz a stresszgén készlet összetételéből egy-egy faj filogenetikai rokonsági kapcsolataira pontosabban lehet következtetni, mint stressz toleranciájára. Ennek hátterében az áll, hogy a stressz toleranciát a stresszgének kópiaszám változásán kívül más folyamatok is érdemben befolyásolják. Néhány lehetséges példa:

i) A stresszfehérjék szerkezetének és ezen keresztül aktivitásának megváltozása (is) elegendő lehet az adaptációhoz.

Nagyon sok példa ismert az irodalomból, hogy stresszgének mutációi a gén által kódolt fehérje szerkezetének/aktivitásának megváltozásán keresztül megnövelték a törzs rezisztenciáját egy stresszorral szemben (ld. szerzett rezisztencia kialakulása antifungális szerekkel szemben; Revie és munkatársai 2018). Konkrét példaként említhető Bódi és munkatársainak (2017) laboratóriumi evolúciós kísérlete, melyben a flukonazol jelenlétéhez adaptálódott *S. cerevisiae* sejtvonalak megnövekedett flukonazol rezisztenciájának hátterében nagy gyakorisággal a flukonazol pumpát kódoló *pdr5* gén mutációja állt.

ii) A stresszgének aktivitásában bekövetkező változások helyettesíthetik a gén deléciót és a gén duplikációt.

Bódi és munkatársainak (2017) kísérletében a megnövekedett flukonazol rezisztencia sok esetben – a *pdr5* gén mutációja mellett – a *rox1* transzkripció faktor génjének mutációjával járt együtt. E gén többek között az ergoszterin szintézist is szabályozza (Montañés és munkatársai 2011), ami arra utalhat, hogy a rezisztencia kialakulásában az ergoszterin bioszintézisében résztvevő gének aktivitásának megváltozása is fontos lépés lehetett (Bódi és munkatársainak 2017). Más laboratóriumi evolúciós kísérletekben is gyakran megfigyelt jelenség volt, hogy a stresszhez adaptálódott sejtvonalak valamilyen szabályzó génben (is) hordoztak mutációt (Conrad és munkatársai 2009, 2011). A stresszgén aktivitásának jelentőségét jól szemlélteti a kadmium pumpát kódoló *pca1* gén is (Adle és munkatársai 2007, Bakti és munkatársai 2018). Az általunk is vizsgált *Aspergillus* fajok közül a legnagyobb CdCl_2 toleranciát mutató fajok (*A. fumigatus*, *A. versicolor*, *A. sydowii*) genomjában megtalálható a *pca1* ortológja (az *A. sydowii* esetében két ortológ van jelen a genomban), míg a kadmiumra leginkább érzékeny fajoknak (*A. carbonarius*, *A. aculeatus*, *A. glaucus*) nincs *pca1* ortológja (de Vries és munkatársai 2017). Voltak azonban kivételek: a *pca1* ortológgal nem rendelkező *A. niger* jobban tolerálta a kadmium jelenlétét, mint az *A. flavus*, amelynek genomjában megtalálható ez a gén (de Vries és munkatársai 2017). Nem meglepő módon a Kruskal-Wallis teszt sem mutatott szignifikáns különbséget a két, az egy és a nulla *pca1* ortológgal rendelkező törzsek CdCl_2 toleranciája között (Kurucz és munkatársai 2018a). Sőt

az *A. fumigatus* fajon belül, azaz egyetlen fajon belül is igen jelentős (nagyságrendnyi) eltérést lehetett mérni a törzsek MIC_{50,cd} értékei között (0,25 mM – >2 mM) (Kurucz és munkatársai 2018a). A MIC_{50,cd} adatok azonban jól korreláltak a *pcaA* (*pca1* ortológ) relatív transzkripciójával (Kurucz és munkatársai 2018a). Mindezen adatok jól szemléltetik, hogy a *pca1* jelenléte önmagában nem szükségszerűen okoz kadmium toleranciát csak lehetőséget biztosít arra, hogy kialakulhasson kadmium tolerancia a gén aktivitásának növekedésével.

iii) A stresszválaszok szabályozásában bekövetkező változások fontos elemei lehetnek az adaptációnak.

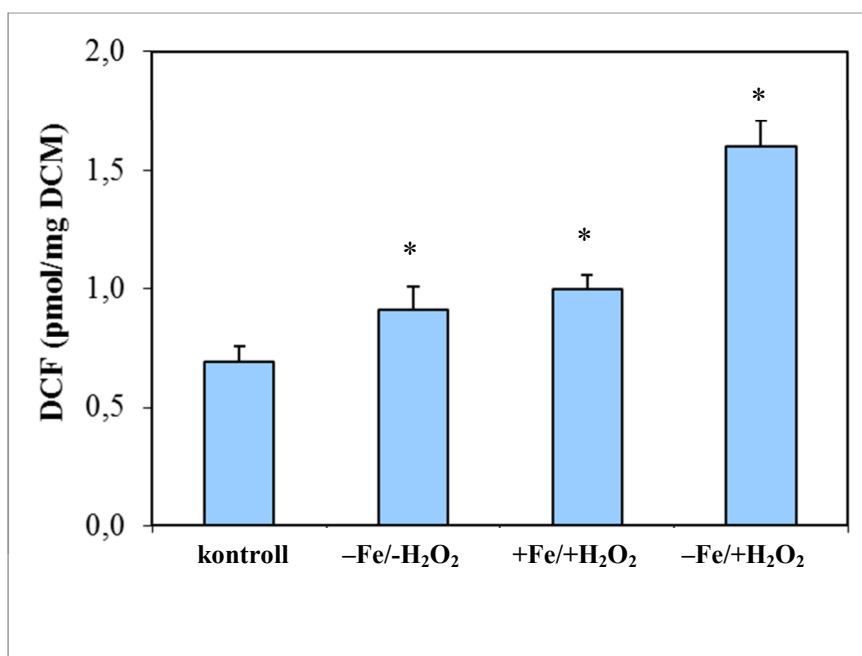
A stresszválaszokat szabályozó jelátviteli útvonalak funkcionális változásai (ugyanazon útvonal eltérő stresszhelyzetekre reagál és/vagy eltérő géneket szabályoz az egyes fajokban) gyakran tettenérhetőek a gombavilágban (Pusztahelyi és Pócsi 2013, Hagiwara és munkatársai 2016, Xu és munkatársai 2017).

A fenotipikus heterogenitás fontos eleme lehet a stresszhez való genetikai adaptációnak. A fenotipikus heterogenitás hátterében gyakran pozitív feedback szabályozási mechanizmusok állnak (Becskei és munkatársai 2001). Ezen autoregulációs mechanizmusok kialakulása és megszűnése így szintén hozzájárulhat a sikeres adaptációhoz (Mustonen és Lässig 2010, Sánchez-Romero és Casadesús 2014, Bódi és munkatársai 2017).

Az *A. fumigatus* és az *A. fischerii* - bár filogenetikailag közel állnak egymáshoz (29A ábra; De Vries és munkatársai 2017) - stressz toleranciájukban nagy eltérések tapasztalhatóak (30B és 30C ábrák), ami magyarázhatja a két faj patogenitásában megmutatkozó eltéréseket is (Lamoth 2016). Vizsgálataink alapján azonban az eltérő stressz toleranciájuk hátterében nem az eltérő stresszgén készletük állt. Természetesen nem zárható ki annak lehetősége, hogy az általunk nem vizsgált gének között fontos stressz gének találhatók és ezek jelenléte/kópiaszáma karakterisztikusan jellemző az *A. fumigatus*-ra (Fedorova és munkatársai 2008). Mindazonáltal eredményeink azt az elképzelést erősítik, miszerint az *Aspergillus* fajok számára egy immunkomprimált emberi szervezetben való növekedés nem szükségszerűen igényel speciális géneket. Egy „átlagos” *Aspergillus* stresszgén készlet is alkalmas lehet erre, amennyiben e fehérjék aktivitása, stabilitása és nem utolsósorban szabályozása megfelelő. A következő fejezetben bemutatott vizsgálatok azt szemléltetik, hogy a stresszválaszok szabályozása – különösen többféle, egyidőben érvényesülő stresszhatások esetén – kulcsfontosságú lehet az új környezethez (pl. az emberi szervezethez) való sikeres alkalmazkodásban.

5.4.2 Az *Aspergillus fumigatus* kombinatórikus stresszválasza

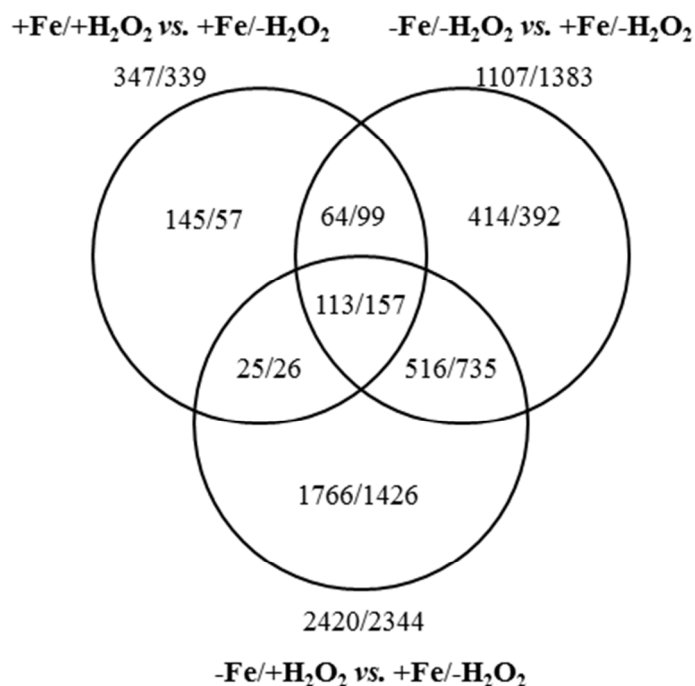
Kísérleteinkben négyféle tenyészet transzkriptomát határoztuk meg RNS szekvenálás segítségével: 1. Oxidatív stressznek kitett (3 mM H₂O₂-dal kezelt) tenyészetek (+Fe/+H₂O₂). 2. Vaséhező tenyészetek (-Fe/-H₂O₂). 3. Oxidatív stressznek kitett (3 mM H₂O₂-dal kezelt) vaséhező tenyészetek (-Fe/+H₂O₂). 4. Kontroll tenyészetek (+Fe/-H₂O₂). A vaséhező tenyészetekben – a várakozásoknak megfelelően – jelentős ($49 \pm 6 \mu\text{M}$; $n = 4$) extracelluláris sziderofór termelést tapasztaltunk. Összehasonlításképpen a kontroll tenyészetek extracelluláris sziderofór tartalma $< 3 \mu\text{M}$ volt. (Az 1 h-s H₂O₂ kezelések érdemben nem befolyásolták a fermentlé sziderofór koncentrációját.) A H₂O₂-dal kezelt tenyészetekben a DCF teszt redox egyensúlyvesztést jelzett (31. ábra). Meglepő módon redox egyensúlyvesztés már a vashiányos tenyészetekben is kialakult (31. ábra).



31. ábra Redox egyensúlyvesztés oxidatív stressznek és/vagy vaséhezésnek kitett *A. fumigatus* tenyészetekben

A redox egyensúlyvesztést a tenyészetek DCF termelésével jellemeztük. Az ábra három független mérés átlagait és szórásait tartalmazza. A „*” jelölés a kontroll (+Fe/-H₂O₂) tenyészetekkel mért értékektől való szignifikáns (Student-féle t-teszt, $p < 0,05$) eltérést jelöli. A +Fe/+H₂O₂ tenyészetekben mért értékek szignifikánsan (Student-féle t-teszt, $p < 0,05$) nagyobbak voltak a +Fe/+H₂O₂ és a -Fe/-H₂O₂ tenyészetekben mért értékeknél is.

A kezelések hatására a transzkriptomban a kontroll tenyészetekhez viszonyítva bekövetkezett változásokat a 32. ábra szemlélteti.



32. ábra Az indukálódott/represszálódott stressz-függő gének megoszlása az oxidatív stressznek (+Fe/+H₂O₂), vaséhezésnek (-Fe/-H₂O₂) és a vaséhezéssel kombinált oxidatív stressznek (-Fe/+H₂O₂) kitett *A. fumigatus* tenyészetekben

Stressz-függő gén: A legalább kétszeres transzkripciós változást ($|\log_2 FC| > 1$) mutató differenciáltan expresszálódott gén. Indukálódott gén: Stressz-függő gén, ahol $\log_2 FC > 1$. Represszálódott gén: Stressz-függő gén, ahol $\log_2 FC < -1$.

A transzkriptom változásai jól korreláltak a 26 gén esetében RT-qPCR-rel mért transzkripciós változásokkal. A Pearson-féle korrelációs koefficiens értéke 0,71-0,94 között volt mindhárom kezelés esetében. Ugyanezen kísérleti elrendezésben, ugyanezen törzs segítségével Dr. Olaf Kniemeyer (Leibniz Institute for Natural Product Research and Infection Biology – Hans Knöll Institute, Jena, Germany) és munkatársai meghatározták a proteom változásait is (Kurucz és munkatársai 2018b). Az e vizsgálatok alapján indukálódott, illetve represszálódott fehérjék proteomikai adatai vaséhező tenyészetek esetén jól korreláltak a megfelelő gének transzkriptomikai adataival. A Pearson-féle korrelációs koefficiensek az alábbiak voltak: 0,68 ($p < 0,05$) (-Fe/-H₂O₂ vs. +Fe/-H₂O₂), 0,66 ($p < 0,05$) (-Fe/+H₂O₂ vs. +Fe/-H₂O₂), míg a H₂O₂ kezelés esetében -0,03 ($p = 0,89$) (+Fe/+H₂O₂ vs. +Fe/-H₂O₂). Érdeemes megemlíteni azonban, hogy a peroxid kezelés csak igen kevés (összesen 17) fehérje mennyiségében okozott lényegi változást a mintavétel időpontjában (Kurucz és munkatársai 2018b).

5.4.2.1 A vaséhezés hatása az *A. fumigatus* transzkriptomára

A géncsoport dúsulási vizsgálatok alapján vaséhezés hatására, az irodalmi adatokkal összhangban (Hortschansky és munkatársai 2007, Schrettl és munkatársai 2008, 2010, Haas

2012), indukálódtak a sziderofór anyagcserében érintett gének, ami együtt járt a transzláció, valamint számos vas-függő folyamat (pl. FeS klaszter kötő fehérjék, hem tartalmú fehérjék, légzés, citromsav ciklus) génjeinek repressziójával (21. táblázat, 9-11. mellékletek).

A géncsoport ¹ neve	típusa ²	és viselkedése ³			
		-Fe/-H ₂ O ₂	+Fe/+H ₂ O ₂	-Fe/+H ₂ O ₂	-Fe/+H ₂ O ₂
		vs. +Fe/-H ₂ O ₂	vs. +Fe/-H ₂ O ₂	vs. +Fe/-H ₂ O ₂	vs. +Fe/-H ₂ O ₂
Antioxidáns enzimek	S	represszió		indukció	indukció
Fe transzport	S	indukció	represszió	indukció	
FeS klaszter szintézis	GO				indukció
Hem bioszintézis	GOt				
FeS klaszter kötő fehérjék	GO	represszió		represszió	
Hem kötő fehérjék	FunCat	represszió		represszió	represszió
Citromsav ciklus	S	represszió		represszió	represszió
Légzés	S	represszió		represszió	
Ergoszterin bioszintézis	S	indukció		represszió	represszió
Zn transzport	GO	represszió		represszió	
Drog transzport	GO	indukció		indukció	represszió

21. táblázat Az oxidatív stressz, a vaséhezés és a vaséhezéssel kombinált oxidatív stressz által az *A. fumigatus* tenyészetekben indukált, vagy represszált gének funkció szerinti csoportosítása

¹ – A táblázat csak néhány fontosnak ítélt géncsoportot tartalmaz. A géncsoport dúsulási vizsgálatok összes adata elérhető a Kurucz és munkatársai (2018a) közlemény mellékleteiben. ² – GO – A géncsoport a kérdéses „biological process GO term” génjeit tartalmazza (*Aspergillus* Genome Database; <http://www.aspergillusgenome.org>). FunCat – A géncsoport a megfelelő „FunCat term” (FungiFun2 szerver; <https://elbe.hki-jena.de/fungifun/fungifun.php>) génjeiből áll. S – Általunk létrehozott géncsoport. A géncsoport definíciója és a géncsoportba tartozó gének listája a Kurucz és munkatársai (2018a) közleményben és mellékleteiben érhető el. ³ – Indukció/Represszió – szignifikáns (Fisher-féle egzakt teszt; $p < 0,05$) dúsulás az adott kezelésben indukálódott/represszáldott gének (32. ábra) csoportján belül.

Jelentős változások következtek be a szekunder anyagcserében is: a sziderofórok bioszintéziséért felelős klaszteren kívül további 4 génklaszter indukálódott, míg 10 klaszter repressziót mutatott (22. táblázat). A fentiekén túl represszió volt jellemző a cink transzportban résztvevő génekre, míg a drog transzportához köthető gének indukálódtak (21. táblázat, 10. melléklet).

klaszter (gének száma) ^a	indukálódott/represszáldott gének száma			
	-Fe/-H ₂ O ₂	+Fe/+H ₂ O ₂	-Fe/+H ₂ O ₂	-Fe/+H ₂ O ₂
	vs. +Fe/-H ₂ O ₂	vs. +Fe/-H ₂ O ₂	vs. -Fe/-H ₂ O ₂	vs. +Fe/-H ₂ O ₂
DHN-melanin klaszter (10)	1/8 ^b	1/0	3/0	2/7 ^b
Endokrocin klaszter (9)	2/4 ^b	5 ^b /1	1/4	1/5 ^b
Fumagillin klaszter (15)	8 ^b /0	11 ^b /0	0/15 ^b	1/2
Fumigaklavin C klaszter (11)	0/5 ^b	4 ^b /0	0/1	0/6 ^b
Fumipirrol klaszter (7)	0/7 ^b	0/0	2/1	1/7 ^b
Fumikinazolin klaszter (5)	0/5 ^b	1/0	1/0	0/4 ^b
Fumitremorgin B klaszter (9)	0/4 ^b	0/0	0/7 ^b	0/8 ^b
Sziderofór klaszter (18)	10 ^b /5	0/10 ^b	9 ^b /3	11 ^b /3
Gliotoxin klaszter (12)	0/12 ^b	2/0	4/1	0/12 ^b
Hexadehidro-asztekróm klaszter (8)	7 ^b /0	5 ^b /0	1/4	3/0
Pszeurotin A klaszter (4)	3 ^b /0	4 ^b /0	0/4 ^b	0/1
Afu1g01010 klaszter (4)	2/0	1/0	0/4 ^b	0/1
Afu3g01410 klaszter (9)	2/0	2 ^b /0	3/4	2/3
Afu3g02570 és Afu3g02530 klaszter (15)	4/3	0/2	7 ^b /0	6/2
Afu3g02670 klaszter (7)	3 ^b /0	0/1	1/2	3/0
Afu3g13730 klaszter (9)	0/5 ^b	0/4 ^b	0/1	0/5 ^b
Afu5g10120 klaszter (10)	3/0	1/0	2/0	6 ^b /0
Afu6g13930 klaszter (9)	0/9 ^b	0/2 ^b	1/5 ^b	0/9 ^b
Afu7g00170 klaszter (7)	1/1	4 ^b /0	1/0	1/0
“No PKS/NRPS backbone 6” klaszter (13)	1/5 ^b	0/2	3/1	3/5
indukálódott klaszterek száma:	5	7	2	2
represszáldott klaszterek száma:	10	3	5	9

22. táblázat Néhány szekunder metabolit génklaszter transzkripciójának változása oxidatív stressznek, vaséhezésnek, illetve kombinált stresszkezelésnek kitett *A. fumigatus* tenyészetekben

^a – Az Inglis és munkatársai (2013), valamint a Lin és munkatársai (2013) közleményben szereplő klasztereket vizsgáltuk. A klaszter génjeinek számán a manuálisan és/vagy kísérletesen beazonosított klasztergének számát értjük. A részletes transzkripció adatok a Kurucz és munkatársai (2018a) közlemény mellékleteiben érhetőek el. ^b – Fisher-féle egzakt teszt alapján a klaszter génjei szignifikánsan ($p < 0,05$) feldúsultak a vizsgált géncsoportban.

A sziderofór anyagcserében bekövetkezett transzkripció szintű változások együtt jártak a *hapX* gén indukciójával és a *sreA* gén repressziójával is (11. melléklet). A HapX transzkripció faktor felelős a vas-függő folyamatok represszállásáért és a sziderofór

bioszintézis indukciójáért vaséhező körülmények között (Schrettl és munkatársai 2010). Az SreA transzkripció faktor ugyanakkor kedvező vasellátottság esetén gátolja a sziderofórok képződésében résztvevő gének átírását (Schrettl és munkatársai 2008, Blatzer és munkatársai 2011). Érdekes módon a három RIA gén közül csak egy, a *freB* indukcióját tapasztaltuk (11. melléklet).

Az antioxidáns enzimek közül – vastartalmuk miatt – a katalázokat, illetve peroxidázokat érdemes kiemelni; ezen enzimek génjei repressziót mutattak (11. melléklet). A proteomikai vizsgálatok alapján (Kurucz és munkatársai 2018b) e gének repressziója együtt járt a Cat1 kataláz és a Ccp1 citokróm c peroxidáz mennyiségének a csökkenésével, illetve néhány vasat nem tartalmazó antioxidáns enzim – Trr1 (feltételezett TrxR), Afu5g11320 (feltételezett Trx) és Sod1 (CuZn-SOD) – mennyiségének a növekedésével. E fehérjék közül génszinten csak a *sod1* indukálódott. A *sod1* vaséhezés alatti indukcióját korábban Oberegger és munkatársai (2000) is megfigyelték. E változások arra utalhatnak, hogy az antioxidáns védelemben a sejtek a vas-függő reakciókat vasat nem igénylő megoldásokkal próbálják helyettesíteni. Feltehetőleg az antioxidáns rendszerben (és a légzési elektrontranszport láncban) bekövetkezett változásokkal hozható kapcsolatba a vaséhezés alatt megfigyelt redox egyensúlyvesztés is (31. ábra).

Érdekes módon, bár sok hem, illetve FeS klaszter tartalmú fehérje génje represszálódott (10. melléklet, 21. táblázat), a hem, illetve a FeS klaszterek bioszintézisében résztvevő gének nem dúsultak fel a represszálódott gének csoportjában vaséhezés alatt (10. melléklet, 21. táblázat). Sőt, a szkvalén→ergoszterin bioszintézis útvonal génjeinek egy jelentős része indukálódott, beleértve a vas-függő enzimet kódoló *erg3A*, *erg3B*, *erg25A* és *erg25B* géneket is (10. melléklet, 21. táblázat). Az Erg3A fehérje mennyiségének növekedését a proteomikai vizsgálatok is igazolták (Kurucz és munkatársai 2018b). Irodalmi adatokból ismert, hogy vaséhezés hatására csökken a sejtek szterin tartalma, amit részben az intenzív mevalonsav felhasználással (extracelluláris sziderofór bioszintézis), részben a szkvalén→ergoszterin bioszintetikus útvonal vas igényével magyaráznak (Yasmin és munkatársai 2012, Haas 2012). Elképzelhető, hogy a transzkripció szinten megfigyelt változások célja e hatások ellensúlyozása és a szterin tartalom túlzott mértékű csökkenésének megakadályozása.

Régóta ismert, hogy a vaséhezés indukálja a vas felvételt, fékezi a növekedést (és ezzel mérsékli a gomba vasigényét), valamint gátolja a sejt vas-függő bioszintetikus folyamatait (Hortschansky és munkatársai 2007, Schrettl és munkatársai 2008, 2010, Haas 2012). Vizsgálataink amellet, hogy megerősítik ezen megfigyeléseket, felhívják a figyelmet arra is, hogy a „vas-függő folyamatok gátlása” nem jelenti automatikusan az összes

vastartalmú fehérje képződésének visszaszorulását, vagy az összes vas-függő folyamat teljes gátlását. Sokkal inkább arról van szó, hogy a rendelkezésre álló vasat igyekszik a sejt a túlélése szempontjából a lehető legelőnyösebben szétosztani a vasigényes folyamatok között, amibe a vas felhasználáshoz köthető sok gén repressziója mellett akár vas felhasználáshoz köthető gének indukciója is beletartozik.

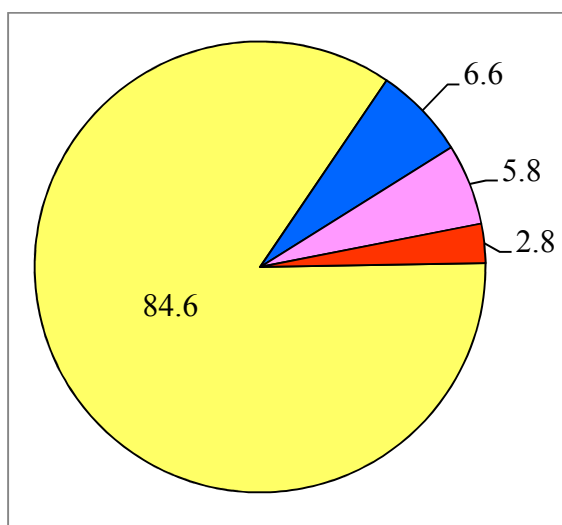
5.4.2.2 Az oxidatív stressz hatása a vaséhező tenyészetekre

A kísérleteinkben alkalmazott oxidatív stresszkezelés (3 mM H₂O₂; 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. A transzkriptomikai adatok alapján megváltozott a szekunder anyagsere (22. táblázat), valamint a vas transzportban fontos gének represszálódtak, de nem tapasztaltunk érdemi változást többek között az antioxidáns enzimek transzkripciósi adataiban sem (21. táblázat, 9-11. mellékletek). A vaséhező tenyészetek számára ugyanez az oxidatív stressz azonban igen komoly kihívást jelentett: Kombinált kezelés esetén lényegesen több gén (32. ábra), illetve fehérje (Kurucz és munkatársai 2018b) indukcióját és represszióját figyeltük meg, mint az önmagában alkalmazott peroxid kezelést követően. Számos, az oxidatív és hő stresszválaszra jellemző gén indukálódott (beleértve a hő stresszválaszt és az oxidatív stresszválaszt szabályozó Hsf1, Yap1 és AtfA transzkripciósi faktorok génjeit is; Lessing és munkatársai 2007, Albrecht és munkatársai 2010, Hagiwara és munkatársai 2014), indukálódtak a DNS repair rendszerek, a fehérjék proteozómális lebontásáért felelős folyamatok és a makroautofágiában fontos gének is (9. és 11. mellékletek). A DCF teszt lényegesen nagyobb redox egyensúlyvesztést mutatott kombinált kezelés esetén, mint kedvező vasellátottságú tenyészetekben (31. ábra). Sőt, a Prof. Dr. Haas és munkatársai (Medical University of Innsbruck, Innsbruck, Ausztria) által felületi tenyészetekben végzett növekedési tesztek is azt mutatták, hogy a sziderofór termelésben sérült (*AsidA*) és ezért nem megfelelő vasellátottságú törzsek oxidatív stressz érzékenysége nagyobb volt, mint a kontroll törzseké (Kurucz és munkatársai 2018b). Az *A. fumigatus* viselkedésével összhangban a sziderofórtermelés inaktiválása (*Anps6*) a *Cochliobolus heterostrophus* oxidatív stressz érzékenységét is megnövelte (Oide és munkatársai 2006).

A vaséhezés oxidatív stressz érzékenységet növelő hatása nem magától érthető, hiszen élesztő fajokban a szénéhezés például kifejezetten csökkenti az oxidatív stresszel szemben mutatott érzékenységét (Roetzer és munkatársai 2011). Megfigyeléseink alapján nem meglepő, hogy a patogén mikrobák ROS-okal való támadása és egyúttal az

életfolyamataikhoz szükséges vas elvonása elterjedt stratégia az állatvilágban a fertőzések leküzdésében (Nairz és munkatársai 2014, Prüfer és munkatársai 2014). A humán polimorfonukleáris leukociták például nemcsak ROS, de a vasat megkötő laktoferrin termelésük révén is gátolják a gombák növekedését (Zarembek és munkatársai 2007, Prüfer és munkatársai 2014).

A kombinált stresszkezelés (-Fe/+H₂O₂ vs. +Fe/-H₂O₂) hatása nemcsak erősségében, de jellegében is eltért az egyszerű stresszkezelésektől és nem fogható fel a kétféle kezelésre (+Fe/+H₂O₂ vs. +Fe/-H₂O₂, illetve -Fe/-H₂O₂ vs. +Fe/-H₂O₂) adott stresszválasz kombinációjaként. A megfigyelt transzkripcionális változások túlnyomó többsége csak a kombinált kezelést követően volt detektálható (33. ábra).



33. ábra A vashiányos és a kontroll *A. fumigatus* tenyészetek oxidatív stresszválaszai (-Fe/+H₂O₂ vs. -Fe/-H₂O₂, illetve +Fe/+H₂O₂ vs. +Fe/-H₂O₂) közötti átfedés

A színek a kizárólag a +Fe/+H₂O₂ vs. +Fe/-H₂O₂ összehasonlításban (kék), a kizárólag a -Fe/+H₂O₂ vs. -Fe/-H₂O₂ összehasonlításban (sárga), valamint a mindkét összehasonlításban (rózsaszín: mindkét összehasonlításban indukálódott, vagy represszáldott; piros: egyik összehasonlításban indukálódott, a másikban represszáldott) stressz-függő gének százalékos megoszlását mutatják. Stressz-függő gén: A legalább kétszeres transzkripció változást ($|\log_2 FC| > 1$) mutató, differenciáltan expresszáldott gén.

Kevés irodalmi adat áll rendelkezésre a többféle stresszkezelés együttes hatásáról. Az *A. fumigatus* esetében a gliotoxin és a H₂O₂ együttes hatását tanulmányozták a proteom változására és szintén számos, csak a kombinált kezelésre jellemző változást tapasztaltak (Owens és munkatársai 2014). A *C. albicans* esetében szintén leírták, hogy a szénforrás (szénforrás limitációs stressz) alapvetően befolyásolja a gomba stressztűrő képességét (Brown és munkatársai 2014). A laboratóriumi körülmények között végzett, egyszerű stresszkezelésekre adott stresszválaszok igen sokat elárulnak a gomba lehetséges stresszválasz elemeiről és ezek kifejeződésének szabályozásáról. A természetes niche-ekben, így az emberi szervezetben is azonban, jellemzően egyszerre többféle stressz éri/érheti a gombákat. Az itt

bemutatott saját és az említett irodalmi adatok is felhívják a figyelmet arra, hogy a „klasszikus” stresszválasz kutatások eredményei alapján nem jósolható meg a gomba viselkedése egy komplex környezetben. 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).

A transzkriptom változásai alapján az alábbi folyamatok segíthették a tenyészeteket, hogy túléljék a kombinált kezelést:

1. Vas-független antioxidáns enzimeket kódoló gének indukciója.

A kombinált stresszkezelés hatására 16 ismert, vagy feltételezett antioxidáns enzimet kódoló gén indukálódott, noha önmagában az oxidatív stressz egyet sem, míg a vaséhezés csak egy gént indukált (11. melléklet). Ráadásul a 16 gén közül 5 vaséhezés alatt repressziót mutatott (11. melléklet). E gének túlnyomó többsége működéséhez vasat nem igénylő enzimet (pl. a tioredoxin-glutaredoxin rendszer enzimeit, SODok) kódol (11. melléklet). A proteomikai vizsgálatok a Sod1 (CuZn-SOD), a Trx1 (feltételezett TrxR) és az Afu2g14960 (feltételezett GR) fehérjék mennyiségének növekedését igazolták (Kurucz és munkatársai 2018b). A vas-független antioxidáns enzimgének indukciója mellett számos, a ROS-ok okozta károk mérséklésében potenciónalisán fontos rendszer (pl. DNS repair, hőstresszválasz elemek, a károsodott fehérjéket eltávolító folyamatok) is indukálódott (9. melléklet).

2. A fehérjeszintézis repressziója.

A riboszómák biogenezisében és a transzlációban fontos gének nagy számban represszálódtak nemcsak a kontroll, de a vaséhező tenyészetekben mért transzkripció értékekhez képest is (9. melléklet). E folyamatok gátlása a növekedés gátlásán keresztül nemcsak anyagokat/energiát takarít meg a sejtek számára (Gasch 2003), de mérsékelheti a sejtek vasigényét is.

3. A vas ionokat biztosító folyamatok aktiválódtak

A sziderofór anyagcserében fontos gének jelentős része a kombinált kezelés alatt is indukciót mutatott, igaz, a vaséhező tenyészetekhez képest (-Fe/+H₂O₂ vs. -Fe/-H₂O₂) ez az indukció nem volt számottevő (21. táblázat, 9-11. mellékletek). Ezzel szemben a három RIA gént a kombinált kezelés egyértelműen indukálta a vaséhező tenyészetekben mért transzkripció értékekhez képest is (11. melléklet).

Richie és munkatársai (2007a) kimutatták, hogy tápanyag limitáció alatt a makroautofágia fontos része a vas homeosztázis fenntartásának az *A. fumigatus* fonalas gombában. Minthogy a makroautofágiához köthető gének – a fehérjék proteoszómális lebontásában fontos génekkel együtt – indukálódtak a kombinált stresszkezelés alatt (9.

melléklet), így elképzelhető, hogy a vastartalmú fehérjék lebontása és vastartalmuk hasznosítása szintén fontos eleme a rendelkezésre álló vas hatékony (újra)elosztásának a vasigényes folyamatok között. E tekintetben az oxidatív stresszel kombinált vaséhezés a szénéhezésre emlékeztet. Szénéhezés alatt a sejtek részben a tápközegben még jelenlévő szénforrásokat (pl. az elpusztult sejtek sejtfala) próbálják meg extracelluláris enzimeik segítségével hasznosítani, részben a makroautofágia segítségével jutnak lebontható szerves anyagokhoz (Szilágyi és munkatársai 2013, van Munster és munkatársai 2016).

