

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

A glutation anyagcsere, az enzim szekréció és a szekunder metabolit termelés szabályozásának vizsgálata szénstressznek kitett *Aspergillus nidulans* tenyészetekben

Gila Csaba Barnabás

Témavezető: Prof. Dr. Emri Tamás



DEBRECENI EGYETEM

TÁPLÁLKOZÁS- ÉS ÉLELMISZERTUDOMÁNYI DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2025

*„Aki keres, majdnem biztosan talál,
csak nem éppen mindig azt,
aminek a keresésére indult.”*

J. R. R. Tolkien

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	4
1. Bevezetés és célkitűzés	5
1.1. Bevezetés.....	5
1.2. Célkitűzés	8
2. Irodalmi áttekintés	11
2.1. Az <i>Aspergillus</i> nemzetség rövid bemutatása.....	11
2.2. Az <i>A. nidulans</i> fonalas gomba modell jellemzése.....	13
2.3. A glutation-metabolizmus és annak stresszfiziológiai jelentősége	16
2.4. A fonalas gombák szénstressz válaszai	18
2.5. A növényi sejtfal-poliszacharidok hasznosítása.....	21
3. Anyagok és módszerek.....	24
3.1. A vizsgálatokhoz felhasznált törzsek és tenyésztésük	24
3.2. A felületi tenyészetek stresszérzékenységének meghatározása	25
3.3. A konídiumtermelés vizsgálata	25
3.4. RNS-izolálás	26
3.5. Reverz transzkripciót követő kvantitatív PCR (RT-qPCR)	26
3.6. Újgenerációs RNS-szekvenálás (RNAseq).....	27
3.7. A transzkriptomikai adatok kiértékelése	27
3.8. Mintavétel és sejtfeltárás a fiziológiai vizsgálatokhoz.....	29
3.9. A növekedés jellemzése	29
3.10. A metabolikus aktivitás meghatározása	30
3.11. A szénforrás-hasznosítás meghatározása	30
3.12. A fehérjetartalom kvantitatív vizsgálata.....	30
3.13. Enzimaktivitás mérések.....	31
3.14. A glutationtartalom kvantitatív meghatározása.....	33
3.15. A melanintermelés vizsgálata.....	34
3.16. A redox egyensúlyvesztés detektálása	34
3.17. A szterigmatocisztin termelés meghatározása.....	34
3.18. Az extracelluláris fehérjék azonosítása	35
4. Eredmények	37
4.1. A szénéhezés alatti GSH-metabolizmus vizsgálata.....	37
4.1.1. <i>A dugB és dugC delécióinak hatása a két gén relatív transzkripciójára és a süllyesztett tenyészetek GSH-tartalmára</i>	37
4.1.2. <i>A dugB és dugC delécióinak hatása a süllyesztett tenyészetek fiziológiai paramétereire</i>	39

4.1.3. A <i>dugB</i> és <i>dugC</i> kettős deléciójának hatása a felületi tenyészetek stressz toleranciájára, valamint ivaros és ivartalan fejlődésére	43
4.1.4. A szénéhezés, valamint a <i>dugB</i> és <i>dugC</i> kettős deléciójának hatása a tenyészetek génexpressziós mintázatára.....	46
4.1.4.1. A szénéhezés hatása	49
4.1.4.2. A <i>dugB</i> és <i>dugC</i> kettős deléciójának hatása glükózon	52
4.2. A laktózon megfigyelhető szénforrás-limitációs stresszválasz vizsgálata	52
4.2.1. A szénstressz hatása a süllyesztett tenyészetek metabolikus aktivitására és növekedésére	52
4.2.2. A szénstressz hatása süllyesztett tenyészetek enzimtermelésére	53
4.2.3. A szénstressz hatása a süllyesztett tenyészetek génexpressziós mintázatára.....	56
4.2.3.1. Glükóz-hasznosításban érintett gének.....	61
4.2.3.2. Sejtfal homeosztázisért és lebontásért felelős gének	62
4.2.3.3. Autofágiához köthető gének.....	63
4.2.3.4. Laktóz-hasznosításért felelős gének	63
4.2.3.5. Extracelluláris peptidáz gének.....	64
4.2.3.6. CAZyme gének.....	64
4.2.3.7. Transzkripció faktor gének	67
4.2.3.8. Szekunder metabolit génklaszterek.....	68
5. Megbeszélés.....	71
5.1. Szénéhező tenyészetek GSH-metabolizmusa.....	71
5.1.1. A DUG-útvonal szerepe a glutation intracelluláris lebontásában.....	71
5.1.2. A redox-szabályozás és a szénéhezésre adott stresszválasz kapcsolata.....	72
5.1.3. Az oxidatív stressz hatása a szekunder metabolitok termelésére	73
5.1.4. A DUG-útvonal inaktiválásának szignáltranszdukciós aspektusai	74
5.2. A laktózon megfigyelhető szénforrás-limitációs stresszválasz	76
5.2.1. Enzimatis „felderítés” szénéhezés során.....	76
5.2.2. Az adaptív előrejelzés jelentősége a CAZyme gének szabályozásában.....	78
5.2.3. „A közlegelők tragédiája” („Tragedy of the commons”)	79
5.2.3.1 A laktóz regulátor szerepe a fakultatív család korlátozásában	80
5.2.3.2. Az <i>A. nidulans</i> , mint fakultatív család	82
5.2.4. A CAZyme-szekréció szabályozásának jelentősége.....	85
6. Összefoglalás.....	87
6.1. Summary	88
8. Tézisek.....	91
9. Irodalomjegyzék.....	92
10. Tárgyszavak.....	114
10.1. Keywords	114

11. Köszönetnyilvánítás	115
12. Függelék	116
12.1. Mellékletek.....	116
12.2. A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények.....	123

Rövidítések jegyzéke

CAZyme: szénhidrát-aktív enzim (carbohydrate-active enzyme)

CSR: szénstresszválasz (carbon-stress-response)

DCF: 2,7-diklórflooreszcein

DCM: száraz sejt tömeg (dry cell mass)

DTT: ditioneitol

DUG: glutation-hasznosításban deficiens (deficient in utilization of glutathione) fenotípus

ER: endoplazmatikus retikulum

ESR: környezeti stresszválasz (environmental stress response)

GSE: géncsoport dúsulás (gene set enrichment)

GSH: redukált glutation

GSSG: oxidált glutation

γ GT: γ -glutamil transzpeptidáz

MAPK: mitogén-aktivált protein-kináz

MTT: metil-tiazol-tetrazolium

RNAseq: RNS-szekvenálás

ROS: reaktív oxigénformák (reactive oxygen species)

RT-qPCR: reverz transzkripciót követő kvantitatív polimeráz láncreakció

SMG: szekunder metabolit gén

SOD: szuperoxid dizmutáz

STC: szterigmatocisztin

1. Bevezetés és célkitűzés

1.1. Bevezetés

Az elmúlt évtizedben egyre fokozottabb piaci igény mutatkozik a globális egészségipar részéről az olyan bioaktív vegyületek és termékek (bio-, nano- és finomkémiai anyagok, gyógytápszerek, táplálékkiegészítők) iránt, amelyek ipari léptékű előállítása különböző mikroorganizmusok érintettsége révén, bioszintetikus úton valósítható meg (El-Baz és mtsai., 2016, 2018; Cui és mtsai., 2019; Hassan és mtsai., 2019). A glutation (γ -glutamil-L-ciszteinil-glicin) egy tripeptid, amely széles körben megtalálható az élő szervezetek körében, főként eukarióta sejtekben (Meister és Anderson, 1983; Lienkamp és mtsai., 2020). A glutation redukált formája (GSH) a legjelentősebb intracelluláris tiol redox-puffer, a legtöbb sejt számára nélkülözhetetlen – még az emberi anyatejben is jelenlévő – antioxidatív molekula, melynek kiemelt szerepe van pl. az oxidatív stressz, az UV-sugárzás, a xenobiotikumok, vagy a nehézfémek elleni védelmi mechanizmusokban (Pócsi és mtsai., 2004; Khazim és mtsai., 2013; Gila-Diaz és mtsai., 2019; Lienkamp és mtsai., 2020).

A GSH-t alapvető bioaktív molekulaként tartják számon, illetve használják széles körben az élelmiszeriparban és a gyógyszeriparban egyaránt, valamint különféle kozmetikai készítmények gyártása során is gyakori összetevő (Cui és mtsai., 2019; Santos és mtsai., 2022). A GSH hiányát számos humán egészségügyi rendellenességgel hozták összefüggésbe, többek között szív- és érrendszeri betegségek, tüdőbetegségek, májbetegségek, cukorbetegség, emésztőrendszeri és hasnyálmirigy gyulladások, valamint immunrendszeri, öregedési és neurodegeneratív kórképek kialakulásával és a COVID-19 okozta súlyos tüdőgyulladásos állapottal is (Ballatori és mtsai., 2009; Kumar és mtsai., 2022). Orvosi alkalmazását tekintve kiegészítőként való adagolása nem meglepően a GSH-hiányos állapotok (pl. májcirrózis, cisztás fibrózis, Alzheimer-kór, Parkinson-kór, időskori rendellenességek, HIV-fertőzés) során jelentős (Ballatori és mtsai., 2009). A húsipar elsősorban tartósítószerként és ízfokozóként alkalmaz nagy mennyiségű GSH-t, a szépségiparban leginkább bőrvilágosító és öregedésgátló készítmények, valamint napfényvédő termékek alapanyagaként van jelen (Liu és Eady, 2005; Gatea, 2020). Évente már több mint 200 tonna GSH-t állítanak elő világszerte, ipari mértékű termelésre azonban a mai napig is a gombák, különösen a *Saccharomyces cerevisiae* és a *Candida*

utilis fajok génmódosított törzsei a legmegfelelőbb organizmusok (Liang és mtsai., 2009; Schmacht és mtsai., 2017; Santos és mtsai., 2022).

Mivel a GSH nagyüzemi előállítására egyre nagyobb igény keletkezik, a gyártástechnológia optimalizálása, illetve a lehetséges termelő fajok folyamatos szűrése érdekében a molekula sejtfiziológiai szerepének és metabolizmusának vizsgálata is egyre népszerűbb kutatási területté vált az utóbbi években (Wang és mtsai., 2019; Bahut és mtsai., 2020; Ilyasov és mtsai., 2020; Čapek és Roušar, 2021). Például az a meghatározás is, hogy a gombák citoszolikus GSH-lebontásáért nem kizárólagosan a γ -glutamil transzpeptidáz (γ GT) felelős, csak az elmúlt évtized elejére kezdett körvonalazódni (Ohkama-Ohtsu és mtsai., 2008; Kaur és mtsai., 2009, 2012; Desai és mtsai., 2011; Kumar és mtsai., 2012). Az *S. cerevisiae* és *Candida albicans* fajoknál már bebizonyosodott, hogy elsődlegesen az ún. DUG („deficient in utilization of glutathione”) útvonal fehérjéi (Dug1, Dug2, Dug3) végzik az intracelluláris GSH-degradációt (Desai és mtsai., 2011; Kaur és mtsai., 2012), azonban az *Aspergillus nidulans* esetében ezen fehérjék génjeinek (*dugA*/AN3459: *S. cerevisiae dug1* ortológja; *dugB*/AN1879: *S. cerevisiae dug2* ortológja; *dugC*/AN1092: *S. cerevisiae dug3* ortológja; Spitzmüller és mtsai., 2015a) funkciója még mindig nem volt tisztázott. Már korábban megfigyelték, hogy a szénéhezés okozta stressz hatására jelentősen csökken a *Penicillium chrysogenum*, valamint az *A. nidulans* tenyészetek hifáinak GSH-tartalma, illetve a γ GT aktivitása is indukálódik (Sámi és mtsai., 2001; Emri és mtsai., 2004). Azonban az is megállapításra került, hogy a *ggtA* (γ GT-t kódoló gén) deléciója nincs jelentős hatással az *A. nidulans*nál szénéhezés során tapasztalható GSH koncentráció csökkenésre (Spitzmüller és mtsai., 2015b). A *dugA* és a *dugC* transzkripciós aktivitása ezzel szemben pozitívan korrelált a GSH-lebontással, míg a *ggtA* és a *dugB* expressziója esetén hasonló összefüggés nem volt tapasztalható (Spitzmüller és mtsai., 2015a). Ezen adatok hátterének tisztázása gyakorlati szempontból azért is indokolt, mert a gombák nem csak a természetben, hanem ipari körülmények között is találkozhatnak olyan stressz körülményekkel (pl. szénstressz és oxidatív stressz), amelyek serkentő hatással lehetnek a nem kívánatos szekunder metabolit-termelésre (pl. mikotoxinok), mely anyagok képződésének visszaszorítására az antioxidáns-kezelést egy ígéretes lehetőségnek tartják (Ask és mtsai., 2013; Fountain és mtsai., 2016; Koza és mtsai., 2022). Ezért a GSH-lebontó útvonalak azonosítása, valamint a megemelkedett GSH-tartalom következményeinek tisztázása hasznos információkkal szolgálhat az ipari törzsek hozamának további javítása mellett az élelmiszer-biztonság fejlesztéséhez is.

A fonalas gombákat általánosságban is nagyon sokszínű enzimszekréció és szekunder metabolit-termelés jellemzi. Az általuk szekretált enzimek, valamint szekunder metabolitok nagyban meghatározzák a fajok elterjedését (képesek-e az adott élettér biopolimerjeinek hasznosítására), befolyásolják virulenciájukat (patogenitásukat), valamint a fajok közötti kompetíciót és a fajok közötti/fajon belüli kooperációt is (van Munster és mtsai., 2014, 2016; Keller, 2019; Devi és mtsai., 2020; Filiatrault-Chastel és mtsai., 2021; Sakekar és mtsai., 2021). Minthogy katalitikus hatékonyságuknak és specificitásuknak köszönhetően a gomba enzimek igen széles biotechnológiai felhasználási lehetőséggel kecsegtetnek, nem meglepő, hogy az extracelluláris fehérjeszekréciót érintő vizsgálatok régóta fókuszban vannak a mikrobiológusok szemében (Peberdy, 1994; Szilágyi és mtsai., 2011; van Munster és mtsai., 2014, 2016; Emri és mtsai., 2018). Azokat az enzimeket, amelyek a különböző szénhidrátok bioszintézisében, módosításában, megkötésében és lebontásában vesznek részt ún. szénhidrát-aktív enzimeknek („carbohydrate-active enzyme”; CAZyme) nevezzük (Davies és mtsai., 2005). A CAZyme-ok újabban a biotechnológiai és ipari alkalmazhatóságuk miatt kerültek a figyelem középpontjába, ugyanis aktivitásuknak köszönhetően megoldhatóvá vált a komplex növényi anyagok hatékony szacharifikációja (André és mtsai., 2014; Garron és Henrissat, 2019; Bandi és mtsai., 2020; Chettri és mtsai., 2020). Az ilyen módon létrehozott prekursor anyagok pedig felhasználhatók különböző biológiai alapú termékek, mint pl. élelmiszerek, állati takarmányok, papír, textil, vagy egyéb vegyületek, köztük akár bioüzemanyagok előállítására is (Rytioja és mtsai., 2014; Kameshwar és Qin, 2018).

A gombák által termelt másodlagos anyagcseretermékeknek számos alkalmazási területe van a gyógyszeriparban, az élelmiszeriparban, valamint a mezőgazdaságban is, mivel ezek a kis molekulatömegű vegyületek esetlegesen antibakteriális, antifungális, rákellenes és gyulladáscsökkentő hatásúak, vagy akár a biológiai növényvédelemben is hasznosíthatók különböző rovarok, kártevők és kórokozók ellen (Devi és mtsai., 2020; Rangel és mtsai., 2021; Conrado és mtsai., 2022). A globális klímaváltozással párhuzamosan egyre nagyobb problémát okoznak a mikotoxin termelő gombafajok, ami szintén szükségessé teszi a gombák szekunder metabolit-termelésének kutatását. Magyarország az éghajlatváltozás következményeit tekintve Európa egyik legsérülékenyebb országa lehet; mezőgazdasági és egészségügyi szempontból is súlyos problémává válhat a jelenleg csak tőlünk délre elterjedt, melegkedvelő toxinogén *Aspergillus* fajok, mint például az aflatoxin termelő *Aspergillus flavus*, *Aspergillus*

parasiticus, *Aspergillus nominus* fajok térnyerése (Peles és mtsai., 2019; Pfliegler és mtsai., 2020). Mivel másodlagos anyagcseretermékek szintén jelentősen befolyásolhatják a humán patogén gombák virulenciáját (pl. *Aspergillus fumigatus*), klinikai szempontból is érdemes figyelmet fordítani ezen metabolitok stressz alatti képződésére (Brown és Goldman, 2016; Lind és mtsai., 2018). Mindebből kifolyólag célzottan a szekunder metabolitok bioszintézisének stresszfüggő szabályozásának megértése is hasznos lehet, ha meg akarjuk előzni az élelmiszerek és a takarmányok szennyezését, valamint tisztázni ezen vegyületek humán- és állatfertőzésekben betöltött szerepét (Pusztahelyi és mtsai., 2015; Macheleidt és mtsai., 2016; Peles és mtsai., 2019; Raffa és Keller, 2019).

Amikor a szénforrás mennyisége vagy minősége nem teszi lehetővé a tenyészetek gyors vegetatív növekedését szénstresszről (szénéhezés vagy szénforrás-limitáció) beszélünk (Winderickx és mtsai., 2003; Emri és mtsai., 2008; van Munster és mtsai., 2016). A szénstressz nemcsak a gombák GSH anyagcseréjét, de szekunder metabolit- és a CAZyme-termelését is jelentősen befolyásolja (Pócsi és mtsai., 2003, 2004; Brakhage, 2013; van Munster és mtsai., 2016; Contesini és mtsai., 2021). Számos, minket érdeklő jelenség, mint a GSH lebontási útvonalak aktiválódása, a mikotoxinok képződése, és egyes CAZyme fehérjék termelődése könnyebben tanulmányozható szénéhező, illetve szénforrás-limitált tenyészetekben, mint a gyors vegetatív növekedést lehetővé tevő glükóz szénforráson. Vizsgálatainkban ezért elsősorban szénstressznek kitett tenyészetekkel dolgoztunk. A transzkriptom változásának nyomonkövetésével átfogó képet kaphatunk a tenyészet egészének viselkedésében bekövetkezett változásokról. Kísérleteink középpontjában az RNS szekvenálással gyűjtött transzkriptom adatok feldolgozása és értelmezése állt, ami lehetővé tette számunkra, hogy a GSH anyagcserét, a mikotoxinok és CAZyme fehérjék képződését a szénstressz válasz részeként értelmezzük. Reményeink szerint, ez a megközelítési mód átfogóbb képet adhat számunkra a vizsgált folyamatokról, mint egy-egy enzim vagy metabolit vizsgálata.

1.2. Célkitűzés

A bevezetésben leírtak alapján a szénstressz jelentősen befolyásolhatja a gombák számos, gyakorlati szempontból is fontos fiziológiai paraméterét. Doktori munkám kidolgozásához ezért célul tűztem ki az *A. nidulans* modellszervezet szénstressz válaszána alaposabb megismerését. A dolgozat első felében a *dugB* és *dugC*,

feltételezhetően a GSH-lebontásban közreműködő gének funkcióját szerettem volna igazolni, majd megvizsgálni, hogy a GSH lebontásának gátlása milyen hatással van a gomba fiziológiájára, különös tekintettel a CAZyme-képződésben és a szekunder anyagcserében megfigyelhető változásokra szénéhező körülmények között, illetve glükóz szénforráson. A dolgozat második felében a laktóz szénforráson megfigyelhető szénforrás-limitációs stresszválaszt tanulmányoztam és hasonlítottam össze a glükózon, arabinogalaktánon, illetve szénforrás hiányában tapasztalható változásokkal. Elsősorban arra a kérdésre kerestem a választ, hogy miként befolyásolja a szénforrás minősége a gomba CAZyme-termelését és szekunder anyagcseréjét.

A célok megvalósításához az alábbi kísérleteket terveztem/végeztem el:

1. A szénéhezés alatti GSH-metabolizmus vizsgálata

Az *A. nidulans* $\Delta dugB$, $\Delta dugC$ és $\Delta dugB-\Delta dugC$ géndeléciós törzsek, valamint egy referencia törzs süllyesztett folyadékkultúrák (szubmerz) tenyészetek összehasonlítása szénforrásmentes (szénéhező) és glükóz-tartalmú (növekedő) tápközegen:

- biomassza-gyarapodás nyomon követése (DCM)
- glutation-tartalom és változásának meghatározása (GSH, GSSG)
- redox-státusz ellenőrzése (DCF-teszt)
- antioxidáns és autólízishez köthető enzimaktivitások meghatározása
- globális génexpressziós mintázatok összehasonlítása (RNAseq) és validálása (RT-qPCR)
- szekunder metabolit-termelés vizsgálata (vékonyréteg kromatográfia, HPLC, klasztergének transzkripciójának vizsgálata)

A fenti *A. nidulans* törzsek felületi (tápagarra leoltott) tenyészetek összehasonlítása glükózban gazdag (40 g l^{-1}) és szénforrás limitált (10 g l^{-1} glükóz) tápközegen:

- redukzív, oxidatív, ozmotikus, nehézfém- és sejtfalstressz tolerancia vizsgálata (telepátmérők meghatározása)
- konídium- és aszkospóra-képződés vizsgálata

2. A laktózon megfigyelhető szénforrás-limitációs stresszválasz vizsgálata

Négy sülyesztett *A. nidulans* tenyészet összehasonlítását terveztem, amelyek a rendelkezésre álló szénforrás tekintetében vagy glükózt (mint könnyen hasznosítható monoszacharidot), vagy laktózt (mint diszacharidot, amely lassabb növekedést tesz lehetővé, mint a glükóz), vagy arabinogalaktánt (mint komplex poliszacharidot, amely csak lassú növekedést biztosít) tartalmaztak, vagy egyáltalán nem tartalmaztak semmilyen szénforrást:

- metabolikus aktivitás ellenőrzése (MTT-teszt)
- biomassza-gyarapodás nyomon követése (DCM)
- autolízishez és laktóz-hasznosításhoz köthető enzimaktivitások meghatározása
- extracelluláris fehérjék azonosítása (2D-PAGE, nanoHPLC)
- globális génexpressziós mintázatok összehasonlítása (RNAseq) és validálása (RT-qPCR)
- szekunder metabolit-termelés vizsgálata (TLC, klasztergének transzkripciójának vizsgálata)

2. Irodalmi áttekintés

2.1. Az *Aspergillus* nemzetség rövid bemutatása

Az *Aspergillus* nemzetséget taxonómiaiilag az *Ascomycota* törzs, *Pezizomycotina* altörzs, *Eurotiomycetes* osztály, *Eurotiales* rendjének *Aspergillaceae* családjába sorolják (Houbraken és Samson, 2011; Samson és mtsai., 2014). A genus jelenleg több mint 400 fajt számlál, azonban számuk folyamatosan bővül (Wang és Zhuang, 2022). Az *Aspergillus* megnevezés Pier A. Micheli olasz botanikustól, a modern mikológia „atyjától” származik, ugyanis a genus jellegzetes konídiumai a katolikus egyházban használatos szenteltvíz-szóróra (aspergillum) emlékeztették (Samson és mtsai., 2014; Frisvad és Larsen, 2016). A nemzetséget alkotó változatos fajok a legkülönbözőbb szerves szubsztrátokat képesek hasznosítani, és jól alkalmazkodnak a környezeti feltételek széles skálájához. Az *Aspergillus*ok a Föld legelterjedtebb organizmusai közé tartoznak, megtalálhatók növényeken, állati szervezeteken, bomló szerves maradványokon, a talajban, a levegőben, valamint édesvízi és tengeri élőhelyeken is. Konídiumaik akár a beltéri környezetben (pl. épületek felületein, levegőben, háztartási eszközökön), vagy az ivóvízben és a szállóporban is előfordulnak. A leírtak alapján teljes joggal feltételezhetjük, hogy az *Aspergillus* nemzetség tagjai az életterünkben leggyakrabban előforduló gombáknak számítanak (Fleißner és Dersch, 2010; Cray és mtsai., 2013).

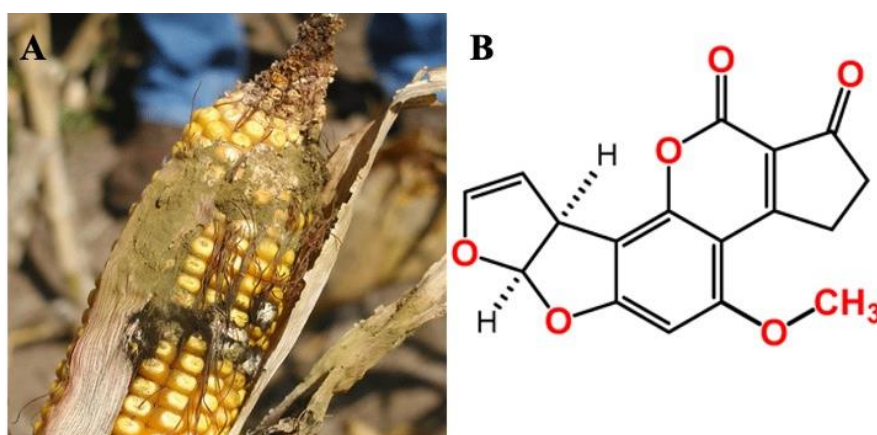
Szerveződésük és megjelenésük tekintetében az *Aspergillus*ok fonalas morfológiát mutatnak, de éhező körülmények fellépésekor a fonalak darabolódhatnak, azonban esetükben valódi dimorfizmus feltételezhetően nem áll fenn. Hifáikat szeptumok osztják sejtekre (interszeptumok), a köztük lévő anyagáram egyszerű pórusok révén valósul meg. Az interszeptumok több haploid magot is tartalmaznak, melyekből a legtöbb a csúcsi, osztódó sejtekben található (Harris, 2001; Rittenour és mtsai., 2009). Diploid magok természetes körülmények között csak az ivaros, illetve a paraszexuális ciklus részeként jelennek meg rövidebb ideig (Pontecorvo és mtsai., 1953; de Vries és mtsai., 2017). A tenyészetek ivartalan szaporodását biztosító konídiumaiknak köszönhetően a telepeik igen változatos színárnyalatokban mutatkoznak meg. A konídiumok az ún. konidiofórokon képződnek, melyek alapját egy talpsejt képezi, amelyből kiindulva egy oldalelágazás végén fejlődik ki a vezikulum. A fialidok (konídiumot termelő sejtek) a vezikulumhoz kapcsolódhatnak közvetlenül (uniseriate típus), vagy metulák

(konídiumot nem termelő sejtek) révén közvetetten (biseriate típus). Egyes fajoknál egyszerre mind a két típusú, vagy akár csökevényes konídiofór képződése is jellemző lehet a tenyésztési körülményektől függően (Perrone és Gallo, 2017; Chang és mtsai., 2020). Azonban bizonyos *Aspergillus* fajok egyáltalán nem rendelkeznek konídiofórokkal, mint az *Aspergillus monodii*, míg mások teljesen eltérő felépítésű konídiofórt képeznek, amely inkább a *Penicillium* nemzetségre jellemző, mint az *Aspergillus inflatus* esetében (Samson és mtsai., 2014; Baltussen és mtsai., 2019). A genetikai, genomikai módszerek közelmúltbeli gyors fejlődése, valamint a megfelelő körülmények azonosítása egyre több, korábban aszexualisnak tartott *Aspergillus* esetében vezetett az ivaros fejlődés azonosításához (O’Gorman és mtsai., 2009; Horn és mtsai., 2011). Mindezek ellenére a nemzetség többségének ivaros ciklusát még nem írták le, bár egyre több adat utal arra, hogy ivaros potenciáljuk van (Ellena és mtsai., 2020). Abban az esetben, ha fennáll az ivaros szaporodási forma, akkor a fajok jellemzően homotallikusak („öntermékenyek”), ritkábban heterotallikusak („obligát kereszteződők”; pl. *Aspergillus heterotallicus*), és a jellemzően nyolc askospórárt tartalmazó askuszaik kleisztotéciumban fejlődnek (az *Aspergillus thecius* esetében az askuszok szabadon fejlődnek, hiányzik a zárt kleisztotécium) (Dyer és O’Gorman, 2012). Sok *Aspergillus* fajnál paraszexualis ciklust is leírtak már (Varga és mtsai., 2014).

Amellett, hogy jelen vannak a környezet legkülönbözőbb élőhelyein, az *Aspergillus* fajok igen meghatározó szerepet töltenek be az emberiség mindennapjaiban is, ugyanis vad típusú törzseiket opportunistá növény- és humánpatogén kórokozókként egyaránt számontartják (Brown és mtsai., 2019; Latgé és Chamilos, 2019; Ráduly és mtsai., 2020; Koutserimpas és mtsai., 2022). Kártevőkként a szabadföldi kultúrákban és a raktározott terményekben is jelen vannak és jelentős veszteségeket okozhatnak (pl. *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *A. parasiticus*), ráadásul jelenlétüket mikotoxin termelésük (főleg aflatoxinok és ochratoxinok) egészségügyi szempontból is súlyosbítja (**1. ábra**) (Perrone és Gallo, 2017; Ráduly és mtsai., 2020).

A leggyakoribb humán kórokozói az *A. fumigatus*, *A. terreus* és *A. flavus* fajok különböző törzsei, melyek igen súlyos légzőszervi megbetegedések (allergiás bronchopulmonalis aspergillosis és invazív aspergillosis) mellett főleg szem- és fülfertőzések kialakulásáért felelnek (Latgé és Chamilos, 2019; Thompson és Young, 2021). Az utóbbi évtizedben mezőgazdasági kártételeik és invazív fertőzéseik esetszáma egyaránt emelkedőben van, az előbbit a globális éghajlatváltozással, az utóbbit az immunszuppresszív és kemoterápiás kezelésekre szoruló betegek megnövekedett

számával hozzák összefüggésbe (Bernardeschi és mtsai., 2015; Ráduly és mtsai., 2020). Mindemellett biotechnológiai jelentőségük is meghatározó, hiszen számos képviselőjüket hasznosítja aktívan a fermentációs ipar. Előállított anyagaikat tekintve jelentős volumenű vegyipari, élelmiszeripari, és a klinikai felhasználásban érintettek, törzseikkel számos enzim (pl. amilázok, lipázok, proteázok [tisztítószer-összetevők]), illetve primer (pl. citromsav, glükonsav [élelmiszer-adalékanyagok]) és szekunder metabolit (pl. lovasztatin, echinocandinok [gyógyszerhatóanyagok]) termeltetését végzik (Fleißner és Dersch, 2010; Sanchez és mtsai., 2012; Karaffa és Kubicek, 2019; Naveed és mtsai., 2021).



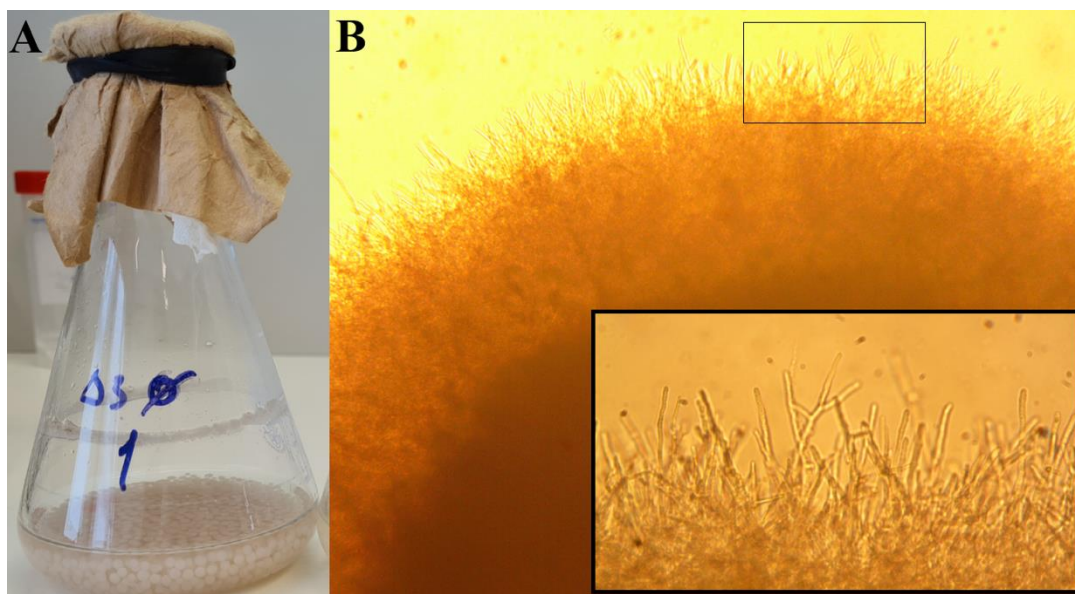
1. ábra Aszpergillusos csőpenészedés (*A. flavus*) kukoricán (A) (Jardine, 2022) és az aflatoxin B1 szerkezeti képlete (B) (Chen és mtsai., 2023)

2.2. Az *A. nidulans* fonalas gomba modell jellemzése

Az újgenerációs szekvenálási (NGS) technikák hozzáférhetősége hamar lehetővé tette a rendszertani országokat képviselő fajok genomjának szekvenálását. A gombák esetében már több mint ezer faj genomja áll rendelkezésre nyilvánosan (1000 Fungal Genomes; <https://1000.fungalgenomes.org/>). A nemzetségén belül az *A. nidulans* egy széles körben elismert eukarióta modellszervezet, melyet Pontecorvo az 40-es évek végén ismert fel kiváló jelöltként genetikai kísérleteihez (Pontecorvo és mtsai., 1953), s azóta napjainkig ez a faj már több mint 5000 elismert tudományos publikáció tárgyát képezte (PubMed; <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>; 2023), jelentősen bővítve ezzel többek közt a sejtfiziológiáról, az evolúcióról, az enzimológiáról, a kromatinszerkezetről, a DNS-javításról és rekombinációról, valamint az elsődleges és másodlagos metabolikus útvonalak szabályozásáról szerzett ismeretinket (Chemudupati és mtsai., 2019; Dimou és mtsai., 2019; Horio és mtsai., 2019; Németh és mtsai., 2019; Marcos és mtsai., 2020).

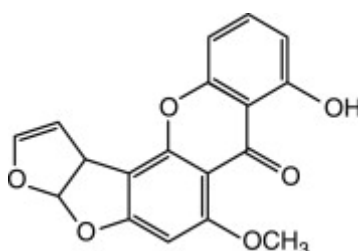
Az *A. nidulans* egy obligát aerob fonalas gomba, szaprofitaként leggyakrabban a talajban és korhadó növényi részekben található meg (Samson és mtsai., 2014). Patogén kórokozóként elsősorban a lovak torokzacskójában (*diverticulum tubae auditivae*) okoz aszpergillózist a helytelenül tárolt takarmányon keresztül (Blomme és mtsai., 1998; Tell, 2005), de azonosították már különféle humán fertőzésekben is (Fassatióvá, 1986; Jiang és mtsai., 2013). Habár az *A. nidulans* általában ártalmatlan az emberre, a legújabb bizonyítékok alapján súlyos (akár halálos) lefolyású betegséget hoz létre a krónikus granulomatózisos egyéneknél (Henriet és mtsai., 2012; Tavakoli és mtsai., 2020; Lim és mtsai., 2023; Pinheiro és mtsai., 2023). A faj ivartalan, ivaros (homotallikus) és paraszexuális szaporodása egyaránt indukálható laboratóriumi körülmények között is (Park és Yu, 2012). Ivartalan szaporodására a „biseriate” típusú konídióforok és zölden pigmentált fialo-konídiumok jellemzőek, míg ivaros ciklusa során Hülle-sejtekkel borított kleisztotéciumokat fejleszt, melyben 8-8 aszkospórát tartalmazó aszkuszok fejlődnek (Palmer és mtsai., 2021). A kleisztotécium fala két rétegből áll, amelyek szorosan egymáshoz tapadó, lapos, sötétlila színű sejtekből épülnek fel. A sejtek közötti tapadást egy ismeretlen összetételű anyag, az ún. „cleistin” biztosítja, amely a kleisztotécium belső terét is kitölti (Dyer és O’Gorman, 2012). A kleisztotécium falához kívülről kapcsolódnak a Hülle-sejtek, melyek morfológiája igen jellegzetes, vastag fallal rendelkeznek, és erősen fénytörőek mikroszkóp alatt. A Hülle-sejtekből származó kolóniák gyorsabban fejlesztenek konídiumokat, mint a spórákból származó telepek, illetve a legfrissebb tanulmányok alapján azt feltételezik, hogy a Hülle-sejtek erősen destruktív körülmények között a gomba tartalék össejtjeiként működhetnek (Dyer és O’Gorman, 2012; Troppens és mtsai., 2020).

Az *A. nidulans* szilárd és folyékony fázisú tápközegen egyaránt tenyészthető, süllyesztett kultúrái a tenyésztési körülményektől és a törzsek genetikai hátterétől függően változatos makromorfológiát mutatnak, mint például a hifapelletek vagy diszperz (szétszórt) hifák megjelenése (**2. ábra**; Miyazawa és mtsai., 2020). Abból fakadóan, hogy a gomba fiziológiája, morfológiája és optimális növekedési feltételei jól jellemzettek, laboratóriumi körülmények között igen könnyen tenyészthető (da Silva Menezes és mtsai., 2018; Frandsen és mtsai., 2018; Gonçalves és mtsai., 2020). Ezen felül a törzsek csekélyebb patogenitásának köszönhetően az *A. nidulans* valóban nagy népszerűségnek örvend a kutató mikológusok körében (David és mtsai., 2008; Etxebeste és Espeso, 2020).



2. ábra Az *Aspergillus nidulans* egy laboratóriumi törzsének (THM4) süllyesztett tenyésztete Erlenmeyer lombikban (A) és egy hifapellet mikroszkópos felvétele (B) (Forrás: saját fénykép)

Habár a közvetlen ipari gyakorlatban csekélyebb figyelmet kap, a fermentációs folyamatok fejlesztési fázisaiban mégis központi szerepet játszik. Törzseit leggyakrabban a heterológ expresszió és a fehérjeszekréció vizsgálataiba vonják be, továbbá penicillin és szterigmatocisztin (STC; **3. ábra**) termelőképesége révén a β -laktám típusú antibiotikum- illetve mikotoxintermelés tanulmányozására is felhasználható (Qiao és mtsai., 2019; Caesar és mtsai., 2020; Kumar, 2020).



3. ábra A szterigmatocisztin szerkezeti képlete (Tabata, 2011).

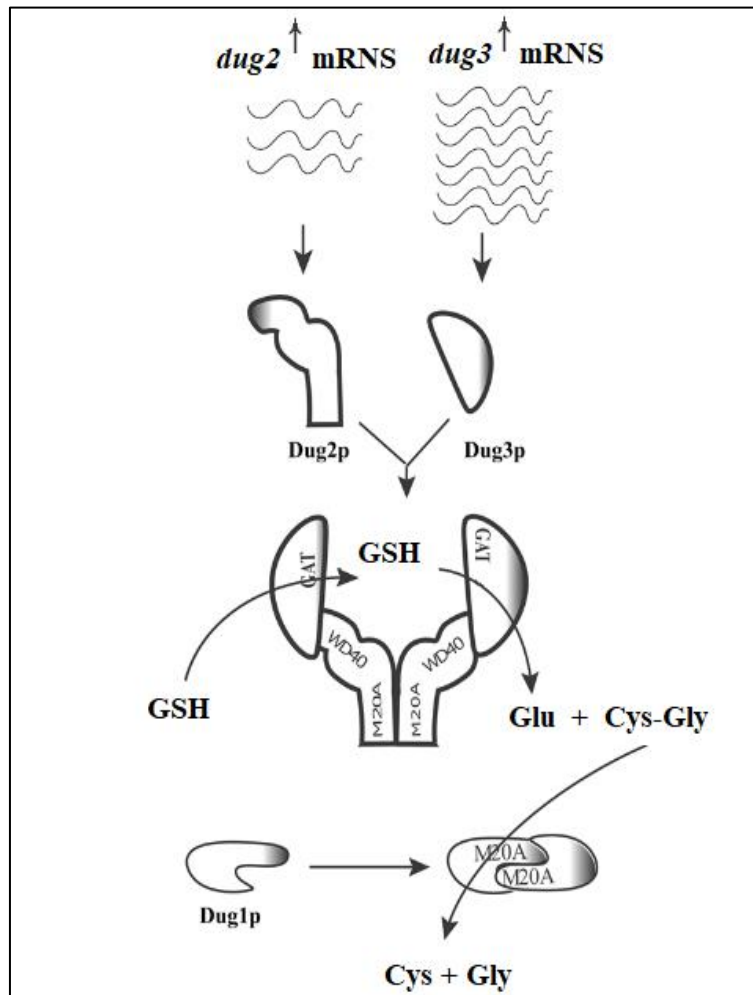
A legtöbb fonalgombához hasonlóan az *A. nidulans* is több tucat olyan szekunder metabolit gén- (SMG) klasztert tartalmaz, amelyekről feltételezhető, hogy mindegyike különböző és változatos másodlagos anyagcsereterméket kódol (Caesar és mtsai., 2020). Az ebben a fajban található kb. 70 feltételezett SMG-klaszter közül (Inglis és mtsai., 2013; Drott és mtsai., 2020) eddig 31 központi SMG-t sikerült összekapcsolni konkrét másodlagos anyagcseretermékkel, melyek többségéről az elmúlt 15 évben számoltak be (Romsdahl és Wang, 2019; Caesar és mtsai., 2020).

Mivel ipari, mezőgazdasági és egészségügyi szempontból is egyértelműen kiemelkedő *Aspergillus* fajok közeli rokona (pl. *A. niger*, *A. oryzae*, *A. flavus*, *A. fumigatus*) (Karaffa és Kubicek, 2019; Latgé és Chamilos, 2019; Ráduly és mtsai., 2020) az *A. nidulans* vizsgálataiból származó eredmények a gyógyszergyártás és a klinikum mellett, az agrárium és az élelmiszeripar számára egyaránt hasznosíthatók, így feltételezhetően a jövőben továbbra is kulcsfontosságú referenciaorganizmus marad számos kutatási területen (Etxebeste és Espeso, 2020).

2.3. A glutation-metabolizmus és annak stresszfiziológiai jelentősége

A GSH egy többfunkciós tripeptid, amely számos prokariótában és a legtöbb eukariótában, így gombasejtekben is bőségesen megtalálható (Penninckx és Elskens, 1993; Pócsi és mtsai., 2004; Smirnova és Oktyabrsky, 2005). Fő funkciója a sejtek védelme a reaktív oxigéngyökökkel (ROS), nehézfémekkel és xenobiotikumokkal szemben, illetve nitrogén- és kéntartalékként is funkcionál éhező körülmények között (Penninckx, 2000; Kumar és mtsai., 2003; Pócsi és mtsai., 2004). A GSH a mitokondriumok és a sejtmagok membránjának redoxstabilizálásában is fontos szerepet játszik, továbbá részt vesz a vas-kén klaszterek érésében stresszmentes és stresszes körülmények között egyaránt (Toledano és mtsai., 2013; Kumar, 2020). A metabolit szintézisútja jól ismert; számos szervezetben a γ -glutamil-cisztein intermedieren keresztül keletkezik a γ -glutamil-cisztein-szintetáz és a GSH-szintáz által katalizált, egymást követő reakciók révén. A GSH lebontása pedig egy ciszteinil-glicin intermedier képződésével történik, a klasszikus GSH lebontó útvonal esetében, a γ -glutamil-transzpeptidáz (γ GT) és egy dipeptidáz által (Smirnova és Oktyabrsky, 2005; Lu, 2013). Azonban a GSH-anyagcserét érintő vizsgálatok alternatív bioszintézis és lebontó útvonalakra is rávilágítottak. Egyes prokariótákban a GSH keletkezhet egy bifunkcionális γ -glutamil-cisztein-szintetáz/GSH-szintáz által is, vagy akár a prolin bioszintézis egyik köztitermékéből, a γ -glutamil-foszfátból is (Gopal és mtsai., 2005; Janowiak és Griffith, 2005; Veeravalli és mtsai., 2011). Az utóbbi esetben a γ -glutamil-kináz által előállított γ -glutamil-foszfát nem-enzimatis módon reagálva a ciszteinnel képez γ -glutamil-ciszteint, amelyet a GSH-szintáz tovább módosít GSH-vá (Veeravalli és mtsai., 2011). Mindezen túlmenően az emlősök és a növények képesek a GSH-t egy γ -glutamil-ciklotranszferáz segítségével ciszteinil-glicinné és 5-oxoprolinná bontani, amelyeket dipeptidázok, illetve az 5-oxoprolináz hidrolizálhat ciszteinné és glicinné, illetve

glutamáttá (Ohkama-Ohtsu és mtsai., 2008; Kumar és mtsai., 2012). Bizonyos gombák esetében, mint pl. a *S. cerevisiae* és a *C. albicans*, a DUG (Deficient in Uttilization of Glutathione) útvonalat tették felelőssé a GSH citoszolikus lebontásáért (Kaur és mtsai., 2009, 2012; Desai és mtsai., 2011). Ezt az útvonalat két enzim alkotja: egy glutamin-amidotranszferáz (GAT) és egy WD40 és M20A doménekből álló ciszteinil-glicin-metallo-dipeptidáz. A glutamin-amidotranszferáz felelős a GSH γ -glutamil-részének eltávolításáért, glutamátot és ciszteinil-glicint felszabadítva. Az enzim két alegységét a *dug2* és *dug3* gének kódolják. A *dug1* által kódolt metallo-dipeptidáz (M20A) pedig tovább hidrolizálja a képződött ciszteinil-glicint szabad aminosavakká (4. ábra, Ganguli és mtsai., 2007; Bachhawat és Kaur, 2017).



4. ábra A DUG enzim-komplex működésének sematikus ábrázolása élesztő modellek alapján (Bachhawat és Kaur, 2017).

GSH: redukált glutation; Glu: L-glutaminsav; Cys: L-cisztein; Gly: glicin;
Cys-Gly: L-ciszteinglicin

A GSH gomba sejtфизиологические функции аз аныгысере ўтвоналхож кепсолодоо гёнек делёциоја ревен кездтек танулманыооно илесзто ёс фонелес гомбелеллекбен. А γ -глутамил-сисзтеин-сизнетёз гёноёнек делёциоја *S. cerevisiae* ёс *A. nidulans* esetében GSH ауотрофиёт иредмёныез, азонбон желнтоёс кўлонобёсёекек мутокзонок аз оптимёлис нёвекедёсезеэ сзўксёсёе GSH мёныисёгёбен (*S. cerevisiae*: 0,5 $\mu\text{mol l}^{-1}$; *A. nidulans*: 8-10 mmol l^{-1} ; Ohtake ёс Yabuuchi, 1991; Bakti ёс mtsai., 2017). Аз окидёлт глутатон (глутатон-дисулфид; GSSG) GSH-вёл тёртёноо редукциоёлёрт феелёлёс глутатон редуктёлзт кодоолоо гён делёциоја а *S. pombe* esetében летёлиснелк бисоноёлт (Lee ёс mtsai. 1997), мёлс гомбёлкбон (пл.: *S. cerevisiae*, *A. nidulans*, *Acremonium chrysogenum*) азонбон а глутатон редуктёлзт гён нем ессзёнциёлис, дел кулёсфонтоосёлгў а мёлс GSH/GSSG арёлны феннтёртёлсёлбон ёс аз окидёлтív стрёсз кёлелкулёлсёлнелк мёлелёозёсёбен (Sato ёс mtsai., 2009; Bakti ёс mtsai., 2017).

2.4. А фонелес гомбёлк сзёнстрёсз вёлелсёл

А микроогонизмусок, игы фонелес гомбёлк текинтетёбен ил аокор бёсёлелтўнк сзёнстрёсзрёл, микор а сеёлтек сёлмёлрёл аз елёрелто ёс фелвелелто енергияфорёлскёлт фелхёлснёллёлто сзервес вегёлелтекек мёныисёге, илтелве мёлёсёе мёлр нем елелгёноо а гёлрс вегёлёлтív нёвекедёс феннтёртёлсёлхоэ (Winderickx ёс mtsai., 2003; van Munster ёс mtsai., 2016). Амикор егы тенёлсзет жёл хёлснёлсёллёлто сзёнфорёлсон нёвексёлк, а сзёнфорёлс фогёлтокозёлсёл кёлвелкзетёбен елёлсёлр сзёнфорёлс-лимёлциоёл стрёсз лёл фел. Hа аз елёлдлелес сзёнфорёлс елфогёл, ёс а сеёлтекек нем сикерўёл ёттёрни вёламылён алтернёлтív сзёнфорёлсрёл, бекёлвелкзёлк а сзёнёлезёс. Ez а кёл сзёнстрёсзтёлпус (сзёнфорёлс-лимёлцио ёс сзёлёлезёс) а гомбёл елтерёл нёвекедёлсёл фёлсёлрёл желлемёл: а сзёнфорёлс лимёлцио а нёвекедёлс кёлел ехпонёнциёлис фёлсёлбон, мёлг а сзёлёлезёс а стёлционер, илтелве хёлнёлтёл фёлсёлбон алакул кёл (Emri ёс mtsai., 2008; van Munster ёс mtsai., 2014, 2016).

