

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**Az AtfA és AtfB bZIP típusú transzkripciós faktorok vizsgálata
Aspergillus nidulans fonalas gombában**

Kocsis Beatrix

Témavezető: Dr. Leiter Éva



DEBRECENI EGYETEM
Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola

Debrecen, 2024

Az AtfA és AtfB bZIP típusú transzkripciós faktorok vizsgálata *Aspergillus nidulans* fonalas gombában

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
a gyógyszerészeti tudományok tudományágban

Írta: Kocsis Beatrix okleveles molekuláris biológus

Készült a Debreceni Egyetem Gyógyszerészeti Tudományok doktori iskolája
(Mikrobiológia programja) keretében

Témavezető: Dr. Leiter Éva, PhD

Az értekezés bírálói:

Dr. Hamari Zsuzsanna, PhD
Dr. Virág Eszter Andrea, PhD

A bírálóbizottság:

elnök:

Prof. Dr. Tósaki Árpád, az MTA doktora

tagok:

Dr. Hamari Zsuzsanna, PhD

Dr. Virág Eszter Andrea, PhD

Prof. Dr. Vágvölgyi Csaba, az MTA doktora

Prof. Dr. Batta Gyula, az MTA doktora

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK Belgyógyászati Intézet „A”
épület tanterme, 2024. szeptember 11. 13:00 óra.

1. Bevezetés

Selye János szerint a stressz az élő szervezetre gyakorolt nem fajlagos hatások (például betegséget okozó vagy gyógyszerek által kiváltott hatások) összességét jelenti. Stresszoroknak tekinthetők mindazok a tényezők, amelyek stresszt okozó képességgel jellemezhetők (Selye, 1973). A környezeti stresszhatások a mikroorganizmusok életfolyamataira is hatással vannak, amelyek leküzdésére különböző stratégiák kifejlesztésével van lehetőségük. Stressz hatására egyes transzkripciós faktorok (TF-ok) aktiválódása révén specifikus szignáltranszdukciós útvonalak bekapcsolásával képesek alkalmazkodni a környezeti változásokhoz (Guan és mtsai., 2017). A jelátviteli útvonalak szabályozása tehát alapvető szerepet játszik a mikroorganizmusok celluláris homeosztázisának fenntartásában. A TF-ok ezen szabályozási hálózatok meghatározó elemei (Leiter és mtsai., 2021).

Gombákban a kísérletesen igazolt TF funkciót betöltő fehérjék száma szignifikánsan kevesebb, mint a magasabbrendű eukariótákban, ez a TRANSFAC (<http://gene-regulation.com/pub/databases.html>) és Mycopath adatbázisokban (<https://www.biobase.cc>) is jól látható. Ez a tény kétféleképpen magyarázható: mivel logikus azon elképzelés, hogy minél komplexebb egy élőlény, annál több TF – ra van szüksége, ezért lehetséges, hogy a gombák valóban kevesebb TF-ral jellemezhetők, a másik lehetőség pedig, hogy sok TF-uk van, viszont ezek azonosítása még nem történt meg (Shelest, 2008).

A bZIP (bázikus leucin cipzár) típusú TF-ok az egyik legősibb TF-ok közé tartoznak, melyek egyetlen eukarióta génből jöttek létre az evolúció során (Leiter és mtsai., 2021). Emberben az egyik legismertebb az ATF2, amely olyan fontos folyamatokat szabályoz, mint a sejtciklus, a glikoziláció, a gyulladás vagy az aminosav éhezésre adott válasz (Watson és mtsai., 2017). Gombákban az első ATF2 ortológot *Schizosaccharomyces pombe*ban írták le Atf1 néven (Takeda és mtsai., 1995). Funkciójukat tekintve nagy változatosságot mutatnak, sokféle biológiai folyamat szabályozásában vesznek részt, úgy, mint a vegetatív növekedés, sporuláció, csírázás, virulencia, valamint az abiotikus és biotikus stresszre adott válaszreakciók (Zhao és mtsai., 2022). Az általunk tanulmányozott bZIP TF családba tartozó AtfA és AtfB a konídiumokban és a vegetatív micéliumban biztosítják az oxidatív stresszel szembeni védelmet számos fonalas gombában (Balázs és mtsai.; 2010, Roze és mtsai., 2011; Hagiwara és mtsai.; 2014; Silva és mtsai., 2021).

Így az AtfA a konídiumokban részt vesz többek között a stresszválaszok transzkripciós szintű szabályozásában, hozzájárul a konídiumok életképességének fenntartásához, biztosítja azok oxidatív, hő (Hagiwara és mtsai., 2008) és ozmotikus stresszel szembeni toleranciáját

(Balázs és mtsai., 2010), *Aspergillus nidulans*ban szerepe van továbbá az aszexuális fejlődésben, valamint *Fusarium verticillioides*ben a konídiumok nyugalmi állapotának fenntartásában (Szabó és mtsai., 2020). Oxidatív stressz alatt részt vesz számos elsődleges metabolikus útvonal (aminosav, zsírsav és trikarbonsav metabolikus folyamatok) szabályozásában is *A. nidulans*ban (Orosz és mtsai., 2017).

Az AtfB *Aspergillus oryzae*ben a konídiospórákban biztosítja az oxidatív (Wee és mtsai., 2017) és hőstresszel szembeni védelmet, valamint részt vesz a konídiumok fejlődése során olyan celluláris folyamatok szabályozásában, mint a különböző stresszhatásokkal szembeni tolerancia vagy a szén- és aminosav metabolizmus (Sakamoto és mtsai., 2008, Silva és mtsai., 2021). *Aspergillus parasiticus*ban az AtfB a szekunder anyagcsere, a stresszválasz és a konídiumok fejlődésének mesterregulátora (Wee és mtsai., 2017).

