

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

***Aspergillus* fajok mitokondriális mangán SOD
génjeinek összehasonlító funkció vizsgálata**

Pákozdi Klaudia Gréta

Témavezető: Prof. Dr. Pócsi István



DEBRECENI EGYETEM

TÁPLÁLKOZÁS- ÉS ÉLELMISZERTUDOMÁNYI DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2025

***Aspergillus* fajok mitokondriális mangán SOD génjeinek összehasonlító funkció vizsgálata**

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
az egészségtudományok tudományágban

Írta: Pákozdi Klaudia Gréta okleveles biotechnológus

Készült a Debreceni Egyetem Táplálkozás- és Élelmiszertudományi doktori iskolája
(Táplálkozástudományi programja) keretében

Témavezető: Prof. Dr. Pócsi István, MTA doktora

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Papp Tamás, MTA doktora

Dr. Máthé Endre, PhD

A bírálóbizottság:

elnök:

Prof. Dr. Gesztelyi Rudolf, PhD

tagok:

Prof. Dr. Papp Tamás, MTA doktora

Dr. Máthé Endre, PhD

Prof. Dr. Holb Imre János, MTA doktora

Dr. Tóth Beáta, PhD

Az értekezés védésének helyszíne és időpontja:

Debreceni Egyetem, ÁOK, Belgyógyászati Intézet „A” épületének tanterme.

2026. február 17., 13:00 óra

Bevezetés

Az *Aspergillus nidulans* igen széleskörben alkalmazott modellszervezet az alap- és alkalmazott mikrobiológiai kutatásokban. Filogenetikailag az *Aspergillus* nemzetség egyik legismertebb tagja, amely különösen fontos a fonalas gombák növekedési és fejlődési mechanizmusainak, sejtciklusának, valamint a másodlagos anyagcseréjének tanulmányozásában. Az *Aspergillus fumigatus* egy igen elterjedt szaprofiton fonalas gomba, amely elsősorban lebomló szerves anyagokon, talajban, komposztban és egyéb növényi maradványokon fordul elő. Bár az *A. fumigatus* alapvetően szaprofiton, de bizonyos körülmények között patogénként viselkedik, különösen az immunhiányos személyek esetében. Élelmiszer-biztonsági szempontból is kockázatot jelent, viszont jelentősége kisebb, mint az *Aspergillus flavus*-é, vagy az *Aspergillus niger*-é, amelyek közismert mikotoxin termelők és igen nagy problémát okoznak az élelmiszeriparban. Egyes tanulmányok kimutatták, hogy az *A. fumigatus* jelen lehet gabonaféléken, áprán, rizsen, búzán, továbbá dióféléken,ogyorón, dión, földimogyorón.

Ebben a munkában az oxidatív stressz hatásainak vizsgálata került előtérbe a két fajban, azon belül is a mitokondriumban lokalizált mangán tartalmú szuperoxid dizmutáz (MnSOD) enzim szerepére voltunk kíváncsiak. A gombák számára az oxidatív stressz kezelése meglehetősen fontos, hiszen a természetes környezetben is előforduló stresszforma, valamint a patogén gombák esetében a gazdaszervezet kolonizációja közben is gyakran megemelkedik az oxidatív stressz mértéke. Szükséges megértenünk a gombák túlélési stratégiáit, sejtvédelmi mechanizmusait, hogy azonosíthassuk azokat a célpontokat, amelyek gombaellenes terápiák és stratégiák fejlesztésére fordíthatók vagy ipari törzsfeljesztésekben hasznosíthatók. A génfunkció jobb feltérképezése érdekében mindkét *Aspergillus* faj olyan deléciós mutánsát is bevontuk a kísérleteinkbe, melyekből hiányzott a mitokondriális MnSOD enzimjét kódoló gén.

Az oxidatív stresszválasz szoros kapcsolatban állhat a szekunder metabolitok termelésével is. Egyes mikotoxinok, például az aflatoxinok, ochratoxinok és trichotecének termelését oxidatív stressz indukálhatja, míg antioxidánsok jelenlétében ezek a folyamatok visszaszorulnak. Továbbá egyes gombák esetében a szekunder metabolitok termelése a sejtek redox-egyensúlyának fenntartásához is hozzájárulhat, míg más esetekben ezek a vegyületek kompetitív előnyt biztosíthatnak más mikroorganizmusokkal szemben. Patogén gombák esetében a gazdaszervezet immunrendszere elleni védekezésben is jelentősek.

Összefoglalva, a fonalas gombák oxidatív stresszre adott válaszainak megismerése ipari és élelmiszerbiztonsági szempontból is kiemelkedően fontos. A gombák oxidatív stresszhez való alkalmazkodása alapjaiban befolyásolja túlélésüket és szekunder metabolitjaik, köztük igazoltan vagy potenciálisan toxikus vegyületek termelését. Mivel egyes mikotoxinok képződését oxidatív stressz hatások kiválthatják vagy fokozhatják, az ilyen folyamatok feltérképezése az élelmiszerek szennyeződésének megelőzéséhez vezethet. Az oxidatív stresszre adott válaszok feltérképezése továbbá segítheti az ipari felhasználásra szánt gombatorzsek fejlesztését, valamint új gombaellenes célpontok azonosítását, ami mind a gyógyszeripar, mind a biotechnológia számára a gyakorlatban is értékes eredmény.