А лабораториуми гёлкорлелбон а сзёнстрёсз желнкёлбб кёл мёлдон вёллёлто кёл. А лелелгёлсзёрўбб мёлдсзёр, хогёл адоог инокубёлжук а тенёлсзетел, мёлг аз а ренделкёлзёсёлрёл ёлло сзёнфорёлсёлт теллес мёлртёлкбон фел нем хёлснёллёл (Emri ёс mtsai., 2006). Товёлбб илелёлёсёл, аз ехпонёнциёлис фёлсёлу мёлёлиум сзёнфорёлс мёлнес вёлг кёлплек (нехезен хёлснёлсуло) сзёнфорёлсёлт тёлрлелмёлзёл тёлпкёлзёлге вёлло ёлелелзёлсёл (Szilágyi ёс mtsai., 2013; Németh ёс mtsai., 2016; Meng ёс mtsai., 2022). Fontos азонбон кёлелмёлни, хогёл а кёл мёлдсзёр желнтоёсёлн елтер егымёлстёл, угёлнелс аз елёл esetben а сзёлёлезёсёлт сзёнфорёлс-лимёлцио елёлзёл мёлг, мёлг а мёлсик мёлдсзёрнёл нёл нёвекелдоо тенёлсзетелк фокёлзёлосон

kialakuló szénforrás-limitáció nélkül hirtelen szembesülnek a könnyen hasznosítható szénforrás eltűnésével (Emri és mtsai., 2006; Jørgensen és mtsai., 2010; van Munster és mtsai., 2016).

Habár a szénforrás-limitációra adott stresszválasz reakciók egyes elemeit már részletesen vizsgálták (ld. karbon katabolit represszió; Ruijter és Visser, 1997; Adnan és mtsai., 2018; de Assis és mtsai., 2021), a sejtek globális reakcióját leíró omikai vizsgálatok csak kevés található a szakirodalomban (Winderickx és mtsai., 2003; Jørgensen és mtsai., 2010). Ezzel szemben a szénéhezéssel kapcsolatban számos, elsősorban transzkriptomikai megközelítésen alapuló tanulmány áll rendelkezésre (Pócsi és mtsai., 2003; Emri és mtsai., 2008; Nitsche és mtsai., 2012; Szilágyi és mtsai., 2013; van Munster és mtsai., 2016). Az *A. nidulans* szénéhezésnek kitett süllyesztett folyadékultúrák tenyészetét specifikus fiziológiai és morfológiai változások jellemzik, melyekhez nagyon gyakran kapcsolódik az autolízis folyamata is (Emri és mtsai., 2008). Az autolízis során egy olyan sejtpusztulási folyamat játszódik le, amelynek lefolyása a makroautofágia (intracelluláris tartalom lebontása és újrahasznosítása) mellett magába foglalja a sejtfa alkotóelemeinek lebontását (autolitikus sejtfa-degradáció) is hidrolitikus enzimek (pl. proteázok, kitinázok, glükánázok) termelése révén, hogy az így keletkezett monomerek tápanyagként szolgálhassanak a tenyészet túléléséhez. (Gordon és Lilly, 1995; White és mtsai., 2002; Emri és mtsai., 2004). A saját, nitrogéntartalmú vegyületek lebontását támasztja alá a gomba szénéhező tenyészetében megfigyelhető ammónia felszabadulás is (Pusztahelyi és munkatársai 1997, Emri és munkatársai 2004). Az autolízist más elemek (pl. oxigén, vas, nitrogén) hiánya is kiválthatja, de a szénéhezéshez szinte általánosan köthető a jelenség (White és mtsai., 2002). A makroautofágia következtében az autolízist intenzív vakuolizáció és a hifák kiürülése kíséri, míg a kiüresedett hifák sejtfa-lának lebontása (autolitikus sejtfa-degradáció) a fonalak darabolódásához, a pelleték széteséséhez vezet. Az autolízis végén csak néhány „élesztőszerű” sejtfa-ból álló hifa-töredék marad életben, amelyek friss tápközegen képesek újra „csírázni”. A folyamatot gyakran intenzív melanizáció is kíséri, ami feltehetőleg a még élő sejtek falát védi a tápközegbe szekretált kitinázoktól (Emri és mtsai., 2004, 2008, 2018; Szilágyi és mtsai., 2011, 2013, 2018).

Az antioxidáns védekezés kulcsszerepet játszik a fonalas gombák szénstresszhez való alkalmazkodásában. Szénéhezés alatt, az autolízis mellett, a sejtek redox folyamataiban is jelentős változás áll be: A redukált/oxidált glutation arány (GSH/GSSG) csökken, amit nagy γ -glutamil transzpeptidáz (γ -GT) aktivitás kísér. Bár a tenyészetek

respirációja csökken, a reaktív oxigénformák (pl. peroxidok, szuperoxid) koncentrációja és a szuperoxid dizmutáz specifikus aktivitása nő (Emri és mtsai., 2004; Spitzmüller és mtsai., 2015b). Az *A. nidulans* esetében a több peroxiredoxin közül a PrxA-t azonosították mint nélkülözhetetlen antioxidáns védelmi tényezőt (Xia és mtsai., 2018; Zhou és mtsai., 2021; Li és mtsai., 2022). A PrxA által végzett H₂O₂ lebontás a tioredoxin rendszer (tioredoxin és annak reduktáza), valamint NADPH jelenlétét igényli (Xia és mtsai., 2018). Az *A. nidulans* emellett több katalázt is kódol, köztük a CatA, CatB, CatC és CatD enzimeket (Kawasaki és Aguirre, 2001), melyek közül a CatA egy spóraspecifikus kataláz, amelynek hiánya a konídiumokat fokozottan érzékennyé teszi a H₂O₂ hatásával szemben (Navarro és mtsai., 1996), a CatB pedig a vegetatív sejtnövekedés szakaszában van jelen, és elsősorban a környezeti H₂O₂ ellen nyújt védelmet (Kawasaki és mtsai., 1997). Nem meglepő módon a szénéhezés hatására fellépő fiziológiai változások háttérében jelentős transzkripciós szintű változások állnak (Szilágyi és mtsai., 2013). *A. nidulans* törzsek esetében eddigi ismereteink alapján az autolízis szabályozása szoros kapcsolatban áll a sporuláció szabályozásával: A *brlA* (a sporulációt érintő legfontosabb transzkripciós faktort kódoló gén) hiánya gátolja az extracelluláris kitináz termelést és ezen keresztül az autolitikus sejtfoldegradációt is lassítja, de fokozott extracelluláris proteáz termeléshez vezet. *A fluG* (a *brlA* legfontosabb szabályzóelemét kódoló gén) deléciója ugyanakkor teljesen blokkolja a proteázok, kitinázok és glükánázok képződését és leállítja az autolitikus sejtfoldegradációt (Emri és mtsai., 2005a, 2005b). Ugyanakkor a sporulációt érintő egyéb szabályzóelemek génjeinek (pl. *abaA*, *flbA-E* gének, *wetA*) mutációi már nem okoznak érdemi változásokat a szénstressz alatt kialakuló autolitikus fenotípusban (Emri és mtsai., 2005a; Yu, 2010). E transzkripciós szintű kapcsolat célja feltehetőleg az, hogy a tenyészet autolizáló sejtjei által felszabadult tápanyagokat a nem autolizáló sejtek fel tudják használni konídium termelésre. A FluG-BrlA szabályzó útvonallal szemben a CreA karbon katabolit represszióért felelős transzkripciós faktor génjének deléciója hiperautolitikus fenotípust hozza létre, ami intenzív extracelluláris hidroláz termelésben és a szárazanyagtartalom gyors csökkenésében nyilvánul meg (Emri és mtsai., 2006; Ries és mtsai., 2016). A szénéhezés alatti extracelluláris hidroláz termelést az XprG transzkripciós faktor szintén aktiválja, legalább részben a *brlA* transzkripcióján keresztül (Katz és mtsai., 2013). A vegetatív növekedés fenntartásáért felelős heterotrimer G-fehérje-függő jelátviteli útvonalak (pl. FadA és GanB útvonalak), amelyekről ismert, hogy gátolják a konídiumképződést és gyakran a *brlA* transzkripciót is (Yu, 2006; Krijgheld és mtsai.,

2013a) az extracelluláris proteáz termelésre is hatással lehetnek (Molnár és mtsai., 2004, 2006). Fontos azonban megemlíteni, hogy a *fluG* deléciója az *A. niger*ben nincs hatással a konidiogenezisre, továbbá az extracelluláris enzimtermelést is fokozza (Wang és mtsai., 2015). Ugyanezen fajnál az FlbA hiánya (amely a *brlA* szabályozóeleme) szintén fokozott fehérjeszekréción eredményezett (Krijgheld és mtsai., 2013b). Ezek az adatok arra utalnak, hogy bár a szénéhezés szabályozó útvonalai konzerváltak tűnnek az *Aspergillus*ok esetében, az extracelluláris enzimszekréción és ezen keresztül az autolitikus sejtfaldegradáción gyakorolt hatásuk eltérő lehet a különböző fajokban (Emri és mtsai., 2018).

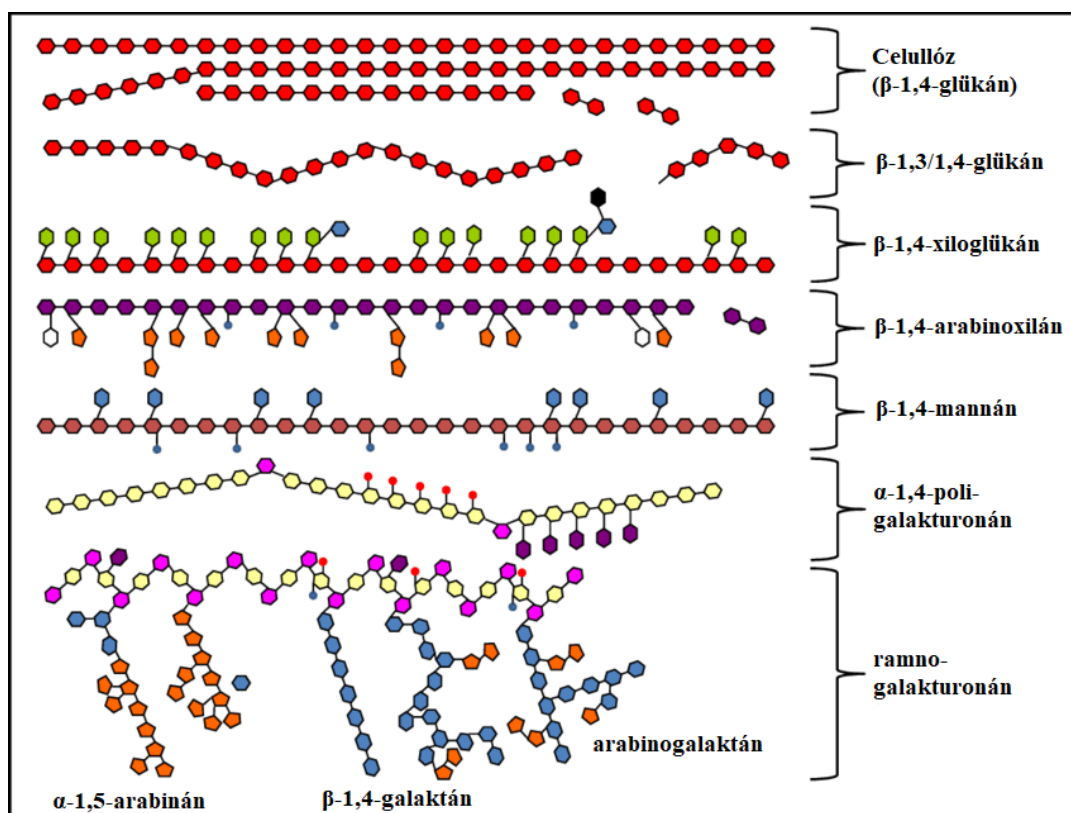
Gyakorlati vonatkozásait tekintve a szénstressz vizsgálata több szempontból is jelentős. A szén- és energiaforrások típusa, illetve elérhetősége nagy mértékben befolyásolja a gombák életének számos aspektusát, többek között stressztűrését, CAZyme-szekréciónját, (nem CAZyme típusú) extracelluláris hidrolázok (pl. proteázok) kiválasztását (Glass és mtsai., 2013; van Munster és mtsai., 2016), szekunder metabolitok (akár mikotoxinok vagy gyógyszeripari jelentőségű molekulák) képződését (Brakhage, 2013; Keller, 2019), valamint ivaros és ivartalan differenciálódást, sőt még az antifungális szerekkel szembeni érzékenységet, illetve virulenciát is (Shapiro és mtsai., 2011; Ene és mtsai., 2012; Brown és Goldman, 2016; Chew és mtsai., 2019). A fentieken túl, az autólízis indukálása elősegítheti a sejtfalhoz kötött és a sejten belül felhalmozódott ipari szempontból fontos metabolitok (pl. sztatínok) és enzimek kinyerését és fokozza az ipari szempontból is fontos proteázok, glükánázok, kitinázok termelődését (White és mtsai., 2002; Salakkam és Webb, 2018). Másrészt a folyamatot gátolva megnyújtható a stacioner fázis hossza, megtartható az ipari szempontból fontos pelletes morfológia, mérsékelhető a termékek proteolitikus degradációnja a proteáztermelés visszaszorítása révén és csökkenhető a fokozott habzást és a kis átmérőjű csövek eltömődését okozó melaninok képződése is (Pócsi és mtsai., 2003; Szilágyi és mtsai., 2018). Nem utolsó sorban, az szénéhezés alaposabb megismerése a sejtfaldegradáló elemek azonosítása révén akár új antimikotikumok felfedezésére is lehetőséget teremt (Meyer és Jung, 2018; Bugeda és mtsai., 2020).

2.5. A növényi sejtfal-poliszacharidok hasznosítása

Az *A. nidulans*, sok más fonalas gombához hasonlóan, általában bomló növényi anyagokban gazdag élőhelyeken fordul elő; a szerves anyagok és különösen a

poliszacharidok széles skáláját képesek szén- és energiaforrásként felhasználni (van Munster és mtsai., 2016; Ho és mtsai., 2017). Genomja több mint 400 CAZyme gént tartalmaz (CAZy Database; <http://www.cazy.org/>), CAZyme fehérjéinek köszönhetően hatékonyan képes komplex növényi anyagokon is növekedni (Saykhedkar és mtsai., 2012; Martins és mtsai., 2014; de Assis és mtsai., 2015).

A növényi sejtfalat számos poliszacharid alkotja (**5. ábra**), köztük cellulóz (és kisebb mennyiségben vegyes kötésű glükán), hemicellulózok (pl. xilánok, xiloglükánok, mannánok) és pektinek. A növényi sejtfalak ezeken felül különféle hidroxiprolinban gazdag peptideket, pl. extenzineket és arabinogalaktán-fehérjéket is tartalmaznak, melyek molekulatömegének jelentős részét az oligoszacharid-oldalláncok teszik ki (Held és mtsai., 2015). A fenti poliszacharidokat sok gomba képes lebontani extracelluláris enzimeik segítségével. A komplex szacharidok hatékony lebontásához legtöbbször több, egymással szinergikusan ható enzimre van szükség (Culleton és mtsai., 2013; Glass és mtsai., 2013; Znameroski és Glass, 2013).



5. ábra. A fontosabb növényi sejtfal-poliszacharidok sematikus ábrázolása.

piros hexagon: glükóz; zöld hexagon: xilóz; kék hexagon: galaktóz; fekete hexagon: fukóz; narancssárga pentagon: arabinóz; fehér hexagon: glükuronsav; kék kör: acetilsoport; sötétvörös hexagon: mannózpólimer; halványsárga hexagon: galakturonsav; rózsaszín hexagon: ramnóz; piros kör: metilsoport; (Phalip és mtsai., 2012)

A poliszacharidok extracelluláris hasznosítása lehetővé teszi a sejtek számára, hogy a lebontáshoz szükséges mennyiségű enzimet kooperatív módon állítsák elő. Ilyen értelemben az extracellulárisan felszabaduló mono- és oligoszacharidok a mikroorganizmusok számára közjavaknak tekinthetők, mivel a közelben lévő bármely mikroba hasznosíthatja őket, még a lebontó enzimek termelésére képtelen („csalók”) és az enzimtermelésre képes, de azt mégsem termelő törzsek/fajok („fakultatív csalók”) is (Gore és mtsai., 2009). Emiatt nem meglepő, hogy a mikroorganizmusok extracelluláris enzimtermelését a viselkedésokológia tudományterülete is intenzíven tanulmányozza (Smith és Schuster, 2019).

A gombák által termelt növényisejtfalbontó enzimek ipari szempontból is jelentősek, hiszen segítségükkel hatékonyra tehető a komplex növényi anyagok szacharifikációja. A hatékony szacharifikációs eljárások pedig kulcsfontosságúak a második generációs bioüzemanyagok költséghatékony előállítása szempontjából is (Chundawat és mtsai., 2011). Annak megértése, hogy a gombák miként képesek alkalmazkodni a különböző szén- és energiaforrásokhoz, akár az enzimtermelés szabályozásában részt vevő új gének vagy molekulák, illetve a biopolimerek hatékony lebontásához szükséges új enzimek azonosításában is segíthet. Mindezen ismeretek hozzájárulhatnak a növényi sejtfalösszetevő-hasznosítás hatékonyságának javításához, vagy elősegíthetik a felhasznált enzimek előállítási költségeinek csökkentését is (Chundawat és mtsai., 2011; Chettri és mtsai., 2020; Contesini és mtsai., 2021).

3. Anyagok és módszerek

3.1. A vizsgálatokhoz felhasznált törzsek és tenyésztésük

A kísérleteink során vizsgált *A. nidulans* törzseket az **1. táblázat** tartalmazza. A törzsfenntartást Barratt-féle minimál tápaggarral (AMM) végeztük (Barratt és mtsai., 1965), melynek összetétele az alábbiaknak felelt meg: 6 g l⁻¹ NaNO₃, 1,5 g l⁻¹ KH₂PO₄, g l⁻¹ MgSO₄·4H₂O, 0,5 g l⁻¹ KCl, 10 g l⁻¹ glükóz, 0,1 v/v% nyomelemoldat, 20 g l⁻¹ agar (pH 6,5), illetve szükség szerint 200 µg l⁻¹ piridoxinnal egészítettünk ki. A nyomelemoldat összetétele 22 g l⁻¹ ZnSO₄ 7 H₂O, 11 g l⁻¹ H₃BO₃, 5 g l⁻¹ MnCl₂ 4 H₂O, 5 g l⁻¹ FeSO₄ 7 H₂O, 1,6 g l⁻¹ CoSO₄ 5 H₂O, 1,6 g l⁻¹ CuSO₄ 5 H₂O, 1,1 g l⁻¹ (NH₄)₆Mo₇O₂₄ 4 H₂O és 50 g l⁻¹ Na₂EDTA volt. A tápagra leoltott törzseket minden esetben 37 °C-on inkubáltuk 6 napon keresztül és a sülyesztett kultúrákat e tenyészetek frissen izolált (0,1 v/v% Tween 20 oldat) konidiumaival oltottuk be.

1. táblázat A vizsgált *Aspergillus nidulans* törzsek.

Törzs ^a	Leírás	Genotípus	Referencia
THS30	referencia törzs	<i>pyrG89 AfupyrG⁺ pyroA⁺ veA⁺</i>	Emri és mtsai. 2015
THM2	<i>ΔdugB</i> mutáns	<i>pyrG89 pyroA4 ΔANI879::AfupyrG⁺ veA⁺</i>	Gila és mtsai. 2021
THM3	<i>ΔdugC</i> mutáns	<i>pyrG89 pyroA4 ΔANI092::AfupyrG⁺ veA⁺</i>	Gila és mtsai. 2021
THM4	<i>ΔdugB ΔdugC</i> mutáns	<i>pyrG89 pyroA4 ΔANI879::AfupyrG⁺ ΔANI092::pyroA⁺ veA⁺</i>	Gila és mtsai. 2021
THM7	<i>dugC⁺</i> komplementált törzs	<i>pyrG89 pyroA4 ΔANI092::AfupyrG⁺ ANI092::pyroA veA⁺</i>	Gila és mtsai. 2021
THM8	<i>dugB⁺</i> komplementált törzs	<i>pyrG89 pyroA4 ΔANI879::AfupyrG⁺ ANI879::pyroA veA⁺</i>	Gila és mtsai. 2021

^a – A deléció, valamint komplementált törzseket Dr. Heungyun Harrison Moon és Prof. Dr. Jae-Hyuk Yu (University of Wisconsin-Madison, Madison, WI, USA) hozta létre és bocsátotta rendelkezésünkre.

A sülyesztett kultúrákhoz Barratt-féle táplevest (a táptalaj agarmentes változatát) készítettünk, amelyet az előtenyészetek esetében 5 g l⁻¹ élesztőkivonattal egészítettünk ki. A tápközeg 100 ml-ét (500 ml-es Erlenmeyer lombikban) 5×10⁷ db konidiummal inokuláltuk, majd a tenyészeteket 18 órán keresztül neveltük rázóinkubátorban (37 °C, 220 rpm). A még exponenciális növekedési fázisban lévő biomasszát vákuumszűrést követően steril szénforrásmentes Barratt-féle táplevessel mostuk, majd 100 ml friss

táplevesben vettük fel úgy, hogy a kiindulási száraztömeg mintegy 2 g l^{-1} legyen. A micéliumok átmosását követően a friss Barrat-féle táplevesek szénforrás tartalma a következőképpen alakult:

- szénforrás mentes (szénéhező tenyészetek)
- 20 g l^{-1} laktóz (laktózos/szénforrás limitált tenyészetek)
- 20 g l^{-1} arabinogalaktán (arabinogalaktános/szénforrás limitált tenyészetek)
- 20 g l^{-1} glükóz (glükózos/növekedő referencia tenyészetek)

3.2. A felületi tenyészetek stresszérzékenységének meghatározása

A felületi tenyészetek vizsgálatához szintén Barrat-féle tápagart használtunk, amelyeket $5 \mu\text{l}$ spóraszuszpenzióval (10^5 konídium ml^{-1} $0,1 \text{ v/v}\%$ Tween 20 oldat) történő pontleoltást követően 5 napon keresztül inkubáltunk $37 \text{ }^\circ\text{C}$ -on, majd lemértük a telepátmérőket (Leiter és mtsai., 2016; de Vries és mtsai., 2017). A táptalajok leoltás előtt már külön-külön tartalmazták a stressz ágenseket, melyek koncentrációja a következő volt: $0,18 \text{ mM}$ menadion-nátrium-biszulfit (MSB); $0,8 \text{ mM}$ *tert*-butil-hidroperoxid (*t*BOOH); $1,5 \text{ mM}$ diamid; 1 M NaCl, 50 mM kongóvörös (CR). Bizonyos esetekben a táptalaj 40 g l^{-1} glükózt tartalmazott a standard 10 g l^{-1} helyett. A kísérleteket minden esetben három ismétlésben végeztük.

3.3. A konídiumtermelés vizsgálata

A felületi tenyészetek által termelt konídiumok mennyiségének meghatározásához pontinokulációt végeztünk a **3.2. alfejezetben** leírt módon Barrat-féle táptalajt tartalmazó agarlemezekre. Öt nap $37 \text{ }^\circ\text{C}$ -on történő inkubációt követően $1 \times 0,5 \text{ cm}^2$ felületű agarhasábokat vágunk ki a telepek sugárhosszúságának közepénél, majd a hasábok felületén lévő konídiumokat $500 \mu\text{l}$ $0,1 \text{ v/v}\%$ Tween 20 oldatban szuszpendáltuk. A konídiumszuszpenziók spóraszámát hemocitóméterrel (Bürker-kamra) határoztuk meg. Bizonyos esetekben a táptalaj 40 g l^{-1} glükózt tartalmazott a standard 10 g l^{-1} helyett, illetve további 10 mM ditiotreitollal (DTT) vagy 10 mM GSH-val egészült ki (Bakti és mtsai., 2017; Emri és mtsai., 2018).

3.4. RNS-izolálás

Az RNS-izolálás mintánként 10 ml fermentléből átszűrt micéliumból történt, amelyeket 4 °C-os desztillált vízzel mostunk, majd további felhasználásig -70 °C-on tároltunk. A közvetlen felhasználás előtt liofilizált és feltárt mintákból a totál RNS-tartalmat TRIzol reagens (Invitrogen, Waltham, MA, USA) hozzáadásával nyertük ki Chomczynski módszere (Chomczynski, 1993) alapján. Az RNS minták tisztaságát a DE ÁOK Genomi Medicina és Bioinformatikai Szolgáltató Laboratórium munkatársai ellenőrizték mikrofluid elektroforézis rendszer (Agilent 2100 Bioanalyzer, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) segítségével.

3.5. Reverz transzkripciót követő kvantitatív PCR (RT-qPCR)

Az RT-qPCR-t Luna Universal One-Step RT-qPCR Kit (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) használatával végeztük a gyártó által ajánlott protokollnak megfelelően. A reakcióelegyek 400 ng, DNáz (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) kezelt, totál RNS-t, 2,5 mM Mg²⁺-t és 0,4 μM génspecifikus primer párt tartalmaztak. Az RT-qPCR-hez használt primerek szekvenciáit az **1. melléklet** tartalmazza.

Az RT-qPCR az alábbi lépésekből épült fel:

1. reverz transzkripció, 55 °C, 10 perc
2. reverz transzkriptáz denaturáció, 95 °C, 1 perc
3. DNS-denaturáció, 95 °C, 10 másodperc
4. primer hibridizáció (annealing), 60 °C, 1 perc
5. lánchosszabbítás (extension), 60 °C, 30 másodperc
6. harmadik lépéstől való ciklus ismétlés 40 ciklus erejéig

A RT-qPCR termékek mennyiségének változását ciklusonként az 5. lépés után követtük nyomon a duplaszálú DNS-be interkalálódott SYBR Green I festék fluoreszcenciájának detektálása révén. A minták homogenitását a termékek olvadáspontjának meghatározásával állapítottuk meg. A relatív transzkripció mértékét a $\Delta\Delta C_t$ módszerrel határoztuk meg: $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t^{\text{kezelt minta}} - \Delta C_t^{\text{kezeletlen minta}}$, ahol $\Delta C_t = C_t^{\text{referencia gén}} - C_t^{\text{vizsgált gén}}$, és C_t az a ciklusszám, amelynél a minta átlépi a PCR termék kimutatását jelző fluoreszcencia küszöböt. A $\Delta\Delta C_t$ érték növekedése arra utal, hogy a

vizsgált tenyészetben a gén relatív transzkripciója növekedett a kezeletlen kontroll tenyészethez képest. Referencia génként a kísérletsorozatoktól függően a *gfdA* (Gila és mtsai., 2021) és az AN6700 (Gila és mtsai., 2022) géneket használtuk.

3.6. Újgenerációs RNS-szekvenálás (RNAseq)

Az RNS-minták szekvenálását (a könyvtár készítéstől a FASTQ fájlok megírásáig) a DE Genomi Medicina és Bioinformatikai Szolgáltató Laboratórium munkatársai, a minőségellenőrzést, az illesztést, valamint a differenciáltan expresszált gének meghatározását pedig Dr. Antal Károly (EKKE TTK Állattani Tanszék) végezte. A cDNS könyvtárak 1 µg totál RNS-ből kiindulva a TruSeq RNA Sample Preparation Kit (Illumina, San Diego, CA, USA) használatával készültek el, szekvenálásuk (single-read 75 bp sequencing; 16-30 millió olvasat [read]/minta) pedig az Illumina HiScan SQ (Illumina, San Diego, CA, USA) készüléssel történt. A nyers szekvencia adatok minőségi ellenőrzése a FastQC programcsomaggal (Andrews, 2010), a szekvencia olvasatok illesztése pedig HISAT2 szoftver segítségével történt (v2.1.0; Kim et al., 2015), melyhez az *A. nidulans* FGSC A4 genom adatai kerültek felhasználásra (Gila és mtsai., 2021, 2022). Az illesztések mintánként legalább 93%-os arányban sikeresek voltak. A differenciáltan expresszáldott gének a DESeq2 programcsomaggal (v1.24.0; Love et al., 2014) kerültek meghatározásra.

3.7. A transzkriptomikai adatok kiértékelése

A transzkriptomikai adatok elemzése során az alábbi definíciókat és géncsoportokat határoztuk meg:

– Felül-, illetve alulszabályozott géneknek azokat a differenciáltan expresszált (korrigált p -érték $\leq 0,05$) géneket tekintettük, amelyek expressziója (egy adott törzs esetében) az alkalmazott kezelés, (egy adott tenyésztési körülmény estén) a vizsgált mutáció következtében úgy változott meg, hogy a felülszabályozott gének esetében $\log_2FC > 1$, míg az alulszabályozott géneknél $\log_2FC < -1$ volt. A \log_2FC (\log_2 „fold change”) az a DESeq2 szoftver által számított logaritmikus érték, ami leírja az adott gén transzkripciósi aktivitásának változását a kezeletlen tenyészetben, vagy a referencia törzsben mért értékhez képest.

- Szekunder metabolit klaszter gének: Inglis és mtsai. (2013) közleményében szereplő manuálisan vagy kísérleti úton meghatározott szekunder metabolit génklaszterek génjei.
- Sejtfal bioszintézis gének: de Groot és mtsai. (2009) munkája alapján a kitin-szintázok, glükán-szintázok, transzglykolázok és endomannanázok, illetve a Leloir-útvonal génjei.
- Sejtfal degradáció génjei: de Groot és mtsai. (2009) közleményének megfelelően a kitinázok, kitin deacetilázok, hexózaminidázok, glükánázok és glükozidázok, illetve az N-acetil-glükózamin-6-foszfát deacetiláz (AN1428), az N-acetil-glükózamin transzmembrán transzporter (AN1427) és a glükózamin-6-foszfát deamináz (AN1418) génjei.
- Glikolízis gének, oxidatív pentóz-foszfát út gének, citromsav-ciklus gének: A Flippi és mtsai. (2009) közleményében leírt glikolízis, oxidatív pentóz-foszfát út és citromsav-ciklus gének.
- Ergoszterol bioszintézis gének: Az *A. fumigatus* szkvalén-ergoszterol-útvonal géneknek (Alcazar-Fuoli és Mellado, 2013) az *Aspergillus* Genome Database-ben (AspGD; <https://www.aspergillusgenome.org/>) szereplő ortológjai.
- Extracelluláris proteáz és γ -GT gének: Az AspGD -ben (szereplő *A. nidulans* proteáz gének, melyek esetében a SignalP szoftver (v5.0; Armenteros és mtsai., 2019) segítségével a szignálpeptid jelenléte kimutatható (0,8 valószínűségi szint mellett), továbbá az extracelluláris γ -glutamil-transzpeptidázt kódoló *ggtA* (AN10444) gén.
- CAZyme gének, extracelluláris CAZyme gének: A CAZY Database (<https://www.cazy.org/>) adatbázisban szereplő gének, illetve ezen gének azon csoportja, amelyek esetében a szignálpeptid meglétének valószínűsége nagyobb, mint 0,75.
- Laktóz hasznosításért felelős gének: A galaktóz-lebontó Leloir- és oxido-reduktív útvonalak génjei, illetve az előbbi útvonalak transzkripciós regulátor fehérjéit kódoló *galX* (AN10543) és *galR* (AN10543) gének (Christensen és mtsai., 2011), továbbá az ismert és feltételezett β -galaktozidázok és laktóz permeázok génjei (AspGD; Fekete és mtsai., 2012, 2016).
- Autofágiához köthető gének, vas-kén klaszter gének, riboszóma biogenezis gének, mitotikus sejtciklus gének, transzkripciós faktor gének, antioxidáns enzim gének: Az AspGD-ben szereplő „autophagy” gének, „[2Fe-2S] cluster assembly” gének, „ribosome biogenesis” gének, „mitotic cell cycle” gének, „transcription factor” gének, továbbá ismert vagy feltételezett katalázok, peroxidázok, szuperoxid-dizmutázok, illetve a glutation/glutaredoxin/tioredoxin rendszer génjei.

A fenti csoportokhoz tartozó gének teljes listája Gila és mtsai. (2021) közleményének S2. táblázatában, valamint Gila és mtsai. (2022) közleményének S2. táblázatában található meg.

Az alul-, illetve felülszabályozott génekhez kapcsolható biológiai folyamatok meghatározását géncsoport dúsulás (Gene Set Enrichment; GSE) analízisek segítségével jellemeztük GO (Gene Ontology; Harris és mtsai., 2004) FunCat (Functional Catalogue; Ruepp és mtsai., 2004) és KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes; Kanehisa és Goto, 2000) kategóriák felhasználásával a FungiFun2 szoftver (v2.2.8; Priebe és mtsai., 2015) segítségével. A kiértékelési folyamat során azokat a találatokat vettük csak figyelembe, ahol a korrigált p -érték kisebb volt, mint 0,05. A fentebb definiált kategóriákba tartozó gének dúsulását a Fisher-egzakt teszt segítségével teszteltük az R programnyelv (v4.1.1; R Core Team, 2021) és a „stats” R csomag (v3.5.3; R Core Team, 2021) használatával. A GSE analízist a szekunder metabolit klaszter gének esetében klaszterenként is elvégeztük.

3.8. Mintavétel és sejtfeltárás a fiziológiai vizsgálatokhoz

A fiziológiai vizsgálatokhoz a tenyészetekből 5 ml térfogatú mintát zsugorított üvegszűrővel szűrtünk, a kiszűrt micéliumot 4 °C-os desztillált vízzel mostuk, majd azokat Eppendorf csövekbe helyeztük, és szükség esetén további felhasználásig -20 °C-on tároltuk. Az intracelluláris paraméterek vizsgálatához a mintákat MagNA Lyser Instrument homogenizátor (Roche Diagnostics, Mannheim, Németország) segítségével tártuk fel az adott vizsgálathoz szükséges pufferben.

3.9. A növekedés jellemzése

A süllyesztett tenyészetek növekedését a biomassza száraztömegének meghatározásán keresztül jellemeztük, mely során a mintából kiszűrt micéliumot desztillált vízzel való mosást követően szobahőmérsékleten súlyállandóságig szárítottuk. A száraz sejttömeget (DCM) analitikai mérlegen mértük, majd a minta térfogatára vonatkoztatva $g\ l^{-1}$ mértékegységben adtuk meg (Pusztahelyi és mtsai., 1997).

3.10. A metabolikus aktivitás meghatározása

A tenyészetek metabolikus aktivitásának („életképességének”) meghatározása során a kultúrákból steril kémcsövekbe átmért 1 ml térfogatú mintákhoz 1 ml, az előtenyésztéskor is alkalmazott élesztőkivonatot tartalmazó friss táplevest és 100 µl metil-tiazol-tetrazolium (MTT) oldatot (10 mg l^{-1}) adtunk. A mintákat rázóinkubátorba helyeztük (220 rpm, 37 °C, 4 óra), majd 600 µl nátrium-dodecil-szulfát (SDS) oldattal (20 v/v%) kezeltük és további 20 órán át inkubáltuk a korábbi paramétereknek megfelelően. Centrifugálást követően (10000 g , 20 °C, 10 perc) a minták MTT-formázán tartalmát mértük 550 nm hullámhosszon spektrofotométerrel (Emri és mtsai., 2005a).

3.11. A szénforrás-hasznosítás meghatározása

A tenyészetek szénforrás-hasznosításának meghatározásakor a fermentlében lévő redukálócukor mennyiségét határoztuk meg *p*-hidroxibenzoészav hidrazid (PAHBAH) reagens („A” és „B” reagens 1:9 arányú elegye) segítségével. Az „A” reagens összetételében 33 mM PAHBAH és 72 mM HCl, a „B” reagens összetételében pedig 0,5 M NaOH, 42 mM trinátrium-citrát és 7,5 mM CaCl₂ szerepelt. A vizsgálat során 100 µl fermentlémintát 1 ml PAHBAH reagens jelenlétében inkubáltunk (95 °C, 5 perc), majd jégágyon való hűtést követően az elszíneződést spektrofotométerrel mértük 410 nm hullámhosszon (Lever, 1977). A glükóz-, laktóz- és arabinogalaktán-tartalmakat törzsoldatokkal készült kalibráló sorok segítségével határoztuk meg.

3.12. A fehérjetartalom kvantitatív vizsgálata

A fehérjetartalmak vizsgálatát a feltárt sejtmentes micélium kivonatokból és a szűrt fermentlevekből is elvégeztük. Mindkét esetben a minták 25 µl-éhez 900 µl Bradford-reagenst (Bradford, 1976) adtunk. A minták abszorbanciáját 15 perc szobahőmérsékleten történő inkubációt követően, 595 nm hullámhosszon mértük meg spektrofotométerrel. Az abszorbancia adatokból borjúsérum albumin (BSA) kalibráló sor segítségével határoztuk meg a fehérjetartalmat, és az így kapott értékeket a fermentlé térfogatára vonatkoztatva mg l^{-1} mértékegységben adtuk meg.

3.13. Enzimaktivitás mérések

Az extracelluláris és intracelluláris enzimaktivitásokat egyaránt 1 ml fermentlé, vagy azok sejtmentes micélium-kivonatainak fehérjetartalmát figyelembe véve határoztuk meg. 1 U-nak (egységnek) tekintettük az enzimaktivitást, ha a fent leírt körülmények között bekövetkezett abszorbanciaváltozás 1 egység volt.

Az extracelluláris proteáz-tartalom kimutatásához 100 μ l mintához 100 μ l azokazein reagenst (25 mg ml⁻¹; Na₂HPO₄ (0,2 M) – citrát-pufferben (0,1 M, pH 6,5)) adtunk. Inkubáció után (37 °C, 30 perc) 800 μ l 5 w/v%-os triklór-ecetsavat (TCA) mértünk a mintákhoz, majd centrifugálás (10000 g, 4 °C, 5 perc) után a felülúszó 800 μ l-éhez 800 μ l NaOH oldatot (0,5 M) adtunk, és a hidrolizált azokazein mennyiségét spektrofotometriásan határoztuk meg 440 nm hullámhosszon (Tomarelli és mtsai., 1949). A mért aktivitási értékeket a méréshez felhasznált minta térfogatára (folyékony tápközeg), vagy felületére (tápagar) vonatkoztattuk és U ml⁻¹, illetve U cm⁻² mértékegységgel adtuk meg.

A kitináz aktivitások mérésénél 150 μ l mintához 200 μ l citrát-puffert (0,1 M, pH 5,0) és 100 μ l karboximetil-kitin-Remazol Brilliant Violet-5R (CM-kitin-RBV) szubsztrát oldatot (CM-Chitin-RBV, Loewe Biochemica, Sauerlach, Németország) mértünk. Inkubáció után (37 °C, 30 perc) a mintákat 450 μ l HCl oldattal (2 M) kezeltük. Jégágyon történő inkubálást követően (10 perc) a mintákat centrifugáltuk (10000 g, 4 °C, 5 perc), majd a felülúszó hidrolizált CM-kitin-RBV tartalmát spektrofotometriásan határoztuk meg 550 nm hullámhosszon (Szilágyi és mtsai., 2013). A mért aktivitási értékeket a méréshez felhasznált minta térfogatára (folyékony tápközeg), vagy felületére (tápagar) vonatkoztatva U ml⁻¹, illetve U cm⁻² mértékegységgel adtuk meg.

A β -glükozidáz aktivitás mérésénél 400 μ l Na-acetát pufferhez (120 mM, pH 7,0) 100 μ l mintát, majd 100 μ l szubsztrát oldatot (5 mg ml⁻¹ *p*-nitrofenil- β -D-glükopiranozid; Na-acetát pufferben) adtunk. A mintáinkat inkubáció után (37 °C, 15 perc) 900 μ l borát-puffer (100 mM, pH 10,0) hozzáadását követően 400 nm hullámhosszon mértük a mintákban bekövetkezett abszorbanciaváltozást (Fontaine és mtsai., 1997). A felszabaduló *p*-nitrofenol koncentrációját *p*-nitrofenollal készített kalibráló sor segítségével határoztuk meg és az egységnyi idő alatt képződő termék mennyiségét a méréshez felhasznált minta térfogatára vonatkoztattuk és nkat ml⁻¹ adtuk meg.

A β -galaktozidáz aktivitások meghatározása a β -glükozidáz méréshez hasonlóan történt, de ebben az esetben a szubsztrát *p*-nitrofenil- β -D-galaktopiranóz (5 mg ml⁻¹) volt (Fontaine és mtsai., 1997).

A hexózáminidáz aktivitások vizsgálatához 400 μ l citrát-pufferhez (0,1 M, pH 4,5) adtuk hozzá a 100 μ l térfogatú mintát és 100 μ l szubsztrát oldatot (1,7 mg ml⁻¹ *p*-nitrofenil-N-acetil- β -D-glükózamin; citrát-pufferben). A mintákhoz inkubáció után (37 °C, 30 perc) 900 μ l borát-puffert (100 mM, pH 10,0) adtunk, majd 400 nm hullámhosszon végeztük el a fotometrálist (Pusztahelyi és mtsai., 1997). A felszabaduló *p*-nitrofenol koncentrációját *p*-nitrofenollal készített kalibráló sor segítségével határoztuk meg és az egységnyi idő alatt képződő termék mennyiségét a méréshez felhasznált minta térfogatára vonatkoztattuk és nkat ml⁻¹ adtuk meg.

A γ -GT mérések esetében a reagens 20 mM glicil-glicint (Gly-Gly) és 1 mM γ -glutamil-*p*-nitroanilidet tartalmazott Tris-HCl-pufferben (0,1 M, pH 8,0). 100 μ l mintához 900 μ l reagenst adtunk, majd inkubáció után (37 °C, 1 óra) az abszorbanciaváltozást (a *p*-nitroanilid felszabadulását) 410 nm hullámhosszon detektáltuk (Spitzmüller és mtsai., 2015b). A felszabaduló *p*-nitroanilid koncentrációját *p*-nitroaniliddel készített kalibráló sor segítségével határoztuk meg és az egységnyi idő alatt képződő termék mennyiségét a méréshez felhasznált minta térfogatára vonatkoztattuk és nkat ml⁻¹ adtuk meg.

A celluláz aktivitások meghatározása során karboximetil-cellulóz (CM-cellulóz) szubsztrát oldatban (1 w/v%) felszabaduló redukálócukor-tartalmak emelkedését követtük nyomon (**3.11. alfejezet**). A méréseket megelőzően a fermentléminták redukálócukor-tartalmát K-PO₄-pufferben (0,1 M, pH 6.5) történő dialízis révén távolítottuk el.

Az alábbi enzimaktivitásokat „rate assay” módszerekkel spektrofotometriásan határoztuk meg. Az egyes enzimvizsgálatok esetében 1 ml volt a reakcióelegyek végtérfogata, amelyek 10 v/v% minta mellett az alábbi összetevőket tartalmazták: A kataláz aktivitásának meghatározásához a reakcióelegy 20 mM Hepes-puffert (pH 7,6) és 0,1 mM H₂O₂-t tartalmazott, és a H₂O₂ fogyását vizsgáltuk 240 nm hullámhosszon (Roggenkamp és mtsai., 1974). A nitrát reduktáz mérés reakcióelegye 20 mM Hepes-puffert (pH 7.6), 10 mM NaNO₃-ot és 1 mM NADPH-t tartalmazott. A meghatározás során a NADPH fogyását követtük nyomon 340 nm hullámhosszon (Bruinenberg és mtsai., 1983). A glutation reduktáz aktivitások meghatározásakor a reakcióelegyben 0,1 M foszfát-puffer (16 mg ml⁻¹ K₂HPO₄ és 0,8 mg ml⁻¹ KH₂PO₄), 10 mM GSSG és 1 mM

NADPH volt. A vizsgálatok során a NADPH fogyását követtük nyomon 340 nm hullámhosszon (Pinto és mtsai., 1984). A szuperoxid-dizmutáz (SOD) aktivitások vizsgálatához a reakcióelegy 50 mM Na-PO₄-puffert (pH 7,8), 1,4 mM dietilén-triamin-pentaecetsavat (DETAPAC), 70 µM nitro blue tetrazolium-kloridot (NBT), 0,2 mM xantint, 10 U l⁻¹ xantin oxidázt és 1000 U l⁻¹ katalázt tartalmazott. A meghatározáshoz az NBT oxidálódását detektáltuk 560 nm hullámhosszon (Oberley és Spitz, 1984).

A kataláz, nitrát reduktáz és glutation reduktáz enzimek esetében az egységnyi idő alatt mért adszorbanciaváltozásból, az extinciókoefficiensek figyelembevételével, számolt aktivitási értékeket a minták fehérjetartalmára (intracelluláris minták), vagy tárfogatára (extracelluláris minták) vonatkoztatva mkat kg⁻¹ protein, vagy nkat ml⁻¹ mértékegységgel adtuk meg. A SOD esetében 1 U-nak tekintettük annak a mintának az aktivitását amely az NBT oxidálódásának sebességét 50%-al tudta csökkenteni. Az aktivitási adatokat ebben az esetben is a minták fehérje tartalmára vonatkoztattuk és U mg⁻¹ protein (intracelluláris minták), vagy U ml⁻¹ (extracelluláris minták) mértékegységgel adtuk meg.

3.14. A glutationtartalom kvantitatív meghatározása

Előkezelésként a szűrt micéliummintákat 1 ml 4 °C-os szulfoszalicilsav oldatban (5 w/v%) vettük fel, majd jégágyon történő inkubáció (10 perc) után centrifugáltuk (10000 g, 4 °C, 10 perc), ezt követően pedig a felülúszókkal dolgoztunk tovább. A feltárt minták GSSG-tartalmát Anderson „rate assay” eljárása révén határoztuk meg (Anderson, 1985). Előzetesen a minták GSH-tartalmát 2-vinilpiridines kezeléssel (185 mM, pH 6,0-7,0; 1 óra) reagáltattuk el. A továbbiakban a reakcióelegy 115 mM Na-PO₄-puffert (pH 7,5), 50 mM Na-EDTA, 0,6 mM 5,5'-ditio-bisz(2-nitrobenzoesav) (DTNB), 0,2 mM NADPH, 1,5 kU l⁻¹ glutation reduktáz és 10 v/v% előkezelt mintát tartalmazott. A GSSG-tartalmak meghatározásához a DTNB redukcióját detektáltuk spektrofotométerrel 412 nm hullámhosszon és az egységnyi idő alatt redukálódott DTNB mennyiségét kalibráló sor segítségével számoltuk ki.

A GSH-tartalom meghatározása során a minták teljes glutationtartalmát (GSH + GSSG) mértük a GSSG-meghatározáshoz használt eljárásnak megfelelően a 2-vinilpiridines kezelés nélkül, majd a GSH mennyiségét a GSSG-tartalmak ismeretében számítottuk ki. A meghatározott mennyiségeket a minták száraztömegére vonatkoztatva nmol mg⁻¹-ban adtuk meg.

3.15. A melanintermelés vizsgálata

A sülyesztett tenyészetek melanizációját a tenyészetekről készült fényképeken dokumentáltuk. Az extracellulárisan kiválasztódó, oldott melanin mennyiségének nyomon követéséhez a tenyészetek teljes fermentlevét zsugorított üvegszűrőn keresztül választottuk el, majd a tiszta felülúszó abszorbanciáját spektrofotometriásan határoztuk meg 405 nm hullámhosszon. Az így kapott abszorbanciaértékek a fermentlé melanintartalmának kvantitatív becslésére szolgáltak (Szilágyi és mtsai. 2018).

3.16. A redox egyensúlyvesztés detektálása

A sülyesztett kultúrák redox egyensúlyában bekövetkező változásokat DCF-teszt segítségével vizsgáltuk, amely során a tenyészetek 20 ml térfogatú részleteihez $10 \mu\text{mol l}^{-1}$ végkoncentrációban 2,7-diklórfluoreszcin diacetátot (DCFDA) adtunk (Halliwell és Gutteridge, 2015). A tenyészeteket 1 órán keresztül inkubáltuk ($37 \text{ }^\circ\text{C}$, 220 rpm), majd a korábban leírtak szerint mintavételeztünk a micéliumból (3.2. alfejezet). Szulfoszalicilsavas előkezelést követően (3.14. alfejezet) a minták $500 \mu\text{l}$ -ét $500 \mu\text{l}$ NaOH oldattal (2 M) közömbösítettük. Az így kezelt minták 2,7-diklórfluoreszcein (DCF) tartalmának meghatározása fluoreszcenciás intenzitás mérés segítségével történt ($502 \text{ nm}/523 \text{ nm}$) DCF kalibráló sor felhasználásával. A képződött DCF mennyiségét a minták DCM-ra vonatkoztatva pmol DCF mg^{-1} DCM mértékegységgel adtuk meg.