4. Sok vastartalmú fehérje génje indukálódott

Bár a kombinált stresszkezelés alapvetően represszálta a vas-függő folyamatokat (pl. kataláz-peroxidáz gének, légzés, citromsav ciklus, ergoszterin szintézis, FeS klaszter fehérjék, hem-tartalmú fehérjék génjei), jelentős számban voltak olyan gének is, amelyek indukciót mutattak (10-11. mellékletek). Összesen 50, vas felhasználáshoz szorosan köthető indukálódott gént találtunk kombinált stressznek kitett tenyészetekben, míg vaséhezés esetén 19, oxidatív stresszt követően pedig 5 ilyen típusú gént azonosítottunk (10-11. mellékletek). E gének közül külön említést érdemel a 11 FeS klasztert tartalmazó fehérje génje, valamint a 6 FeS klaszter bioszintézisben fontos gén, hiszen a vaséhezés önmagában e két géncsoport génjei közül egyet sem indukált (10. melléklet). Fontos megjegyezni, hogy e változások csak a transzkripció szintjén lettek megfigyelve, a proteomikai vizsgálatok egyetlen esetben sem mutattak ki indukciót (Kurucz és munkatársai 2018b). A FeS klaszter fehérjék igen érzékenyek az oxidatív stresszre; oxidatív stressz alatti folyamatos újra szintézisük fontos eleme az oxidatív stresszválasznak (Rouault és Klausner 1996, Imlay 2006). Vas hiány esetén azonban a szintézis komoly nehézségekbe ütközik (Rouault és Klausner 1996, Imlay 2006). Elképzelhető, hogy a kérdéses gének transzkripcionális aktiválása abban segít, hogy a rendelkezésre álló vas hatékonyabban tudjon a vastartalmú fehérjékbe beépülni. Ez azonban nem jelenti szükségszerűen e fehérjék mennyiségének a növekedését, de hozzájárulhat ahhoz, hogy mennyiségük ne csökkenhessen le túlságosan. A vastartalmú fehérjék mennyiségének, illetve a vasfüggő folyamatok aktivitásának legalább egy minimális szinten történő biztosítása kulcsfontosságú lehet a vaséhezéssel kombinált oxidatív stresszválasznak. Bár a FeS klaszter és hem bioszintézis útvonalak erősen konzerváltak (Kroll és munkatársai 2016, Braymer és Lill 2017), az *A. fumigatus* vas anyagcseréjének megzavarása FeS klaszter bioszintézist, illetve hem bioszintézist gátló anyagokkal (Ben Yaakov és munkatársai 2016, Choby és munkatársai 2016, Tripathi és munkatársai 2017) ígéretes kiindulási pontja lehet új antifungális szerek/stratégiák kidolgozásának.

5.4.2.2 *A stressz hatása az A. fumigatus néhány, terápiás szempontból is fontos géncsoportjára*

A stresszkezelések az *A. nidulans*ban tapasztaltakhoz (5.1.4) hasonlóan stressz-függő módon befolyásolták a szekunder metabolit génklaszterek transzkripcióját (22. táblázat). A mintegy 40 klaszterből (Inglis és munkatársai 2013) 20 klaszter mutatott indukciót, vagy repressziót (22. táblázat). Három szekunder metabolitról – gliotoxin, fumagillin és hexadehidro-asztekróm – igazolták, hogy növeli az *A. fumigatus in vivo* virulenciáját (Fallon és munkatársai 2011, Scharf és munkatársai 2012, Yin és munkatársai 2013). A vaséhezés az oxidatív stressztől függetlenül represszálta a gliotoxin klaszter génjeinek transzkripcióját (22. táblázat). A fumagillin és hexadehidro-asztekróm klaszterek esetében a vaséhezés és az oxidatív stressz is indukáló hatású volt, együttes alkalmazásuk esetén azonban ez az indukció elmaradt (22. táblázat). Összességében a vaséhezéssel kombinált oxidatív stressz nem előnyös egyik, a virulenciát igazoltan növelő szekunder metabolit génklaszter működése szempontjából sem. Ez természetesen nem zárja ki annak lehetőségét, hogy a kombinált kezelés által indukált Afu5g10120 klaszter (ezidáig nem azonosított) terméke ne kompenzálhatná az előbbi metabolitok hiányát.

Az emberi szervezeten belül a cink fehérjékhez kötötten van jelen; a mikrobák számára könnyen elérhető Zn^{2+} mennyisége – becslések szerint – nmol/l nagyságrendű lehet (Iyengar és Woittiez 1988). Ráadásul, fertőzéskor a neutrofil granulociták által szekretált kalprotektin a szabad Zn^{2+} (és Mn^{2+}) megkötésével tovább nehezíti a mikroorganizmusok helyzetét (Amich és munkatársai 2014, Clark és munkatársai 2016). A vaséhezés mellett a cinkéhezést a legfontosabb olyan stresszhatások közé sorolják melyek alapvetően befolyásolják a fertőzés kimenetelét (Amich és Calera 2014). A cink és a vas anyagcsere között szoros kapcsolat van (Yasmin és munkatársai 2009). Erre utaltak a mi adataink is: Vaséhezés hatására (függetlenül az oxidatív stresszkezeléstől) számos, a cink transzportban fontos gén represszálódott (21. táblázat, 10. melléklet). A vaséhezés által a cink anyagcserében okozott változások is hozzájárulhattak ahhoz, hogy Zn^{2+} keláló vegyületek segítségével sikerült jelentősen megnövelni az *A. fumigatus*szal fertőzött egerek túlélését (Laskaris és munkatársai 2016).

A vaséhezés és a vaséhezéssel kombinált oxidatív stressz egyaránt sok multidrog transzporter gént indukált (21. táblázat, 10. melléklet). A háromféle stresszkezelés a 25 ismert/feltételezett multidrog transzporter génje közül 17-et indukált (10. melléklet). E gének közül az AbcB transzportert kódoló gént kell kiemelni, hiszen az AbcB fehérje mennyiségének a növekedését a proteomikai vizsgálatok is igazolták vaséhezés alatt, illetve a

kombinált stresszkezelésnek kitett tenyészetekben (Kurucz és munkatársai 2018b). Ráadásul e fehérjéről igazolták, hogy részt vesz a (*cyp1a*-független) azol rezisztencia kialakulásában (Fraczek és munkatársai 2013). Stressz hatására gyakran indukálódnak olyan gének, melyek nem szükségesek az adott stressz túléléséhez, de felkészítik a sejtet egy esetleges másodlagos stresszhatás kivédésére (Gasch 2003, Mitchell és munkatársai 2009). Feltehetőleg a multidrog transzporter gének indukciója is hasonló módon magyarázható. E gének indukálódása ugyanakkor komoly terápiás következményekkel is bírhat, hiszen megnövelheti a gomba antifungális szerekkel szemben mutatott toleranciáját. Eredményeink így felhívják a figyelmet a multidrog transzporterek működését szelektíven gátló anyagok (Cannon és munkatársai 2009, Tegos és munkatársai 2011) kutatásának terápiás jelentőségére.

6. Tézisek

Az *A. nidulans* különböző stresszorokkal kiváltott oxidatív stresszválaszai a gének (transzkriptom) szintjén egyediek, a köztük lévő átfedés mértéke és összetétele esetleges, az összehasonlított kezelések típusától és erősségétől függ. (Emri és munkatársai 2015)

Az *A. nidulans* különböző stresszorokkal kiváltott oxidatív stresszválaszaiban a szabályozott biológiai folyamatok (stresszválasz elemek) tekintetében abban az esetben is lehetnek jelentős átfedések, ha ez a szabályozott gének szintjén nem valósul meg. (Orosz és munkatársai 2017)

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)

Az (oxidatív) stressz az egyes szekunder metabolit génklaszterekre eltérő módon hat (az *A. nidulans* és az *A. fumigatus* gombák esetében is); a stressz típusától és erősségétől függően egyes klaszterek transzkripcióját növelheti, vagy csökkentheti, míg más klaszterek transzkripciójára nincs hatással. (Emri és munkatársai 2015; Kurucz és munkatársai 2018b)

Az *atfA* gén inaktiválása segítségével egyes szekunder metabolit génklaszterek aktivitása (transzkripció szinten) befolyásolható az *A. nidulans* gombában. (Emri és munkatársai 2015)

Az AN0472 (*engA*) gén terméke egy szénéhezés alatt extracellulárisan termelődő β -1,3-endoglukanáz; képződéséhez aktív FluG-BrlA jelátviteli útvonal szükséges, és ezen enzim nélkülözhetetlen a szénéhező tenyészetek autolitikus sejtfaldegradációjához (ASD). (Szilágyi és munkatársai 2010a)

Szénéhezés alatt az *A. nidulans* nemcsak lebontja elhalt sejtjeinek sejtfalát, de fel is használja az így nyert tápanyagokat, ami segíti a szénéhezés alatti konidium termelést; azaz az ASD és a konidiogenezis nemcsak szabályozását tekintve, de funkcionálisan is összefüggnek egymással (Szilágyi és munkatársai 2013, Emri és munkatársai 2018a)

A szénéhező *A. nidulans* tenyészetek melanizációját a sejtfalbontó hidrolázok (az EngA β -1,3-glukanáz és a ChiB kitináz) jelenléte váltja ki; a melanin termelésnek fontos szerepe van abban, hogy autolízis alatt az élő sejtek sejtfa ne károsodjon. (Szilágyi és munkatársai 2012, 2018)

Az AN10444 gén által kódolt GgtA felelős a szénéhező tenyészetek nagy intra- és extracelluláris γ GT aktivitásáért; a szénéhező tenyészetekben megfigyelhető jelentős GSH tartalom csökkenéshez azonban a GgtA nem szükséges. (Spitzmüller és munkatársai 2015a)

A GgtA számottevő hidroláz aktivitással nem rendelkezik, lúgos pH-n Gln és GSH (mint γ -glutamil donorok), valamint Glu, (mint γ -glutamil akceptor) jelenlétében nagy aktivitást mutat. (Spitzmüller és munkatársai 2016)

Az echinocandin termelő *Aspergillus pachycristatus* nem rendelkezik veleszületett echinocandin rezisztenciával. (Tóth és munkatársai 2012)

Az *Aspergillus pachycristatus* echinocandin termelő körülmények között is echinocandinokkal gátolható β -1,3-glükán szintázt termel. (Tóth és munkatársai 2012)

Az echinocandin kezelésre indukálódó, „kompenzatórikus kitinszintézis” fontos eleme az *Aspergillus pachycristatus* echinocandin toleranciájának. (Tóth és munkatársai 2012)

Az *Aspergillus* fajok stresszgén készletének összetétele és filogenetikai rendszere között szoros kapcsolat van. Ez alapján a stresszgének kópiaszámában bekövetkező változások fontos részét képezik e fajok stresszhez való adaptációjának és ezen keresztül evolúciójának. (Emri és munkatársai 2018b)

Az *Aspergillus* fajok stresszgén készletének összetétele és stressztoleranciája között nincs szoros kapcsolat. Ez arra utal, hogy a stressztoleranciát a stresszgének kópiaszám változásán kívül más folyamatok (pl. a stresszgének szabályozása) érdemben befolyásolják. (Emri és munkatársai 2018b)

Az *Aspergillus fumigatus* patogenitása nem magyarázható stresszgén készletének (eddig feltárt génjei) egyedi összetételével. (Emri és munkatársai 2018b)

A vashiány megnöveli az *A. fumigatus* oxidatív stresszel szemben mutatott érzékenységét. (Kurucz és munkatársai 2018b)

Az *A. fumigatus* vaséhezással kombinált oxidatív stresszre adott stresszválasza nem írható le a vaséhezésre, illetve az oxidatív stresszre adott stresszválaszok egyszerű kombinációjaként, mind erősségében, mind jellegében eltér azoktól. (Kurucz és munkatársai 2018b)

A vasfelhasználás mérséklését célzó változások mellett egyes vastartalmú fehérjéket kódoló gének, illetve vasigényes folyamatokban résztvevő gének transzkripciójának indukálása szintén jellemző eleme – és egyben potenciális gyenge pontja – a vaséhezésre és különösen a vaséhezéssel kombinált oxidatív stresszre adott stresszválasznak. (Kurucz és munkatársai 2018b)

7. Saját közlemények jegyzéke

7.1 A dolgozat alapjául szolgáló (első, vagy utolsó szerzős) publikációk

Emri T, Majoros L, Tóth V, Pócsi I. (2013) Echinocandins: production and applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 97:3267-3284. IF: 3,811

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. IF: 3,867

Emri T, Vékony V, Gila B, Nagy F, Forgács K, Pócsi I. (2018a) Autolytic hydrolases affect sexual and asexual development of *Aspergillus nidulans*. *Folia Microbiol*. 63:619-626. IF: 1,311

Emri T, Antal K, Riley R, Karányi Zs, Miskei M, Orosz E, Baker SE, Wiebenga A, de Vries RP, Pócsi I (2018b) Duplications and losses of genes encoding known elements of the stress defense system of the *Aspergilli* contribute to the evolution of these filamentous fungi but do not directly influence their environmental stress tolerance. *Stud Mycol*. 91:23-36. IF: 11,633

Kurucz V, Krüger T, Antal K, Dietl AM, Haas H, Pócsi I, Kniemeyer O, Emri T. (2018b) Additional oxidative stress reroutes the global response of *Aspergillus fumigatus* to iron depletion. *BMC Genomics*. 19:357. IF: 3,730

Orosz E, Antal K, Gazdag Z, Szabó Zs, Han KH, Yu JH, Pócsi I, Emri T. (2017) Transcriptome-based modeling reveals that oxidative stress induces modulation of the AtfA-dependent signaling networks in *Aspergillus nidulans*. *Int J Genomics*. 2017:6923849. IF: 1,904

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. IF: 1,760

Spitzmüller Zs, Gonda S, Kiss-Szikszai A, Vasas G, Pócsi I, Emri T. (2016) Characterization of extracellular γ -glutamyl transpeptidase from *Aspergillus nidulans*. *Mycoscience*. 57:400-403. IF: 1,014

Szilágyi M, Kwon NJ, Dorogi C, Pócsi I, Yu JH, Emri T. (2010a) The extracellular β -1,3-endoglucanase EngA is involved in autolysis of *Aspergillus nidulans*. *J Appl Microbiol*. 109:1498-1508. IF: 2,365

Szilágyi M, Anton F, Forgács K, Yu JH, Pócsi I, Emri T. (2012) Antifungal activity of extracellular hydrolyses produced by autolysing *Aspergillus nidulans* cultures. *J Microbiol*. 50:849-854. IF: 1,276

Szilágyi M, Miskei M, Karányi Z, Lenkey B, Pócsi I, Emri T (2013) Transcriptome changes initiated by carbon starvation in *Aspergillus nidulans*. *Microbiol-SGM*. 159:, 176-190. IF: 2,835

Szilágyi M, Anton F, Pócsi I, Emri T. (2018) Autolytic enzymes are responsible for increased melanization of carbon stressed *Aspergillus nidulans* cultures. *J Basic Microbiol*. 58:440-447. IF: 1,580

Tóth V, Nagy CsT, Pócsi I, Emri T. (2012) The echinocandin B producer fungus *Aspergillus nidulans* var. *roseus* ATCC 58397 does not possess innate resistance against its lipopeptide antimycotic. *Appl Microbiol Biotechnol*. 95:113-122. IF: 3,689

7.2 A dolgozatban idézett első, vagy utolsó szerzős publikációk

Bertóti R, Vasas G, Gonda S, Nguyen NM, Szőke É, Pócsi I, Emri T (2016) Glutathione protects *Candida albicans* against horseradish volatile oil. *J Basic Microbiol*. 56:1071-1079.

Emri T, Bartók G, Szentirmai A. (1994) Regulation of specific activity of glucose-6-phosphate-dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase in *Penicillium chrysogenum*. *FEMS Microbiol Lett*. 117:67-70.

Emri T, Pócsi I, Szentirmai A. (1997a) Glutathione metabolism and protection against oxidative stress caused by peroxides in *Penicillium chrysogenum*. *Free Radic Biol Med* 23:809-814.

Emri T, Pócsi I, Szentirmai A. (1997b) Phenoxycetic acid induces glutathione-dependent detoxification and depletes the glutathione pool in *Penicillium chrysogenum*. *J Basic Microbiol*. 37:181-186.

- Emri T, Pócsi I, Szentirmai A. (1999) Analysis of the oxidative stress response of *Penicillium chrysogenum* to menadione. *Free Rad Res.* 30:125-132.
- Emri T, Leiter É, Farkas E, Pócsi I. (2001) Penicillin productivity and glutathione-dependent detoxification of phenylacetic and phenoxyacetic acids in *Penicillium chrysogenum*. *J Basic Microbiol.* 41:67-73.
- Emri T, Molnár Zs, Pusztahelyi T, Pócsi I. (2004a) Physiological and morphological changes in autolysing *Aspergillus nidulans* cultures. *Folia Microbiol* 49:277-284.
- Emri T, Molnár Zs, Pusztahelyi T, Rosén S, Pócsi I. (2004b) Effect of vitamin E on the autolysis and sporulation of *Aspergillus nidulans*. *Appl Biochem Biotechnol.* 118:337-348.
- Emri T, Molnár Zs, Pusztahelyi T, Varecza Z, Pócsi I. (2005a) The FluG-BrlA pathway contributes to the initialisation of autolysis in submerged *Aspergillus nidulans* cultures. *Mycol Res.* 109:757-763.
- Emri T, Molnár Zs, Pócsi I. (2005b) The appearances of autolytic and apoptotic markers are concomitant but differently regulated in carbon-starving *Aspergillus nidulans* cultures. *FEMS Microbiol Lett.* 251:297-303.
- Emri T, Molnár Zs, Veres T, Pusztahelyi T, Dudás G, Pócsi I. (2006) Glucose-mediated repression of autolysis and conidiogenesis in *Emericella nidulans*. *Mycol Res.* 110:1172-1178.
- Emri T, Molnár Zs, Szilágyi M, Pócsi I. (2008) Regulation of autolysis in *Aspergillus nidulans*. *Appl Biochem Biotechnol.* 151:211-220.
- Emri T, Szilágyi M, László K, Hamvas M, Pócsi I. (2009) PepJ is a new extracellular proteinase of *Aspergillus nidulans*. *Folia Microbiol.* 54:105-109.
- Emri T, Zalka A, Pócsi I. (2017) Detection of transcriptionally active mycotoxin gene clusters: DNA microarray. In: Moretti A, Susca A (edd.). *Mycotoxigenic Fungi: Methods and Protocols.* Springer, New York, pp.:345-365.
- Kurucz V, Kiss B, Szigeti ZsM, Nagy G, Orosz E, Hargitai Z, Harangi S, Wiebenga A, de Vries RP, Pócsi I, Emri T. (2018a) Physiological background of the remarkably high Cd²⁺ tolerance of the *Aspergillus fumigatus* Af293 strain. *J Basic Microbiol.* 58:957-967.
- Pócsi I, Pusztahelyi T, Sámi L, Emri T. (2003) Autolysis of *Penicillium chrysogenum* - a holistic approach. *Ind J Biotechnol.* 2:293-301.
- Spitzmüller Zs, Hajdu M, Pócsi I, Emri T. (2015b) Degradation of glutathione in *Aspergillus nidulans*. *Acta Biol Hung.* 66:242-245.
- Szilágyi M, Pócsi I, Forgács K, Emri T. (2010b) MeaB dependent nutrition sensing regulates autolysis in carbon starving *Aspergillus nidulans* cultures. *Ind J Microbiol.* 50:104-108.
- Szilágyi M, Kwon NJ, Bakti F, M-Hamvas M, Jámbrik K, Park HS, Pócsi I, Yu JH, Emri T. (2011) Extracellular proteinase formation in carbon starving *Aspergillus nidulans* cultures - physiological function and regulation. *J Basic Microbiol.* 51:625-634.
- Tóth V, Nagy CsT, Miskei M, Pócsi I, Emri T. (2011) Polyphasic characterization of "*Aspergillus nidulans* var. *roseus*" ATCC 58397. *Folia Microbiol.* 56:381-388.

7.3 A dolgozatban idézett további saját publikációk

- 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.
- de Vries RP, Riley R, Ad Wiebenga A, Aguilar-Osorio G, Amillis S, Akemi Uchima C, Anderluh G, Asadollahi Askin M, Barry K, Battaglia E, Bayram Ö, Benocci T, Braus-Stromeier SA, Caldana C, Cánovas D, Cerqueira G, Chen F, Chen W, Choi C, Clum A, Corrêa dos Santos RA, de Lima Damásio AR, Diallinas G, Emri T, Fekete E, Flippin M, Freyberg S, Gallo A, Gournas C, Habgood R, Haimaut M, Harispe L, Henrissat B, Hildén K S, Hope R, Hossain A, Karabika E, Karaffa L, Karányi Z, Kraševac N, Kuo A, Kusch H, LaButti K, Lagendijk EL, Lapidus A, Lévassieur A, Lindquist E, Lipzen A, Logrieco A, MacCabe A, Mäkelä MR, Malavazi I, Melin P, Meyer V, Mielnichuk N, Miskei M, Molnár ÁP, Mulé G, Ngan CY, Orejas M, Orosz E, Ouedraogo JP, Overkamp KM, Park HS, Perrone G, Piumi F, Punt P, Ram A FJ, Ramón A, Rauscher S, Record E, Riaño-

Pachón DM, Robert V, Röhrig J, Ruller R, Salamov A, Salih N, Samson R A, Sándor E, Sanguinetti M, Schütze T, Sepčić K, Shelest E, Sherlock G, Sophianopoulou V, Squina FM, Sun H, Susca A, Todd RB, Tsang A, Unkles SE, van de Wiele N, van Rossum-Uffink D, Velasco de Castro Oliveira J, Vesth TC, Visser J, Yu JH, Zhou M, Andersen MR, Archer D, Baker S, Benoit I, Brakhage AA, Braus GH, Fischer R, Frisvad JC, Goldman GH, Houben J, Oakley B, Pócsi I, Scazzocchio C, Seiboth B, vanKuyk PA, Wortman JR, Dyer PS and Grigoriev IV. (2017) Comparative genomics reveals high biological diversity and specific adaptation in the industrially and medically important fungal genus *Aspergillus*. *Genome Biol.* 18:28.

Hegedűs N, Leiter É, Kovács B, Tomori V, Kwon NJ, Emri T, Marx F, Batta G, Csernoch L, Haas H, Yu JH, Pócsi I. (2011) The small molecular mass antifungal protein of *Penicillium chrysogenum* - a mechanism of action oriented review. *J Basic Microbiol.* 51:561-571.

Kovács Zs, Szarka M, Kovács S, Boczonádi I, Emri T, Abe K, Pócsi I, Pusztahelyi T. (2013) Effect of cell wall integrity stress and RlmA transcription factor on asexual development and autolysis in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Biol.* 54:1-14.

Molnár Zs, Mészáros E, Szilágyi Zs, Rosén S, Emri T, Pócsi I (2004) Influence of *fdaA^{G203R}* and *AflbA* mutations on the morphology and physiology of submerged *Aspergillus nidulans* cultures. *Appl Biochem Biotechnol.* 118:349-360.

Molnár Zs, Emri T, Zavaczki E, Pusztahelyi T, Pócsi I. (2006) Effects of mutations in the GanB/RgsA G protein mediated signaling on the autolysis of *Aspergillus nidulans*. *J Basic Microbiol.* 46:495-503.

Orosz E, van de Wiele N, Emri T, Zhou M, Robert V, de Vries RP, Pócsi I. (2018) Fungal Stress Database (FSD) - a repository of fungal stress physiological data. *Database (Oxford)*. 2018:bay009.

Pócsi I, Emri T, Varcza Z, Sámi L, Pusztahelyi T. (1999) Allosamidin inhibits the fragmentation and autolysis of *Penicillium chrysogenum*. In: Peter MG, Domard A, Muzzarelli RAA (edd.). *Advances in chitin sciences*, Vol.4. University of Potsdam, Potsdam. pp.: 558-564.

Pócsi I, Miskei M, Karányi Zs, Emri T, Ayoubi P, Pusztahelyi T, Balla Gy, Prade RA. (2005) Comparison of gene expression signatures of diamide, H₂O₂ and menadione exposed *Aspergillus nidulans* cultures - linking genome-wide transcriptional changes to cellular physiology. *BMC Genomics.* 6:182-192.

Pócsi I, Jeney V, Kertai P, Pócsi I, Emri T, Gyémánt Gy, Fésüs L, Balla J, Balla Gy. (2008) Fungal siderophores function as protective agents of LDL oxidation and are promising anti-atherosclerotic metabolites in functional food. *Mol Nutr Food Res.* 52:1434-1447.

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.

Pusztahelyi T, Molnár Zs, Emri T, Klement É, Miskei M, Kerékgyártó J, Balla J, Pócsi I. (2006) Comparative studies on differential expression of chitinolytic enzymes encoded by *chiA*, *chiB*, *chiC* and *nagA* genes in *Aspergillus nidulans*. *Folia Microbiol.* 51:547-554.

Pusztahelyi T, Klement E, Szajli E, Klem J, Miskei M, Karányi Zs, Emri T, Kovács S, Orosz G, Kovács KL, Medzihradszky KF, Prade RA, Pócsi I. (2011) Comparison of transcriptional and translational changes caused by long-term menadione exposure in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Biol.* 48:92-103.

Sámi L, Emri T, Pócsi I. (2001a) Autolysis and ageing of *Penicillium chrysogenum* cultures under carbon starvation: III: glutathione metabolism and formation of reactive oxygen species. *Mycol Res.* 105:1246-1250.

Sámi L, Pusztahelyi T, Emri T, Varcza Z, Fekete A, Grallert Á, Karányi Zs, Kiss L, Pócsi I (2001b) Autolysis and ageing of *Penicillium chrysogenum* cultures under carbon starvation: chitinase production and antifungal effect of allosamidin. *J Gen Appl Microbiol.* 47:201-211.

Sámi L, Karaffa L, Emri T, Pócsi I. (2003) Autolysis and ageing of *Penicillium chrysogenum* cultures under carbon starvation: respiration and glucose oxidase production. *Acta Microbiol Immunol Hung.* 50:67-76.

van Munster JM, Burggraaf AM, Pócsi I, Szilágyi M, Emri T, Ram AFJ. (2016) Post-genomic approaches to dissect carbon starvation responses in *Aspergilli*. In: Benoit I, Andersen MR, de Vries RP (edd.). *Aspergillus and Penicillium in the post-genomic era*. Caister Academic Press, Norfolk, pp.: 89-112.

Yin WB, Reinke AW, Szilágyi M, Emri T, Chiang YM, Keating AE, Pócsi I, Wang CC, Keller NP. (2013) bZIP transcription factors affecting secondary metabolism, sexual development and stress responses in *Aspergillus nidulans*. *Microbiology* 159:77-88.

8. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom Prof. Dr. Pócsi Istvánnak, aki nemcsak mint tapasztalt kutató, de mint tanszékvezető és mint egykori tanárom is felbecsülhetetlen segítséget, támogatást és ösztönzést nyújtott ezen dolgozat elkészítéséhez. Köszönet illeti a tanszék korábbi tanszékvezetőit is Dr. Lenkey Bélát, Prof. Dr. Bíró Sándort és Prof. Dr. Szentirmai Attilát, hogy megfelelő környezetet biztosítottak munkám elvégzéséhez.

Köszönöm egykori és jelenlegi PhD hallgatóim munkáját, akik közül Dr. Molnár Zsoltot, Dr. Szilágyi Melindát, Dr. Tóth Viktóriát, Dr. Spitzmüller Zsoltot és Dr. Kurucz Vivient szeretném név szerint is megemlíteni, hiszen a dolgozat nagyrészt a velük végzett munka eredményeire épül. A dolgozat alapjául szolgáló vizsgálatok kivitelezésében Anton Fruzsina, Dorogi Csilla, Gila Csaba Barnabás, Hajdu Márton, Kiss Beáta, László Krisztina, Nagy Flóra, Nagy Csilla Terézia, Szarvas Vera és Vékony Viktória, mint szakdolgozók működtek közre. Munkájuk értékét jelzi, hogy egy-egy a dolgozatban is szereplő közleményben társszerzőként szerepelnek.

Köszönet illeti mindazon kutatókat, akikkel együtt dolgozhattam ezen időszak alatt: Dr. Jakab Ágnes, Dr. Leiter Éva, Dr. Miskei Márton, Dr. Orosz Erzsébet, Dr. Pusztahelyi Tünde, Szabó Zsuzsa, Dr. Szemán-Nagy Gábor, Dr. Szigeti Zsuzsa a tanszék jelenlegi, vagy egykori munkatársai; Dr. Birkó Zsuzsa, Dr. Csósz Éva, Dr. Gonda Sándor, Dr. Hamvas Márta, Dr. Harangi Sándor, Karányi Zsolt, Dr. Keserű Judit, Dr. Kiss-Szikszai Attila, Dr. Majoros László, Dr. Poliska Szilárd, Prof. Dr. Vasass Gábor, a Debreceni Egyetem munkatársai, valamint Prof. Dr. Pesti Miklós és Dr. Gazdag Zoltán (Pécsi Tudományegyetem), Prof. Dr. Hubertus Haas és kollégái (Medical University of Innsbruck), Prof. Dr. Nancy Keller és munkatársai (University of Wisconsin–Madison), Dr. Olaf Kniemayer és kollégái (Leibniz Institute for Natural Product Research and Infection Biology – Hans Knöll Institute), Prof. Dr. Arthur F. J. Ram és munkatársai (Utrecht University), Prof. Dr. Jae-hyuk Yu és kollégái (University of Wisconsin–Madison) és nem utolsósorban Prof. Dr. Ronald P. de Vries és munkatársai (Utrecht University).

Külön szeretném megköszönni Dr. Antal Károly (Eszterházy Károly Egyetem) munkáját, segítségét, tanácsait és kritikai észrevételeit, mellyel a vizsgálatok bioinformatikai és statisztikai részét támogatta.

Hálával tartozom Tóth Gábor Lászlóné laboráns, valamint Heteiné Burai Katalin, Tóth-Fekete Csilla és Varga-Bencsik Anikó (egymást követő) tanszéki adminisztrátorok munkájáért is.

Nem utolsósorban hálás vagyok feleségemnek, Dr. Forgács Katalinnak és lányomnak Emri Katalin Nórának, nemcsak mert türelemmel viselték az elmúl időszak megpróbáltatásait, de a dolgozat végső formába öntését is segítették nyelvi, stilisztikai és formai észrevételeikkel.

A dolgozatban szereplő kutatások finanszírozása az alábbi pályázatok segítségével volt lehetséges: TAMOP 4.2.1/B-09/1/KONV-2010-0007, TAMOP 4.2.2/B-10/1-2010-0024, 2.2. TAMOP A-11/1/KONV-2012-0045, NKFIH K100464, NKFIH K112181, NKFIH K119494, NKFIH NN125671, SROP-4.2.2.B-15/1/KONV-2015-0001, EFOP-3.6.1-16-2016-00022.

9. Irodalomjegyzék

Abad A, Fernández-Molina JV, Bikandi J, Ramírez A, Margareto J, Sendino J, Hernando FL, Pontón J, Garaizar J, Rementeria A. (2010) What makes *Aspergillus fumigatus* a successful pathogen? Genes and molecules involved in invasive aspergillosis. *Rev Iberoam Micol.* 27:155-182.

Abegg MA, Alabarse PV, Casanova A, Hoscheid J, Salomon TB, Hackenhaar FS, Medeiros TM, Benfato MS. (2010) Response to oxidative stress in eight pathogenic yeast species of the genus *Candida*. *Mycopathologia.* 170:11-20.

Ádám AL, Kohut G, Hornok L. (2008) Fphog1, a HOG-type MAP kinase gene, is involved in multistress response in *Fusarium proliferatum*. *J Basic Microbiol.* 48:151-159.

Adams TH, Wieser JK, Yu JH. (1998) Asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Microbiol Mol Biol Rev.* 62:35-54.

Adle DJ, Sinani D, Kim H, Lee J. (2007) A cadmium-transporting P1B-type ATPase in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* 282:947-955.

Aimanianda V, Bayry J, Bozza S, Knemeyer O, Perruccio K, Elluru SR, Clavaud C, Paris S, Brakhage AA, Kaveri SV, Romani L, Latgé JP. (2009) Surface hydrophobin prevents immune recognition of airborne fungal spores. *Nature.* 460:1117-1121.

Albrecht D, Guthke R, Brakhage AA, Knemeyer O. (2010) Integrative analysis of the heat shock response in *Aspergillus fumigatus*. *BMC Genomics.* 11:32.

Alfonso C, Nuero OM, Santamaría F, Reyes F. (1995). Purification of a heat-stable chitin deacetylase from *Aspergillus nidulans* and its role in cell wall degradation. *Curr Microbiol* 30:49-54.

Altwasser R, Baldin C, Weber J, Guthke R, Knemeyer O, Brakhage AA, Linde J, Valiante V. (2015) Network modeling reveals cross talk of MAP kinases during adaptation to caspofungin stress in *Aspergillus fumigatus*. *PLoS One.* 10:e0136932.

Amich J, Calera JA. (2014) Zinc acquisition: a key aspect in *Aspergillus fumigatus* virulence. *Mycopathologia.* 178:379-385.

Amich J, Vicentefranqueira R, Mellado E, Ruiz-Carmuega A, Leal F, Calera JA. (2014) The ZrfC alkaline zinc transporter is required for *Aspergillus fumigatus* virulence and its growth in the presence of the Zn/Mn-chelating protein calprotectin. *Cell Microbiol.* 16:548-564.

Ámon J, Keisham K, Bokor E, Kelemen E, Vágvolgyi C, Hamari Zs. (2018) Sterigmatocystin production is restricted to hyphae located in the proximity of hülle cells. *J Basic Microbiol.* 58:590-596.

Amore A, Giacobbe S, Faraco V. (2013) Regulation of cellulase and hemicellulase gene expression in fungi. *Curr Genomics.* 14:230-249.