Célkitűzés

PhD munkám célja az *A. nidulans* és az *A. fumigatus* MnSOD enzimjének összehasonlító funkcionális jellemzése volt, különös tekintettel az enzimeknek az oxidatív stressz elleni védelemben betöltött szerepére. Az *A. nidulans* kiváló modellszervezet, amely a jól jellemezett genomjának és az azonosított génjeinek köszönhetően transzkriptomikai munkákban megbízhatóan alkalmazható és jól felhasználható új génfunkciók és gének közötti kapcsolatok megállapítására. Összevetve az *A. fumigatus* transzkriptomával a két fonalagomba közötti különbségek jobban azonosíthatóvá váltak. Vizsgálatunkkal lehetőség nyílt arra, hogy a két fonalas, spóraképző és szekunder metabolitokat termelő gomba oxidatív stresszválaszát mélyebben megértsük, mely képességek feltárása gyógyászati és ipari szempontból is fontos lehet. Az *A. fumigatus*, mint opportunista humánpatogén, különös jelentőségű klinikai szempontból. Transzkriptomikai adatainak az összehasonlítása az *A. nidulans*-ban található ortológok expressziós mintázatával hozzájárulhat az oxidatív stresszvédelem evolúciós és funkcionális különbségeinek feltárásához.

Munkánkban a következő lépések végrehajtását tűztük ki:

1. Folyékony tápoldatban normál és oxidatív stressznek kitett körülmények közötti tenyésztés, ebből RNS izolálás, szuperoxid szint és SOD aktivitás mérés. Szilárd táptalajon az oxidatív stressz érzékenységnek az összehasonlítása.
2. Az RNS szekvenálásból származó adatok kiértékelése, a differenciálisan expresszálódó gének meghatározása, géncsoportok génkészlet-dúsulási elemzéseinek végrehajtása.
3. qPCR-rel az eredmények validálása a transzkriptomikai adatokból kiválasztott génekkel.

4. A kapott eredmények fényében további munkák elvégzése (pl. makrofágokkal szembeni érzékenység vizsgálat).

Munkánkban az alábbi kérdésekre kerestük a választ:

MnSOD enzimek élettani szerepe:

1. Milyen szerepet játszanak az *A. nidulans* és *A. fumigatus* mitokondriális MnSOD enzimek az oxidatív stressz elleni védelemben?

sodB és *sod2* gén deléció hatásai:

2. Milyen mértékben növeli az *A. nidulans sodB* és az *A. fumigatus sod2* gén deléciója a gombák oxidatív stresszérzékenységét?

Alternatív védekezési mechanizmusok:

3. Milyen antioxidáns enzimek aktiválódnak az MnSOD hiányának kompenzálására?

A. nidulans és *A. fumigatus* eltérő stresszválaszai:

4. Milyen különbségek tárulnak fel az összehasonlító funkcióanalízis révén a két törzs stresszválaszában?

5. Az *A. fumigatus*-specifikus különbségek vajon miképpen használhatók majd ki a jövőben a gyógyszervejlesztésekben?

Anyagok és módszerek

A két *Aspergillus* faj mangán SOD génjének összehasonlítása

Az *A. nidulans sodB* és az *A. fumigatus sod2* génjeinek esetében elvégeztük a nukleotid- és aminosav-szekvenciák összehasonlítását, a FungiDB adatbázisból származó szekvenciák alapján. Az intron- és UTR-régiókat szintén a FungiDB-vel azonosítottuk. A szekvenciaillesztéseket a BioEdit programmal végeztük, míg az aminosav-szekvenciák közötti homológia meghatározása az NCBI BLAST felületén történt. A két fehérje prediktált 3D szerkezeti modelljeit AlphaFold 2 programmal generáltuk, majd az RCSB Protein Data Bank felületén illesztettük egymásra a hasonlóság vizsgálatához. Emellett funkcionális domének meghatározását is elvégeztük a SMART online programmal, amely ismert doménstruktúrák alapján keres homológiát a megadott fehérjeszekvenciákban.

A kísérletekben felhasznált törzsek és tenyésztésük

Az általunk használt törzsek a következők voltak: *Aspergillus nidulans* THS30.3 és *ΔsodB*, valamint *Aspergillus fumigatus* *akuB^{ku80}* és *Δsod2/IP345*. A törzseket Barratt-féle nitrát tartalmú minimál táptalajon (AMM) tartottuk fent (Barratt és mtsai., 1965) és spóráztattuk kísérleteinkhez. A kísérletek előtt glicerines szuszpenzióról oltottunk le a friss spórák előállításához és a tenyésztés 6 napig tartott minden esetben 37 °C-on.

Micélium előállítása RNS izolálásához

5 x 10⁷ db konídiospórát tartalmazó szuszpenziót mértünk be folyékony 100 ml Barratt-féle tápoldatba, *A. fumigatus* esetében diammónium-tartarátot tartalmazó módosított tápoldatba, 500 ml Erlenmeyer-lombikokba. Ezután a lombikokat 37 °C-on inkubáltuk 16 órán keresztül az *A. nidulans* törzsek esetében, míg az *A. fumigatus* törzseknél ez 20 óra volt, 3,7 Hz-en (Leiter és mtsai., 2016). Az *A. nidulans* tenyészetek egy részéhez 16 óra elteltével 0,16 mM MSB-t adtunk, míg az *A. fumigatus* tenyészetek egy részéhez 20 óra elteltével 6 mM MSB-t, így létrehozva a kezelt és kezeletlen tenyészeteknek három-három biológiai ismétlését. A kezelés után 30 perc elteltével leszűrtük a micéliumot és további felhasználásig -20 °C-on tároltunk.