3.17. A szterigmatocisztin termelés meghatározása

A tenyészetek STC-termelésének kvalitatív ellenőrzése vékonyréteg-kromatográfiás (TLC) eljárással történt. Az STC-tartalmak kinyeréséhez liofilizált, majd gyöngymalommal (MAGNA Lyser Instrument, Roche Diagnostics, Mannheim, Németország) homogenizált micélium mintákból acetonos ($70 \text{ v/v}\%$) extrakciót végeztünk. Az acetonos extraktumokból $25 \mu\text{l}$ térfogatú részleteket vittünk fel szilikagél lemezre (TLC Silica gel 60 F₂₅₄, Merck Millipore, Darmstadt, Németország) (Ámon és mtsai., 2018). A mozgó fázis toluolt, etil-acetátot és jégecetet tartalmazott 8:1:1 arányban (Shwab és mtsai., 2007). A futtatás után a TLC lemezeket száradni hagytuk, majd a szekunder metabolit spektrumok előhívásához AlCl_3 -oldattal (10 g l^{-1} ; $96 \text{ v/v}\%$ etanol)

permeteztük be a szilika réteg felületét, majd 366 nm hullámhosszúságú UV-megvilágítás mellett végeztük a detektálást (Ámon és mtsai., 2018).

A micéliumok STC-tartalmának kvantitatív vizsgálata HPLC analízissel Prof. Dr. Pusztahelyi Tünde segítségével (DE MÉK Agrárműszerközpont) történt. Az STC-tartalmak kinyeréséhez liofilizált, majd gyöngymalommal (MagNA Lyser Instrument, Roche Diagnostics, Mannheim, Németország) homogenizált micélium mintákból metanolos (80 v/v%) extrakciót végeztünk. Centrifugálást (5000 g, 5 perc) követően a felülúszók 50 µl-ét HPLC fecskendőszűrő (Whatman Spartan, Cytiva, Marlborough, MA, USA) segítségével szűrtük, majd egy C18 oszloppal és diódasoros detektorral (DAD) szerelt HPLC berendezéssel (LaChrom Elite, Hitachi, Ichige, Japán) analizáltuk. A minták elúciója acetonitril, metanol és víz 15:50:35 arányú elegyével történt, az ST mennyiségét pedig 254 nm hullámhosszon detektáltuk.

3.18. Az extracelluláris fehérjék azonosítása

A fermentlébe szekretált fehérjék vizsgálatakor a minták előkészítéséhez a 48 órás tenyészetek sejtmentessé szűrt fermentlevéből indultunk ki. A fehérjék kicsapása a mintákból triklór-ecetsavval (20 v/v%) történt (1:1), majd a kicsapódott fehérjéket 30 perc jégágyon történő inkubációt követően centrifugálással (10000 g, 4 °C, 20 perc) gyűjtöttük össze. A csapadékot 500 µl jéghideg acetonnal mostuk, és szobahőmérsékleten szárítottuk (Pusztahelyi és mtsai. 2011), ezt követően pedig 100 µl rehidratáló pufferben oldottuk vissza. A rehidratáló puffer az alábbiakat tartalmazta: 7 M karbamid, 2 M tiokarbamid, 20 g l⁻¹ 3-[(3-kolamidopropil)-dimetilammónium]-1-propánszulfonát (CHAPS), 50 mM ditiotreitolt (DTT), 2 g l⁻¹ 100x Bio-Lyte 3/10 IPG puffer (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), 20 mg l⁻¹ brómfenolkék.

A fehérjék 2D gélelektroforézissel történő elválasztását Dr. Keserű Judit (DE ÁOK, Humánagenetikai Tanszék) végezte el Keserű és mtsai. (2011) közleményében leírtaknak megfelelően. A gélből manuálisan kivágott fehérjék tripszines emésztését követően a minták analízise egy 4000 QTRAP tömegspektrométerrel (AB Sciex, Framingham, MA, USA) kapcsolt EasyLC II nanoHPLC berendezéssel (Bruker, Billerica, MA, USA) történt. A kapott LC-MS/MS adatokból a fehérjék azonosítását Prof. Dr. Csósz Éva és munkatársai végezték (DE ÁOK, Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet) a Swiss-Prot adatbázisból (Swiss Institute of Bioinformatics, Lausanne, Svájc) a

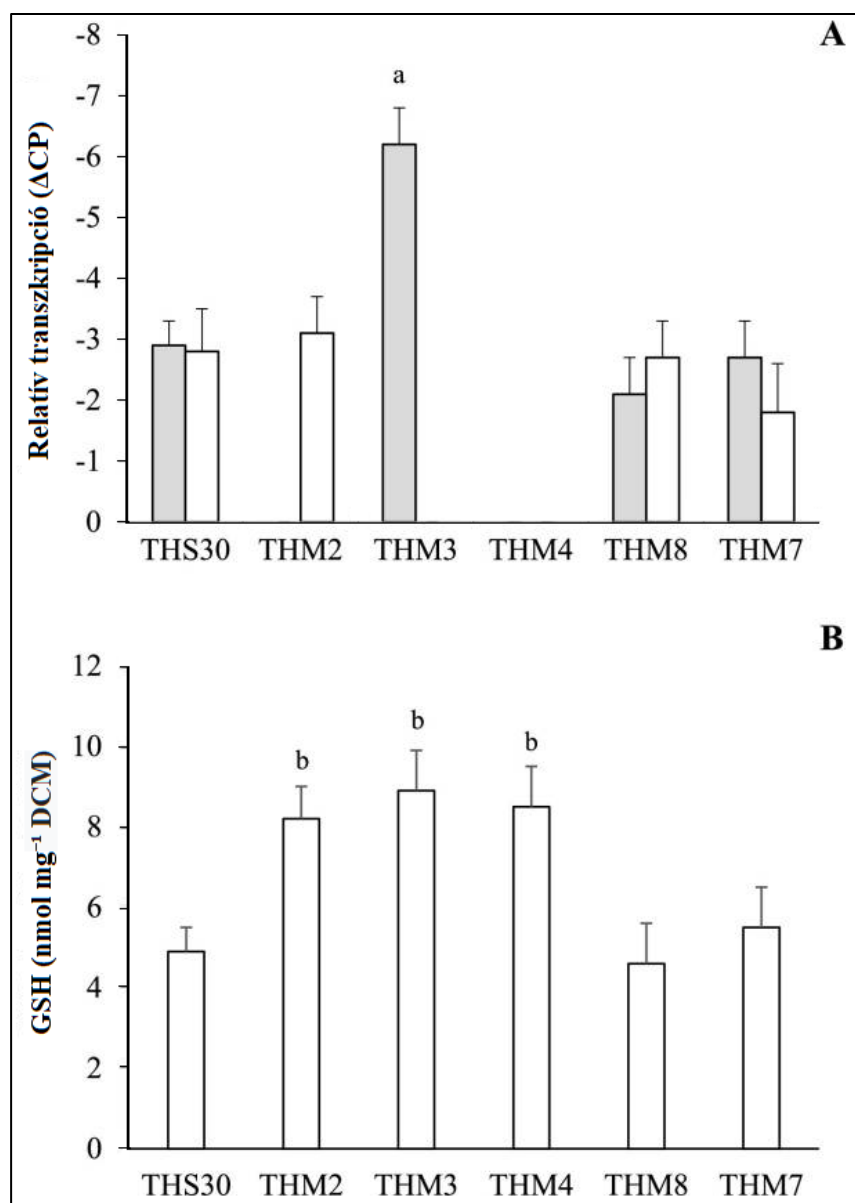
ProteinPilot szoftver (v4.5; AB Sciex, Framingham, MA, USA) segítségével legalább két peptid alapján 99%-os megbízhatóság mellett.

4. Eredmények

4.1. A szénéhezés alatti GSH-metabolizmus vizsgálata

4.1.1. A *dugB* és *dugC* delécióinak hatása a két gén relatív transzkripciójára és a süllyesztett tenyészetek GSH-tartalmára

Dr. Heungyun Harrison Moon és Prof. Dr. Jae-Hyuk Yu (University of Wisconsin-Madison, Madison, WI, USA) három *A. nidulans* törzset (egy $\Delta dugB$ és egy $\Delta dugC$ mutánst, valamint egy $\Delta dugB-\Delta dugC$ duplamutánst) és a hozzájuk tartozó komplementált törzseket bocsájtott rendelkezésünkre annak érdekében, hogy a feltételezett DugB-DugC komplex citoszolikus GSH lebontásában betöltött szerepét tisztázzuk. Elsőként a mutáns törzsek, a referencia törzs és a komplementált törzsek szénéhező tenyészeiben vizsgáltuk meg a *dugB* és *dugC* gének expressziós aktivitását (**6A. ábra**). Érdekes módon a *dugC* deléciója a *dugB* expresszióját is csökkentette, aminek aktivitását visszaállította a *dugC* komplementációja. Ezzel szemben a *dugB* hiánya és annak komplementációja sem befolyásolta a *dugC* transzkripcióját. A géndeléciók nem változtatták meg a sejtek GSSG-tartalmát, amelyek értéke 0,5 és 1 nmol mg^{-1} DCM között volt minden vizsgált 1 napos süllyesztett kultúrában. Szénéhező körülmények között, mindegyik deléciós törzsnek szignifikánsan nagyobb volt a GSH-tartalma (**6B. ábra**). A $\Delta dugB$ és $\Delta dugC$ deléciós törzsek *dugB*, illetve *dugC* génekkel való komplementációja (**6A. ábra**) azonban csökkentette a törzsek GSH-tartalmát, és helyreállította a THS30 referencia törzs fenotípusát (**6B. ábra**). A GSH-tartalom egységes növekedése a deléciós mutánsokban arra utal, hogy a DugB és a DugC egyaránt részt vesz a citoszolikus GSH lebontásában szénéhezés során, illetve arra, hogy nem képesek egymást helyettesíteni. Ez egybevág azzal a megállapítással, hogy a Dug2p és Dug3p (amelyek a DugB és DugC ortológjai az *S. cerevisiae*-ben) $\alpha_2\beta_2$ heterotetramert alkotnak az élesztő sejtekben, és csak ez a heterotetramer rendelkezik GSH-hidrolizáló (glutamin-amidotranszferáz) aktivitással (Kaur és mtsai., 2012). Így, a GSH lebontása a heterotetramer jellegből adódóan a *dugB* vagy a *dugC* bármelyikével szabályozható. A két gén között megfigyelt aszimmetrikus kölcsönhatás (pl. a DugC képes felülszabályozni a *dugB*-t) segítheti a *dugB* és a *dugC* expresszióját befolyásoló hatások finomhangolását. Ez különösen fontos lehet, ha ellentétes hatások szabályozzák a két gén aktivitását.



6. ábra A *dugB* és *dugC* gének relatív transzkripciója (A), illetve a sejtek GSH-tartalma (B) a THS30 (kontroll) törzs, a THM2 (Δ *dugB*), THM3 (Δ *dugC*) és THM4 (Δ *dugB*- Δ *dugC*) deléciós törzsek, valamint a THM7 (*dugC*⁺) és THM8 (*dugB*⁺) komplementált törzsek súllyesztett tenyészetében szénéhező körülmények között

Az „A” ábra oszlopai a *dugB* (szürke) és *dugC* (fehér) gének relatív transzkripcióinak értékeit mutatják. A „B” ábra fehér oszlopai az 1 napos szénéhező tenyészetek micéliumainak GSH-tartalmát ábrázolják. A THS30 törzs esetében egy, a THM2, THM3 és THM8 törzsek esetében három, a THM4 és THM7 törzs esetében pedig négy izotípust vizsgáltunk triplikátumokban. Az ábra különböző genotípusonként a mérések átlagát és szórását tartalmazza.

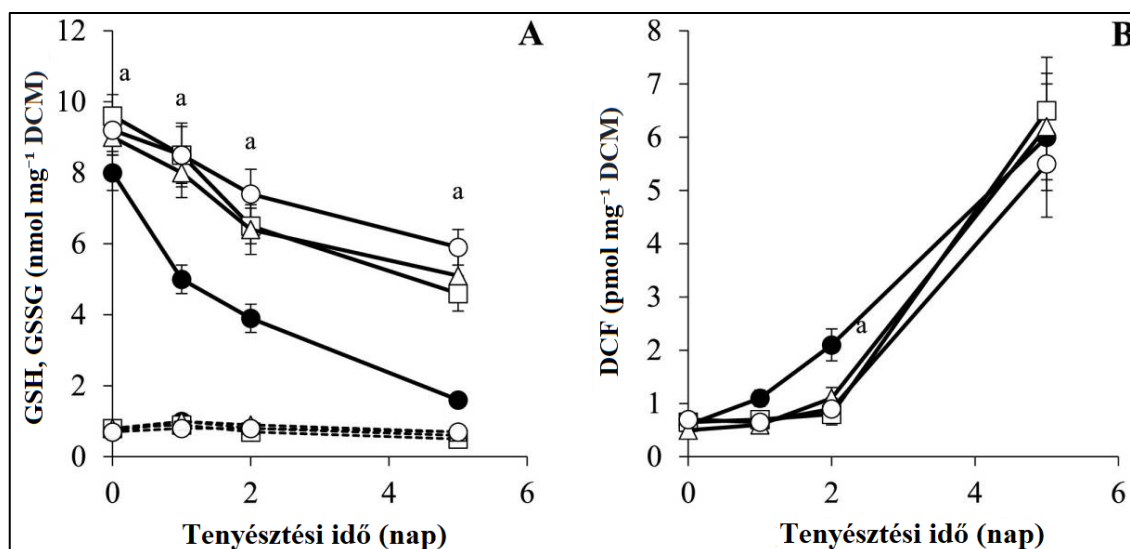
^a – A *dugB* gén relatív transzkripciója szignifikánsan nagyobb volt a Δ *dugC* mutánsban a kontroll törzshöz képest (Student-féle *t*-teszt, $p < 0,05$).

^b – A GSH-tartalom szignifikánsan nagyobb volt a mutáns törzsben a kontroll törzshöz képest (Student-féle *t*-teszt, $p < 0,05$).

GSH: redukált glutation; DCM: száraz sejtömeg (dry cell mass)

4.1.2. A *dugB* és *dugC* delécióinak hatása a sülylesztett tenyészetek fiziológiai paramétereire

A sülylesztett kultúrák vizsgálata során exponenciális fázisú, növekedő micélium pelletet kerültek átmosásra szénforrásmentes tápközegbe. A 0 órás mintavételi időpontok a még növekedő tenyészetek közötti különbségeket, a további időpontok pedig a már szénéhező körülmények alatti kialakult különbségeket mutatják. A *dugB* és/vagy *dugC* deléciója a várakozásoknak megfelelően a kontroll törzs GSH-szintjéhez képest emelkedett GSH-tartalmat eredményezett (7A ábra). A micéliumok GSSG-tartalma minden törzsben és minden egyes mintavételkor körülbelül 0,5 és 1 nmol mg⁻¹ DCM között volt (7A ábra), továbbá a fermentlevekből nem mutattunk ki GSH-t és GSSG-t sem. Érdekes módon még a *dugB* és a *dugC* kettős deléciója sem blokkolta teljesen a GSH-raktárak kimerülését (7A ábra). Ezek az adatok arra utalnak, hogy a DUG-útvonalon kívül más útvonal(ak) is hozzájárul(nak) a GSH lebontásához szénéhezés során. A szénéhező tenyészetekre különösen jellemző a reaktív oxigéngyökök felhalmozódása (Sámi és mtsai., 2001; Emri és mtsai., 2004).



7. ábra Redox-változások a deléciós törzsekben: A GSH- és GSSG-tartalom (A), valamint a DCF-képződés változásai (B) az *A. nidulans* THM2 ($\Delta dugB$; □), THM3 ($\Delta dugC$; Δ) és THM4 ($\Delta dugB-\Delta dugC$; ○) mutánsok, valamint a THS30 (●) kontroll törzs szénéhező sülylesztett tenyészetében

Az ábra három független kísérlet eredményének átlagát és szórását mutatja. A GSSG-tartalmak szórás értékei (szaggatott vonalak) nem haladták meg az átlagok 15%-át, ezért nem láthatók a szimbólumok miatt. A megnövekedett DCF-képződés redox egyensúlyvesztésre utal.

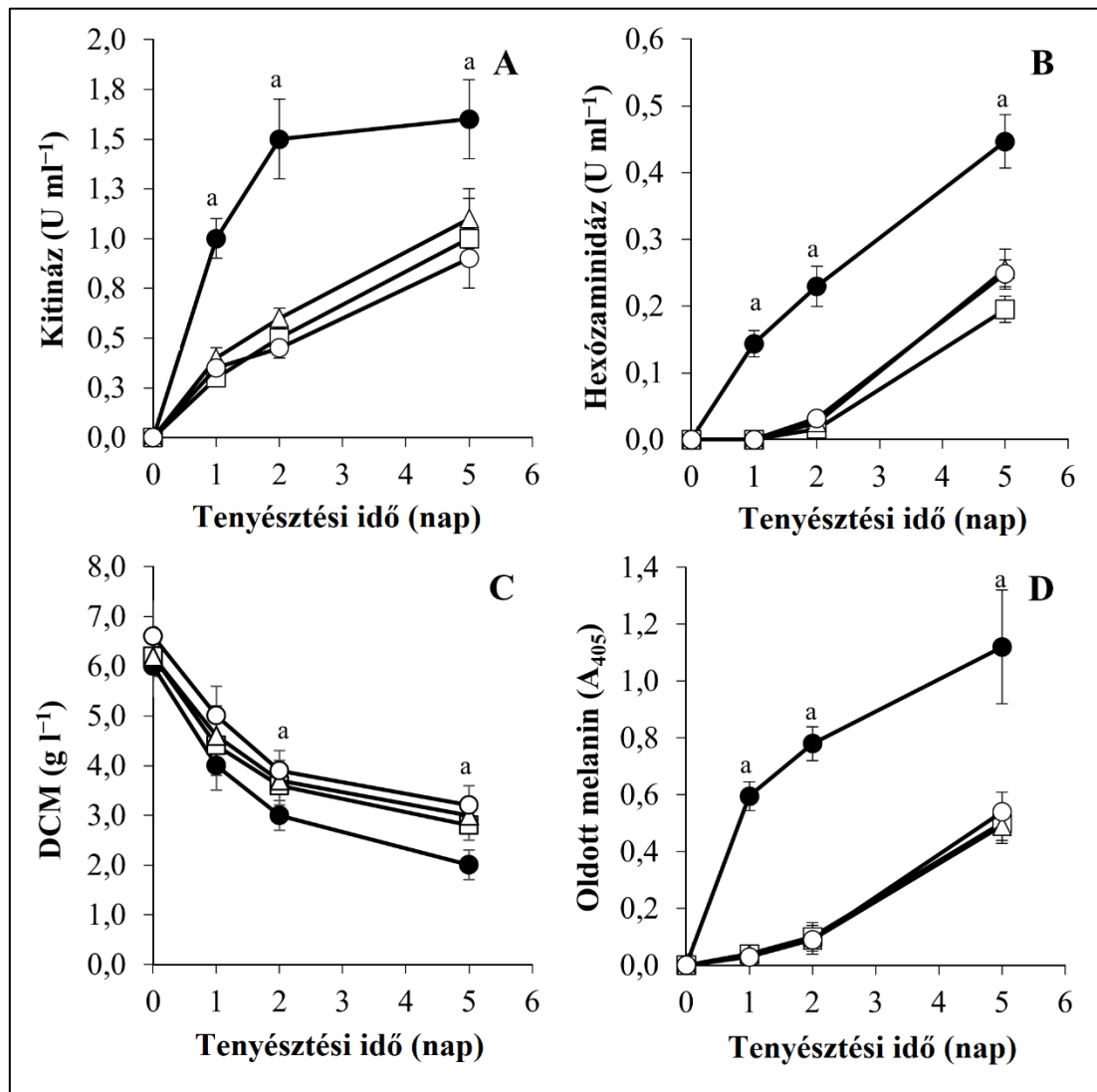
^a – Szignifikáns különbség mindhárom mutáns törzs adatai és a kontroll törzs adata között a jelzett időpontban (Student-féle *t*-teszt, $p < 0,05$).

GSH: redukált glutation; GSSG: oxidált glutation; DCM: száraz sejttömeg (dry cell mass); DCF: 2,-diklórfluorescein;

A csökkent GSH-lebontást a redox-egyensúly késleltetett felborulása kísérte (**7B. ábra**), ami arra utal, hogy a szénéhezés alatt lecsökkent GSH-tartalom részben felelős a reaktív oxigéngyökök felhalmozódásáért. Fontos azonban kiemelni, hogy a vizsgálatba bevont törzsek redox-állapotában nem volt szignifikáns eltérés a tenyésztés végére (**7B. ábra**.)

A szénéhezés alatti autolitikus sejtfall lebontásban főként extracelluláris hidrolázok (pl. kitinázok, hexózaminidázok és glükánázok) vesznek részt (van Munster és mtsai., 2016). Ezek azok az enzimek, amelyek lebontják az elhalt („üres”) hifák sejtfalát, hogy hasznosítsák azok anyagát (Szilágyi és mtsai., 2013; Emri és mtsai., 2018), ami a biomassa csökkenését eredményezi. Az élő hifasejtek – többek között – melanint termelnek, hogy megvédjék sejtfalukat ezen hidrolázokkal szemben (Szilágyi és mtsai., 2018). A DUG-útvonalban gátolt mutánsok kevesebb kitinázt és hexózaminidázt szekretáltak a fermentlébe (**8A. és 8B. ábrák**), és esetükben a DCM is kisebb mértékben csökkent (**8C. ábra**), emellett pedig kevesebb melanint termeltek (**8D. ábra; 3. melléklet**), mint a kontroll törzs. Az extracelluláris proteáz szekréció szintén egy szénéhezésre jellemző folyamat, amit intracelluláris γ GT termelés és szekréció kísér (Spitzmüller és mtsai., 2015b). A vizsgálatok során a deléciós törzsek kevesebb proteázt és γ GT-t termeltek a kontroll törzshöz képest (**9. ábra**).

A hexózaminidáz és az extracelluláris γ GT-termelés esetében a H_2O_2 -kezelés hatását is vizsgáltuk. A H_2O_2 mindkét extracelluláris enzim képződését növelni tudta a vizsgált THM4 mutánsban, azonban ugyanez a kezelés a kontroll törzsből ellentétes hatást fejtett ki (**10. ábra**). Ezek az adatok alátámasztják azt a feltételezést, hogy az autolitikus sejtfall lebontás és a proteáz/ γ GT-termelés redox-szabályzás alatt áll. Ez összhangban van azokkal a korábbi eredményekkel, melyek szerint a mérsékelt oxidatív stressz fokozta, míg az α -tokoferol kezelés (az erős oxidatív stresszel együtt) gátolta az *A. nidulans* autolitikus sejtfall lebontását (Emri és mtsai., 2004).

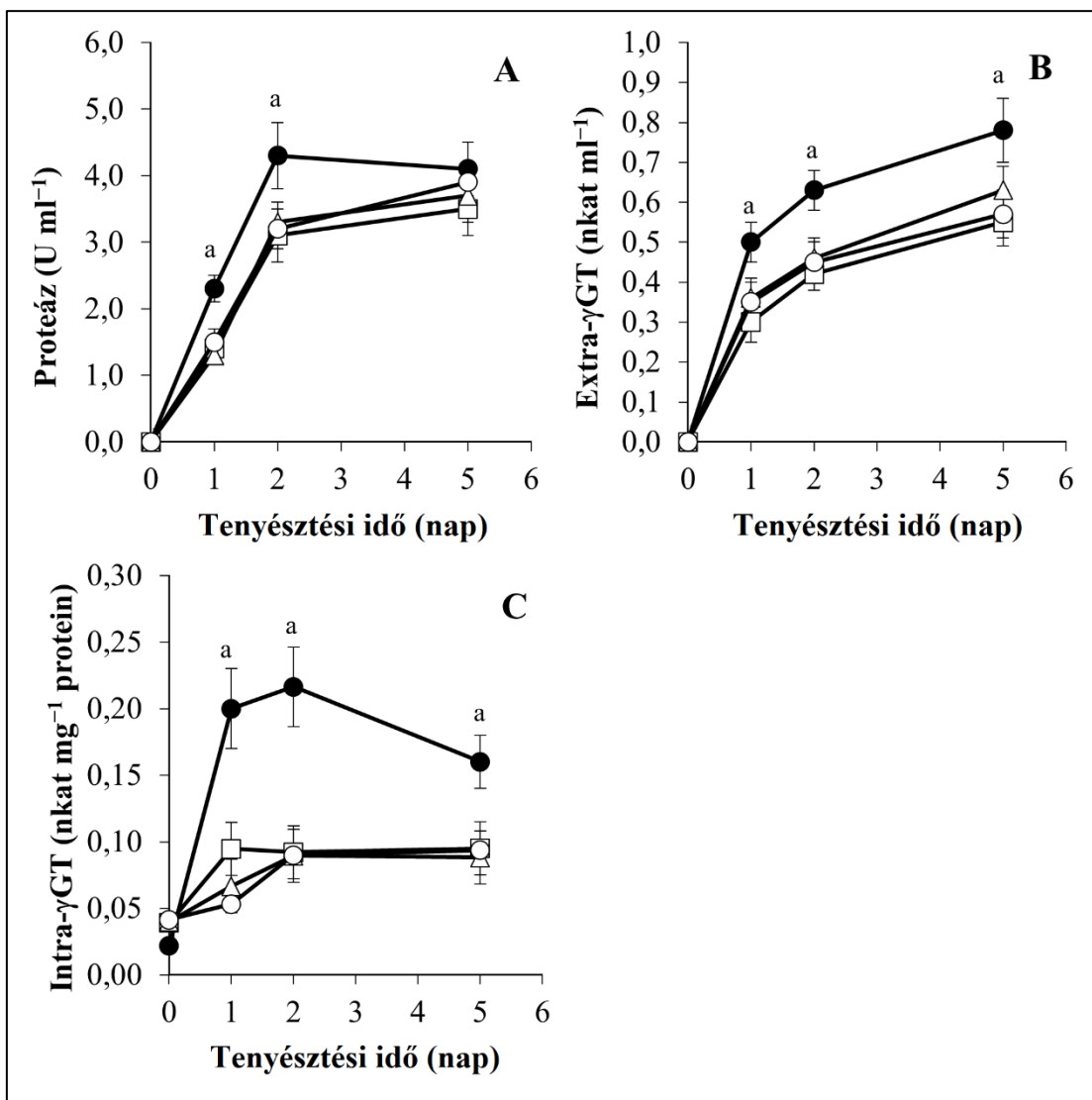


8. ábra Autolitikus sejtfallebontás a deléciós törzsekben: A kitináz (A) és hexozaminidáz (B) aktivitások, valamint a DCM (C) és a melanizáció (D) változásai az *A. nidulans* THM2 ($\Delta dugB$; □), THM3 ($\Delta dugC$; △) és THM4 ($\Delta dugB-\Delta dugC$; ○) mutánsok, valamint a THS30 (●) kontroll törzs süllyesztett tenyészeiben szénéhező körülmények között

Az ábra három független kísérlet eredményének átlagát és szórását mutatja.

^a – Szignifikáns különbség mindhárom mutáns törzs adatai és a kontroll törzs adata között a jelzett időpontban (Student-féle *t*-teszt, $p < 0,05$).

DCM: száraz sejtömeg (dry cell mass)

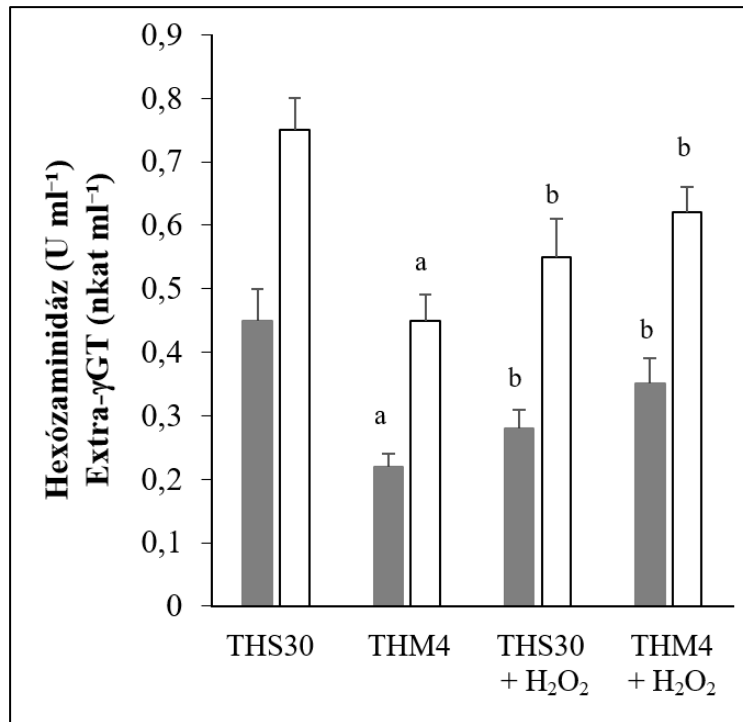


9. ábra Peptid-hasznosítás a deléciós törzsekben: Az extracelluláris peptidáz (A), extracelluláris γ GT (B) és intracelluláris γ GT (C) aktivitások változásai az *A. nidulans* THM2 (Δ *dugB*; □), THM3 (Δ *dugC*; △) és THM4 (Δ *dugB*- Δ *dugC*; ○) mutánsok, valamint a THS30 (●) kontroll törzs süllyesztett tenyészeiben szénéhező körülmények között

Az ábra három független kísérlet eredményének átlagát és szórását mutatja.

^a – Szignifikáns különbség mindhárom mutáns törzs adatai és a kontroll törzs adata között a jelzett időpontban (Student-féle *t*-teszt, $p < 0,05$).

γ GT: γ -glutamil-transzpeptidáz



10. ábra A H₂O₂ kezelés hatása az *A. nidulans* THM4 ($\Delta dugB$ - $\Delta dugC$) mutáns, valamint a THS30 kontroll törzs süllyesztett szénéhező tenyészetek hexózáminidáz- (szürke oszlopok) és extracelluláris γ GT- (fehér oszlopok) termelésére.

A H₂O₂ kezelés során a micéliumok szénforrásmentes tápközegbe való átmosását követően a tápoldatot 100 mmol l⁻¹ H₂O₂-dal egészítettük ki. Az ábra három független kísérlet eredményének átlagát és szórását mutatja.

^a – Szignifikáns különbség a kontroll törzs és a mutáns között (Student-féle *t*-teszt, $p < 0,05$).

^b – Szignifikáns különbség a H₂O₂-dal kezelt és a kezeletlen kultúrák között (Student-féle *t*-teszt, $p < 0,05$).
 γ GT: γ -glutamil-transzpeptidáz

4.1.3. *A dugB* és *dugC* kettős deléciójának hatása a felületi tenyészetek stressz toleranciájára, valamint ivaros és ivartalan fejlődésére

Mivel a $\Delta dugB$ és $\Delta dugC$ mutánsok (THM2 és THM3), illetve a $\Delta dugB$ - $\Delta dugC$ duplamutáns (THM4) nagyon hasonlóan viselkedtek a fent leírt kísérletekben, ezért a további elemzésekhez csak egy mutánst (THM4) választottunk ki. Bár a *dugB* és *dugC* kettős deléciója növelte a sejtek GSH-tartalmát és lassította a GSH-lebontást szénéhezés alatt (**6. és 7A. ábrák**), a THM4 törzs oxidatív, só- és kongóvörös- (CR) stressztűrése nem különbözött jelentősen a referencia törzsétől (**4A. melléklet**). Korábban azt figyeltük meg felületi tenyészeteknél, hogy a telepek alatti glükóz koncentráció néhány napon belül közel nullára csökkent a 10 g l⁻¹ glükózt tartalmazó standard Barratt-féle táptalaj esetén, de a 40 g l⁻¹ glükózzal készített táptalajban nem (Emri és mtsai., 2018). Így a GSH-tartalom szénstressz okozta csökkenésének elkerülésének érdekében a kiindulási glükóz koncentrációt 40 g l⁻¹-re emeltük (Emri és mtsai., 2018) és megismételtük a stressz-

kísérleteket ilyen körülmények között is. A két törzs stressztűrésében azonban ezen feltételek mellett sem találtunk szignifikáns eltérést (**4B. melléklet**).

Azonban a THM4 mutáns fokozott toleranciát mutatott a CdCl₂-dal szemben 10 g l⁻¹ és 40 g l⁻¹ glükózt tartalmazó táptalajon is (**2. táblázat**). Ez azt jelenti, hogy a micélium GSH-tartalmának döntő szerepe van a gomba nehézfém elleni védelemben. Ez összhangban van a Cd²⁺ detoxifikációval kapcsolatos ismereteinkkel, amelyek a baktériumoktól az emberig széles körben elterjedt bisz(glutation)-kadmium-komplex transzportrendszeren alapulnak (Prévéral és mtsai., 2009).

A *dugB* és *dugC* gének kettős deléciója nem változtatta meg lényegesen a gomba konídium-termelését 10 g l⁻¹ glükózt tartalmazó táptalajon (**2. táblázat**). A 40 g l⁻¹ kiindulási glükóz koncentrációjú agarlemezek használata csökkentette a sugárirányú növekedést és növelte a kontroll törzs konídium-termelését (**2. táblázat**), ahogyan azt korábban is megfigyeltük (Emri és mtsai., 2018). Az emelt glükózkoncentráció a THM4 mutánsban is csökkentette a radiális növekedést, azonban nem növelte a konídiumképződést (**2. táblázat**). Emellett a szexuális és aszexuális fejlődés közötti egyensúly a szexuális fejlődés irányába tolódott el: megindult a kleisztotéciumok fejlődése (primordium) és csökkent a specifikus konídiumtermelés (**11. ábra**; 1. táblázat), illetve a telepek konídiummal borított részének aránya is csökkent (**11. ábra**).

2. táblázat Az *A. nidulans* THS30 referencia törzs és a THM4 (Δ *dugB*- Δ *dugC*) mutáns növekedésének, kadmium-toleranciájának és konídiumtermelésének összehasonlítása felületi kultúrákban^a

Tenyésztési körülmények	10 g l ⁻¹ glükóz				40 g l ⁻¹ glükóz			
	Telepátmérő (mm)		Konídiumtermelés (10 ³ mm ²)		Telepátmérő (mm)		Konídiumtermelés (10 ³ mm ²)	
	THS30	THM4	THS30	THM4	THS30	THM4	THS30	THM4
AMM	57 ± 1,5	55 ± 2	42 ± 6	40 ± 7	44 ± 2 ^b	43 ± 2 ^b	134 ± 15 ^b	50 ± 10 ^c
+ 10 mM GSH	33 ± 2 ^d	31 ± 3 ^d	16 ± 2 ^d	9 ± 3 ^{c,d}	39 ± 4	38 ± 3	60 ± 8 ^{b,d}	8 ± 3 ^{c,d}
+ 10 mM DTT	23 ± 1 ^d	25 ± 2 ^d	0 ^d	0 ^d	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
+ 0,3 mM CdCl ₂	27 ± 1 ^d	35 ± 1 ^{c,d}	n.a.	n.a.	30 ± 1 ^d	33 ± 1 ^{c,d}	n.a.	n.a.

^a – A táblázat három független kísérlet eredményeinek átlagát és szórását tartalmazza. A THM2 és THM3 géndeléció törzsek viselkedése a THM4 dupla mutánséhoz, a THM7 és THM8 komplementált törzsek viselkedése pedig a THS30 törzshez volt hasonló. Ezeket az adatokat a Gila és mtsai. (2021) közleményének „S5” táblázata tartalmazza, melyek csak terjedelmi okok miatt nem kerültek bele a dolgozatba.

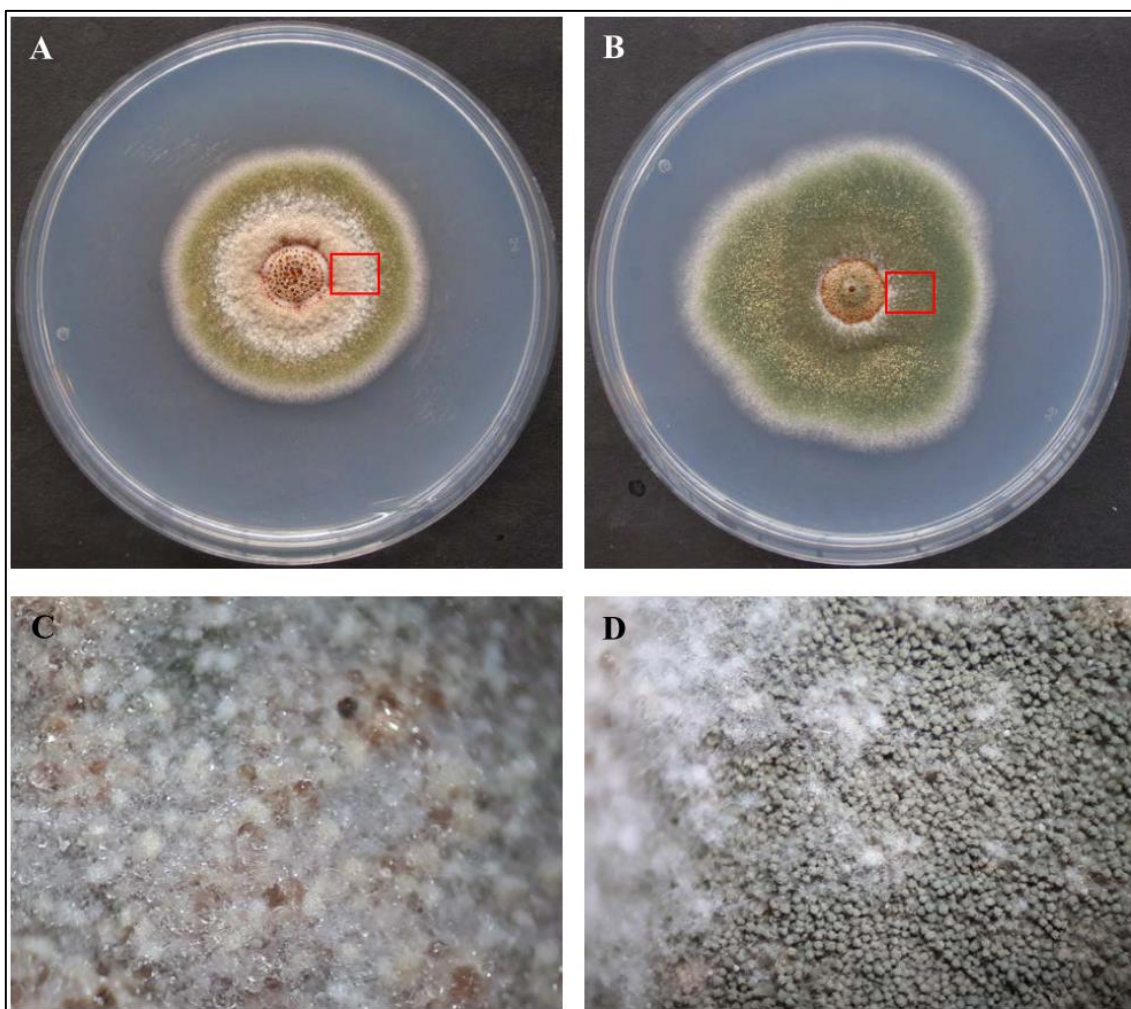
^b – Szignifikáns különbség a 10 g l⁻¹ glükózon és 40 g l⁻¹ glükózon tenyésztett kultúrák közt (Student-féle *t*-teszt, *p* < 0,05).

^c – Szignifikáns különbség a mutáns és a kontroll törzs közt (Student-féle *t*-teszt, *p* < 0,05).

^d – Szignifikáns különbség a GSH-, DTT-, vagy CdCl₂-kezelt tenyészet és a kezeletlen tenyészet között (Student-féle *t*-teszt, *p* < 0,05).

n.a.: nem került meghatározásra; GSH: redukált glutation; DTT: ditiotreitolt

Az askospóra-, illetve kleisztotécium-képződést nem számszerűsítettük, mivel érett kleisztotéciumokat nem találtunk a fent leírt körülmények között. A 10 g l⁻¹ glükózt tartalmazó tenyészetek esetében 10 mM GSH vagy ditiotreitól (DTT) hozzáadása csökkentette a radiális növekedést, valamint a konídium-képződését mindkét törzsnél (**2. táblázat**), továbbá 10 mM GSH jelenlétében a THM4 mutáns szignifikánsan kevesebb konídiumot termelt, mint a kontroll törzs (**2. táblázat**). A 10 mM GSH jelenlétében megfigyelt különbség a két törzs konídium-termelése között a 40 g l⁻¹ glükózt tartalmazó táptalajon még szembevetőbb volt. Mindezek az adatok arra utalnak, hogy a redukzív stressz, amelyet akár redukáló szerek (pl. GSH vagy DTT) hozzáadásával, akár a GSH lebontásának gátlásával idézünk elő, befolyásolhatja az *A. nidulans* fejlődési folyamatait.



11. ábra Az *A. nidulans* THM4 ($\Delta dugB$ - $\Delta dugC$; A és C) mutáns, valamint a THS30 (B és D) kontroll törzs viselkedése glükózban gazdag körülmények között

A törzseket 40 g l⁻¹ glükózt tartalmazó agarlemezekben tenyésztettük. Az ábra a leoltást követő 5. napon készült reprezentatív fényképeket mutatja be. A petri-csészék átmérője 85 mm volt. A piros téglalapok a nagyítások (C és D) helyét jelölik.

4.1.4. A szénéhezés, valamint a *dugB* és *dugC* kettős deléciójának hatása a tenyészetek génexpressziós mintázatára

Annak megállapítására, hogy a DUG-útvonal inaktiválása mely géneknek és milyen mértékben változtatja meg az expressziós aktivitását, újgenerációs RNS-szekvenálást végeztünk a tenyészetekből izolált RNS mintákon. Vizsgálatainkhoz a THM4 dupla mutáns és THS30 kontroll törzs szénéhező süllyesztett kultúráinak transzkriptomát vizsgáltuk, referenciaként pedig glükózon növekedő tenyészeteket használtunk. Fontos megjegyezni, hogy a *dugB* és *dugC* gének kettős deléciója nem volt szignifikáns hatással a növekedésre, a THS30 és THM4 törzsek növekedési sebessége glükóz szénforráson $0,22 \pm 0,05 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$, illetve $0,20 \pm 0,05 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ volt (Student-féle *t*-teszt; $p = 0,65$ $n = 3$). Kiválasztottunk összesen 15 felül- és alulszabályozott, illetve nem szabályozott gént, amelyek expressziós szintjét RT-qPCR analízissel is megmértük (**3. táblázat**). Az RT-qPCR-adatokat összehasonlítva az RNAseq-adatokkal a legtöbb esetben szoros korrelációt tapasztaltunk. A Pearson-féle korrelációs koefficiensek értékei a következők voltak: 0,85 (szénéhezés vs. glükózon növekedés, THS30); 0,83 (szénéhezés vs. glükózon növekedés, THM4); 0,85 (THM4 vs. THS30, glükóz); -0,1 (THM4 vs. THS30, szénéhezés). Szénéhező körülmények között a vizsgált gének expressziójában csak minimális eltérés volt a két törzs között, azaz a $\Delta\Delta\text{Ct}$ (RT-qPCR) és $\log_2\text{FC}$ (RNAseq) értékek is nullához közeli értékűek voltak, így nem meglepő, hogy ebben az esetben a korrelációs koefficiens értéke sem tért el jelentősen a nullától.

A felvehető szénforrás hiánya jelentősen módosította a tenyészetek transzkriptomát (**12. és 13. ábra**), mint ahogyan az már egy vad típusú törzs esetében korábban is megállapításra került (Szilágyi és mtsai. 2013). A *dugB* és *dugC* gének kettős deléciója csak kis mértékben volt hatással a gomba transzkriptomára, és meglepő módon ez a hatás glükóz esetén volt határozottabb, mintsem szénéhezés alatt (**12. és 13. ábrák**).

3. táblázat A szénéhezés, valamint a *dugB* és *dugC* kettős deléciójának hatása néhány kiválasztott gén relatív transzkripciójára (RT-qPCR) az *A. nidulans* kultúrákban

Gén	Leírás ^a	ΔC_t^b			
		Glükóz		Szénéhezés	
		THS30	THM4	THS30	THM4
AN0973 (<i>brlA</i>)	Transzkripció faktor (sporuláció és autolízis) ^c	0,4 ± 0,2	0,6 ± 0,4	4,1 ± 0,2 ^d	3,9 ± 0,5 ^d
AN10153 (<i>sskB</i>)	MAPK (HOG-útvonal) ^c	1,5 ± 0,6	-0,1 ± 0,4 ^f	1,9 ± 0,6	1,6 ± 0,4 ^d
AN1017 (<i>hogA</i>)	MAPK (HOG-útvonal) ^c	1,3 ± 0,6	0,4 ± 0,6	1,8 ± 0,4	1,9 ± 0,5 ^d
AN1092 (<i>dugC</i>)	Feltételezett glutamin amidotranszferáz	-4,1 ± 0,5	n.a.	-2,4 ± 0,8 ^d	n.a.
AN1414 (<i>xprG</i>)	Transzkripció faktor (proteáz-termelés és autolízis) ^c	-0,5 ± 0,4	-0,5 ± 0,3	1,2 ± 0,4 ^d	1,3 ± 0,4 ^d
AN1879 (<i>dugB</i>)	Feltételezett glutamin amidotranszferáz	-1,2 ± 0,6	n.a.	-2,2 ± 0,9	n.a.
AN3150 (<i>gcsA</i>)	Feltételezett γ -glutamil-cisztein szintetáz	0,6 ± 0,2	0,5 ± 0,4	-0,1 ± 0,4 ^d	-0,2 ± 0,2 ^d
AN4189 (<i>mkkA</i>)	MAPK (sejtfalintegritás-útvonal) ^g	2,7 ± 0,4	1,6 ± 0,6 ^f	2,9 ± 0,4	2,7 ± 0,8
AN5296 (<i>tcsA</i>)	Hisztidin-kináz (HOG-útvonal) ^c	-3,8 ± 0,3	-4,6 ± 0,3 ^f	-4,2 ± 0,3	-4,6 ± 0,3
AN5893 (<i>flbA</i>)	G-protein szignál regulátor (sporuláció és növekedés) ^h	0,1 ± 0,3	-1,1 ± 0,3 ^f	0,6 ± 0,4	0,5 ± 0,5 ^d
AN5982 (<i>torA</i>)	TOR-kináz	-0,8 ± 0,6	-0,5 ± 0,8	3,4 ± 0,3 ^d	3,2 ± 0,7 ^d
AN6542 (<i>actA</i>)	γ -Aktin	5,3 ± 0,4	5,9 ± 0,5	5,1 ± 0,5	4,4 ± 0,2 ^d
AN6838 (<i>tubC</i>)	β -Tubulin	0,5 ± 0,3	1,3 ± 0,5	-0,1 ± 0,5	-0,3 ± 0,3 ^d
AN7572 (<i>srrB</i>)	Válasz regulátor (HOG-útvonal) ^c	-0,9 ± 0,8	-1,1 ± 0,7	1,4 ± 0,5 ^d	1,6 ± 0,5 ^d
AN9397 (<i>hacA</i>)	Transzkripció faktor (UPR)	2,4 ± 0,2	1,8 ± 0,3 ^f	4,2 ± 0,5 ^d	3,9 ± 0,6 ^d

^a – Forrás, ha másként nem jelöltük: AspGD (<https://aspergillusgenome.org/>)

^b – A ΔC_t értékek három független kísérlet eredményének átlagát és szórását jelölik, melyek kiszámításakor a *gfdA* került felhasználásra referenciaként.

^c – Forrás: van Munster és mtsai. (2016)

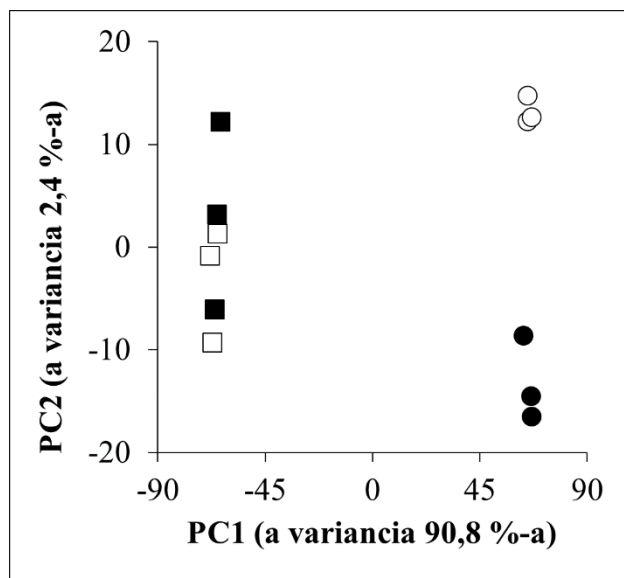
^d – Szignifikáns különbség a szénéhező és a glükózon növekedő kultúrák közt (Student-féle *t*-teszt, $p < 0,05$).