- Anderson ME. (1985) Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. *Methods Enzymol.* 113:548-555.
- Andreini C, Bertini I, Cavallaro G, Holliday GL, Thornton JM. (2008) Metal ions in biological catalysis: from enzyme databases to general principles. *J Biol Inorg Chem.* 13:1205-1218.
- Antachopoulos C, Meletiadiis J, Sein T, Roilides E, Walsh TJ. (2008) Comparative in vitro pharmacodynamics of caspofungin, micafungin, and anidulafungin against germinated and nongerminated *Aspergillus* conidia. *Antimicrob Agents Chemother.* 52:321-328.
- Anzai T, Takatori K, Shimozawa K, Manglai D. (2000) Fungal and bacterial isolation from inflamed guttural pouches. Drug susceptibility of the isolates. *J Japan Vet Med Assoc* 53:63-66.
- Arikan S, Lozano-Chiu M, Paetznick V, Rex JH. (2001) *In vitro* susceptibility testing methods for caspofungin against *Aspergillus* and *Fusarium* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 45:327-330.
- Asano Y, Hagiwara D, Yamashino T, Mizuno T. (2007) Characterization of the bZip-type transcription factor NapA with reference to oxidative stress response in *Aspergillus nidulans*. *Biosci Biotechnol Biochem.* 71:1800-1803.
- Askwith C, Eide D, Van Ho A, Bernard PS, Li L, Davis-Kaplan S, Sipe DM, Kaplan J. (1994) The FET3 gene of *S. cerevisiae* encodes a multicopper oxidase required for ferrous iron uptake. *Cell.* 76:403-410.
- Atay O, Skotheim JM. (2017) Spatial and temporal signal processing and decision making by MAPK pathways. *J Cell Biol.* 216:317-330.
- Aung-Htut MT, Ayer A, Breitenbach M, Dawes IW. (2012) Oxidative stresses and ageing. *Subcell Biochem.* 57:13-54.
- Ayer A, Gourlay CW, Dawes IW. (2014) Cellular redox homeostasis, reactive oxygen species and replicative ageing in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* 14:60-72.
- Bakti F, Sasse C, Heinekamp T, Pócsi I, Braus GH. (2018) Heavy metal-induced expression of PcaA provides cadmium tolerance to *Aspergillus fumigatus* and supports its virulence in the *Galleria mellonella* model. *Front Microbiol.* 9:744.
- Baladrón V, Ufano S, Dueñas E, Martín-Cuadrado AB, del Rey F, Vázquez de Aldana CR. (2002) Eng1p, an endo-1,3- β -glucanase localized at the daughter side of the septum, is involved in cell separation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell.* 1:774-786.
- Balajee SA, Kano R, Baddley JW, Moser SA, Marr KA, Alexander BD, Andes D, Kontoyiannis DP, Perrone G, Peterson S, Brandt ME, Pappas PG, Chiller T. (2009) Molecular identification of *Aspergillus* species collected for the Transplant-Associated Infection Surveillance Network. *J Clin Microbiol.* 47: 3138-3141.
- 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.
- Baldrian P, Valásková V. (2008) Degradation of cellulose by basidiomycetous fungi. *FEMS Microbiol Rev.* 32:501-521.
- Balloy V, Chignard M. (2009) The innate immune response to *Aspergillus fumigatus*. *Microbes Infect.* 11:919-927.
- Barker BM, Kroll K, Vödisch M, Mazurie A, Kniemeyer O, Cramer RA. (2012) Transcriptomic and proteomic analyses of the *Aspergillus fumigatus* hypoxia response using an oxygen-controlled fermenter. *BMC Genomics.* 13:62.
- Barratt, RW, Johnson GB, Ogata WN. (1965) Wild-type and mutant stocks of *Aspergillus nidulans*. *Genetics.* 52:233-246.
- Bart-Delabesse E, Latgé JP. (2004) Ecology and Genetic Diversity of *Aspergillus fumigatus*. In: Dörm J, Kobayashi GS (eds). *Human Fungal Pathogens. The Mycota*, vol 12. Springer, Berlin, pp.: 25-36.
- Bauer S, Vasu P, Persson S, Mort AJ, Somerville CR. (2006) Development and application of a suite of polysaccharide-degrading enzymes for analyzing plant cell walls. *Proc Natl Acad Sci USA.* 103:11417-11422.

- Beaulieu D, Tang J, Yan SB, Vessels JM, Radding JA, Parr TR Jr. (1996) Characterization and cilofungin inhibition of solubilized *Aspergillus fumigatus* (1,3)-beta-D-glucan synthase. *Antimicrob Agents Chemother.* 38:937-944.
- Becskei A, Séraphin B, Serrano L. (2001). Positive feedback in eukaryotic gene networks: cell differentiation by graded to binary response conversion. *EMBO J.* 20:2528-2535.
- Beekrum S, Govinden R, Padayachee T, Odhav B. (2003) Naturally occurring phenols: a detoxification strategy for fumonisin B1. *Food Addit Contam.* 20:490-449.
- Bello MH, Epstein L. (2013) Clades of γ -glutamyltransferases (GGTs) in the ascomycota and heterologous expression of *Colletotrichum graminicola* CgGGT1, a member of the pezizomycotina-only GGT clade. *J Microbiol.* 51:88-99.
- Bello MH, Morin D, Epstein L. (2013) γ -Glutamyltransferases (GGT) in *Colletotrichum graminicola*: mRNA and enzyme activity, and evidence that CgGGT1 allows glutathione utilization during nitrogen deficiency. *Fungal Genet Biol.* 51:72-83.
- Ben-Ami R, Garcia-Effron G, Lewis RE, Gamarra S, Leventakos K, Perlin DS, Kontoyiannis DP. (2011) Fitness and virulence costs of *Candida albicans* FKS1 hot spot mutations associated with echinocandin resistance. *J Infect Dis.* 204:626-635.
- Ben-Ami R, Kontoyiannis DP. (2012) Resistance to echinocandins comes at a cost: the impact of FKS1 hotspot mutations on *Candida albicans* fitness and virulence. *Virulence.* 3:95-97.
- Ben Yaakov D, Rivkin A, Mircus G, Albert N, Dietl AM, Kovalerchick D, Carmeli S, Haas H, Kontoyiannis DP, Oshero N. (2016) Identification and characterization of haemofungin, a novel antifungal compound that inhibits the final step of haem biosynthesis. *J Antimicrob Chemother.* 71:946-952.
- Bergmann S, Schümann J, Scherlach K, Lange C, Brakhage AA, Hertweck C. (2007) Genomics-driven discovery of PKS-NRPS hybrid metabolites from *Aspergillus nidulans*. *Nat Chem Biol.* 3:213-217.
- Berman J. (2016) Ploidy plasticity: a rapid and reversible strategy for adaptation to stress. *FEMS Yeast Res.* 16:fow020.
- Bernardo SM, Gray KA, Todd RB, Cheetham BF, Katz ME. (2007) Characterization of regulatory non-catalytic hexokinases in *Aspergillus nidulans*. *Mol Genet Genomics.* 277:519-532.
- Bertóti R, Vasas G, Gonda S, Nguyen NM, Szőke É, Pócsi I, Emri T (2016) Glutathione protects *Candida albicans* against horseradish volatile oil. *J Basic Microbiol.* 56:1071-1079.
- Bertuzzi M, Schrettl M, Alcazar-Fuoli L, Cairns TC, Muñoz A, Walker LA, Herbst S, Safari M, Cheverton AM, Chen D, Liu H, Saijo S, Fedorova ND, Armstrong-James D, Munro CA, Read ND, Filler SG, Espeso EA, Nierman WC, Haas H, Bignell EM. (2014) The pH-responsive PacC transcription factor of *Aspergillus fumigatus* governs epithelial entry and tissue invasion during pulmonary aspergillosis. *PLoS Pathog.* 10:e1004413.
- Binder U, Lass-Flörl C. (2013) New insights into invasive aspergillosis - from the pathogen to the disease. *Curr Pharm Des.* 19:3679-3688.
- Binod P, Pusztahelyi T, Nagy V, Sandhya C, Szakacs G, Pócsi I, Pandey A. (2005) Production and purification of extracellular chitinases from *Penicillium aculeatum* NRRL 2129 under solid-state fermentation. *Enzyme Microb Technol.* 36:880-887.
- Birse CE, Clutterbuck AJ. (1990). N-acetyl-6-hydroxytryptophan oxidase, a developmentally controlled phenol oxidase from *Aspergillus nidulans*. *J Gen Microbiol.* 136:1725-1730.
- Blatzer M, Binder U, Haas H. (2011) The metalloreductase FreB is involved in adaptation of *Aspergillus fumigatus* to iron starvation. *Fungal Genet Biol.* 48:1027-1033.
- Boeck LD, Kastner RE. (1981) Method of producing the A-30912 antibiotics. US4288549A.
- Bódi Z, Farkas Z, Nevozhay D, Kalapis D, Lázár V, Csörgő B, Nyerges Á, Szamecz B, Fekete G, Papp B, Araújo H, Oliveira JL, Moura G, Santos MAS, Székely T Jr, Balázs G, Pál C. (2017) Phenotypic heterogeneity promotes adaptive evolution. *PLoS Biol.* 15:e2000644.

- Boisnard S, Lagniel G, Garmendia-Torres C, Molin M, Boy-Marcotte E, Jacquet M, Toledano MB, Labarre J, Chédin S. (2009) H₂O₂ activates the nuclear localization of Msn2 and Maf1 through thioredoxins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell*. 8:1429-1438.
- Bok JW, Hoffmeister D, Maggio-Hall LA, Murillo R, Glasner JD, Keller NP. (2006) Genomic mining for *Aspergillus niger* products. *Chem Biol*. 13:31-37.
- Bolstad BM, Irizarry RA, Astrand M, Speed TP. (2003) A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on bias and variance. *Bioinformatics*. 19:185-193.
- Borghi E, Andreoni S, Cirasola D, Ricucci V, Sciota R, Morace G. (2014) Antifungal resistance does not necessarily affect *Candida glabrata* fitness. *J Chemother*. 26:32-36.
- Bossie MA, Martin CE. (1989) Nutritional regulation of yeast delta-9 fatty acid desaturase activity. *J Bacteriol*. 171:6409-6413.
- Bowman JC, Hicks PS, Kurtz MB, Rosen H, Schmatz DM, Liberator PA, Douglas CM. (2002) The antifungal echinocandin caspofungin acetate kills growing cells of *Aspergillus fumigatus* *in vitro*. *Antimicrob Agents Chemother*. 46:3001-3012.
- Braaksma M, Punt PJ. (2008) *Aspergillus* as a cell factory for protein production: controlling protease activity in fungal production. In: Goldman GH, Osmani SA (edd.). *The Aspergilli: Genomics, Medical Aspects, Biotechnology, and Research Methods*. CRC Press, Boca Raton, pp.: 441-455.
- Bradford MM. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 72:248-254.
- Braga RM, Dourado MN, Araújo WL. (2016) Microbial interactions: ecology in a molecular perspective. *Braz J Microbiol*. 47:S86-S98.
- Brakhage AA. (1998) Molecular Regulation of β -lactam biosynthesis in filamentous fungi. *Microbiol Mol Biol Rev*. 62:547-585.
- Brandon M, Howard B, Lawrence C, Laubenbacher R. (2015) Iron acquisition and oxidative stress response in *Aspergillus fumigatus*. *BMC Syst Biol*. 9:19.
- Braymer JJ, Lill R. (2017) Iron-sulfur cluster biogenesis and trafficking in mitochondria. *J Biol Chem*. 292:12754-12763.
- Breitenbach M, Weber M, Rinnerthaler M, Karl T, Breitenbach-Koller L. (2015) Oxidative stress in fungi: its function in signal transduction, interaction with plant hosts, and lignocellulose degradation. *Biomolecules*. 5:318-342.
- Brion C, Pflieger D, Souali-Crespo S, Friedrich A, Schacherer J. (2016) Differences in environmental stress response among yeasts is consistent with species-specific lifestyles. *Mol Biol Cell*. 27:1694-1705.
- Brown DV, Yu JH, Kelkar HS, Fernandes M, Nesbitt TC, Keller NP, Adams TH, Leonard TJ. (1996) Twenty-five coregulated transcripts define a sterigmatocystin gene cluster in *Aspergillus nidulans*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 93:1418-1422.
- Brown AJ, Haynes K, Quinn J. (2009) Nitrosative and oxidative stress responses in fungal pathogenicity. *Curr Opin Microbiol*. 12:384-391.
- Brown GD, Denning DW, Gow NA, Levitz SM, Netea MG, White TC. (2012) Hidden killers: human fungal infections. *Sci Transl Med*. 4:165rv13.
- Brown NA, de Gouvea PF, Krohn NG, Savoldi M, Goldman GH. (2013) Functional characterisation of the non-essential protein kinases and phosphatases regulating *Aspergillus nidulans* hydrolytic enzyme production. *Biotechnol Biofuels*. 6:91.
- Brown AJ, Budge S, Kaloriti D, Tillmann A, Jacobsen MD, Yin Z, Ene IV, Bohovych I, Sandai D, Kastora S, Potrykus J, Ballou ER, Childers DS, Shahana S, Leach MD. (2014) Stress adaptation in a pathogenic fungus. *J Exp Biol*. 217:144-155.
- Brown NA, Goldman GH. (2016) The contribution of *Aspergillus fumigatus* stress responses to virulence and antifungal resistance. *J Microbiol*. 54:243-253.

- Bruinenberg PM, Van Dijken JP, Scheffers WA. (1983) An enzymatic analysis of NADPH production and consumption in *Candida utilis*. J Gen Microbiol. 129:965-971.
- Brückner B. (1992) Regulation of gibberellin formation by the fungus *Gibberella fujikuroi*. Ciba Found Symp. 171:129-137.
- Bugg TD, Ahmad M, Hardiman EM, Rahmanpour R. (2011) Pathways for degradation of lignin in bacteria and fungi. Nat Prod Rep. 28:1883-1896.
- Cacho RA, Jiang W, Chooi YH, Walsh CT, Tang Y. (2012) Identification and characterization of the echinocandin B biosynthetic gene cluster from *Emericella rugulosa* NRRL 11440. J Am Chem Soc. 134:16781-16790.
- Calahan D, Dunham M, DeSevo C, Koshland DE. (2011) Genetic analysis of desiccation tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. Genetics. 189:507-519.
- Calvo E, Pastor FJ, Mayayo E, Guarro J. (2011) Efficacy of anidulafungin against *Aspergillus niger* *in vitro* and *in vivo*. Int J Antimicrob Agents. 38:360-363.
- Calvo IA, Garcia P, Ayte J, Hidalgo E. (2012a) The transcription factors Pap1 and Prr1 collaborate to activate antioxidant, but not drug tolerance, genes in response to H₂O₂. Nucleic Acids Research. 40:4816-4824.
- Calvo E, Pastor FJ, Salas V, Mayayo E, Guarro J. (2012b) Combined therapy of voriconazole and anidulafungin in murine infections by *Aspergillus flavus*. Mycopathologia. 173:251-257.
- Campoy S, Adrio JL. (2017) Antifungals. Biochem Pharmacol. 133:86-96.
- Cannon RD, Lamping E, Holmes AR, Niimi K, Baret PV, Keniya MV, Tanabe K, Niimi M, Goffeau A, Monk BC. (2009) Efflux-mediated antifungal drug resistance. Clin Microbiol Rev. 22:291-321.
- Cao Y, Klionsky DJ. (2007) Atg26 is not involved in autophagy-related pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. Autophagy. 3:17-20.
- Carter WO, Narayanan PK, Robinson JP. (1994) Intracellular hydrogen peroxide and superoxide anion detection in endothelial cells. J Leukoc Biol. 55:253-258.
- Causton HC, Ren B, Koh SS, Harbison CT, Kanin E, Jennings EG, Lee TI, True HL, Lander ES, Young RA. (2001) Remodeling of yeast genome expression in response to environmental changes. Mol Biol Cell. 12:323-337.
- Chandrasekar PH, Sobel JD. (2006) Micafungin: a new echinocandin. Clin Infect Dis. 42:1171-1178.
- Chang PK, Scharfenstein LL, Luo M, Mahoney N, Molyneux RJ, Yu J, Brown RL, Campbell BC. (2011) Loss of *msnA*, a putative stress regulatory gene, in *Aspergillus parasiticus* and *Aspergillus flavus* increased production of conidia, aflatoxins and kojic acid. Toxins (Basel). 3:82-104.
- Chang PK, Scharfenstein LL, Mack B, Ehrlich KC. (2012) Deletion of the *Aspergillus flavus* orthologue of *A. nidulans fluG* reduces conidiation and promotes production of sclerotia but does not abolish aflatoxin biosynthesis. Appl Environ Microbiol. 78:7557-7563.
- Cheah IK, Halliwell B. (2012) Ergothioneine; antioxidant potential, physiological function and role in disease. Biochim Biophys Acta. 1822:784-793.
- Chen D, Toone WM, Mata J, Lyne R, Burns G, Kivinen K, Brazma A, Jones N, Bähler J. (2003) Global transcriptional responses of fission yeast to environmental stress. Mol Biol Cell. 14:214-229.
- Chen D, Wilkinson CR, Watt S, Penkett CJ, Toone WM, Jones N, Bähler J. (2008). Multiple pathways differentially regulate global oxidative stress responses in fission yeast. Mol Biol Cell. 19:308-317.
- Chen SC, Slavin MA, Sorrell TC. (2011) Echinocandin antifungal drugs in fungal infections: a comparison. Drugs. 71:11-41.
- Chen YQ, Liu XG, Zhao W, Cui H, Ruan J, Yuan Y, Tu Z. (2017) MET18 deficiency increases the sensitivity of yeast to oxidative stress and shortens replicative lifespan by inhibiting catalase activity. Biomed Res Int. 2017:7587395.
- Cheng J, Park TS, Chio LC, Fischl AS, Ye XS. (2003) Induction of apoptosis by sphingoid long-chain bases in *Aspergillus nidulans*. Mol Cell Biol. 23:163-177.

- Cheon SA, Thak EJ, Bahn YS, Kang HA. (2017) A novel bZIP protein, Gsb1, is required for oxidative stress response, mating, and virulence in the human pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Sci Rep*. 7:4044.
- Chernova TA, Kiktev DA, Romanyuk AV, Shanks JR, Laur O, Ali M, Ghosh A, Kim D, Yang Z, Mang M, Chernoff YO, Wilkinson KD. (2017) Yeast short-lived actin-associated protein forms a metastable prion in response to thermal stress. *Cell Rep*. 18:751-761.
- Chiang YM, Szewczyk E, Nayak T, Davidson AD, Sanchez JF, Lo HC, Ho WY, Simityan H, Kuo E, Praseuth A, Watanabe K, Oakley BR, Wang CC. (2008) Molecular genetic mining of the *Aspergillus* secondary metabolome: discovery of the emericellamide biosynthetic pathway. *Chem Biol*. 15:527-532.
- Chiang YM, Szewczyk E, Davidson AD, Keller N, Oakley BR, Wang CC. (2009) A gene cluster containing two fungal polyketide synthases encodes the biosynthetic pathway for a polyketide, asperfuranone, in *Aspergillus nidulans*. *J Am Chem Soc*. 131:2965-2970.
- Chiang YM, Szewczyk E, Davidson AD, Entwistle R, Keller NP, Wang CCC, Oakley BR. (2010) Characterization of the *Aspergillus nidulans* Monodictyphenone Gene Cluster *Appl Environ Microbiol*. 76:2067-2074.
- Chiang YM, Oakley CE, Ahuja M, Entwistle R, Schultz A, Chang SL, Sung CT, Wang CC, Oakley BR. (2013) An efficient system for heterologous expression of secondary metabolite genes in *Aspergillus nidulans*. *J Am Chem Soc*. 135:7720-7731.
- Chiu DTY, Stults FH, Tappel AL. (1976) Purification and properties of rat lung soluble glutathione peroxidase. *Biochem Biophys Acta*. 445:558-566.
- Choby JE, Mike LA, Mashruwala AA, Dutter BF, Dunman PM, Sulikowski GA, Boyd JM, Skaar EP. (2016) A small-molecule inhibitor of iron-sulfur cluster assembly uncovers a link between virulence regulation and metabolism in *Staphylococcus aureus*. *Cell Chem Biol*. 23:1351-1361.
- Choi CJ, Ju HJ, Park BH, Qin R, Jahng KY, Han DM, Chae KS. (2005). Isolation and characterization of the *Aspergillus nidulans* *eglC* gene encoding a putative β -1,3-endoglucanase. *Fungal Genet Biol*. 42:590-600.
- Chomczynski P. (1993) A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques*. 15:532-537.
- Chung D, Barker BM, Carey CC, Merriman B, Werner ER, Lechner BE, Dhingra S, Cheng C, Xu W, Blosser SJ, Morohashi K, Mazurie A, Mitchell TK, Haas H, Mitchell AP, Cramer RA. (2014) ChIP-seq and *in vivo* transcriptome analyses of the *Aspergillus fumigatus* SREBP SrbA reveals a new regulator of the fungal hypoxia response and virulence. *PLoS Pathog*. 10:e1004487.
- Clark HL, Jhingran A, Sun Y, Vareechon C, de Jesus Carrion S, Skaar EP, Chazin WJ, Calera JA, Hohl TM, Pearlman E. (2016) Zinc and manganese chelation by neutrophil S100A8/A9 (calprotectin) limits extracellular *Aspergillus fumigatus* hyphal growth and corneal infection. *J Immunol*. 196:336-344.
- Cletus J, Balasubramanian V, Vashisht D, Sakthivel N. (2013) Transgenic expression of plant chitinases to enhance disease resistance. *Biotechnol Lett*. 35:1719-1732.
- Colabardini AC, De Castro PA, De Gouvêa PF, Savoldi M, Malavazi I, Goldman MH, Goldman GH. (2010) Involvement of the *Aspergillus nidulans* protein kinase C with farnesol tolerance is related to the unfolded protein response. *Mol Microbiol*. 78:1259-1279.
- Colman-Lerner A, Chin TE, Brent R. (2001) Yeast Cbk1 and Mob2 activate daughter-specific genetic programs to induce asymmetric cell fates. *Cell*. 107:739-750.
- Conrad TM, Joyce AR, Applebee MK, Barrett CL, Xie B, Gao Y, Palsson BØ. (2009) Whole-genome resequencing of *Escherichia coli* K-12 MG1655 undergoing short-term laboratory evolution in lactate minimal media reveals flexible selection of adaptive mutations. *Genome Biol*. 10:R118.
- Conrad TM, Lewis NE, Palsson BØ. (2011) Microbial laboratory evolution in the era of genome-scale science. *Mol Syst Biol*. 7:509.
- Cooney NM, Klein BS. (2008) Fungal adaptation to the mammalian host: it is a new world, after all. *Curr Opin Microbiol*. 11:511-516.
- Costa VM, Amorim MA, Quintanilha A, Moradas-Ferreira P. (2002) Hydrogen peroxide-induced carbonylation of key metabolic enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*: the involvement of the oxidative stress response regulators Yap1 and Skn7. *Free Radic Biol Med*. 33:1507-1515.

- Costa TG, Younger R, Poe C, Farmer PJ. (2012) Studies on synthetic and natural melanin and its affinity for Fe(III) ion. *Bioinorg Chem Appl.* 2012:712840.
- Culotta VC, Joh HD, Lin SJ, Slekar KH, Strain J. (1995) A physiological role for *Saccharomyces cerevisiae* copper/zinc superoxide dismutase in copper buffering. *J Biol Chem.* 270:29991-29997.
- Dahiya N, Tewari R, Hoondal GS. (2006) Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review. *Appl Microbiol Biotechnol.* 71:773-782.
- Dancis A. (1998) Genetic analysis of iron uptake in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Pediatr.* 132:S24-S29.
- Davidson JF, Whyte B, Bissinger PH, Schiestl RH. (1996) Oxidative stress is involved in heat-induced cell death in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 93:5116-5121.
- Davies MJ. (1989) Detection of peroxy and alkoxy radicals produced by reaction of hydroperoxides with rat liver microsomal fractions. *Biochem J.* 257:603-606.
- de Cássia R, Goncalves R, Pombeiro-Sponchiado SR. (2005) Antioxidant activity of the melanin pigment extracted from *Aspergillus nidulans*. *Biol Pharm Bull.* 28:1129-1131.
- de Groot PW, Brandt BW, Horiuchi H, Ram AF, de Koster CG, Klis FM. (2009) Comprehensive genomic analysis of cell wall genes in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Biol.* 46:S72-S81.
- de Jesús-Berrios M, Liu L, Nussbaum JC, Cox GM, Stamler JS, Heitman J. (2003) Enzymes that counteract nitrosative stress promote fungal virulence. *Curr Biol.* 13:1963-1968.
- de Marco JL, Felix CR. (2002) Characterization of a protease produced by a *Trichoderma harzianum* isolate which controls cocoa plant witches' broom disease. *BMC Biochem.* 3:3.
- de Vries RP, Riley R, Ad Wiebenga A, Aguilar-Osorio G, Amillis S, Akemi Uchima C, Anderluh G, Asadollahi Askin M, Barry K, Battaglia E, Bayram Ö, Benocci T, Braus-Stromeier SA, Caldana C, Cánovas D, Cerqueira G, Chen F, Chen W, Choi C, Clum A, Corrêa dos Santos RA, de Lima Damásio AR, Diallinas G, Emri T, Fekete E, Flipphi M, Freyberg S, Gallo A, Gournas C, Habgood R, Haimaut M, Harispe L, Henriessat B, Hildén K S, Hope R, Hossain A, Karabika E, Karaffa L, Karányi Z, Kraševac N, Kuo A, Kusch H, LaButti K, Lagendijk EL, Lapidus A, Lévassieur A, Lindquist E, Lipzen A, Logrieco A, MacCabe A, Mäkelä MR, Malavazi I, Melin P, Meyer V, Mielnichuk N, Miskei M, Molnár ÁP, Mulé G, Ngan CY, Orejas M, Orosz E, Ouedraogo JP, Overkamp KM, Park HS, Perrone G, Piumi F, Punt P, Ram A FJ, Ramón A, Rauscher S, Record E, Riaño-Pachón DM, Robert V, Röhrig J, Ruller R, Salamov A, Salih N, Samson R A, Sándor E, Sanguinetti M, Schütze T, Sepčić K, Shelest E, Sherlock G, Sophianopoulou V, Squina FM, Sun H, Susca A, Todd RB, Tsang A, Unkles SE, van de Wiele N, van Rossen-Uffink D, Velasco de Castro Oliveira J, Vesth TC, Visser J, Yu JH, Zhou M, Andersen MR, Archer D, Baker S, Benoit I, Brakhage AA, Braus GH, Fischer R, Frisvad JC, Goldman GH, Houbraeken J, Oakley B, Pócsi I, Scazzocchio C, Seiboth B, vanKuyk PA, Wortman JR, Dyer PS and Grigoriev IV. (2017) Comparative genomics reveals high biological diversity and specific adaptation in the industrially and medically important fungal genus *Aspergillus*. *Genome Biol.* 18:28.
- Debiane D, Garçon G, Verdin A, Fontaine J, Durand R, Shirali P, Grandmougin-Ferjani A, Lounès-Hadj Sahraoui A. (2009) Mycorrhization alleviates benzo[a]pyrene-induced oxidative stress in an *in vitro* chicory root model. *Phytochemistry.* 70:1421-1427.
- Desai PR, Thakur A, Ganguli D, Paul S, Morschhäuser J, Bachhawat AK. (2011) Glutathione utilization by *Candida albicans* requires a functional glutathione degradation (DUG) pathway and OPT7, an unusual member of the oligopeptide transporter family. *J Biol Chem.* 286:41183-41194.
- Dickinson BC, Chang CJ. (2011) Chemistry and biology of reactive oxygen species in signaling or stress responses. *Nat Chem Biol.* 7:504-511.
- DiDone L, Oga D, Krysan DJ. (2011) A novel assay of biofilm antifungal activity reveals that amphotericin B and caspofungin lyse *Candida albicans* cells in biofilms. *Yeast.* 28:561-568.
- Dixon DM, Szaniszló PJ, Polak A. (1991) Dihydroxynaphthalene (DHN) melanin and its relationship with virulence in the early stages of phaeohyphomycosis. In: Cole GT, Hoch HC (edd.). *The fungal spore and disease initiation in plants and animals*. Plenum Press, New York, pp.: 297-318.
- Dlouhy AC, Outten CE. (2013) The iron metallome in eukaryotic organisms. *Met Ions Life Sci.* 12:241-278.
- Douglas CM. (2006) Understanding the microbiology of the *Aspergillus* cell wall and the efficacy of caspofungin. *Med Mycol.* 44:S95-S99.

- Döll K, Chatterjee S, Scheu S, Karlovsky P, Rohlf M. (2013) Fungal metabolic plasticity and sexual development mediate induced resistance to arthropod fungivory. *Proc Biol Sci.* 280:20131219.
- Dubey MK, Zehra A, Aamir M, Meena M, Ahirwal L, Singh S, Shukla S, Upadhyay RS, Bueno-Mari R, Bajpai VK. (2017) Improvement strategies, cost effective production, and potential applications of fungal glucose oxidase (GOD): current updates. *Front Microbiol.* 8:1032.
- Dumbrava VA, Pall ML. (1987) Control of nucleotide and erythroascorbic acid pools by cyclic AMP in *Neurospora crassa*. *Biochim Biophys Acta.* 926:331-338.
- Dyer PS, Ingram DS, Johnstone K. (1992) The control of sexual morphogenesis in the Ascomycotina. *Biol Rev.* 67:421-458.
- Dyer PS, O’Gorman CM. (2012). Sexual development and cryptic sexuality in fungi: insights from *Aspergillus* species. *FEMS Microbiol Rev.* 36:165-192.
- Eades CJ, Hintz WE. (2000) Characterization of the class I alpha-mannosidase gene family in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Gene.* 255:25-34.
- Eigentler A, Pócsi I, Marx F. (2011) The anisin1 gene encodes a defensin-like protein and supports the fitness of *Aspergillus nidulans*. *Arch Microbiol.* 194:427-437.
- Eisenman HC, Casadevall A. (2012) Synthesis and assembly of fungal melanin. *Appl Microbiol Biotechnol.* 93:931-940.
- El Sayed AS, Fujimoto S, Yamada C, Suzuki H. (2010) Enzymatic synthesis of γ -glutamylglutamine, a stable glutamine analogue, by γ -glutamyltranspeptidase from *Escherichia coli* K-12. *Biotechnol Lett.* 32:1877-1881.
- Elad Y. (2000). Biological control of foliar pathogens by means of *Trichoderma harzianum* and potential modes of action. *Crop Prot.* 19:709-714.
- El-Katatny MH, Gudelj M, Robra KH, Elnaghy MA, Gübitz GM. (2001) Characterization of a chitinase and an endo-beta-1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum* Rifai T24 involved in control of the phytopathogen *Sclerotium rolfsii*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 56:137-143.
- Emri T, Bartók G, Szentirmai A. (1994) Regulation of specific activity of glucose-6-phosphate-dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase in *Penicillium chrysogenum*. *FEMS Microbiol Lett.* 117:67-70.
- Emri T, Pócsi I, Szentirmai A. (1997a) Glutathione metabolism and protection against oxidative stress caused by peroxides in *Penicillium chrysogenum*. *Free Radic Biol Med* 23:809-814.
- Emri T, Pócsi I, Szentirmai A. (1997b) Phenoxyacetic acid induces glutathione-dependent detoxification and depletes the glutathione pool in *Penicillium chrysogenum*. *J Basic Microbiol.* 37:181-186.
- Emri T, Pócsi I, Szentirmai A. (1999) Analysis of the oxidative stress response of *Penicillium chrysogenum* to menadione. *Free Rad Res.* 30:125-132.
- Emri T, Leiter É, Farkas E, Pócsi I. (2001) Penicillin productivity and glutathione-dependent detoxification of phenylacetic and phenoxyacetic acids in *Penicillium chrysogenum*. *J Basic Microbiol.* 41:67-73.
- Emri T, Molnár Zs, Pusztahelyi T, Pócsi I. (2004a) Physiological and morphological changes in autolysing *Aspergillus nidulans* cultures. *Folia Microbiol* 49:277-284.
- Emri T, Molnár Zs, Pusztahelyi T, Rosén S, Pócsi I. (2004b) Effect of vitamin E on the autolysis and sporulation of *Aspergillus nidulans*. *Appl Biochem Biotechnol.* 118:337-348.
- Emri T, Molnár Zs, Pusztahelyi T, Varcza Z, Pócsi I. (2005a) The FluG-BrlA pathway contributes to the initialisation of autolysis in submerged *Aspergillus nidulans* cultures. *Mycol Res.* 109:757-763.
- Emri T, Molnár Zs, Pócsi I. (2005b) The appearances of autolytic and apoptotic markers are concomitant but differently regulated in carbon-starving *Aspergillus nidulans* cultures. *FEMS Microbiol Lett.* 251:297-303.
- Emri T, Molnár Zs, Veres T, Pusztahelyi T, Dudás G, Pócsi I. (2006) Glucose-mediated repression of autolysis and conidiogenesis in *Emmericella nidulans*. *Mycol Res.* 110:1172-1178.
- Emri T, Molnár Zs, Szilágyi M, Pócsi I. (2008) Regulation of autolysis in *Aspergillus nidulans*. *Appl Biochem Biotechnol.* 151:211-220.