A szilárd táptalajon végzett stresszkísérletek körülményei

Barratt minimál táptalajt használtunk az *A. nidulans* törzseknél, míg az *A. fumigatus*-sal zajló kísérleteket a diammónium-tartaráttal módosított táptalajjal végeztük el. Ezeknél a kísérleteknél az agarba kevert MSB koncentrációk az *A. nidulans* törzsekkel zajló kísérletekben 25 μM, míg az *A. fumigatus*-nál 0,5 μM, 1 μM és 15 μM voltak. Az agar lemezek közepére 5 μl spóraszuszpenziót inokuláltunk 2 x 10⁷ konídium/ml törzsoldatból, majd a Petri csészéket 37 °C-on inkubáltuk 5 napig és a gátlás mértékét a telepek átmérőjének mérésével határoztuk meg. Az *A. fumigatus* törzsekkel végzett vas-limitációs kísérleteknél 0,8 mM deferipronnal (DFP) is kiegészítettük a táptalajt, továbbá vasmentesen készítettünk el azt. A táptalajok felszínén 100 μl kondídiumszuszpenziót (10⁷ konídium/ml törzsoldatból) szélesztettünk szét, majd minden lemez közepére pipetta hegygel lyukat vájtuk. A csészék egy részének vájataiba azonnal, a másik részébe 1 napig tartó inkubáció után 50 μl 12 mM-os MSB oldatot pipettáztunk, majd a tenyészeteket 4 napig 37 °C-on inkubáltuk. A kísérlet kiértékelésekor megmértük a gátlási zóna átmérőjét.

Minták előállítása szuperoxid-képződés és SOD-aktivitás mérésre

A szuperoxid-képződés meghatározásához ugyanazon körülmények között végeztünk tenyésztést, mint az RNS izoláláshoz készült micéliumok esetében. A szuperoxid-képződéshez az MSB hozzáadását követően a táptalajból vettünk mintát, a SOD-aktivitás méréséhez pedig 5 óra elteltével micéliumot szűrtünk le. Ebben az esetben is három biológiai ismétléssel dolgoztunk.

A szuperoxid képződés mérése

A szuperoxid kimutatásához dihidroetídiumos kezelést alkalmaztunk, a Carter és mtsai (1994) által leírt protokoll alapján. 20 ml tenyészethez 100 µl 2mM-os dihidroetídium oldatot adtunk, majd a mintákat 1 órán át inkubáltuk rázógépen, 37 °C-on ~3,6 Hz-en (220 rpm). Ezután 6 ml tenyészetet szűrtünk le, melyet desztillált vízzel átmostunk. A micéliumokat Eppendorf csőbe helyeztük és 1 ml 4 fokos, 5 w/v %-os szulfoszalicilsav oldatban vettük fel a mintákat. 10-20 percet inkubáltunk jégen, majd 10 perc centrifugálás (4 °C, 10000 g) után 500 µl felülúszóhoz 500 µl 2 M-os NaOH-t adtunk. A minták fluoreszcenciáját spektrofotométerrel határoztuk meg ($\lambda_{\text{ext}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 610 \text{ nm}$) és a képződött etídium mennyiségét etídium-bromid kalibráló sor felvétele után számoltuk ki.

A szuperoxid dizmutáz (SOD) aktivitásának mérése

A szuperoxid dizmutáz (SOD) aktivitást Oberley és Spitz (1984) módszere alapján határoztuk meg. A meghatározáshoz 1 ml végső térfogatú reakcióelegyet alkalmaztunk, amely 10 v/v% mintát tartalmazott. A reakcióelegy komponensei a következők voltak: 50 mM nátrium-foszfát puffer (pH 7,8), 70 µM nitro blue tetrazolium-klorid (NBT), 1,4 mM dietilén-triamin-pentaecetsav (DETAPAC), 0,2 mM xantin, 10 U/l xantin oxidáz, valamint 1000 U/l kataláz. Az enzimaktivitás meghatározása az NBT oxidációjának nyomon követésén alapult, amelyet 560 nm hullámhosszon mértünk, 2 percen keresztül. Kontrollként minta nélküli reakcióelegyet használtunk. Az enzimaktivitást a kontroll és a minta abszorbanciaértékeinek hányadosából számítottuk ki, majd ebből 1-et vontunk le.

A fehérjetartalom meghatározása

A minták fehérjetartalmát Bradford-reagens hozzáadásával határoztuk meg. Felülúszó mintákhoz Bradford reagenst adtunk és 10 perc szobahőn történő inkubációs idő elteltével a mintákat spektrofotométerrel mértük le, $\lambda=595 \text{ nm}$ hullámhosszon. Az abszorbancia adatokból

szarvasmarha szérum albumin (BSA) kalibrálósor segítségével határoztuk meg a fehérjetartalmat, és az így kapott értékeket a fermentlé térfogatára vonatkoztatva mg/l mértékegységben adtuk meg.

***A. fumigatus* konídiumok túlélése makrofágokkal szemben**

A kísérlethez kétféle makrofágot használtunk. Voltak granulocita-makrofág kolóniastimuláló faktorra (GM-CSF; Gentaur Molecular Products, London, UK, 80 ng/ml) létrehozott M1 makrofág fenotípusú, illetve makrofág kolóniastimuláló faktorra (M-CSF; PeproTech, Brüsszel, Belgium, 50 ng/ml) indukált M2 makrofág fenotípusú makrofágok. A makrofágokat 96 lyukú sejtenyésztő lemezekbe oltottuk 1×10^5 sejt/100 μ l sejtsűrűségben. Minden lyukba 100 μ l 1×10^5 *A. fumigatus* spóra/RPMI 1640 médium szuszpenziót adtunk. A kontroll 100 μ l spóraszuszpenzió és 100 μ l RPMI médium volt makrofágok nélkül. 4 óra inkubációt és centrifugálást követően a felülúszót eltávolítottuk, és desztillált vízzel sejtlízist idéztünk elő. A kapott mintákat sorozatos hígítás után Barratt-féle minimál nitrát agarra oltottuk, és az életképes sejtek számát 37 °C-on, 36 órás inkubációt követően telepkező egységek (CFU) meghatározásával értékeltük.