^e – Forrás: Hong és mtsai. (2013)

^f – Szignifikáns különbség a THS30 referencia törzs és a THM4 (*ΔdugB-ΔdugC*) mutáns között (Student-féle *t*-teszt, $p < 0,05$).

^g – Forrás: de Souza és mtsai. (2013)

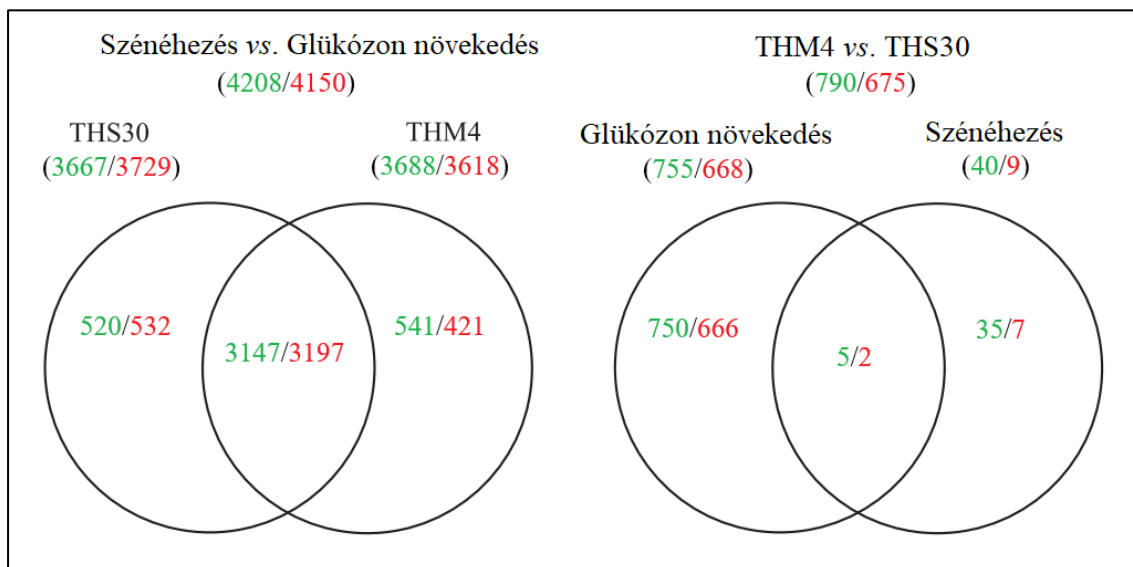
^h – Forrás: Yu (2016)



12. ábra A DUG-útvonalban gátolt és vad típusú *A. nidulans* tenyészetek RNAseq-adatainak főkomponens analízise (PCA)

A szimbólumok a referencia törzs (THS30) növekedő (○) és szénéhező (□), valamint a $\Delta dugBA-dugC$ duplamutáns (THM4) növekedő (●) és szénéhező (■) tenyészeinek adatait jelölik.

Megjegyzés: A második főkomponens (PC2) a variáciának csak a 2,4 %-át magyarázza.



13. ábra Az *A. nidulans* THM4 ($\Delta dugB-\Delta dugC$) mutáns és a THS30 referenciatörzs felül/alulszabályozott génjeinek eloszlása szénéhezés, valamint glükózon való növekedés alatt

4.1.4.1. A szénéhezés hatása

A szénéhezés által kiváltott főbb változásokat géncsoport dúsulási (GSE) vizsgálatokkal azonosítottuk (**4. melléklet**), melyek során az alábbiakat állapítottuk meg:

(i) A zsírsav-lebontás felülszabályozódott, a nukleotid- és aminosav-bioszintézis pedig alulszabályozódott (**4. melléklet**).

(ii) Az autofágiával kapcsolatos gének, az extracelluláris proteáz, a szénhidrát-aktív enzim (CAZyme) és a sejtfallebontásért felelős gének felülszabályozódtak, a sejtfal-bioszintézis génjei pedig alulszabályozódtak (**4. melléklet**).

(iii) A glikolízis, az oxidatív pentóz-foszfát útvonal, a citromsav ciklus és a légzés génjei alulszabályozódtak (**4. melléklet**).

(iv) A vas-kén klaszter összeszerelő gének, az ergoszterol bioszintézis génjei és a translációban részt vevő gének alulszabályozódtak (**4. melléklet**).

(v) Az antioxidáns enzimgének (pl. a növekedő tenyészetekre jellemző CatA és CatB katalázokat, SodA és SodB szuperoxid-dizmutázokat, GlrA glutation reduktázt, TrxR tioredoxin reduktázt és Ccp1 citokróm *c*-peroxidázt kódoló gén) szignifikánsan feldúsultak az alulszabályozott gének csoportjában (**4. melléklet**). Bár az antioxidáns enzimgének nem dúsultak fel a felülszabályozott gének csoportjában, számos kevésbé ismert antioxidáns enzimgén mutatott felülszabályozottságot: a CatC kataláz, a CpeA kataláz-peroxidáz, az AN7924 peroxidáz, az AN1131 és AN0785 szuperoxid-dizmutázok, a TrxB tioredoxin reduktáz és az AN5440 citokróm *c*-peroxidáz génjei (**4. melléklet**).

(vi) A cisztein-, metionin- és GSH-anyagcseréhez kapcsolódó gének szintén feldúsultak a két törzs alulszabályozott génkészleteiben (**4. melléklet**). A *dugA* (feltételezett dipeptidáz gén), a *ggtA* (γ GT gén) és az AN5658 (feltételezett γ GT gén) felülszabályozódtak, míg a *gcsA* (feltételezett γ -glutamilcisztein-szintetáz gén) alulszabályozódott (**3. táblázat; 4. melléklet**). Az AN12476 GSH-szintáz és az AN2988 feltételezett γ -glutamil-ciklotranszferáz génjei a THS30 és a THM4 törzsben is alulszabályozódtak (**4. melléklet**). A referencia törzsben a *dugB* alul-, a *dugC* pedig felülszabályozódott (**3. táblázat; 4. melléklet**).

(vii) Az SMG-k szignifikáns dúsulást mutattak a felülszabályozott génkészletekben: A szénéhezés alatti állapot 206 SMG transzkripcióját aktiválta a THS30 törzsben és 209-et a THM4 törzsben. A legszembetűnőbb felülszabályozottságot mutató klasztereket a **4. táblázat** foglalja össze. Bár az SMG-klaszterek génjei általánosságban

nem dúsultak fel az alulszabályozott génkészletekben, egyes klaszterek génjei mégis jelentős dúsulást mutattak. Ezen klaszterek közé tartozik a kontroll törzs esetében az inp klaszter és a pkh klaszter, mindkét törzsnél pedig a mikroperforanon klaszter és a „No PKS/NRPS backbone 1” klaszter (**4. táblázat**).

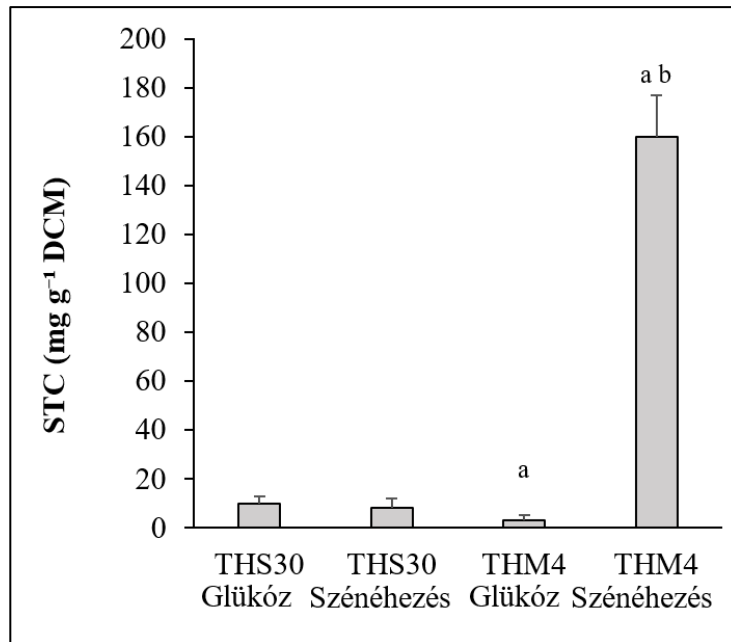
A szénéhező tenyészetek transzkriptom-adatainak közvetlen összehasonlítása (THM4 mutáns vs. THS30 referencia törzs) azt mutatta, hogy bizonyos SMG-klaszterek (AN7884 klaszter, benzaldehid származék 1, F9775 hibrid klaszter 2, pkg klaszter, STC-klaszter) aktívabbak voltak a THM4 mutánsban, mint a referencia törzsben (**4. táblázat**; **4. melléklet**). Ami az STC-klasztert illeti, a THM4 mutánsban ezen klasztergénnek nagyobb transzkripció aktivitását fokozott STC-termelés is kísérte (**14. ábra**). További érdekesség, hogy a $\Delta dugB-\Delta dugC$ duplamutánsban a referencia törzshöz viszonyított mindösszesen 40 felül- vagy alulszabályozott gén közül 24 gén valamely SMG-klaszter tagja volt (**4. táblázat**).

4. táblázat A szénéhezés, valamint a *dugB* és *dugC* kettős deléció hatása a SMG-klaszterek transzkripció regulációjára az *A. nidulans* kultúrákban

SMG-klaszter ^a	Felül-/alulszabályozott gének száma			
	Szénéhezés vs. glükóz		THM4 vs. THS30	
	THS30	THM4	Glükóz	Szénéhezés
STC (26)	25/0	26/0	2/0	8/0
Monodiktifenon (12)	12/0	12/0	0/0	0/0
Pkg (8)	8/0	8/0	0/1	3/0
Terrikinon (5)	5/0	5/0	1/0	0/0
AN1680 (4)	4/0	3/0	0/1	0/0
AN3612 (4)	4/0	3/0	2/0	0/0
Aszpertecín (3)	3/0	3/0	0/0	0/0
Penicillin (3)	2/0	3/0	0/2	0/0
Mikroperforanon (3)	0/3	0/3	0/0	0/0

^a – Csak azok a felül- vagy alulszabályozott SMG-klaszterek kerültek bemutatásra, amelyekben legalább egy összehasonlítás során az összes gén egyidejűleg felül- vagy alulszabályozottságot mutatott. Az SMG-klaszterben érintett gének számát zárójelben tüntettük fel. Az SMG-k transzkripció aktivitására vonatkozó további adatok Gila és mtsai. (2021) közleményének „S1” táblázatában találhatóak meg. Ezek az adatok csak terjedelmi okok miatt nem kerültek bele a dolgozatba.

SMG: szekunder metabolit gén; THS30: referencia törzs; THM4: *AdugB-AdugC* duplamutáns; STC: szterigmatocisztin



14. ábra Az *A. nidulans* Δ *dugB*- Δ *dugC* duplamutáns és a referencia törzs STC-termelése

A Δ *dugB*- Δ *dugC* (THM4) mutáns, valamint a THS30 kontroll törzs sülyesztett tenyészeit a mintavétel előtt 24 órán át (szénéhező kultúrák), illetve 4 órán keresztül (növekedő kultúrák) inkubáltuk. Az ábra három független kísérlet eredményének átlagát és szórását mutatja.

^a – Szignifikáns különbség a kontroll törzs és a mutáns között (Student-féle *t*-teszt, $p < 0,05$).

^b – Szignifikáns különbség a szénéhező és a növekedő kultúrák között (Student-féle *t*-teszt, $p < 0,05$).

STC: szterigmatocisztin; DCM: száraz sejtömeg (dry cell mass)

A szénéhező *A. nidulans* kultúrákban az extracelluláris kitináz, hexóزامinidáz és γ GT aktivitások csak egy-egy génhez köthetők, nevezetesen a *chiB*, *nagA* és *ggtA* génekhez, míg az extracelluláris proteáz aktivitások több mint feléért a *prtA* és *pepJ* gének felelősek (van Munster és mtsai., 2016). Fontos megjegyezni, hogy a THS30 és a THM4 törzsek között nem figyeltünk meg szignifikáns különbséget ezen gének expressziós aktivitás változásaiban (**5. táblázat**), noha az enzimaktivitásokban jelentős eltérés mutatkozott (**8. és 9. ábra**). Ez arra utal, hogy a GSH-szint (vagyis a sejtek redox-állapota) poszttranszkripció mechanizmusok révén szabályozza ezen enzimek termelését és/vagy szekrécióját.

5. táblázat Az *A. nidulans* tenyészetek extracelluláris kitináz, hexózaminidáz, γ GT és proteáz termelésért felelős génjeinek transzkripciósi adatai

Gén	THS30	THM4	Glükóz	Szénéhezés
	Szénéhezés vs. Glükóz	Szénéhezés vs. Glükóz	THM4 vs. THS30	THM4 vs. THS30
AN1502 (<i>nagA</i>)	4.2893	4.7338	0.0145	0.4590
AN4871 (<i>chiB</i>)	6.7156	8.0456	-1.1855	0.1445
AN5558 (<i>priA</i>)	2.8145	2.5718	-0.3542	-0.5970
AN7962 (<i>pepJ</i>)	14.1498	13.6070	0.5511	0.0083
AN10444 (<i>ggtA</i>)	2.0120	1.9801	0.2938	0.2620

A táblázat az RNAseq során azonosított transzkripciósi változások (\log_2FC) értékeit tartalmazza. A teljes adatsor Gila és mtsai. (2021) közleményének „S4” táblázatában található. γ GT: γ -glutamil-transzpeptidáz; THS30: referencia törzs; THM4: Δ *dugB- Δ dugC* duplamutáns

4.1.4.2. A *dugB* és *dugC* kettős deléciójának hatása glükózon

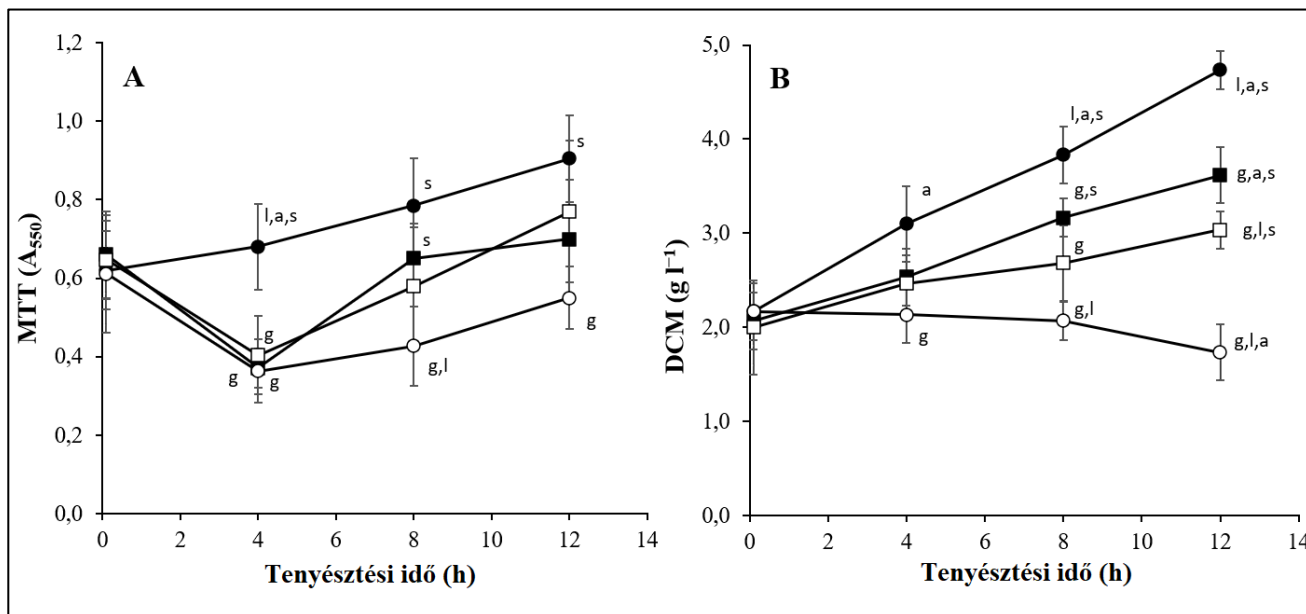
A növekedő kultúrák transzkriptom adatainak közvetlen összevetése (THM4 mutáns vs. THS30 referencia törzs) azt mutatta, hogy a *dugB* és *dugC* kettős deléciója felülszabályozta az ergosterol-bioszintézis génjeit, míg a vas-kén klaszter összeszerelő géneket és a *hacA* gént, amelyek részt vesznek a „nem feltekeredett fehérje” (UPR) stresszválaszban, alulszabályozta (**3. táblázat; 4. melléklet**). Ezen túlmenően számos MAPK-út vonal gén (pl. *steC*, *sskB*, *pbsA*, *hogA* és *mkkA*), valamint a fejlődési folyamatok (konídiumképződés és aszkospóráképződés; pl. *flbA*, *flbC*, *flbE*, *nosA*, *rosA*, *nsdC* és *nsdD*) és a sejtfal bioszintézisének szabályozásában részt vevő gének alulszabályozottsága is megfigyelhető volt (**3. táblázat; 4. melléklet**). Ezek a transzkripciósi változások összhangban voltak a felületi tenyészetek glükózban gazdag táptalajon megfigyelt mérsékelt konídium-termelésével és megváltozott ivaros fejlődésével (**2. táblázat; 11. ábra**).

4.2. A laktózon megfigyelhető szénforrás-limitációs stresszválasz vizsgálata

4.2.1. A szénstressz hatása a süllyesztett tenyészetek metabolikus aktivitására és növekedésére

A továbbiakban három eltérő szénstressznek (szénéhezés, valamint szénforrás-limitáció egy diszacharid és egy poliszacharid jelenlétében) kitett tenyészetben bekövetkező élettani változásokat vizsgáltuk meg tüzetesebben. A micéliumok glükóz tartalmú tápközegből szénforrásmentes, illetve laktóz/arabinogalaktán tartalmú közegbe

történő atmoszája jelentősen csökkentette a kultúrák MTT-redukáló aktivitását (**15A. ábra**). Ez a csökkenés azonban csak átmeneti volt, ugyanis 4 óra elteltével a szénforrással kezelt kultúrák MTT-redukáló aktivitása még a szénéhező tenyészetek esetében is növekedni kezdett (**15A. ábra**). A szénstressz a várakozásnak megfelelően a gombák növekedését is mérsékelte (**15B. ábra**). A glükózos tenyészetekhez viszonyítva a legnagyobb mértékű biomassza-csökkenést a szénéhező kultúrákban figyeltük meg, amelyeket az arabinogalaktános és a laktózos tenyészetek követtek. Habár a hosszútávú szénéhezés általában DCM-csökkenéssel jár együtt (Emri és mtsai., 2004), esetünkben csak egy kismértékű (de statisztikailag nem szignifikáns) DCM-csökkenés volt megfigyelhető 12 óra elteltével (**15B. ábra**).



15. ábra A vizsgált *A. nidulans* THS30 tenyészetek növekedése és metabolikus aktivitása

A törzs MTT-redukáló aktivitásának (A) és DCM adatainak (B) változásait követtük nyomon glükózon (●), szénforrás hiányában (○), laktózon (■) és arabinogalaktánon (□). Az ábra három független kísérlet eredményének átlagát és szórását mutatja.

A 12 órás tenyészetek MTT-redukáló aktivitása szignifikánsan nagyobb volt (Student-féle *t*-teszt, $p < 0,05$), mint a 4 órás tenyészeteké.

A 12 órás glükóz-, laktóz- vagy arabinogalaktán-tartalmú kultúrák DCM-értéke szignifikánsan nagyobb volt, mint a 0 órás kultúráké (Student-féle *t*-teszt, $p < 0,05$).

g, l, a, s – Szignifikáns különbség a glükózt-, laktózt-, arabinogalaktánt- vagy szénforrást nem tartalmazó kultúrák adataihoz képest (Student-féle *t*-teszt, $p < 0,05$).

MTT: metil-tiazol-tetrazolium; DCM: száraz sejtömeg (dry cell mass)

4.2.2. A szénstressz hatása süllyesztett tenyészetek enzimtermelésére

A szénstressz minden kultúrában jelentősen csökkentette a nitrát reduktáz és a glutation reduktáz aktivitását, míg az intracelluláris β -galaktozidáz aktivitását megemelte (**6. táblázat**). Ez az emelkedés a laktózos tenyészetek esetében volt a legnagyobb, amit az arabinogalaktán tartalmú, majd a szénéhező tenyészetek követtek (**6. táblázat**).

Az tenyészetek intracelluláris SOD-aktivitása arabinogalaktánon és szénéhező körülmények közt megnőtt. Mind a négy kultúra fermentlevében volt kimutatható SOD aktivitás, illetve szénéhezés során kataláz aktivitást is detektáltunk (**6. táblázat**), ami egybevág Saykhedkar és mtsai. (2012) eredményeivel, akik az *A. nidulans* cirokszáron termelt szekretomját vizsgálták. A szénstressz növelte az extracelluláris proteáz, γ GT, kitináz és β -glükozidáz aktivitást is (**6. táblázat**), emellett pedig a szénéhezést leszámítva a laktózon vagy arabinogalaktánon történő tenyésztés növelte az extracelluláris β -galaktozidáz és a celluláz aktivitását is (**6. táblázat**).

6. táblázat Enzimaktivitások a glükózban gazdag, valamint szénstressznek kitett *A. nidulans* kultúrákban.

	Glükóz	Laktóz	Arabinogalaktán	Szénéhezés
Intracelluláris enzimaktivitások				
SOD (U mg ⁻¹ protein)	81 ± 10 ^{a,s}	97 ± 15 ^{a,s}	156 ± 21 ^{g,l,s}	210 ± 30 ^{g,l,a}
Kataláz (kat kg ⁻¹ protein)	2,2 ± 0,3	1,6 ± 0,3	1,7 ± 0,2	1,7 ± 0,2
Nitrát redukáz (mkat kg ⁻¹ protein)	1,40 ± 0,09 ^{l,a,s}	1,09 ± 0,05 ^{g,a,s}	0,62 ± 0,12 ^{g,l}	0,56 ± 0,15 ^{g,l}
Glutation redukáz (mkat kg ⁻¹ protein)	9,3 ± 0,3 ^{l,a,s}	6,4 ± 0,8 ^{g,a}	4,0 ± 0,5 ^{g,l,s}	5,3 ± 0,6 ^{g,a}
β-Galaktozidáz (μkat kg ⁻¹ protein)	< 0,1 ^{l,a,s}	10,2 ± 1,1 ^{g,a,s}	3,7 ± 0,3 ^{g,l,s}	0,6 ± 0,02 ^{g,l,a}
Extracelluláris enzimaktivitások				
SOD (U ml ⁻¹)	4,3 ± 1,1 ^{l,a,s}	9,7 ± 1,5 ^g	8,1 ± 1,0 ^g	9,3 ± 0,9 ^g
Kataláz (μkat ml ⁻¹)	< 8 ^{l,a,s}	11 ± 1 ^{g,a,s}	16 ± 1 ^{g,l,s}	52 ± 10 ^{g,l,a}
β-Galaktozidáz (nkat ml ⁻¹)	< 0,006 ^{l,a}	0,012 ± 0,001 ^{g,a,s}	0,018 ± 0,002 ^{g,l,s}	< 0,006 ^{l,a}
β-Glükózidáz (nkat ml ⁻¹)	< 0,006 ^{l,a,s}	0,09 ± 0,02 ^{g,a}	0,18 ± 0,01 ^{g,l,s}	0,11 ± 0,02 ^{g,a}
Celluláz (nkat ml ⁻¹)	0,7 ± 0,1 ^{l,a,s}	2,5 ± 0,3 ^{g,a,s}	1,2 ± 0,3 ^{g,l,s}	< 0,3 ^{g,l,a}
Kitináz (U ml ⁻¹)	< 0,1 ^{l,a,s}	0,6 ± 0,2 ^{g,a,s}	1,1 ± 0,2 ^{g,l}	1,5 ± 0,3 ^{g,l}
Proteáz (U ml ⁻¹)	< 0,1 ^{l,a,s}	3,1 ± 0,3 ^{g,a}	0,8 ± 0,3 ^{g,l,s}	2,7 ± 0,3 ^{g,a}
γGT (nkat ml ⁻¹)	< 0,01 ^{l,a,s}	0,12 ± 0,02 ^{g,a,s}	0,84 ± 0,05 ^{g,l,s}	0,35 ± 0,05 ^{g,l,a}

A táblázat három független kísérlet eredményének átlagát és szórását tartalmazza.

^{g, l, a, s} – Szignifikáns különbség a glükózt-, laktózt-, arabinogalaktánt- vagy szénforrást nem tartalmazó kultúrák adataihoz képest (Student-féle *t*-teszt, *p* < 0,05).

SOD: szuperoxid dizmutáz; γGT: γ-glutamil-transzpeptidáz

A szénéhező kultúrák fermentlevéből további enzimek azonosítása érdekében az extracelluláris fehérjéket 2D gélelektroforézissel választottuk el, majd elemeztük a kiválasztott foltok fehérjetartalmát. A fermentléből az alábbi fehérjék jelenlétét mutattuk ki (Gila és mtsai., 2021): AbnC (AN8007; feltételezett extracelluláris endo-1,5- α -L-arabinozidáz), EglB (AN3418; celluláz); BglA és BglL (AN4102 és AN2828; feltételezett β -glükozidázok), ChiB (AN4871; kitináz); EglC (AN7950; feltételezett GPI-horgonyzott glükán endo-1,3- β -D-glükozidáz), PepJ (AN7962; proteáz), CatB (AN9339; kataláz) és SodA (AN0241; Cu/Zn-SOD). Az AbnC, CatB, EglB, PepJ, SodA és az AN8445 peptidáz jelenlétét a laktózos tenyészetek fermentlevéből már korábban kimutatták (Spitzmüller és mtsai., 2015b), továbbá van Munster és mtsai (2014) *A. niger* tenyészetek esetében megállapították, hogy a CAZyme gének szénstressz alatti felülszabályozódása együtt jár a megfelelő fehérjék szekréciójával még szénéhezés esetén is. Mindennek megfelelően az itt kimutatott fehérjék génjei is felülszabályozódtak a megfelelő szénstressz hatására az alábbi kivételekkel: Nem tudtuk kimutatni az *eglB* felülszabályozottságát szénéhezés alatt, illetve a *sodA* és AN8445 felülszabályozottságát a laktózos tenyészetekben, a kódolt fehérjék jelenlétét azonban ki tudtuk mutatni a fermentléből (Spitzmüller és mtsai., 2015b; Gila és mtsai., 2022 „S4” táblázat). A SodA és az EglC (szénéhező tenyészetekben kimutatott), valamint a CatB (szénéhező és laktózos tenyészetekben is kimutatott) fehérjék esetében (Spitzmüller és mtsai., 2015b) azonban a megfelelő gének még szénstressz hatására is alulszabályozódtak (**7. és 8. táblázat**). Lehetséges, hogy ezek a fehérjék glükóz jelenlétében felhalmozódnak a sejtekben (a sejtfalhoz kötött EglC esetében a sejtfalban), és csak stressz hatására szabadulnak fel a fermentlébe.

4.2.3. A szénstressz hatása a sülyesztett tenyészetek génexpressziós mintázatára

A főkomponens-analízis (PCA) alapján a kezelésként 3-3 független minta adatai jó egyezést mutattak, a rendelkezésre álló szénforrás típusa a várakozásoknak megfelelően jelentősen befolyásolta a tenyészetek transzkriptomát (**16. ábra**). Az RNS-szekvenálással nyert adatokat 28 gén esetében összehasonlítást végeztünk az RT-qPCR analízis során kapott értékekkel, és pozitív korrelációt tapasztaltunk (Pearson-féle korrelációs koefficiens: 0,79; **7. táblázat**).

7. táblázat A szénstressz hatása néhány kiválasztott gén relatív transzkripciójára (RT-qPCR) az *A. nidulans* kultúrákban.

Gén	Leírás	ΔC_t^b			
		Glükóz	Laktóz	Arabinogalaktán	Szénéhezés
AN0423 (<i>xyrA</i>) ^c	Xilóz reduktáz	-5,12 ± 0,08 ^{l,a,s}	-3,07 ± 0,48 ^{g,a}	0,27 ± 0,73 ^{g,l,s}	-2,78 ± 0,22 ^{g,a}
AN0756 (<i>lacA</i>) ^c	β-Galaktozidáz	-8,96 ± 0,37 ^{l,a}	-7,62 ± 0,44 ^{g,s}	-7,71 ± 0,37 ^{g,s}	-9,69 ± 0,22 ^{l,a}
AN0942 (<i>ladA</i>) ^c	Arabinitol dehidrogenáz	-8,61 ± 0,57 ^{l,a,s}	-5,89 ± 0,21 ^{g,s}	-4,62 ± 1,03 ^{g,s}	-0,84 ± 0,41 ^{g,l,a}
AN2463 (<i>lacF</i>) ^c	β-Galaktozidáz	-9,94 ± 0,42 ^{l,a}	-7,73 ± 0,28 ^{g,a,s}	-5,87 ± 0,38 ^{g,l,s}	-9,16 ± 0,31 ^{l,a}
AN2814 (<i>lacpB</i>) ^c	Laktóz permeáz	-13,27 ± 0,31 ^{l,a,s}	-5,98 ± 1,02 ^{g,s}	-6,96 ± 0,85 ^{g,s}	-8,79 ± 0,56 ^{g,l,a}
AN3199 (<i>lacpA</i>) ^c	Laktóz permeáz	-10,51 ± 1,15 ^{l,a}	-5,45 ± 0,38 ^{g,s}	-4,66 ± 0,70 ^{g,s}	-10,96 ± 1,28 ^{l,a}
AN3201 (<i>lacD</i>) ^c	β-Galaktozidáz	-14,97 ± 0,32 ^{l,a}	-8,3 ± 0,41 ^{g,s}	-9,39 ± 0,59 ^{g,s}	-14,94 ± 0,30 ^{l,a}
AN4957 (<i>galE</i>) ^c	Galaktokináz	-12,18 ± 0,77 ^{a,s}	-10,94 ± 0,32 ^{a,s}	-9,47 ± 0,29 ^{g,l}	-9,73 ± 0,23 ^{g,l}
AN6388 (<i>lacE</i>) ^c	β-Galaktozidáz	-9,26 ± 0,24 ^{l,a,s}	-8,36 ± 0,08 ^g	-8,1 ± 0,48 ^g	-8,17 ± 0,50 ^g
AN9064 (<i>xdhA</i>) ^c	Xilitol dehidrogenáz	-4,17 ± 0,57 ^{l,a,s}	-1,61 ± 0,66 ^g	-2,32 ± 0,53 ^g	-2,72 ± 0,23 ^g
AN10543 (<i>galX</i>) ^c	Transzkripció faktor	-7,46 ± 0,46 ^l	-1,1 ± 0,65 ^{g,a,s}	-7,95 ± 0,75 ^l	-8,11 ± 0,27 ^l
AN10550 (<i>galR</i>) ^c	Transzkripció faktor	-9,11 ± 0,71 ^l	-2,76 ± 0,37 ^{g,l,s}	-9,04 ± 0,50 ^{l,s}	-10,37 ± 0,41 ^{l,a}
AN0241 (<i>sodA</i>) ^d	Szuperoxid dizmutáz	0,51 ± 0,12 ^s	0,02 ± 0,65	0,40 ± 0,29 ^s	-0,82 ± 0,23 ^{g,a}
AN3581 (<i>trxR</i>) ^d	Tioredoxin reduktáz	-6,07 ± 0,45 ^{a,s}	-6,68 ± 0,09 ^{a,s}	-7,08 ± 0,17 ^{g,l,s}	-7,60 ± 0,14 ^{g,l,a}
AN8218 (<i>trxB</i>) ^d	Tioredoxin reduktáz	-6,04 ± 0,11 ^{l,a,s}	-3,13 ± 0,27 ^{g,a,s}	-2,24 ± 0,35 ^{g,l,s}	-5,11 ± 0,33 ^{g,l,a}
AN8692 (<i>prxA</i>) ^d	Peroxidedoxin	0,68 ± 0,02 ^{l,a,s}	-1,49 ± 0,08 ^g	-1,78 ± 0,25 ^g	-2,93 ± 0,66 ^g
AN9339 (<i>catB</i>) ^d	Kataláz	2,13 ± 0,10 ^{l,a,s}	-0,83 ± 0,27 ^{g,a,s}	-1,83 ± 0,28 ^{g,l}	-2,45 ± 0,35 ^{g,l}
AN10220 (<i>ccp1</i>) ^d	Citokrom C peroxidáz	-3,85 ± 0,30 ^{l,a,s}	-5,05 ± 0,36 ^g	-5,25 ± 0,16 ^g	-5,85 ± 0,39 ^g
AN0973 (<i>brlA</i>) ^e	Transzkripció faktor	-4,76 ± 0,58 ^{l,a,s}	-2,79 ± 0,24 ^g	-0,92 ± 1,13 ^g	-2,36 ± 0,71 ^g
AN1414 (<i>xprG</i>) ^e	Transzkripció faktor	-3,08 ± 0,03 ^{l,a,s}	-2,43 ± 0,15 ^{g,a,s}	-1,5 ± 0,28 ^{g,l}	-1,76 ± 0,06 ^{g,l}
AN4871 (<i>chiB</i>) ^e	Kitináz	-0,85 ± 0,74 ^{l,a,s}	0,81 ± 0,53 ^g	1,13 ± 0,33 ^g	1,01 ± 0,49 ^g
AN8445 ^e	Peptidáz	-1,34 ± 0,37 ^a	-1,7 ± 0,34 ^{a,s}	-0,06 ± 0,40 ^{g,l}	-0,59 ± 0,26 ^l
AN0399 (<i>nrtB</i>) ^f	Nitrát transzporter	-1,49 ± 0,20 ^{l,a,s}	-2,66 ± 0,26 ^{g,a,s}	-6,92 ± 0,39 ^{g,l}	-6,97 ± 0,28 ^{g,l}
AN1006 (<i>niaD</i>) ^f	Nitrát reduktáz	-0,59 ± 0,08 ^{l,a,s}	-3,27 ± 0,42 ^{g,a,s}	-9,77 ± 0,18 ^{g,l,s}	-10,8 ± 0,36 ^{g,l,a}
AN1812 (<i>jlbA</i>) ^f	Transzkripció faktor	0,92 ± 0,11 ^s	1,05 ± 0,10 ^s	0,31 ± 0,35	-0,34 ± 0,18 ^{g,l}
AN6542 (<i>actA</i>) ^f	Aktin	-0,39 ± 0,16 ^{l,a,s}	-1,44 ± 0,22 ^{g,s}	-1,63 ± 0,27 ^g	-2,13 ± 0,20 ^{g,l}
AN6838 (<i>tubC</i>) ^f	β-Tubulin	-3,25 ± 0,18 ^{l,a,s}	-4,04 ± 0,25 ^{g,s}	-4,23 ± 0,37 ^{g,s}	-5,73 ± 0,61 ^{g,l,a}
AN9397 (<i>hacA</i>) ^f	Transzkripció faktor	-1,33 ± 0,18 ^{l,a,s}	-0,94 ± 0,13 ^{g,a,s}	0,74 ± 0,40 ^{g,l}	0,88 ± 0,09 ^{g,l}

^b – A ΔC_t értékek három független kísérlet eredményének átlagát és szórását jelölik, melyek kiszámítás: AN6700 gén került felhasználásra referenciaként.

^{g, l, a, s} – Szignifikáns különbség a glükózt-, laktózt-, arabinogalaktánt- vagy szénforrást nem tartalmazó k adataihoz képest (Student-féle *t*-teszt, $p < 0,05$).

^c – Laktóz hasznosításért felelős gének

^d – Antioxidáns enzimgének

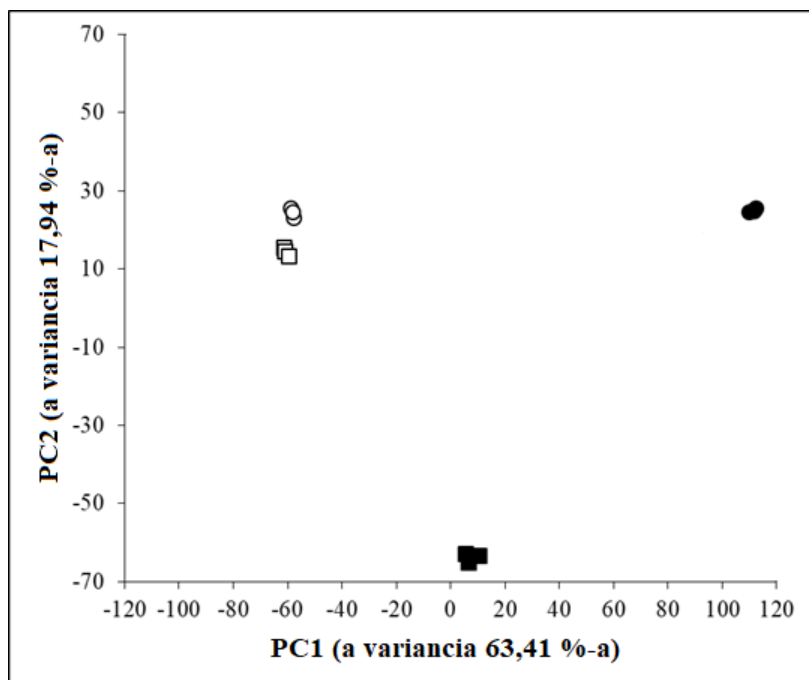
^e – Szénéhezésre adott stresszválasz gének

^f – Egyéb gének

8. táblázat A néhány kiválasztott géncsoport transzkripció regulációjának bemutatása a szénstressznek kitett *A. nidulnas* kultúrákban.

	Géncsoportok regulációja ^a		
	Laktóz vs. glükóz	Arabinogalaktán vs. glükóz	Szénéhezés vs. glükóz
Laktóz-hasznosításért felelős gének	↑	↑	-
β-Galaktozidázok és laktóz-permeázok	↑	↑	↑
Leloir-útvonal	-	-	↓
D-galaktóz oxidoreduktív útvonal	↑	-	-
Glikolízis gének	↓	↓	↓
Oxidatív pentóz-foszfát-útvonal gének	-	↓	↓
Citrát-ciklus gének	-	↓	↓
Autofágia gének	-	-	↑
Sejtfal gének	↓	↓	↕
Szintázok, transzglikozilázok és regulátor fehérjék	-	↓	↓
Hidrolázok	↓	↑	↑
Extracelluláris peptidáz gének	-	↑	↑
CAZyme gének	↕	↑	↑
α-Glükozidázok	-	-	-
β-Glükozidázok	-	↑	-
β-1,4-Endoglükánázok	-	↑	-
Cellobiohidrolázok és cellobióz-dehidrogenázok	-	↑	-
α-Galaktozidázok	↑	↑	-
β-Galaktozidázok	↑	↑	-
Arabinofunaozidázok és endo-arabinozidázok	-	↑	-
Xilanázok	-	-	-
Xilozidázok	↑	↑	↑
Mannán-lebontás	-	↑	-
Galakturonán-lebontás	-	↑	↑
Ramnogalakturonán-lebontás	↑	↑	↑
Antioxidáns enzimgének	-	-	↓
Szkvalén és ergoszterol útvonal gének	↓	↓	↓
Riboszóma-biogenezis gének	-	-	↓
Mitotikus sejtciklus gének	-	-	-
Transzkripció faktor gének	↑	↑	↑

^a – A „↑”, „↓” és „↕” szimbólumok a felülszabályozott, az alszabályozott, illetve mind a felül- és alszabályozott génkészletekben való szignifikáns dúsulást jelölik. Abban az esetben, ha nem azonosítottunk szignifikáns dúsulást, a „-” szimbólumot tüntettük fel. A géncsoportok transzkripció aktivitásának további adatait Gila és mtsai. (2022) közleményének „S2” táblázata tartalmazza. Ezek az adatok csak terjedelmi okok miatt nem kerültek bele a dolgozatba.

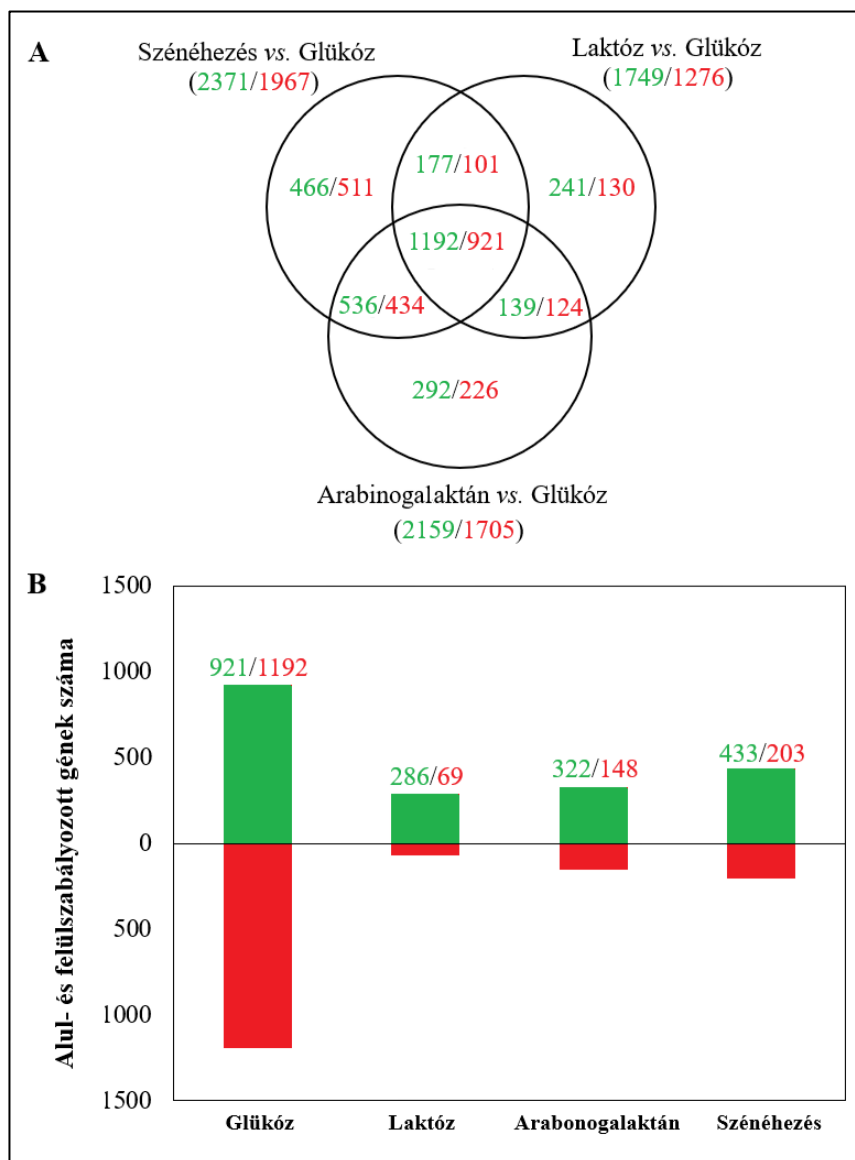


16. ábra A szénstressznek kitett *A. nidulans* tenyészetek RNAseq-adatainak főkomponens analízise (PCA)

A szimbólumok az *A. nidulans* THS30 törzs tenyészeitének adatit jelölik glükózon (●), szénforrás hiányában (○), laktózon (■) és arabinogalaktánon (□).

Korábbi vizsgálatok kimutatták, hogy a szénforrás-limitált és a szénéhező tenyészetek stresszválaszai között jelentős átfedés van, ha a korai stressz-válaszokat vizsgáljuk (van Munster és mtsai., 2014). Ezt azzal magyarázták, hogy szénforrás-limitált körülmények között a sejtek mindaddig éheznek, amíg az alternatív szénforrások hasznosítása be nem indul (van Munster és mtsai., 2014). Ebből fakadóan a mintavételezést olyan időpontokban végeztük a transzkriptomikai elemzésekhez, amikor a laktóz és az arabinogalaktán hasznosítása már nagyvalószínűséggel megkezdődött a DCM és MTT redukciós mintázatok alapján (**15. ábra**). Azonban még ennek ellenére is jelentős átfedést tapasztaltunk a három kultúra genomszintű expressziós változásai között: Azokat a géneket, amelyek egy adott szénstressz hatására differenciálisan expresszálódtak a glükózos referencia tenyészetekhez képest szénstressz válasz (carbon-stress response; CSR) génekként definiáltuk, egy-egy külön halmazt alkotva. A halmazok metszeteken kívül eső géncsoportjaira az adott szénstressz-típushoz tartozó szénforrás-specifikus génekként hivatkoztunk (laktóz-specifikus, arabinogalaktán-specifikus és szénéhezés-specifikus gének). A CSR-génhalmazok hármasmetszetében található géneket tekintettük általános vagy környezeti stresszválasz (environmental stress response; ESR; Gasch, 2007) génekként, amelyek fenti definícióink szerint a glükózos

tenyészetek alul-, illetve felülszabályozódott génjeit is jelentik (glükóz-specifikus gének). Az összes CSR-gén 39%-a mindhárom szénstressz-típusnak kitett tenyészetnél felülszabályozottságot, 38% pedig alulszabályozottságot mutatott (17A. ábra). A glükóz-specifikus differenciáltan expresszált gének száma nagymértékben felülmúlta a többi szénforrásra specifikus gének számát (17B. ábra).



17. ábra A CSR- (A) és a szénforrás-specifikus (B) gének eloszlása a tenyészetekben.

Az ábrák a felül-/alulszabályozott gének számát mutatják.

Megjegyzés: A három halmaz (A) az adott CSR-géneket, a hármasmetszet pedig az ESR-géneket tartalmazza (glükózos tenyészeteket használva referenciaként). A felülszabályozott ESR-gének azonosak az alulszabályozott glükóz-specifikus génekkel, illetve az alulszabályozott ESR-gének azonosak a felülszabályozott glükóz-specifikus génekkel (B).

CSR: szénstresszválasz (carbon-stress-response); ESR: környezeti stresszválasz (environmental stress response)

A CSR-gének GSE-analízise alapján, a szénéhezés alulszabályozta a fehérjeszintézist, a primer anyagcsere számos elemét (pl. glükóz-hasznosítás, aminosav-bioszintézis, szteroidszintézis), valamint több stresszgén átírását is. Másrészt azonban felülszabályozta a sejtfal szerveződésben, a kitin-, xilán- és pektin-lebontásban, valamint a zsírsav-oxidációban részt vevő géneket (**8. táblázat; 5. melléklet**). A glükóz laktózzal való helyettesítése a primer anyagcsere számos elemét (pl. glükóz-hasznosítás és szteroidszintézis) szabályozta alul, azonban a szénéhező tenyészetekkel ellentétben az aminosav-bioszintézis, a riboszóma-biogenezis és a transláció alulszabályozottságát nem tapasztaltuk. Felülszabályozódott az extracelluláris poliszacharid-hasznosítás, beleértve a glükóztól eltérő hexózok és pentózok metabolizmusa is (**8. táblázat; 5. melléklet**). Az arabinogalaktánon való növekedés alulszabályozta a glükóz-hasznosítás, az aminosav-bioszintézis és a szteroidszintézis génjeit. Viszont a laktózhoz hasonlóan a nagy volumenű fehérjeszintézis alulszabályozottsága ez esetben sem volt megfigyelhető. Az extracelluláris poliszacharid-hasznosítás génjei szintén felülszabályozódtak, azonban a pentóz- vagy hexóz- (pl. galaktóz, mannóz) anyagcserében részt vevő gének mind a felül-, mind az alulszabályozott géncsoportokban feldúsultak (**8. táblázat; 5. melléklet**). A glükóz-specifikus gének GSE-analízisének eredményei arra utalnak, hogy a glükóz hasznosítással és a növekedéssel kapcsolatos folyamatok (pl. glikolízis, légzés, illetve szteroidok, vitaminok, kofaktorok proszтетikus csoportok bioszintézise) felülszabályozódtak, míg a poliszacharid katabolikus folyamatok és a lipidanyagcsere (pl. zsírsav-oxidáció) alulszabályozódott a glükózban gazdag tenyészeteknél a többi kultúrához képest (**5. melléklet**). Ezzel párhuzamosan a szénstressznek kitett tenyészetekre a szénhidrát-katabolizmus különböző elemeinek felülszabályozása, valamint néhány, főként a növekedéssel kapcsolatos folyamat alulszabályozása volt jellemző (**5. melléklet**).

Annak a kérdésnek a megválaszolásához, hogy a szénstressznek kitett kultúrák milyen mechanizmusok révén biztosítják energiaszükségletüket, a **8. és 9. táblázatokban** bemutatott géncsoportokat választottuk ki részletesebb elemzésre.