- Emri T, Szilágyi M, László K, Hamvas M, Pócsi I. (2009) PepJ is a new extracellular proteinase of *Aspergillus nidulans*. *Folia Microbiol.* 54:105-109.
- Emri T, Majoros L, Tóth V, Pócsi I. (2013) Echinocandins: production and applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 97:3267-3284.
- 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.
- Emri T, Zalka A, Pócsi I. (2017) Detection of transcriptionally active mycotoxin gene clusters: DNA microarray. In: Moretti A, Susca A (edd.). *Mycotoxigenic Fungi: Methods and Protocols*. Springer, New York, pp.:345-365.
- Emri T, Vékony V, Gila B, Nagy F, Forgács K, Pócsi I. (2018a) Autolytic hydrolases affect sexual and asexual development of *Aspergillus nidulans*. *Folia Microbiol.* 63:619-626.
- Emri T, Antal K, Riley R, Karányi Zs, Miskei M, Orosz E, Baker SE, Wiebenga A, de Vries RP, Pócsi I (2018b) Duplications and losses of genes encoding known elements of the stress defense system of the *Aspergilli* contribute to the evolution of these filamentous fungi but do not directly influence their environmental stress tolerance. *Stud Mycol.* e-pub(doi: doi.org/10.1016/j.simyco.2018.10.003).
- Enjalbert B, Smith DA, Cornell MJ, Alam I, Nicholls S, Brown AJ, Quinn J. (2006) Role of the Hog1 stress-activated protein kinase in the global transcriptional response to stress in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Mol Biol Cell.* 17:1018-1032.
- Eshaghi M, Lee JH, Zhu L, Poon SY, Li J, Cho KH, Chu Z, Karuturi RK, Liu J. (2010) Genomic binding profiling of the fission yeast stress-activated MAPK Sty1 and the bZIP transcriptional activator Atf1 in response to H₂O₂. *PloS One.* 5:e11620.
- Fallon JP, Reeves EP, Kavanagh K. (2011) The *Aspergillus fumigatus* toxin fumagillin suppresses the immune response of *Galleria mellonella* larvae by inhibiting the action of haemocytes. *Microbiology.* 157:1481-1488.
- Fanelli C, Ricelli A, Reverberi M, Fabbri AA. (2004) Aflatoxins and ochratoxins in cereal grains: an open challenge. *Recent Res Devel Crop Sci.* 1:295-317.
- Farr SB, Kogoma T. (1991) Oxidative stress responses in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Microbiol Rev.* 55:561-585.
- Feng Y, He D, Yao Z, Klionsky DJ. (2014) The machinery of macroautophagy. *Cell Res.* 24:24-41.
- Fernandes C, Prados-Rosales R, Silva BM, Nakouzi-Naranjo A, Zuzarte M, Chatterjee S, Stark RE, Casadevall A, Gonçalves T. (2015) Activation of melanin synthesis in *Alternaria infectoria* by antifungal drugs. *Antimicrob Agents Chemother.* 60:1646-1655.
- Fiser B, Jójárt B, Csizmadia IG, Viskolcz B. (2013) Glutathione--hydroxyl radical interaction: a theoretical study on radical recognition process. *PLoS One.* 8:e73652.
- Fitzgibbon GJ, Morozov IY, Jones MG, Caddick MX. (2005) Genetic analysis of the TOR pathway in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot Cell.* 4:1595-1598.
- Fitzpatrick DA. (2012) Horizontal gene transfer in fungi. *FEMS Microbiol Lett.* 329:1-8.
- Fogarty RV, Tobin JM. (1996) Fungal melanins and their interactions with metals. *Enzyme Microb Technol.* 19:311-317.
- Fontaine T, Hartland RP, Beauvais A, Diaquind M, Latge JP. (1997) Purification and characterization of an endo-1,3- β -glucanase from *Aspergillus fumigatus*. *Eur J Biochem.* 243:315-321.
- Fortwendel JR, Juvvadi PR, Perfect BZ, Rogg LE, Perfect JR, Steinbach WJ. (2010) Transcriptional regulation of chitin synthases by calcineurin controls paradoxical growth of *Aspergillus fumigatus* in response to caspofungin. *Antimicrob Agents Chemother.* 54:1555-1563.
- Fountain JC, Bajaj P, Nayak SN, Yang L, Pandey MK, Kumar V, Jayale AS, Chitikineni A, Lee RD, Kemerait RC, Varshney RK, Guo B. (2016a) Responses of *Aspergillus flavus* to oxidative stress are related to fungal development regulator, antioxidant enzyme, and secondary metabolite biosynthetic gene expression. *Front Microbiol.* 7:2048.

- Fountain JC, Bajaj P, Pandey M, Nayak SN, Yang L, Kumar V, Jayale AS, Chitikineni A, Zhuang W, Scully BT, Lee RD, Kemerait RC, Varshney RK, Guo B. (2016b) Oxidative stress and carbon metabolism influence *Aspergillus flavus* transcriptome composition and secondary metabolite production. *Sci Rep*. 6:38747.
- Fraczek MG, Bromley M, Buied A, Moore CB, Rajendran R, Rautemaa R, Ramage G, Denning DW, Bowyer P. (2013) The *cdlB* efflux transporter is associated with non-cyp51a-mediated itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *J Antimicrob Chemother*. 68:1486-1496.
- Fréalle E, Aliouat-Denis CM, Delhaes L, Hot D, Dei-Cas E. (2013) Transcriptomic insights into the oxidative response of stress-exposed *Aspergillus fumigatus*. *Curr Pharm Des*. 19:3713-3737.
- Galluzzi L, Baehrecke EH, Ballabio A, Boya P, Bravo-San Pedro JM, Cecconi F, Choi AM, Chu CT, Codogno P, Colombo MI, Cuervo AM, Debnath J, Deretic V, Dikic I, Eskelinen EL, Fimia GM, Fulda S, Gewirtz DA, Green DR, Hansen M, Harper JW, Jäättelä M, Johansen T, Juhasz G, Kimmelman AC, Kraft C, Ktistakis NT, Kumar S, Levine B, Lopez-Otin C, Madeo F, Martens S, Martinez J, Melendez A, Mizushima N, Münz C, Murphy LO, Penninger JM, Piacentini M, Reggiori F, Rubinsztein DC, Ryan KM, Santambrogio L, Scorrano L, Simon AK, Simon HU, Simonsen A, Tavernarakis N, Tooze SA, Yoshimori T, Yuan J, Yue Z, Zhong Q, Kroemer G. (2017) Molecular definitions of autophagy and related processes. *EMBO J*. 36:1811-1836.
- Ganguli D, Kumar C, Bachhawat AK. (2006) The alternative pathway of glutathione degradation is mediated by a novel protein complex involving three new genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 175:1137-1151.
- Ganz T. (2009) Iron in innate immunity: starve the invaders. *Curr Opin Immunol*. 21:63-67.
- Garcia-Neto W, Cabrera-Orefice A, Uribe-Carvajal S, Kowaltowski AJ, Alberto Luévano-Martínez L. (2017) High osmolarity environments activate the mitochondrial alternative oxidase in *Debaryomyces hansenii*. *PLoS One*. 12:e0169621.
- Gasch AP. (2003) The environmental stress response: a common yeast response to diverse environmental stresses. In: Hohmann S, Mager WH (edd.). *Yeast stress responses*. Topics in Current Genetics. Springer, Berlin, pp.: 11-70.
- Gasch AP, Spellman PT, Kao CM, Carmel-Harel O, Eisen MB, Storz G, Botstein D, Brown PO. (2000) Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol Biol Cell*. 11:4241-4257.
- Giles SS, Perfect JR, Cox GM. (2005) Cytochrome c peroxidase contributes to the antioxidant defense of *Cryptococcus neoformans*. *Fungal Genet Biol*. 42:20-29.
- Godon C, Lagniel G, Lee J, Buhler JM, Kieffer S, Perrot M, Boucherie H, Toledano MB, Labarre J. (1998) The H₂O₂ stimulon in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*. 273:22480-22489.
- Gómez BL, Nosanchuk JD. (2003) Melanin and fungi. *Curr Opin Infect Dis*. 16:91-96.
- Gonçalves RC, Lisboa HC, Pombeiro-Sponchiado SR. (2012) Characterization of melanin pigment produced by *Aspergillus nidulans*. *World J Microbiol Biotechnol*. 28:1467-1474.
- Gordon-Thomson C, Kumari A, Tomkins L, Holford P. (2009) Chitotriosidase and gene therapy for fungal infections. *Cell Mol Life Sci*. 66:1116-1125.
- Grahl N, Puttikamonkul S, Macdonald JM, Gamcsik MP, Ngo LY, Hohl TM, Cramer RA. (2011) *In vivo* hypoxia and a fungal alcohol dehydrogenase influence the pathogenesis of invasive pulmonary aspergillosis. *PLoS Pathog*. 7:e1002145.
- Grahl N, Shepardson KM, Chung D, Cramer RA. (2012) Hypoxia and fungal pathogenesis: to air or not to air? *Eukaryot Cell*. 11:560-570.
- Gresham D, Desai MM, Tucker CM, Jenq HT, Pai DA, Ward A, DeSevo CG, Botstein D, Dunham MJ. (2008) The repertoire and dynamics of evolutionary adaptations to controlled nutrient-limited environments in yeast. *PLoS Genet*. 4:e1000303.
- Gresnigt MS, Bozza S, Becker KL, Joosten LA, Abdollahi-Roodsaz S, van der Berg WB, Dinarello CA, Netea MG, Fontaine T, De Luca A, Moretti S, Romani L, Latge JP, van de Veerdonk FL. (2014) A polysaccharide virulence factor from *Aspergillus fumigatus* elicits anti-inflammatory effects through induction of Interleukin-1 receptor antagonist. *PLoS Pathog*. 10:e1003936.
- Gugnani HC. (2003) Ecology and taxonomy of pathogenic aspergilli. *Front Biosci*. 8:346-357.

- Guo M, Guo W, Chen Y, Dong S, Zhang X, Zhang H, Song W, Wang W, Wang Q, Lv R, Zhang Z, Wang Y, Zheng X. (2010) The basic leucine zipper transcription factor Moatf1 mediates oxidative stress responses and is necessary for full virulence of the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Mol Plant-Microbe Interact.* 23:1053-1068.
- Göldener U, Münsterkötter M, Kastenmüller G, Strack N, van Helden J, Lemer C, Richelles J, Wodak SJ, García-Martínez J, Pérez-Ortín JE, Michael H, Kaps A, Talla E, Dujon B, André B, Souciet JL, De Montigny J, Bon E, Gaillardin C, Mewes HW. (2005) CYGD: the Comprehensive Yeast Genome Database. *Nucl Acids Res.* 33:D364-D368.
- Haas H, Eisendle M, Turgeon BG. (2008) Siderophores in fungal physiology and virulence. *Annu Rev Phytopathol.* 46:149-187.
- Haas H. (2012) Iron - A key nexus in the virulence of *Aspergillus fumigatus*. *Front Microbiol.* 3:28.
- Hagiwara D, Asano Y, Marui J, Furukawa K, Kanamaru K, Kato M, Abe K, Kobayashi T, Yamashino T, Mizuno T. (2007) The SskA and SrrA response regulators are implicated in oxidative stress responses of hyphae and asexual spores in the phosphorelay signaling network of *Aspergillus nidulans*. *Biosci Biotechnol Biochem.* 71:1003-1014.
- 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.
- Hagiwara D, Asano Y, Marui J, Yoshimi A, Mizuno T, Abe K. (2009) Transcriptional profiling for *Aspergillus nidulans* HogA MAPK signaling pathway in response to fludioxonil and osmotic stress. *Fungal Genet Biol.* 46:868-878.
- Hagiwara D, Mizuno T, Abe K. (2011) Characterization of the conserved phosphorylation site in the *Aspergillus nidulans* response regulator SrrA. *Curr Genet.* 57:103-114.
- Hagiwara D, Suzuki S, Kamei K, Gono T, Kawamoto S. (2014) The role of AtfA and HOG MAPK pathway in stress tolerance in conidia of *Aspergillus fumigatus*. *Fungal Genet Biol.* 73:138-149.
- Hagiwara D, Sakamoto K, Abe K, Gomi K. (2016a) Signaling pathways for stress responses and adaptation in *Aspergillus* species: stress biology in the post-genomic era. *Biosci Biotechnol Biochem.* 80:1667-1680.
- Hagiwara D, Takahashi H, Kusuya Y, Kawamoto S, Kamei K, Gono T. (2016b) Comparative transcriptome analysis revealing dormant conidia and germination associated genes in *Aspergillus* species: an essential role for AtfA in conidial dormancy. *BMC Genomics.* 17:358.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. (2007) *Free Radicals in Biology and Medicine*, 4th edn. Oxford University Press, Oxford.
- Hallsworth JE. (2018) Stress-free microbes lack vitality. *Fungal Biol.* 122:379-385.
- Hamid R, Khan MA, Ahmad M, Ahmad MM. (2013) Chitinases: An update. *J Pharm Bioallied Sci.* 5:21-29.
- Han K, Lee D, Kim J, Kim M, Kim W, Park Y, Kim H, Han D. (2003). Environmental factors affecting development of *Aspergillus nidulans*. *J Microbiol.* 41:34-40.
- Hara T, Yokoo Y, Furukawa T. (1992) Potential of γ -L-glutamyl-L-cystine and bis- γ -L-glutamyl-L-cystine as a cystine-containing peptide for parental nutrition. In: Takai K (ed.). *Frontiers and new horizons in amino acid research*. Elsevier, Amsterdam, pp.: 607-611.
- Hartmann T, Sasse C, Schedler A, Hasenberg M, Gunzer M, Krappmann S. (2011) Shaping the fungal adaptome--stress responses of *Aspergillus fumigatus*. *Int J Med Microbiol.* 301:408-416.
- Haro R, Garciadeblas B, Rodríguez-Navarro A (1991) A novel P-type ATPase from yeast involved in sodium transport. *FEBS Lett.* 291:189-191.
- Hayashi S, Yoshioka M, Matsui T, Kojima K, Kato M, Kanamaru K, Kobayashi T. (2014) Control of reactive oxygen species (ROS) production through histidine kinases in *Aspergillus nidulans* under different growth conditions. *FEBS Open Biol.* 4:90-95.
- He XJ, Mulford KE, Fassler JS. (2009) Oxidative stress function of the *Saccharomyces cerevisiae* Skn7 receiver domain. *Eukaryot Cell.* 8:768-778.

- Hegedűs N, Leiter É, Kovács B, Tomori V, Kwon NJ, Emri T, Marx F, Batta G, Csernoch L, Haas H, Yu JH, Pócsi I. (2011) The small molecular mass antifungal protein of *Penicillium chrysogenum* - a mechanism of action oriented review. *J Basic Microbiol.* 51:561-571.
- Heisterkamp N, Groffen J, Warburton D, Sneddon TP. (2008) The human gamma-glutamyltransferase gene family. *Hum Genet.* 123:321-332.
- Heller J, Tudzynski P. (2011) Reactive oxygen species in phytopathogenic fungi: signaling, development, and disease. *Annu Rev Phytopathol.* 49:369-390.
- Henriet SS, Hermans PW, Verweij PE, Simonetti E, Holland SM, Sugui JA, Kwon-Chung KJ, Warris A. (2011) Human leukocytes kill *Aspergillus nidulans* by reactive oxygen species-independent mechanisms. *Infect Immun.* 79:767-773.
- Herrero E, Ros J, Bellí G, Cabisco E. (2008) Redox control and oxidative stress in yeast cells. *Biochim Biophys Acta.* 1780:1217-1235.
- Hillmann F, Shekhova E, Kniemeyer O. (2015) Insights into the cellular responses to hypoxia in filamentous fungi. *Curr Genet.* 61:441-455.
- Hillmann F, Bagramyan K, Straßburger M, Heinekamp T, Hong TB, Bzymek KP, Williams JC, Brakhage AA, Kalkum M. (2016) The crystal structure of peroxiredoxin Asp f3 provides mechanistic insight into oxidative stress resistance and virulence of *Aspergillus fumigatus*. *Sci Rep.* 6:33396.
- Ho A, Lonardo DP, Bodelier PL. (2017) Revisiting life strategy concepts in environmental microbial ecology. *FEMS Microbiol Ecol.* 93:fix006.
- Hohmann S, Mager WH. (2003a) Introduction. In: Hohmann S, Mager WH (edd.). *Yeast stress responses. Topics in Current Genetics.* Springer, Berlin, pp.: 1-9.
- Hohmann S, Mager WH (edd.) (2003b) *Yeast stress responses. Topics in Current Genetics.* Springer, Berlin.
- Hoffmann C, Dollive S, Grunberg S, Chen J, Li H, Wu GD, Lewis JD, Bushman FD. (2013) Archaea and fungi of the human gut microbiome: correlations with diet and bacterial residents. *PLoS One.* 8:e66019.
- Hong TY, Meng M. (2003) Biochemical characterization and antifungal activity of an endo-1,3-beta-glucanase of *Paenibacillus sp.* isolated from garden soil. *Appl Microbiol Biotechnol.* 61:472-478.
- Hong SY, Roze LV, Linz JE. (2013a) Oxidative stress-related transcription factors in the regulation of secondary metabolism. *Toxins (Basel).* 5:683-702.
- Hong SY, Roze LV, Wee J, Linz JE. (2013b) Evidence that a transcription factor regulatory network coordinates oxidative stress response and secondary metabolism in aspergilli. *Microbiologyopen.* 2:144-160.
- Hortschansky P, Eisendle M, Al-Abdallah Q, Schmidt AD, Bergmann S, Thön M, Kniemeyer O, Abt B, Seeber B, Werner ER, Kato M, Brakhage AA, Haas H. (2007) Interaction of HapX with the CCAAT-binding complex--a novel mechanism of gene regulation by iron. *EMBO J.* 26:3157-3168.
- Hospenthal DR, Kwon-Chung KJ, Bennett JE. (1998) Concentrations of airborne *Aspergillus* compared to the incidence of invasive aspergillosis: lack of correlation. *Med Mycol.* 36:165-168.
- Howard SJ. (2014) Multi-resistant aspergillosis due to cryptic species. *Mycopathologia.* 178:435-439.
- Hördt W, Römheld V, Winkemann G. (2000) Fusarinines and dimerum acid, mono- and dihydroxamate siderophores from *Penicillium chrysogenum*, improve iron utilization by strategy I and strategy II plants. *BioMetals.* 13:37-46.
- Hu G, Hacham M, Waterman SR, Panepinto J, Shin S, Liu X, Gibbons J, Valyi-Nagy T, Obara K, Jaffe HA, Ohsumi Y, Williamson PR. (2008) PI3K signaling of autophagy is required for starvation tolerance and virulence of *Cryptococcus neoformans*. *J Clin Invest.* 118:1186-1197.
- Huh WK, Lee BH, Kim ST, Kim YR, Rhie GE, Baek YW, Hwang CS, Lee JS, Kang SO. (1998) D-Erythroascorbic acid is an important antioxidant molecule in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol.* 30:895-903.
- Hüttel W. (2017) Structural diversity in echinocandin biosynthesis: the impact of oxidation steps and approaches toward an evolutionary explanation. *Z Naturforsch C.* 72:1-20.

- Ibrahim-Granet O, Dubourdeau M, Latgé JP, Ave P, Huerre M, Brakhage AA, Brock M. (2008) Methylcitrate synthase from *Aspergillus fumigatus* is essential for manifestation of invasive aspergillosis. *Cell Microbiol.* 10:134-148.
- Imhof A, Balajee SA, Marr KA. (2003) New methods to assess susceptibilities of *Aspergillus* isolates to caspofungin. *J Clin Microbiol.* 41:5683-5688.
- Imlay JA. (2006) Iron-sulphur clusters and the problem with oxygen. *Mol Microbiol.* 59:1073-1082.
- Imlay JA. (2013) The molecular mechanisms and physiological consequences of oxidative stress: lessons from a model bacterium. *Nat Rev Microbiol.* 11:443-454.
- Inglis DO, Binkley J, Skrzypek MS, Arnaud MB, Cerqueira GC, Shah P, Wymore F, Wortman JR, Sherlock G. (2013) Comprehensive annotation of secondary metabolite biosynthetic genes and gene clusters of *Aspergillus nidulans*, *A. fumigatus*, *A. niger* and *A. oryzae*. *BMC Microbiol.* 13:91.
- Iyengar V, Woittiez J. (1988) Trace elements in human clinical specimens: evaluation of literature data to identify reference values. *Clin Chem.* 34:474-481.
- 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.
- Jakubowski W, Biliński T, Bartosz G. (2000) Oxidative stress during aging of stationary cultures of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Free Radic Biol Med.* 28:659-664.
- Jamieson DJ, Rivers SL, Stephen DW. (1994) Analysis of *Saccharomyces cerevisiae* proteins induced by peroxide and superoxide stress. *Microbiology.* 140:3277-3283.
- Jensen HL. (1931) The fungus flora of the soil. *Soil Sci.* 31:123-158.
- Johnstone IL, McCabe PC, Greaves P, Gurr SJ, Cole GE, Brow MA, Unkles SE, Clutterbuck AJ, Kinghorn JR, Innis MA. (1990) Isolation and characterisation of the *crnA-niiA-niaD* gene cluster for nitrate assimilation in *Aspergillus nidulans*. *Gene.* 90:181-192.
- Jordan R, Patel S, Hu H, Lyons-Weiler J. (2008) Efficiency analysis of competing tests for finding differentially expressed genes in lung adenocarcinoma. *Cancer Inform.* 6:389-421.
- Jørgensen TR, Nitsche BM, Lamers GE, Arentshorst M, van den Hondel CA, Ram AF. (2010) Transcriptomic insights into the physiology of *Aspergillus niger* approaching a specific growth rate of zero. *Appl Environ Microbiol.* 76:5344-5355.
- Jozefczak M, Remans T, Vangronsveld J, Cuypers A. (2012) Glutathione is a key player in metal-induced oxidative stress defenses. *Int J Mol Sci.* 13:3145-3175.
- Kamada Y, Funakoshi T, Shintani T, Nagano K, Ohsumi M, Ohsumi Y. (2000) Tor-mediated induction of autophagy via an Apg1 protein kinase complex. *J Cell Biol.* 150:1507-1513.
- Kang JY, Chun J, Jun SC, Han DM, Chae KS, Jahng KY. (2013) The MpkB MAP kinase plays a role in autolysis and conidiation of *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Biol.* 61:42-49.
- Karányi Zs, Holb I, Hornok L, Pócsi I, Miskei M. (2013) FSRD: fungal stress response database. Database (Oxford). 2013:bat037.
- Karasuda S, Tanaka S, Kajihara H, Yamamoto Y, Koga D. (2003) Plant chitinase as a possible biocontrol agent for use instead of chemical fungicides. *Biosci Biotechnol Biochem.* 67:221-224.
- Katiyar SK, Alastruey-Izquierdo A, Healey KR, Johnson ME, Perlin DS, Edlind TD. (2012) Fks1 and Fks2 are functionally redundant but differentially regulated in *Candida glabrata*: implications for echinocandin resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 56:6304-6309.
- Katz ME, Flynn PK, vanKuyk PA, Cheetham BF. (1996) Mutations affecting extracellular protease production in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Mol Gen Genet.* 250:715-724.
- Katz ME, Bernardo SM, Cheetham BF. (2008) The interaction of induction, repression and starvation in the regulation of extracellular proteases in *Aspergillus nidulans*: evidence for a role for CreA in the response to carbon starvation. *Curr Genet.* 54:47-55.

- Katz ME, Braunberger K, Yi G, Cooper S, Nonhebel HM, Gondro C. (2013) A p53-like transcription factor similar to Ndt80 controls the response to nutrient stress in the filamentous fungus, *Aspergillus nidulans*. *F1000Res*. 2:72.
- Katz ME, Buckland R, Hunter CC, Todd RB. (2015) Distinct roles for the p53-like transcription factor XprG and autophagy genes in the response to starvation. *Fungal Genet Biol*. 83:10-18.
- Katz ME, Cooper S. (2015) Extreme diversity in the regulation of ndt80-like transcription factors in fungi. *G3 (Bethesda)*. 5:2783-2792.
- Katz ME, Braunberger KS, Kelly JM. (2016) Role of HxkC, a mitochondrial hexokinase-like protein, in fungal programmed cell death. *Fungal Genet Biol*. 97:36-45.
- Kauffman CA. (2017) Treatment and prevention of invasive aspergillosis. In: Sexton DJ, Thorner AR (edd.). *UpToDate*. <https://www.uptodate.com/contents/treatment-and-prevention-of-invasive-aspergillosis>.
- Kaur H, Ganguli D, Bachhawat AK. (2012) Glutathione degradation by the alternative pathway (DUG pathway) in *Saccharomyces cerevisiae* is initiated by (Dug2p-Dug3p)₂ complex, a novel glutamine amidotransferase (GATase) enzyme acting on glutathione. *J Biol Chem*. 287:8920-8931.
- Kawasaki L, Wysong D, Diamond R, Aguirre J. (1997) Two divergent catalase genes are differentially regulated during *Aspergillus nidulans* development and oxidative stress. *J Bacteriol*. 179:3284-3292.
- Kawasaki L, Sánchez O, Shiozaki K, Aguirre J. (2002) SakA MAP kinase is involved in stress signal transduction, sexual development and spore viability in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol*. 45:1153-1163.
- Kikuma T, Ohneda M, Arioka M, Kitamoto K. (2006) Functional analysis of the ATG8 homologue Aogat8 and role of autophagy in differentiation and germination in *Aspergillus oryzae*. *Eukaryot Cell*. 5:1328-1336.
- Kim S, Matsuo I, Ajisaka K, Nakajima H, Kitamoto K. (2002) Cloning and characterization of the *nagA* gene that encodes beta-N-acetylglucosaminidase from *Aspergillus nidulans* and its expression in *Aspergillus oryzae*. *Biosci Biotechnol Biochem*. 66:2168-2175.
- Kim Y, Islam N, Moss BJ, Nandakumar MP, Marten MR. (2011) Autophagy induced by rapamycin and carbon-starvation have distinct proteome profiles in *Aspergillus nidulans*. *Biotechnol Bioeng*. 108:2705-2715.
- Kimura K, Tran LS, Uchida I, Itoh Y. (2004) Characterization of *Bacillus subtilis* γ -glutamyltranspeptidase and its involvement in the degradation of capsule poly-gammaglutamate. *Microbiology*. 150:4115-4123.
- Klich M, Mendoza C, Mullaney E, Keller N, Bennett JW. (2001) A new sterigmatocystin producing *Emericella* variant from agricultural desert soils. *Syst Appl Microbiol*. 24:131-138.
- Kovács Zs, Szarka M, Kovács S, Boczonádi I, Emri T, Abe K, Pócsi I, Pusztahelyi T. (2013) Effect of cell wall integrity stress and RlmA transcription factor on asexual development and autolysis in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Biol*. 54:1-14.
- Kowalski CH, Beattie SR, Fuller KK, McGurk EA, Tang YW, Hohl TM, Obar JJ, Cramer RA Jr. (2016) Heterogeneity among isolates reveals that fitness in low oxygen correlates with *Aspergillus fumigatus* virulence. *MBio*. 7:e01515-16.
- Krijgsheld P, Altelaar AFM, Post H, Ringrose JH, Müller WH, Heck AJR, Wösten HAB. (2012) Spatially resolving the secretome within the mycelium of the cell factory *Aspergillus niger*. *J Proteome Res*. 11:2807-2818.
- Krohn NG, Brown NA, Colabardini AC, Reis T, Savoldi M, Dinamarco TM, Goldman MHS, Goldman GH (2014) The *Aspergillus nidulans* ATM kinase regulates mitochondrial function, glucose uptake and the carbon starvation response. *G3 (Bethesda)*. 4:49-62.
- Kroll K, Shekhova E, Mattern DJ, Thywissen A, Jacobsen ID, Strassburger M, Heinekamp T, Shelest E, Brakhage AA, Kniemeyer O. (2016) The hypoxia-induced dehydrogenase HorA is required for coenzyme Q10 biosynthesis, azole sensitivity and virulence of *Aspergillus fumigatus*. *Mol Microbiol*. 101:92-108.
- Kumar C, Sharma R, Bachhawat AK. (2003) Utilization of glutathione as an exogenous sulfur source is independent of gamma-glutamyl transpeptidase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for an alternative glutathione degradation pathway. *FEMS Microbiol Lett*. 219:187-194.

- Kumar A, Tikoo S, Maity S, Sengupta S, Sengupta S, Kaur A, Bachhawat AK. (2012) Mammalian proapoptotic factor ChaC1 and its homologues function as γ -glutamyl cyclotransferases acting specifically on glutathione. *EMBO Rep.* 13:1095-1101.
- Kuo MJ, Alexander M. (1967) Inhibition of the lysis of fungi by melanins. *J Bacteriol.* 94:624-629.
- Kurtz MB, Heath IB, Marrinan J, Dreikorn S, Onishi J, Douglas C. (1994a) Morphological effects of lipopeptides against *Aspergillus fumigatus* correlate with activity against (1,3)- β -D-glucan synthase. *Antimicrob Agents Chemother.* 38:1480-1489.
- Kurtz MB, Douglas C, Marrinan J, Nollstadt K, Onishi J, Dreikorn S, Milligan J, Mandala S, Thompson J, Balkovec JM, Bouffard FA, Dropinski JF, Hammond ML, Zambias RA, Abruzzo G, Bartizal K, McManus OB, Garcia ML. (1994b) Increased antifungal activity of L-733,560, a water-soluble, semisynthetic pneumocandin, is due to enhanced inhibition of cell wall synthesis. *Antimicrob Agents Chemother.* 38:2750-2757.
- Kurucz V, Kiss B, Szigeti ZsM, Nagy G, Orosz E, Hargitai Z, Harangi S, Wiebenga A, de Vries RP, Pócsi I, Emri T. (2018a) Physiological background of the remarkably high Cd²⁺ tolerance of the *Aspergillus fumigatus* Af293 strain. *J Basic Microbiol.* 58:957-967.
- Kurucz V, Krüger T, Antal K, Dietl AM, Haas H, Pócsi I, Kniemeyer O, Emri T. (2018b) Additional oxidative stress reroutes the global response of *Aspergillus fumigatus* to iron depletion. *BMC Genomics.* 19:357.
- Kusari S, Lamshöft M, Spiteller M. (2009) *Aspergillus fumigatus* Fresenius, an endophytic fungus from *Juniperus communis* L. Horstmann as a novel source of the anticancer pro-drug deoxypodophyllotoxin. *J Appl Microbiol.* 107:1019-1030.
- Kwon NJ, Shin KS, Yu JH. (2010) Characterization of the developmental regulator FlbE in *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Biol.* 47:981-993.
- Laemmli K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227:680-685.
- Lamarre C, Ibrahim-Granet O, Du C, Calderone R, Latgé JP. (2007) Characterization of the SKN7 ortholog of *Aspergillus fumigatus*. *Fungal Genet Biol.* 44:682-690.
- Lambou K, Lamarre C, Beau R, Dufour N, Latgé JP. (2010) Functional analysis of the superoxide dismutase family in *Aspergillus fumigatus*. *Mol Microbiol.* 75:910-923.
- Lamoth F. (2016) *Aspergillus fumigatus*-related species in clinical practice. *Front Microbiol.* 7:683.
- Lamoth F, Juvvadi PR, Steinbach WJ. (2016) Heat shock protein 90 (Hsp90): A novel antifungal target against *Aspergillus fumigatus*. *Crit Rev Microbiol.* 42:310-321.
- Langfelder K, Streibel M, Jahn B, Haase G. (2003) Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi. *Fungal Genet Biol.* 38:143-158.
- Lapp K, Vödisch M, Kroll K, Strassburger M, Kniemeyer O, Heinekamp T, Brakhage AA. (2014) Characterization of the *Aspergillus fumigatus* detoxification systems for reactive nitrogen intermediates and their impact on virulence. *Front Microbiol.* 5:469.
- 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.
- Larochelle M, Drouin S, Robert F, Turcotte B. (2006) Oxidative stress-activated zinc cluster protein Stb5 has dual activator/repressor functions required for pentose phosphate pathway regulation and NADPH production. *Mol Cell Biol.* 26:6690-6701.
- Laskaris P, Atrouni A, Calera JA, d'Enfert C, Munier-Lehmann H, Cavaillon JM, Latgé JP, Ibrahim-Granet O. (2016) Administration of zinc chelators improves survival of mice infected with *Aspergillus fumigatus* both in monotherapy and in combination with caspofungin. *Antimicrob Agents Chemother.* 60:5631-5639.
- Latgé JP. (2001) The pathobiology of *Aspergillus fumigatus*. *Trends Microbiol.* 9:382-389.
- Lazarova N, Krumova E, Stefanova T, Georgieva N, Angelova M. (2014) The oxidative stress response of the filamentous yeast *Trichosporon cutaneum* R57 to copper, cadmium and chromium exposure. *Biotechnol Biotechnol Equip.* 28:855-862.

- Leary NO, Pembroke A, Duggan PF. (1992) Improving accuracy of glucose oxidase procedure for glucose determinations on discrete analyzers. *Clin Chem.* 38:298-302.
- LeBlanc GA, Cochrane BJ. (1987) Identification of multiple glutathione S-transferases from *Daphnia magna*. *Comp Biochem Physiol B.* 88:39-45.
- Lee BN, Adams TH. (1996) *fluG* and *flbA* function interdependently to initiate conidiophore development in *Aspergillus nidulans* through brlA β activation. *EMBO J.* 15:299-309.
- Lessing F, Kniemeyer O, Wozniok I, Loeffler J, Kurzai O, Haertl A, Brakhage AA. (2007) The *Aspergillus fumigatus* transcriptional regulator AfYap1 represents the major regulator for defense against reactive oxygen intermediates but is dispensable for pathogenicity in an intranasal mouse infection model. *Eukaryot Cell.* 6:2290-2302.
- Lever M, Powell JC, Killip M, Small CW. (1973) A comparison of 4-hydroxybenzoic acid hydrazide (PAHBAH) with other reagents for the determination of glucose. *J Lab Clin Med.* 82:649-655.
- Levine B, Klionsky DJ. (2017) Autophagy wins the 2016 Nobel Prize in Physiology or Medicine: Breakthroughs in baker's yeast fuel advances in biomedical research. *Proc Natl Acad Sci USA.* 114:201-205.
- Lewis DF. (2002) Oxidative stress: the role of cytochromes P450 in oxygen activation. *J Chem Technol Biotechnol.* 77:1095-1100.
- Li S, Ault A, Malone CL, Raitt D, Dean S, Johnston LH, Deschenes RJ, Fassler JS. (1998) The yeast histidine protein kinase, Sln1p, mediates phosphotransfer to two response regulators, Ssk1p and Skn7p. *EMBO J.* 17:6952-6962.
- Li Q, Bai Z, O'Donnell A, Harvey LM, Hoskisson PA, McNeil B. (2011) Oxidative stress in fungal fermentation processes: the roles of alternative respiration. *Biotechnol Lett.* 33:457-467.
- Li M, Liang X, Rollins JA. (2012) *Sclerotinia sclerotiorum* γ -glutamyl transpeptidase (Ss-Ggt1) is required for regulating glutathione accumulation and development of sclerotia and compound appressoria. *Mol Plant-Microbe Interact.* 25:412-420.
- Liebmann B, Müller M, Braun A, Brakhage AA. (2004) The cyclic AMP-dependent protein kinase A network regulates development and virulence in *Aspergillus fumigatus*. *Infect Immun.* 72:5193-5203.
- Lim FY, Sanchez JF, Wang CC, Keller NP. (2012) Toward awakening cryptic secondary metabolite gene clusters in filamentous fungi. *Methods Enzymol.* 517:303-324.
- Lima Pde S, Casaletti L, Bailão AM, de Vasconcelos AT, Fernandes Gda R, Soares CM. (2014) Transcriptional and proteomic responses to carbon starvation in *Paracoccidioides*. *PLoS Negl Trop Dis.* 8:e2855.
- Lin HC, Chooi YH, Dhingra S, Xu W, Calvo AM, Tang Y. (2013) The fumagillin biosynthetic gene cluster in *Aspergillus fumigatus* encodes a cryptic terpene cyclase involved in the formation of β -trans-bergamotene. *J Am Chem Soc.* 135:4616-4619.
- Liu XD, Thiele DJ. (1996) Oxidative stress induced heat shock factor phosphorylation and HSF-dependent activation of yeast metallothionein gene transcription. *Genes Dev.* 10:592-603.
- Liu JY, Song YC, Zhang Z, Wang L, Guo ZJ, Zou WX, Tan RX. (2004) *Aspergillus fumigatus* CY018, an endophytic fungus in *Cynodon dactylon* as a versatile producer of new and bioactive metabolites. *J Biotechnol.* 114:279-287.
- Lo HC, Entwistle R, Guo CJ, Ahuja M, Szewczyk E, Hung JH, Chiang YM, Oakley BR, Wang CC. (2012) Two separate gene clusters encode the biosynthetic pathway for the meroterpenoids austinol and dehydroaustinol in *Aspergillus nidulans*. *J Am Chem Soc.* 134:4709-4720.
- Loiko V, Wagener J. (2017) The paradoxical effect of echinocandins in *Aspergillus fumigatus* relies on recovery of the β -1,3-glucan synthase Fks1. *Antimicrob Agents Chemother.* 61:e01690-16.
- Lushchak VI. (2015) Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stresses and their classifications. *Ukr Biochem J.* 87:11-18.
- Ma D, Li R. (2013) Current understanding of HOG-MAPK pathway in *Aspergillus fumigatus*. *Mycopathologia.* 175:13-23.