Doktori munkámban az *A. nidulans* bZIP TF-okat kódoló *atfA* és *atfB* gének további funkcióinak feltérképezésére a létrehozott deléciós és túltermelő mutánsok fenotípusos vizsgálatait, illetve a deléciós mutánsok és egy kontroll törzs transzkriptomikai analízisét hajtottuk végre.

2. Célkitűzések

Doktori munkámban az *A. nidulans* fonalas gomba bZIP típusú transzkripciós faktorait kódoló *atfA* és *atfB* gének funkcióinak részletesebb megismerése érdekében az alábbi célokat tűztük ki:

- Double-Joint PCR módszerrel a deléció (Δ), a *niiA* promótert tartalmazó pHS11 vektorral a túltermelő (OE) mutánsok előállítását az összes kombinációban: $\Delta atfA$, $\Delta atfB$, $\Delta atfA\Delta atfB$, $\Delta atfAatfBOE$, $\Delta atfBatfAOE$, $atfAOE$, $atfBOE$ és $atfAOEatfBOE$,
- A mutánsok stresszérzékenységének vizsgálatát szilárd táptalajon történő pontinokulációval oxidatív (diamid, MSB, *t*BOOH), ozmotikus (NaCl, szorbit), nehézfém ($CdCl_2$), sejtfal integritás stresszt (Kongóvíz) alkalmazva, valamint hőstresszel szembeni érzékenységük tanulmányozását 10 percig tartó 50 °C-os hőkezelés után a konídiospórák szélesztésével,
- Az ivaros (kleisztotécium képződésének indukálásával) és ivartalan (konídiospórák számának meghatározásával) szaporodás tanulmányozását,
- A konídiospórák méretének meghatározását fény- és scanning elektronmikroszkópos felvételek készítésével, valamint az *abaA* gén expressziójának meghatározását RT-qPCR segítségével,
- A szekunder metabolitok termelése szoros kapcsolatot mutat a környezeti, elsősorban oxidatív stresszel, így célul tűztük ki a sterigmatocisztin mikotoxin termelésének vékonyréteg kromatográfiás analízissel, illetve HPLC-s módszerrel történő meghatározását,
- A deléció mutánsok (a $\Delta atfA$, $\Delta atfB$, $\Delta atfA\Delta atfB$) és a kontroll THS30.3 törzs transzkriptomikai tanulmányozását újgenerációs RNS szekvenálással MSB-vel kezelt és stresszmentes táptalajon növesztett tenyészetek vegetatív micéliumaiból és konídiumaiból,
- Ezt követően az adatok összehasonlító transzkriptom vizsgálatát, majd a transzkriptomikai eredmények kiértékelését a törzseknél kapott globális génexpressziós mintázatok Venn-diagramos összehasonlításaival kívántuk végrehajtani.

3. Anyagok és módszerek

Az *atfA* (locus ID:AN2911) és az *atfB* (locus ID: AN8643) gének deléciójának előállítása Double-Joint PCR módszer (Yu és mtsai., 2004; Leiter és mtsai., 2016) alkalmazásával történt. A deléciós mutánsokat Dr. Mi-Kyung Lee készítette el (Koreai Biotudományi és Biotechnológiai Kutatóintézet (KRIBB), Biológiai Erőforrás Központ, Jeongeup-si, Koreai Köztársaság).

A túltermelő mutánsok előállításához a *pyroA* marker gén kódoló szekvenciájának háromnegyed részét tartalmazó pHS11 vektort használtuk (Kwon és munkatársai, 2010). Az ezzel a vektorral transzformálandó recipiens törzsek mutáció miatt piridoxinra mutatnak auxotrófiát. Az *atfA* vagy *atfB* gént tartalmazó plazmid a *pyroA4* helyre egyszeres rekombinációval épül be, ami megszünteti a piridoxin auxotrófiát. Az *atfA* és *atfB* géneket az *niiA* promóter és *trpC* terminátor régió közé klónoztuk be (Leiter és mtsai., 2016).

A túltermelő mutánsokban az *atfA* vagy *atfB* beépülését PCR-rel (EmeraldAmp MAX PCR polimeráz, Takarabio), a túltermelődést RT-qPCR módszerrel (Király és mtsai., 2020) ellenőriztük.

Stresszérzékenységi vizsgálatok

6 napos 37 °C-on minimál táptalajon inkubált tenyészetek spóráiból 2×10^7 /ml spórakoncentrációval, 5 μ l (100000 spóra) spóraszuszpenziót pontinokuláltunk különböző stresszt generáló anyagokat tartalmazó tápagra, majd 37 °C-on 5 napig inkubáltuk a törzseket (Balázs és mtsai., 2010). Kontroll törzsként a THS30.3 törzset használtuk.

Az oxidatív stresszt 2 mM diamid, 0,08 mM MSB (menadion nátrium biszulfít) és 0,8 mM *t*BOOH, az ozmotikus stresszt 1,5 M NaCl és 2 M szorbit, a nehézfém stresszt 300 μ M CdCl₂, illetve a sejtfal-integritás stresszt 54 μ M Kongóvörös jelenlétében végeztük. Emellett teszteltük a konidiospórák életképességét 50 °C-on 10 percig tartó hőstressz hatására (Hagiwara és mtsai., 2008, 2009).

A mutánsok élettani tulajdonságainak vizsgálata

Az ivaros szaporodás vizsgálatokban kleisztotécium képzést indukáltunk. Az érett kleisztotéciumokat a Petri-csészéken sztereomikroszkóp segítségével számoltuk meg és a területre (cm²-re) normálva meghatároztuk a mennyiségüket (Leiter és mtsai., 2016).

Az ivartalan szaporodás vizsgálatokban a mutáns valamint kontroll törzsek konidiospóra képzésének tanulmányozására a spórákat 3 ml spóramosó folyadékban, a teljes telep

leemosásával összegyűjtöttük Bürker-kamra alatt leszámoltuk és cm^2 -re vonatkoztatva adtuk meg mennyiségüket (Vargas-Pérez és mtsai., 2007).