Az RNS izolálás menete

Az RNS szekvenáláshoz és génextpressziós vizsgálatokhoz felhasznált RNS-t liofilizált micéliumokból Chomczynski (1993) protokollja alapján TRIzol reagenssel (Invitrogen, Waltham, MA, USA) izoláltuk, majd ezt követően a minták RNS tartalmát előzetesen Nanodrop UV/Vis (Nabi, μ 2 Microdigital) készülékkel mértük le, 260 nm-en. Felhasználásig a mintákat -70 °C-on tároltuk. Továbbá az RNS minták tisztaságát a DE ÁOK Genomi Medicina és Bioinformatikai Szolgáltató Laboratórium munkatársai ellenőrizték mikrofluid elektroforézis rendszerrel (Agilent 2100 Bioanalyzer, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA).

Kvantitatív valós idejű polimeráz lánreakció (RT-qPCR)

Az RNS-szekvenálásból származó génextpressziós eredményeket RT-qPCR-rel validáltuk. Az RNS minták előkészítésekor először DNS-mentesítést végeztünk, majd a qPCR-reakciót az Xceed qPCR SG 1-step 2x Mix Lo-ROX Kit (Applied Biotechnologies, Praha, Csehország) kissé módosított protokollja alapján mértük össze. Referencia génként az *A. nidulans* esetén az AN9168 (feltételezett glicerinn transzportert kódoló gén), míg az *A. fumigatus* esetében az AFUB_078400 (feltételezhetően az 1,3- β -D-glükán szintáz katalitikus alegységét

kódolja) gént használtuk. Az RT-qPCR-ben kapott Cq értékeket a megfelelő referencia génhez viszonyítottuk, majd a $\Delta\Delta\text{CP}$ értékeket négy különböző összehasonlítás alapján számoltuk ki. Ezeket vetettük össze a szekvenálási adatokból származó $\log_2\text{FC}$ értékekkel, amelyeket szintén ugyanilyen összehasonlításokban határoztunk meg.

A nagy-áteresztőképességű RNS szekvenálás menete

A következő mintákat állítottuk elő három biológiai ismétléssel: *A. nidulans* THS30.3 kezeletlen, THS30.3 MSB-vel (0,16 mM) kezelt, *ΔsodB* kezeletlen, *ΔsodB* MSB-vel (0,16 mM) kezelt mintái, valamint *A. fumigatus* *akuB^{ku80}* kezeletlen, *akuB^{ku80}* MSB-vel (6 mM) kezelt, *Δsod2* kezeletlen, illetve *Δsod2* MSB-vel (6 mM) kezelt tenyészetei. Az egy irányú (single-read) 75 bp-os Illumina RNS szekvenáláshoz szükséges RNS könyvtárat a TruSeq RNS Library Prep Kit-tel (Illumina, San Diego, CA, USA) készítették el a gyártó leírása szerint. A szekvenálást az Illumina NextSeq 500 műszeren hajtották végre.

A szekvencia adatok feldolgozása (RNAseq)

A szekvenálásból származó olvasatokat az *A. nidulans* FGSC A4, illetve az *A. fumigatus* A1163 genomjához illesztettük a HISAT2 szoftver (2.1.0 verzió) futtatásával. Az, hogy pontosan hány olvasat tartozott egy génhez azt a featureCounts szoftver (2.0.0 verzió) határozta meg. A differenciáltan expresszált géneket (DEG) a DESeq2 (1.34.0 verzió) szoftverrel kaptuk meg. Az RPKM értékeket az edgeR csomag „rpkm” függvényével határoztuk meg, továbbá a PCA (főkomponens analízis) pedig az RStudio (<https://rstudio-education.github.io/hopr/starting.html>), „pcrump” függvénnyel történt.

A transzkriptomikai adatok kiértékelése

Két transzkriptom összehasonlításakor a felül- és alulszabályozott géneket olyan DEG-ekként definiáltuk (korrigált p -érték $<0,05$), ahol az $|\log_2\text{FC}|$ értékek egy meghatározott küszöbértéknél (ha másként nem jelöltük 1-nél) nagyobbak voltak. Az $\log_2\text{FC}$ értékeket a DESeq2 szoftverrel (1.34.0 verzió) számítottuk ki referenciaként a kezeletlen tenyészeteket, vagy a vad típusú törzsek tenyészetait használva. A kiválasztott génkészletek összetételének jellemzésére a ShinyGO 0.77 (<http://bioinformatics.sdstate.edu/go/>) platformon génkészlet-dúsítási elemzéseket (“gene set enrichment analysis”) hajtottunk végre. A háromnál kevesebb gént tartalmazó kifejezéseket vagy a csak egy gént tartalmazó találatokat kihagytuk az elemzésből, és csak a korrigált- $p <0,05$ értékekkel rendelkező találatokat vettük figyelembe. Az elemzéseket a DEG-ek több, különböző $\log_2\text{FC}$ küszöbérték beállításával kapott részhalmazán

is elvégeztük. Az *A. nidulans* esetében $|\log_2FC| > 0$, $|\log_2FC| > 1$, $|\log_2FC| > 2$ küszöbértékeket, míg az *A. fumigatus* esetében $|\log_2FC| > 0$, $|\log_2FC| > 0,5$ és $|\log_2FC| > 1$ küszöbérték használtunk.