- Maligie MA, Selitrennikoff CP. (2005) *Cryptococcus neoformans* resistance to echinocandins: (1,3)beta-glucan synthase activity is sensitive to echinocandins. *Antimicrob Agents Chemother.* 49:2851-2856.
- Marsh PB, Millner PD, Kla JM. (1979) A guide to the recent literature on aspergillosis as caused by *Aspergillus fumigatus*, a fungus frequently found in self-heating organic matter. *Mycopathologia.* 69:67-81.
- Martín JF, Casqueiro J, Kosalková K, Marcos AT, Gutiérrez S. (1999) Penicillin and cephalosporin biosynthesis: mechanism of carbon catabolite regulation of penicillin production. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 75:21-31.
- Martin K, McDougall BM, McIlroy S, Jayus Chen J, Seviour RJ. (2007) Biochemistry and molecular biology of exocellular fungal β -(1,3)- and β -(1,6)-glucanases. *FEMS Microbiol Rev.* 31:168-192.
- Martín-Cuadrado AB, Dueñas E, Sipiczki M, Vázquez de Aldana CR, del Rey F. (2003) The endo- β -1,3-glucanase eng1p is required for dissolution of the primary septum during cell separation in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Sci.* 116:1689-1698.
- Martinelli SD. (1994) *Aspergillus*: 50 years on. In: Martinelli SD, Kinghorn JR (edd.). *Progress in industrial Microbiology*, Vol. 29. Elsevier, Amsterdam, pp.: 33-58.
- Matsushika A, Nagashima A, Goshima T, Hoshino T. (2013) Fermentation of xylose causes inefficient metabolic state due to carbon/energy starvation and reduced glycolytic flux in recombinant industrial *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One.* 8: e69005.
- Matsuyama A, Arai R, Yashiroda Y, Shirai A, Kamata A, Sekido S, Kobayashi Y, Hashimoto A, Hamamoto M, Hiraoka Y, Horinouchi S, Yoshida M. (2006) ORFeome cloning and global analysis of protein localization in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Nat Biotechnol.* 24:841-847.
- Matsuzawa T, Tanaka R, Horie Y, Hui Y, Abliz P, Yaguchi T. (2012) The correlation among molecular phylogenetics, morphological data, and growth temperature of the genus *Emericella*, and a new species. *Mycoscience.* 53:433-445.
- Mattenberger F, Sabater-Muñoz B, Hallsworth JE, Fares MA. (2016) Glycerol stress in *Saccharomyces cerevisiae*: Cellular responses and evolved adaptations. *Environ Microbiol.* 19:990-1007.
- McCluskey K. (2003) The Fungal Genetics Stock Center, from molds to molecules. *Adv Appl Microbiol.* 52:245-262.
- 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, Niernan WC, Bignell E. (2008) Sub-telomere directed gene expression during initiation of invasive aspergillosis. *PLoS Pathog.* 4:e1000154.
- McIntyre M, Berry DR, McNeil B. (1999) Response of *Penicillium chrysogenum* to oxygen starvation in glucose- and nitrogen-limited chemostat cultures. *Enzyme Microb Tech.* 25:447-454.
- Mendoza-Martínez AE, Lara-Rojas F, Sánchez O, Aguirre J. (2017) NapA mediates a redox regulation of the antioxidant response, carbon utilization and development in *Aspergillus nidulans*. *Front Microbiol.* 8:516.
- Mesa-Arango AC, Trevijano-Contador N, Román E, Sánchez-Fresneda R, Casas C, Herrero E, Argüelles JC, Pla J, Cuenca-Estrella M, Zaragoza O. (2014) The production of reactive oxygen species is a universal action mechanism of amphotericin B against pathogenic yeasts and contributes to the fungicidal effect of this drug. *Antimicrob Agents Chemother.* 58:6627-6638.
- Mishra BB, Tiwari VK. (2011) Natural products in drug discovery: Clinical evaluations and investigations. In: Tiwari VK, Mishra BB (edd.). *Opportunity, challenge and scope of natural products in medicinal chemistry.* Research Signpost, Kerala, pp.: 1-62.
- Miskei M, Karányi Zs, Pócsi I. (2009) Annotation of stress-response proteins in the aspergilli. *Fungal Genet Biol.* 46:S105-S120.
- Mitchell A, Romano GH, Groisman B, Yona A, Dekel E, Kupiec M, Dahan O, Pilpel Y. (2009) Adaptive prediction of environmental changes by microorganisms. *Nature.* 460:220-224.
- Miyazaki T, Kohno S. (2014) ER stress response mechanisms in the pathogenic yeast *Candida glabrata* and their roles in virulence. *Virulence.* 5:365-370.
- Molnár Zs, Mészáros E, Szilágyi Zs, Rosén S, Emri T, Pócsi I (2004) Influence of *fdaA*^{G203R} and *AflbA* mutations on the morphology and physiology of submerged *Aspergillus nidulans* cultures. *Appl Biochem Biotechnol.* 118:349-360.

- Molnár Zs, Emri T, Zavaczki E, Pusztahelyi T, Pócsi I. (2006) Effects of mutations in the GanB/RgsA G protein mediated signaling on the autolysis of *Aspergillus nidulans*. J Basic Microbiol. 46:495-503.
- Mondon P, De Champs C, Donadille A, Ambroise-Thomas P, Grillot R. (1996) Variation in virulence of *Aspergillus fumigatus* strains in a murine model of invasive pulmonary aspergillosis. J Med Microbiol. 45:186-191.
- 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.
- Montibus M, Pinson-Gadais L, Richard-Forget F, Barreau C, Ponts N. (2013) Coupling of transcriptional response to oxidative stress and secondary metabolism regulation in filamentous fungi. Crit Rev Microbiol. 41:295-308.
- Montibus M, Pinson-Gadais L, Richard-Forget F, Barreau C, Ponts N. (2015) Coupling of transcriptional response to oxidative stress and secondary metabolism regulation in filamentous fungi. Crit Rev Microbiol. 41:295-308.
- Moore MM. (2013) The crucial role of iron uptake in *Aspergillus fumigatus* virulence. Curr Opin Microbiol. 16:692-699.
- Moreno AB, del Pozo AM, Borja M, San Segudo B. (2003) Activity of the antifungal protein from *Aspergillus giganteus* against *Botrytis cinerea*. Phytopathology 93:1344-1353.
- Morano KA, Grant CM, Moye-Rowley WS. (2012) The response to heat shock and oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. Genetics. 190:1157-1195.
- Motoyama T, Yamaguchi I. (2003) Fungicides, melanin biosynthesis inhibitors. In: Plimmer JR, Ragsdale NN, Gammon D (edd.). Encyclopedia of agrochemicals, vol. 3. Wiley, <https://doi.org/10.1002/047126363X.agr102>.
- Mousavi SA, Robson GD. (2003) Entry into the stationary phase is associated with a rapid loss of viability and an apoptotic-like phenotype in the opportunistic pathogen *Aspergillus fumigatus*. Fungal Genet Biol. 39:221-229.
- Mousavi SA, Robson GD. (2004) Oxidative and amphotericin B-mediated cell death in the opportunistic pathogen *Aspergillus fumigatus* is associated with an apoptotic-like phenotype. Microbiology. 150:1937-1945.
- Mukherjee PK, Sheehan D, Puzniak L, Schlamm H, Ghannoum MA. (2011) Echinocandins: are they all the same? J Chemother. 23:319-325.
- Murakawa S, Sano S, Yamashita H, Takahashi T. (1977) Biosynthesis of D-erythroascorbic acid by *Candida*. Agric Biol Chem. 41:1799-1800.
- Mustonen V, Lässig M. (2010) Fitness flux and ubiquity of adaptive evolution. Proc Natl Acad Sci USA. 107:4248-4253.
- Nakagawa CW, Yamada K, Mutoh N. (2000) Role of Atf1 and Pap1 in the induction of the catalase gene of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. J Biochem. 127:233-238.
- Nakazawa T, Ishiuchi K, Praseuth A, Noguchi H, Hotta K, Watanabe K. (2012) Overexpressing transcriptional regulator in *Aspergillus oryzae* activates a silent biosynthetic pathway to produce a novel polyketide. Chembiochem. 13:855-861.
- Nairz M, Haschka D, Demetz E, Weiss G. (2014) Iron at the interface of immunity and infection. Frontiers in Pharmacology. 5:1-10.
- Nathues E, Joshi S, Tenberge KB, von den Driesch M, Oeser B, Bäumer N, Mihlan M, Tudzynski P. (2004) CPTF1, a CREB-like transcription factor, is involved in the oxidative stress response in the phytopathogen *Claviceps purpurea* and modulates ROS level in its host *Secale cereale*. Mol Plant Microbe Interact. 17:383-393.
- Ni M, Rierson S, Seo JA, Yu JH. (2005) The *pkaB* gene encoding the secondary protein kinase A catalytic subunit has a synthetic lethal interaction with *pkaA* and plays overlapping and opposite roles in *Aspergillus nidulans*. Eukaryot Cell. 4:1465-1476.
- Nielsen P, Sorensen J. (1997) Multi-target and medium-independent fungal antagonism by hydrolytic enzymes in *Paenibacillus polymyxa* and *Bacillus pumilus* strains from barley rhizosphere. FEMS Microbiol Ecol. 22:183-192.

- Nikolaou E, Agrafioti I, Stumpf M, Quinn J, Stansfield I, Brown AJ. (2009) Phylogenetic diversity of stress signalling pathways in fungi. *BMC Evol Biol.* 9:44.
- Nimmanee P, Woo PC, Vanittanakom P, Youngchim S, Vanittanakom N. (2014) Functional analysis of *atfA* gene to stress response in pathogenic thermal dimorphic fungus *Penicillium marneffei*. *PLoS One.* 9:e111200.
- Nitsche BM, Jørgensen TR, Akeroyd M, Meyer V, Ram AF. (2012) The carbon starvation response of *Aspergillus niger* during submerged cultivation: Insights from the transcriptome and secretome. *BMC Genomics.* 13:380.
- Nitsche BM, Burggraaf-Van Welzen AM, Lamers G, Meyer V, Ram AFJ. (2013). Autophagy promotes survival in aging submerged cultures of the filamentous fungus *Aspergillus niger*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 97:8205-8218.
- Norbeck J, Pålman AK, Akhtar N, Blomberg A, Adler L. (1996) Purification and characterization of two isoenzymes of DL-glycerol-3-phosphatase from *Saccharomyces cerevisiae*. Identification of the corresponding *GPP1* and *GPP2* genes and evidence for osmotic regulation of Gpp2p expression by the osmosensing mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *J Biol Chem.* 271:13875-13881.
- Nosanchuk JD, Casadevall A. (2006) Impact of melanin on microbial virulence and clinical resistance to antimicrobial compounds. *Antimicrob Agents Chemother.* 50:3519-3528.
- Novo E, Parola M. (2008) Redox mechanisms in hepatic chronic wound healing and fibrogenesis. *Fibrogenesis Tissue Repair.* 1:5.
- Novo M, Bigey F, Beyne E, Galeote V, Gavory F, Mallet S, Cambon B, Legras JL, Wincker P, Casaregola S, Dequin S. (2009) Eukaryote-to-eukaryote gene transfer events revealed by the genome sequence of the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae* EC1118. *Proc Natl Acad Sci USA.* 106:16333-16338.
- Oberegger H, Zadra I, Schoeser M, Haas H. (2000) Iron starvation leads to increased expression of Cu/Zn-superoxide dismutase in *Aspergillus*. *FEBS Lett.* 485:113-116.
- Oberley LW, Spitz DR. (1984) Assay of superoxide dismutase activity in tumor tissue. *Methods Enzymol.* 105:457-464.
- Ohkama-Ohtsu N, Oikawa A, Zhao P, Xiang C, Saito K, Oliver DJ. (2008) A gamma-glutamyl transpeptidase-independent pathway of glutathione catabolism to glutamate *via* 5-oxoproline in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 148:1603-1613.
- Ohkura H, Adachi Y, Kinoshita N, Niwa O, Toda T, Yanagida M. (1988) Cold-sensitive and caffeine-supersensitive mutants of the *Schizosaccharomyces pombe* *dis* genes implicated in sister chromatid separation during mitosis. *EMBO J.* 7:1465-1473.
- Oide S, Moeder W, Krasnoff S, Gibson D, Haas H, Yoshioka K, Turgeon BG. (2006) NPS6, encoding a nonribosomal peptide synthetase involved in siderophore-mediated iron metabolism, is a conserved virulence determinant of plant pathogenic ascomycetes. *Plant Cell.* 18:2836-2653.
- Oliver BG, Panepinto JC, Askew DS, Rhodes JC. (2002) cAMP alteration of growth rate of *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus niger* is carbon-source dependent. *Microbiology.* 148:2627-2633.
- Omar HM. (2013). Mycotoxins-induced oxidative stress and disease. In: Makun HA (ed.). *Mycotoxin and food safety in developing countries*. InTech Publisher, Croatia, pp.: 63-92.
- Oren I, Paul M. (2014) Up to date epidemiology, diagnosis and management of invasive fungal infections. *Clin Microbiol Infect.* 20:S1-S4.
- Orosz E, Antal K, Gazdag Z, Szabó Zs, Han KH, Yu JH, Pócsi I, Emri T. (2017) Transcriptome-based modeling reveals that oxidative stress induces modulation of the AtfA-dependent signaling networks in *Aspergillus nidulans*. *Int J Genomics.* 2017:6923849.
- Orosz E, van de Wiele N, Emri T, Zhou M, Robert V, de Vries RP, Pócsi I. (2018) Fungal Stress Database (FSD) - a repository of fungal stress physiological data. *Database (Oxford).* 2018:bay009.
- 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.
- Paderu P, Park S, Perlin DS. (2004) Caspofungin uptake is mediated by a high-affinity transporter in *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother.* 48:3845-3849.

- Paegle N, Jung S, Schäpe P, Müller-Hagen D, Ouedraogo JP, Heiderich C, Jedamzick J, Nitsche BM, van den Hondel CA, Ram AF, Meyer V. (2016) A transcriptome meta-analysis proposes novel biological roles for the antifungal protein AnAFP in *Aspergillus niger*. PLoS One. 11:e0165755.
- Pahlman AK, Granath K, Ansell R, Hohmann S, Adler L. (2001) The yeast glycerol 3-phosphatases gpp1p and gpp2p are required for glycerol biosynthesis and differentially involved in the cellular responses to osmotic, anaerobic, and oxidative stress. J Biol Chem. 276:3555-3563.
- Papadakis MA, Workman CT. (2015) Oxidative stress response pathways: Fission yeast as archetype. Crit Rev Microbiol. 41:520-535.
- Pardo B, Crabbé L, Pasero P. (2016) Signaling pathways of replication stress in yeast. FEMS Yeast Res. 17:fow101.
- Pardo-Planas O, Prade RA, Müller M, Atiyeh HK, Wilkins MR. (2017) Prevention of melanin formation during aryl alcohol oxidase production under growth-limited conditions using an *Aspergillus nidulans* cell factory. Bioresour Technol. 243:874-882.
- Park SJ, Mehrad B. (2009) Innate immunity to *Aspergillus* species. Clin Microbiol Rev. 22:535-551.
- Park YS, Kim JY, Yun CW. (2016) Identification of ferrichrome- and ferrioxamine B-mediated iron uptake by *Aspergillus fumigatus*. Biochem J. 473:1203-1213.
- Patel S, Lyons-Weiler J. (2004) caGEDA: a web application for the integrated analysis of global gene expression patterns in cancer. Appl Bioinformatics. 3:49-62.
- Paulussen C, Hallsworth JE, Álvarez-Pérez S, Nierman WC, Hamill PG, Blain D, Rediers H, Lievens B. (2017) Ecology of aspergillosis: insights into the pathogenic potency of *Aspergillus fumigatus* and some other *Aspergillus* species. Microb Biotechnol. 10:296-322.
- Peralta DR, Adler C, Corbalán NS, Paz García EC, Pomares MF, Vincent PA. (2016) Enterobactin as part of the oxidative stress response repertoire. PLoS One. 11:e0157799.
- Pereira Silva L, Alves de Castro P, Dos Reis TF, Paziani MH, Von Zeska Kress MR, Riaño-Pachón DM, Hagiwara D, Ries LN, Brown NA, Goldman GH. (2017) Genome-wide transcriptome analysis of *Aspergillus fumigatus* exposed to osmotic stress reveals regulators of osmotic and cell wall stresses that are SakA^{HOG1} and MpkC dependent. Cell Microbiol. 19:cmi.12681.
- Pérez-Gallardo RV, Briones LS, Díaz-Pérez AL, Gutiérrez S, Rodríguez-Zavala JS, Campos-García J. (2013) Reactive oxygen species production induced by ethanol in *Saccharomyces cerevisiae* increases because of a dysfunctional mitochondrial iron-sulfur cluster assembly system. FEMS Yeast Res. 13:804-819.
- Pinar M, Pantazopoulou A, Peñalva MA. (2013) Live-cell imaging of *Aspergillus nidulans* autophagy: RAB1 dependence, Golgi independence and ER involvement. Autophagy. 9:1024-1043.
- Pinto MC, Mata AM, Lopez-Barea J. (1985) The redox interconversion mechanism of *Saccharomyces cerevisiae* glutathione reductase. Eur J Biochem. 151:275-281.
- Pócsi I, Emri T, Varecza Z, Sámi L, Pusztahelyi T. (1999) Allosamidin inhibits the fragmentation and autolysis of *Penicillium chrysogenum*. In: Peter MG, Domard A, Muzzarelli RAA (edd.). Advances in chitin sciences, Vol.4. University of Potsdam, Potsdam. pp.: 558-564.
- Pócsi I, Pusztahelyi T, Sámi L, Emri T. (2003) Autolysis of *Penicillium chrysogenum* - a holistic approach. Ind J Biotechnol. 2:293-301.
- Pócsi I, Prade RA, Penninckx MJ. (2004) Glutathione, altruistic metabolite in fungi. Adv Microb Physiol. 49:1-76.
- Pócsi I, Miskei M, Karányi Zs, Emri T, Ayoubi P, Pusztahelyi T, Balla Gy, Prade RA. (2005) Comparison of gene expression signatures of diamide, H₂O₂ and menadione exposed *Aspergillus nidulans* cultures - linking genome-wide transcriptional changes to cellular physiology. BMC Genomics. 6:182-192.
- Pócsi I, Jeney V, Kertai P, Pócsi I, Emri T, Gyémánt Gy, Fésüs L, Balla J, Balla Gy. (2008) Fungal siderophores function as protective agents of LDL oxidation and are promising anti-atherosclerotic metabolites in functional food. Mol Nutr Food Res. 52:1434-1447.

- 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.
- Pollack JK, Li ZJ, Marten MR. (2008). Fungal mycelia show lag time before re-growth on endogenous carbon. *Biotechnol Bioeng.* 100:458-465.
- Pollack JK, Harris SD, Marten MR. (2009). Autophagy in filamentous fungi. *Fungal Genet Biol.* 46:1-8.
- Pollegioni L, Piubelli L, Sacchi S, Pilone MS, Molla G. (2007) Physiological functions of D-amino acid oxidases: from yeast to humans. *Cell Mol Life Sci.* 64:1373-1394.
- Pombeiro-Sponchiado SR, Sousa GS, Andrade JCR, Lisboa HF, Gonçalves RCR. (2017) Production of melanin pigment by fungi and its biotechnological applications. In: Blumenberg M (ed.). *Melanin*. InTech, <https://www.intechopen.com/books/melanin/production-of-melanin-pigment-by-fungi-and-its-biotechnological-applications>.
- Ponts N, Pinson-Gadais L, Verdal-Bonnin MN, Barreau C, Richard-Forget F. (2006) Accumulation of deoxynivalenol and its 15-acetylated form is significantly modulated by oxidative stress in liquid cultures of *Fusarium graminearum*. *FEMS Microbiol Lett.* 258:102-107.
- Ponts N, Pinson-Gadais L, Barreau C, Richard-Forget F, Ouellet T. (2007) Exogenous H₂O₂ and catalase treatments interfere with Tri genes expression in liquid cultures of *Fusarium graminearum*. *FEMS Lett.* 581:443-447.
- Popović-Bijelić A, Mojović M, Stamenković S, Jovanović M, Selaković V, Andjus P, Bačić G. (2016) Iron-sulfur cluster damage by the superoxide radical in neural tissues of the SOD1(G93A) ALS rat model. *Free Radic Biol Med.* 96:313-322.
- Prüfer S, Weber M, Stein P, Bosmann M, Stassen M, Kreft A, Schild H, Radsak MP. (2014) Oxidative burst and neutrophil elastase contribute to clearance of *Aspergillus fumigatus* pneumonia in mice. *Immunobiology.* 219:87-96.
- Punja ZK, Zhang YY. (1993) Plant chitinases and their roles in resistance to fungal diseases. *J Nematol.* 25:526-540.
- Pusztahelyi T, Pócsi I, Kozma J, Szentirmai A. (1997a) Aging of *Penicillium chrysogenum* cultures under carbon starvation: I: morphological changes and secondary metabolite production. *Biotechnol Appl Biochem.* 25:81-86.
- Pusztahelyi T, Pócsi I, Szentirmai A. (1997b) Aging of *Penicillium chrysogenum* cultures under carbon starvation: II: protease and N-acetyl-β-D-hexosaminidase production. *Biotechnol Appl Biochem.* 25:87-93.
- Pusztahelyi T, Molnár Zs, Emri T, Klement É, Miskei M, Kerékgyártó J, Balla J, Pócsi I. (2006) Comparative studies on differential expression of chitinolytic enzymes encoded by *chiA*, *chiB*, *chiC* and *nagA* genes in *Aspergillus nidulans*. *Folia Microbiol.* 51:547-554.
- Pusztahelyi T, Klement E, Szajli E, Klem J, Miskei M, Karányi Zs, Emri T, Kovács S, Orosz G, Kovács KL, Medzihradsky KF, Prade RA, Pócsi I. (2011) Comparison of transcriptional and translational changes caused by long-term menadione exposure in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Biol.* 48:92-103.
- Pusztahelyi T, Pócsi I (2013) Functions, cooperation and interplays of the vegetative growth signaling pathways in the aspergilli. *J Mycol.* 2013:832521.
- Qadota H, Python CP, Inoue SB, Arisawa M, Anraku Y, Zheng Y, Watanabe T, Levin DE, Ohya Y. (1996) Identification of yeast Rho1p GTPase as a regulatory subunit of 1,3-beta-glucan synthase. *Science.* 272:279-281.
- Qi XZ, Guo LJ, Yang LY, Huang J. (2013) Foatf1, a bZIP transcription factor of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, is involved in pathogenesis by regulating the oxidative stress responses of Cavendish banana (*Musa spp.*). *Phys Mol Plant Pathol.* 84:76-85.
- Qiao J, Kontoyiannis DP, Calderone R, Li D, Ma Y, Wan Z, Li R, Liu W. (2008) Afyap1, encoding a bZip transcriptional factor of *Aspergillus fumigatus*, contributes to oxidative stress response but is not essential to the virulence of this pathogen in mice immunosuppressed by cyclophosphamide and triamcinolone. *Med Mycol.* 46:773-772.

- Quinn J, Findlay VJ, Dawson K, Millar JB, Jones N, Morgan BA, Toone WM. (2002) Distinct regulatory proteins control the graded transcriptional response to increasing H₂O₂ levels in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Biol Cell*. 13:805-816.
- Quintana-Cabrera R, Fernandez-Fernandez S, Bobo-Jimenez V, Escobar J, Sastre J, Almeida A, Bolanos JP. (2012) c-Glutamylcysteine detoxifies reactive oxygen species by acting as glutathione peroxidase-1 cofactor. *Nat Commun*. 3:718.
- Radding JA, Heidler SA, Turner W. (1998) Photoaffinity analog of the semisynthetic echinocandin LY303366: Identification of echinocandin targets in *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother*. 42:1187-1194.
- Ralser M, Wamelink MM, Kowald A, Gerisch B, Heeren G, Struys EA, Klipp E, Jakobs C, Breitenbach M, Lehrach H, Krobitsch S. (2007) Dynamic rerouting of the carbohydrate flux is key to counteracting oxidative stress. *J Biol*. 6:10.
- Reed CE. (2007) Inflammatory effect of environmental proteases on airway mucosa. *Curr Allergy Asthma Rep*. 7:368-374.
- Reinke AW, Baek J, Ashenberg O, Keating AE. (2013) Networks of bZIP protein-protein interactions diversified over a billion years of evolution. *Science*. 340:730-734.
- Reverberi M, Fabbri AA, Zjalic S, Ricelli A, Punelli F, Fanelli C. (2005) Antioxidant enzymes stimulation in *Aspergillus parasiticus* by *Lentinula edodes* inhibits aflatoxin production. *Appl Microbiol Biotechnol*. 69:207-215.
- Reverberi M, Zjalic S, Punelli F, Ricelli A, Fabbri AA, Fanelli C. (2007) Apyap1 affects aflatoxin biosynthesis during *Aspergillus parasiticus* growth in maize seeds. *Food Addit Contam*. 24:1070-1075.
- Reverberi M, Punelli F, Scarpari M, Camera E, Zjalic S, Ricelli A, Fanelli C, Fabbri AA. (2010a) Lipoperoxidation affects ochratoxin A biosynthesis in *Aspergillus ochraceus* and its interaction with wheat seeds. *Appl Microbiol Biotechnol*. 85:1935-1946.
- Reverberi M, Ricelli A, Zjalic S, Fabbri AA, Fanelli C. (2010b) Natural functions of mycotoxins and control of their biosynthesis in fungi. *Appl Microbiol Biotechnol*. 87:899-911.
- Reverberi M, Gazzetti K, Punelli F, Scarpari M, Zjalic S, Ricelli A, Fabbri AA, Fanelli C. (2012) Aoyap1 regulates OTA synthesis by controlling cell redox balance in *Aspergillus ochraceus*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 95:1293-1304.
- Revie NM, Iyer KR, Robbins N, Cowen LE. (2018) Antifungal drug resistance: evolution, mechanisms and impact. *Curr Opin Microbiol*. 45:70-76.
- Richie DL, Fuller KK, Fortwendel J, Miley MD, McCarthy JW, Feldmesser M, Rhodes JC, Askew DS. (2007a) Unexpected link between metal ion deficiency and autophagy in *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryot Cell*. 6:2437-2447.
- Richie DL, Miley MD, Bhabhra R, Robson GD, Rhodes JC, Askew DS. (2007b) The *Aspergillus fumigatus* metacaspases CasA and CasB facilitate growth under conditions of endoplasmic reticulum stress. *Mol Microbiol*. 63:591-604.
- Richie DL, Feng X, Krishnan K, Askew DS. (2011) Secretion stress and antifungal resistance: an Achilles' heel of *Aspergillus fumigatus*? *Med Mycol*. 49:S101-S106.
- Ries LN, Beattie SR, Espeso EA, Cramer RA, Goldman GH. (2016) Diverse regulation of the CreA carbon catabolite repressor in *Aspergillus nidulans*. *Genetics*. 203:335-352.
- Ries LNA, Rocha MC, de Castro PA, Silva-Rocha R, Silva RN, Freitas FZ, de Assis LJ, Bertolini MC, Malavazi I, Goldman GH. (2017) The *Aspergillus fumigatus* CrzA transcription factor activates chitin synthase gene expression during the caspofungin paradoxical effect. *MBio*. 8:e00705-17.
- Rinnerthaler M, Büttner S, Laun P, Heeren G, Felder TK, Klinger H, Weinberger M, Stolze K, Grousl T, Hasek J, Benada O, Frydlova I, Klocker A, Simon-Nobbe B, Jansko B, Breitenbach-Koller H, Eisenberg T, Gourelay CW, Madeo F, Burhans WC, Breitenbach M. (2012) Yno1p/Aim14p, a NADPH-oxidase ortholog, controls extramitochondrial reactive oxygen species generation, apoptosis, and actin cable formation in yeast. *Proc Natl Acad Sci USA*. 109: 8658-8663.

- Ritchie ME, Silver J, Oshlack A, Silver J, Holmes M, Diyagama D, Holloway A, Smyth GK. (2007) A comparison of background correction methods for two-colour microarrays. *Bioinformatics*. 23:2700-2707.
- Rodrigues JV, Gomes CM. (2012) Mechanism of superoxide and hydrogen peroxide generation by human electron-transfer flavoprotein and pathological variants. *Free Radic Biol Med*. 53:12-19.
- Rodríguez-Urra AB, Jiménez C, Nieto MI, Rodríguez J, Hayashi H, Ugalde U. (2012) Signaling the induction of sporulation involves the interaction of two secondary metabolites in *Aspergillus nidulans*. *ACS Chem Biol*. 7:599-606.
- Roetzer A, Gregori C, Jennings AM, Quintin J, Ferrandon D, Butler G, Kuchler K, Ammerer G, Schüller C. (2008) *Candida glabrata* environmental stress response involves *Saccharomyces cerevisiae* Msn2/4 orthologous transcription factors. *Mol Microbiol*. 69:603-620.
- Roetzer A, Gratz N, Kovarik P, Schüller C. (2010) Autophagy supports *Candida glabrata* survival during phagocytosis. *Cell Microbiol*. 12:199-216.
- Roetzer A, Klopff E, Gratz N, Marcet-Houben M, Hiller E, Rupp S, Gabaldón T, Kovarik P, Schüller C. (2011) Regulation of *Candida glabrata* oxidative stress resistance is adapted to host environment. *FEBS Lett*. 585:319-327.
- Roggenkamp R, Sahm H, Wagner F. (1974) Microbial assimilation of methanol induction and function of catalase in *Candida boidinii*. *FEBS Lett*. 41:283-286.
- Rouault TA, Klausner RD. (1996) Iron-sulfur clusters as biosensors of oxidants and iron. *Trends Biochem Sci*. 21:174-177.
- Royall JA, Ischiropoulos H. (1993) Evaluation of 2',7'-dichlorofluorescein and dihydrorhodamine 123 as fluorescent probes for intracellular H₂O₂ in cultured endothelial cells. *Arch Biochem Biophys*. 302:348-355.
- Roze LV, Chanda A, Wee J, Awad D, Linz JE. (2011) Stress-related transcription factor AtfB integrates secondary metabolism with oxidative stress response in aspergilli. *J Biol Chem*. 286:35137-35148.
- Ruchel R, Reichard U. (1999) Pathogenesis and clinical presentation of aspergillosis. In: Brakhage AA, Jahn B, Schmidt A (edd.). *Aspergillus fumigatus*, vol. 2. *Contrib Microbiol*. Basel, pp.: 21-43.
- Ruijter GJ, Visser J. (1997) Carbon repression in Aspergilli. *FEMS Microbiol Lett*. 151:103-114.
- Ruijter GJ, Bax M, Patel H, Flitter SJ, van de Vondervoort PJ, de Vries RP, vanKuyk PA, Visser J. (2003) Mannitol is required for stress tolerance in *Aspergillus niger* conidiospores. *Eukaryot Cell*. 2:690-698.
- Sakamoto K, Iwashita K, Yamada O, Kobayashi K, Mizuno A, Akita O, Mikami S, Shimo H, Gomi K. (2009) *Aspergillus oryzae atfA* controls conidial germination and stress tolerance. *Fungal Genet Biol*. 46:887-897.
- Saloheimo M, Valkonen M, Penttilä M. (2003) Activation mechanisms of the HAC1-mediated unfolded protein response in filamentous fungi. *Mol Microbiol*. 47:1149-1161.
- Sambrook J, Russel DW (2001). *Molecular cloning: A laboratory manual* (third edition), Chapter 7, Protocol 6, Cold Spring Harbor, New York.
- Sámi L, Emri T, Pócsi I. (2001a) Autolysis and ageing of *Penicillium chrysogenum* cultures under carbon starvation: III: glutathione metabolism and formation of reactive oxygen species. *Mycol Res*. 105:1246-1250.
- Sámi L, Pusztahelyi T, Emri T, Varecza Z, Fekete A, Grallert Á, Karányi Zs, Kiss L, Pócsi I (2001b) Autolysis and ageing of *Penicillium chrysogenum* cultures under carbon starvation: chitinase production and antifungal effect of allosamidin. *J Gen Appl Microbiol*. 47:201-211.
- Sámi L, Karaffa L, Emri T, Pócsi I. (2003) Autolysis and ageing of *Penicillium chrysogenum* cultures under carbon starvation: respiration and glucose oxidase production. *Acta Microbiol Immunol Hung*. 50:67-76.
- Samson RA, Flannigan B, Flannigan ME, Verhoeff AP, Adan OCG, Hoekstra ES. (1994) *Air quality monographs*, vol. 2. *Health implications of fungi in indoor air environments*. Elsevier Publications, Amsterdam, pp.: 531-538.
- Samson RA, Visagie CM, Houbraken J, Hong SB, Hubka V, Klaassen CH, Perrone G, Seifert KA, Susca A, Tanney JB, Varga J, Kocsubé S, Szigeti G, Yaguchi T, Frisvad JC. (2014) Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Stud Mycol*. 78:141-173.