A konidiospórák méretének meghatározásához fény- és scanning elektronmikroszkópos felvételek készítése után ToupView képfeldolgozó szoftverrel végeztük a spóraátmérők lemerését. Az elektronmikroszkópos felvételeket Dr Daróczy Lajos a Debreceni Egyetem, Természettudományi és Technológiai Kar, Fizikai Intézet, Szilárdtest Fizikai Tanszékének munkatársa készítette. A konidiofórok fejlődését szabályozó *abaA* gén (locus ID: AN0422) expresszióját RT-qPCR-rel határoztuk meg a kontroll törzsnél illetve a *ΔatfB* és *atfBOE* mutánsoknál. A mérések kivitelezésében Dr. Batta Gyula a Debreceni Egyetem, Természettudományi és Technológiai Kar, Biotechnológiai Intézet, Genetikai és Alkalmazott Mikrobiológiai Tanszékének munkatársa nyújtott segítséget, majd elvégeztük az összegyűjtött adatok kiértékelését.

A mutánsok sterigmatocisztin termelési képességét pontinokulált tenyészetekből határoztuk meg (Yin és mtsai., 2013) vékonyrétegekromatográfiával, majd HPLC analízissel. A méréseket Dr. Nagy Tibor a Debreceni Egyetem, Természettudományi és Technológiai Kar, Kémiai Intézet, Alkalmazott Kémiai Tanszékének munkatársa végezte.

A deléciós törzsek illetve a kontroll törzs újgenerációs RNS szekvenálással történő transzkriptomikai analízise

A Debreceni Egyetem Genomi Medicina és Bioinformatikai Szolgáltató Laboratóriumban Illumina NextSeq500 készülékkel újgenerációs RNS szekvenálás segítségével megvalósítottuk a deléciós mutánsok, a *ΔatfA*, *ΔatfB*, *ΔatfAΔatfB* valamint a kontroll törzs 0,04 mM koncentrációjú MSB-vel kezelt és stresszort nem tartalmazó táptalajon növesztett tenyészetek micélium és konidiospóra állapotainak transzkriptomikai tanulmányozását. A gének transzkripció aktivitásának bemutatására kiszámított RPKM értékek (Reads Per Kilobase of gene model per Million mapped reads) összehasonlításával meghatároztuk a relatív expressziós szinteket (Robinson és mtsai., 2010). A differenciáltan expresszálódó gének meghatározását Dr. Antal Károly (Eszterházy Károly Egyetem, Állattani Tanszék) végezte.

A transzkriptomikai adatok csoportosítása a vizsgált törzs, kezelés, illetve a fejlődési állapot szerint történt. A transzkriptomikai adatok kiértékelését Dr. Antal Károly (Eszterházy Károly Egyetem, Állattani Tanszék) és Prof. Dr. Emri Tamás (Debreceni Egyetem Természettudományi és Technológiai Kar, Molekuláris Biotechnológiai és Mikrobiológiai Tanszék valamint a HUN-REN-DE Gomba Stresszbiológiai Kutatócsoport munkatársa) végezték.

Az adatok kiértékeléséhez a gének alábbi kategóriáit hoztuk létre: AA géneknél csak az AtfA szabályoz, BB géneknél csak az AtfB szabályoz, AB géneknél mindkét TF (AtfA és AtfB) együttesen szükséges a gén normális működéséhez, A/B géneknél mindkét gén együttes szabályozása érvényesül, a hiányzó TF-t a másik TF teljesen helyettesíteni tudja, míg az A-B gének esetében mindkét gén együttes szabályozása érvényesül, de a hiányzó TF-t a másik csak részben tudja helyettesíteni.

A géncsoport dúsulás vizsgálatokban (Gene Set Enrichment Analysis = GSEA) a géneket a közöttük lévő expressziós különbségek korrelációjával rangsoroltuk (Subramanian és mtsai., 2005).

A kísérleti eredményeket három független mérés átlaga és szórása adta. Az átlagértékek közötti eltéréseket Student-féle t-próbával határoztuk meg, ahol csak a $p < 0,05$ értéket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

Az *atfA* és *atfB* gének relatív transzkript szintjeinek kiszámítása a ΔC_P meghatározásával ($\Delta C_P = C_{\text{Referencia}} - C_{\text{Ptesztelt gén}}$) történt (Balázs és munkatársai, 2010). Normalizációra az *actA* gén-t (locus ID: AN6542) használtuk.

4. Az új tudományos eredmények összefoglalása

A bZIP transzkripció faktorok fonalas gombákban a különböző fejlődési folyamatok, a stresszválaszok és a szekunder metabolit termelés fontos szabályozóiként szerepelnek (Kocsis és mtsai., 2022; Roze és mtsai., 2011; Yin és mtsai., 2012, 2013; Bákány és mtsai., 2021).

Jelen értekezés célja volt az *A. nidulans* fonalas gomba bZIP-típusú transzkripció faktorait kódoló *atfA* és *atfB* géneknek a funkcionális analízise, valamint újgenerációs RNS szekvenálással a deléciós mutánsok ($\Delta atfA$, $\Delta atfB$, $\Delta atfA\Delta atfB$) transzkriptomikai tanulmányozása. Az *atfA* és *atfB* gének élettani funkcióinak analíziséhez létrehoztuk a deléciós és a túltermelő mutánsokat az összes kombinációban: $\Delta atfA$, $\Delta atfB$, $\Delta atfA\Delta atfB$, $\Delta atfAatfBOE$, $\Delta atfBatfAOE$, $atfAOE$, $atfBOE$ és $atfAOEatfBOE$.

1. Az oxidatív, ozmotikus, nehézfém, sejtfal integritás és hőstressz vizsgálatok eredményei

1.1. A $\Delta atfA$, $atfBOE$ és az $atfAOEatfBOE$ törzsek csökkent növekedést mutattak stresszort nem tartalmazó minimál médiumon 37°C-on.