4.2.3.1. Glükóz-hasznosításban érintett gének

A glikolízis gének átírása lecsökkent a szénstressz hatására (**8. táblázat**), de az oxidatív pentóz-foszfát útvonal és a citromsavciklus génjeinek alulszabályozottsága csak

a szénéhező és az arabinogalaktános tenyészetekre volt jellemző, amelyek növekedési rátájukat tekintve is alulmaradtak a kísérletek során (**15B. ábra**).

4.2.3.2. Sejtfal homeosztázisért és lebontásért felelős gének

A szénstressz jelentősen befolyásolta a sejtfal homeosztázisát is (**7. táblázat**). Általánosságban csökkent a szintázok, transzglykozilázok és szabályozó fehérjék géneinek expressziója, valamint a hidroláz gének felülszabályozottsága volt megfigyelhető, ami szintén egybeesik a kultúrák mérsékelt növekedésével (**15B. ábra; 7. táblázat**). Azonban a laktózos kultúrák esetében – amelyek a három stresszkezelés közül a legintenzívebb növekedést mutatták (**15. ábra**) – a fent említett géncsoportok dúsulása nem volt szignifikáns. A sejtfal-hidroláz gének közül az *enga* (endo-1,3- β -glükánáz), *chiB* (endokitináz) és *nagA* (N-acetil- β -glükózaminidáz), amelyek bizonyítottan fontosak az elhalt sejtek falának hasznosításában (autolitikus sejtfaldegradáció; Emri és mtsai., 2008; van Munster és mtsai., 2016), felülszabályozódtak a szénéhező és arabinogalaktános tenyészetekben (**7. és 8. táblázat**). Ezek a transzkripciók aktivitások, továbbá az AN1427 (feltételezett N-acetil-glükózamin transzmembrán-transzporter gén), AN1428 (feltételezett N-acetil-glükózamin-6-foszfát-deacetiláz gén), AN1418 (feltételezett glükózamin-6-foszfát-deamináz gén) és AN2424 (feltételezett N-acetil-hexózaminidáz gén) gének felülszabályozottsága (**7. táblázat**) is arra utalnak, hogy az autolitikus sejtfallebontás nemcsak a szénéhező, hanem a lassan növekedő szénforrás-limitált kultúrákban is aktív.

Kiemelendő, hogy a sejtfalintegritás fenntartásáért felelős géncsoportok transzkripciók aktivitása nem változott meg, ami alátámasztja azt a nézetet, hogy csak az elhalt sejtek (az ún. „üres hifák”) sejtfala kerül lebontásra, és az élő sejtek pedig meg tudják védeni magukat ezekkel a hidroláz-aktivitásokkal szemben (Szilágyi és mtsai., 2013). Korábbi eredmények is alátámasztják, hogy a melanin-termelés megvédheti a sejteket a kitinázoktól, beleértve a ChiB kitinázt is (Szilágyi és mtsai., 2013). A *chiB* gén nem csak a szénéhező és arabinogalaktános tenyészetekben, hanem a laktózon növekedő kultúrákban is felülszabályozódott (**7. és 8. táblázat**). Nem meglepő módon az N-acetil-6-hidroxi-triptofán típusú melanin képződéséért felelős *ivo* („ivory”) génklaszter és az aromás aminosavak metabolizmusáért felelős géncsoport génjei is felülszabályozódtak a három kezelés során (**8. táblázat**; Gila és mtsai. 2022), emellett több sejtfal-hidroláz génje is alulszabályozottságot mutatott a tenyészetekben (**8. táblázat**). Ezek a gének

inkább a sejtfa bioszintéziséhez, mintsem a lebontásához járulhatnak hozzá (de Groot és mtsai., 2009), akárcsak a *chiA*, amely mindhárom stresszkezelés hatására alulszabályozódott, és egy olyan kitinázt kódol, amely a sejtfa átrendeződésében, illetve érésében vesz részt a növekedés során (Yamazaki és mtsai., 2008). A felülszabályozott sejtfa-hidroláz gének közül előfordultak glükóz-specifikus és a szénéhezés-specifikus géncsoportok is (**8. táblázat**), amelyek szintén azt a feltételezést támasztják alá, hogy a sejtek különböző hidroláz-készleteket használnak fel a sejtfa bioszintézis és a sejtfa lebontás során.

4.2.3.3. Autofágiához köthető gének

Autofágiához köthető géneket csak a szénéhező tenyészeteknél azonosítottunk (**8. táblázat**), ami arra utal, hogy az autolitikus sejtfa lebontás mellett az autofágia is egy olyan kiemelt mechanizmus, amely külső tápanyagok hiányában energiaforrást biztosíthat a sejteknek.

4.2.3.4. Laktóz-hasznosításért felelős gének

A laktóz hasznosításáért felelős gének transzkripció faktorait kódoló *galR* és *galX* gének (Christensen és mtsai., 2011; Meng és mtsai., 2022) csak a laktózt tartalmazó tenyészetekben szabályozódtak felül (**7. táblázat**). Ez együtt járt a D-galaktózt bontó oxidoreduktív útvonal génjeinek (Gruben és mtsai., 2012), valamint számos ismert vagy feltételezett laktóz-permeáz és β -galaktozidáz kódoló gén, beleértve a laktóz-hasznosításban résztvevő legfontosabb β -galaktozidáz (*lacD*) és laktózpermeázok (*lacpA*, *lacpB*) (Fekete és mtsai., 2012, 2016) génjeinek felülszabályozódásával is (**7. és 8. táblázat**). A laktóz-lebontó Leloir-útvonal génjei közül azonban egy sem szabályozódott felül, ami arra utal, hogy a gomba laktóz-hasznosítása elsősorban a D-galaktóz oxidoreduktív útvonalon történik (**7. és 8. táblázat**).

Az arabinogalaktános tenyészetek esetében az *araR* felülszabályozódott (Kowalczyk és mtsai., 2015), viszont a *galR* és *galX* aktivitása nem változott meg. Megfigyelhető volt a D-galaktóz oxidoreduktív útvonal génjeinek felülszabályozottsága is, amelyek megegyeztek a laktózon is aktiválódott génekkel (**7. táblázat**), úgymint a *lacD*, *lacpA*, *lacpB*, illetve számos más ismert vagy feltételezett laktóz-permeáz és β -galaktozidáz gén. Érdekes módon a Leloir-útvonal génjei még a szénéhező kultúrák

esetben is alulszabályozottságot mutattak, ami arra utal, hogy ez az útvonal inkább a galaktóz tartalmú szacharidok szintéziséhez, mintsem a galaktóz lebontásához köthető. A *lacpB* és *lacD*, valamint néhány más ismert vagy feltételezett β -galaktozidáz gén még szénéhezés hatására is felülszabályozódott (**7. táblázat**), ami összhangban van a szénstressznek kitett tenyészetek emelkedett β -galaktozidáz aktivitásával (**6. táblázat**).

4.2.3.5. Extracelluláris peptidáz gének

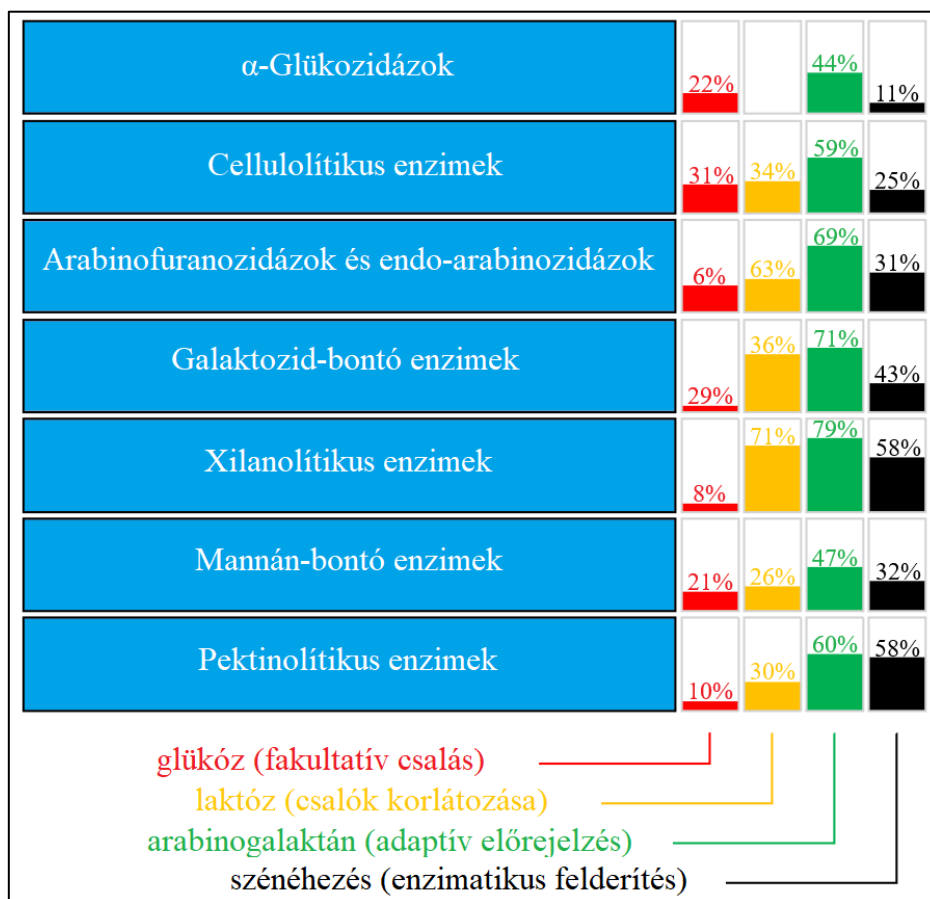
A szénstressz minden kultúrában fokozta bizonyos extracelluláris peptidáz (proteáz) gének transzkripcióját. Felülszabályozott géncsoportok dúsulása csak a szénéhező és az arabinogalaktános tenyészetekben volt jelentős (**7. táblázat**), azonban még a laktózon felülszabályozott 10 ismert/feltételezett extracelluláris peptidáz gén is kimutatható proteáz aktivitással járt együtt (**6. táblázat**). Ezek az adatok fermentációs ipari szempontból is figyelemfelkeltőek, ugyanis heterológ fehérjetermelés során bármely fellépő szénstressz kedvezőtlen kihozatalt okozhat egy intenzív proteolitikus degradáció következtében (Nevalainen és Peterson, 2014).

4.2.3.6. CAZyme gének

Mindhárom kezelés hatására szintén szignifikáns mértékben szabályozódtak felül a CAZyme fehérjék génjei (**18. ábra; 8. és 9. táblázat**). Ezek egy része összefüggésben volt az alkalmazott szénforrással, ugyanis pl. β -galaktozidáz gének mind a laktóz, mind az arabinogalaktán esetében aktiválódtak, míg arabino-furanozidáz, endo-arabinozidáz és α -galaktozidáz géneket csak az arabinogalaktánt tartalmazó tenyészetek CSR-génjei között találtunk (**8. és 9. táblázat**). Az AN9166 (feltételezett exo-1,6-galaktanáz; Coutinho és mtsai., 2009) felülszabályozottsága szintén csak arabinogalaktánon volt megfigyelhető. Számos felülszabályozott CAZyme génnek azonban inkább olyan szénhidrátok hasznosításában lehet szerepe, amelyek nem voltak jelen a tápközegben, hiszen a β -1,4-endoglükánáz/celluláz, β -glükózidáz, cellobiohidroláz és cellobiozidáz gének arabinogalaktánon, míg a xilozidáz, illetve a ramnogalakturonán hasznosító gének mindhárom kezelésnél is feldúsultak a felülszabályozott gének csoportjában (**8. és 9. táblázat; 5. melléklet**).

A legtöbb CAZyme gént (65 gén) az arabinogalaktános kultúrákban figyeltük meg, őket pedig meglepő módon a glükózban gazdag (29 gén), majd a szénéhező (16

gén), végül a laktóztartalmú tenyészetek (6 gén) követték (**18. ábra; 9. táblázat**). Az arabinogalaktánon felülszabályozott CAZyme gének esetében számos külön alkategóriába tartozó géncsoport is szignifikáns dúsulást mutatott (**18. ábra; 9. táblázat**). A szénéhező tenyészeteknél ilyen dúsulást azonban nem tapasztaltunk, ami arra utal, hogy a szénéhezés-specifikus CAZyme gének több CAZyme kategória között oszlanak meg (**9. táblázat**). Érdekes módon laktózon csak az α -galaktozidáz géncsoport szabályozódott felül, a β -galaktozidáz gének csoportja azonban nem. Valójában laktózon a β -galaktozidáz gének közül csak a laktóz-hasznosításhoz nélkülözhetetlen β -galaktozidázt kódoló *lacD* expresszáldott szignifikánsan nagyobb aktivitással a többi tenyészethez képest (**8. és 9. táblázat**). A glükózos referencia kultúrákat ilyen szempontból a β -1,4-endoglükánáz/celluláz géncsoport dúsulása jellemezte (**18. ábra; 9. táblázat; 5. melléklet**).



18. ábra A szénforrások hatása a kiválasztott CAZyme géncsoportok felülszabályozására.

A jobb oldali színes oszlopok a csoporton belül felülszabályozott gének arányát mutatják az adott szénforráson. A géncsoportokhoz köthető gének számát a **9. táblázat** tartalmazza.

9. táblázat A CAZyme gének transzkripciók regulációja a glükózban gazdag, valamint szénstressznek kitett *A. nidulans* kultúrákban

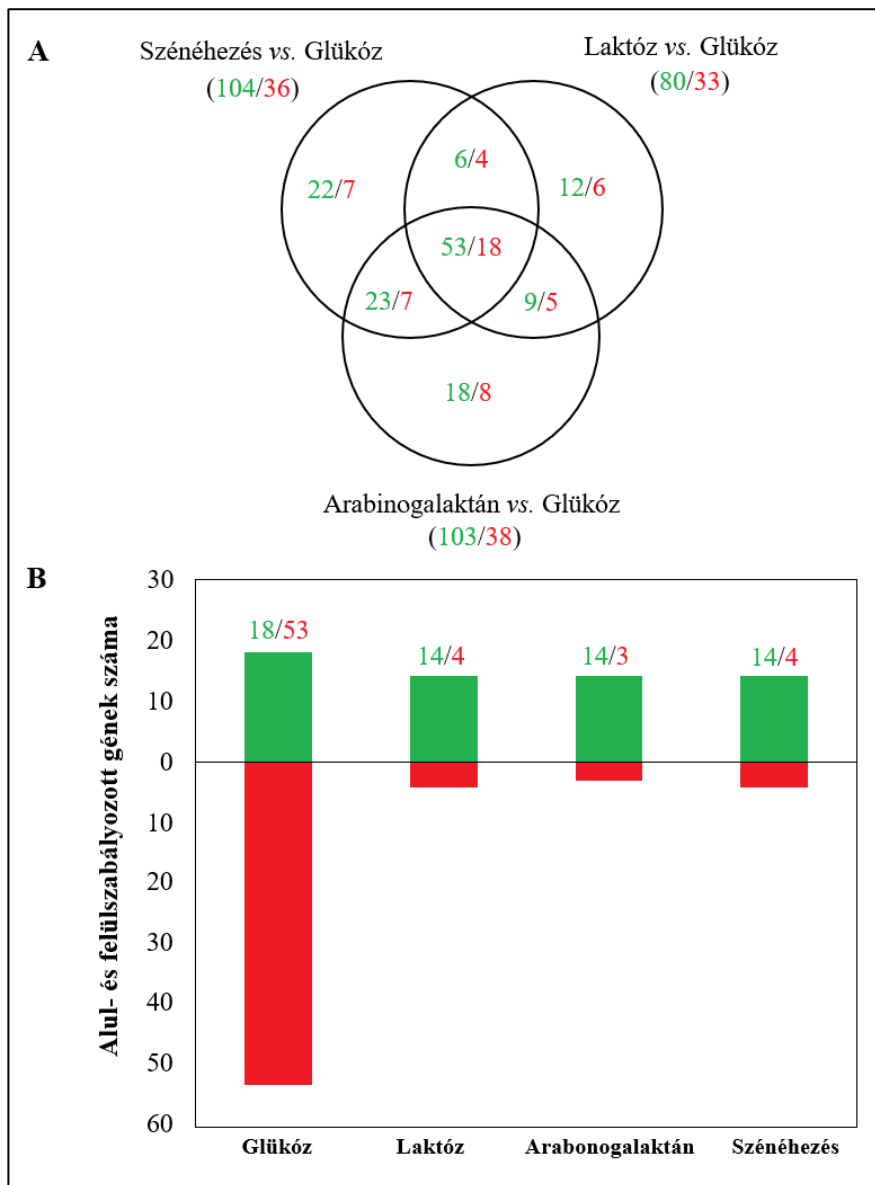
Géncsoport ^a	Glükóz ^b	Laktóz ^b	Arabinogalaktán ^b	Szénéhezés ^b
CAZyme gének (317)	77 (29)	81 (6)	138 (62)	107 (16)
α-Glükozidázok (9)	2 (1)	0 (0)	4 (2)	1 (1)
Cellulolítikus enzimek (32)	10 (5)	11 (0)	19 (14)	8 (1)
β-Glükozidázok (13)	3 (1)	4 (0)	8 (5)	5 (0)
β-1,4-Endoglükánázok (14)	5 (4)	5 (0)	7 (5)	2 (1)
Cellobiohidrolázok és cellobióz-dehidrogenázok (5)	2 (0)	2 (0)	4 (4)	1 (0)
Galaktozid-bontó enzimek (16)	1 (0)	10 (4)	11 (4)	5 (0)
α-Galaktozidázok (7)	1 (0)	5 (3)	5 (1)	2 (0)
β-Galaktozidázok (7)	0 (0)	5 (1)	6 (2)	3 (0)
Galaktanázok (2)	0 (0)	0 (0)	0 (1)	0 (0)
Arabinofunaozidázok és endo-arabinozidázok (14)	4 (1)	5 (0)	10 (7)	6 (0)
Xilanolítikus enzimek (24)	2 (0)	17 (1)	19 (13)	14 (2)
Xilanázok (5)	1 (0)	2 (0)	3 (3)	2 (1)
Xilozidázok (12)	1 (0)	10 (1)	11 (8)	7 (0)
További xilán-bontó enzimek (7)	0 (0)	5 (0)	5 (2)	5 (1)
Mannán-bontó enzimek (19)	4 (1)	5 (0)	9 (4)	6 (0)
Xiloglükán-bontó enzimek (3)	1 (1)	1 (0)	2 (1)	2 (0)
Pektinolítikus enzimek (40)	4 (1)	12 (1)	24 (7)	23 (3)
Galaktorunán-bontó enzimek (24)	4 (1)	4 (0)	12 (4)	11 (2)
Ramnogalaktorunán-bontó enzimek (16)	0 (0)	8 (1)	12 (3)	12 (1)

^a – A géncsoport neve után zárójelben szereplő szám adatok a géncsoporthoz köthető gének számát jelölik.

^b – A táblázat az alábbiak szerint meghatározott felülszabályozott gének számát tartalmazza: A szénstressznek kitett kultúrák esetében a glükózos tenyészetekhez viszonyítva vizsgáltuk a regulációt. A glükózos tenyészetek esetében a regulációt bármely szénstressznek kitett kultúrához viszonyítva (azaz bármely szénstressz által alulszabályozott gének) kerültek megállapításra. A zárójelben szereplő számok a szénforrás-specifikus gének számát jelölik. A CAZyme gének transzkripciók aktivitására vonatkozó további adatokat a **18. ábra**, az **8. táblázat**, valamint Gila és mtsai. (2022) közleményének „S2” táblázata tartalmazza. Ezek az adatok csak terjedelmi okok miatt nem kerültek bele a dolgozatba.

4.2.3.7. Transzkripciós faktor gének

A szénforrás-specifikus géneket illetően a transzkripciós faktorok génjeinek csoportja a stresszkezelt tenyészeteknél felülszabályozottságot, glükóz-specifikusan pedig alulszabályozottságot mutatott (**19. ábra; 8. táblázat**). A *galR* és *galX* laktózon, valamint az *araR* arabinogalaktánon és szénéhezés során történő felülszabályozódása mellett a celluláz- és xilanáztermelés szabályozásáért felelős *clrA* (Coradetti és mtsai. 2012), a ramnóz hasznosításáért felelős *rhaR* (Pardo és Orejas, 2014), valamint az extracelluláris peptidáz- és sejtfal-hidroláz-termelésért felelős *brlA* és *xprG* (Emri és mtsai., 2008; Katz és mtsai., 2013; van Munster és mtsai., 2016) gének felülszabályozódása volt jellemző a szénstressznek kitett tenyészetekre (**18. ábra; 8. táblázat**). Számos felülszabályozott peptidáz, CAZyme és sejtfalgén kódol (feltételezett) extracelluláris enzimeket. Ezzel összhangban a rosszul feltekeredett fehérjeválaszért (unfolded protein response; UPR; endoplazmatikus retikulum stressz) felelős HacA transzkripciós faktor génjének transzkripciója is megnőtt szénstressz hatására (**17. ábra; 8. táblázat**).



19. ábra A CSR- (A) és a szénforrás-specifikus (B) transzkripciós faktor gének eloszlása a tenyészetekben.

Az ábrák az felül-/alul szabályozott transzkripciós faktor gének számát mutatják.

CSR: szénstresszválasz (carbon-stress-response)

4.2.3.8. Szekunder metabolit génklaszterek

Mivel a sejtek másodlagos anyagcseréjét nagymértékben meghatározza a rendelkezésre álló szénforrás minősége és mennyisége (Ruiz-Villafán és mtsai., 2022), az SMG-klaszterek transzkripciós aktivitását is értékeltük. Ezeknél a géncsoportoknál vegyesen fordultak elő felül- és alul szabályozódott klaszterek mindhárom kezelés során (Gila és mtsai., 2022 „S3” táblázat). Mind a négy kultúrában volt egy-egy jellegzetes SMG-klaszter, amely a legnagyobb transzkripciós aktivitást mutatta az adott

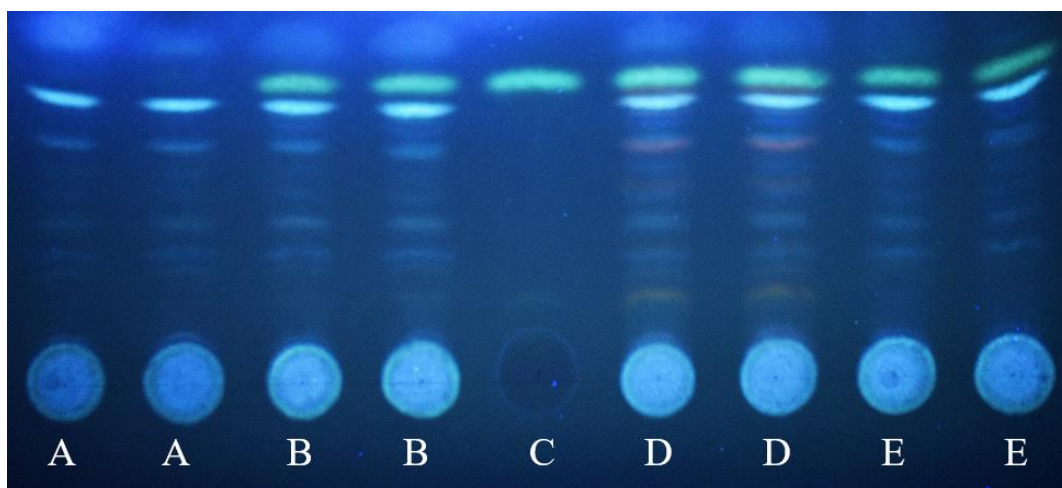
tenyészetnél, de a differenciáltan expresszált klaszterek összességében hasonló mintázatot mutattak. A szénstressz hatására felülszabályozott legfontosabb SMG-klaszttereket az **10. táblázat** tartalmazza. Ezek közül kiemelkedik a STC-klaszter transzkripció aktivitása, ugyanis mind a 26 klasztergén felülszabályozottságot mutatott a mindhárom kezelt kultúrában, illetve a kódolt mikotoxin képződését TLC-lemezen is sikerült kimutatni (**20. ábra**). Említést érdemel, hogy bár az alulszabályozott génklasztterek glükózon jelentkeztek a legnagyobb számban, voltak olyan klasztterek (mikroperforanon klaszter, pkh klaszter és AN3273 klaszter), amelyek a három stressznek kitett tenyészethez képest nagyobb aktivitást mutattak a referencia kultúrákban (**10. táblázat**).

10. Táblázat Néhány szénstressz hatására felülszabályozott SMG-klaszter az *A. nidulans* kultúrákban.

SMG-klaszter ^a	Laktóz vs. glükóz	Arabinogalaktán vs. glükóz	Szénéhezés vs. glükóz
	Felül-/alulszabályozott gének száma		
STC (26)	26/0	26/0	26/0
Monodiktifenon (12)	12/0	12/0	11/0
AN8105 (10)	8/1	9/1	8/1
Pkb (9)	6/0	7/0	8/0
Pkg (6)	6/0	3/0	6/0
Emericellamid (5)	0/0	5/0	1/1
Terrikinon (5)	5/0	5/0	5/0
AN1680 (4)	1/0	4/0	4/0
Penicillin (3)	0/1	3/0	3/0
Ivo (2)	2/0	2/0	2/0
AN9129 (2)	2/0	2/0	2/0
AN9314 (2)	2/0	2/0	2/0

^a – Csak azok a felülszabályozott SMG-klasztterek kerültek bemutatásra, amelyekben legalább egy összehasonlítás során az összes gén ($a \leq 8$ gént tartalmazó klasztterek esetében), vagy 1 gén kivételével az összes gén ($a > 8$ gént tartalmazó klasztterek esetében) egyidejűleg felülszabályozottságot mutatott. Az SMG-klaszterben érintett gének számát zárójelben tüntettük fel. Az SMG-k transzkripció aktivitására vonatkozó további adatok Gila és mtsai. (2022) közleményének „S3” táblázatában található meg. Ezek az adatok csak terjedelmi okok miatt nem kerültek bele a dolgozatba.

SMG: szekunder metabolit gén; STC: szterigmatocisztin



20. ábra STC-termelés a szénstressznek kitett *A. nidulans* THS30 tenyészetekben.

Az ábra az STC-termelés kvalitatív meghatározásának (TLC) reprezentatív fényképét mutatja. A tenyészeteket mintavétel előtt 12 órán (szénstressznek kitett kultúrák), illetve 4 órán keresztül (glükózos tenyészetek) inkubáltuk.

STC: szterigmatocisztin; TLC: vékonyréteg kromatográfia (thin layer chromatography);
 A: glükózos tenyészetek; B: szénéhező tenyészetek; C: STC-standard (25 µg); D: laktózos tenyészetek;
 E: arabinogalaktános tenyészetek

5. Megbeszélés

5.1. Szénéhező tenyészetek GSH-metabolizmusa

5.1.1. A DUG-útvonal szerepe a glutation intracelluláris lebontásában

A redox-szabályozás, vagyis a sejtek redox-állapotától függő szabályozási mechanizmusok kulcsfontosságúak a legtöbb élő szervezet számára (Federoff, 2006; Oktyabrsky és Smirnova, 2007; Wu és Bauer, 2008; Boronat és mtsai., 2014). A redox-homeosztázis fenntartása és az oxidatív/reduktív stresszhatások káros következményeinek megelőzése a redox-szabályozás egészének csak egy kis hányadát jelentik (Federoff, 2006; Oktyabrsky és Smirnova, 2007; Thön és mtsai., 2007; Mendoza-Martínez és mtsai., 2020). Fonalas gombák esetében az ivaros és ivartalan fejlődési folyamatok, a tápanyagok hasznosítása, a másodlagos anyagcsere és a virulenciát meghatározó tulajdonságok is gyakran a redox-szabályozás kontrollja alatt állnak (Hansberg és Aguirre, 1990; Thön és mtsai., 2007; Montibus és mtsai., 2015; Chi és Craven, 2016; Mendoza-Martínez és mtsai., 2017, 2020).

A GSH/GSSG redox-rendszer sok prokariótában és a legtöbb eukarióta élőlényben, így a gombákban is meghatározó szerepet tölt be az optimális redox-állapot fenntartásában. Nem meglepő módon, a gombák GSH tartalmát érintő változások jelentősen befolyásolhatják működésük és viselkedésük számos aspektusát (Schafer és Buettner, 2001; Pócsi és mtsai., 2004; Bakti és mtsai., 2017). Mindezek ellenére a fonalas gombák egyik legfontosabb modell organizmusa, az *A. nidulans* esetében eddig csak néhány, a GSH anyagcseréjéhez és szállításához kapcsolódó fehérjét/gént jellemeztek funkcionálisan. Ezen fehérjék/gének közé tartozik a GSH szintéziséhez szükséges γ -glutamil-cisztein-szintáz (*gcsA*; Sato és mtsai., 2009), a GSSG (vissza)redukálását biztosító glutation reduktáz (*glrA*; Bakti és mtsai., 2017) és a γ GT (*ggtA*; Spitzmüller és mtsai., 2015b). Ez utóbbi „GSH-bontó” enzim, bár *in vitro* képes a GSH lebontására és szintézisére is (Spitzmüller és mtsai., 2015b), a GSH raktárak szénéhező körülmények közötti jelentős csökkenésében nem esszenciális (Spitzmüller és mtsai., 2015a). Kísérleteinkben ezért megvizsgáltuk, hogy az egyes élesztő fajokban a citoszólikus GSH lebontásáért felelős DUG útvonal enzimeinek (Kumar és mtsai., 2003; Ganguli és mtsai., 2007; Desai és mtsai., 2011; Kaur és mtsai., 2012) van-e szerepe az *A. nidulans* GSH anyagcseréjében. Ennek érdekében a *dugB* és *dugC*, feltételezhetően a GSH-lebontásban

résztevő fehérjéket kódoló génekben sérült egyszeres és duplamutánsokat vizsgáltunk. Kísérleteinkben kimutattuk, hogy az *A. nidulans*-ban a DUG-útvonal részt vesz a citoszolikus GSH lebontásában, hiszen a mutáns tenyészetek GSH-tartalma lassabban csökkent szénéhezés során, mint a referencia törzsé (**7A. ábra**). Ezek az adatok egyértelműen igazolták azt is, hogy a DUG-útvonal nem az egyetlen GSH-lebontó útvonal az *A. nidulans*-ban, mindezért még további vizsgálatokra van szükség a GSH-lebontás részleteinek tisztázásához. Bár a GSH bioszintézisének szigorú negatív visszacsatolós kontrollja (Noctor és mtsai., 1998; Pócsi és mtsai., 2004; Lushchak, 2012) és az *A. nidulans* alternatív GSH-elimináló mechanizmusai miatt a DUG-útvonal inaktiválása csak mérsékelten befolyásolta a sejtek GSH-tartalmát, azonban már ez is lehetővé tette számunkra a megváltozott GSH-szintek fiziológiai következményeinek vizsgálatát.

5.1.2. A redox-szabályozás és a szénéhezésre adott stresszválasz kapcsolata

A GSH-anyagcsere kapcsolatot teremthet a szénéhezésre adott stresszválasz és a redox-szabályozás között, hiszen a nagy intracelluláris GSH-koncentrációnak köszönhetően a sejtek tárolt szén/energiaforrásként hasznosíthatják azt. Hasonlóképpen, a GSH akár nitrogén- vagy kénraktárként is szolgálhat nitrogén-/kén-limitáció vagy éhezés során (Pócsi és mtsai., 2004). A csökkenő GSH-tartalom megváltoztatja a sejtek redox-állapotát, továbbá aktiválja azokat a szabályozó útvonalakat, amelyek a szénéhezéskor fellépő stresszválaszok elemeit szabályozzák.

Számos mechanizmus segíti a gombákat abban, hogy túléljék a szénéhezést. Intracelluláris raktáraik kimerítését követően, vagy akár azzal egyidejűleg is folytathatnak makroautofágiát, szekretálhatnak enzimeket az elhalt hifák sejtfalanyagainak hasznosításához (autolitikus sejtfallebontás) (Nitsche és mtsai., 2012; Szilágyi és mtsai., 2013; van Munster és mtsai., 2016; Emri és mtsai., 2018), és szekretálhatnak egyéb enzimeket is (pl. peptidázokat és CAZyme-okat), hogy alternatív szénforrásokat találjanak a környezetükben (van Munster és mtsai., 2014, 2016). Irodalmi adatokkal és korábbi eredményekkel összhangban (Emri és mtsai., 2004; Bartoszewska és Kiel, 2011; Deng és mtsai., 2012) az itt bemutatott vizsgálatokból is kiderül, hogy a makroautofágia és az autolitikus sejtfallebontás a sejtek redoxállapotától is függ, ugyanis a mérsékelt oxidatív stressz kedvezően hatott az sejtfal lebontó enzimek termelésére (**8. ábra**), míg a H₂O₂ okozta szélsőséges stressz azonban gátolta ezt a folyamatot (**10. ábra**;

Emri és mtsai., 2004a). A proteáz és γ GT aktivitásokat szintén befolyásolta a GSH-szint változása (**9. ábra**). Mivel a szénéhező tényezetek extracelluláris enzimaktivitásának nagy részéért felelős enzimeket (pl. ChiB, EngA, PrtA, PepJ és GgtA) kódoló gének (Pócsi és mtsai., 2009; Szilágyi és mtsai., 2010, 2011; Spitzmüller és mtsai., 2015b) transzkripciójában nem detektáltunk jelentős változásokat (**5. táblázat**), lehetséges, hogy a redox-szabályozásnak ez a szegmense poszttranszkripciós szinten fejtette ki a hatását (*4.1.4.1. alfejezet*). Azonban az is előfordulhat, hogy a sejtek redox-állapota közvetlenül a fehérje-szekréció szabályozásán keresztül befolyásolta a fehérjék termelését.

Habár a GSH-anyagcserében bekövetkezett változások módosították az intracelluláris ROS-szinteket (**7B. ábra**), a megnövekedett ROS-képződés oka még így sem teljesen nyilvánvaló. Ehhez a GSH-szintek csökkenése mellett (**7A. ábra**) a megnövekedett fehérjeszekréció (Yu és mtsai., 2016), valamint az antioxidáns enzimek termelésében bekövetkezett erőteljes változás is hozzájárulhatott (**8. és 9. ábra**; Gila és mtsai., 2021 „S4” táblázat). Nem zárható ki továbbá a közvetlen ROS-termelés sem, például a NADPH-oxidázok által (Aguirre és mtsai., 2005; Cano-Domínguez és mtsai., 2008).

5.1.3. Az oxidatív stressz hatása a szekunder metabolitok termelésére

Sok tanulmány foglalkozott már a gombák szekunder metabolit-termelésének aktiválódásával, amit leginkább oxidatív stressz és szénstressz alatt sikerült megfigyelni (Roze és mtsai., 2011; Hong és mtsai., 2013, 2013; Subramaniam és Rampitsch, 2013; Montibus és mtsai., 2015). Korábbi vizsgálatok transzkriptomikai adatai azt mutatják, hogy más stresszhatások, mint a vaséhezés, vagy a sóstressz, szintén felülszabályozhatnak SMG-klasztereket (Emri és mtsai., 2015; Kurucz és mtsai., 2018). Ezek a vizsgálatok arra is rávilágítanak, hogy a stressz típusától és erősségétől is függ, hogy aktiválódik, esetleg gátlódik egy klaszter működése, ráadásul klaszter-specifikus módon (Emri és mtsai., 2015; Kurucz és mtsai., 2018). A mi kísérletünkben is több SMG-klaszter szabályozódott felül a szénstressz (és a vele együtt járó oxidatív stressz) hatására, emellett néhány klaszter azonban alulszabályozottságot mutatott (**4. táblázat**). Meglepő módon a DUG-útvonal gátlása egyes, a szénéhezés által aktivált klaszterek aktivitását tovább növelte. Erre jó példa az STC-klaszter működése: A szénéhezés aktiválta a klasztergének transzkripcióját és ez a felülszabályozottság a THM4 DUG mutánsban lényegesen nagyobb volt, mint a kontroll törzsben (**4. táblázat**). A klaszter működésében

bekövetkezett változások a termelt STC mennyiségét is megváltoztatták (**14. ábra**). Korábban már kimutatták, hogy ivarosan fejlődő felületi gombafélék esetében az STC-termelés időben egybeesik a kleisztotéciumok képződésével (Kato és mtsai., 2003; Atoui és mtsai., 2008; Bayram és Braus, 2012), és a Hülle-sejtekben lokalizálódik (Ámon és mtsai., 2018). Feltételezhetően elsődleges funkciója az, hogy védje a termőtesteket a fungivór ízeltlábúaktól (Staadén és mtsai., 2011; Döll és mtsai., 2013). Mindezek alapján nem meglepő, hogy a *dugB-dugC* kettős deléción az ivaros folyamatokkal együtt a STC-termelést is befolyásolta (**11. és 14. ábra**).

A korábbi megfigyelésekkel összhangban (Emri és mtsai. 2015) a mérsékelt oxidatív stressz serkentheti, míg az erős oxidatív stressz inkább gátolja egyes SMG-klaszterek működését. Sajnos ez azt is jelenti, hogy a mikotoxintermelés visszaszorítását célzó antioxidáns-kezelések paradox módon akár felül is szabályozhatnak egyes SMG-génklasztereket fokozva a nemkívánatos mikotoxinok képződését.

5.1.4. A DUG-útvonal inaktiválásának szignáltranszdukciós aspektusai

A fokozott oxidatív, ozmotikus, sejtfal integritási, hőmérsékleti és antimikotikus stresszérzékenység, amelyet az *A. nidulans* *ΔglrA* törzsei is mutatnak, egyértelműen jelzi a GSH általános jelentőségét a stressz tűrésben (Sato és mtsai., 2009; Bakti és mtsai., 2017). Ezzel szemben a *dugB* és *dugC* deléción nem növelte a gomba oxidatív stresszel szembeni toleranciáját (**8. és 9. ábra**; Gila és mtsai., 2021 „S4” táblázat). Lehetséges, hogy a GSH felhalmozódásának negatív mellékhatásai (pl. a túlzottan redukív belső körülmények megakadályozhatják az oxidatív stresszválasz megfelelő szabályozását), ellensúlyozzák a megnövekedett antioxidáns kapacitást. Jól tükrözi a GSH túlzott jelenlétének káros következményeit az a megfigyelés, miszerint a tápközeghez adott GSH nagykoncentrációban kifejezetten toxikus az *A. nidulans* számára (Bakti és mtsai., 2017).

Az oxidatív stressztoleranciával szemben, a kadmium tolerancia jól detektálható módon megnövekedett a DUG-útvonal inaktiválásával (**2. táblázat**). Ez a megfigyelés összeegyeztethető azzal a feltételezéssel, hogy a gomba GSH-kadmium komplex képzésével védekezik e nehézfém ellen (Prévéral és mtsai., 2009; Emri és mtsai., 2021). Ebben az esetben a nagyobb GSH-szintek negatív mellékhatásaik ellenére is előnyösek a gomba számára. Mindez azt is jelenti, hogy a kadmiumtoleráns mutánsok keresése jobb stratégia lehet GSH-túltermelő törzsek izolálására, mint a megnövekedett oxidatív stressztolerancia tesztelése.

A THM4 mutáns viselkedése nem csak szénéhező körülmények között, hanem a glükózon növekedő tenyészetekben is jelentősen különbözött a vad típusú törzsétől. Számos mitogén-aktivált protein-kináz (MAPK) útvonal gén (pl. *steC*, *sskB*, *pbsA*, *hogA*, *mkkA*) transzkripciójában mutatkozott változás (**3. táblázat**). Mivel a MAPK-útvonalak központi szerepet játszanak a sejtek homeosztázisának fenntartásában, a megnövekedett GSH-szint ezekre a génekre gyakorolt következményei magyarázatot adhatnak arra, hogy a GSH túladagolása miért káros az *A. nidulans* számára (Bakti és mtsai., 2017) és a DUG útvonal inaktiválása miért nem növelte az oxidatív stressztoleranciát.

A MAPK-útvonalak a stresszválaszok mellett fejlődési/differenciálódási folyamatokat is szabályoznak az *Aspergillus* fajokban (Duran és mtsai., 2010; Ma és Li, 2013). Így nem meglepő, hogy a konídiumok és az aszkospórák képződésének szabályozásában részt vevő gének (pl. *flbA*, *flbC*, *flbE*, *nosA*, *rosA*, *nsdC* és *nsdD*) transzkripciója is megváltozott a THM4 törzsben szénéhezés hatására (**3. táblázat**). Ezen génexpressziós változásokkal összhangban a THM4 mutánsban csökkent konídiumképződést (**2. táblázat**) és az ivaros folyamatok szabályozásának zavarát figyeltük meg (**11. ábra**).

A MAPK-útvonalak felsőbb szintű szabályozóelemei közé tartoznak a redox-érzékelő His-Asp foszforiláló (kétkomponensű) rendszerek. Az *A. nidulans* genomja 15 hisztidin-kinázt, négy válaszregulátort és egy hisztidin-tartalmú foszfortranszfer-proteint kódol (Hagiwara és mtsai., 2007). A négy válaszregulátor közül kettő (SskA és SrrA) az oxidatív stresszválasz szabályozásában vesz részt, az SskA pedig a HogA MAPK-útvonalon keresztül hat (Furukawa és mtsai., 2005; Hagiwara és mtsai., 2007). A *Candida albicans* Hog1 MAP-kináz enzimeje reaktív cisztein-oldalláncokkal rendelkezik, melyek redox-státuszának változása (az enzim foszforilációja mellett) fontos szerepet játszik a kináz sejtmagban történő akkumulálódásában nitrozatív stressz alatt (Herrero-de-Dios és mtsai., 2018). A redox-érzékelő His-Asp foszforiláló rendszerek mellett ez is egy érdekes példa arra, hogy a redox-változások hogyan változtatják meg egy MAPK-útvonal aktivitását. Összességében tehát azt feltételezhetjük, hogy a DUG-útvonal inaktiválása által okozott megnövekedett GSH-szint a redox-érzékelő mechanizmusok révén módosíthatta a MAPK-kaszádok aktivitását, amely számos gén, köztük a MAPK útvonalak fehérjéit kódoló gének és a differenciálódási folyamatok szabályozásában résztvevő gének transzkripcióját is módosította.

Más eredményekkel összhangban (Hansberg és Aguirre, 1990; Thön és mtsai., 2007; Montibus és mtsai., 2015; Chi és Craven, 2016; Mendoza-Martínez és mtsai., 2017,

2020) kísérleti adataink is egyértelműen arra utalnak, hogy a redox-szabályozás nélkülözhetetlen része a sejtműködés szinte minden aspektusát érintő általános szabályozási rendszernek. A redox-szabályozás hatásai minden bizonnyal messze túlmutatnak a redox-stressz elleni védekezés folyamatain, ugyanis a másodlagos anyagcserét, a redox-stressztől eltérő stresszválaszokat, valamint az ivaros és ivartalan fejlődést is szabályozza. Eredményeink azt is alátámasztják, hogy a GSH sejteken belüli felhalmozódása jelentősen módosíthatja a gomba fiziológiáját, ami kiemeli a GSH-szekréciónak a metabolit ipari léptékű előállításakor (Schmacht és mtsai., 2017).

5.2. A laktózon megfigyelhető szénforrás-limitációs stresszválasz

5.2.1. Enzimikus „felderítés” szénéhezés során

Az extracelluláris poliszacharidok hasznosítása komoly kihívást jelent a mikrobák számára, hiszen mindenekelőtt azonosítaniuk kell a környezetben jelenlévő szénhidrátokat, hogy a megfelelő enzimet vagy enzim mixet szekretálják a hatékony lebontáshoz. Ezt a problémát általában „felderítő” enzimek kiválasztásával oldják meg (Martens-Uzunova és Schaap, 2009; Delmas és mtsai., 2012; van Munster és mtsai., 2016). Ezek az enzimek „közönséges” CAZyme fehérjék, amelyek önmagukban nem tudják lebontani teljes mértékben a polimert, azonban energia hatékonyan képesek felszabadítani néhány oligomert vagy monomert. Ez utóbbi vegyületeket (mint „szabályozó molekulákat”) ismerik fel a sejtek, ami aktiválja az adott polimer teljes és hatékony lebontásához szükséges valamennyi enzim fokozott termelését (Martens-Uzunova és Schaap, 2009; Delmas és mtsai., 2012; van Munster és mtsai., 2014).

A mi esetünkben a szénéhezésre számos CAZyme gén (107 gén) transzkripciója aktiválódott a glükózban gazdag tenyészetekhez képest, azonban ezen gének közül csak 16 volt szénéhezés-specifikus (8. és 9. táblázat). A vizsgált CAZyme alkategóriák közül egy sem dúsult fel a szénéhezés-specifikus felülszabályozott gének csoportjában, és legtöbbjük még a teljes szénéhezésre aktiválódott gének csoportjában sem (8. és 9. táblázat). Ezek az eredmények egybevágóak a felvázolt „enzimikus felderítés” stratégiával, miszerint az *A. nidulans* az *A. niger*-hez hasonlóan (van Munster és mtsai., 2014), éhezés során egyszerre több enzimet szekretál az alternatív szénforrások

felkutatása érdekében anélkül, hogy felülszabályozná egy-egy poliszacharid hasznosításához szükséges teljes génkészletét.

Érdekes módon a ramnogalakturonán-lebontó gének közül több gén (a 16 génből 12), valamint a galakturonán-, arabinán- és xilán-lebontó gének közel fele (összesen 25 az 54 génből) felderítő enzimgénként viselkedett (felülszabályozódtak szénstressz során), míg a cellulóz lebontó gének nem (**8. és 9. táblázat**). A cellulóztól eltérően a növényi sejtfal nem cellulóztartalmú komponensei meglehetősen változatosak, ezért felismerésükhöz több különböző enzimre lehet szükség. A felismerés után azonban ezek lebontása kevésbé lehet problémás, mint a részben kristályos szerkezetű cellulózé. Ez magyarázatot adhat a felderítő enzimgének magas arányára ezekben a kategóriákban.

Szénéhezés során a raktározott vegyületek (pl. a glikogén vagy akár a GSH) hasznosítása, az autofágia és az autolitikus sejtfaldegradáció is energiaforrást biztosíthatnak a sejtek számára (**5.1. alfejezet; 8. táblázat**; Szilágyi és mtsai., 2013; van Munster és mtsai., 2016). A potenciális szénforrások felderítése mellett az autolitikus sejtfallebontáshoz is intenzív extracelluláris enzimtermelésére van szükség. A riboszóma biogenezis és az ER-specifikus folyamatok (mint az ER és a Golgi-vezikulák közötti transzport, a fehérjék glikozilációja és az ER-stressz) génjei nem meglepő módon már a szénstressz válasz korai szakaszában felülszabályozódnak (Szilágyi és mtsai., 2013). Habár az általunk vizsgált kései stresszválasz során az ER-specifikus folyamatok nem aktiválódtak szignifikánsan, azonban intenzív volt az ER-stresszt szabályozó transzkripciós faktort kódoló *hacA* (Saloheimo és mtsai., 2003) expressziója (**7. táblázat**). Úgy tűnik tehát, hogy a sejtek szénstresszhez való alkalmazkodásában az ER megfelelő működése különösen fontos. Ez gyakorlati szempontból is érdekes lehet, hiszen a CAZyme-termelő ipari törzsek ER-függő folyamatainak manipulálása nemcsak hatékonyabb enzimszekréciónak vezethet, hanem növelheti a törzs stressztoleranciáját és segítheti a gyors adaptációját a fermentációs iparban alkalmazott körülményekhez. Az enzimszekréciónak és a szénstresszhez való alkalmazkodásnak a patogén gombák virulenciáját is befolyásolja (Ene és mtsai., 2012; Brown és Goldman, 2016; Vivek-Ananth és mtsai., 2018), ami felhívja a figyelmet a gomba ER-aktivitásának megzavarásán alapuló antifungális stratégiák lehetőségére.

5.2.2. Az adaptív előrejelzés jelentősége a CAZyme gének szabályozásában

Az „adaptív előrejelzés” egy olyan jelenség, amelyet a stresszbiológiában a „stressz keresztvédelem” (stress cross-protection) magyarázatára szoktak alkalmazni (Mitchell és mtsai., 2009; Brown és mtsai., 2019). Ez azt jelenti, hogy egy adott stresszorzal szembeni stresszválasz során a sejtek nem csak a stresszorra specifikus génkészleteket szabályozzák felül, hanem más elemeket is, hogy esetlegesen felkészüljenek a legvalószínűbb későbbi stresszhatásokra is. Ennek következtében az egyik stresszor jelenléte növelheti a sejtek toleranciáját egy másik fajta stresszorzal szemben. Növényi sejtfal-poliszacharidok ritkán fordulnak elő elszigetelt formában a gombák természetes élőhelyein. Ebből adódóan az egyik szacharid típus jelenléte növeli annak valószínűségét, hogy más típusok is előfordulnak ott. Emiatt ésszerű feltételezni, hogy az egyik típusú poliszacharid lebontása során képződő szabályozó molekulák felülszabályozzák a gombák több CAZyme génjét is, amelyek más, esetlegesen együtt előforduló polimerek felismeréséhez, illetve lebontásához is szükségesek lehetnek („cross-upregulation”).