- Sanchez JF, Chiang YM, Szewczyk E, Davidson AD, Ahuja M, Elizabeth Oakley C, Woo Bok J, Keller N, Oakley BR, Wang CC (2010) Molecular genetic analysis of the orsellinic acid/F9775 gene cluster of *Aspergillus nidulans*. *Mol Biosyst.* 6:587-593.
- Sanchez JF, Entwistle R, Hung JH, Yaegashi J, Jain S, Chiang YM, Wang CC, Oakley BR. (2011) Genome-based deletion analysis reveals the prenyl xanthone biosynthesis pathway in *Aspergillus nidulans*. *J Am Chem Soc.* 133:4010-4017.
- Sánchez-Romero MA, Casadesús J. (2014) Contribution of phenotypic heterogeneity to adaptive antibiotic resistance. *Proc Natl Acad Sci USA.* 111:355-360.
- 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.
- Savoldi M, Malavazi I, Soriani FM, Capellaro JL, Kitamoto K, da Silva Ferreira ME, Goldman MH, Goldman GH. (2008) Farnesol induces the transcriptional accumulation of the *Aspergillus nidulans* Apoptosis-Inducing Factor (AIF)-like mitochondrial oxidoreductase. *Mol Microbiol.* 70:44-59.
- Sawistowska-Schröder ET, Kerridge D, Perry H. (1984) Echinocandin inhibition of 1,3-beta-D-glucan synthase from *Candida albicans*. *FEBS Lett.* 173:134-138.
- Saykhedkar S, Ray A, Ayoubi-Canaan P, Hartson SD, Prade R, Mort AJ. (2012) A time course analysis of the extracellular proteome of *Aspergillus nidulans* growing on sorghum stover. *Biotechnol Biofuels.* 5:52.
- Scharf DH, Heinekamp T, Remme N, Hortschansky P, Brakhage AA, Hertweck C. (2012) Biosynthesis and function of gliotoxin in *Aspergillus fumigatus*. *Appl Microbiol Biotech.* 93:467-472.
- Schneider T, Gerrits B, Gassmann R, Schmid E, Gessner MO, Richter A, Battin T, Eberl L, Riedel K. (2010). Proteome analysis of fungal and bacterial involvement in leaf litter decomposition. *Proteomics.* 10:1819-1830.
- Schöbel F, Ibrahim-Granet O, Avé P, Latgé JP, Brakhage AA, Brock M. (2007) *Aspergillus fumigatus* does not require fatty acid metabolism via isocitrate lyase for development of invasive aspergillosis. *Infect Immun.* 75:1237-1244.
- Schrettl M. (2004) Siderophore biosynthesis but not reductive iron assimilation is essential for *Aspergillus fumigatus* virulence. *J Exp Med.* 200:1213-1219.
- Schrettl M, Kim HS, Eisendle M, Kragl C, Nierman WC, Heinekamp T, Werner ER, Jacobsen I, Illmer P, Yi H, Brakhage AA, Haas H. (2008) SreA-mediated iron regulation in *Aspergillus fumigatus*. *Mol Microbiol.* 70:27-43.
- Schrettl M, Beckmann N, Varga J, Heinekamp T, Jacobsen ID, Jöchl C, Moussa TA, Wang S, Gsaller F, Blatzer M, Werner ER, Niermann WC, Brakhage AA, Haas H. (2010) HapX-mediated adaption to iron starvation is crucial for virulence of *Aspergillus fumigatus*. *PLoS Pathog.* 6:1001124.
- Schrettl M, Haas H. (2011) Iron homeostasis--Achilles' heel of *Aspergillus fumigatus*? *Curr Opin Microbiol.* 14:400-405.
- Schrickx JM, Krave AS, Verdoes JC, van den Hondel CA, Stouthamer AH, van Verseveld HW. (1993) Growth and product formation in chemostat and recycling cultures by *Aspergillus niger* N402 and a glucoamylase overproducing transformant, provided with multiple copies of the *glaA* gene. *J Gen Microbiol.* 139:2801-2810.
- Schüller C, Mamnun YM, Wolfger H, Rockwell N, Thorner J, Kuchler K. (2007) Membrane-active compounds activate the transcription factors Pdr1 and Pdr3 connecting pleiotropic drug resistance and membrane lipid homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell.* 18:4932-4944.
- Schweer KE, Jakob B, Liss B, Christ H, Fischer G, Vehreschild M, Cornely OA, Vehreschild JJ. (2016) Domestic mould exposure and invasive aspergillosis-air sampling of *Aspergillus spp.* spores in homes of hematological patients, a pilot study. *Med Mycol.* 54:576-583.
- Selye H. (1936) Syndrome produced by diverse nocuous agents. *Nature.* 138:32.
- Semighini CP, Savoldi M, Goldman GH, Harris SD. (2006) Functional characterization of the putative *Aspergillus nidulans* poly(ADP-ribose) polymerase homolog PrpA. *Genetics.* 173:87-98.
- Sha W, Martins AM, Laubenbacher R, Mendes P, Shulaev V. (2013) The genome-wide early temporal response of *Saccharomyces cerevisiae* to oxidative stress induced by cumene hydroperoxide. *PLoS One.* 8:e74939.

- Shaaban MI, Bok JW, Lauer C, Keller NP. (2010) Suppressor mutagenesis identifies a velvet complex remediator of *Aspergillus nidulans* secondary metabolism. *Eukaryot Cell*. 9:1816-1824.
- Shalit I, Shadkchan Y, Samra Z, Oshero N. (2003) *In vitro* synergy of caspofungin and itraconazole against *Aspergillus spp.*: MIC versus minimal effective concentration end points. *Antimicrob Agents Chemother*. 47:1416-1418.
- Shanmuganathan A, Avery SV, Willetts SA, Houghton JE. (2004) Copper-induced oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae* targets enzymes of the glycolytic pathway. *FEBS Lett*. 556:253-259.
- Sharma N, Sharma KP, Gaur RK, Gupta VK. (2011) Role of chitinase in plant defense. *Asian J Biochem*. 6:29-37.
- Shedletzky E, Unger C, Delmer DP. (1997) A Microtiter-based fluorescence assay for (1,3)- β -glucan synthases. *Anal Biochem*. 249:88-93.
- Shibayama K, Wachino J, Arakawa Y, Saidijam M, Rutherford NG, Henderson PJ. (2007) Metabolism of glutamine and glutathione via gamma-glutamyltranspeptidase and glutamate transport in *Helicobacter pylori*: possible significance in the pathophysiology of the organism. *Mol Microbiol*. 64:396-406.
- Shimizu M, Fujii T, Masuo S, Takaya N. (2010) Mechanism of de novo branched-chain amino acid synthesis as an alternative electron sink in hypoxic *Aspergillus nidulans* cells. *Appl Environ Microbiol*. 76:1507-1515.
- Shin KS, Kwon NJ, Kim YH, Park HS, Kwon GS, Yu JH. (2009) Differential roles of the ChiB chitinase in autolysis and cell death of *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot Cell*. 8:738-746.
- Shiozaki K, Russell P. (1996) Conjugation, meiosis, and the osmotic stress response are regulated by Spc1 kinase through Atf1 transcription factor in fission yeast. *Genes Dev*. 10:2276-2288.
- Shoji JY, Craven KD. (2011). Autophagy in basal hyphal compartments: A green strategy of great recyclers. *Fungal Biol Rev*. 25:79-83.
- Sjöberg L, Eriksen TE, Révész L (1982) The reaction of the hydroxyl radical with glutathione in neutral and alkaline aqueous solution. *Radiat Res*. 89:255-263.
- Skamnioti P, Henderson C, Zhang Z, Robinson Z, Gurr SJ. (2007) A novel role for catalase B in the maintenance of fungal cell-wall integrity during host invasion in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Mol Plant Microbe Interact*. 20:568-580.
- Skromne I, Sánchez O, Aguirre J. (1995) Starvation stress modulates the expression of the *Aspergillus nidulans* *brlA* regulatory gene. *Microbiology* 141:21-28.
- Smethurst DG, Cooper KF. (2016) ER fatalities-The role of ER-mitochondrial contact sites in yeast life and death decisions. *Mech Ageing Dev*. 161:225-233.
- Smyth GK. (2005) Limma: linear models for microarray data. In: Gentleman R, Carey V, Dudoit S, Irizarry R, Huber W (edd.). *Bioinformatics and Computational Biology Solutions using R and Bioconductor*. Springer, New York, pp.: 397-420.
- Sofjan AK, Mitchell A, Shah DN, Nguyen T, Sim M, Trojcek A, Beyda ND, Garey KW. (2018) Rezafungin (CD101), a next generation echinocandin. A systematic literature review and assessment of possible place in therapy. *J Glob Antimicrob Resist*. 14:58-64.
- Soid-Raggi G, Sánchez O, Aguirre J. (2006) TmpA, a member of a novel family of putative membrane flavoproteins, regulates asexual development in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol*. 59:854-869.
- Soid-Raggi G, Sánchez O, Ramos-Balderas JL, Aguirre J. (2016) The adenylate-forming enzymes *afeA* and *tmpB* are involved in *Aspergillus nidulans* self-communication during asexual development. *Front Microbiol*. 7:353.
- Spickett CM, Smirnoff N, Pitt AR. (2000) The biosynthesis of erythroascorbate in *Saccharomyces cerevisiae* and its role as an antioxidant. *Free Radic Biol Med*. 28:183-192.
- 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.

- Spitzmüller Zs, Hajdu M, Pócsi I, Emri T. (2015b) Degradation of glutathione in *Aspergillus nidulans*. Acta Biol Hung. 66:242-245.
- Spitzmüller Zs, Gonda S, Kiss-Szikszai A, Vasas G, Pócsi I, Emri T. (2016) Characterization of extracellular γ -glutamyl transpeptidase from *Aspergillus nidulans*. Mycoscience. 57:400-403.
- Springael JY, Penninckx MJ. (2003) Nitrogen-source regulation of yeast gamma-glutamyl transpeptidase synthesis involves the regulatory network including the GATA zinc-finger factors Gln3, Ntl1/Gat1 and Gzf3. Biochem J. 371:589-595.
- Staadén S, Milcu A, Rohlf M, Scheu S. (2011) Olfactory cues associated with fungal grazing intensity and secondary metabolite pathway modulate *Collembola* foraging behaviour. Soil Biol Biochem. 43:1411-1416.
- Staerck C, Gastebois A, Vandeputte P, Calenda A, Larcher G, Gillmann L, Papon N, Bouchara JP, Fleury MJJ. (2017) Microbial antioxidant defense enzymes. Microb Pathog. 110:56-65.
- Starkov AA, Fiskum G, Chinopoulos C, Lorenzo BJ, Browne SE, Patel MS, Beal MF. (2004) Mitochondrial alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex generates reactive oxygen species. J Neurosci. 24:7779-7788.
- Stearman R, Yuan DS, Yamaguchi-Iwai Y, Klausner RD, Dancis A. (1996) A permease-oxidase complex involved in high-affinity iron uptake in yeast. Science. 271:1552-1557.
- Steinbach WJ, Lamoth F, Juvvadi PR. (2015) Potential microbiological effects of higher dosing of echinocandins. Clin Infect Dis. 61:S669-S677.
- Stephan JS, Yeh YY, Ramachandran V, Deminoff SJ, Herman PK. (2009). The Tor and PKA signaling pathways independently target the Atg1/Atg13 protein kinase complex to control autophagy. Proc Natl Acad Sci USA. 106:17049-17054.
- Stevens DA, Ichinomiya M, Koshi Y, Horiuchi H. (2006) Escape of *Candida* from caspofungin inhibition at concentrations above the MIC (paradoxical effect) accomplished by increased cell wall chitin; evidence for beta-1,6-glucan synthesis inhibition by caspofungin. Antimicrob Agents Chemother. 50:3160-3161.
- Stinnett SM, Espeso EA, Cobeño L, Araújo-Bazán L, Calvo AM. (2007) *Aspergillus nidulans* VeA subcellular localization is dependent on the importin alpha carrier and on light. Mol Microbiol. 63:242-255.
- Subramaniam R, Rampitsch C. (2013) Towards systems biology of mycotoxin regulation. Toxins (Basel). 5:675-682.
- Suzuki H, Yamada C, Kato K. (2007) Gamma-glutamyl compounds and their enzymatic production using bacterial gamma-glutamyltranspeptidase. Amino Acids. 32:333-340.
- Szabó S, Tache Y, Somogyi A. (2012) The legacy of Hans Selye and the origins of stress research: a retrospective 75 years after his landmark brief "letter" to the editor of nature. Stress. 15:472-478.
- Szewczyk E, Chiang YM, Oakley CE, Davidson AD, Wang CC, Oakley BR. (2008) Identification and characterization of the asperthecin gene cluster of *Aspergillus nidulans*. Appl Environ Microbiol. 74:7607-7612.
- Szilágyi M, Kwon NJ, Dorogi C, Pócsi I, Yu JH, Emri T. (2010a) The extracellular β -1,3-endoglucanase EngA is involved in autolysis of *Aspergillus nidulans*. J Appl Microbiol. 109:1498-1508.
- Szilágyi M, Pócsi I, Forgács K, Emri T. (2010b) MeaB dependent nutrition sensing regulates autolysis in carbon starving *Aspergillus nidulans* cultures. Ind J Microbiol. 50:104-108.
- Szilágyi M, Kwon NJ, Bakti F, M-Hamvas M, Jámbrik K, Park HS, Pócsi I, Yu JH, Emri T. (2011) Extracellular proteinase formation in carbon starving *Aspergillus nidulans* cultures - physiological function and regulation. J Basic Microbiol. 51:625-634.
- Szilágyi M, Anton F, Forgács K, Yu JH, Pócsi I, Emri T. (2012) Antifungal activity of extracellular hydrolyses produced by autolysing *Aspergillus nidulans* cultures. J Microbiol. 50:849-854.
- Szilágyi M, Miskei M, Karányi Z, Lenkey B, Pócsi I, Emri T (2013) Transcriptome changes initiated by carbon starvation in *Aspergillus nidulans*. Microbiol. 159:, 176-190.
- Szilágyi M, Anton F, Pócsi I, Emri T. (2018) Autolytic enzymes are responsible for increased melanization of carbon stressed *Aspergillus nidulans* cultures. J Basic Microbiol. 58:440-447.

- Takasaki K, Shoun H, Yamaguchi M, Takeo K, Nakamura A, Hoshino T, Takaya N. (2004) Fungal ammonia fermentation, a novel metabolic mechanism that couples the dissimilatory and assimilatory pathways of both nitrate and ethanol. Role of acetyl CoA synthetase in anaerobic ATP synthesis. *J Biol Chem.* 279:12414-12420.
- Tan SX, Teo M, Lam YT, Dawes IW, Perrone GG. (2009) Cu, Zn superoxide dismutase and NADP(H) homeostasis are required for tolerance of endoplasmic reticulum stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell.* 20:1493-1508.
- Tegos GP, Haynes M, Strouse JJ, Khan MM, Bologa CG, Oprea TI, Sklar LA. (2011) Microbial efflux pump inhibition: tactics and strategies. *Curr Pharm Des.* 17:1291-302.
- Tekaia F, Latgé JP. (2005) *Aspergillus fumigatus*: saprophyte or pathogen? *Curr Opin Microbiol.* 8:385-392.
- Temme N, Oeser B, Massaroli M, Heller J, Simon A, Collado IG, Viaud M, Tudzynski P. (2012) BcAtf1, a global regulator, controls various differentiation processes and phytotoxin production in *Botrytis cinerea*. *Mol Plant Pathol.* 13:704-718.
- Temple MD, Perrone GG, Dawes IW. (2005) Complex cellular responses to reactive oxygen species. *Trends Cell Biol.* 15:319-326.
- Ting SY, Ishola OA, Ahmed MA, Tabana YM, Dahham S, Agha MT, Musa SF, Muhammed R, Than LT, Sandai D. (2016) Metabolic adaptation via regulated enzyme degradation in the pathogenic yeast *Candida albicans*. *J Mycol Med.* 27:98-108.
- Toledano MB, Delaunay A, Biteau B, Spector D, Azevedo D. (2003) Oxidative stress responses in yeast. In: Hohmann S, Mager WH (edd.). *Yeast stress responses. Topics in Current Genetics.* Springer, Berlin, pp.: 241-304.
- Tomarelli RM, Charney J, Harding ML. (1949) The use of azoalbumin as a substrate in the colorimetric determination of peptic and tryptic activity. *J Lab Clin Med.* 34:428-433.
- Tomita K, Yano T, Tsuchida T, Kumagai H, Tochikura T. (1990) Purification and properties of γ -glutamyltranspeptidase from *Penicillium roqueforti* IFO 4622. *J Ferment Bioeng.* 70:128-130.
- Torres AM, Ramirez ML, Arroyo M, Chulze SN, Magan N. (2003) Potential use of antioxidants for control of growth and fumonisin production by *Fusarium verticillioides* and *Fusarium proliferatum* on whole maize grain. *Int J Food Microbiol.* 83:319-324.
- Tóth V, Nagy CsT, Miskei M, Pócsi I, Emri T. (2011) Polyphasic characterization of "*Aspergillus nidulans* var. *roseus*" ATCC 58397. *Folia Microbiol.* 56:381-388.
- Tóth V, Nagy CsT, Pócsi I, Emri T. (2012) The echinocandin B producer fungus *Aspergillus nidulans* var. *roseus* ATCC 58397 does not possess innate resistance against its lipopeptide antimycotic. *Appl Microbiol Biotechnol.* 95:113-122.
- Trapnell C, Pachter L, Salzberg SL. (2009) TopHat: discovering splice junctions with RNA Seq. *Bioinformatics.* 25:1105-1111.
- Trapnell C, Hendrickson DG, Sauvageau M, Goff L, Rinn JL, Pachter L. (2013) Differential analysis of gene regulation at transcript resolution with RNA-seq. *Nature Biotechnol.* 31:46-53.
- Tripathi SK, Xu T, Feng Q, Avula B, Shi X, Pan X, Mask MM, Baerson SR, Jacob MR, Ravu RR, Khan SI, Li XC, Khan IA, Clark AM, Agarwal AK. (2017) Two plant-derived aporphinoid alkaloids exert their antifungal activity by disrupting mitochondrial iron-sulfur cluster biosynthesis. *J Biol Chem.* 292:16578-16593.
- Tudzynski P, Heller J, Siegmund U. (2012) Reactive oxygen species generation in fungal development and pathogenesis. *Curr Opin Microbiol.* 15:653-659.
- Valiante V, Macheleidt J, Föge M, Brakhage AA. (2015) The *Aspergillus fumigatus* cell wall integrity signaling pathway: drug target, compensatory pathways, and virulence. *Front Microbiol.* 6:325.
- van de Sande WW, Fahal AH, Bakker-Woudenberg IA, van Belkum A. (2010) *Madurella mycetomatis* is not susceptible to the echinocandin class of antifungal agents. *Antimicrob Agents Chemother.* 54:2738-2740.
- van de Veerdonk FL, Gresnigt MS, Romani L, Netea MG, Latgé JP. (2017) *Aspergillus fumigatus* morphology and dynamic host interactions. *Nat Rev Microbiol.* 15:661-674.

- van Duin D, Casadevall A, Nosanchuk JD. (2002) Melanization of *Cryptococcus neoformans* and *Histoplasma capsulatum* reduces their susceptibilities to amphotericin B and caspofungin. *Antimicrob Agents Chemother.* 46:3394-3400.
- van Munster JM, Daly P, Delmas S, Pullan ST, Blythe MJ, Malla S, Kokolski M, Noltorp EC, Wennberg K, Fetherston R, Beniston R, Yu X, Dupree P, Archer DB. (2014) The role of carbon starvation in the induction of enzymes that degrade plant-derived carbohydrates in *Aspergillus niger*. *Fungal Genet Biol.* 72:34-47.
- van Munster JM, Dobruchowska JM, Veloo R, Dijkhuizen L, van der Maarel MJEC. (2015). Characterization of the starvation-induced chitinase CfcA and α -1,3-glucanase AgnB of *Aspergillus niger*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 99:2209-2223.
- van Munster JM, Burggraaf AM, Pócsi I, Szilágyi M, Emri T, Ram AFJ. (2016) Post-genomic approaches to dissect carbon starvation responses in Aspergilli. In: Benoit I, Andersen MR, de Vries RP (edd.). *Aspergillus and Penicillium in the post-genomic era*. Caister Academic Press, Norfolk, pp.: 89-112.
- Van Nguyen T, Kröger C, Bönnighausen J, Schäfer W, Bormann J. (2013) The ATF/CREB transcription factor Atf1 is essential for full virulence, deoxynivalenol production, and stress tolerance in the cereal pathogen *Fusarium graminearum*. *Mol Plant Microbe Interact.* 26:1378-1394.
- Van Waeyenberghe L, Baré J, Pasmans F, Claeys M, Bert W, Haesebrouck F, Houf K, Martel A. (2013) Interaction of *Aspergillus fumigatus* conidia with *Acanthamoeba castellanii* parallels macrophage-fungus interactions. *Environ Microbiol Rep.* 5:819-824.
- Vargas-Pérez I, Sánchez O, Kawasaki L, Georgellis D, Aguirre J. (2007) Response regulators SrrA and SskA are central components of a phosphorelay system involved in stress signal transduction and asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot Cell.* 6:1570-1583.
- Vega K, Kalkum M. (2012) Chitin, chitinase responses, and invasive fungal infections. *Int J Microbiol.* 2012:920459.
- Verwer PE, van Duijn ML, Tavakol M, Bakker-Woudenberg IA, van de Sande WW. (2012) Reshuffling of *Aspergillus fumigatus* cell wall components chitin and β -glucan under the influence of caspofungin or nikkomycin Z alone or in combination. *Antimicrob Agents Chemother.* 56:1595-1598.
- Vieira ÉD, Andrietta Mda G, Andrietta SR. (2013) Yeast biomass production: a new approach in glucose-limited feeding strategy. *Braz J Microbiol.* 44:551-558.
- Viña JR, Puertes IR, Montoro JB, Saez GT, Viña J. (1985) Gamma-glutamyl-amino acids as signals for the hormonal regulation of amino acid uptake by the mammary gland of the lactating rat. *Biol Neonate.* 48:250-256.
- Vincent BM, Lancaster AK, Scherz-Shouval R, Whitesell L, Lindquist S. (2013) Fitness trade-offs restrict the evolution of resistance to amphotericin B. *PLoS Biol.* 11:e1001692.
- 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.
- Vödisch M, Scherlach K, Winkler R, Hertweck C, Braun H-P, Roth M, Haas H, Werner ER, Brakhage AA, Kniemeyer O. (2011) Analysis of the *Aspergillus fumigatus* proteome reveals metabolic changes and the activation of the Pseurotin A biosynthesis gene cluster in response to hypoxia. *J Proteome Res.* 10:2508-2524.
- Walker LA, Gow NA, Munro CA. (2012) Elevated chitin content reduces the susceptibility of *Candida* species to caspofungin. *Antimicrob Agents Chemother.* 57:146-154.
- Walter J, Sobottka I, Rogiers X, Broering D, Fischer L. (2011) Invasive aspergillosis caused by *Aspergillus terreus* in a living donor liver transplant recipient successfully treated by caspofungin. *Mycoses.* 54:e220-2.
- Wang Y, Song JZ, Yang Q, Liu ZH, Huang XM, Chen Y. (2010). Cloning of a heat-stable chitin deacetylase gene from *Aspergillus nidulans* and its functional expression in *Escherichia coli*. *Appl Biochem Biotechnol.* 162:843-854.
- Warnecke D, Erdmann R, Fahl A, Hube B, Müller F, Zank T, Zähringer U, Heinz E. (1999) Cloning and functional expression of UGT genes encoding sterol glucosyltransferases from *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *Pichia pastoris*, and *Dictyostelium discoideum*. *J Biol Chem.* 274:13048-13059.

- Wei H, Scherer M, Singh A, Liese R, Fischer R. (2001). *Aspergillus nidulans* alpha-1,3 glucanase (mutanase), *mutA*, is expressed during sexual development and mobilizes mutan. Fungal Genet Biol. 34:217-227.
- Weinberg ED. (2009) Iron availability and infection. Biochim Biophys Acta. 1790:600-605.
- Wheeler GL, Trotter EW, Dawes IW, Grant CM. (2003) Coupling of the transcriptional regulation of glutathione biosynthesis to the availability of glutathione and methionine *via* the Met4 and Yap1 transcription factors. J Biol Chem. 278:49920-49928.
- White S, McIntyre M, Berry DR, McNeil B. (2002) The autolysis of industrial filamentous fungi. Crit Rev Biotechnol. 22:1-14.
- Wiedemann A, Spadinger A, Löwe A, Seeger A, Ebel F. (2016) Agents that activate the High Osmolarity Glycerol pathway as a means to combat pathogenic molds. Int J Med Microbiol. 306:642-651.
- Wiederhold NP. (2009) Paradoxical echinocandin activity: a limited *in vitro* phenomenon? Med Mycol. 47:S369-S375.
- Willger SD, Puttikamonkul S, Kim KH, Burritt JB, Grahl N, Metzler LJ, Barbuch R, Bard M, Lawrence CB, Cramer RA Jr. (2008) A sterol-regulatory element binding protein is required for cell polarity, hypoxia adaptation, azole drug resistance, and virulence in *Aspergillus fumigatus*. PLoS Pathog. 4:e1000200.
- Winderickx J, Holsbeeks I, Lagatie O, Giots F, Thevelein J, de Winde H. (2003) From feast to famine; adaptation to nutrient availability in yeast. In: Hohmann S, Mager WH (edd.). Yeast stress responses. Topics in Current Genetics. Springer, Berlin, pp.: 305-386.
- Winge DR. (1998) Copper-regulatory domain involved in gene expression. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol. 58:165-195.
- Woodworth RC, Richter GW. (1990) Iron-dependent enzymes in mammalian systems. In: Ponka P, Schulman HM (edd.). Iron transport and storage. CRC Press, Boston, pp.: 17-39.
- Wu WS, Chen BS. (2009) Identifying stress transcription factors using gene expression and TF-gene association data. Bioinform Biol Insights. 1:137-145.
- Wysocki R, Tamás MJ. (2010) How *Saccharomyces cerevisiae* copes with toxic metals and metalloids. FEMS Microbiol Rev. 34:925-951.
- Xiong Y, Coradetti ST, Li X, Gritsenko MA, Clauss T, Petyuk V, Camp D, Smith R, Cate JH, Yang F, Glass NL. (2014) The proteome and phosphoproteome of *Neurospora crassa* in response to cellulose, sucrose and carbon starvation. Fungal Genet Biol. 72:21-33.
- Xu C, Liu R, Zhang Q, Chen X, Qian Y, Fang W. (2017) The diversification of evolutionarily conserved MAPK cascades correlates with the evolution of fungal species and development of lifestyles. Genome Biol Evol. 9:311-322.
- Yamashita K, Shiozawa A, Watanabe S, Fukumori F, Kimura M, Fujimura M. (2008) ATF-1 transcription factor regulates the expression of *cgg-1* and *cat-1* genes in response to fludioxonil under OS-2 MAP kinase in *Neurospora crassa*. Fungal Genet Biol. 45:1562-1569.
- Yamazaki H, Yamazaki D, Takaya N, Takagi M, Ohta A, Horiuchi H. (2007) A chitinase gene, *chiB*, involved in the autolytic process of *Aspergillus nidulans*. Curr Genet. 51:89-98.
- Yamazaki H, Tanaka A, Kaneko J, Ohta A, Horiuchi H. (2008). *Aspergillus nidulans* ChiA is a glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored chitinase specifically localized at polarized growth sites. Fungal Genet Biol. 45:963-972.
- Yang Z, Huang J, Geng J, Nair U, Klionsky DJ. (2006). Atg22 recycles amino acids to link the degradative and recycling functions of autophagy. Mol Biol Cell. 17:5094-5104.
- Yasmin S, Abt B, Schrettl M, Moussa TA, Werner ER, Haas H. (2009) The interplay between iron and zinc metabolism in *Aspergillus fumigatus*. Fungal Genet Biol. 46:707-713.
- Yin WB, Reinke AW, Szilágyi M, Emri T, Chiang YM, Keating AE, Pócsi I, Wang CC, Keller NP. (2013) bZIP transcription factors affecting secondary metabolism, sexual development and stress responses in *Aspergillus nidulans*. Microbiology 159:77-88.

- Yoon J, Maruyama J, Kitamoto K. (2011) Disruption of ten protease genes in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae* highly improves production of heterologous proteins. *Appl Microbiol Biotechnol.* 89:747-759.
- Yu JH, Mah JH, Seo JA. (2006) Growth and developmental control in the model and pathogenic aspergilli. *Eukaryot Cell.* 5:1577-1584.
- Yu SJ, Chang YL, Chen YL. (2015) Calcineurin signaling: lessons from *Candida* species. *FEMS Yeast Res.* 15:fov016.
- Yue Q, Li Y, Chen L, Zhang X, Liu X, An Z, Bills GF. (2018) Genomics-driven discovery of a novel self-resistance mechanism in the echinocandin-producing fungus *Pezicula radicicola*. *Environ Microbiol.* 20:3154-3167.
- Zarembek KA, Sugui JA, Chang YC, Kwon-Chung KJ, Gallin JI. (2007) Human polymorphonuclear leukocytes inhibit *Aspergillus fumigatus* conidial growth by lactoferrin-mediated iron depletion. *J Immunol.* 178:6367-6373.
- Zarnowski R, Cooper KG, Brunold LS, Calaycay J, Woods JP. (2008) *Histoplasma capsulatum* secreted gamma-glutamyltransferase reduces iron by generating an efficient ferric reductant. *Mol Microbiol.* 70:352-368.
- Zhang L, Zhou Z, Guo Q, Fokkens L, Miskei M, Pócsi I, Zhang W, Chen M, Wang L, Sun Y, Donzelli BG, Gibson DM, Nelson DR, Luo JG, Rep M, Liu H, Yang S, Wang J, Krasnoff SB, Xu Y, Molnár I, Lin M. (2016) Insights into Adaptations to a near-obligate nematode endoparasitic lifestyle from the finished genome of *Drechmeria coniospora*. *Sci Rep.* 6:23122.

10. Mellékletek

1. melléklet

A törzs jele	Genotípus/eredet	Referencia
<i>Aspergillus fumigatus</i>		
Af293 (FGSC 1100)	klinikai izolátum (humán szisztémás aszpergillózis)	FGSC ^b
<i>Aspergillus nidulans</i>		
FGSC A4	vad típusú törzs (Glasgow wild-type)	FGSC
FGSC A26	<i>biA1</i>	FGSC
FGSC A744	<i>pabaA</i> ; <i>yA2</i> ; <i>fluG1</i>	FGSC
FGSC A1079	<i>biA</i> ; <i>pabaA1</i> ; <i>pyroA4</i> ; <i>AbrLA</i> ; <i>veA</i> ⁺	FGSC
THS30.3 ^a	<i>pyrG89</i> ; <i>AfupyrG</i> ⁺ ; <i>pyroA</i> ⁺ ; <i>veA</i> ⁺	Emri és munkatársai 2015
tNJ11 ^a	<i>biA1</i> ; <i>argB2</i> ; <i>metG1</i> ; <i>argB</i> ⁺	Pócsi és munkatársai 2009
tNJ12	<i>biA1</i> ; <i>argB2</i> ; Δ <i>chiB::argB</i> ⁺ ; <i>metG1</i>	Pócsi és munkatársai 2009
tNJ33.3	<i>pyrG89</i> ; Δ <i>engA::AfupyrG</i> ⁺ ; <i>pyroA4</i> ; <i>veA</i> ⁺	Szilágyi és munkatársai 2010a
tNJ34.8	<i>pyrG89</i> ; Δ <i>engA::AfupyrG</i> ⁺ ; <i>pyroA4</i> ; Δ <i>chiB::AnipyroA</i> ⁺ ; <i>veA</i> ⁺	Szilágyi és munkatársai 2010a
tNJ36.1	<i>pyrG89</i> ; <i>AfupyrG</i> ⁺ ; <i>pyroA4</i> ; <i>veA</i> ⁺ ;	Kwon és munkatársai 2010
tNJ76.7	<i>pyrG89</i> ; Δ <i>pepJ::AfupyrG</i> ⁺ ; <i>pyroA4</i> ; <i>veA</i> ⁺	Szilágyi és munkatársai 2011
tNJ77.16	<i>pyrG89</i> ; Δ <i>prtA::AfupyrG</i> ⁺ ; <i>pyroA4</i> ; <i>veA</i> ⁺	Szilágyi és munkatársai 2011
tNJ78.4	<i>pyrG89</i> ; Δ <i>pepJ::AfupyrG</i> ⁺ ; <i>pyroA4</i> ; Δ <i>prtA::AnipyroA</i> ⁺ ; <i>veA</i> ⁺	Szilágyi és munkatársai 2011
tNJ92.4	<i>pyrG89</i> ; <i>AfupyrG</i> ⁺ ; <i>pyroA4</i> ; Δ <i>atfA::AnipyroA</i> ⁺ ; <i>veA</i> ⁺	Emri és munkatársai 2015
tNJ151_1-3	<i>pyrG89</i> ; Δ <i>AN10444::AfupyrG</i> ⁺ ; Δ <i>AN10444::pyroA</i> ⁺ ; <i>veA</i> ⁺	Spitzmüller és munkatársai 2015a
tNJ188_2-3	<i>pyrG89</i> ; Δ <i>AN5658::AfupyrG</i> ⁺ ; <i>pyroA4</i> ; <i>veA</i> ⁺	Spitzmüller és munkatársai 2015a
tNJ189_1-2	<i>pyrG89</i> ; Δ <i>AN5658::AfupyrG</i> ⁺ ; Δ <i>AN5658::pyroA</i> ⁺ ; <i>veA</i> ⁺	Spitzmüller és munkatársai 2015a
tNJ190_1-3	<i>pyrG89</i> ; Δ <i>AN10444::AfupyrG</i> ⁺ ; <i>pyroA4</i> ; <i>veA</i> ⁺	Spitzmüller és munkatársai 2015a
<i>Aspergillus pachycristatus</i> („<i>A. nidulans</i> var. <i>roseus</i>”)		
ATCC 58397	vad típus (NRRL 11440)	ATCC ^b

A vizsgálatokban felhasznált *Aspergillus* törzsek

^a – A THS és tNJ törzseket Prof. Dr. Jae-hyuk Yu (University of Wisconsin-Madison, Madison, USA) bocsátotta rendelkezésünkre. ^b – FGSC: Fungal Genetic Stock Centre (Kansas City, Missouri, USA) (McCluskey 2003); ATCC: American Type Culture Collection (Manassas, Virginia, USA); NCAIM: Mezőgazdasági és Ipari Mikroorganizmusok Nemzeti Gyűjteménye, MIMNG (National Collection of Agricultural and Industrial Microorganisms) (Szent István Egyetem, Budapest)

2. melléklet

Transzkripciós változás ¹	MSB	MSB <i>t</i> BOOH	MSB <i>t</i> BOOH diamid	Összehasonlított kezelések			Összes kezelés ²
				MSB <i>t</i> BOOH diamid + h-H ₂ O ₂	MSB <i>t</i> BOOH diamid + NaCl	MSB <i>t</i> BOOH diamid + h-H ₂ O ₂ és NaCl	
<i>indukált gének</i>							
6 stresszor esetén							7
5 stresszor esetén						51	88
4 stresszor esetén				161	84	226	221
3 stresszor esetén			393	414	503	535	523
2 stresszor esetén		699 ³	793	856	1031	1012	1004
1 stresszor esetén	1574	1542 ³	2052	2018	2007	1925	1923
összesen:	1574	2241	3238	3449	3625	3749	3766
<i>represszált gének</i>							
6 stresszor esetén							6
5 stresszor esetén						65	84
4 stresszor esetén				103	194	278	300
3 stresszor esetén			480	530	544	543	580
2 stresszor esetén		786	960	1021	985	1031	1069
1 stresszor esetén	1696	1563	1799	1904	1813	1852	1763
összesen:	1696	2349	3239	3558	3536	3769	3802

Az együtt szabályozott gének („co-regulated genes”) száma a kontroll (THS30.3) törzsben

¹ – Azon gének száma, ahol a transzkripciós változás (FC) legalább kétszeres volt a kezeletlen tenyészetekéhez képest. $|\log_2 FC| > 1$; $FC = I_{\text{kezelt}} / I_{\text{kezeletlen}}$; I: normalizált jelintenzitás; $\log_2 FC > 1$ – indukció („up-regulation”), $\log_2 FC < -1$ – represszió (down-reguláció). ² – MSB, *t*BOOH, diamid, l-H₂O₂, h-H₂O₂ és NaCl stressz együtt. ³ – Az együtt szabályozott géneket („co-regulated genes”) kék, a stressz specifikus géneket sárga kiemelés mutatja.