1.2. A $\Delta atfA$, $\Delta atfAatfBOE$ törzsnél valamint a két gén egyidejű deléciója esetén egyaránt diamiddal szembeni érzékenységet tapasztaltunk, míg az *atfB* deletálásával és túltermelésével diamidra toleráns fenotípust mutattunk ki.

1.3. Az AtfA oxidatív stresszel szembeni védelemben betöltött szerepét már igazolták a korábbiakban (Hagiwara és mtsai., 2008, 2009; Balázs és mtsai., 2010; Emri és mtsai., 2015), kísérleteinkben a $\Delta atfA$ mellett a dupla deléciós és a $\Delta atfAatfBOE$ mutánsoknál is *tBOOH* érzékenységet figyeltünk meg, ezzel szemben az *atfAOE* mutáns toleranciája *tBOOH*-ra növekedett.

1.4. MSB-vel szemben csak a $\Delta atfA$ mutáns mutatott érzékenységet, amelyet az *atfB* túltermelése kompenzálni tudott a $\Delta atfAatfBOE$ mutánsnál. Az *atfAOE* és $atfBOE$ jobban növekedett MSB jelenlétében, mint a kontroll.

1.5. A mutánsok ozmotikus stressz érzékenységét NaCl és szorbit jelenlétében vizsgáltuk, melynek eredménye, hogy az *atfB* deletálása NaCl-ra érzékenységet, míg a dupla túltermelő törzsnél toleranciát okozott. Szorbitra az $atfBOE$ törzs mutatkozott a legérzékenyebbnek, a $\Delta atfB$ viszont jól tolerálta ezen stresszort.

1.6. Nehézfémstressz vizsgálatainkból kiderült, hogy a CdCl₂ stresszben az AtfB-nek van szerepe, mivel az *atfB* túltermelés következtében az $\Delta atfAatfBOE$ mutánsnál enyhe, miközben

az *atfBOE* és az *atfAOEatfBOE* törzseknél jelentősebb érzékenységet figyeltünk meg. A $\Delta atfB$ mérsékelt toleranciát mutatott $CdCl_2$ -ra.

1.7. A Kongóvörössel végzett sejtfal-integritás stresszel szemben a $\Delta atfA$ törzs mérsékelt toleranciát mutatott.

1.8. Az AtfB hőstresszben való szerepét is megállapítottuk, mivel a $\Delta atfB$ mutáns életképessége csökkent, ezzel szemben a $\Delta atfAatfBOE$ és a $\Delta atfBatfAOE$ mutánsok életképessége fokozódott az 50 °C-on, 10 percig tartó hőkezelésre.

2. Az ivaros és ivartalan szaporodást valamint a sterigmatocisztin termelést vizsgáló kísérletek eredményei

2.1. A bZIP transzkripciós faktorok a fonalas gombák körében részt vesznek az ivaros szaporodási folyamatokban is (Bayram és mtsai., 2008; Yin és mtsai., 2013), ezt kísérleti eredményeink megerősítették, mivel az *atfA* deléciója önmagában vagy az *atfB* deléciójával együtt gátolta a kleisztotécium képződést, ezzel ellentétben a kontrollhoz viszonyítva a $\Delta atfB$ és $\Delta atfBatfAOE$ mutánsoknál másfélszer több termőtest képződött.

2.2. Az ivartalan szaporodást tanulmányozó vizsgálatokkal meghatároztuk a mutánsok spóraszámát is. A $\Delta atfA$, $\Delta atfA\Delta atfB$, *atfBOE* és $\Delta atfAatfBOE$ mutánsoknál csökkent, az *atfAOE* és $\Delta atfBatfAOE$ -nál növekedett a konidiospórák száma.

2.3. A fény- és scanning elektronmikroszkópos felvételek készítése után, ToupView képfeldolgozó szoftverrel megvizsgáltuk a konidiospórák méretét. Az *atfBOE* mutáns spóráinak mérete kb. $3,72 \pm 0,24 \mu M$ körül mozgott (a kontroll törzs spórái $2,98 \pm 0,33 \mu M$ méretűek voltak), amely szignifikáns eltérésnek bizonyult. A többi mutáns spóraméretében nem volt különbség a kontroll törzshöz viszonyítva. Az *atfBOE* spóraméretbeli eltérése miatt RT-qPCR-el meghatároztuk az *abaA* gén (locus ID: AN0422, a konidiogenezis központi útvonalának szabályozó eleme) expresszióját felületi pontinokulált tenyészetekből kiindulva. Az RT-qPCR adatai szerint az *atfBOE* mutánsnál az *abaA* gén felülszabályozódott, a $\Delta atfB$ esetében viszont nem volt szignifikáns különbség a kontroll törzshöz képest.

2.4. Meghatároztuk a sterigmatocisztin termelés mértékét is. A mérési eredményeink szerint a sterigmatocisztin a $\Delta atfA$ mutáns esetében a kimutatási határ alatt volt az 5 napos inkubáció után. Ezzel szemben a $\Delta atfA\Delta atfB$ dupla deletált mutáns ezen mikotoxin-termelő képessége nem változott. A $\Delta atfAatfBOE$, $\Delta atfBatfAOE$ és a *atfAOEatfBOE* törzsek szintén kevesebb sterigmatocisztin termelésére voltak képesek. A dupla túltermelő, *atfAOEatfBOE* törzs sterigmatocisztin szintje a kontroll törzshöz képest a felére csökkent.

2.5. Az ivaros szaporodás és a szekunder metabolizmus közötti kapcsolatot igazolta, hogy a *ΔatfA* mutánsban az ivaros szaporodásban bekövetkező zavarral egyidejűleg a sterigmatocisztin szintézis leállása is bekövetkezett.