A vizsgálataink során is használt vörösfenyő (*Larix*) faanyagból származó arabinogalaktán polimert egy β -1,3-D-galaktopiranozil főlánc alkotja, melynek oldalláncai között α -L-arabinofuranozil (C6'), β -1,6-L-galaktobiozil (C4' vagy C6') és 4-O-(α -L-arabinofuranozil)- β -D-galaktopiranozil (C6') egységek találhatóak (Megazyme, Bray, Írország). Így nem meglepő, hogy számos, ennek a polimernek a lebontásában potenciálisan részt vevő enzimet kódoló gén, köztük galaktozidáz és arabinofuranozidáz gének is felülszabályozódtak (8. és 9. táblázat). Érdekes módon az *A. nidulans* genomja nem tartalmazza az *A. flavus* Af3G β -1,3-endogalaktanáz ortológját (Yoshimi és mtsai., 2017), azonban sikerült kimutatni az AN9166 (feltételezett exo-1,6-galaktanáz) gén felülszabályozottságát, de a *gala* (β -1,4-endogalaktanáz) esetében ezt nem figyeltük meg. A galaktóz és az arabinóz valószínűleg a D-galaktóz oxidoreduktív útvonalon és az azzal átfedő pentóz-lebontó útvonalon keresztül hasznosult (Kowalczyk és mtsai., 2015). Az arabinogalaktánon való növekedés nem szabályozott felül autofágia géneket, ami arra utal, hogy a sejtek energiatermelése az arabinogalaktán komponenseinek hasznosítása felé tolódott el, azonban az autolitikus sejtfallebontásban résztvevő gének (pl. *chiB*, *engA*, *nagA*) transzkripciója továbbra is intenzív volt. Az arabinogalaktános tenyészetek génextpressziós mintázatában a xilán, a galakturonán, a ramnogalakturonán és a cellulóz hasznosításában részt vevő (vagy feltételezhetően részt vevő) gének nagymértékű

aktivitása is kimutatható volt (**8. és 9. táblázat**). Ezen gének felülszabályozottsága azonban már nem magyarázható a „felderítő enzimszekréció” stratégiával: ezek közül számos gén szignifikánsan nagyobb transzkripciós aktivitást mutatott arabinogalaktánon mint a többi tenyészetben, emellett pedig a szénéhező kultúrákhoz képest több alkategóriában is (α -glükózidázok, β -glükózidázok, β -1,4-endoglükánázok, cellobiohidroláz - cellobióz dehidrogenázok) több gén volt aktívabb (**8. és 9. táblázat**). Az arabinogalaktánon növekedő tenyészetek ezen tulajdonsága leginkább az arabinogalaktán hasznosítása során felszabaduló molekulák „cross-upregulation” hatásával magyarázható. Néhány CAZyme-csoport között dokumentáltak már hasonló „cross-upregulation” hatást: pl. cellulózbontó enzimek termelése indukálódik xilóz jelenlétében *A. niger*-ben (Gielkens és mtsai., 1999), illetve arabitól és xilánok hatására *Trichoderma reesei*-ben (Margolles-Clark és mtsai., 1997). Továbbá abból kiindulva, hogy a laktóz szerkezetileg (mint β -galaktozid diszacharid) jobban hasonlít a galaktóz-tartalmú poliszacharidok lebontása során keletkező oligomerekhez, mint a cellulóz lebontása során felszabaduló oligomerekhez, a *T. reesei* és az *Acremonium cellulolyticus* celluláz-termelő képessége laktózon (Morikawa és mtsai., 1995; Fang és mtsai., 2008) a „cross-upregulation” következménye is lehet.

5.2.3. „A közlegelők tragédiája” („Tragedy of the commons”)

Hardin (1968) közleménye alapján ökológiai, illetve gazdasági értelemben, ha a közjavak hasznosításának stratégiája az egyén számára előnyös, a közösség számára viszont nem, akkor bekövetkezik a „közlegelők tragédiája” („tragedy of the commons”), ugyanis a folyamat a közjavak teljes kimerüléséhez vezet. A jelenséget általában a több gazda által is igénybe vett közlegelő példájával szokták magyarázni. Az egyes gazdáknak az az érdeke, hogy minél több egyeddel bővítsék saját legeltetett nyájukat, hiszen a túllegeltetésből származó negatív következmények egyenletesen oszlanak meg a tulajdonosok között, a több egyed tartásából származó haszon viszont kizárólag a tulajdonosé. A nyájak egyre csak növekvő egyedszáma azonban végül a legelő teljes pusztulásához vezet a túllegeltetés miatt (Smith és Schuster, 2019).

A poliszacharidok extracelluláris lebontása a degradáció környezetében lévő bármely mikroorganizmus számára szabadon hozzáférhető extracelluláris mono- és oligoszacharidok felszabadulását eredményezi, tehát a folyamat ebben az értelemben mikrobiális „közjavakat” („public goods”; „közjószág”) teremt. Ha egyes mikrobák

ezeket a közjavakat hasznosítják, de nem fektetnek energiát lebontó enzimek szekréciójába (noha képesek lennének rá; „fakultatív csalók”), előnybe kerülhetnek az enzimet szekretáló társaikkal szemben (Brockhurst és mtsai., 2010; Smith és Schuster, 2019). Mivel minden sejtnek az az érdeke, hogy a közjavakból a lehető legtöbbet használja fel a lehető legkevesebb enzimszekréció befektetése mellett, prognosztizálható a közjavak gyors kimerülése, ha csak az enzimet szekretáló egyedek nem tudják megakadályozni a (fakultatív) csalók térnyerését. Erre több lehetőség is kínálkozik: pl. a felszabadított tápanyagok diffúziójának korlátozása hatékony transzport és/vagy az extracelluláris enzim sejt felszínhez való rögzítésével, illetve az enzimet szekretáló egyedek térbeli izolációja a csalóktól (Smith és Schuster, 2019; Lerch és mtsai., 2022). A biopolimerek extracelluláris lebontása általában visszacsatolós gátlás és visszacsatolós represszió által szabályozott (Glass és mtsai., 2013; Wang és Lu, 2016). E negatív visszacsatolós mechanizmusoknak, a felszabadult molekulák gyors felhasználása mellett fontos szerepe lehet a fakultatív csalók korlátozásában, hiszen megakadályozza a közjavak gyors felhalmozódását

5.2.3.1 A laktóz regulátor szerepe a fakultatív csalás korlátozásában

Bár a laktóz szabad formában igen ritkán fordul elő a természetben (általában csak az emlősök tejében), mégis mind a β -galaktozid kötés (pl. xiloglükánokban, ramnogalakturonánokban, arabinogalaktán-fehérjékben), mind az α -galaktozid kötés (pl. galaktomannánokban, galakto-glükomannánokban, extenzinokban) gyakran megtalálható a növényi sejt fal-poliszacharidokban (Held és mtsai., 2015). A galaktóz szintén részét képezi a gombasejt fal galaktomannán (galaktofurán oldalláncok) és galaktózaminogalaktán (α -1-4-galaktozid és N-acetil-galaktózamin oldalláncok) összetevőinek is (Garcia-Rubio és mtsai., 2019). Nem meglepő módon az *A. nidulans* genomja, sok más gombához hasonlóan, számos α - és β -galaktozidáz, valamint néhány galaktanáz gént is (AspGD; **8.** és **9. táblázat**) tartalmaz, amelyek ezen poliszacharidok, illetve az azok lebontása során felszabaduló oligo- és diszacharidok hidrolizálására szolgálnak.

A laktózos tenyészeteket a laktóz hasznosításában közvetlenül részt vevő gének, mint a *lacD* β -galaktozidáz, *lacpA* és *lacpB* laktózpermeázok (Fekete és mtsai., 2012, 2016), valamint a D-galaktóz oxidoreduktív útvonal (Kowalczyk és mtsai., 2015) aktív transzkripciója jellemezte. Ezek mellett csak 81 CAZyme gén szabályozódott felül

laktózra, amelyekből egy gén kivételével mindegyik aktív volt arabinogalaktánon és szénéhezés alatt is (**7-9. táblázat**). A laktóz továbbá kevesebb extracelluláris peptidáz és gombasejtfal-hidroláz gén indukcióját eredményezte a másik két szénstresszhez képest. Érdekes módon a *lacD*-től eltérő β -galaktozidáz gének is felülszabályozódtak, sőt, több α -galaktozidáz gén is indukálódott (**7-9. táblázat**). A kódolt enzimek közül a LacA leginkább a laktóz hidrolíziséről ismert, de bizonyos oligoszacharidok terminális β -1,3- és β -1,4-galaktofuranozil oldalláncait is hasítja (Dragosits és mtsai., 2014). A *lacD*-vel ellentétben a *lacA* gén kódjában egy N-terminális szignál-peptid szekvencia is található, ami az enzim extracelluláris termelődésére utal (AspGD). Azonban a felülszabályozott galaktozidáz gének többsége alapvetően a laktóztól eltérő galaktóz-tartalmú vegyületek hasznosításában vesz részt. A galaktóz-tartalmú polimerek lebontásában szerepet játszó gének (xiloglükán- és ramnogalakturonán-lebontó gének, valamint galaktanáz, arabinofuranozidáz és endo-arabinozidáz gének) közül kevesebb aktiválódott laktózon, mint a többi kezelésnél (**8. és 9. táblázat**). A galaktózt nem tartalmazó vegyületek lebontásával kapcsolatos felülszabályozott gének (β -1,4-endoglükánáz, β -glükozidáz, cellobiosidáz és cellobióz-dehidrogenáz gének) közül 11 volt laktózon, azaz több, mint a szénéhező tenyészeteknél (8 gén) és kevesebb, mint az arabinogalaktános kultúráknál (19 gén) (**8. és 9. táblázat**). Ezek a változások együttesen azt sugallják, hogy a nagy laktózkoncentráció egy olyan szituációt imitálhatott a gomba számára, mintha a környezetben galaktóz-tartalmú poliszacharidok lettek volna jelen, amelyek lebontása olyan hatékony volt, hogy a galaktóz-tartalmú oligomerek elkezdtek felhalmozódni sejten kívül. Ebben a helyzetben már csökken a jelentősége az alternatív tápanyagok keresésének, valamint az esetlegesen együttesen előforduló poliszacharidok lebontásához szükséges gének felülszabályozásának, az autofágia aktiválásának, vagy pl. az autolitikus sejtfaldegradáció fenntartásának. Ugyanakkor, a sejteknek egy optimális (nem túl magas) szinten kell tartaniuk a mikrobiális közjavak mennyiségét, hogy megakadályozzák a fakultatív csapók elszaporodását. Épp ezért a potenciális közjavak megteremtésének és hasznosításának ütemét egyensúlyban kell tartani. Ez génexpressziós szinten egy olyan CAZyme-profilt eredményezett laktózon, ahol több érzékelt/előrejelzett poliszacharid lebontásában részt vevő CAZyme-gén szabályozódik felül, mint szénéhezés során, de kevesebb, mint az arabinogalaktán jelenlétében (**8. és 9. táblázat**).

Igen nagy a valószínűsége, hogy a laktóz hatása szorosan összefügg annak koncentrációjától, és hogy a molekula kettős szabályozóként működik. Alacsony szinten felülszabályozhatja a galaktóztartalmú, illetve a vele együttesen előforduló

poliszacharidok lebontásában részt vevő géneket, hogy fokozza azok hasznosítását, mint ahogyan azt már más fajoknál is megállapították (Morikawa és mtsai., 1995; Fang és mtsai., 2008). Emellett pedig nagy koncentrációban vissza- (alul-)szabályozhatja őket, hogy optimalizálja az oligomer-koncentrációt a környezetben. Hasonló viselkedést találtak a xilózzal kapcsolatban is, amely felülszabályozhat (kis koncentrációban) vagy alulszabályozhat (nagy koncentrációban) számos xilanolitikus és cellulolitikus gént *A. niger*-ben (de Vries és mtsai., 1999). Ezen túlmenően, a cellulolitikus enzimtermelésnek ugyanezt a kettős szabályozottságát figyelték meg *A. terreus*-ban xilóz, cellobióz, sőt még glükóz esetén is (Ali és Sayed, 1992). Hasonló jelenséget tapasztaltak az *S. cerevisiae* invertáz-termelését szabályozó *suc2* gén alacsony koncentrációjú glükózzal történő aktiválása, illetve magas glükóz-szint melletti repressziója kapcsán (Ozcan és mtsai., 1997).

5.2.3.2. Az *A. nidulans*, mint fakultatív csalo

Habár a szabad glükóz nem számít olyan ritka molekulának a környezetben, mint a laktóz, jelenléte közel sem nevezhető bőségesnek a talajban, illetve az *Aspergillus* fajok legtöbb természetes élőhelyén. Az elérhető glükóz javarészt különféle α - és β -glükánok monomerjeként fordul elő. Ami a növényi sejtfalat illeti, a cellulóz, a vegyes kötésű glükán, a xiloglükán és a glükomannán a leggyakoribb glükóz-tartalmú vegyületek (Held és mtsai., 2015), míg a gombák sejtfalában a β -1,3- és α -1,3-glükánok rendelkeznek a legjelentősebb glükóz-tartalommal (de Groot és mtsai., 2009).

Esetünkben a glükózban gazdag körülmények felülszabályozták a glikolízis géneit, míg az autofágiáért és az autolitikus sejtfaldegradációért felelős gének alulszabályozódtak a szénstressznek kitett tenyészetek profiljához képest. Az extracelluláris peptidáz gének, valamint a CAZyme gének szintén kis transzkripciós aktivitást mutattak (**8. és 9. táblázat**). Érdekes módon néhány CAZyme gén glükózon érte el a legnagyobb transzkripciós aktivitást: Összesen 29 gén volt szignifikánsan aktívabb ezekben a kultúrákban, mint a szénstressz kezeléseknél (**9 és 10. melléklet**), melyek közt az *agdB* (α -glükozidáz; Kato és mtsai., 2002), *bglJ* (β -glükozidáz; Coutinho és mtsai., 2009), *xgcA* (xiloglükánobiohidroláz; Bauer és mtsai. 2005), valamint négy feltételezett β -1,4-endoglükánáz gén (AN1041, AN6786, AN7891 és AN8068) is szerepelt. Ezek a gének a glükóz-polimerek lebontásában részt vevő (vagy

feltételezhetően részt vevő) enzimeket kódolnak. Fontos megjegyezni, hogy a glükózos tenyészetek fermentlevéből kimutatható volt egy alacsony szintű celluláz-aktivitás, de β -glükozidáz-aktivitás nem (6. táblázat). Korábban már 2,5 g l⁻¹glükóz koncentráció mellett is sikerült detektálni mind az endoglükánáz, mind a β -glükozidáz gének indukcióját *A. terreus* esetében (Ali és Sayed, 1992), és β -glükozidáz szekréción is mérték glükózon különböző *Aspergillus* fajoknál (Jäger és mtsai., 2001; Szilágyi és mtsai., 2013). A glükózos tenyészetek korábban említett jellemzői (pl. a β -glükán lebontásában részt vevő számos felülszabályozott glükóz-specifikus gén) hasonlítanak a laktóz esetében megfigyeltékhez. Elképzelhető, hogy a nagy glükóz-koncentráció is azt a szituációt imitálja az *A. nidulans* számára, mintha egy poliszacharid lenne a környezetében, amely olyan hatékonyan bomlik, hogy a monomerjei felhalmozódtak a sejten kívül. Emiatt a sejtek elkezdték fokozni a glükóz-hasznosításukat, illetve gátolni a glükóz-monomerek felszabadulását, valamint alulszabályozták az alternatív tápanyagok keresésére vagy a glükánoktól eltérő, poliszacharidok lebontására irányuló folyamatokat, továbbá represszáldott az autofágia és az autolitikus sejtfaledbontás is. Az extracelluláris enzimek (pl. peptidázok vagy növényi és gombasejtfal-hidrolázok) génjeinek alacsony transzkripciós aktivitása a laktózhhoz képest glükózon viszont szembetűnőbb volt, ami arra utal, hogy a fakultatív család előnyösebb taktikának bizonyul glükózon, mint laktózon. Ez azzal lehet összefüggésben, hogy a sejtek sokkal gyorsabban képesek hasznosítani a glükózt, mint a laktózt. A glükóz, mint „közjószág” kimerülésének megakadályozásához nagyon intenzív glükán-lebontásra lenne szükség, és az ehhez szükséges nagy enzimaktivitás elérése jelentős energiaköltséget vonzana maga után, ami nem kedvez a kooperációnak. Ez a stratégia azonban könnyen a fakultatív család elterjedéséhez vezethet, ami a „közlegelők tragédiáját” eredményezheti. A fakultatív családok számára jó taktika a gyors vegetatív növekedésbe való befektetés. A növekedés, mint autokatalitikus folyamat, önmagában is nagy mennyiségű glükózt használ el energia- és szénforrásként, emellett az újonnan képződő sejtek is glükózt fognak hasznosítani a további növekedésükhöz. Következésképpen a gyors növekedés lehetővé teszi azt, hogy a sejtek és utódsejtjeik többet használjanak fel a közjavakból, mint más, lassabban növekedő sejtek. Nem meglepő módon a glükóz hasznosításával és a vegetatív növekedéssel kapcsolatos gének, köztük a glikolízis, az aerob sejtlegzés, a 2-oxokarbonsav-metabolizmus és az ergosterol bioszintézis génjei, valamint a vitaminok, kofaktorok és prosztetikus csoportok bioszintézisében részt vevő gének, illetve a nitrogén-, kén- és szelén-anyagcserében, továbbá a sejtfaled homeosztázisában részt vevő

gének csoportjai mellett az antioxidáns enzimgének csoportja dúsult fel glükóz-specifikusan a felülszabályozott gének közül (**8. és 9. táblázat; 5. melléklet**). Ez egybevág azzal a ténnyel, hogy az aerob glükóz-hasznosítás reaktív oxigénformák (ROS) képződéséhez vezet, valamint alátámasztja azt az elképzelést, hogy az aerob anyagcserén alapuló gyors növekedés veszélyes lehet a mikrobák számára (Hallsworth 2018). Az alulszabályozott glükóz-specifikus gének száma jóval meghaladta a felülszabályozott gének számát (**17B. ábra**). Közülük legnagyobb arányban az extracelluláris peptidáz és CAZyme gének (a β -1,4-endoglükánáz géneken kívül) represszálódtak (**8. táblázat**). Ezen túlmenően a legnagyobb számú alulszabályozott szekunder metabolit génklaszterek csoportja is a glükózos tenyészetek génexpressziós profiljában volt megfigyelhető. A transzkripciós faktor gének alulszabályozott expressziója (**19B. ábra, 8. táblázat**) – attól függetlenül, hogy némelyik negatív szabályozóelemet kódol – önmagában is arra utal, hogy számos szénstressz alatt aktív folyamat represszálódott glükózon. Összességében tehát elmondható, hogy a sejtek nemcsak a glükóz hasznosítását igyekeztek fokozni, hanem számos olyan „felesleges” biológiai folyamatot is alulszabályoztak (beleértve számos szekunder metabolit termelését), amelyek egyébként csökkentenék a növekedési rátájukat, ezáltal pedig a mikrobiális közjavak gyors hasznosítását is.

Az általunk vizsgált négy tenyészet közül a glükózban gazdag kultúrákban jelentkezett a legtöbb olyan gén, amely a kísérleti körülmények között a legnagyobb vagy a legkisebb transzkripciós aktivitást érte el (**17B. ábra**). Ezt azért kell kiemelni, mert amikor összehasonlítunk két génexpressziós profilt, a kapott különbség szükségszerűen függ mindkét transzkriptomtól. Egy korábbi kísérletsorozatban már felvetettük, hogy a transzkripciós szinten detektált stresszválaszok egyformán árulkodnak arról, hogy a sejtek miként adaptálódtak a (stressz)kezelés előtti körülményekhez, és hogyan próbálnak meg alkalmazkodni az új feltételekhez (Antal és mtsai., 2020). Ez akkor is igaz, ha egynél több kezelés következményeit hasonlítjuk össze. Azaz, a minden kezelésre felül- és alulszabályozott génkészlet (a központi stresszválasz gének) mérete és összetétele nagymértékben függ a kiválasztott referencia tenyésztől. Ha a vizsgálat során, a glükózos kultúrákat választjuk „stresszmentes” referenciának, akkor nagy központi stresszválasz génhalmazt kapunk (**17. ábra**). Az átfedő (együtt-)szabályozott gének nagy száma arra utal, hogy a szénforrás-limitációra és az éhezésre adott stresszválaszok hasonlóak. Ugyanakkor ez azt is jelenti, hogy a glükózon való növekedés meglehetősen eltért a többi kezeléstől. Másrészt, ha referenciának inkább a szénéhező tenyészeteket választanánk, akkor a „szénforrás-indukált stresszválaszok” közötti különbség sokkal

kisebbsébe, és a központi stresszválasz elemek profilja is nagyon eltérő lenne. A transzkriptomikai vizsgálatok során a megfelelő referenciaállapot megválasztása az első és legfontosabb lépés, ami mindig a megválaszolandó kérdés(ek)től függ. Az *Aspergillus* fajok esetében a glükóz kultúrák referenciaként való alkalmazása általában kényelmes választás, de nem a legjobb abban az esetben, ha meg akarjuk érteni, hogyan reagálnak a különböző kezelésekre természetes élőhelyükön vagy az emberi szervezetben (Kurucz és mtsai., 2018; Brown és mtsai., 2019). Ezzel szemben a *Saccharomyces* fajok szacharózban gazdag életterében, ahol a nagy periplazmatikus invertáz-aktivitás miatt gyakori a glükóz, mint elsődleges tápanyag (Ozcan és mtsai., 1997), a glükózra adott stresszválaszok tanulmányozása nemcsak praktikus választás az intenzív növekedés miatt, hanem ésszerű is.

5.2.4. A CAZyme-szekréció szabályozásának jelentősége

Az *A. nidulans*, mint tipikus talajlakó fonalas gomba, általában bomló növényi maradványokon növekszik. A növényi biopolimerek hatékony lebontásához szükséges több száz CAZyme, illetve egyéb más gén szabályozása nagyon komplex folyamat, amiben a polimerek hasznosítása során keletkező „szabályozó molekulák” központi szerepet töltenek be (Culleton és mtsai., 2013; Glass és mtsai., 2013; Znameroski és Glass, 2013; Wang és Lu, 2016). Részt vesznek a jelenlévő vegyületek felismerésében (lásd: szénéhezés alatti „enzimatikus felderítés”), kereszt-irányú felülszabályozást válthatnak ki (lásd: „a rendelkezésre álló biopolimerek adaptív előrejelzése” arabinogalaktán jelenléte alapján), illetve nagy koncentrációban represszálhatnak is olyan géneket, amelyek fontosak lehetnek a fakultatív csalás korlátozásában (lásd: laktóz-hasznosítás), vagy akár a fakultatív csalás stratégiájára való átkapcsoláshoz is vezethetnek (lásd: glükózon való gyors növekedés). E bonyolult szabályozási hálózat molekuláris és viselkedéskölögi aspektusainak részletes vizsgálata a jövőben hozzásegíthet minket a gombák CAZyme-szekréciójának alaposabb megértésében, ami javíthatja ipari alkalmazhatóságukat. Az egyes CAZyme gének közös szabályozottságainak szisztematikus azonosítása például felhívhatja a figyelmet olyan kevésbé vizsgált hidrolázokra, amelyek az iparban „járulékos enzimeként” fokozhatnák a növényi sejtfa-poliszacharidok hasznosítását. A poliszacharidok lebontására vonatkozó adaptív előrejelzésen alapuló gombastratégia tanulmányozása új molekuláris

szabályozóelemek felfedezéséhez vezethet. Ezen regulátor molekulák kettős (felül-/alulszabályozó) jellegének megértése pedig elősegítheti a CAZyme-gyártás új, akár költséghatékonyabb fermentációs technikáinak kifejlesztését is.

A CAZyme gének transzkripciós szabályozása jó példa arra, hogy a sejtek kezdetben miként képesek felismerni a stresszt (változást), de még nem „tudják”, hogyan is alkalmazkodjanak hozzá. Ezért első lépésben egy „felderítő választ” adnak, majd az összegyűjtött információ alapján további lépéseket tesznek a megfelelő irányba. Ésszerű feltételezni, hogy a szénforrás-limitációs stresszválaszok mellett más stresszválaszok során is lehetnek olyan „felderítő elemek”, amelyek a megfelelő irányba terelik az adott válaszreakciót. Ez megmagyarázná a gombák azon képességét, hogy miként is alkalmazkodhatnak ilyen sikeresen a különféle (akár erősen manipulált) környezeti tényezőkhöz, még módosított genetikai háttérrel is.

6. Összefoglalás

Kísérleteink középpontjában az *Aspergillus nidulans* fonalas gomba modell szénstressznek kitett tenyészetének RNS-szekvenálással gyűjtött transzkriptom-adatai feldolgozása és értelmezése állt. Ez a megközelítési mód lehetővé tette számunkra, hogy a GSH anyagcserét, a szekunder-metabolitok és CAZyme fehérjék képződését a szénstressz-válasz részeként értelmezzük egy-egy enzim vagy metabolit vizsgálatához képest átfogóbb módon.

Korábban az *A. nidulans* esetében az ún. DUG („deficient in utilization of glutathione”) GSH-lebontó útvonal feltételezett fehérjéinek (DugA, DugB és DugC) funkciója még nem volt tisztázott. Azonban a GSH-metabolizmus megismerése és megértése létfontosságú a mikroorganizmusok redox-szabályozásának megfejtéséhez, valamint gyakorlati szempontból is indokolt, hiszen a gombák nem csak a természetben, hanem ipari alkalmazás során is találkozhatnak olyan körülményekkel (pl. szénstressz), amelyek serkentő hatással lehetnek a nem kívánatos szekunder metabolit-termelésre (mikotoxinok), mely anyagok képződésének visszaszorítására az antioxidáns-kezelést egy ígéretes lehetőségnek tartják. Mindezért kísérleteink első felében a *dugB* és *dugC* gének funkcióit vizsgáltuk *A. nidulans*-ban. A *dugB*, *dugC*, vagy azok kettős deléciója a glükózon növekedő micéliumok GSH-tartalmának mérsékelt növekedését, csökkent konídiumtermelést és zavart ivaros fejlődést eredményezett. A transzkriptom adatok kimutatták, hogy a megfigyelésekkel összhangban alulszabályozódtak egyes a differenciációban is fontos MAPK-útvonal gének (pl. *steC*, *sskB* és *hogA*), illetve a konídiumképződést és a szexuális differenciálódást szabályozó fehérjéket (pl. FlbA, NosA, RosA és NsdC) kódoló gének a Δ *dugB*- Δ *dugC* mutánsban. A *dugB* és/vagy a *dugC* deléciója lassította a GSH-raktárak kimerülését szénéhezés során, emellett csökkentette a ROS-felhalmozódást, az autolitikus sejtfaldegradációt és az enzimszekréción, de megnövelte az STC-termelést. Transzkriptomikai vizsgálataink alapján feltételezhető, hogy a gomba enzimszekrécióna a mikotoxintermeléssel ellentétben poszttranszkripciós szinten szabályozódik. Továbbá azt is megállapítottuk, hogy a GSH alighanem összeköti az éhezést és a redox-szabályozást, hiszen a sejtek a GSH-t raktározott szénforrásként is hasznosítják, ez a GSH-tartalom csökkenése révén redox-egyensúlyvesztést eredményez, ami aktiválhatja a szénstressz válaszáért felelős jelátviteli útvonalakat.

A gombák genomjában előforduló több száz CAZyme gén összehangolt szabályozásának megismerése szintén nagy gyakorlati jelentőséggel bír. Ezért

kísérleteink második felében négy *A. nidulans* kultúra viselkedését hasonlítottuk össze, amelyeket glükóz, laktóz, vagy arabinogalaktán jelenlétében, illetve szénéhező körülmények között tenyésztettünk. Meghatároztuk a szénstressz-specifikus változásokat (gyenge szénforrás vagy annak hiánya vs. glükóz), és a szénforrás-specifikus változásokat (egyfajta kultúra vs. az összes többi kultúra). Mivel a sejtek szekunder-anyagcseréjét nagymértékben meghatározza a rendelkezésre álló szénforrás minősége és mennyisége, a szekunder-metabolit génklaszterek transzkripciós aktivitását is értékeltük. Számos CAZyme gén mutatott szénstressz-specifikus és/vagy szénforrás-specifikus felülszabályozódást arabinogalaktánon (138 és 62 gén), ahol galaktozidáz és arabinánbontó enzimgének mellett cellulolitikus, pektinolitikus, mannán- és xilánbontó enzimgének transzkripciós aktivitása volt jellemző. Laktózra 81 és 6 (galaktozidázok, xilozidázok és ramnogalakturonázok), szénéhezésre 107 és 16 (ramnogalakturonázok) szénstressz-specifikus, valamint szénforrás-specifikus felülszabályozott CAZyme gént találtunk. Glükózon csak néhány (29 gén) szénforrás-specifikus indukciót mutattunk ki, amelyek jellemzően β -1,4-glükanáz gének voltak. Mind a négy kultúrában volt egy-egy jellegzetes szekunder-metabolit génklaszter, amely a legnagyobb transzkripciós aktivitást mutatta az adott tenyészetnél, de a differenciáltan expresszált klaszterek összességében hasonló mintázatot mutattak. A dolgozatban ezen jellemzők viselkedésökológiai hátterét is értékeltük felhasználva az „enzimatikus felderítés” (secretion of scouting enzymes)”, „adaptív előrejelzés” (adaptive prediction), a „közlegelők tragédiája” (tragedy of the commons) és a „fakultatív csalók” (facultative cheating) modelleket, illetve rendszereztük a CAZyme-termeléssel kapcsolatos ismereteinket, amelyek új stratégiák kidolgozásához vezethetnek a növényi anyagok szacharifikációjához szükséges enzimek előállítására.

6.1. Summary

Our experiments focused on the processing and interpretation of transcriptome data collected by RNA sequencing of the model filamentous fungus *Aspergillus nidulans* cultures exposed to carbon stress. This approach allowed us to interpret GSH metabolism, formation of secondary metabolites and CAZyme proteins as part of the carbon-stress-response in a more comprehensive way than the study of a single enzyme or metabolite.

Previously, the function of the putative proteins (DugA, DugB and DugC) of the DUG ("deficient in utilization of glutathione") pathway in *A. nidulans* was not yet clear.

However, understanding GSH metabolism is crucial for deciphering the redox regulation of microorganisms. This knowledge is also of practical relevance, as fungi frequently encounter environmental and industrial conditions (e.g., carbon stress) that can induce the production of undesirable secondary metabolites such as mycotoxins. Antioxidant-based interventions represent a promising strategy to mitigate their formation. Therefore, in the first half of our experiments, we investigated the functions of *dugB* and *dugC* genes in *A. nidulans*. Deletion of *dugB*, *dugC*, or both resulted in a moderate increase in GSH content of mycelia growing on glucose, reduced conidial production and impaired sexual development. Transcriptome data showed that genes encoding certain MAPK pathway elements (e.g., SteC, SskB and HogA) or proteins regulating conidia formation and sexual differentiation (e.g., FlbA, NosA, RosA and NsdC) were down-regulated in the Δ *dugB*- Δ *dugC* mutant, consistent with observations. Deletion of *dugB* and/or *dugC* slowed the depletion of GSH pools during carbon starvation, reduced accumulation of ROS, autolytic cell wall degradation and enzyme secretion, while simultaneously increasing STC production. Our transcriptomic results obtain that enzyme secretion by the fungus is regulated at the post-transcriptional level in contrast to mycotoxin production. Furthermore, our results suggest that GSH serves as a molecular link between starvation responses and redox regulation, as cells exploit GSH as a stored carbon source. A decline in GSH levels leads to redox imbalance, which in turn activates signaling pathways associated with carbon starvation stress responses.

Understanding the coordinated regulation of the extensive repertoire of CAZyme genes within the fungal genome is also have a great practical importance. Therefore, in the second phase of our study, we compared the behaviour of four *A. nidulans* cultures grown in the presence of glucose, lactose, or arabinogalactan and under carbon starvation conditions. We determined carbon stress-specific changes (weak or no carbon source *vs.* glucose) and carbon source-specific changes (one type of culture *vs.* all other cultures). Since secondary metabolism is largely influenced by the quality and availability of carbon sources, the transcriptional activity of secondary metabolite gene clusters was also assessed. Several CAZyme genes showed carbon stress-specific and/or carbon source-specific up-regulation on arabinogalactan (138 and 62 genes, respectively), where in addition to galactosidase and arabinan-degrading enzyme genes, transcriptional activity of cellulolytic, pectinolytic, mannan- and xylan-degrading enzyme genes was observed. For lactose, 81 and 6 (galactosidases, xylosidases and rhamnogalacturonases) and for coal starvation 107 and 16 (rhamnogalacturonases) carbon stress-specific and carbon source-

specific up-regulated CAZyme genes were found. On glucose, only a few genes (29) shown carbon source-specific induction, which were typically β -1,4-glucanase genes. Each of the four cultures was associated a distinct secondary metabolite gene cluster that showed the highest transcriptional activity in that culture, although the differentially expressed clusters showed an overall similar pattern. In this thesis, we have also evaluated the behavioural ecology background of these traits ("secretion of scouting enzymes" and "adaptive prediction"), and organized current knowledge on CAZyme production, which may facilitate to the development of novel strategies for optimizing enzyme production for the saccharification of plant materials.

8. Tézisek

1. A DUG-útvonal részt vesz a citoszolikus GSH lebontásában az *Aspergillus nidulans* fonalas gombában.
2. A DUG-útvonal nem az egyetlen GSH-lebontó útvonal az *A. nidulans*ban; szénéhezés alatt a GSH koncentráció csökkenése az inaktív DUG útvonallal rendelkező törzsekben sem szűnik meg teljesen.
3. A GSH-anyagcsere összeköti a gomba szénéhezésre adott stresszválaszát és redox-szabályozását: A GSH szén/energiaforrásként hasznosítható szénéhezés alatt, koncentrációjának csökkenése azonban megváltoztatja a sejtek redox egyensúlyát.
4. A mérsékelt oxidatív stressz serkentheti, míg az erős oxidatív stressz inkább gátolja egyes szekunder-metabolit génklaszterek működését. (A mikotoxintermelés visszaszorítását célzó antioxidáns-kezelések paradox módon akár felül is szabályozhatnak egyes SMG-génklasztereket fokozva a nemkívánatos mikotoxin termelését.)
5. Az endoplazmikus retikulum (ER) működése nagy jelentőséggel bír a szénstressznek kitett tenyészetek életében. Ez felveti gomba ER-aktivitásának megzavarásán alapuló antifungális stratégiák lehetőségét.
6. A mikrobiális ökológiai megközelítés segíthet jobban megérteni az extracelluláris poliszacharidok lebontásában résztvevő enzimek képződését, ami új molekuláris szabályozóelemek felfedezéséhez vezethet el.
7. A CAZyme gének transzkripciós mintázatai magyarázhatóak az „enzimatis felderítés” (szénéhezés alatt), az „adaptív előrejelzés” (arabinogalaktánon), valamint „a közlegelők tragédiája” és a „fakultatív csalók visszaszorítása” (laktózon és glükózon) ökológiai modellek segítségével.

9. Irodalomjegyzék

- Adnan, M., Zheng, W., Islam, W., Arif, M., Abubakar, Y. S., Wang, Z., és mtsai. (2018). Carbon Catabolite Repression in Filamentous Fungi. *International Journal of Molecular Sciences* 19, 48. doi: 10.3390/ijms19010048.
- Aguirre, J., Ríos-Momberg, M., Hewitt, D., és Hansberg, W. (2005). Reactive oxygen species and development in microbial eukaryotes. *Trends in Microbiology* 13, 111–118. doi: 10.1016/j.tim.2005.01.007.
- Alcazar-Fuoli, L., és Mellado, E. (2013). Ergosterol biosynthesis in *Aspergillus fumigatus*: its relevance as an antifungal target and role in antifungal drug resistance. *Frontiers in Microbiology* 3, 439. doi: 10.3389/fmicb.2012.00439.
- Ali, S., és Sayed, A. (1992). Regulation of the cellulase biosynthesis in *Aspergillus terreus*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 8, 73–75. doi: 10.1007/BF01200691.
- Ámon, J., Keisham, K., Bokor, E., Kelemen, E., Vágvölgyi, C., és Hamari, Z. (2018). Sterigmatocystin production is restricted to hyphae located in the proximity of hülle cells. *Journal of Basic Microbiology* 58, 590–596. doi: 10.1002/jobm.201800020.
- Anderson, M. E. (1985). „Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples”, in *Methods in Enzymology* Glutamate, Glutamine, Glutathione, and Related Compounds. (Academic Press), 548–555. doi: 10.1016/S0076-6879(85)13073-9.
- André, I., Potocki-Véronèse, G., Barbe, S., Moulis, C., és Remaud-Siméon, M. (2014). CAZyme discovery and design for sweet dreams. *Current Opinion in Chemical Biology* 19, 17–24. doi: 10.1016/j.cbpa.2013.11.014.
- Andrews, S. (2010). FastQC: A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data. Available at: <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/> [Elérés március 9, 2022].
- Antal, K., Gila, B. C., Pócsi, I., és Emri, T. (2020). General stress response or adaptation to rapid growth in *Aspergillus nidulans*? *Fungal Biology* 124, 376–386. doi: 10.1016/j.funbio.2019.10.009.
- Armenteros, J. J. A., Tsirigos, K. D., Sønderby, C. K., Petersen, T. N., Winther, O., Brunak, S., és mtsai. (2019). SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks. *Nature Biotechnology* 37, 420–423. doi: 10.1038/s41587-019-0036-z.
- Ask, M., Bettiga, M., Mapelli, V., és Olsson, L. (2013). The influence of HMF and furfural on redox-balance and energy-state of xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology for Biofuels* 6, 22. doi: 10.1186/1754-6834-6-22.
- Atoui, A., Bao, D., Kaur, N., Grayburn, W. S., és Calvo, A. M. (2008). *Aspergillus nidulans* Natural Product Biosynthesis Is Regulated by MpkB, a Putative Pheromone Response Mitogen-Activated Protein Kinase. *Applied and Environmental Microbiology* 74, 3596–3600. doi: 10.1128/AEM.02842-07.
- Bachhawat, A. K., és Kaur, A. (2017). Glutathione Degradation. *Antioxidants & Redox Signaling* 27, 1200–1216. doi: 10.1089/ars.2017.7136.

- Bahut, F., Romanet, R., Sieczkowski, N., Schmitt-Kopplin, P., Nikolantonaki, M., és Gougeon, R. D. (2020). Antioxidant activity from inactivated yeast: Expanding knowledge beyond the glutathione-related oxidative stability of wine. *Food Chemistry* 325, 126941. doi: 10.1016/j.foodchem.2020.126941.
- Bakti, F., Király, A., Orosz, E., Miskei, M., Emri, T., Leiter, É., és mtsai. (2017). Study on the glutathione metabolism of the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* 64, 255–272. doi: 10.1556/030.64.2017.003.
- Ballatori, N., Krance, S. M., Notenboom, S., Shi, S., Tieu, K., és Hammond, C. L. (2009). Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases. *Biological Chemistry* 390, 191–214. doi: 10.1515/BC.2009.033.
- Baltussen, T. J. H., Zoll, J., Verweij, P. E., és Melchers, W. J. G. (2019). Molecular Mechanisms of Conidial Germination in *Aspergillus* spp. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 84, e00049-19. doi: 10.1128/MMBR.00049-19.
- Bandi, C. K., Agrawal, A., és Chundawat, S. P. (2020). Carbohydrate-Active enZyme (CAZyme) enabled glycoengineering for a sweeter future. *Current Opinion in Biotechnology* 66, 283–291. doi: 10.1016/j.copbio.2020.09.006.
- Barratt, R. W., Johnson, G. B., és Ogata, W. N. (1965). Wild-type and mutant stocks of *Aspergillus nidulans*. *Genetics* 52, 233–246. doi: 10.1093/genetics/52.1.233.
- Bartoszewska, M., és Kiel, J. A. K. W. (2011). The role of macroautophagy in development of filamentous fungi. *Antioxidants & Redox Signaling* 14, 2271–2287. doi: 10.1089/ars.2010.3528.
- Bayram, Ö., és Braus, G. H. (2012). Coordination of secondary metabolism and development in fungi: the velvet family of regulatory proteins. *FEMS Microbiology Reviews* 36, 1–24. doi: 10.1111/j.1574-6976.2011.00285.x.
- Bernardeschi, C., Foulet, F., Ingen-Housz-Oro, S., Ortonne, N., Sitbon, K., Quereux, G., és mtsai. (2015). Cutaneous Invasive Aspergillosis: Retrospective Multicenter Study of the French Invasive-Aspergillosis Registry and Literature Review. *Medicine (Baltimore)* 94, e1018. doi: 10.1097/MD.0000000000001018.
- Blomme, E., Piero, F. D., Perle, K. M. D. L., és Wilkins, P. A. (1998). Aspergillosis in horses: a review. *Equine Veterinary Education* 10, 86–93. doi: 10.1111/j.2042-3292.1998.tb00856.x.
- Boronat, S., Domènech, A., Paulo, E., Calvo, I. A., García-Santamarina, S., García, P., és mtsai. (2014). Thiol-based H₂O₂ signalling in microbial systems. *Redox Biology* 2, 395–399. doi: 10.1016/j.redox.2014.01.015.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248–254. doi: 10.1006/abio.1976.9999.
- Brakhage, A. A. (2013). Regulation of fungal secondary metabolism. *Nature Reviews Microbiology* 11, 21–32. doi: 10.1038/nrmicro2916.
- Brockhurst, M. A., Habets, M. G. J. L., Libberton, B., Buckling, A., és Gardner, A. (2010). Ecological drivers of the evolution of public-goods cooperation in bacteria. *Ecology* 91, 334–340. doi: 10.1890/09-0293.1.

- Brown, A. J. P., Gow, N. A. R., Warris, A., és Brown, G. D. (2019). Memory in fungal pathogens promotes immune evasion, colonisation, and infection. *Trends Microbiol* 27, 219–230. doi: 10.1016/j.tim.2018.11.001.
- Brown, N. A., és Goldman, G. H. (2016). The contribution of *Aspergillus fumigatus* stress responses to virulence and antifungal resistance. *J Microbiol* 54, 243–253. doi: 10.1007/s12275-016-5510-4.
- Bruinenberg, P. M., van Dijken, J. P., és Scheffers, W. A. (1983). An enzymic analysis of NADPH production and consumption in *Candida utilis*. *The Journal of General Microbiology* 129, 965–971. doi: 10.1099/00221287-129-4-965.
- Bugeda, A., Garrigues, S., Gandía, M., Manzanares, P., Marcos, J. F., és Coca, M. (2020). The Antifungal Protein AfpB Induces Regulated Cell Death in Its Parental Fungus *Penicillium digitatum*. *mSphere* 5, e00595-20. doi: 10.1128/mSphere.00595-20.
- Caesar, L. K., Kelleher, N. L., és Keller, N. P. (2020). In the fungus where it happens: History and future propelling *Aspergillus nidulans* as the archetype of natural products research. *Fungal Genetics and Biology* 144, 103477. doi: 10.1016/j.fgb.2020.103477.
- Cano-Domínguez, N., Álvarez-Delfín, K., Hansberg, W., és Aguirre, J. (2008). NADPH Oxidases NOX-1 and NOX-2 Require the Regulatory Subunit NOR-1 To Control Cell Differentiation and Growth in *Neurospora crassa*. *Eukaryotic Cell* 7, 1352–1361. doi: 10.1128/EC.00137-08.
- Čapek, J., és Roušar, T. (2021). Detection of Oxidative Stress Induced by Nanomaterials in Cells—The Roles of Reactive Oxygen Species and Glutathione. *Molecules* 26, 4710. doi: 10.3390/molecules26164710.
- Chang, P.-K., Cary, J. W., és Lebar, M. D. (2020). Biosynthesis of conidial and sclerotial pigments in *Aspergillus* species. *Applied Microbiology and Biotechnology* 104, 2277–2286. doi: 10.1007/s00253-020-10347-y.
- Chemudupati, M., Johns, M., és Osmani, S. A. (2019). The mode of mitosis is dramatically modified by deletion of a single nuclear pore complex gene in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genetics and Biology* 130, 72–81. doi: 10.1016/j.fgb.2019.04.010.
- Chen, X., F. Abdallah, M., Chen, X., és Rajkovic, A. (2023). Current Knowledge of Individual and Combined Toxicities of Aflatoxin B1 and Fumonisin B1 In Vitro. *Toxins* 15, 653. doi: 10.3390/toxins15110653.
- Chettri, D., Verma, A. K., és Verma, A. K. (2020). Innovations in CAZyme gene diversity and its modification for biorefinery applications. *Biotechnology Reports (Amsterdam)* 28, e00525. doi: 10.1016/j.btre.2020.e00525.
- Chew, S. Y., Ho, K. L., Cheah, Y. K., Sandai, D., Brown, A. J. P., és Than, L. T. L. (2019). Physiologically relevant alternative carbon sources modulate biofilm formation, cell wall architecture, and the stress and antifungal resistance of *Candida glabrata*. *International Journal of Molecular Science* 20, E3172. doi: 10.3390/ijms20133172.
- Chi, M.-H., és Craven, K. D. (2016). RacA-Mediated ROS Signaling Is Required for Polarized Cell Differentiation in Conidiogenesis of *Aspergillus fumigatus*. *PLOS ONE* 11, e0149548. doi: 10.1371/journal.pone.0149548.
- Chomczynski, P. (1993). A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques* 15, 532–534, 536–537.

- Christensen, U., Gruben, B. S., Madrid, S., Mulder, H., Nikolaev, I., és de Vries, R. P. (2011). Unique regulatory mechanism for D-galactose utilization in *Aspergillus nidulans*. *Applied and Environmental Microbiology* 77, 7084–7087. doi: 10.1128/AEM.05290-11.
- Chundawat, S. P. S., Beckham, G. T., Himmel, M. E., és Dale, B. E. (2011). Deconstruction of lignocellulosic biomass to fuels and chemicals. *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering* 2, 121–145. doi: 10.1146/annurev-chembioeng-061010-114205.
- Conrado, R., Gomes, T. C., Roque, G. S. C., és De Souza, A. O. (2022). Overview of Bioactive Fungal Secondary Metabolites: Cytotoxic and Antimicrobial Compounds. *Antibiotics* 11, 1604. doi: 10.3390/antibiotics11111604.
- Contesini, F. J., Frandsen, R. J. N., és Damasio, A. (2021). Editorial: CAZymes in biorefinery: From genes to application. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 9, 86. doi: 10.3389/fbioe.2021.622817.
- Coutinho, P. M., Andersen, M. R., Kolenova, K., vanKuyk, P. A., Benoit, I., Gruben, B. S., és mtsai. (2009). Post-genomic insights into the plant polysaccharide degradation potential of *Aspergillus nidulans* and comparison to *Aspergillus niger* and *Aspergillus oryzae*. *Fungal Genetics and Biology* 46, S161–S169. doi: 10.1016/j.fgb.2008.07.020.
- Cray, J. A., Bell, A. N. W., Bhaganna, P., Mswaka, A. Y., Timson, D. J., és Hallsworth, J. E. (2013). The biology of habitat dominance; can microbes behave as weeds? *Microbial Biotechnology* 6, 453–492. doi: 10.1111/1751-7915.12027.
- Cui, X., Wan, J., Zhang, X., Wu, H., Li, Z., és Ye, Q. (2019). Efficient glutathione production in metabolically engineered *Escherichia coli* strains using constitutive promoters. *Journal of Biotechnology* 289, 39–45. doi: 10.1016/j.jbiotec.2018.11.001.
- Culleton, H., McKie, V., és de Vries, R. P. (2013). Physiological and molecular aspects of degradation of plant polysaccharides by fungi: what have we learned from *Aspergillus*? *Biotechnology Journal* 8, 884–894. doi: 10.1002/biot.201200382.
- da Silva Menezes, B., Rossi, D. M., Squina, F., és Ayub, M. A. Z. (2018). Comparative production of xylanase and the liberation of xylooligosaccharides from lignocellulosic biomass by *Aspergillus brasiliensis* BLf1 and recombinant *Aspergillus nidulans* XynC A773. *International Journal of Food Science & Technology* 53, 2110–2118. doi: 10.1111/ijfs.13798.
- David, H., Özçelik, İ. Ş., Hofmann, G., és Nielsen, J. (2008). Analysis of *Aspergillus nidulans* metabolism at the genome-scale. *BMC Genomics* 9, 163. doi: 10.1186/1471-2164-9-163.
- Davies, G. J., Gloster, T. M., és Henrissat, B. (2005). Recent structural insights into the expanding world of carbohydrate-active enzymes. *Current Opinion in Structural Biology* 15, 637–645. doi: 10.1016/j.sbi.2005.10.008.
- de Assis, L. J., Ries, L. N. A., Savoldi, M., Dos Reis, T. F., Brown, N. A., és Goldman, G. H. (2015). *Aspergillus nidulans* protein kinase A plays an important role in cellulase production. *Biotechnology for Biofuels* 8, 213. doi: 10.1186/s13068-015-0401-1.
- de Assis, L. J., Silva, L. P., Bayram, O., Dowling, P., Kniemeyer, O., Krüger, T., és mtsai. (2021). Carbon Catabolite Repression in Filamentous Fungi Is Regulated by Phosphorylation of the Transcription Factor CreA. *mBio* 12, 10.1128/mbio.03146-20. doi: 10.1128/mbio.03146-20.