Transzkripció változás ¹	MSB	MSB <i>t</i> BOOH	MSB <i>t</i> BOOH diamid	Összehasonlított kezelések			Összes kezelés ²
				MSB <i>t</i> BOOH diamid	MSB <i>t</i> BOOH diamid	MSB <i>t</i> BOOH diamid	
				+ h-H ₂ O ₂	+ NaCl	+ h-H ₂ O ₂ és NaCl	
<i>indukált gének</i>							
6 stresszor esetén							8
5 stresszor esetén						39	63
4 stresszor esetén				192	69	233	235
3 stresszor esetén			289	331	379	387	399
2 stresszor esetén		561 ³	850	834	951	939	1006
1 stresszor esetén	1001	1781 ³	2103	2104	2138	2141	2149
összesen:	1001	2342	3242	3461	3534	3739	3860
<i>represszált gének</i>							
6 stresszor esetén							10
5 stresszor esetén						111	123
4 stresszor esetén				290	163	289	310
3 stresszor esetén			440	360	552	531	546
2 stresszor esetén		740	918	882	850	779	823
1 stresszor esetén	1050	1354	1523	1510	1516	1497	1489
összesen:	1050	2094	2881	3042	3081	3207	3301

Az együtt szabályozott gének („co-regulated genes”) száma a *ΔatfA* (TNJ92.4) törzsben

¹ – Azon gének száma, ahol a transzkripció változás (FC) legalább kétszeres volt a kezeletlen tenyészetekhez képest. $|\log_2 FC| > 1$; $FC = I_{\text{kezelt}}/I_{\text{kezeletlen}}$; I: normalizált jelintenzitás; $\log_2 FC > 1$ – indukció („up-regulation”), $\log_2 FC < -1$ – represszió (down-reguláció). ² – MSB, *t*BOOH, diamid, l-H₂O₂, h-H₂O₂ és NaCl stressz együtt. ³ – Az együtt szabályozott géneket („co-regulated genes”) kék, a stressz specifikus géneket sárga kiemelés mutatja.

3. melléklet

Gén azonosító	Gén név	Kódolt fehérje	Kontroll törzs			ΔatfA mutáns		
			MSB	tBOOH	Diamid	MSB	tBOOH	Diamid
Relatív transzkripció (ΔΔCP)								
AN1006	niaD	nitrát reduktáz	-1,0 ± 0,5 ¹	-2,2 ± 1,1 ¹	-4,3 ± 1,2 ¹	0,5 ± 0,6	-2,2 ± 0,9 ¹	-1,9 ± 1,1 ¹
AN1007	niiA	nitrit reduktáz	-1,5 ± 0,7 ¹	-1,4 ± 0,7 ¹	-3,2 ± 1,0 ¹	0,2 ± 0,6	-1,9 ± 1,0 ¹	-2,1 ± 1,2 ¹
AN1008	crnA	nitrát transzporter	-4,8 ± 1,2 ¹	-1,1 ± 0,7 ¹	-2,1 ± 0,9 ¹	0,9 ± 0,8 ¹	-2,4 ± 1,1 ¹	-0,5 ± 0,5
AN5296	tcsA	hisztidin kináz	2,7 ± 0,8 ¹	3,1 ± 1,0 ¹	1,9 ± 0,9 ¹	0,6 ± 0,6	1,9 ± 0,8 ¹	-0,1 ± 0,5
AN1800	tcsB	hisztidin kináz	4,2 ± 1,1 ¹	2,2 ± 0,7 ¹	1,3 ± 0,7 ¹	2,4 ± 1,2 ¹	1,4 ± 0,8 ¹	-0,3 ± 0,7
AN3101	phkB	hisztidin kináz	1,5 ± 0,8 ¹	-0,5 ± 0,5	-1,3 ± 0,4 ¹	-0,5 ± 0,6	-0,6 ± 0,6	-1,7 ± 0,8 ¹
AN7945	hk2	hisztidin kináz	4,2 ± 1,1 ¹	-0,4 ± 0,5	-0,1 ± 0,7	0,2 ± 0,7	0,6 ± 0,7	0,4 ± 0,8
AN4113	hk-8-2	hisztidin kináz	2,6 ± 0,5 ¹	-0,4 ± 0,6	0,4 ± 0,6	-0,3 ± 0,7	-1,2 ± 0,7 ¹	-1,1 ± 0,6 ¹
AN6820	hk-8-3	hisztidin kináz	2,9 ± 1,0 ¹	-0,9 ± 0,4 ¹	-2,0 ± 1,1 ¹	0,3 ± 0,6	0,4 ± 0,6	0,9 ± 0,7 ¹
AN2363	hk-8-6	hisztidin kináz	3,5 ± 1,3 ¹	1,8 ± 0,8 ¹	-0,3 ± 0,6	0,6 ± 0,6	0,2 ± 0,7	-0,9 ± 0,5 ¹

A *niaD-niiA-crnA* klaszter és hisztidin kináz gének RT-qPCR-rel meghatározott transzkripció adatai az MSB-tal, tBOOH-dal, illetve dimaiddal kezelt THS30.3 (kontroll), illetve TNJ92.4 (*ΔatfA*) tenyészetekben

¹ – A Student-féle t-teszt alapján a táblázatban feltüntetett ΔACP értékek (átlag ± szórás) szignifikánsan ($p < 0.05$, $n = 4$) eltérnek a nullától.

	Kontroll törzs				<i>ΔatfA</i> mutáns			
	Kezeletlen	MSB	tBOOH	Diamid	Kezeletlen	MSB	tBOOH	Diamid
nitrát reduktáz (mkat/kg protein)	2,6 ± 0,3	1,6 ± 0,3 ¹	0,3 ± 0,1 ¹	0,6 ± 0,1 ¹	2,8 ± 0,3	3,1 ± 0,4 ¹	0,3 ± 0,1 ¹	0,7 ± 0,1 ¹
GR (mkat/kg protein)	3,8 ± 0,5	4,8 ± 0,6 ¹	4,4 ± 0,6 ¹	4,5 ± 0,5 ¹	3,4 ± 0,4	4,6 ± 0,5 ¹	4,8 ± 0,5 ¹	4,6 ± 0,4 ¹
GPx (mkat/kg protein)	0,40 ± 0,04	0,51 ± 0,05 ¹	0,57 ± 0,05 ¹	0,77 ± 0,08 ¹	0,33 ± 0,04	0,46 ± 0,05 ¹	0,58 ± 0,06 ¹	0,44 ± 0,05 ¹
kataláz (kat/kg protein)	0,20 ± 0,02	0,38 ± 0,03 ¹	0,40 ± 0,03 ¹	0,30 ± 0,03 ¹	0,18 ± 0,02	0,43 ± 0,04 ¹	0,44 ± 0,04 ¹	0,43 ± 0,04 ¹

A nitrát reduktáz és néhány antioxidáns enzim specifikus aktivitása az MSB-tal, tBOOH-dal, illetve dimaiddal kezelt THS30.3 (kontroll), illetve TNJ92.4 (*ΔatfA*) tenyészetekben

¹ – A Student-féle t-teszt alapján a táblázatban feltüntetett specifikus enzimaktivitás értékek (átlag ± szórás) szignifikánsan ($p < 0.05$, $n = 3$) eltérnek a kezeletlen tenyészetekben mért specifikus enzimaktivitástól.

4. melléklet

Klaszter ¹	MSB	l-H ₂ O ₂	h-H ₂ O ₂	tBOOH	Diamid	NaCl
<i>kontroll törzs (kezelt vs. kezeletlen)</i>						
AN7884 klaszter	indukció					
benzaldehyd (dba) - F9775 hibrid klaszter 2				indukció		
emicellamid (eas) klaszter	represszió			represszió	represszió	represszió
AN1680 klaszter					indukció	
AN2924 klaszter	represszió				represszió	
AN8209 (wA) klaszter	represszió					
AN12331/AN7838 klaszter		represszió				
Mikroperfuranon (mic) klaszter	represszió					
AN6236 klaszter				indukció		
AN10486 klaszter	indukció			indukció		
“No PKS/NRPS backbone” 4 klaszter					represszió	
<i>ΔatfA mutáns (kezelt vs. kezeletlen)</i>						
AN7884	indukció					
monodiktifenon (mdp) klaszter		indukció	indukció	represszió		represszió
benzaldehyd (dba) - F9775 hibrid klaszter 1			indukció	represszió	represszió	represszió
pkf klaszter		indukció		represszió	represszió	represszió
emicellamid (eas) klaszter			represszió	represszió	represszió	represszió
AN2924 klaszter					represszió	
Mikroperfuranon (mic) klaszter			represszió		represszió	
AN6236 klaszter				indukció		
AN10486 klaszter	indukció			indukció	represszió	
ivo klaszter		indukció		represszió	represszió	represszió

Az oxidatív stressz és a sóstressz hatása a szekunder metabolit klaszterek transzkripciójára a THS30.3 (kontroll), illetve TNJ92.4 (*ΔatfA*) törzsek tenyészetében

¹ –Azon klaszterek, ahol a gének legalább fele és köztük legalább egy kulcsgén is indukálódott/represszáldott (ld. 5. táblázat is).

5. melléklet

Gén ID	Ismert/feltételezett géntermék	Transzkripció változás		
		DNS chip ^a (log ₂ FC)	RT-qPCR (ΔCP)	
			Növekvő tenyészet	Éhező tenyészet
Sejtfal homeosztázis				
AN4367	kitin szintáz (ChsF)	-3,09	-7 ± 0,6	-11 ± 1,2 ^b
AN2523	kitin szintáz (ChsB)	0,92	-4,7 ± 0,6	-7,6 ± 0,7 ^b
AN8710	kitin bioszintézis fehérje	2,32	-2,7 ± 0,6	-3,7 ± 0,7
AN8241	kitináz (ChiA)	-4,94	-4,4 ± 0,5	-8,5 ± 1 ^b
AN4871	kitináz (ChiB)	3,47	-4 ± 0,6	-0,2 ± 0,1 ^b
AN9390	kitináz (ChiC)	4,14	-12,3 ± 1	-11,5 ± 0,9
AN9380	kitin deacetiláz	8,14	-3,1 ± 0,4	-1,6 ± 0,3 ^b
AN1502	N-Acetil-β-D-glükózaminidáz (NagA)	4,69	-4,1± 0,4	-1 ± 0,2 ^b
AN1418	glükózamin-6-foszfát izomeráz	4,39	-3,4 ± 0,4	-1 ± 0,2 ^b
AN1428	N-acetilglükózamin-6-foszfát deacetiláz	6,10	-7,5 ± 1	-4,5 ± 0,6 ^b
AN3729	β-1,3-glükán szintáz (FksA)	1,30	-4,7 ± 0,6	-7,8 ± 0,8 ^b
AN7657	β-1,3-transzglükozidáz (GelA)	-2,82	1,8 ± 0,3	0,4 ± 0,2 ^b
AN7511	β-1,3-transzglükozidáz (GelE)	-3,74	-3,8 ± 0,5	-5,9 ± 0,7 ^b
AN10779	β-1,6-transzglükozidáz	-3,45	-12 ± 1	-14 ± 1,1 ^b
AN7950	β-1,3-glükanáz (EglC)	-2,27	-1,7 ± 0,3	-5,4 ± 0,6 ^b
AN0472	endo-β-1,3-glükanáz (EngA)	2,75	-9 ± 1,3	-2,1 ± 0,4 ^b
AN0245	β-1,3-glükanáz	5,62	-4,8 ± 0,6	-0,8 ± 0,2 ^b

AN0779	exo- β -1,3-glukanáz	1,34	$-2,5 \pm 0,3$	$-1,1 \pm 0,2^b$
AN4825	exo- β -1,3-glukanáz	4,44	$-6,3 \pm 0,7$	$0,6 \pm 0,2^b$
AN3307	α -1,3-glükán szintáz (AgsB)	-4,35	$-2,9 \pm 0,4$	$-6,7 \pm 0,7^b$
AN7349	α -1,3-glukanáz (MutA)	3,66	$-9,8 \pm 1$	$-3,6 \pm 0,3^b$
AN7539	hidrofobin	-2,48	$1,2 \pm 0,2$	$-4,4 \pm 0,4^b$
AN8803	hidrofobin (RodA)	2,74	$-7 \pm 0,7$	$-1,4 \pm 0,2^b$
AN0940	hidrofobin	4,31	$-4,3 \pm 0,5$	$-3,9 \pm 0,4$
AN5666	MAP protein kináz (MpkA)	0,01	$-15,3 \pm 1,2$	$-16,1 \pm 1,3$
AN2984	transzkripció faktor (RlmA)	-1,90	$-1,3 \pm 0,3$	$-1,8 \pm 0,3$

Makroautofágia

AN5174	autofágia fehérje (Atg5)	4,58	$-14 \pm 0,8$	$-12,6 \pm 0,7^b$
AN2876	autofágia fehérje (Atg22)	3,91	$-6,4 \pm 0,5$	$-2,2 \pm 0,2^b$
AN5814	TOR jelátviteli útvonal fehérje (TipA)	2,07	$-4,8 \pm 0,5$	$-2,9 \pm 0,2^b$

Szénhidrát anyagcsere, katabolikus glükóz hasznosítás

AN8041	glicerinaldehid-3-foszfát dehidrogenáz (GpdA)	-3,05	$3,2 \pm 0,4$	$1,4 \pm 0,3^b$
AN5144	6-foszfofrukto-2-kináz (PfkZ)	-2,55	$-5,3 \pm 0,8$	-10 ± 1^b
AN2981	glükóz-6-foszfát dehidrogenáz (GsdA)	-2,37	$0,7 \pm 0,2$	$-0,7 \pm 0,2^b$
AN8275	citrát szintáz (CitA)	-3,54	$-5,1 \pm 0,5$	$-6,2 \pm 0,5^b$
AN2099	alternatív oxidáz (AoxA)	-2,17	$-7 \pm 0,6$	$-8,2 \pm 0,6^b$
AN10585	citokrom C oxidáz	-2,57	$3,9 \pm 0,4$	$2,8 \pm 0,1^b$
AN5523	trehalóz-6-foszfát szintáz (TpsA)	-2,37	$-3 \pm 0,3$	$-4,4 \pm 0,5^b$

AN9340	savas trehaláz (TreA)	2,14	$-3,9 \pm 0,5$	$-2,1 \pm 0,3^b$
AN7396	β -glükózidáz (BglM)	7,47	$-12,6 \pm 1$	$-8,1 \pm 0,7^b$
AN6620	glükózil hidroláz	4,84	$-4 \pm 0,5$	$-3,7 \pm 0,3$
AN2017	α -glükózidáz (AgdA)	3,00	$-5,4 \pm 0,4$	$-5,9 \pm 0,6$
AN5860	kis affinitású glükóz transzporter (MstE)	-4,26	$-3 \pm 0,2$	$-9,4 \pm 0,8^b$
AN8737	nagy affinitású glükóz transzporter (MstA)	4,04	$-6,6 \pm 0,7$	$-3,5 \pm 0,4^b$
AN6923	nagy affinitású hexóz transzporter (HxtA)	2,77	$-5,6 \pm 0,4$	$0,9 \pm 0,2^b$
AN5104	MFS (monoszacharid) transzporter	2,39	$-5,3 \pm 0,6$	$-1 \pm 0,2^b$
AN8347	cukor transzporter	4,77	$-6 \pm 0,7$	$-3,9 \pm 0,4^b$
AN9168	cukor transzporter	1,85	$-6,6 \pm 0,8$	$-2,8 \pm 0,3^b$
AN3357	MFS (monoszacharid) transzporter	-4,78	$-13,1 \pm 0,9$	-15 ± 1^b
AN6669	nagy affinitású glükóz transzporter (MstC)	1,9	$-14,1 \pm 1$	$-14 \pm 1,2$

Lipid anyagcsere

AN8242	lipáz	3,13	$-7,1 \pm 0,8$	$-2,4 \pm 0,4^b$
AN6464	észteráz	5,35	$-12,3 \pm 1$	$-6,5 \pm 0,8^b$
AN4923	hidroximetil-glutaril-CoA szintáz	-3,08	$-0,6 \pm 0,1$	$-4,7 \pm 0,7^b$
AN9408	zsírsav szintáz (FasB)	-3,23	$-0,4 \pm 0,2$	$-1,5 \pm 0,3^b$

Nitrogén anyagcsere

AN1006	nitrát reduktáz (NiaD)	-4,21	$-6,1 \pm 0,7$	$-11 \pm 0,9^b$
AN1007	nitrit reduktáz (NiiA)	-4,33	$3 \pm 0,3$	$-3,5 \pm 0,4^b$
AN1899	4-hidroxifenil-piruvát dioxigenáz (HpdA)	8,58	$-12 \pm 0,9$	$-6,5 \pm 0,6^b$

AN8559	α -ketokarbonsav dehidrogenáz	3,88	$-9,9 \pm 0,8$	$-9,4 \pm 1$
AN5558	alkalikus szerin proteáz (PrtA)	4,58	$-4,9 \pm 0,5$	$-0,6 \pm 0,2^b$
AN7962	metalloproteináz (PepJ)	2,47	$-4 \pm 0,4$	$-1 \pm 0,2^b$
AN3393	metalloproteináz (PepI)	4,22	$-11,9 \pm 1,2$	$-7,4 \pm 0,7^b$
AN8445	aminopeptidáz	5,33	$-5,7 \pm 0,7$	$-1 \pm 0,2^b$
AN6438	dipeptidil-peptidáz	3,93	$-3 \pm 0,3$	$1,5 \pm 0,1^b$
AN2572	dipeptidil-peptidáz	4,96	$-12,1 \pm 1,1$	$-9,8 \pm 0,9^b$
AN8498	proteináz	1,87	$-2,7 \pm 0,3$	$-1 \pm 0,2^b$
AN2237	karboxipeptidáz	0,66	$-3,6 \pm 0,4$	$-2,6 \pm 0,4^b$
AN2092	prolil aminopeptidáz (PapA)	4,48	$-15,5 \pm 1,3$	$-14,5 \pm 1,2$
AN4282	aminopeptidáz	5,05	$-11,3 \pm 0,9$	$-10,2 \pm 1$
AN1723	ribonukleáz	7,48	$-7,8 \pm 0,8$	$-2,7 \pm 0,2^b$
AN11897	ribonukleáz	4,11	$-3,3 \pm 0,4$	$-2 \pm 0,1^b$
AN11062	ribonukleáz	7,21	$-5,9 \pm 0,6$	$-0,9 \pm 0,2^b$
AN4809	glutamináz (GtaA)	3,66	$-6,4 \pm 0,6$	$-1,9 \pm 0,3^b$

Fehérjék feltekeredése, poszttranszlációs módosítása, intracelluláris transzportja

AN7436	diszulfid izomeráz (PdiA)	2,52	$-5,1 \pm 0,5$	$-1,6 \pm 0,3^b$
AN9397	transzkripciós faktor (HacA)	2,28	$-2,6 \pm 0,2$	$-1,2 \pm 0,1^b$
AN0787	α -1,2- mannozidáz (Mns1B)	4,31	$-2,5 \pm 0,3$	$-0,2 \pm 0,1^b$
AN2738	COPII vezikulum fehérje (Erv46)	3,25	$-4,5 \pm 0,5$	$-3,1 \pm 0,4^b$
AN1117	COPII vezikulum fehérje (SurF4/Erv29)	2,47	$-2,1 \pm 0,2$	$-0,8 \pm 0,1^b$

Redox homeosztázis

AN3150	γ -glutamil-cisztein szintáz	-1,40	$-3,6 \pm 0,4$	$-3,9 \pm 0,3$
AN5658	γ -glutamiltranszpeptidáz-szerű fehérje	2,97	$-5,4 \pm 0,5$	$-3,2 \pm 0,4^b$
AN10444	γ -glutamiltranszpeptidáz	3,04	$-5,6 \pm 0,6$	$-2,8 \pm 0,2^b$
AN5652	5-oxoprolináz	3,44	$-2,5 \pm 0,4$	$-4,6 \pm 0,6^b$
AN8218	tioredoxin reduktáz (TrxB)	2,79	$-3 \pm 0,4$	$-2,5 \pm 0,3$
AN0241	CuZn-SOD (SodA)	-0,58	$-0,1 \pm 0,1$	$-2,2 \pm 0,3^b$
AN5577	Mn-SOD (SodB)	-2,50	$-4 \pm 0,3$	$-1,7 \pm 0,2^b$
AN1131	CuZn-SOD	4,57	$-3,8 \pm 0,5$	$-0,3 \pm 0,1^b$
AN8637	kataláz (CatA)	-4,86	$-9,3 \pm 1$	$-15,6 \pm 1,3^b$
AN9339	kataláz (CatB)	-2,48	$-3 \pm 0,4$	$-6 \pm 0,5^b$
AN5918	kataláz (CatC)	3,93	$-5,5 \pm 0,7$	$-4,5 \pm 0,6$
AN10220	citokróm C peroxidáz	3,14	-	-

Szekunder anyagcsere, interspecifikus interakciók

AN10576	NRPS (IvoA)	4,20	$-8,2 \pm 0,8$	$-2,9 \pm 0,4^b$
AN2091	tirozin dekarboxiláz	4,08	$-3,9 \pm 0,3$	$-3,4 \pm 0,4$
AN0230	tirozináz	4,07	$-5,6 \pm 0,7$	$0,4 \pm 0,1^b$
AN9129	NRPS	3,91	$-11,3 \pm 1,1$	$-5,4 \pm 0,6^b$
AN7820	transzkripció faktor (AflR)	2,62	$-6 \pm 0,7$	$-0,3 \pm 0,1^b$
AN6470	N,O-diacetil-muramidáz	7,16	$-9,1 \pm 1$	$-2,2 \pm 0,4^b$
AN5046	anizin-1	4,96	$-7,5 \pm 0,8$	$-2,5 \pm 0,3^b$
AN11510	defenzin-szerű fehérje	4,95	$-12,8 \pm 1,2$	$-5,6 \pm 0,5^b$

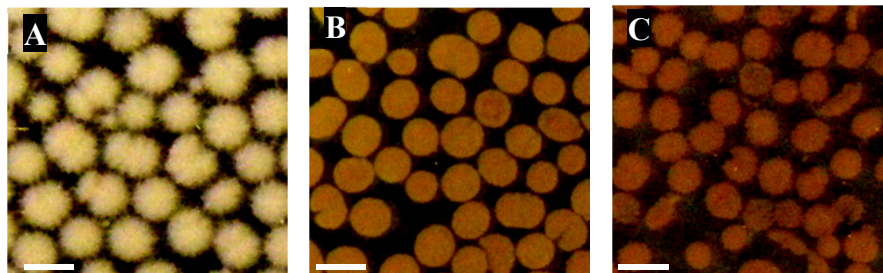
Egyéb

AN1414	transzkripció faktor (XprG)	2,36	$-2,2 \pm 0,3$	$-0,8 \pm 0,2^b$
AN0973	transzkripció faktor (BrlA)	4,28	-8 ± 1	$-2,2 \pm 0,3^b$
AN2265	szerin/treonin protein kináz	2,20	$-5,5 \pm 0,5$	$0,1 \pm 0,2^b$
AN4255	regulatórikus hexokináz (HxkC)	4,36	-	-
AN5457	NADPH oxidáz (NoxA)	1,00	$-0,4 \pm 0,2$	$-0,7 \pm 0,2$
AN5712	metakaspáz (CasA)	0,48	$1 \pm 0,2$	$0,8 \pm 0,2$

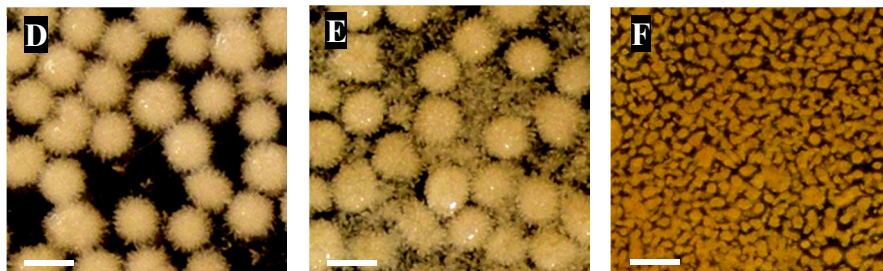
Néhány kiválasztott gén DNS chip, illetve RT-qPCR segítségével meghatározott transzkripció adata
^a – Az indukálódott és represszálódott gének teljes listája és a transzkripció változásuk adatai a Szilágyi és munkatársai (2013) közlemény mellékletében találhatóak. ^b – Szignifikáns eltérés (Student-féle t-teszt; $p < 0,05$; $n = 4$) a növekedő és a szénéhező tenyészetek RT-qPCR-rel meghatározott $\Delta\Delta CP$ értékei (átlag $\pm$ szórás) között.

6. melléklet

szénéhező tenyészet



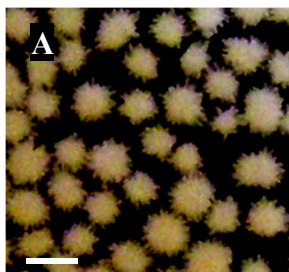
40 g/l glükóz



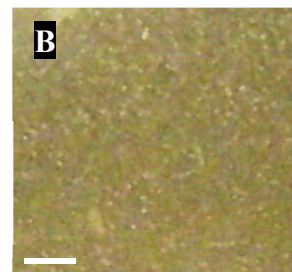
A *Trichoderma* litikáz (Sigma-Aldrich Kft, Budapest) hatása az *A. nidulans* FGSC A4 melanin termelésére és pellet morfológiájára

A kései exponenciális fázisú micéliumot szénforrás mentes (A-C), illetve 40 g/l glükózt tartalmazó (D-F) tápközegbe mostuk át (0 h). A szénéhező tenyészetekhez 0 mg/ml (A), 25 mg/ml (B), illetve 50 mg/ml (C) *Trichoderma* litikázt (Sigma-Aldrich Kft, Budapest) adtunk. A glükózos tenyészetek esetében a kezelést a tenyészetekhez adott 0 mg/ml (D), 5 mg/ml (E), illetve 25 mg/ml (F) *Trichoderma* litikázzal végeztük el. A reprezentatív fotók az átmosást követő 24. órában készültek. Bár = 2 mm

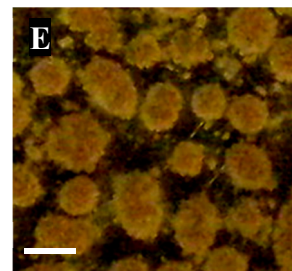
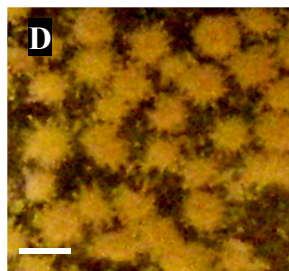
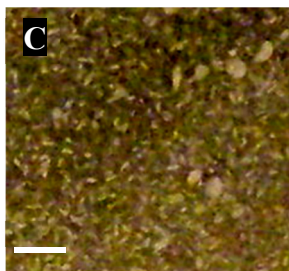
kontroll



litikáz



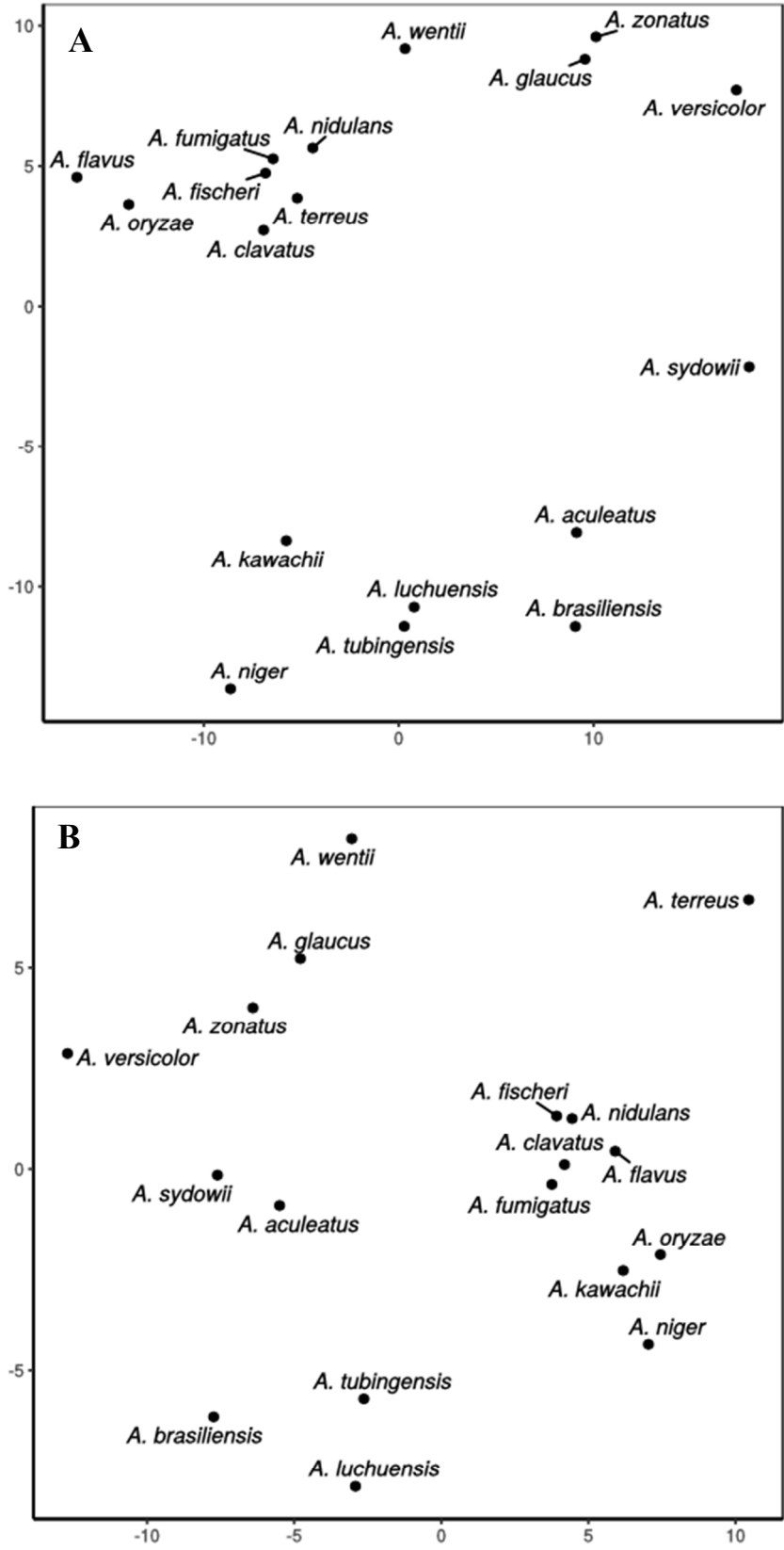
litikáz és melanin

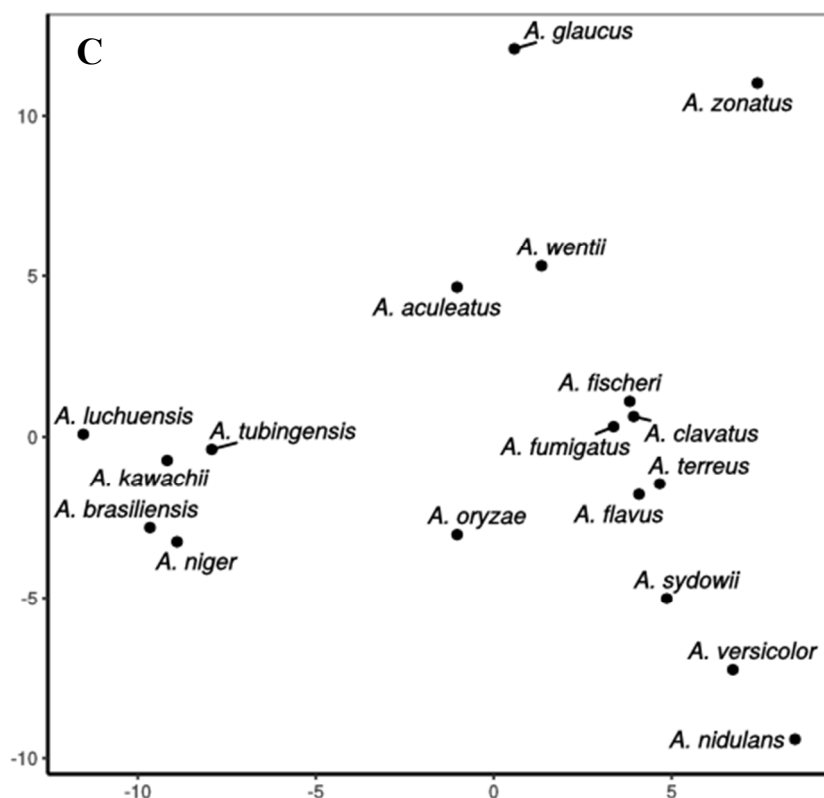


A DOPA melanin hatása a *Trichoderma* litikázzal kezelt *A. nidulans* FGSC A26 tenyészetek pellet morfológiájára