3. Transzkriptomikai eredményeink az alábbiak voltak

3.1. Az *atfA* gén expressziója nem változott sem MSB kezelésre sem az *atfB* deléció hatására.

3.2. Az *atfB* gén represszióját igazoltuk a micélium mintáknál MSB kezelésre és a micélium és konídium mintáknál az *atfA* deléció következtében, vagyis az AtfA az AtfB-függő géneket az *atfB* transzkripcióján keresztül képes szabályozni.

3.3. A micélium és konídium mintákban egyaránt a *ΔatfA* esetében jóval nagyobb mennyiségben találtunk differenciáltan expresszálódó géneket a *ΔatfB*-hez képest.

3.4. Az AtfA-függő gének (329) száma a kezeletlen micélium minták esetében jóval nagyobb volt, mint az AtfB-függő (96) géneké, amelyek többsége AtfA-függő is volt, tehát az *atfA* gén hiánya jelentősebb transzkriptomikai és élettani hatással bír (Kocsis és mtsai., 2022).

3.5. Kevesebb gén esetében következett be transzkripciós változás MSB kezelés hatására az *atfA* és/vagy az *atfB* deléció miatt. A kontroll törzs esetében MSB kezelés hatására az *atfB* repressziója következett be.

3.6. Az MSB kezelt tenyészetek esetében az AtfA-függő génkészletben az MSB stresszre érzékeny alulszabályozott gének feldúsulása volt jellemző, hasonlóan a kezelés nélküli AtfA és AtfB-függő génkészletekhez. Az MSB toleráns fenotípust mutató tenyészeteknél az AtfA fő feladata a gének további alulszabályozásának megakadályozása volt.

3.7. Az MSB kezelés a konídiumok és a micéliumok transzkriptomját is jelentősen módosította (konídiumban: 485 db felülszabályozott gént és 1070 db alulszabályozott MSB stresszérzékeny gént, a micéliumnál 786 db felülszabályozott és 912 db alulszabályozott MSB-re érzékeny gént találtunk).

3.8. A géncsoport dúsulás vizsgálattal azonosított AtfA-függő gének a következők voltak: a szénhidrát metabolizmusban részvevő gének, a glikolitikus gének (konídiospóráknál), foszforelé választ szabályozó gének (kivéve a kezeletlen micélium mintáknál), a vas-kén klaszter összeszerelő gének (konídiospóráknál), az antioxidáns enzimeket kódoló gének (konídiospóra kezeletlen tenyészeténél), a trikarbonsav ciklus (TCA ciklus) és a légzési lánc génjei (konídiospóra MSB-kezelt tenyészeténél), szekunder metabolit klaszter gének (emericellamid klaszter).

3.9. Az AtfA-függő géncsoportok között nagyobb különbség volt a vegetatív micéliumokban a konídiumokhoz képest. Úgy gondoljuk, hogy a konídiumok a konidiogenezis

során alkalmazkodnak az MSB-hez. Mivel a konídiogén sejtek képesek megváltoztatni a konídiumok mRNS tartalmát, így azok a legvalószínűbben a csírázás során megjelenő stresszhatásokkal szemben már felkészülten tudnak reagálni.

3.10. 23 db AtfB-függő gént találtunk mindösszesen: mint pl.: az AN8953-at (*agdB*) egy feltételezett α -glikozidázt, az AN3402-t (*amyB*) egy feltételezett α -amilázt, az AN7619-et (*calA*), amely a korai konídium-csírázásban tölt be szerepet valamint egy alternatív oxidázt kódoló gént, az AN2099-et (Kocsis és mtsai., 2022).

3.11. Az *atfA* és *atfB* mRNS szintje sokkal magasabb volt a konídiospórákban, emellett nagyobb számban voltak megtalálhatók az AtfA- és AtfB-függő gének is ebben a fejlődési stádiumban, tehát ezek a gének jelentősebb szabályozó szereppel bírnak a spórákban, mint a vegetatív szövetben (az AtfA konídiumokban mutatott fontosabb szabályozó szerepét más *Aspergillus* fajokban is igazolták már, az AtfA a konídiumspecifikus gének szabályozásában jelentős szerepet tölt be).

4. Az AtfA és AtfB által is valószínűsíthetően szabályozott folyamatok a következők:

4.1. Hőstressz elleni védelem: A $\Delta atfA atfB$ OE, $\Delta atfB atfA$ OE mutánsok mutatták a legnagyobb toleranciát hőstresszel szemben.

4.2. Kleisztotécium képzés: A $\Delta atfA$ és a $\Delta atfA \Delta atfB$ törzsben az ivaros szaporodás elmaradt ezzel szemben a $\Delta atfB atfA$ OE törzsben hasonló mennyiségű kleisztotécium képződött, mint a $\Delta atfB$ mutánsban, illetve a két utóbbi mutánsban szignifikánsan nagyobb volt a kleisztotéciumok száma, mint a kontrollban.

4.3. Konídiospóra képzés: Mind az *atfA* deléciója, mind az *atfB* túltermelése csökkentette a konídiumok számát. Az *atfA* túltermelése önmagában, illetve az *atfB* gén deléciójával együtt is növelte a konídiospórák számát.

4.4. ST termelés: A $\Delta atfA$ ST termelése a kimutatási határ alatt maradt, míg a dupla túltermelő, valamint a $\Delta atfA atfB$ OE, $\Delta atfB atfA$ OE mutánsok ST termelése is csökkent a kontrollhoz képest.

5. Összefoglalás

A dimer bázikus leucin cipzár (bZIP) fehérjék konzervált transzkripciós enhancerek, amelyek minden eukariótában megtalálhatók. Kritikus, gyakran fajspecifikus szerepet töltenek be a szervezet fejlődésének számos vonatkozásában (Yin és mtsai., 2013). Az eukariótákban változatos szerepük van az egyes sejttípusok differenciációjában, azok fenntartásában, de részt vesznek emellett különböző stresszválaszokban, a sejtproliferáció szabályozásában, illetve a homeosztázis fenntartásában (Jindrich és Degnan, 2016).