Az *A. nidulans* transzkriptomikai adatainak elemzése

Az Fe-S klaszter összeszerelés (“Fe-S cluster assembly”), az antioxidáns enzim (“Antioxidant enzyme”), a respiráció (“Respiration”) és a szterigmatocisztin klaszter (“Sterigmatocystin cluster”) géncsoportok génkészlet-dúsulási elemzéseinek eredményeit Fisher féle egzakt próbával is megvizsgáltuk (“fisher.test” funkció az R projektben; www.R-project.org/). A Fe-S klaszter összeszerelés (“Fe-S cluster assembly”) és a légzés (“Respiration”) géncsoportokat a FungiDB adatbázisa szerint határoztuk meg. Az antioxidáns enzim géneket is szintén a FungiDB-ben (<https://fungidb.org/fungidb/app>) elérhető adatok szerint azonosítottuk be. A szterigmatocisztin temeléséért felelős génklasztert Inglis és munkatársai (2013) tanulmányából gyűjtöttük össze. A stresszgéneket pedig a Fungal Stress Response Database (FSRD) *A. nidulansban* található stresszgének alapján azonosítottuk.

Az *A. fumigatus* transzkriptomikai adatainak elemzése

A glikolízis (“Glycolysis”), az antioxidáns enzim (“Antioxidant enzyme”), a vasfelvétel (“Iron uptake”), a sziderofór klaszter (“Siderophore cluster”), az Fe-S klaszter fehérje (“Fe-S cluster protein”), az Fe-S komplex klaszter összeszerelés (“Fe-S cluster assembly”), a hemkötő fehérje (“Heme binding protein”), a hem bioszintézis (“Heme biosynthesis”), és a riboszóma fehérje (“Ribosome protein”) géncsoportokba tartozó gének dúsulását a Fisher féle teszttel is megvizsgáltuk („fisher.test” funkció az R projektben; www.R-project.org/). A riboszómafehérje (“Ribosome protein”) géncsoporthoz az *A. fumigatus* Af293 génjeit a KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) útvonal-adatbázisból gyűjtöttük össze (<https://www.kegg.jp/pathway/afm03010>). A többi géncsoportot az alábbi helyekről szereztük meg: a glikolízis (“Glycolysis”) gének Flippi és munkatársaitól (2009), az antioxidáns enzim (“Antioxidant enzyme”), a vasfelvétel (“Iron uptake”), a Fe-S klaszter fehérje (“Fe-S cluster protein”), az Fe-S komplex klaszter összeszerelés (“Fe-S cluster assembly”), a hemkötő fehérje (“Heme binding protein”), a hem bioszintézis (“Heme biosynthesis”) Emri és munkatársaitól (2022), valamint a sziderofór klaszter gének (“Siderophore cluster”) Inglis és munkatársai (2013) által leírt *A. fumigatus* Af293 génlistájából. Az *A. fumigatus* Af293 ortológjait az *A. fumigatus* A1163-ban az OrthoMCL v2.0 (<https://orthomcl.org/orthomcl/app/>) felhasználásával határoztuk meg. Az elemzési folyamatban a homológia kereséshez a blast algoritmust, a

megtalált ortológok klaszterezéséhez pedig az MCL (Markov Cluster Algorithm) algoritmust (www.micans.org/mcl/index.html) használtuk.

Új tudományos eredmények

Az adataink alapján a két gombafaj oxidatív stresszre adott válasz mechanizmusai meglehetősen különbözőek voltak. Az *A. nidulans* esetében a stresszválasz jellege és az érintett gének száma hasonló volt a THS30.3 és a $\Delta sodB$ mutáns törzsekben, míg az *A. fumigatus*-ban a génexpressziós válaszok nagymértékben eltértek egymástól az *akuB^{ku80}* és $\Delta sod2$ törzsekben.

A csírázás és az oxidatív stressz

Az *A. nidulans* és *A. fumigatus* spórák fokozottan érzékenyek voltak az oxidatív stresszre, mivel csírázáskor fokozódik a mitokondriális aktivitás, ami megnöveli a ROS-szintet. Vizsgálataink szerint a tenyésztési körülmények és az oxidatív stressz időzítése (csírázás előtt vagy után) jelentősen befolyásolja a törzsek érzékenységét. Az *A. nidulans* $\Delta sodB$ és az *A. fumigatus* $\Delta sod2$ törzsek különösen sérülékenyek voltak, amikor csírázás előtt érte őket a stressz. Ugyanakkor, ha csírázást követően alkalmaztuk a kezelést (pl. süllyesztett kultúrában), a referencia és mutáns törzsek közötti különbségek csökkentek. Ebből arra a következtetésre jutottunk, hogy a konídiumok elleni célzott stratégiák hatékonyabbak lehetnek, mint a már növekedő micéliumokkal szembeni beavatkozások.