A kései exponenciális fázisú micéliumot 40 g/l glükózt tartalmazó minimál tápközegbe mostuk át (0 h). A növekvő tenyészetekhez 12 mg/ml *Trichoderma* litikázt (Sigma-Aldrich Kft, Budapest) (B), vagy 12 mg/ml *Trichoderma* litikáz mellett 25 mg/ml melanint (C), 100 mg/ml melanint (D), illetve 200 mg/ml melanint adtunk. Az „A” jelű tenyészet (kontroll) sem litikázzal sem melaninnal nem volt kezelve. A reprezentatív fotók az átmosást követő 24. órában készültek. Bár = 2 mm

7. melléklet

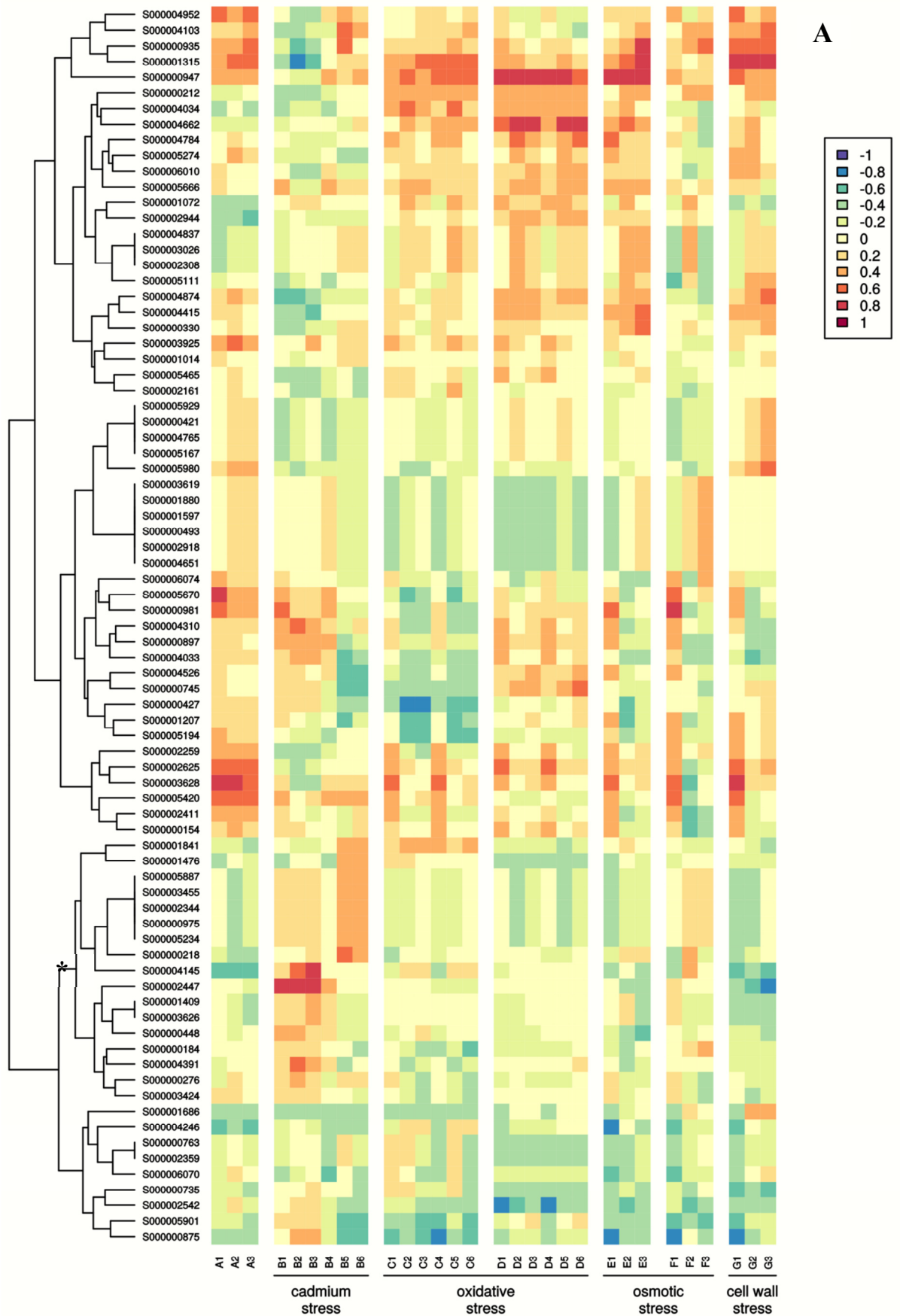


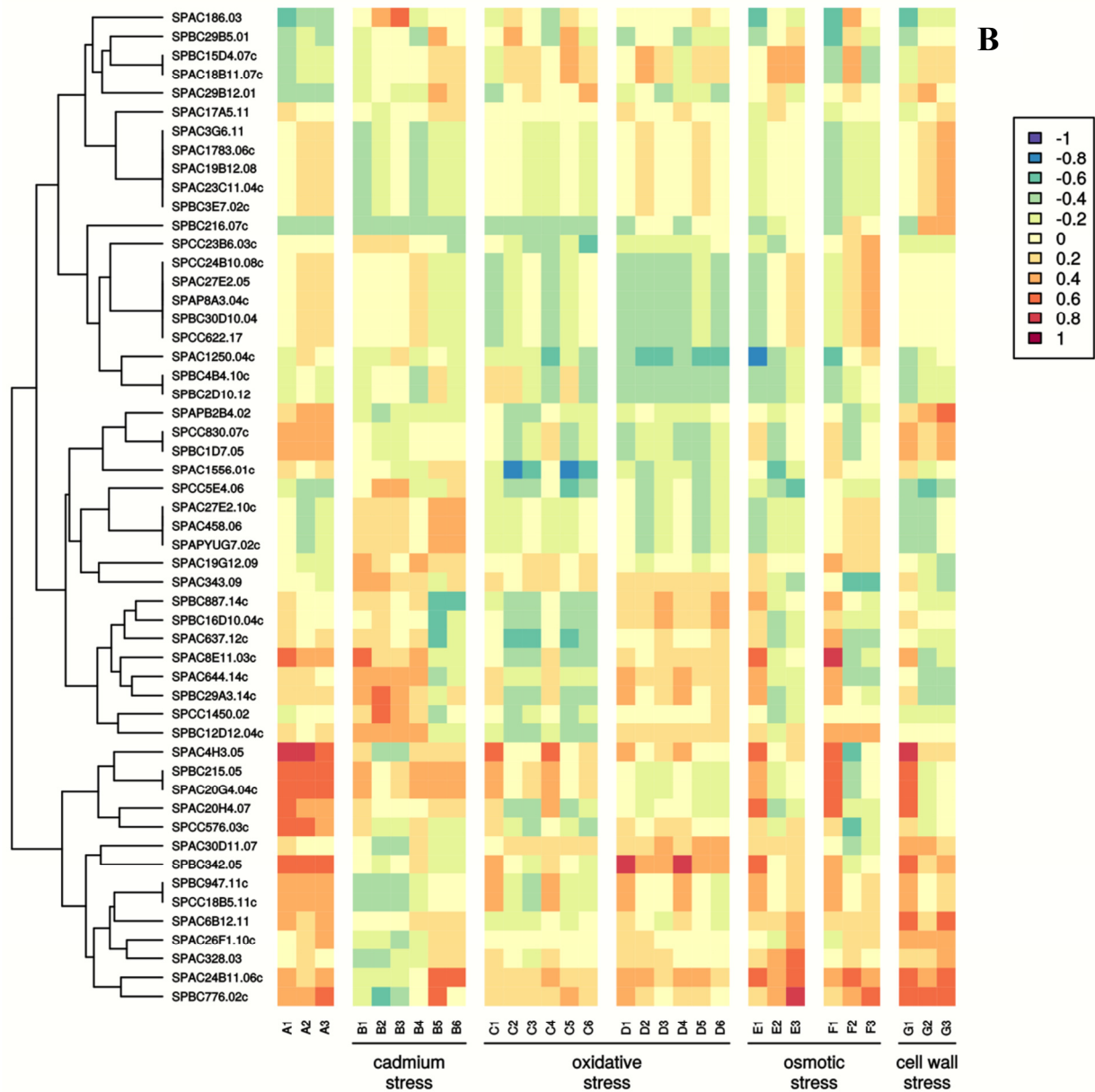


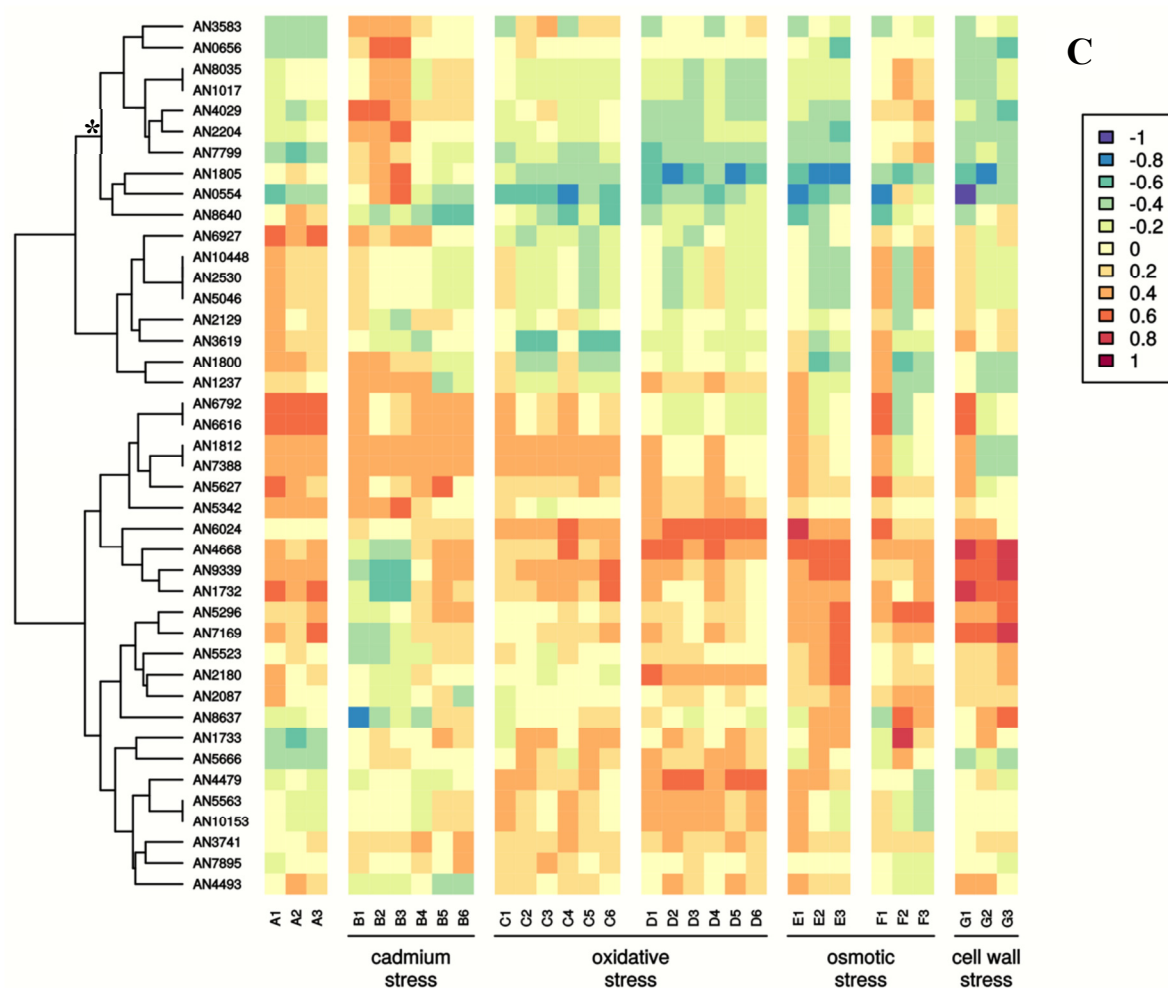
A vizsgált *Aspergillus* fajok stresszgén ortológ számok szerinti MDS-a

Az MDS diagrammok a *S. cerevisiae* (A), a *S. pombe* (B) és az *A. nidulans* (C) modellekben szereplő fehérjék ortológjainak száma alapján számolt Manhattan távolságmátrixok felhasználásával készültek. A távolságmátrixok létrehozásához az R statisztikai programcsomag „dist” függvényét, az MDS-hez a „cmdscale” függvényt használtuk. A *S. cerevisiae*, *S. pombe* és az *A. nidulans* modellek adatai az Emri és munkatársai (2018b) közlemény mellékletében érhetők el.

8. melléklet







A *S. cerevisiae* (A), a *S. pombe* (B) és az *A. nidulans* (C) modellekben szereplő fehérjék ortológjainak száma és a vizsgált stressz-paraméterek közötti Spearman-féle korrelációs koefficiensek

Azon fehérjék adatai, ahol az ortológok számában egyik *Aspergillus* faj esetében sem volt eltérés nincsenek feltüntetve. A fehérjék a hozzájuk tartozó korrelációs koefficiensek alapján számolt Euklideszi távolságok alapján lettek klaszterezve (Emri és munkatársai 2018b). A korrelációs koefficiensek táblázatos formában az Emri és munkatársai (2018b) közlemény mellékletében érhetőek el.

A1-3: kezeletlen tenyészetek, normalizált telepátmérők (37 °C 5 d, 25 °C 5 d, 25 °C 10 d)

B1-3: CdCl₂ stressz, normalizált MIC₅₀ adatok (37 °C 5 d, 25 °C 5 d, 25 °C 10 d)

B4-6: CdCl₂ stressz, normalizált MIC₉₀ adatok (37 °C 5 d, 25 °C 5 d, 25 °C 10 d)

C1-3: MSB stressz, normalizált MIC₅₀ adatok (37 °C 5 d, 25 °C 5 d, 25 °C 10 d)

C4-6: MSB stressz, normalizált MIC₉₀ adatok (37 °C 5 d, 25 °C 5 d, 25 °C 10 d)

D1-3: H₂O₂ stressz, normalizált MIC₅₀ adatok (37 °C 5 d, 25 °C 5 d, 25 °C 10 d)

D4-6: H₂O₂ stressz, normalizált MIC₉₀ adatok (37 °C 5 d, 25 °C 5 d, 25 °C 10 d)

E1-3: szorbitol stressz, normalizált relatív növekedési ráta értékek (37 °C 5 d, 25 °C 5 d, 25 °C 10 d)

F1-3: NaCl stressz, normalizált relatív növekedési ráta értékek (37 °C 5 d, 25 °C 5 d, 25 °C 10 d)

G1-3: Kongó Vörös stressz, normalizált relatív növekedési ráta értékek (37 °C 5 d, 25 °C 5 d, 25 °C 10 d)

A “*” jel mutatja azon fehérjék csoportját ahol az ortológok száma a CdCl₂-os kezeléssel mutat csak (valamennyi) pozitív korrelációt.

9. melléklet

összehasonlítás	indukálódott, represszáldott génok száma		indukálódott génokportok ¹	represszáldott génokportok ¹
-Fe/-H ₂ O ₂ vs. +Fe/-H ₂ O ₂	1107	1383	szekunder anyagcsere, drog/toxin transzport, fémion homeosztázis, ferrisziderofór transzport, Asp lebontás	transzláció, riboszóma biogenezis, FeS klaszter kötő fehérjék, hem kötő fehérjék, citokróom P450-függő detoxifikáció, kataláz, légzés, citromsav ciklus, szekunder anyagcsere, melanin anyagcsere
+Fe/+H ₂ O ₂ vs. +Fe/-H ₂ O ₂	347	339	szekunder anyagcsere	szekunder anyagcsere, ferrisziderofór transzport, fémion homeosztázis, extracelluláris polisacharid lebontás
-Fe/+H ₂ O ₂ vs. -Fe/-H ₂ O ₂	2125	2028	hősokk válasz, oxidatív stresszválasz, DNS repair, proteoszómális fehérje lebontás, vakuoláris transzport, makroautofágia	transzláció, riboszóma biogenezis, allantoin és allantoinát transzport, Gln lebontás, szekunder anyagcsere, vitamin/kofaktor transzport, zsírsav anyagcsere, virulencia faktorok,
-Fe/+H ₂ O ₂ vs. +Fe/-H ₂ O ₂	2420	2344	proteoszómális fehérje lebontás, hősokk válasz, vakuoláris transzport, transzkripció iniciációja, vakuólum, DNS repair	transzláció, riboszóma biogenezis, allantoin és allantoinát transzport, virulencia faktorok, FeS klaszter kötő fehérjék, hem kötő fehérjék, citokróom P450-függő detoxifikáció, légzés, citromsav ciklus, szekunder anyagcsere

Az oxidatív stressz, a vaséhezés és a vaséhezéssel kombinált oxidatív stressz hatása az *A. fumigatus* transzkriptómára - A génokport dúsulási vizsgálatok fontosabb eredményei

¹ – A táblázat csak néhány fontosnak ítélt génokportot tartalmaz. E génokportok génjei szignifikáns (Fisher-féle egzakt teszt; $p < 0,05$) dúsulást mutattak az adott összehasonlításban indukálódott/represszáldott génok csoportján belül. A génokport dúsulási vizsgálatok részletes adatai, melyek a FunCat kategóriák mellett a GO és KEGG kategóriákkal végzett elemzéseket is tartalmazzák a Kurucz és munkatársai (2018a) közleményének mellékletében érhetőek el.

10. melléklet

A géncsoport ¹ neve	mérete ²	a géncsoportba tartozó gének viselkedése ³			
		-Fe/-H ₂ O ₂	+Fe/+H ₂ O ₂	-Fe/+H ₂ O ₂	-Fe/+H ₂ O ₂
		vs. +Fe/-H ₂ O ₂	vs. +Fe/-H ₂ O ₂	vs. +Fe/-H ₂ O ₂	vs. -Fe/-H ₂ O ₂
Antioxidáns enzimek	31	1/12	0/1	16/10	12/0
Fe transzport	35	20/7	0/11	23/7	10/5
FeS klaszter szintézis	15	0/5	0/0	6/2	12/0
Hem bioszintézis	11	0/4	0/0	0/4	1/2
FeS klaszter kötő fehérjék	43	0/21	0/0	11/20	14/4
Hem kötő fehérjék	64	8/22	4/3	12/28	9/22
Citromsav ciklus	36	3/12	1/0	6/21	9/15
Légzés	53	1/15	0/0	6/18	9/3
Ergoszterin bioszintézis	21	7/3	0/0	8/10	5/8
Zn transzport	9	2/5	0/1	2/5	1/2
Drog transzport	25	8/1	2/0	12/5	7/10

Az oxidatív stressz, a vaséhezés és a vaséhezéssel kombinált oxidatív stressz hatása az *A. fumigatus* néhány kiválasztott géncsoportjához tartozó génjének transzkripciójára

¹ – A táblázat csak néhány fontosnak ítélt géncsoportot tartalmaz. Részletesebb adatsorok a Kurucz és munkatársai (2018a) közlemény mellékleteiben érhetők el. Ld. 17. táblázat is. ² – Az adott géncsoportba tartozó gének száma ³ – A számok a géncsoporthoz tartozó indukálódott/represszáldott gének számát mutatják. Indukció/represszió: legalább kétszeres transzkripciós változást mutató differenciáltan expresszáldott gének; indukálódott gének esetében log₂ FC > 1, represszáldott gének esetében log₂ FC < -1.

11. melléklet

Génazonosító	Gén név	Transzkripció (log ₂ FC) ¹				Ismert/feltételezett funkció ²
		-Fe/-H ₂ O ₂	+Fe/+H ₂ O ₂	-Fe/+H ₂ O ₂	-Fe/+H ₂ O ₂	
		vs. +Fe/-H ₂ O ₂	vs. +Fe/-H ₂ O ₂	vs. +Fe/-H ₂ O ₂	vs. +Fe/-H ₂ O ₂	
Antioxidáns enzimek						
Afu4g09110	<i>ccp1</i>	-5,886	-0,208	-2,918	2,968	citokróm c peroxidáz
Afu2g00200		0,000	0,000	0,000	0,000	kataláz
Afu3g02270	<i>cat1</i>	-6,033	-0,529	-2,400	3,633	kataláz
Afu6g03890	<i>catA</i>	-1,345	-0,003	-1,473	-0,128	kataláz
Afu8g01670	<i>cat2</i>	-4,820	0,301	5,743	10,563	kataláz-peroxidáz
Afu1g11640		-0,227	-0,100	-1,759	-1,532	SOD
Afu1g14550	<i>sod3</i>	-6,620	-2,079	-5,848	0,772	SOD
Afu4g11580	<i>sod2</i>	-0,537	0,300	2,081	2,618	SOD
Afu5g09240	<i>sod1</i>	2,345	0,464	3,505	1,160	SOD
Afu6g07210	<i>sod4</i>	-1,244	-0,260	-1,467	-0,223	SOD
Afu3g12270		-1,143	-0,174	2,784	3,927	GPx
Afu3g12270		-1,143	-0,174	2,784	3,927	GPx
Afu1g15960		-0,627	0,100	1,070	1,697	GR
Afu3g14970		0,614	0,070	2,286	1,672	Trx
Afu5g11320	<i>aspf29</i>	-1,145	-0,481	2,083	3,228	Trx
Afu8g01090		0,804	0,368	-1,061	-1,865	Trx
Afu4g08580	<i>prx1</i>	-0,963	-0,692	-1,804	-0,841	Prx
Afu5g01440		-0,754	0,073	-1,420	-0,666	Prx
Afu8g07130		-0,770	-0,349	-0,922	-0,151	Prx
Afu4g12990	<i>trr1</i>	0,172	-0,354	5,157	4,984	TrxR
Afu6g07840		0,814	0,272	2,028	1,214	metionin-szulfoxid reduktáz
Afu1g06100		-1,159	0,162	0,688	1,847	egyéb
Afu1g09090		0,773	0,181	2,849	2,076	egyéb
Afu2g14960		0,031	-0,275	1,680	1,649	egyéb
Afu4g05950		-0,289	0,018	-0,382	-0,092	egyéb
Afu5g15070		-1,180	0,579	2,247	3,427	egyéb

Afu6g02280	<i>aspf3</i>	-0,178	-0,683	4,142	4,320	egyéb
Afu6g02280	<i>aspf3</i>	-0,178	-0,683	4,142	4,320	egyéb
Afu6g10300	<i>aspf28</i>	0,204	-0,124	-1,087	-1,291	egyéb
Afu6g11590		-1,139	-0,078	-0,318	0,821	egyéb
Afu6g13570		0,442	-0,565	1,853	1,412	egyéb
Fe transzport						
Afu1g04450	<i>sidL</i>	-1,324	-0,184	1,629	2,953	szideroför bioszintézis
Afu1g17190	<i>sidI</i>	7,040	-1,010	7,351	0,310	szideroför bioszintézis
Afu1g17200	<i>sidC</i>	2,761	-0,311	3,194	0,433	szideroför bioszintézis
Afu2g07680	<i>sidA</i>	3,602	-0,731	4,356	0,753	szideroför bioszintézis
Afu2g08590	<i>pptA</i>	0,088	0,213	-2,262	-2,350	szideroför bioszintézis
Afu3g03390	<i>sidJ</i>	4,917	-1,867	6,879	1,962	szideroför bioszintézis
Afu3g03400	<i>sidF</i>	7,036	-0,701	7,812	0,776	szideroför bioszintézis
Afu3g03410	<i>sidH</i>	6,580	-1,353	6,484	-0,096	szideroför bioszintézis
Afu3g03420	<i>sidD</i>	7,361	-1,296	8,303	0,942	szideroför bioszintézis
Afu3g03650	<i>sidG</i>	5,692	-2,129	4,200	-1,492	szideroför bioszintézis
Afu8g02760	<i>amcA</i>	3,636	-0,173	3,487	-0,148	szideroför bioszintézis
Afu3g11430	<i>agaA</i>	0,451	0,776	3,034	2,583	szideroför bioszintézis
Afu2g03700	<i>hmgI</i>	0,817	0,428	-0,144	-0,961	szideroför bioszintézis
Afu1g11230	<i>hmg2</i>	2,286	0,466	0,204	-2,082	szideroför bioszintézis
Afu2g05730	<i>mirC</i>	2,072	0,005	2,260	0,188	ferriszideroför transzport
Afu3g03440	<i>mirD</i>	6,219	-1,370	7,003	0,783	ferriszideroför transzport
Afu3g03640	<i>mirB</i>	4,798	-1,380	4,660	-0,138	ferriszideroför transzport
Afu7g06060	<i>sitI</i>	2,834	-1,353	3,000	0,165	ferriszideroför transzport
Afu1g17270	<i>freB</i>	4,572	-0,877	4,263	-0,309	RIA
Afu5g03790	<i>fetC</i>	0,333	-0,821	1,225	0,892	RIA
Afu5g03800	<i>ftrA</i>	0,291	-1,104	2,180	1,889	RIA
Afu2g01260	<i>srbA</i>	0,682	-0,344	0,860	0,179	transzkripció faktor
Afu5g03920	<i>hapX</i>	3,350	-0,219	4,002	0,652	transzkripció faktor
Afu5g11260	<i>sreA</i>	-3,628	-0,385	-1,837	1,791	transzkripció faktor
Afu3g09970		-2,341	-0,820	-1,777	0,564	egyéb

Afu4g10510		-0,458	-0,168	0,938	1,395	egyéb
Afu4g12530	<i>cccA</i>	-4,285	-0,233	-0,371	3,914	egyéb
Afu6g02820		-1,219	0,306	-1,052	0,168	egyéb
Afu6g12870	<i>atm1</i>	1,557	0,021	3,471	1,914	egyéb
Afu6g13750		-3,762	-0,378	-5,641	-1,879	egyéb
Afu8g01310		-7,293	-1,721	-8,390	-1,097	egyéb
Afu3g03660	<i>estB</i>	2,756	-1,035	5,235	2,480	egyéb
Afu6g02170		1,737	0,096	-1,881	-3,617	egyéb
Afu5g12920		0,860	0,177	1,278	0,418	egyéb
Afu6g12550		1,895	-0,316	4,357	2,463	egyéb

ergoszterin bioszintézis

Afu4g06890	<i>cyp51A</i>	-1,135	-0,097	-0,989	0,146	C-14 α szterin demetiláz
Afu7g03740	<i>cyp51B</i>	-0,433	-0,112	-1,082	-0,649	C-14 α szterin demetiláz
Afu5g07780	<i>erg1</i>	-1,115	-0,127	0,221	1,336	Szkvalén monooxygenáz
Afu1g04720	<i>erg2</i>	0,251	-0,392	-1,793	-2,045	C-8 szterin izomeráz
Afu6g05140	<i>erg3A</i>	2,024	-0,362	2,838	0,814	C-5 szterin deszaturáz
Afu2g00320	<i>erg3B</i>	1,640	-0,536	3,189	1,549	C-5 szterin deszaturáz
Afu8g01070	<i>erg3C</i>	0,780	0,073	1,465	0,685	C-5 szterin deszaturáz
Afu5g14350	<i>erg4A</i>	0,478	-0,168	-1,433	-1,911	C-24(28) szterin reduktáz
Afu1g07140	<i>erg4B</i>	-0,321	-0,313	-1,576	-1,255	C-24(28) szterin reduktáz
Afu1g03950	<i>erg5</i>	-0,278	-0,331	-1,166	-0,887	C-22 szterin deszaturáz
Afu4g03630	<i>erg6</i>	-0,518	0,429	-2,200	-1,683	C-24 szterin metiltranszferáz
Afu5g04080	<i>erg7A</i>	-0,572	-0,270	-2,595	-2,023	Oxidoszqualén-lanoszterin cikláz
Afu4g12040	<i>erg7B</i>	-0,202	0,261	4,204	4,406	Oxidoszqualén-lanoszterin cikláz
Afu4g14770	<i>erg7C</i>	-3,638	0,545	-7,410	-3,771	Oxidoszqualén-lanoszterin cikláz
Afu1g03150	<i>erg24A</i>	2,288	-0,502	4,118	1,830	C-14 szterin reduktáz
Afu1g05720	<i>erg24B</i>	1,268	-0,781	-0,593	-1,861	C-14 szterin reduktáz
Afu4g04820	<i>erg25B</i>	1,605	0,062	2,000	0,396	C-4 metilszterin oxidáz
Afu8g02440	<i>erg25B</i>	1,011	-0,644	2,611	1,600	C-4 metilszterin oxidáz
Afu2g15030	<i>erg26A</i>	-0,457	-0,275	-1,659	-1,202	C-3 szterin dehidrogenáz/C-4 dekarboxiláz

Afu2g17400	<i>erg26B</i>	2,531	-0,439	2,478	-0,052	C-3 szterin dehidrogenáz/C-4 dekarboxiláz
Afu1g11500	<i>erg27</i>	-0,543	-0,704	-1,261	-0,718	3-ketoszteroid redukáz
transzkripció faktorok³						
Afu2g05830	<i>acuK</i>	-0,482	-0,257	-1,628	-1,146	transzkripció faktor
Afu3g11330	<i>atfA</i>	-1,035	-0,271	1,214	2,249	transzkripció faktor
Afu5g12960	<i>atfB</i>	3,263	-0,170	3,997	0,734	transzkripció faktor
Afu6g12150	<i>atfD</i>	0,440	-0,629	-0,707	-1,147	transzkripció faktor
Afu1g16590	<i>brlA</i>	-3,354	0,158	-5,243	-1,889	transzkripció faktor
Afu4g12470	<i>cpcA</i>	1,373	-0,191	0,924	-0,449	transzkripció faktor
Afu1g13510	<i>facB</i>	-2,675	-0,021	-2,948	-0,273	transzkripció faktor
Afu8g04130	<i>farB1</i>	-1,030	0,133	0,732	1,762	transzkripció faktor
Afu1g00410	<i>farB2</i>	-1,045	0,167	0,828	1,872	transzkripció faktor
Afu8g05800	<i>finA</i>	0,273	-0,115	-0,774	-1,046	transzkripció faktor
Afu2g14680	<i>flbB</i>	0,036	-0,341	-1,514	-1,550	transzkripció faktor
Afu8g00420	<i>fumR</i>	1,409	0,994	-0,735	-2,144	transzkripció faktor
Afu6g09630	<i>gliZ</i>	-3,089	0,416	-3,262	-0,173	transzkripció faktor
Afu5g03920	<i>hapX</i>	3,350	-0,219	4,002	0,652	transzkripció faktor
Afu3g12890	<i>hasA</i>	1,365	0,710	1,938	0,573	transzkripció faktor
Afu5g01900	<i>hsf1</i>	0,022	-0,028	1,061	1,039	transzkripció faktor
Afu4g10110	<i>htfA</i>	-0,441	1,109	0,392	0,833	transzkripció faktor
Afu4g06530	<i>metR</i>	-0,352	-0,042	0,900	1,252	transzkripció faktor
Afu7g00130	<i>nscR</i>	2,578	4,571	3,519	0,941	transzkripció faktor
Afu4g10120	<i>prrT</i>	-2,725	-0,294	-5,248	-2,523	transzkripció faktor
Afu4g09710	<i>rosA</i>	3,085	-0,884	2,453	-0,633	transzkripció faktor
Afu5g11260	<i>sreA</i>	-3,628	-0,385	-1,837	1,791	transzkripció faktor
Afu5g06190	<i>steA</i>	0,958	0,042	-0,835	-1,793	transzkripció faktor
Afu2g07900	<i>stuA</i>	-0,175	-0,335	-1,401	-1,226	transzkripció faktor
Afu4g14540	<i>tpcE</i>	-5,534	0,652	-4,422	1,112	transzkripció faktor
Afu6g09930	<i>yap1</i>	-0,309	-0,381	1,529	1,838	transzkripció faktor

Az oxidatív stressz, a vaséhezés és a vaséhezéssel kombinált oxidatív stressz hatása az *A. fumigatus* antioxidáns enzimeit, a vas transzportban résztvevő fehérjéit, valamint az szkvalén→ergoszterin bioszintézisben résztvevő enzimeit kódoló gének transzkripciójára

¹ – A táblázatban az RNS szekvenálás segítségével meghatározott $\log_2FC$ értékek szerepelnek. Az indukciót, illetve repressziót piros, illetve kék színek jelölik. Indukció/represszió: legalább kétszeres transzkripciós változást mutató, differenciáltan expresszáldott gének; indukálódott gének esetében $\log_2 FC > 1$, represszáldott gének esetében $\log_2 FC < -1$. Részletesebb adatsorok a Kurucz és munkatársai (2018a) közlemény mellékleteiben érhetők el. ² – A gének által kódolt fehérjék ismert, vagy feltételezett funkciói az *Aspergillus* Genome Database (<http://www.aspergillusgenome.org>) információi alapján lettek meghatározva. ³ – A vizsgálatokban összesen 222 transzkripciós faktor génje indukálódott/represszáldott (Kurucz és munkatársai 2018b).