Kísérleteink megerősítették hogy az AtfA az oxidatív stresszel szembeni védekezésben játszik szerepet, valamint igazoltuk, hogy az ivaros szaporodásban is kulcsfontosságú, deléciója esetén (önmagában vagy az *atfB* deléciójával együtt) a kleisztotéciumok képződése elmaradt.

Az ivaros szaporodás és a szekunder anyagcsere között fennálló szoros kapcsolatot bizonyította az a tény, hogy az *atfA* deletált törzs ivaros szaporodási zavarával egyidőben a sterigmatocisztin mikotoxin szintézis leállása következett be.

Az AtfB funkciójával kapcsolatban világossá vált, hogy elsősorban a hő és a nehéz fém stressz elleni védelemben játszik szerepet, valamint a konídiospórák fejlődését is szabályozza, befolyásolva a konídiumok mennyiségét.

Eredményeinkből kiderült továbbá az, hogy bizonyos élettani funkciókat mindkét bZIP transzkripciós faktor szabályoz, erre láttunk példát a hőstresszt, az ivaros szaporodást, konídiospóraképzést és a sterigmatocisztin termelést vizsgáló kísérleteinknél.

A kontroll és a deléciós törzsek transzkriptomjának összehasonlító analízise rámutatott az *A. nidulans* stresszválaszaiban elsődleges bZIP TF funkciót betöltő AtfA-val kapcsolatban arra, hogy ezen gén hiányában a micélium és konídium mintáknál egyaránt jóval nagyobb számban találtunk alul-és felülszabályozott géneket illetve, hogy az AtfB-függő gének AtfA-tól való függéssel szintén jellemezhetőek voltak.

A két fejlődési állapot esetében azt a következtetést tudtuk levonni, hogy a konídium mintáknál az *atfA* és *atfB* mRNS szintje jóval magasabb volt, illetve több AtfA és AtfB-függő gént tudunk azonosítani. Az MSB-vel történő kezelés hatására a csak AtfB-függő gének száma csökkent jelentős mértékben, ami pedig a kontroll törzs MSB-kezelt micélium mintájának és a $\Delta atfA$ mutáns konídium mintájának mRNS szintjének csökkenését idézte elő.

Megállapítottuk, hogy az MSB kezelt és a kezeletlen minták AtfA-függő génjei közötti átfedés a micélium mintáknál alacsony volt.

A génextpressziós vizsgálattal tehát feltártuk, hogy az *atfA* és *atfB* gének sejttípus-függést mutató szabályozó szereppel jellemezhetőek a vizsgált *A. nidulans* fonalas gomba esetén,

emellett, hogy az AtfA sokkal fontosabb szerepet tölt be a szabályozási hálózat elemeként, mint az AtfB.

Összességében elmondható, hogy eredményeink szerint az AtfA és AtfB között valószínűleg egy olyan interakció valósul meg, amely a stressztoleranciában, ivaros és ivartalan szaporodásban, valamint a szekunder metabolit termelésben résztvevő gének expresszióját képes szabályozni.

Ezért további kutatási terveink között szerepel ezen feltételezett interakció bizonyítása. Így tervezzük a promótereken lévő AtfA és AtfB kötőhelyek genomszintű meghatározását kromatin-immunprecipitációs szekvenálással (ChIP-Seq), valamint az AtfA-AtfB heterodimer képzés igazolását bimolekuláris fluoreszcencia komplementációs (BiFC) technikával.

6. Hivatkozások

- Bákány B; Yin W-B, Dienes B, Nagy T, Leiter É, Emri T, Keller NP, Pócsi I. (2021) Study on the bZIP-type transcription factors NapA and RsmA in the regulation of intracellular reactive species levels and sterigmatocystin production of *Aspergillus nidulans*. Int. J. Mol. Sci. 22: 15777. doi: 10.3390/ijms222111577.
- Balázs A, Pócsi I, Hamari Z, Leiter É, Emri T, Miskei M, Oláh J, Tóth V, Hegedus N, Prade RA, Molnár M, Pócsi I. (2010) AtfA bZIP-type transcription factor regulates oxidative and osmotic stress responses in *Aspergillus nidulans*. Mol. Gen. Genomics 283:289-303. doi: 10.1007/s00438-010-0513-z.
- Bayram O, Krappmann S, Ni M, Bok JW, Helmstaedt K, Valerius O Braus-Stromeier S, Kwon N-J, Keller NP, Yu J-H, Braus GH. (2008) VelB/VeA/LaeA complex coordinates light signal with fungal development and secondary metabolism. Science. 320:1504–1506. doi: 10.1126/science.1155888.
- Emri T, Szarvas V, Orosz E, Antal K, Park H, Han K-H, Yu J-H, Pócsi I. (2015). Core oxidative stress response in *Aspergillus nidulans*. BMC Genomics. 16:478. doi: 10.1186/s12864-015-1705-z.
- Guan N, Li J, Shin H-D, Du G, Chen J, Liu L. (2017) Microbial response to environmental stresses: from fundamental mechanisms to practical applications. Appl. Microbiol. Biotechnol. 101:3991-4008. doi: 10.1007/s00253-017-8264-y.
- Hagiwara D, Asano Y, Yamashino T és Mizuno T. (2008) Characterization of bZip-type transcription factor AtfA with reference to stress responses of conidia of *Aspergillus nidulans*. Biosci. Biotechnol. Biochem. 72:2756–2760. doi: 10.1271/bbb.80001.
- Hagiwara D, Asano Y, Marui J, Yoshimi A, Mizuno T, Abe K. (2009) Transcriptional profiling for *Aspergillus nidulans* HogA MAPK signaling pathway in response to fludioxonil and osmotic stress. Fungal Genet. Biol. 46:868–878. doi: 10.1016/j.fgb.2009.07.003.
- Hagiwara, D, Suzuki S, Kamei K, Gono T, Kawamoto S. (2014) The role of AtfA and HOG MAPK pathway in stress tolerance in conidia of *Aspergillus fumigatus*. Fungal Genet. Biol. 73:138–149. doi: 10.1016/j.fgb.2014.10.011.
- Jindrich, K, Degnan BM. (2016) The diversification of the basic leucine zipper family in eukaryotes correlates with the evolution of multicellularity. BMC Evol. Biol. 16:28. doi: 10.1186/s12862-016-0598-z.
- Király A, Szabó IG, Emri T, Leiter É, Pócsi I. (2020) Supplementation of *Aspergillus glaucus* with *gfdB* gene encoding a glycerol 3-phosphate dehydrogenase in *Aspergillus nidulans*. J. Basic Microbiol. 60:691-698. doi: 10.1002/jobm.202000067.
- Kocsis B, Lee M.-K, Yu J.-H, Nagy T, Daróczi L, Batta G, Pócsi I, Leiter É. (2022) Functional analysis of the bZIP-type transcription factors AtfA and AtfB in *Aspergillus nidulans*. Front. Microbiol. 13:1003709. doi: 10.3389/fmicb.2022.1003709.