Az MnSOD hiányának kompenzálása

Az MSB kezelés hatására több antioxidáns gén – például a *sodA*, *catB*, *ccp1*, AN5440 (feltételezett citokróm c peroxidázt kódoló gén), *trxR*, *tpxB* és *trxA* – felülszabályozódott a $\Delta sodB$ mutánsban a referencia törzshöz képest, ennek ellenére a mutáns törzsben megnövekedett Et-termelés a redox-homeosztázis felborulására utalt. Bár a SOD aktivitás a kezelés alatt nem különbözött jelentősen a vad típushoz képest, az alternatív mechanizmusok nem voltak elegendőek a teljes kompenzációhoz. Hasonlóan az *A. fumigatus* $\Delta sod2$ mutáns törzsben kisebb SOD aktivitást és magasabb szuperoxid szintet mértünk MSB hatására, ami a *sod2* gén hiányából eredő csökkent védekezőképességre utal. Az oxidatív stressz jelenlétében a $\Delta sod2$ mutánsban jóval több antioxidáns gén mutatott felülszabályozódást, mint a vad típusú törzsben, ami hozzájárult részben az oxidatív stressz elleni védekezéshez. Megvizsgálva a további *sod* géneket megállapítottuk, hogy egyik sem kompenzálta a génhányt szignifikánsan,

kivéve a AFUB-073150 gént (az *A. fumigatus* AF293 *sod4* ortológja), amely mérsékelt transzkripciós növekedést mutatott a *Δsod2* mutánsban.

Az oxidatív stressz hatása a géndelégiós és a referencia törzsek transzkriptómára

Az *A. nidulans* két törzsében az MSB stressz által indukált transzkriptom szintű változások mind jellegükben, mind az érintett gének számát tekintve hasonlóak voltak. A sejtnövekedéshez és osztódáshoz kapcsolódó gének alulszabályozódtak, míg az autofágia, oxidatív stresszválasz és Fe–S klaszter összeszerelés génjei felülszabályozódtak mindkét törzsben. Az adataink alapján az MSB csökkentette a mitokondriális funkciók génjeinek (pl. aerob légzés, mitokondriális transzláció) expresszióját, miközben a sérült mitokondriumok eltávolításáért felelős gének aktiválódtak. Ezen kísérleti körülmények között úgy tűnik, a javíthatatlan mitokondriumok eltávolítása éppen olyan jelentőséggel bír, mint a mitokondriumok integritásának és funkcióinak fenntartása. Ezzel szemben az *A. fumigatus* *Δsod2* mutánsának transzkriptómában bekövetkezett változások jelentősebben eltértek a kontroll törzsben megfigyelhetőktől. Az oxidatív stresszre reagáló gének száma jelentősen nagyobb volt, mint a vad típusban és a sejtek fokozottan aktiválták a mitokondriális funkciókat, antioxidáns géneket, valamint a vasanyagcseréhez és Fe–S klaszter összeszereléséhez kapcsolódó géneket is. A riboszómafehérje gének erőteljes felülszabályozása azt jelzi, hogy a mutáns fokozott fehérjeszintézissel próbálhatta kompenzálni az oxidatív stressz okozta sejtkárosodásokat. Bár az *Δsod2* mutánsban több MSB-re reagáló gént azonosítottunk, ezek döntő többsége hasonló biológiai folyamatokhoz kapcsolódott, mint a vad típusban. Ez arra utal, hogy a Sod2 hiánya nem teljesen új stresszvédelmi útvonalakat aktivált, hanem inkább az oxidatív stresszválasz intenzitását fokozta. Eredményeink alapján a Sod2 enzim kiemelt szerepet játszik az MSB által okozott mitokondriális károsodások mérséklésében.

A *sodB* és *sod2* gének delégiójának eltérő transzkriptomikai hatása

Az *A. nidulans* *ΔsodB* mutáns és a referencia törzs között már MSB kezelés nélkül is jelentős különbség mutatkozott a transzkriptomban (808 gén), amely MSB stressz hatására tovább nőtt (1741 gén). A delégió a sejtciklushoz, DNS replikációhoz, mitokondrium-szerveződéshez és stresszválaszhoz kapcsolódó gének felülszabályozását, míg a riboszóma biogenezis, konídiumfejlődés és lipid szintézis gének csökkent expresszióját eredményezte. A szterigmatocisztin bioszintetikus klaszter génjei alulszabályozódtak, jelezve a másodlagos metabolit termelés csökkenését. Az aerob légzés génjei MSB hatására mindkét törzsben

alulszabályozódtak, de a mutánsban ez a hatás kisebb volt. Az alternatív oxidáz gén (*aodA*) mindkét törzsben aktiválódott. Az *A. fumigatus*-ban viszont még ennél is lényegesen több változást okozott a *sod2* hiánya. 446 gén kifejeződésében történt változás a génkiütés következtében, majd ez a szám 1940-re nőtt az MSB kezelést követően. A mutáns sokkal erőteljesebb transzkripciós választ adott az MSB kezelésre, mint a vad típus, de a Δ *sod2* törzsben nem aktiválódtak teljesen új stresszvédelmi mechanizmusok. Az *A. fumigatus* két törzsének stresszválaszai közti különbség inkább a válasz intenzitásában mutatkozott meg. Bár a mutánsban több gén reagált az MSB jelenlétére, ezek túlnyomórészt ugyanazon biológiai folyamatokhoz kapcsolódtak, mint a referencia törzs esetében. A mutánsban több gén reagált, különösen a riboszóma-, mitokondrium- és hemkötő funkciók terén. A glikolízishez és antioxidáns enzimekhez tartozó gének kifejeződése mindkét törzsben nőtt, de a mutánsban nagyobb mértékben.

Makrofágokkal szembeni érzékenység

Az *A. fumigatus* Δ *sod2* mutáns törzs fokozott érzékenységet mutatott az emberi M-CSF- és GM-CSF-indukált makrofágokkal szemben végzett interakciós kísérletekben. Eredményeink szerint a MnSOD enzim igen fontos szerepet játszik a gazdaszervezet immunrendszere által kiváltott oxidatív stressz elleni védekezésben, és hozzájárulhat a gomba túléléséhez a makrofágok támadásával szemben.