- de Groot, P. W. J., Brandt, B. W., Horiuchi, H., Ram, A. F. J., de Koster, C. G., és Klis, F. M. (2009). Comprehensive genomic analysis of cell wall genes in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genetics and Biology* 46 Suppl 1, S72-81. doi: 10.1016/j.fgb.2008.07.022.
- de Vries, R. P., Riley, R., Wiebenga, A., Aguilar-Osorio, G., Amillis, S., Uchima, C. A., és mtsai. (2017). Comparative genomics reveals high biological diversity and specific adaptations in the industrially and medically important fungal genus *Aspergillus*. *Genome Biology* 18, 28. doi: 10.1186/s13059-017-1151-0.
- de Vries, R. P., Visser, J., és de Graaff, L. H. (1999). CreA modulates the XlnR-induced expression on xylose of *Aspergillus niger* genes involved in xylan degradation. *Research in Microbiology* 150, 281–285. doi: 10.1016/s0923-2508(99)80053-9.
- Delmas, S., Pullan, S. T., Gaddipati, S., Kokolski, M., Malla, S., Blythe, M. J., és mtsai. (2012). Uncovering the genome-wide transcriptional responses of the filamentous fungus *Aspergillus niger* to lignocellulose using RNA sequencing. *PLoS Genet* 8, e1002875. doi: 10.1371/journal.pgen.1002875.
- Deng, Y., Qu, Z., és Naqvi, N. I. (2012). Role of Macroautophagy in Nutrient Homeostasis During Fungal Development and Pathogenesis. *Cells* 1, 449–463. doi: 10.3390/cells1030449.
- Desai, P. R., Thakur, A., Ganguli, D., Paul, S., Morschhäuser, J., és Bachhawat, A. K. (2011). Glutathione Utilization by *Candida albicans* Requires a Functional Glutathione Degradation (DUG) Pathway and OPT7, an Unusual Member of the Oligopeptide Transporter Family. *Journal of Biological Chemistry* 286, 41183–41194. doi: 10.1074/jbc.M111.272377.
- Devi, R., Kaur, T., Guleria, G., Rana, K. L., Kour, D., Yadav, N., és mtsai. (2020). „Chapter 9 - Fungal secondary metabolites and their biotechnological applications for human health”, in *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*, szerk. A. A. Rastegari, A. N. Yadav, és N. Yadav (Elsevier), 147–161. doi: 10.1016/B978-0-12-820528-0.00010-7.
- Dimou, S., Kourkoulou, A., Amillis, S., Percudani, R., és Diallinas, G. (2019). The peroxisomal SspA protein is redundant for purine utilization but essential for peroxisome localization in septal pores in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genetics and Biology* 132, 103259. doi: 10.1016/j.fgb.2019.103259.
- Döll, K., Chatterjee, S., Scheu, S., Karlovsky, P., és Rohlf, M. (2013). Fungal metabolic plasticity and sexual development mediate induced resistance to arthropod fungivory. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 280, 20131219. doi: 10.1098/rspb.2013.1219.
- Dragosits, M., Pflügl, S., Kurz, S., Razzazi-Fazeli, E., Wilson, I. B. H., és Rendic, D. (2014). Recombinant *Aspergillus* β -galactosidases as a robust glycomic and biotechnological tool. *Applied Microbiology and Biotechnology* 98, 3553–3567. doi: 10.1007/s00253-013-5192-3.
- Drott, M. T., Bastos, R. W., Rokas, A., Ries, L. N. A., Gabaldón, T., Goldman, G. H., és mtsai. (2020). Diversity of Secondary Metabolism in *Aspergillus nidulans* Clinical Isolates. *mSphere* 5, e00156-20. doi: 10.1128/mSphere.00156-20.
- Duran, R., Cary, J. W., és Calvo, A. M. (2010). Role of the Osmotic Stress Regulatory Pathway in Morphogenesis and Secondary Metabolism in Filamentous Fungi. *Toxins* 2, 367–381. doi: 10.3390/toxins2040367.

- Dyer, P. S., és O’Gorman, C. M. (2012). Sexual development and cryptic sexuality in fungi: insights from *Aspergillus* species. *FEMS Microbiology Reviews* 36, 165–192. doi: 10.1111/j.1574-6976.2011.00308.x.
- El-Baz, A. F., El-Enshasy, H. A., Shetaia, Y. M., Mahrous, H., Othman, N. Z., és Yousef, A. E. (2018). Semi-industrial Scale Production of a New Yeast with Probiotic Traits, *Cryptococcus* sp. YMHS, Isolated from the Red Sea. *Probiotics & Antimicro. Prot.* 10, 77–88. doi: 10.1007/s12602-017-9291-9.
- El-Baz, A. F., Sorour, N. M., és Shetaia, Y. M. (2016). Trichosporon jirovecii–mediated synthesis of cadmium sulfide nanoparticles. *Journal of Basic Microbiology* 56, 520–530. doi: 10.1002/jobm.201500275.
- Ellena, V., Sauer, M., és Steiger, M. G. (2020). The fungal sexual revolution continues: discovery of sexual development in members of the genus *Aspergillus* and its consequences. *Fungal Biology and Biotechnology* 7, 17. doi: 10.1186/s40694-020-00107-y.
- Emri, T., Gila, B., Antal, K., Fekete, F., Moon, H., Yu, J.-H., és mtsai. (2021). AtfA-Independent Adaptation to the Toxic Heavy Metal Cadmium in *Aspergillus nidulans*. *Microorganisms* 9, 1433. doi: 10.3390/microorganisms9071433.
- Emri, T., Molnár, Z., és Pócsi, I. (2005a). The appearances of autolytic and apoptotic markers are concomitant but differently regulated in carbon-starving *Aspergillus nidulans* cultures. *FEMS Microbiol Lett* 251, 297–303. doi: 10.1016/j.femsle.2005.08.015.
- Emri, T., Molnár, Z., Pusztahelyi, T., és Pócsi, I. (2004). Physiological and morphological changes in autolyzing *Aspergillus nidulans* cultures. *Folia Microbiologica (Praha)* 49, 277–284. doi: 10.1007/BF02931043.
- Emri, T., Molnár, Z., Pusztahelyi, T., Varcza, Z., és Pócsi, I. (2005b). The fluG-BrlA pathway contributes to the initialisation of autolysis in submerged *Aspergillus nidulans* cultures. *Mycological Research* 109, 757–763. doi: 10.1017/s0953756205003023.
- Emri, T., Molnár, Z., Szilágyi, M., és Pócsi, I. (2008). Regulation of autolysis in *Aspergillus nidulans*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 151, 211–220. doi: 10.1007/s12010-008-8174-7.
- Emri, T., Molnár, Z., Veres, T., Pusztahelyi, T., Dudás, G., és Pócsi, I. (2006). Glucose-mediated repression of autolysis and conidiogenesis in *Emericella nidulans*. *Mycological Research* 110, 1172–1178. doi: 10.1016/j.mycres.2006.07.006.
- Emri, T., Pócsi, I., és Szentirmai, A. (1997). Glutathione Metabolism and Protection Against Oxidative Stress Caused by Peroxides in *Penicillium chrysogenum*. *Free Radical Biology and Medicine* 23, 809–814. doi: 10.1016/S0891-5849(97)00065-8.
- Emri, T., Szarvas, V., Orosz, E., Antal, K., Park, H., Han, K.-H., és mtsai. (2015). Core oxidative stress response in *Aspergillus nidulans*. *BMC Genomics* 16, 478. doi: 10.1186/s12864-015-1705-z.
- Emri, T., Vékony, V., Gila, B., Nagy, F., Forgács, K., és Pócsi, I. (2018). Autolytic hydrolases affect sexual and asexual development of *Aspergillus nidulans*. *Folia Microbiol* 63, 619–626. doi: 10.1007/s12223-018-0601-8.

- Ene, I. V., Adya, A. K., Wehmeier, S., Brand, A. C., MacCallum, D. M., Gow, N. A. R., és mtsai. (2012). Host carbon sources modulate cell wall architecture, drug resistance and virulence in a fungal pathogen. *Cellular Microbiology* 14, 1319–1335. doi: 10.1111/j.1462-5822.2012.01813.x.
- Etxebeste, O., és Espeso, E. A. (2020). *Aspergillus nidulans* in the post-genomic era: a top-model filamentous fungus for the study of signaling and homeostasis mechanisms. *International Microbiology* 23, 5–22. doi: 10.1007/s10123-019-00064-6.
- Fang, X., Yano, S., Inoue, H., és Sawayama, S. (2008). Lactose enhances cellulase production by the filamentous fungus *Acremonium cellulolyticus*. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 106, 115–120. doi: 10.1263/jbb.106.115.
- Fassatióvá, O. (1986). *Moulds and Filamentous Fungi in Technical Microbiology*. Elsevier.
- Federoff, N. (2006). Redox Regulatory Mechanisms in Cellular Stress Responses. *Annals of Botany* 98, 289–300. doi: 10.1093/aob/mcl128.
- Fekete, E., Karaffa, L., Seiboth, B., Fekete, E., Kubicek, C. P., és Flipphi, M. (2012). Identification of a permease gene involved in lactose utilisation in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genetics and Biology* 49, 415–425. doi: 10.1016/j.fgb.2012.03.001.
- Fekete, E., Orosz, A., Kulcsár, L., Kavalecz, N., Flipphi, M., és Karaffa, L. (2016). Characterization of a second physiologically relevant lactose permease gene (lacpB) in *Aspergillus nidulans*. *Microbiology (Reading)* 162, 837–847. doi: 10.1099/mic.0.000267.
- Filiatrault-Chastel, C., Heiss-Blanquet, S., Margeot, A., és Berrin, J.-G. (2021). From fungal secretomes to enzymes cocktails: The path forward to bioeconomy. *Biotechnology Advances* 52, 107833. doi: 10.1016/j.biotechadv.2021.107833.
- Fleißner, A., és Dersch, P. (2010). Expression and export: recombinant protein production systems for *Aspergillus*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 87, 1255–1270. doi: 10.1007/s00253-010-2672-6.
- Flipphi, M., Sun, J., Robellet, X., Karaffa, L., Fekete, E., Zeng, A.-P., és mtsai. (2009). Biodiversity and evolution of primary carbon metabolism in *Aspergillus nidulans* and other *Aspergillus* spp. *Fungal Genetics and Biology* 46 Suppl 1, S19–S44. doi: 10.1016/j.fgb.2008.07.018.
- Fontaine, T., Hartland, R. P., Beauvais, A., Diaquin, M., és Latge, J. P. (1997). Purification and characterization of an endo-1,3-beta-glucanase from *Aspergillus fumigatus*. *European Journal of Biochemistry* 243, 315–321. doi: 10.1111/j.1432-1033.1997.0315a.x.
- Fountain, J. C., Bajaj, P., Nayak, S. N., Yang, L., Pandey, M. K., Kumar, V., és mtsai. (2016). Responses of *Aspergillus flavus* to Oxidative Stress Are Related to Fungal Development Regulator, Antioxidant Enzyme, and Secondary Metabolite Biosynthetic Gene Expression. *Frontiers in Microbiology* 7. Available at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2016.02048> [Elérés január 17, 2024].
- Frandsen, R. J. N., Khorsand-Jamal, P., Kongstad, K. T., Nafisi, M., Kannangara, R. M., Staerk, D., és mtsai. (2018). Heterologous production of the widely used natural food colorant carminic acid in *Aspergillus nidulans*. *Scientific Reports* 8, 12853. doi: 10.1038/s41598-018-30816-9.

- Frisvad, J. C., és Larsen, T. O. (2016). Extrolites of *Aspergillus fumigatus* and Other Pathogenic Species in *Aspergillus* Section *Fumigati*. *Frontiers in Microbiology* 6. Available at: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2015.01485> [Elérés március 9, 2022].
- Furukawa, K., Hoshi, Y., Maeda, T., Nakajima, T., és Abe, K. (2005). *Aspergillus nidulans* HOG pathway is activated only by two-component signalling pathway in response to osmotic stress. *Molecular Microbiology* 56, 1246–1261. doi: 10.1111/j.1365-2958.2005.04605.x.
- Ganguli, D., Kumar, C., és Bachhawat, A. K. (2007). The Alternative Pathway of Glutathione Degradation Is Mediated by a Novel Protein Complex Involving Three New Genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 175, 1137–1151. doi: 10.1534/genetics.106.066944.
- Garcia-Rubio, R., de Oliveira, H. C., Rivera, J., és Trevijano-Contador, N. (2019). The fungal cell wall: *Candida*, *Cryptococcus*, and *Aspergillus* species. *Frontiers in Microbiology* 10, 2993. doi: 10.3389/fmicb.2019.02993.
- Garron, M.-L., és Henrissat, B. (2019). The continuing expansion of CAZymes and their families. *Current Opinion in Chemical Biology* 53, 82–87. doi: 10.1016/j.cbpa.2019.08.004.
- Gasch, A. P. (2007). Comparative genomics of the environmental stress response in ascomycete fungi. *Yeast* 24, 961–976. doi: 10.1002/yea.1512.
- Gatea, A. H. (2020). Review on analysis of interesting whitening agents in cosmetics products. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*. 928, 052001. doi: 10.1088/1757-899X/928/5/052001.
- Gielkens, M. M., Dekkers, E., Visser, J., és de Graaff, L. H. (1999). Two cellobiohydrolase-encoding genes from *Aspergillus niger* require D-xylose and the xylytic transcriptional activator XlnR for their expression. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 4340–4345. doi: 10.1128/AEM.65.10.4340-4345.1999.
- Gila, B. C., Antal, K., Birkó, Z., Keserű, J. S., Pócsi, I., és Emri, T. (2022). Strategies Shaping the Transcription of Carbohydrate-Active Enzyme Genes in *Aspergillus nidulans*. *Journal of Fungi* 8, 79. doi: 10.3390/jof8010079.
- Gila, B. C., Moon, H., Antal, K., Hajdu, M., Kovács, R., Jónás, A. P., és mtsai. (2021). The DUG pathway governs degradation of intracellular glutathione in *Aspergillus nidulans*. *Applied and Environmental Microbiology* 87, e01321-20. doi: 10.1128/AEM.01321-20.
- Gila-Diaz, A., Arribas, S. M., Algara, A., Martín-Cabrejas, M. A., López de Pablo, Á. L., Sáenz de Pipaón, M., és mtsai. (2019). A Review of Bioactive Factors in Human Breastmilk: A Focus on Prematurity. *Nutrients* 11, 1307. doi: 10.3390/nu11061307.
- Glass, N. L., Schmoll, M., Cate, J. H. D., és Coradetti, S. (2013). Plant cell wall deconstruction by ascomycete fungi. *Annual Reviews of Microbiology* 67, 477–498. doi: 10.1146/annurev-micro-092611-150044.
- Gonçalves, E. C. S., Pérez, M. M., Vici, A. C., Salgado, J. C. S., de Souza Rocha, M., de Almeida, P. Z., és mtsai. (2020). Potential biodiesel production from Brazilian plant oils and spent coffee grounds by *Beauveria bassiana* lipase 1 expressed in *Aspergillus nidulans* A773 using different agroindustry inputs. *Journal of Cleaner Production* 256, 120513. doi: 10.1016/j.jclepro.2020.120513.

- Gopal, S., Borovok, I., Ofer, A., Yanku, M., Cohen, G., Goebel, W., és mtsai. (2005). A Multidomain Fusion Protein in *Listeria monocytogenes* Catalyzes the Two Primary Activities for Glutathione Biosynthesis. *Journal of Bacteriology* 187, 3839–3847. doi: 10.1128/JB.187.11.3839-3847.2005.
- Gordon, L. J., és Lilly, W. W. (1995). Quantitative analysis of *Schizophyllum commune* metalloprotease ScPrB activity in SDS-gelatin PAGE reveals differential mycelial localization of nitrogen limitation-induced autolysis. *Current Microbiology* 30, 337–343. doi: 10.1007/BF00369860.
- Gore, J., Youk, H., és van Oudenaarden, A. (2009). Snowdrift game dynamics and facultative cheating in yeast. *Nature* 459, 253–256. doi: 10.1038/nature07921.
- Gruben, B. S., Zhou, M., és de Vries, R. P. (2012). GalX regulates the D-galactose oxidoreductive pathway in *Aspergillus niger*. *FEBS Letters* 586, 3980–3985. doi: 10.1016/j.febslet.2012.09.029.
- Hagiwara, D., Asano, Y., Marui, J., Furukawa, K., Kanamaru, K., Kato, M., és mtsai. (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*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 71, 1003–1014. doi: 10.1271/bbb.60665.
- Halliwell, B., és Gutteridge, J. M. C. (2015). *Free Radicals in Biology and Medicine*. OUP Oxford.
- Hallsworth, J. E. (2018). Stress-free microbes lack vitality. *Fungal Biology*. 122(6): 379-385. doi: 10.1016/j.funbio.2018.04.003
- Hansberg, W., és Aguirre, J. (1990). Hyperoxidant states cause microbial cell differentiation by cell isolation from dioxygen. *Journal of Theoretical Biology* 142, 201–221. doi: 10.1016/S0022-5193(05)80222-X.
- Hardin, G. (1968). The Tragedy of the Commons. *Science* 162, 1243–1248.
- Harris, M. A., Clark, J., Ireland, A., Lomax, J., Ashburner, M., Foulger, R., és mtsai. (2004). The Gene Ontology (GO) database and informatics resource. *Nucleic Acids Research* 32, D258-261. doi: 10.1093/nar/gkh036.
- Harris, S. D. (2001). Septum formation in *Aspergillus nidulans*. *Current Opinion in Microbiology* 4, 736–739. doi: 10.1016/S1369-5274(01)00276-4.
- Hassan, A., Sorour, N. M., El-Baz, A., és Shetaia, Y. (2019). Simple synthesis of bacterial cellulose/magnetite nanoparticles composite for the removal of antimony from aqueous solution. *International Journal of Environmental Science and Technology* 16, 1433–1448. doi: 10.1007/s13762-018-1737-4.
- Held, M. A., Jiang, N., Basu, D., Showalter, A. M., és Faik, A. (2015). „Plant cell wall polysaccharides: Structure and biosynthesis”, in *Polysaccharides: Bioactivity and Biotechnology*, szerk. K. G. Ramawat és J.-M. Mérillon (Cham: Springer International Publishing), 3–54. doi: 10.1007/978-3-319-16298-0_73.
- Henriet, S. S. V., Verweij, P. E., és Warris, A. (2012). *Aspergillus nidulans* and Chronic Granulomatous Disease: A Unique Host–Pathogen Interaction. *The Journal of Infectious Diseases* 206, 1128–1137. doi: 10.1093/infdis/jis473.

- Herrero-de-Dios, C., Day, A. M., Tillmann, A. T., Kastora, S. L., Stead, D., Salgado, P. S., és mtsai. (2018). Redox Regulation, Rather than Stress-Induced Phosphorylation, of a Hog1 Mitogen-Activated Protein Kinase Modulates Its Nitrosative-Stress-Specific Outputs. *mBio* 9, e02229-17. doi: 10.1128/mBio.02229-17.
- Ho, A., Di Lonardo, P., és Bodelier, P. (2017). Revisiting life strategy concepts in environmental microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology* 93. doi: 10.1093/femsec/fix006.
- Hong, S.-Y., Roze, L. V., Wee, J., és Linz, J. E. (2013). Evidence that a transcription factor regulatory network coordinates oxidative stress response and secondary metabolism in aspergilli. *MicrobiologyOpen* 2, 144–160. doi: 10.1002/mbo3.63.
- Horio, T., Szewczyk, E., Oakley, C. E., Osmani, A. H., Osmani, S. A., és Oakley, B. R. (2019). SUMOlock reveals a more complete *Aspergillus nidulans* SUMOylome. *Fungal Genetics and Biology* 127, 50–59. doi: 10.1016/j.fgb.2019.03.002.
- Horn, B. W., Moore, G. G., és Carbone, I. (2011). Sexual reproduction in aflatoxin-producing *Aspergillus nomius*. *Mycologia* 103, 174–183. doi: 10.3852/10-115.
- Houbraken, J., és Samson, R. A. (2011). Phylogeny of *Penicillium* and the segregation of *Trichocomaceae* into three families. *Studies in Mycology* 70, 1–51. doi: 10.3114/sim.2011.70.01.
- Ilyasov, I., Beloborodov, V., Antonov, D., Dubrovskaya, A., Terekhov, R., Zhevlakova, A., és mtsai. (2020). Flavonoids with Glutathione Antioxidant Synergy: Influence of Free Radicals Inflow. *Antioxidants* 9, 695. doi: 10.3390/antiox9080695.
- Inglis, D. O., Binkley, J., Skrzypek, M. S., Arnaud, M. B., Cerqueira, G. C., Shah, P., és mtsai. (2013). Comprehensive annotation of secondary metabolite biosynthetic genes and gene clusters of *Aspergillus nidulans*, *A. fumigatus*, *A. niger* and *A. oryzae*. *BMC Microbiology* 13, 91. doi: 10.1186/1471-2180-13-91.
- Jäger, S., Brumbauer, A., Fehér, E., Réczey, K., és Kiss, L. (2001). Production and characterization of β -glucosidases from different *Aspergillus* strains. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 17, 455–461. doi: 10.1023/A:1011948405581.
- Janowiak, B. E., és Griffith, O. W. (2005). Glutathione Synthesis in *Streptococcus agalactiae*: One Protein Accounts For γ -Glutamylcysteine Synthetase and Glutathione Synthetase Activities. *Journal of Biological Chemistry* 280, 11829–11839. doi: 10.1074/jbc.M414326200.
- Jardine, D. (2022). Aflatoxin in corn: A potential concern for the 2022 season. *Agronomy eUpdates* October 6th, 2022, 14–16.
- Jiang, Z., Wang, Y., Jiang, Y., Xu, Y., és Meng, B. (2013). Vertebral osteomyelitis and epidural abscess due to *Aspergillus nidulans* resulting in spinal cord compression: Case report and literature review. *Journal of International Medical Research* 41, 502–510. doi: 10.1177/0300060513476432.
- Jørgensen, T. R., Nitsche, B. M., Lamers, G. E., Arentshorst, M., van den Hondel, C. A., és Ram, A. F. (2010). Transcriptomic Insights into the Physiology of *Aspergillus niger* Approaching a Specific Growth Rate of Zero. *Applied an Environmental Microbiology* 76, 5344–5355. doi: 10.1128/AEM.00450-10.

- Kameshwar, A. K. S., és Qin, W. (2018). Structural and functional properties of pectin and lignin–carbohydrate complexes de-esterases: a review. *Bioresources and Bioprocessing* 5, 43. doi: 10.1186/s40643-018-0230-8.
- Kanehisa, M., és Goto, S. (2000). KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Research* 28, 27–30. doi: 10.1093/nar/28.1.27.
- Karaffa, L., és Kubicek, C. P. (2019). Citric acid and itaconic acid accumulation: variations of the same story? *Applied Microbiology and Biotechnology* 103, 2889–2902. doi: 10.1007/s00253-018-09607-9.
- Kato, N., Brooks, W., és Calvo, A. M. (2003). The Expression of Sterigmatocystin and Penicillin Genes in *Aspergillus nidulans* Is Controlled by veA, a Gene Required for Sexual Development. *Eukaryotic Cell* 2, 1178–1186. doi: 10.1128/EC.2.6.1178-1186.2003.
- Kato, N., Suyama, S., Shirokane, M., Kato, M., Kobayashi, T., és Tsukagoshi, N. (2002). Novel alpha-glucosidase from *Aspergillus nidulans* with strong transglycosylation activity. *Applied an Environmental Microbiology* 68, 1250–1256. doi: 10.1128/AEM.68.3.1250-1256.2002.
- Katz, M. E., Braunberger, K., Yi, G., Cooper, S., Nonhebel, H. M., és 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. doi: 10.12688/f1000research.2-72.v1.
- Kaur, H., Ganguli, D., és Bachhawat, A. K. (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. *Journal of Biological Chemistry* 287, 8920–8931. doi: 10.1074/jbc.M111.327411.
- Kaur, H., Kumar, C., Junot, C., Toledano, M. B., és Bachhawat, A. K. (2009). Dug1p Is a Cys-Gly Peptidase of the γ -Glutamyl Cycle of *Saccharomyces cerevisiae* and Represents a Novel Family of Cys-Gly Peptidases. *Journal of Biological Chemistry* 284, 14493–14502. doi: 10.1074/jbc.M808952200.
- Kawasaki, L., Wysong, D., Diamond, R., Aguirre, J. (1997). Two Divergent Catalase Genes Are Differentially Regulated during *Aspergillus nidulans* Development and Oxidative Stress. *Journal of Bacteriology* 179(10), 3284–3292. doi: 10.1128/jb.179.10.3284-3292.1997.
- Kawasaki, L., Aguirre, J. (2001). Multiple Catalase Genes Are Differentially Regulated in *Aspergillus nidulans*. *Journal of Bacteriology* 183 (4), 1434–1440. doi: 10.1128/jb.183.4.1434-1440.2001.
- Keller, N. P. (2019). Fungal secondary metabolism: regulation, function and drug discovery. *Nature Reviews Microbiology* 17, 167–180. doi: 10.1038/s41579-018-0121-1.
- Keserű, J. S., Szabó, I., Gál, Z., Massidda, O., Mingoia, M., Kaszanyitzky, É., és mtsai. (2011). Identification of β -lactamases in human and bovine isolates of *Staphylococcus aureus* strains having borderline resistance to penicillinase-resistant penicillins (PRPs) with proteomic methods. *Veterinary Microbiology* 147, 96–102. doi: 10.1016/j.vetmic.2010.06.006.

- Khazim, K., Giustarini, D., Rossi, R., Verkaik, D., Cornell, J. E., Cunningham, S. E. D., és mtsai. (2013). Glutathione redox potential is low and glutathionylated and cysteinylated hemoglobin levels are elevated in maintenance hemodialysis patients. *Translational Research* 162, 16–25. doi: 10.1016/j.trsl.2012.12.014.
- Kim, D., Langmead, B., és Salzberg, S. L. (2015). HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements. *Nature Methods* 12, 357–360. doi: 10.1038/nmeth.3317.
- Koutserimpas, C., Chamakioti, I., Raptis, K., Alpantaki, K., Vrioni, G., és Samonis, G. (2022). Osseous Infections Caused by *Aspergillus* Species. *Diagnostics* 12, 201. doi: 10.3390/diagnostics12010201.
- Kowalczyk, J. E., Gruben, B. S., Battaglia, E., Wiebenga, A., Majoor, E., és Vries, R. P. de (2015). Genetic Interaction of *Aspergillus nidulans* galR, xlnR and araR in Regulating D-Galactose and L-Arabinose Release and Catabolism Gene Expression. *PLOS ONE* 10, e0143200. doi: 10.1371/journal.pone.0143200.
- Koza, N. A., Adedayo, A. A., Babalola, O. O., és Kappo, A. P. (2022). Microorganisms in Plant Growth and Development: Roles in Abiotic Stress Tolerance and Secondary Metabolites Secretion. *Microorganisms* 10, 1528. doi: 10.3390/microorganisms10081528.
- Krijgsheld, P., Bleichrodt, R., van Veluw, G. J., Wang, F., Müller, W. H., Dijksterhuis, J., és mtsai. (2013a). Development in *Aspergillus*. *Studies in Mycology* 74, 1–29. doi: 10.3114/sim0006.
- Krijgsheld, P., Nitsche, B. M., Post, H., Levin, A. M., Müller, W. H., Heck, A. J. R., és mtsai. (2013b). Deletion of flbA results in increased secretome complexity and reduced secretion heterogeneity in colonies of *Aspergillus niger*. *Journal of Proteome Research* 12, 1808–1819. doi: 10.1021/pr301154w.
- Kumar, A. (2020). *Aspergillus nidulans*: A potential resource of the production of the native and heterologous enzymes for industrial applications. *International Journal of Microbiology* 2020, e8894215. doi: 10.1155/2020/8894215.
- Kumar, A., Tikoo, S., Maity, S., Sengupta, S., Sengupta, S., Kaur, A., és mtsai. (2012). Mammalian proapoptotic factor ChaC1 and its homologues function as γ -glutamyl cyclotransferases acting specifically on glutathione. *EMBO reports* 13, 1095–1101. doi: 10.1038/embor.2012.156.
- Kumar, C., Sharma, R., és Bachhawat, A. K. (2003). Utilization of glutathione as an exogenous sulfur source is independent of γ -glutamyl transpeptidase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for an alternative glutathione degradation pathway. *FEMS Microbiology Letters* 219, 187–194. doi: 10.1016/S0378-1097(03)00059-4.
- Kumar, P., Osahon, O., Vides, D. B., Hanania, N., Minard, C. G., és Sekhar, R. V. (2022). Severe Glutathione Deficiency, Oxidative Stress and Oxidant Damage in Adults Hospitalized with COVID-19: Implications for GlyNAC (Glycine and N-Acetylcysteine) Supplementation. *Antioxidants* 11, 50. doi: 10.3390/antiox11010050.
- Kurucz, V., Krüger, T., Antal, K., Dietl, A.-M., Haas, H., Pócsi, I., és mtsai. (2018). Additional oxidative stress reroutes the global response of *Aspergillus fumigatus* to iron depletion. *BMC Genomics* 19, 357. doi: 10.1186/s12864-018-4730-x.
- Latgé, J.-P., és Chamilos, G. (2019). *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis in 2019. *Clinical Microbiology Reviews* 33, e00140-18. doi: 10.1128/CMR.00140-18.

- Leiter, É., Park, H.-S., Kwon, N.-J., Han, K.-H., Emri, T., Oláh, V., és mtsai. (2016). Characterization of the *aodA*, *dnmA*, *mnSOD* and *pimA* genes in *Aspergillus nidulans*. *Scientific Reports* 6, 20523. doi: 10.1038/srep20523.
- Lerch, B. A., Smith, D. A., Koffel, T., Bagby, S. C., és Abbott, K. C. (2022). How public can public goods be? Environmental context shapes the evolutionary ecology of partially private goods. *PLoS Computational Biology* 18, e1010666. doi: 10.1371/journal.pcbi.1010666.
- Lever, M. (1977). Carbohydrate determination with 4-hydroxybenzoic acid hydrazide (PAHBAH): effect of bismuth on the reaction. *Analytical Biochemistry* 81, 21–27. doi: 10.1016/0003-2697(77)90594-2.
- Li, J., Sun, Y., Liu, F., Zhou, Y., Yan, Y., Zhou, Z., Wang, P., Zhou, S. (2022). Increasing NADPH Impairs Fungal H₂O₂ Resistance by Perturbing Transcriptional Regulation of Peroxiredoxin. *Bioresources and Bioprocessing* 9(1). doi: 10.1186/s40643-021-00489-w.
- Liang, G., Liao, X., Du, G., és Chen, J. (2009). A new strategy to enhance glutathione production by multiple H₂O₂-induced oxidative stresses in *Candida utilis*. *Bioresource Technology* 100, 350–355. doi: 10.1016/j.biortech.2008.06.012.
- Lienkamp, A. C., Heine, T., és Tischler, D. (2020). „Chapter Five - Glutathione: A powerful but rare cofactor among *Actinobacteria*”, in *Advances in Applied Microbiology*, szerk. G. M. Gadd és S. Sariaslani (Academic Press), 181–217. doi: 10.1016/bs.aambs.2019.12.003.
- Lim, J.-Y., Jung, Y.-E., Hwang, H.-E., Kim, C.-H., Basaran-Akgul, N., Goli, S. H., és mtsai. (2023). Survival Factor A (SvfA) Contributes to *Aspergillus nidulans* Pathogenicity. *Journal of Fungi* 9, 143. doi: 10.3390/jof9020143.
- Lind, A. L., Lim, F. Y., Soukup, A. A., Keller, N. P., és Rokas, A. (2018). An LaeA- and BrlA-Dependent Cellular Network Governs Tissue-Specific Secondary Metabolism in the Human Pathogen *Aspergillus fumigatus*. *mSphere* 3, 10.1128/msphere.00050-18. doi: 10.1128/msphere.00050-18.
- Liu, S. M., és Eady, S. J. (2005). Glutathione: its implications for animal health, meat quality, and health benefits of consumers. *Australian Journal of Agricultural Research* 56, 775–780. doi: 10.1071/AR05053.
- Love, M. I., Huber, W., és Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology* 15, 550. doi: 10.1186/s13059-014-0550-8.
- Lu, S. C. (2013). Glutathione synthesis. *Biochimica et Biophysica Acta* 1830, 3143–3153. doi: 10.1016/j.bbagen.2012.09.008.
- Lushchak, V. I. (2012). Glutathione Homeostasis and Functions: Potential Targets for Medical Interventions. *Journal of Amino Acids* 2012, e736837. doi: 10.1155/2012/736837.
- Ma, D., és Li, R. (2013). Current Understanding of HOG-MAPK Pathway in *Aspergillus fumigatus*. *Mycopathologia* 175, 13–23. doi: 10.1007/s11046-012-9600-5.
- Macheleidt, J., Mattern, D. J., Fischer, J., Netzker, T., Weber, J., Schroeckh, V., és mtsai. (2016). Regulation and Role of Fungal Secondary Metabolites. *Annual Review of Genetics* 50, 371–392. doi: 10.1146/annurev-genet-120215-035203.

- Marcos, A. T., Ramos, M. S., Schinko, T., Strauss, J., és Cánovas, D. (2020). Nitric oxide homeostasis is required for light-dependent regulation of conidiation in *Aspergillus*. *Fungal Genetics and Biology* 137, 103337. doi: 10.1016/j.fgb.2020.103337.
- Margolles-Clark, E., Ihnen, M., és Penttilä, M. (1997). Expression patterns of ten hemicellulase genes of the filamentous fungus *Trichoderma reesei* on various carbon sources. *Journal of Biotechnology* 57, 167–179. doi: 10.1016/S0168-1656(97)00097-7.
- Martens-Uzunova, E. S., és Schaap, P. J. (2009). Assessment of the pectin degrading enzyme network of *Aspergillus niger* by functional genomics. *Fungal Genetics and Biology* 46 Suppl 1, S170–S179. doi: 10.1016/j.fgb.2008.07.021.
- Martins, I., Garcia, H., Varela, A., Núñez, O., Planchon, S., Galceran, M. T., és mtsai. (2014). Investigating *Aspergillus nidulans* secretome during colonisation of cork cell walls. *Journal of Proteomics* 98, 175–188. doi: 10.1016/j.jprot.2013.11.023.
- Meister, A., és Anderson, M. E. (1983). Glutathione. *Annual Review of Biochemistry* 52, 711–760. doi: 10.1146/annurev.bi.52.070183.003431.
- Mendoza-Martínez, A. E., Cano-Domínguez, N., és Aguirre, J. (2020). Yap1 homologs mediate more than the redox regulation of the antioxidant response in filamentous fungi. *Fungal Biology* 124, 253–262. doi: 10.1016/j.funbio.2019.04.001.
- Mendoza-Martínez, A. E., Lara-Rojas, F., Sánchez, O., és Aguirre, J. (2017). NapA Mediates a Redox Regulation of the Antioxidant Response, Carbon Utilization and Development in *Aspergillus nidulans*. *Frontiers in Microbiology* 8. Available at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2017.00516> [Elérés november 28, 2022].
- Meng, J., Németh, Z., Peng, M., Fekete, E., Garrigues, S., Lipzen, A., és mtsai. (2022). GalR, GalX and AraR co-regulate d-galactose and l-arabinose utilization in *Aspergillus nidulans*. *Microbial Biotechnology* 15, 1839–1851. doi: 10.1111/1751-7915.14025.
- Meyer, V., és Jung, S. (2018). Antifungal Peptides of the AFP Family Revisited: Are These Cannibal Toxins? *Microorganisms* 6, 50. doi: 10.3390/microorganisms6020050.
- Mitchell, A., Romano, G. H., Groisman, B., Yona, A., Dekel, E., Kupiec, M., és mtsai. (2009). Adaptive prediction of environmental changes by microorganisms. *Nature* 460, 220–224. doi: 10.1038/nature08112.
- Miyazawa, K., Yoshimi, A., és Abe, K. (2020). The mechanisms of hyphal pellet formation mediated by polysaccharides, α -1,3-glucan and galactosaminogalactan, in *Aspergillus* species. *Fungal Biology and Biotechnology* 7, 10. doi: 10.1186/s40694-020-00101-4.
- Molnár, Z., Emri, T., Zavaczki, E., Pusztahelyi, T., és Pócsi, I. (2006). Effects of mutations in the GanB/RgsA G protein mediated signalling on the autolysis of *Aspergillus nidulans*. *Journal of Basic Microbiology* 46, 495–503. doi: 10.1002/jobm.200610174.
- Molnár, Z., Mészáros, E., Szilágyi, Z., Rosén, S., Emri, T., és Pócsi, I. (2004). Influence of fadAG203R and deltaflbA mutations on morphology and physiology of submerged *Aspergillus nidulans* cultures. *Appl Biochem Biotechnol* 118, 349–360. doi: 10.1385/abab:118:1-3:349.

- Montibus, M., Pinson-Gadais, L., Richard-Forget, F., Barreau, C., és Ponts, N. (2015). Coupling of transcriptional response to oxidative stress and secondary metabolism regulation in filamentous fungi. *Critical Reviews in Microbiology* 41, 295–308. doi: 10.3109/1040841X.2013.829416.
- Morikawa, Y., Ohashi, T., Mantani, O., és Okada, H. (1995). Cellulase induction by lactose in *Trichoderma reesei* PC-3-7. *Applied Microbiology and Biotechnology* 44, 106–111. doi: 10.1007/BF00164488.
- Navarro, R. E., Hansberg, W., Timberlake, W. E., Aguirre, J., Stringer, M. A. (1996) CatA, a New *Aspergillus nidulans* Gene Encoding a Developmentally Regulated Catalase. *Current Genetics* 29(4), 352–359. doi: 10.1007/s002940050056.
- Naveed, M., Nadeem, F., Mehmood, T., Bilal, M., Anwar, Z., és Amjad, F. (2021). Protease—A Versatile and Ecofriendly Biocatalyst with Multi-Industrial Applications: An Updated Review. *Catalysis Letters* 151, 307–323. doi: 10.1007/s10562-020-03316-7.
- Németh, Z., Kulcsár, L., Flippi, M., Orosz, A., Aguilar-Pontes, M. V., de Vries, R. P., és mtsai. (2019). l-Arabinose induces d-galactose catabolism via the Leloir pathway in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genetics and Biology* 123, 53–59. doi: 10.1016/j.fgb.2018.11.004.
- Németh, Z., Molnár, Á. P., Fejes, B., Novák, L., Karaffa, L., Keller, N. P., és mtsai. (2016). Growth-Phase Sterigmatocystin Formation on Lactose Is Mediated via Low Specific Growth Rates in *Aspergillus nidulans*. *Toxins* 8, 354. doi: 10.3390/toxins8120354.
- Nevalainen, H., és Peterson, R. (2014). Making recombinant proteins in filamentous fungi- are we expecting too much? *Frontiers in Microbiology* 5, 75. doi: 10.3389/fmicb.2014.00075.
- Nitsche, B. M., Jørgensen, T. R., Akeroyd, M., Meyer, V., és Ram, A. F. (2012). The carbon starvation response of *Aspergillus niger* during submerged cultivation: Insights from the transcriptome and secretome. *BMC Genomics* 13, 380. doi: 10.1186/1471-2164-13-380.
- Noctor, G., Arisi, A.-C. M., Jouanin, L., Kunert, K. J., Rennenberg, H., és Foyer, C. H. (1998). Glutathione: biosynthesis, metabolism and relationship to stress tolerance explored in transformed plants. *Journal of Experimental Botany* 49, 623–647. doi: 10.1093/jxb/49.321.623.
- Oberley, L. W., és Spitz, D. R. (1984). Assay of superoxide dismutase activity in tumor tissue. *Methods in Enzymology* 105, 457–464. doi: 10.1016/s0076-6879(84)05064-3.
- O’Gorman, C. M., Fuller, H. T., és Dyer, P. S. (2009). Discovery of a sexual cycle in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Nature* 457, 471–474. doi: 10.1038/nature07528.
- Ohkama-Ohtsu, N., Oikawa, A., Zhao, P., Xiang, C., Saito, K., és Oliver, D. J. (2008). A γ -Glutamyl Transpeptidase-Independent Pathway of Glutathione Catabolism to Glutamate via 5-Oxoproline in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 148, 1603–1613. doi: 10.1104/pp.108.125716.
- Ohtake, Y., és Yabuuchi, S. (1991). Molecular cloning of the γ -glutamylcysteine synthetase gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 7, 953–961. doi: 10.1002/yea.320070907.
- Oktyabrsky, O. N., és Smirnova, G. V. (2007). Redox regulation of cellular functions. *Biochemistry Moscow* 72, 132–145. doi: 10.1134/S0006297907020022.

- Ozcan, S., Vallier, L. G., Flick, J. S., Carlson, M., és Johnston, M. (1997). Expression of the SUC2 gene of *Saccharomyces cerevisiae* is induced by low levels of glucose. *Yeast* 13, 127–137. doi: 10.1093/emboj/17.9.2566
- Palmer, J. M., Wiemann, P., Greco, C., Chiang, Y. M., Wang, C. C. C., Lindner, D. L., és mtsai. (2021). The sexual spore pigment asperthecin is required for normal ascospore production and protection from UV light in *Aspergillus nidulans*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 48, kuab055. doi: 10.1093/jimb/kuab055.
- Pardo, E., és Orejas, M. (2014). The *Aspergillus nidulans* Zn(II)2Cys6transcription factor AN5673/RhaR mediates L-rhamnose utilization and the production of α -L-rhamnosidases. *Microbial Cell Factories* 13, 161. doi: 10.1186/s12934-014-0161-9.
- Park, H.-S., és Yu, J.-H. (2012). Genetic control of asexual sporulation in filamentous fungi. *Current Opinion in Microbiology* 15, 669–677. doi: 10.1016/j.mib.2012.09.006.
- Peberdy, J. F. (1994). Protein secretion in filamentous fungi — trying to understand a highly productive black box. *Trends in Biotechnology* 12, 50–57. doi: 10.1016/0167-7799(94)90100-7.
- Peles, F., Sipos, P., Györi, Z., Pfliegler, W. P., Giacometti, F., Serraino, A., és mtsai. (2019). Adverse Effects, Transformation and Channeling of Aflatoxins Into Food Raw Materials in Livestock. *Frontiers in Microbiology* 10. Available at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2019.02861> [Elérés január 17, 2024].
- Penninckx, M. J. (2000). A short review on the role of glutathione in the response of yeasts to nutritional, environmental, and oxidative stresses. *Enzyme and Microbial Technology* 26, 737–742. doi: 10.1016/S0141-0229(00)00165-4.
- Penninckx, M. J., és Elskens, M. T. (1993). „Metabolism and Functions of Glutathione in Microorganisms”, in *Advances in Microbial Physiology*, szerk. A. H. Rose (Academic Press), 239–301. doi: 10.1016/S0065-2911(08)60031-4.
- Perrone, G., és Gallo, A. (2017). „*Aspergillus* Species and Their Associated Mycotoxins”, in *Mycotoxigenic Fungi: Methods and Protocols* Methods in Molecular Biology., szerk. A. Moretti és A. Susca (New York, NY: Springer), 33–49. doi: 10.1007/978-1-4939-6707-0_3.
- Pfliegler, W. P., Pócsi, I., Györi, Z., és Pusztahelyi, T. (2020). The *Aspergilli* and Their Mycotoxins: Metabolic Interactions With Plants and the Soil Biota. *Frontiers in Microbiology* 10. Available at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2019.02921> [Elérés január 15, 2024].
- Phalip, V., Debeire, P., Jeltsch, J.-M., Phalip, V., Debeire, P., és Jeltsch, J.-M. (2012). *Competing Plant Cell Wall Digestion Recalcitrance by Using Fungal Substrate – Adapted Enzyme Cocktails*. IntechOpen doi: 10.5772/23419.
- Pinheiro, Â., Piontkivska, D., Sequeira, P., Martins, T. M., és Pereira, C. S. (2023). *Aspergillus nidulans*. *Trends in Microbiology* 31, 212–213. doi: 10.1016/j.tim.2022.09.013.
- Pinto, M. C., Mata, A. M., és Lopez-Barea, J. (1984). Reversible inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* glutathione reductase under reducing conditions. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 228, 1–12. doi: 10.1016/0003-9861(84)90040-7.

- Pócsi, I., Leiter, E., Kwon, N.-J., Shin, K.-S., Kwon, G.-S., Pusztahelyi, T., és mtsai. (2009). Asexual sporulation signalling regulates autolysis of *Aspergillus nidulans* via modulating the chitinase ChiB production. *Journal of Applied Microbiology* 107, 514–523. doi: 10.1111/j.1365-2672.2009.04237.x.
- Pócsi, I., Prade, R. A., és Penninckx, M. J. (2004). „Glutathione, Altruistic Metabolite in Fungi”, in *Advances in Microbial Physiology* (Academic Press), 1–76. doi: 10.1016/S0065-2911(04)49001-8.
- Pócsi, I., Pusztahelyi, T., Saw, L., és Emri, T. (2003). Autolysis of *Penicillium chrysogenum*-A Holistic Approach. *Indian Journal of Biotechnology* 2(3):293-301
- Pontecorvo, G., Roper, J. A., Chemmons, L. M., Macdonald, K. D., és Bufton, A. W. J. (1953). „The Genetics of *Aspergillus nidulans*”, in *Advances in Genetics*, szerk. M. Demerec (Academic Press), 141–238. doi: 10.1016/S0065-2660(08)60408-3.
- Prévéral, S., Gayet, L., Moldes, C., Hoffmann, J., Mounicou, S., Gruet, A., és mtsai. (2009). A Common Highly Conserved Cadmium Detoxification Mechanism from Bacteria to Humans: Heavy Metal Tolerance Conferred by the ATP-binding Cassette (ABC) Transporter spHMT1 Requires Glutathione but not Metal-Chelating Phytochelatin Peptides. *Journal of Biological Chemistry* 284, 4936–4943. doi: 10.1074/jbc.M808130200.
- Priebe, S., Kreisel, C., Horn, F., Guthke, R., és Linde, J. (2015). FungiFun2: a comprehensive online resource for systematic analysis of gene lists from fungal species. *Bioinformatics* 31, 445–446. doi: 10.1093/bioinformatics/btu627.
- Pusztahelyi, T., Holb, I., és Pócsi, I. (2015). Secondary metabolites in fungus-plant interactions. *Frontiers in Plant Science* 6. Available at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2015.00573> [Elérés január 17, 2024].
- Pusztahelyi, T., Pócsi, I., és Szentirmai, A. (1997). Aging of *Penicillium chrysogenum* cultures under carbon starvation: II: protease and N-acetyl-b-D-hexosaminidase production. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 25, 87–93. doi: 10.1111/j.1470-8744.1997.tb00418.x.
- Qiao, Y.-M., Yu, R.-L., és Zhu, P. (2019). Advances in targeting and heterologous expression of genes involved in the synthesis of fungal secondary metabolites. *RSC Advances* 9, 35124–35134. doi: 10.1039/C9RA06908A.
- R Core Team (2021). R: A language and environment for statistical computing. Available at: <https://www.R-project.org/> [Elérés december 22, 2022].
- Ráduly, Z., Szabó, L., Madar, A., Pócsi, I., és Csernoch, L. (2020). Toxicological and Medical Aspects of *Aspergillus*-Derived Mycotoxins Entering the Feed and Food Chain. *Frontiers in Microbiology* 10. Available at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2019.02908> [Elérés december 20, 2022].
- Raffa, N., és Keller, N. P. (2019). A call to arms: Mustering secondary metabolites for success and survival of an opportunistic pathogen. *PLOS Pathogens* 15, e1007606. doi: 10.1371/journal.ppat.1007606.