- Kwon NJ, Shin K-S, Yu J-H. (2010) Characterization of the developmental regulator FlbE in *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet. Biol.* 47:981-993. doi: 10.1016/j.fgb.2010.08.009.
- Leiter É, Park H-S, Kwon N-J, Han K-H, Emri T, Oláh, V, Mészáros I, Dienes B, Vincze J, Csernoch L, Yu J-H, Pócsi I. (2016) Characterization of the *aodA*, *dnmA*, *mnSOD* and *pimA* genes in *Aspergillus nidulans*. *Sci. Rep.* 6:20523. doi: 10.1038/srep20523.
- Leiter É, Emri T, Pákozdi K, Hornok L, Pócsi I. (2021) The impact of bZIP Atf1 ortholog global regulators in fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 105:5769-5783. doi: 10.1007/s00253-021-11431-7.
- Orosz E, Antal K, Gazdag Z, Szabó Z, Han K-H, Yu J-H, Pócsi I, Emri T. (2017) Transcriptome-based modeling reveals that oxidative stress induces modulation of the AtfA dependent signaling networks in *Aspergillus nidulans*. *Int. J. Genom.* 2017:6923849. doi: 10.1155/2017/6923849.
- Robinson MD., McCarthy DJ, Smyth GK. (2010) edgeR: a Bioconductor package for differential expression. *Bioinform.* 26:139-140. doi: 10.1093/bioinformatics/btp616.
- Roze LV, Chanda A, Wee J, Awad D, Linz JE. (2011) Gene Regulation: Stress-related transcription factor AtfB integrates secondary metabolism with oxidative stress response in *Aspergilli*. *J. Biol. Chem.* 286:35137-35148. doi: 10.1074/jbc.M111.253468.
- Sakamoto K, Arima T-h, Iwashita K, Yamada O, Gomi K, Akita O. (2008) *Aspergillus oryzae atfB* encodes a transcription factor required for stress tolerance in conidia. *Fungal Genet. Biol.* 45:922-932. doi: 10.1016/j.fgb.2008.03.009.
- Selye J. Életünk és a stress (The stress of life). (Ford. Both Miklós.) 6. kiadás., (1973) Budapest. Akadémiai Kiadó, Alföldi ny. Debrecen. 57 p.
- Shelest E. (2008) Transcription factors in fungi. *FEMS Microbiol. Lett.* 286:145-51. doi: 10.1111/j.1574-6968.2008.01293.x.
- Silva LP, Horta MAC, Goldman GH. (2021) Genetic interactions between *Aspergillus fumigatus* basic leucine zipper (bZIP) transcription factors AtfA, AtfB, AtfC and AtfD. *Front. Fungal Biol.* 2:632048. doi: 10.3389/ffunb.2021.632048.
- Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, Paulovich A, Pomeroy SL, Golub TR, Lander ES, Mesirov JP. (2005) Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102:15545-15550. doi: 10.1073/pnas.0506580102.
- Szabó Z, Pákozdi K, Murvai K, Pusztahelyi T, Kecskeméti Á, Gáspár A, Logrieco AF, Emri T, Ádám AL, Leiter É, Hornok L, Pócsi I. (2020) *FvatfA* regulates growth, stress tolerance as well as mycotoxin and pigment productions in *Fusarium verticillioides*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 104:7879-7899. doi: 10.1007/s00253-020-10717-6.
- Takeda T, Toda T, Kominami K, Kohnosu A, Yanagida M, Jones N. (1995) *Schizosaccharomyces pombe atf1+* encodes a transcription factor required for sexual