A vas limitáció hatása és kombinált terápia lehetősége

Az *A. fumigatus* Δ *sod2* mutáns törzs fokozott érzékenységet mutatott mind az MSB-vel kiváltott oxidatív stresszre, mind a deferipron (DFP) által előidézett vaslimitált környezetre. A két stresszhatás együttes alkalmazása erőteljes növekedésgátlást okozott a mutáns törzs esetében, amiből arra lehet következtetni, hogy az oxidatív stresszel szembeni tolerancia szorosan összefügg a vas elérhetőségével, és a hatékony vasanyagcsere hozzájárul a gomba stressztűréséhez. Mivel az Δ *sod2* törzs virulenciája nem csökkent jelentősen, önmagában az MnSOD gátlása nem tűnik hatékony terápiás célpontnak. Viszont a vasfelvétel egyidejű gátlásával kombinálva jelentősebb oxidatív károsodás váltható ki, ami fokozza a gomba vasigényét és ezáltal hatékonyabbá teheti a kezelést. Ez a kombinált stratégia ígéretes lehet a klinikumban is, mivel nemcsak a virulenciát csökkentheti, hanem a napjainkban terjedő rezisztencia megoldását is elősegítheti.

Az új tudományos eredmények összefoglalásaképpen szeretném felsorolni a doktori munkám célkitűzéseiben feltett kérdésekre adott válaszokat és az újabb tudományos eredményeimet:

1. Az *A. nidulans* és *A. fumigatus* spórák érzékenyebbek voltak az oxidatív stresszre, mint a micéliumok, mert a csírázás közben megnövekedett mitokondriális aktivitásra van szükség, ami eleve fokozott ROS termelést okoz.

2. Az *A. fumigatus sod2* gén deléciója jelentősebb változást idézett elő MSB-re adott stresszválaszban, mint az *A. nidulans sodB* gén hiánya.

3. *A. nidulans*-ban a *sodB* deléciós mutánsában egyes antioxidáns gének (pl. *sodA*, *catB*-kataláz, peroxidázok) aktivitása megnövekedett, kompenzálva az MnSOD hiányát.

4. Az *A. fumigatus Δsod2* törzsében MSB hatására szintén fokozódott más antioxidáns gének kifejeződése, viszont a további *sod* gének esetében nem történt szignifikáns változás.

5. A stressz hatására az *A. nidulans* törzsek fokozhatták a károsodott mitokondriumaik eltávolítását a transzkriptomikai adatok szerint.

6. Az *A. fumigatus* hatékony vas anyagcseréje segíti az oxidatív stressz túlélését, ezért gátolva a vasfelvételt nagyobb oxidatív stresszérzékenységet figyeltünk meg.

7. Az *A. fumigatus*-ban a *sod2* deléciója érzékenyebbé tette a mutáns törzset M-CSF- és GM-CSF-indukált makrofágokkal szemben.

8. A konídiumok elpusztítását célzó stratégiák hatékonyabbak lehetnek, mint a már növekedésben lévő gombafonalakra kifejlesztett módszerek.

9. MnSOD gátlása szakirodalom szerint önmagában nem hatékony terápiás célpont, de a vasanyagcsere gátlásával kombinálva erősebb oxidatív stresszt váltható ki a gombasejtekben.

Összefoglalás

A fonalas gombák oxidatív stressz elleni védelme igen fontos a túlélésük és az alkalmazkodásuk szempontjából. Ez a stresszforma mindenhol fellelhető, de a patogén fajok a gazdaszervezet immunrendszere által még nagyobb mértékű oxidatív stressznek vannak kitéve. Ezt a stresszformát leginkább a ROS, köztük a $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 és $\cdot OH$ okozzák, melyek felhalmozódva károsítják a sejtek fehérjéit, lipidjeit és DNS-ét. A sejtek integritásának védelmében szükség van hatékony védekezési mechanizmusokra e stresszformával szemben.

A mitokondriumban lokalizált mangán tartalmú szuperoxid dizmutáz (MnSOD) az oxidatív stressz elleni védelem egyik antioxidáns enzime gombákban. A sejten belüli

elhelyezkedése miatt a mitokondriumok megfelelő működésének fenntartásában van szerepe. Az elektrontranszport-lánc alatt keletkező szuperoxid anionokat alakítja hidrogén-peroxiddá, melyet majd a védelmi rendszer további tagjai semlegesítenek. Az MnSOD segít fenntartani a sejtek homeosztázisát és megelőzni a sejtkárosodást.

A *sodB* és *sod2* gének MnSOD enzimet kódolnak, melyek a transzkriptomikai elemzéseink szerint is meghatározóak a mitokondriumok védelmében és megfelelő működésük biztosításában. Megfigyeléseink szerint az *A. nidulans* vad típusú és Δ *sodB* deléciós mutáns törzsének oxidatív stresszre adott transzkripciós válaszaik hasonlóak voltak. Míg az *A. fumigatus*-ban Δ *sod2* mutáns törzsben a stresszre adott válaszok igen eltértek a referencia törzsetől. Eredményeink szerint az oxidatív stressz elleni védelemben a gombák többféle stratégiát is alkalmaznak, ez alapulhat alternatív antioxidáns enzimek génjeinek felülszabályozásán vagy a sérült mitokondriumok hatékonyabb eltávolításán.

Kísérleteinkben, ahol az *A. fumigatus* Δ *sod2* mutáns törzset vizsgáltuk, fontos kapcsolatot állapítottunk meg a vas-anyagcsere és oxidatív stressz között. A Sod2 enzim a mitokondriumok Fe-S klaszter fehérjéinek védelmében igen meghatározó. A deléció után a Δ *sod2* mutáns igen érzékennyé vált vas-limitált, oxidatív stressznek kitett környezetben. A transzkriptomikai eredményeink szerint MSB hatására a riboszómális és a vasanyagcsere génjeinek szabályozásában olyan változások léptek fel, melyek valószínűleg a sejtek túlélését segítik.