- Rangel, L. I., Hamilton, O., de Jonge, R., és Bolton, M. D. (2021). Fungal social influencers: secondary metabolites as a platform for shaping the plant-associated community. *The Plant Journal* 108, 632–645. doi: 10.1111/tpj.15490.
- Ries, L. N. A., Beattie, S. R., Espeso, E. A., Cramer, R. A., és Goldman, G. H. (2016). Diverse Regulation of the CreA Carbon Catabolite Repressor in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* 203, 335–352. doi: 10.1534/genetics.116.187872.
- Rittenour, W. R., Si, H., és Harris, S. D. (2009). Hyphal morphogenesis in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Biology Reviews* 23, 20–29. doi: 10.1016/j.fbr.2009.08.001.
- Roggenkamp, R., Sahm, H., és Wagner, F. (1974). Microbial assimilation of methanol induction and function of catalase in *Candida boidinii*. *FEBS Letters* 41, 283–286. doi: 10.1016/0014-5793(74)81230-5.
- Romsdahl, J., és Wang, C. C. C. (2019). Recent advances in the genome mining of *Aspergillus* secondary metabolites (covering 2012-2018). *Medchemcomm* 10, 840–866. doi: 10.1039/c9md00054b.
- Roze, L. V., Chanda, A., Wee, J., Awad, D., és Linz, J. E. (2011). Stress-related Transcription Factor AtfB Integrates Secondary Metabolism with Oxidative Stress Response in *Aspergilli*. *Journal of Biological Chemistry* 286, 35137–35148. doi: 10.1074/jbc.M111.253468.
- Ruepp, A., Zollner, A., Maier, D., Albermann, K., Hani, J., Mokrejs, M., és mtsai. (2004). The FunCat, a functional annotation scheme for systematic classification of proteins from whole genomes. *Nucleic Acids Research* 32, 5539–5545. doi: 10.1093/nar/gkh894.
- Ruijter, G. J. G., és Visser, J. (1997). Carbon repression in aspergilli. *FEMS Microbiology Letters* 151, 103–114. doi: 10.1111/j.1574-6968.1997.tb12557.x.
- Ruiz-Villafán, B., Cruz-Bautista, R., Manzo-Ruiz, M., Passari, A. K., Villarreal-Gómez, K., Rodríguez-Sanoja, R., és mtsai. (2022). Carbon catabolite regulation of secondary metabolite formation, an old but not well-established regulatory system. *Microbial Biotechnology* 15, 1058–1072. doi: 10.1111/1751-7915.13791.
- Rytioja, J., Hildén, K., Yuzon, J., Hatakka, A., de Vries, R. P., és Mäkelä, M. R. (2014). Plant-Polysaccharide-Degrading Enzymes from *Basidiomycetes*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 78, 614–649. doi: 10.1128/MMBR.00035-14.
- Sakekar, A. A., Gaikwad, S. R., és Punekar, N. S. (2021). Protein expression and secretion by filamentous fungi. *Journal of Biosciences* 46, 5. doi: 10.1007/s12038-020-00120-8.
- Salakkam, A., és Webb, C. (2018). Production of poly(3-hydroxybutyrate) from a complete feedstock derived from biodiesel by-products (crude glycerol and rapeseed meal). *Biochemical Engineering Journal* 137, 358–364. doi: 10.1016/j.bej.2018.06.018.
- Saloheimo, M., Valkonen, M., és Penttilä, M. (2003). Activation mechanisms of the HAC1-mediated unfolded protein response in filamentous fungi. *Molecular Microbiology* 47, 1149–1161. doi: 10.1046/j.1365-2958.2003.03363.x.
- Sámi, L., Emri, T., és Pócsi, I. (2001). Autolysis and ageing of *Penicillium chrysogenum* cultures under carbon starvation: glutathione metabolism and formation of reactive oxygen species. *Mycological Research* 105, 1246–1250. doi: 10.1016/S0953-7562(08)61996-6.

- Samson, R. A., Visagie, C. M., Houbraken, J., Hong, S. B., Hubka, V., Klaassen, C. H. W., és mtsai. (2014). Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Studies in Mycology* 78, 141–173. doi: 10.1016/j.simyco.2014.07.004.
- Sanchez, J. F., Somoza, A. D., Keller, N. P., és Wang, C. C. C. (2012). Advances in *Aspergillus* secondary metabolite research in the post-genomic era. *Natural Product Reports* 29, 351–371. doi: 10.1039/C2NP00084A.
- Santos, L. O., Silva, P. G. P., Lemos Junior, W. J. F., de Oliveira, V. S., és Anschau, A. (2022). Glutathione production by *Saccharomyces cerevisiae*: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology* 106, 1879–1894. doi: 10.1007/s00253-022-11826-0.
- Sato, I., Shimizu, M., Hoshino, T., és Takaya, N. (2009). The Glutathione System of *Aspergillus nidulans* Involves a Fungus-specific Glutathione S-Transferase. *Journal of Biological Chemistry* 284, 8042–8053. doi: 10.1074/jbc.M807771200.
- Saykhedkar, S., Ray, A., Ayoubi-Canaan, P., Hartson, S. D., Prade, R., és Mort, A. J. (2012). A time course analysis of the extracellular proteome of *Aspergillus nidulans* growing on sorghum stover. *Biotechnology for Biofuels* 5, 52. doi: 10.1186/1754-6834-5-52.
- Schafer, F. Q., és Buettner, G. R. (2001). Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radical Biology and Medicine* 30, 1191–1212. doi: 10.1016/S0891-5849(01)00480-4.
- Schmacht, M., Lorenz, E., és Senz, M. (2017). Microbial production of glutathione. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 33, 106. doi: 10.1007/s11274-017-2277-7.
- Shapiro, R. S., Robbins, N., és Cowen, L. E. (2011). Regulatory circuitry governing fungal development, drug resistance, and disease. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 75, 213–267. doi: 10.1128/MMBR.00045-10.
- Shwab, E. K., Bok, J. W., Tribus, M., Galehr, J., Graessle, S., és Keller, N. P. (2007). Histone deacetylase activity regulates chemical diversity in *Aspergillus*. *Eukaryotic Cell* 6, 1656–1664. doi: 10.1128/EC.00186-07.
- Smirnova, G. V., és Oktyabrsky, O. N. (2005). Glutathione in Bacteria. *Biochemistry (Moscow)* 70, 1199–1211. doi: 10.1007/s10541-005-0248-3.
- Smith, P., és Schuster, M. (2019). Public goods and cheating in microbes. *Current Biology* 29, R442–R447. doi: 10.1016/j.cub.2019.03.001.
- Spitzmüller, Z., Hajdú, M., Pócsi, I., és Emri, T. (2015a). Degradation of glutathione in *Aspergillus nidulans* — Short communication. *Acta Biologica Hungarica* 66, 242–245. doi: 10.1556/018.66.2015.2.10.
- Spitzmüller, Z., Kwon, N.-J., Szilágyi, M., Keserű, J., Tóth, V., Yu, J.-H., és mtsai. (2015b). γ -Glutamyl transpeptidase (GgtA) of *Aspergillus nidulans* is not necessary for bulk degradation of glutathione. *Archives of Microbiology* 197, 285–297. doi: 10.1007/s00203-014-1057-0.
- Staden, S., Milcu, A., Rohlfs, M., és Scheu, S. (2011). Olfactory cues associated with fungal grazing intensity and secondary metabolite pathway modulate *Collembola* foraging behaviour. *Soil Biology and Biochemistry* 43, 1411–1416. doi: 10.1016/j.soilbio.2010.10.002.

- Subramaniam, R., és Rampitsch, C. (2013). Towards Systems Biology of Mycotoxin Regulation. *Toxins* 5, 675–682. doi: 10.3390/toxins5040675.
- Szilágyi, M., Anton, F., Pócsi, I., és Emri, T. (2018). Autolytic enzymes are responsible for increased melanization of carbon stressed *Aspergillus nidulans* cultures. *Journal of Basic Microbiology* 58, 440–447. doi: 10.1002/jobm.201700545.
- Szilágyi, M., Kwon, N.-J., Bakti, F., M-Hamvas, M., Jámbrik, K., Park, H., és mtsai. (2011). Extracellular proteinase formation in carbon starving *Aspergillus nidulans* cultures – physiological function and regulation. *Journal of Basic Microbiology* 51, 625–634. doi: 10.1002/jobm.201100068.
- Szilágyi, M., Kwon, N.-J., Dorogi, C., Pócsi, I., Yu, J.-H., és Emri, T. (2010). The extracellular β -1,3-endoglucanase EngA is involved in autolysis of *Aspergillus nidulans*. *Journal of Applied Microbiology* 109, 1498–1508. doi: 10.1111/j.1365-2672.2010.04782.x.
- Szilágyi, M., Miskei, M., Karányi, Z., Lenkey, B., Pócsi, I., és Emri, T. (2013). Transcriptome changes initiated by carbon starvation in *Aspergillus nidulans*. *Microbiology (Reading)* 159, 176–190. doi: 10.1099/mic.0.062935-0.
- Tabata, S. (2011). „Yeasts and Molds | Mycotoxins: Aflatoxins and Related Compounds”, in *Encyclopedia of Dairy Sciences (Second Edition)*, szerk. J. W. Fuquay (San Diego: Academic Press), 801–811. doi: 10.1016/B978-0-12-374407-4.00369-1.
- Tavakoli, M., Hedayati, M. T., Mirhendi, H., Nouripour-Sisakht, S., Hedayati, N., Saghafi, F., és mtsai. (2020). The first rare and fatal case of invasive aspergillosis of spinal cord due to *Aspergillus nidulans* in an Iranian child with chronic granulomatosis disease: review of literature. *Current Medical Mycology* 6, 55–60. doi: 10.18502/cmm.6.1.2551.
- Tell, L. A. (2005). Aspergillosis in mammals and birds: impact on veterinary medicine. *Medical Mycology* 43, S71–S73. doi: 10.1080/13693780400020089.
- Thompson, G. R., és Young, J.-A. H. (2021). Aspergillus Infections. *New England Journal of Medicine* 385, 1496–1509. doi: 10.1056/NEJMra2027424.
- Thön, M., Al-Abdallah, Q., Hortschansky, P., és Brakhage, A. A. (2007). The Thioredoxin System of the Filamentous Fungus *Aspergillus nidulans*: Impact On Development And Oxidative Stress Response. *Journal of Biological Chemistry* 282, 27259–27269. doi: 10.1074/jbc.M704298200.
- Toledano, M. B., Delaunay-Moisán, A., Outten, C. E., és Igarria, A. (2013). Functions and Cellular Compartmentation of the Thioredoxin and Glutathione Pathways in Yeast. *Antioxidants & Redox Signaling* 18, 1699–1711. doi: 10.1089/ars.2012.5033.
- Tomarelli, R. M., Charney, J., és Harding, M. L. (1949). The use of azoalbumin as a substrate in the colorimetric determination of peptic and tryptic activity. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 34, 428–433.
- Troppens, D. M., Köhler, A. M., Schlüter, R., Hoppert, M., Gerke, J., és Braus, G. H. (2020). Hülle Cells of *Aspergillus nidulans* with Nuclear Storage and Developmental Backup Functions Are Reminiscent of Multipotent Stem Cells. *mBio* 11, e01673-20. doi: 10.1128/mBio.01673-20.

- van Munster, J. M., Burggraaf, A.-M., Pocsi, I., Szilágyi, M., Emri, T., és Ram, A. F. J. (2016). „Post-genomic approaches to dissect carbon starvation responses in *Aspergilli*”, in *Aspergillus and Penicillium in the Post-genomic Era* (Caister Academic Press), 89–112. doi: 10.21775/9781910190395.06.
- van Munster, J. M., Daly, P., Delmas, S., Pullan, S. T., Blythe, M. J., Malla, S., és mtsai. (2014). The role of carbon starvation in the induction of enzymes that degrade plant-derived carbohydrates in *Aspergillus niger*. *Fungal Genetics and Biology* 72, 34–47. doi: 10.1016/j.fgb.2014.04.006.
- Varga, J., Szigeti, G., Baranyi, N., Kocsubé, S., O’Gorman, C. M., és Dyer, P. S. (2014). *Aspergillus*: Sex and Recombination. *Mycopathologia* 178, 349–362. doi: 10.1007/s11046-014-9795-8.
- Veeravalli, K., Boyd, D., Iverson, B. L., Beckwith, J., és Georgiou, G. (2011). Laboratory evolution of glutathione biosynthesis reveals natural compensatory pathways. *Nature Chemical Biology* 7, 101–105. doi: 10.1038/nchembio.499.
- Vivek-Ananth, R. P., Mohanraj, K., Vandanashree, M., Jhingran, A., Craig, J. P., és Samal, A. (2018). Comparative systems analysis of the secretome of the opportunistic pathogen *Aspergillus fumigatus* and other *Aspergillus* species. *Scientific Reports* 8, 6617. doi: 10.1038/s41598-018-25016-4.
- Wang, F., Krijgheld, P., Hulsman, M., de Bekker, C., Müller, W. H., Reinders, M., és mtsai. (2015). FluG affects secretion in colonies of *Aspergillus niger*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 107, 225–240. doi: 10.1007/s10482-014-0321-2.
- Wang, M., és Lu, X. (2016). Exploring the synergy between cellobiose dehydrogenase from *Phanerochaete chrysosporium* and cellulase from *Trichoderma reesei*. *Frontiers in Microbiology* 7, 620. doi: 10.3389/fmicb.2016.00620.
- Wang, X., Shi, C., Chen, G., Jiang, J., Zhang, C., Qiao, Y., és mtsai. (2019). Characterization of recombinant glutathione reductase from Antarctic yeast *Rhodotorula mucilaginosa*. *Polar Biology* 42, 2249–2258. doi: 10.1007/s00300-019-02603-3.
- Wang, X.-C., és Zhuang, W.-Y. (2022). New Species of *Aspergillus* (*Aspergillaceae*) from Tropical Islands of China. *Journal of Fungi* 8, 225. doi: 10.3390/jof8030225.
- White, S., McIntyre, M., Berry, D. R., és McNeil, B. (2002). The autolysis of industrial filamentous fungi. *Critical Reviews in Biotechnology* 22, 1–14. doi: 10.1080/07388550290789432.
- Winderickx, J., Holsbeeks, I., Lagatie, O., Giots, F., Thevelein, J., és de Winde, H. (2003). „From feast to famine; adaptation to nutrient availability in yeast”, in *Yeast Stress Responses Topics in Current Genetics.*, szerk. S. Hohmann és W. H. Mager (Berlin, Heidelberg: Springer), 305–386. doi: 10.1007/3-540-45611-2_7.
- Wu, J., és Bauer, C. E. (2008). „RegB/RegA, A Global Redox-Responding Two-Component System”, in *Bacterial Signal Transduction: Networks and Drug Targets Advances in Experimental Medicine and Biology.*, szerk. R. Utsumi (New York, NY: Springer), 131–148. doi: 10.1007/978-0-387-78885-2_9.

- Xia, Y., Yu, H., Zhou, Z., Takaya, N., Zhou, S., Wang, P. (2018). Peroxiredoxin System of *Aspergillus nidulans* Resists Inactivation by High Concentration of Hydrogen Peroxide-Mediated Oxidative Stress. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 28(1):145-156. doi: 10.4014/jmb.1707.07024.
- Yamazaki, H., Tanaka, A., Kaneko, J., Ohta, A., és Horiuchi, H. (2008). *Aspergillus nidulans* ChiA is a glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored chitinase specifically localized at polarized growth sites. *Fungal Genetics and Biology* 45, 963–972. doi: 10.1016/j.fgb.2008.02.008.
- Yoshimi, Y., Yaguchi, K., Kaneko, S., Tsumuraya, Y., és Kotake, T. (2017). Properties of two fungal endo- β -1,3-galactanases and their synergistic action with an exo- β -1,3-galactanase in degrading arabinogalactan-proteins. *Carbohydrate Research* 453–454, 26–35. doi: 10.1016/j.carres.2017.10.013.
- Yu, J.-H. (2006). Heterotrimeric G protein signaling and RGSs in *Aspergillus nidulans*. *Journal of Microbiology* 44, 145–154.
- Yu, J.-H. (2010). Regulation of Development in *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus fumigatus*. *Mycobiology* 38, 229–237. doi: 10.4489/MYCO.2010.38.4.229.
- Yu, Q., Zhang, B., Li, J., Zhang, B., Wang, H. és Li, M. (2016). Endoplasmic reticulum-derived reactive oxygen species (ROS) is involved in toxicity of cell wall stress to *Candida albicans*. *Free Radical Biology and Medicine*. 99, 572-583. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.09.014
- Zhou, Y., Lv, H., Li, H., Li, J., Yan, Y., Liu, F., Hao, W., Zhou, Z., Wang, P., Zhou, S. (2021) Nitroreductase Increases Menadione-Mediated Oxidative Stress in *Aspergillus nidulans*. *Applied and Environmental Microbiology* 87(24). doi: 10.1128/aem.01758-21.
- Znameroski, E. A., és Glass, N. L. (2013). Using a model filamentous fungus to unravel mechanisms of lignocellulose deconstruction. *Biotechnology for Biofuels* 6, 6. doi: 10.1186/1754-6834-6-6.

10. Tárgyszavak

Aspergillus nidulans

CAZyme

glutation-lebontás

mikotoxin-termelés

oxidatív stressz

RNS szekvenálás

szekunder anyagcsere

szénstressz

transzkripciós szabályozás

10.1. Keywords

Aspergillus nidulans

carbon stress

CAZyme

glutathione degradation

mycotoxin production

oxidative stress

RNA sequencing

secondary metabolism

transcriptional regulation

11. Köszönetnyilvánítás

Szeretném kifejezni hálámat témavezetőmnek, **Prof. Dr. Emri Tamás** egyetemi tanárnak, akinek elkötelezett iránymutatása, valamint a kritikus helyzetekben mutatott türelme és humorérzéke nélkül ez a dolgozat nem készülhetett volna el. Kutatói példamutatása nagy mértékben járult hozzá szakmai fejlődésemhez az elmúlt évek során. Hálával tartozom továbbá **Prof. Dr. Pócsi István** tanszékvezető egyetemi tanárnak is, hogy hozzájárult a munkám kivitelezéséhez szükséges feltételek megteremtéséhez a DE TTK Molekuláris Biotechnológiai és Mikrobiológiai Tanszéken. Nem utolsó sorban szeretném megköszönni **Tóth Gáborné** laboratóriumi asszisztensnek, **Bori Ákos**, **Fekete Fanni**, **Kenyeres Zoltán** és **Palczert Zoltán** egyetemi hallgatóknak, valamint a tanszék minden kedves munkatársának a laboratóriumi tevékenységek során nyújtott támogatást.

Köszönet illeti még **Dr. Heungyun Harrison Moon** és **Prof. Dr. Jae-Hyuk Yu** (University of Wisconsin-Madison, Madison, WI, USA) munkáját, hogy létrehozták és rendelkezésünkre bocsátották a kísérletek során vizsgált géndelégiós és komplementált törzseket. Köszönettel tartozom továbbá **Dr. Poliska Szilárdnak** (DE ÁOK Genomi Medicina és Bioinformatikai Szolgáltató Laboratórium) az RNS-izolátumok minőségellenőrzésének és szekvenálásának kivitelezéséért, **Dr. Antal Károlynak** (Eszterházy Károly Katolikus Egyetem, Eger) a bioinformatikai és statisztikai vizsgálatok során nyújtott támogatásért, **Prof. Dr. Pusztahelyi Tündének** (DE MÉK Agrárműszerközpont) a szterigmatocisztin-extraktumok kvantitatív analízisében való segítségéért, **Dr. Birkó Zsuzsának** és **Dr. Keserű Juditnak** (DE ÁOK Humán genetikai Tanszék) a fehérje preparátumok elválasztásáért, valamint **Prof. Dr. Csósz Évának** és munkatársainak (DE ÁOK Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet) a proteomikai elemzésekben való segítségnyújtásért.

Nem utolsósorban szeretném megköszönni feleségemnek, családomnak és barátaimnak azt a bizalmat, illetve ösztönzést, melyeknek szerepe az értekezés elkészültében kitüntetett jelentőséggel bírt.

A kutatás finanszírozása az OTKA K131767, EFOP-3.6.1-16-2016-00022 és ÚNKP-20-3 azonosítószámú pályázatok segítségével valósult meg. A projekt a HUN-REN Magyar Kutatási Hálózat anyagi támogatásában részesült.

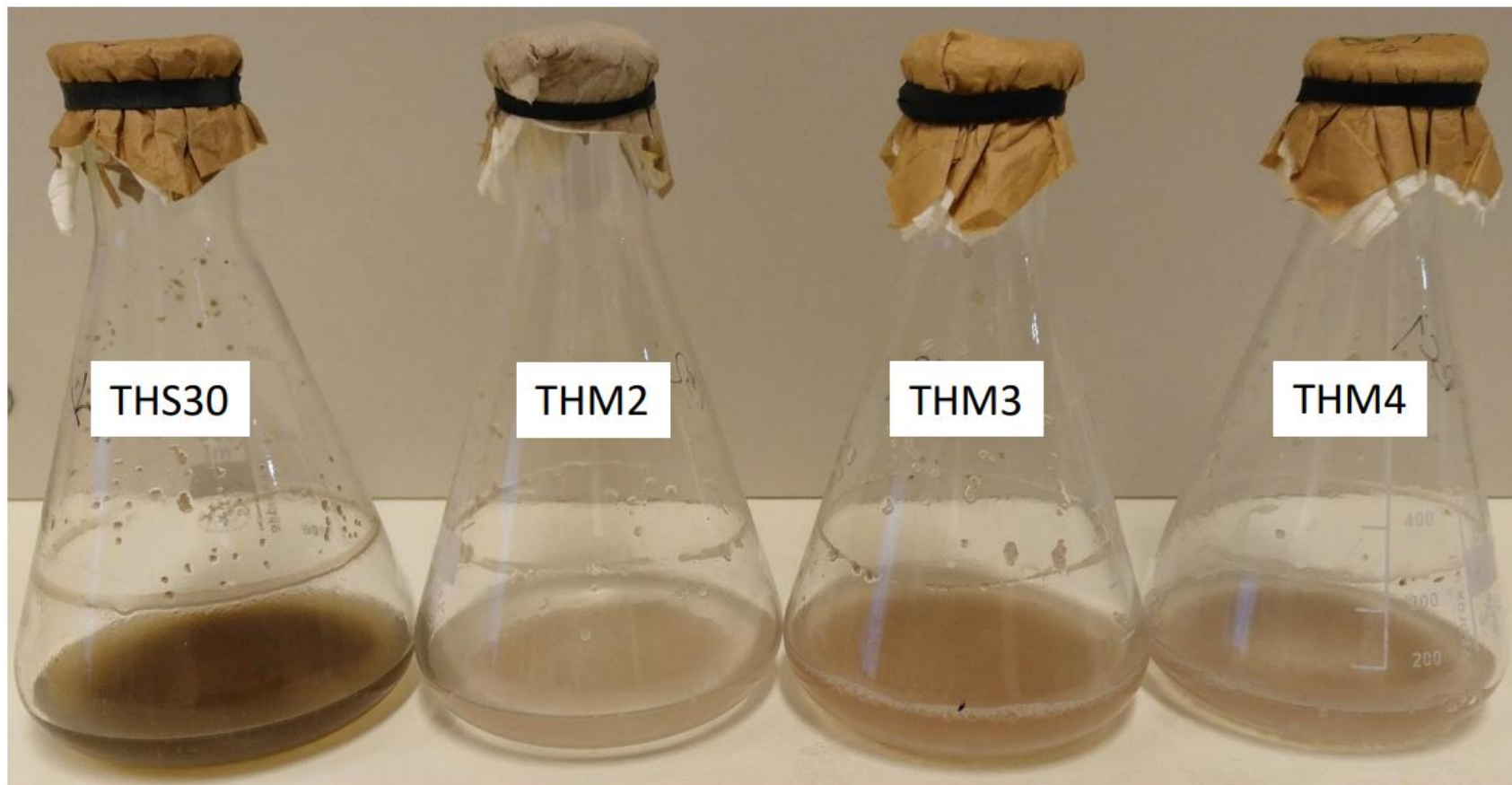
12. Függelék

12.1. Mellékletek

1. melléklet Az RT-qPCR során alkalmazott primerpárok szekvenciái

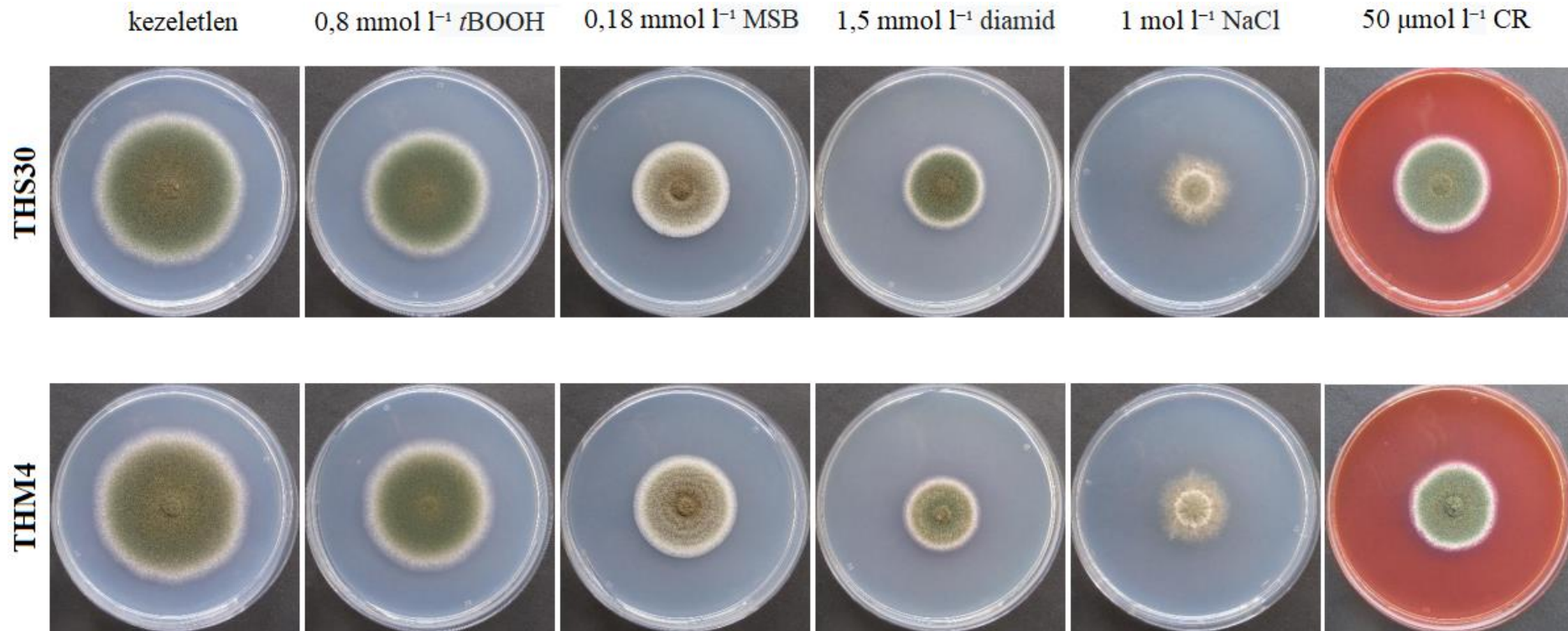
Gén	Forward primer szekvencia	Reverse primer szekvencia
AN0241 (<i>sodA</i>)	5'-CTTCCACATCCACCAGTTC-3'	5'-CAGCGTTACCAGTCTTCTTG-3'
AN0351 (<i>gfdA</i>)	5'-ATCCTGCCTCTTCTCTTTG-3'	5'-ACTCCTTCCTCATCCACATC-3'
AN0399 (<i>nrtB</i>)	5'-GCGGGACAGATTGAGAGTTC-3'	5'-AGAGGGAAGTTGAGGAGATAG-3'
AN0423 (<i>xyrA</i>)	5'-ATTGGGTAAGGCGACTATCC-3'	5'-AAGGTATGGGTGGTGCTC-3'
AN0756 (<i>lacA</i>)	5'-GCTGCTGGTGTGCTCTTAC-3'	5'-ACTCTCCTGGCTTTCCTTCG-3'
AN0942 (<i>ladA</i>)	5'-CCTTTACTCTTTCACCTCTCC-3'	5'-TCACCACTCTTCACCTCTTCG-3'
AN0973 (<i>brlA</i>)	5'-CGACTTTCTCTCTGGATACGATG-3'	5'-CTGGTGACGGTAGTTGTTGTTG-3'
AN1006 (<i>niaD</i>)	5'-TATGTCGTCCCAAACCCG-3'	5'-TTATTCTTCGTCCGCCTCC-3'
AN1017 (<i>hogA</i>)	5'-ACCCCTCACCTCTCACTCATC-3'	5'-TCCAAAAGCACCCATTCCTAC-3'
AN1092 (<i>dugC</i>)	5'-ACTGCGAAACTTGGAACGG-3'	5'-CTAAGAACAATGCGAATGCC-3'
AN1414 (<i>xprG</i>)	5'-CGATGCCAGTATATCCGTG-3'	5'-GTCAGTTCTGCTCCTTG-3'
AN1812 (<i>jlbA</i>)	5'-ATCTCTCCCCATTTCCTCAGC-3'	5'-GTCGTCCGCCGTAGTTGTG-3'
AN1879 (<i>dugB</i>)	5'-GCAATGGACAATACAGGGC-3'	5'-GGGAATGGATGGAATAGAGC-3'
AN2463 (<i>lacF</i>)	5'-CGGGCACACTTCTACTCATA-3'	5'-TACGACACATTTGGCGGCG-3'
AN2814 (<i>lacpB</i>)	5'-CGTCTCCTTCTGCTGTGC-3'	5'-GTGCTTGCCGTTGCGATG-3'
AN3150 (<i>gcsA</i>)	5'-AGGAGGGAGGTAGCAAAAG-3'	5'-CAGATGGAGGGTAATAAGGC-3'
AN3199 (<i>lacpA</i>)	5'-CGATTCCAGCCGTCTTCTTC-3'	5'-AGCCGTAAACAACCCAGC-3'
AN3201 (<i>lacD</i>)	5'-GCTGCTGAACGGGGATTG-3'	5'-GGGGAACGGGAAGATGAC-3'
AN3581 (<i>trxR</i>)	5'-TGGCAGAACGGTATCAGCG-3'	5'-GCGGACAAGCACGGTAACG-3'
AN4189 (<i>mkkA</i>)	5'-CATAACCACCGACCCAAATC-3'	5'-GACTCCTTCCGCTACTTTTCC-3'
AN4871 (<i>chiB</i>)	5'-TGGTCACCAGGCGAATCTC-3'	5'-CGGGACGAAGGATCATA-3'
AN4957 (<i>galE</i>)	5'-CGCTGAGGTTTATGCCACTG-3'	5'-CACTGCTGTAGGGAGGAC-3'
AN5296 (<i>tsaA</i>)	5'-GTTGAGCCGCATCTACCG-3'	5'-CTATCTTTTCCCCGACCACG-3'
AN5893 (<i>flbA</i>)	5'-CCTCCCGTCTTTCACCTC-3'	5'-CACTTGCGAAGCCTTGCG-3'
AN5982 (<i>torA</i>)	5'-GCTGGACACACTGGAAAAGG-3'	5'-ATCAAGGACGCAAAATCGG-3'
AN6388 (<i>lacE</i>)	5'-ATGTCGTGCGTCTGCCTC-3'	5'-GTTCTCTTCCCTTGCTGC-3'
AN6542 (<i>actA</i>)	5'-GAAGTCCTACGAACTGCCTGATG-3'	5'-AAGAACGCTGGGCTGGAA-3'
AN6700	5'-CTATTCCCGAGCAAGTTC-3'	5'-TGATGTTCTGACGATGGC-3'
AN6838 (<i>tubC</i>)	5'-CGGAAACTCGCCGTCAATAT-3'	5'-GGGCAAACCCGACAATAA-3'
AN7572 (<i>srrB</i>)	5'-AAGAACGGGAGAACCTGAG-3'	5'-GCACAGATACACGGATGAAC-3'
AN8218 (<i>trxB</i>)	5'-TCACCTCAATCGTCCCTG-3'	5'-TGCTCGTATCCGTCACAC-3'
AN8445	5'-TTGAAGCCACGACAATGAC-3'	5'-AGATGCCTACGATACCAG-3'
AN8692 (<i>prxA</i>)	5'-CTGGACTGAGGAGAAGGG-3'	5'-CAAGGACGGCAACAACATCG-3'
AN9064 (<i>xdhA</i>)	5'-TCTATTGTGCTGTGCGGTAG-3'	5'-TCCCAAGGTCATTCTCTGC-3'
AN9339 (<i>catB</i>)	5'-CCGAGCCCACAACACTTAC-3'	5'-GTTGAGCGACGACAATGACG-3'
AN9397 (<i>hacA</i>)	5'-AGACGAAGAATGTGGTGGC-3'	5'-ACGCTGAAGAAGGAACTGG-3'
AN10153 (<i>sskB</i>)	5'-TCAACGCCGAACCTCAATAGG-3'	5'-GCAGCATCACAATCATCACAG-3'
AN10220 (<i>ccpI</i>)	5'-GCGACCAAGAACCAAGACC-3'	5'-AACCAACAGGCGGAAAACTC-3'
AN10543 (<i>galX</i>)	5'-TGACGGGATGGGATTCTTGAC-3'	5'-GGGATACGCAGGGTGATAG-3'
AN10550 (<i>galR</i>)	5'-TATCACAGAGGAGCAACGGG-3'	5'-TCATCAGAGGGAGGAAGAACC-3'

2. melléklet A DUG-útvonal gátlásának hatása az *A. nidulans* tenyészetek melaninizációjára



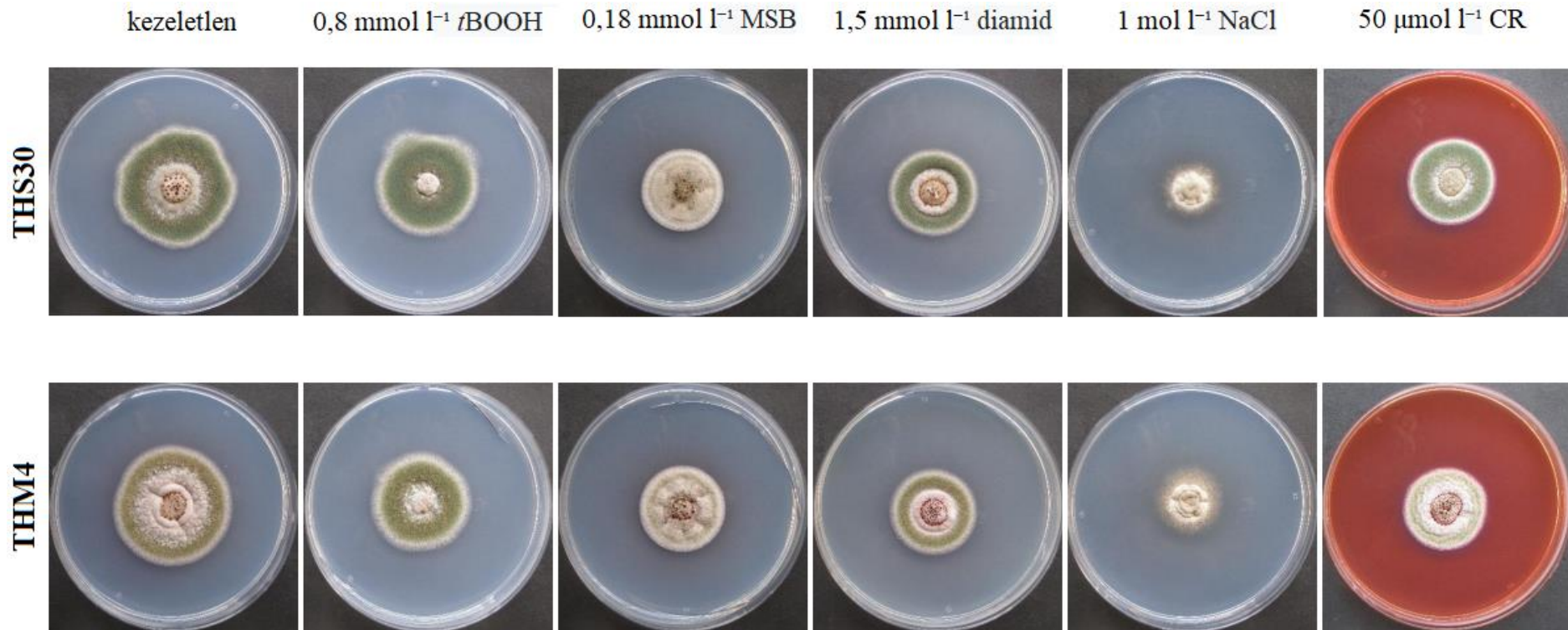
A vizsgálatba az *A. nidulans* THM2 ($\Delta dugB$), a THM3 ($\Delta dugC$) és THM4 ($\Delta dugB-\Delta dugC$) mutáns törzsek, valamint a THS30 referencia törzs került bevonásra. Az ábra a micéliumok szénforrásmentes tápközegbe való átmosását követő 5. napon készült reprezentatív fényképet mutatja be.

3A. melléklet A DUG-útvonal gátlásának hatása a felületi *A. nidulans* tenyészetek oxidatív stressz-toleranciájára



A THM4 ($\Delta dugB-\Delta dugC$) mutáns és a THS30 referencia törzs oxidatív stresszérzékenységének összehasonlítását végeztük el 10 g l⁻¹ glükóz tartalmú agarlemezekken. Az ábra a leoltást követő 5. napon készült reprezentatív fényképeket mutatja be. A petri-csészék átmérője 85 mm volt. A kísérleteket három biológiai ismétléssel végeztük. A két törzs növekedése között nem találtunk szignifikáns különbséget egyik vizsgált esetben sem (Student-féle *t*-teszt, $p < 0,05$).
tBOOH: *tert*-butil-hidroperoxid; MSB: menadion-nátrium-biszulfít; CR: kongóvörös (Congo red)

3B. melléklet A DUG-útvonallal gátlásának hatása a felületi *A. nidulans* tenyészetek oxidatív stressz-toleranciájára



A THM4 (*ΔdugB-ΔdugC*) mutáns és a THS30 referencia törzs oxidatív stresszérzékenységeinek összehasonlítását végeztük el 40 g l⁻¹ glükóz tartalmú agarlemezeken. A kísérleteket három biológiai ismétléssel végeztük. Az ábra a leoltást követő 5. napon készült reprezentatív fényképeket mutatja be. A petri-csészék átmérője 85 mm volt. A két törzs között nem találtunk szignifikáns különbséget egyik vizsgált esetben sem (Student-féle *t*-teszt, $p < 0,05$).

Megjegyzés: A kezeletlen kultúrák radiális növekedése kisebb, azonban biomassza-termelésük nagyobb a 40 g l⁻¹ glükóz tartalmú táptalajon, mint 10 g l⁻¹ glükózon (Emri és mtsai. 2018).

tBOOH: *tert*-butil-hidroperoxid; MSB: menadion-nátrium-biszulfid; CR: kongóvörös (Congo red)

4. melléklet Az *A. nidulans* THM4 mutáns és THS30 referencia törzsek szénéhező, valamint növekedő tenyészeiteinek GSE vizsgálatának összefoglaló táblázata.

Összehasonlítás ^a	Reguláció	Dúsult géncsoportok ^b
Szénéhezés vs. glükóz (THS30)	Felülszabályozott	Zsír-sav-lebontás; monodiktílfenon bioszintézis
	Alülszabályozott	Mitokondrium szerveződés; aerob légzés; transzláció; α -aminosav bioszintézis; aszpartát családba tartozó aminosav bioszintézis; szerin családba tartozó aminosav metabolikus folyamatok; kén aminosav metabolikus folyamatok; purin-tartalmú vegyületek bioszintézise; ribóz-foszfát bioszintézise; sejtválasz az ozmotikus stresszre
Szénéhezés vs. glükóz (THM4)	Felülszabályozott	Transzkripció (DNS-templált); transzkripció szabályozása (DNS-templált); zsír-sav lebontás; zsír-sav β -oxidáció; szekunder metabolit bioszintézis; monodiktílfenon bioszintézis
	Alülszabályozott	Mitokondrium szerveződés; aerob légzés; transzláció; α -aminosav bioszintézis; aszpartát családba tartozó aminosav bioszintézis; szerin családba tartozó aminosav metabolikus folyamatok; metionin metabolikus folyamatok; ribóz-foszfát bioszintézis; szénhidrát származék bioszintézis
THM4 vs. THS30 (glükóz)	Felülszabályozott	
	Alülszabályozott	Gomba típusú sejt-fal szerveződés vagy biogenezis; aszexuális sporuláció; szexuális sporuláció; fehérje foszforilációs jelátvitel; stressz által aktivált MAPK-kaszád
THM4 vs. THS30 (szénéhezés)	Felülszabályozott	Másodlagos anyagcsere-folyamatok; STC bioszintézis; F-9775B bioszintézis
	Alülszabályozott	GSH-lebontás

^a – A teljes adatsor Gila és mtsai. (2021) közleményének „S3” táblázatában található meg. Ezek az adatok csak terjedelmi okok miatt nem kerültek bele a dolgozatba.

^b – A géncsoportok a „biological process GO term” kategória alapján kerültek meghatározásra

GSE: géncsoport dúsulás (gene set enrichment); STC: szterigmatocisztin; GSH: redukált glutation

5. melléklet A szénstressznek kitett *A. nidulans* kultúrák GSE vizsgálatának összefoglaló táblázata.

Összehasonlítás ^a	Dúsult géncsoportok ^b	
	Felülszabályozott	Alulszabályozott
Laktóz vs. glükóz (1749/1276)	glicerolipid anyagcsere, zsírsav anyagcsere, poliszacharid lebontás, mannán lebontás, xilán lebontás, cellulóz lebontás, arabinóz anyagcsere folyamat, D-xilóz anyagcsere folyamat, xilulóz anyagcsere folyamat, galaktóz anyagcsere folyamat, fruktóz és mannóz anyagcsere; alfa-galaktozidáz aktivitás, szekunder anyagcsere, STC-bioszintézis, melaninok anyagcsereje, fenilalanin anyagcsere, triptofán anyagcsere, tirozin anyagcsere	glikolitikus folyamat, glükoneogenezis, légzés, mitokondrium, szteroid bioszintézis, vitaminok, kofaktorok és proszтетikus csoportok bioszintézise, szekunder metabolitok bioszintézise
Arabinogalaktán vs. glükóz (2159/1705)	glicerolipid anyagcsere, zsírsavak oxidációja, sejtfa szerkezet, extracelluláris poliszacharidok lebontása, pektin lebontás, xilán lebontás, glükán lebontás, cellulóz lebontás, mannán lebontás, pentóz-foszfát útvonal, arabinóz anyagcsere folyamat, D-xilóz anyagcsere folyamat, galaktóz anyagcsere, β-glükozidáz aktivitás, szekunder anyagcsere, STC-bioszintézis, fenilalanin anyagcsere, triptofán anyagcsere, tirozin anyagcsere	glikolízis és glükoneogenezis, légzés, citrátciklus, mitokondrium, aminosavak bioszintézise, vitaminok, kofaktorok és proszтетikus csoportok bioszintézise, szteroid bioszintézis, pentóz-foszfát útvonal, fruktóz és mannóz anyagcsere, galaktóz anyagcsere, szekunder metabolitok bioszintézise, stresszre adott válasz, ozmotikus stresszválasz
Szénéhezés vs. glükóz (2371/1967)	glicerolipid anyagcsere, zsírsavak oxidációja, peroxiszóma, sejtfa szerkezet, extracelluláris poliszacharid lebontás, kitin katabolizmus, xilán lebontás, pektin lebontás, szekunder anyagcsere, STC-bioszintézis, melanin anyagcsere, fenilalanin anyagcsere, triptofán anyagcsere, tirozin anyagcsere	transzláció, riboszóma biogenezis, nukleotid-cukor anyagcsere, glikolízis és glükoneogenezis, légzés, Fe/S kötés, mitokondrium, sejtfa aminosav bioszintézis, cisztein bioszintézis, szulfát asszimiláció, szteroid bioszintézis, vitaminok, kofaktorok és proszтетikus csoportok bioszintézise, nehézfémion transzport, szekunder metabolitok bioszintézise, oxidatív stresszválasz, hő sokk válasz, ozmotikus stresszválasz

^a – A zárójelben feltüntetett számok a felül-/alulszabályozott gének számát jelölik az adott összehasonlításban. A teljes adatsor Gila és mtsai. (2022) közleményének „S6” táblázatában található meg. Ezek az adatok csak terjedelmi okok miatt nem kerültek bele a dolgozatba.

^b – A géncsoportok a „biological process GO term”, „FunCat term” és „KEGG term” kategóriák alapján kerültek meghatározásra.

GSE: géncsoport dúsulás (gene set enrichment); STC: szterigmatocisztin

12.2. A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/37/2025.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Gila Csaba Barnabás

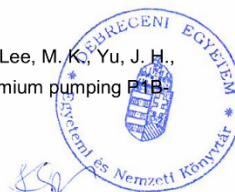
Doktori Iskola: Táplálkozás- és Élelmiszertudományi Doktori Iskola. Táplálkozástudományi Doktori Program

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Gila, C. B.**, Antal, K., Hádáné Birkó, Z., Keserű, J., Pócsi, I., Emri, T.: Strategies Shaping the Transcription of Carbohydrate-Active Enzyme Genes in *Aspergillus nidulans*.
J. Fungi. 8 (1), 1-23, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/jof8010079>
IF: 4.7
2. **Gila, C. B.**, Moon, H., Antal, K., Hajdú, M., Kovács, R., Jónás, A. P., Pusztahelyi, T., Yu, J. H., Pócsi, I., Emri, T.: The DUG Pathway Governs Degradation of Intracellular Glutathione in *Aspergillus nidulans*.
Appl. Environ. Microbiol. 87 (9), 1-19, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.01321-20>
IF: 5.005

További közlemények

3. Emri, T., Antal, K., Varga, K., **Gila, C. B.**, Pócsi, I.: The Oxidative Stress Response Highly Depends on Glucose and Iron Availability in *Aspergillus fumigatus*.
J. Fungi. 10 (3), 1-18, 2024.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/jof10030221>
IF: 4.2 (2023)
4. Vig, I., Benkő, Z., **Gila, C. B.**, Palczert, Z., Jakab, Á., Nagy, F., Miskei, M., Lee, M. K., Yu, J. H., Pócsi, I., Emri, T.: Functional characterization of genes encoding cadmium pumping P1B-type ATPases in *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus nidulans*.
Microbiol Spectr. 11 (5), 1-14, 2023.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/spectrum.00283-23>
IF: 3.7





5. Emri, T., Sümegi-Györi, V. M., Páll, K., **Gila, C. B.**, Pócsi, I.: Effect of the combinatorial iron-chelation and oxidative stress on the growth of *Aspergillus* species.
Res. Microbiol. 173 (8), 1-3, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.resmic.2022.103969>
IF: 2.6
6. Rácz, D., **Gila, C. B.**, Szőke, L., Széles, A.: N-Stabilizer and Foliar Fertilizer Treatments Enhance Tolerance to Specific Pathogens in Maize (*Zea mays* L.).
Agric. conspec. sci. 87 (1), 25-33, 2022.
7. Emri, T., Antal, K., **Gila, C. B.**, Jónás, A. P., Pócsi, I.: Stress Responses Elicited by Glucose Withdrawal in *Aspergillus fumigatus*.
J. Fungi. 8 (11), 1-19, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/jof8111226>
IF: 4.7
8. Emri, T., **Gila, C. B.**, Antal, K., Fekete, F., Moon, H., Yu, J. H., Pócsi, I.: AtfA-Independent Adaptation to the Toxic Heavy Metal Cadmium in *Aspergillus nidulans*.
Microorganisms. 9 (7), 1-23, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/microorganisms9071433>
IF: 4.926
9. Rácz, D., **Gila, C. B.**, Horváth, É., Illés, Á., Széles, A.: The efficiency of nitrogen stabilizer at different soil temperatures on the physiological development and productivity of maize (*Zea mays* L.).
Agron. Res. 19 (4), 1888-1900, 2021.
DOI: <https://doi.org/10.15159/AR.21.146>
10. Antal, K., **Gila, C. B.**, Pócsi, I., Emri, T.: General stress response or adaptation to rapid growth in *Aspergillus nidulans*?
Fungal Biology. 124 (5), 376-386, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.funbio.2019.10.009>
IF: 3.099





11. Emri, T., Vékony, V., **Gila, C. B.**, Nagy, F., Forgács, K., Pócsi, I.: Autolytic hydrolases affect sexual and asexual development of *Aspergillus nidulans*.
Folia Microbiol. 63 (5), 619-626, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s12223-018-0601-8>
IF: 1.448

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 34,378

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
9,705**

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudománymetriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2025.02.06.