- development and entry into stationary phase. *EMBO J.* 14:6193-6208. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1995.tb00310.x>
- Vargas-Pérez I, Sánchez O, Kawasaki L, Georgellis D és Aguirre J. (2007) Response regulators SrrA and SskA are central components of a phosphorelay system involved in stress signal transduction and asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot. Cell.* 6:1570-1583. doi: 10.1128/EC.00085-07.
- Watson G, Ronai ZA, Lau E. (2017) ATF2, a paradigm of the multifaceted regulation of transcription factors in biology and disease. *Pharmacol. Res.* 119:347-357. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2017.02.004>
- Wee, J, Hong S-Y, Roze LV, Day DM, Chanda A, Linz JE. (2017) The fungal bZIP transcription factor AtfB controls virulence-associated processes in *Aspergillus parasiticus*. *Toxins (Basel).* 9:287. doi: 10.3390/toxins9090287
- Yin W-B, Amaike S, Wohlbach DJ, Gasch AP, Chiang Y-M, Wang CCC, Bok JW, Rohlf M, Keller NP. (2012) An *Aspergillus nidulans* bZIP response pathway hardwired for defensive secondary metabolism operates through aflR. *Mol. Microbiol.* 83:1024-1034. doi: 10.1111/j.1365-2958.2012.07986.x.
- Yin, W-B, Reinke AW, Szilágyi M, Emri T, Chiang Y-M, Keating, AE, Pócsi I, Wang CCC, Keller NP. (2013) bZIP transcription factors affecting secondary metabolism, sexual development and stress responses in *Aspergillus nidulans*. *Microbiology (Reading, Engl.)*. 159:77-88. doi: 10.1099/mic.0.063370-0.
- Yu J-H, Hamari Z., Han K-H, Seo J-A., Reyes-Dominguez Y, Scazzocchio C. (2004) Double-joint PCR: a PCR-based molecular tool for gene manipulations in filamentous fungi. *Fungal Genet. Biol.* 41:973-981. doi: 10.1016/j.fgb.2004.08.001.
- Zhao J, Peng M, Chen W, Xing X, Shan Y, Fan Z, Shi Y, Li H, Yang X, Li H, Chen L. (2022) Transcriptome analysis and functional validation identify a putative bZIP transcription factor, Fpkapc, that regulates development, stress Responses, and virulence in *Fusarium pseudograminearum*. *Phytopathology.* 112:1299-1309. doi: 10.1094/PHYTO-12-21-0520-R.

7. 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/49/2024.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Kocsis Beatrix
Doktori Iskola: Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10079544

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Kocsis, B.**, Mi-Kyung, L., Antal, K., Jae-Hyuk, Y., Pócsi, I., Leiter, É., Emri, T.: Genome-Wide Gene Expression Analyses of the AtfA/AtfB-Mediated Menadione Stress Response in *Aspergillus nidulans*.
Cells. 12 (3), 1-16, 2023.
DOI: <https://doi.org/10.3390/cells12030463>
IF: 6 (2022)
2. **Kocsis, B.**, Lee, M. K., Yu, J. H., Nagy, T., Daróczy, L., Batta, G., Pócsi, I., Leiter, É.: Functional analysis of the bZIP-type transcription factors AtfA and AtfB in *Aspergillus nidulans*.
Front. Microbiol. 13, 1-9, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2022.1003709>
IF: 5.2





További közlemények

3. Selbmann, L., Benkő, Z., Coleine, C., de Hoog, S., Donati, C., Druzhinina, I. S., Emri, T., Ettinger, C. L., Gladfelter, A. S., Gorbushina, A., Grigoriev, I. V., Grube, M., Gunde-Cimerman, N., Karányi, Z., **Kocsis, B.**, Kubressoian, T., Miklós, I., Miskei, M., Muggia, L., Northen, T., Novak-Babič, M., Pennacchio, C., Pfliegler, V. P., Pócsi, I., Prigione, V., Riquelme, M., Segata, N., Schumacher, J., Shelest, E., Sterflinger, K., Tesei, D., U'Ren, J. M., Varese, G. C., Vázquez-Campos, X., Vicente, V. A., Souza, E. M., Zalar, P., Walker, A. K., Stajich, J. E.: Shed Light in the DaRk LineagES of the Fungal Tree of Life-STRES. *Life (Basel)*. 10 (12), 1-13, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/life10120362>
IF: 3.817

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 15,017

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 11,2

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

Debrecen, 2024.02.15.



8. Köszönetnyilvánítás

Szeretnék őszinte köszönetet mondani Dr. Leiter Éva témavezetőmnek, hogy lehetővé tette és szakmailag mindvégig támogatta doktori munkám elkészítését és jelen értekezésem megírását a Debreceni Egyetem Természettudományi Karának Molekuláris Biotechnológiai és Mikrobiológiai Tanszékén.

Szeretném köszönetemet kifejezni Prof. Dr. Pócsi István tanszékvezető, egyetemi tanárnak kitartó támogatásáért és szakmai segítségnyújtásáért, amelynek köszönhetően a doktori értekezésem elkészítéséhez vezető útamát végigjárhattam.

Köszönettel tartozom társszerzőimnek, Dr. Emri Tamásnak, Dr. Antal Károlynak, Dr. Nagy Tibornak, Dr. Daróczy Lajosnak, Dr. Batta Gyulának, Mi- Kyung Lee-nek és Jae-Hyuk Yu-nak az értekezésem alapjául szolgáló közlemények elkészítésében nyújtott segítségükért.

Köszönet illeti Dr. Póliska Szilárdot és a Genomi Medicina és Bioinformatikai Szolgáltató Laboratórium munkatársait a szekvenálási munkálatok elvégzéséért.

Nagyon köszönöm Tóth Gáborné laboratóriumi asszisztensnek a laboratóriumi munkákban való segítségét, hogy precizitásával biztosította a tökéletes munkakörülményeket.

Szeretném megköszönni a tanszék valamennyi dolgozójának, szakdolgozójának a mind szakmai értelemben mind lelki síkon nyújtott segítségüket.

Köszönöm Dr. Csoma Eszternek és Dr. Tósaki Árpádnak fáradhatatlan munkájukat, amelyet a doktori iskolában végeztek.

Végezetül szeretnék köszönetet mondani Drága Szüleimnek, Testvéremnek és párjának Juditnak és mindazon rokonaimnak és barátaimnak, akik szüntelenül támogattak engem mindenben, köszönöm, hogy mindig velem voltatok és vagytok...

és aki ezeket az embereket mozgatta: köszönöm Neked Istenem...

A dolgozat az Európai Unió és az Európai Szociális Alap, az EFOP-3.6.1-16-2016-00022 program valamint a TKP2021-EGA-20 (Biotechnológia) Tématerületi Kiválósági program keretében valamint a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal az NKFIH K119494, NN125671 és a NKFIH K131767, továbbá a HUN-REN Gomba Stresszbiológiai Kutatócsoport támogatásával készült.