A humán patogén gombákban, mint az *A. fumigatus*-ban is, igen hatékony védelmi rendszer alakult ki az oxidatív stressz ellen. Szóval, ha figyelembe vesszük, hogy az MnSOD gátlása önmagában nem elég stratégia, de ha kombináljuk vas-anyagcsere gátlással erősebb oxidatív stresszt válthatunk ki. Továbbá azt is megfigyeltük kísérleteinkben, hogy a csírázás előtti konídiumokat célzó stratégiák jóval hatékonyabbak lehetnek, mint a csírázás utáni negatív hatások. Ezen kombinációk figyelembevétele hasznosak lehetnek a jövőben a gomba ellenes stratégiák fejlesztésénél.

Irodalomjegyzék

1. Barratt, R. W., Johnson, G. B., & Ogata, W. N. (1965). Wild-Type and Mutant Stocks of ASPERGILLUS NIDULANS. *Genetics*, 52(1), 233. <https://doi.org/10.1093/GENETICS/52.1.233>
2. 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(1–2), 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)

3. Dagenais, T. R. T., & Keller, N. P. (2009). Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in Invasive Aspergillosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 22(3), 447. <https://doi.org/10.1128/CMR.00055-08>
4. Dantas, A. D. S., Day, A., Ikeh, M., Kos, I., Achan, B., & Quinn, J. (2015). Oxidative Stress Responses in the Human Fungal Pathogen, *Candida albicans*. *Biomolecules*, 5(1), 142–165. <https://doi.org/10.3390/BIOM5010142>
5. Enright, A. J., Van Dongen, S., & Ouzounis, C. A. (2002). An efficient algorithm for large-scale detection of protein families. *Nucleic Acids Research*, 30(7), 1575–1584. <https://doi.org/10.1093/NAR/30.7.1575>
6. Inglis, D. O., Binkley, J., Skrzypek, M. S., Arnaud, M. B., Cerqueira, G. C., Shah, P., Wymore, F., Wortman, J. R., & Sherlock, G. (2013). Comprehensive annotation of secondary metabolite biosynthetic genes and gene clusters of *Aspergillus nidulans*, *A. fumigatus*, *A. niger* and *A. oryzae*. *BMC Microbiology*, 13(1), 1–23. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-13-91>
7. Karányi, Z., Holb, I., Hornok, L., Pócsi, I., & Miskei, M. (2013). FSRD: fungal stress response database. *Database*, <https://doi.org/10.1093/DATABASE/BAT037>
8. Leiter, E., Park, H. S., Kwon, N. J., Han, K. H., Emri, T., Olah, V., Meszaros, 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*. *Scientific Reports*, 6(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/srep20523>
9. Leyva Salas, M., Mounier, J., Valence, F., Coton, M., Thierry, A., & Coton, E. (2017). Antifungal Microbial Agents for Food Biopreservation—A Review. *Microorganisms*, 5(3), 37. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS5030037>
10. Linz, J. E., Hong, S. Y., & Roze, L. V. (2013). Oxidative Stress-Related Transcription Factors in the Regulation of Secondary Metabolism. *Toxins*, 5(4), 683–702. <https://doi.org/10.3390/TOXINS5040683>
11. Martinelli, S. D. (1994). *Aspergillus nidulans* as an experimental organism. *Progress in Industrial Microbiology*, 29, 33–58. <https://europepmc.org/article/med/7765132>
12. Montibus, M., Pinson-Gadais, L., Richard-Forget, F., Barreau, C., & Ponts, N. (2015). Coupling of transcriptional response to oxidative stress and secondary metabolism regulation in filamentous fungi. *Critical reviews in microbiology*, 41(3), 295–308. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2013.829416>
13. Oberle, M., Reichmuth, M., Laffer, R., Ottiger, C., Fankhauser, H., & Bregenzer, T. (2015). Non-Seasonal Variation of Airborne *Aspergillus* Spore Concentration in a Hospital Building. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 12(11), 13730–13738. <https://doi.org/10.3390/IJERPH121113730>
14. Paterson, R. R. M., & Lima, N. (2017). Filamentous Fungal Human Pathogens from Food Emphasising *Aspergillus*, *Fusarium* and *Mucor*. *Microorganisms*, 5(3), 44. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS5030044>
15. Paulussen, C., Hallsworth, J. E., Álvarez-Pérez, S., Nierman, W. C., Hamill, P. G., Blain, D., Rediers, H., & Lievens, B. (2017). Ecology of aspergillosis: insights into the

pathogenic potency of *Aspergillus fumigatus* and some other *Aspergillus* species. *Microbial Biotechnology*, 10(2), 296–322. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12367>

16. Chomczynski, P., Simms, D. M., Cizdziel, P.E. (1993). *TRIzol: a new reagent for optimal single-step isolation of RNA*. *Focus*. <https://www.scienceopen.com/document?vid=211656e2-1673-4783-8402-d8f5f5332811>

17. Van Dongen, S. (2008). Graph Clustering Via a Discrete Uncoupling Process. *SIAM Journal on Matrix Analysis and Applications*, 30(1), 121–141. <https://doi.org/10.1137/040608635>



Nyilvántartási szám: DEENK/127/2025.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Pákozdi Klaudia

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

MTMT azonosító: 10073393

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Pákozdi, K.**, Antal, K., Pázmándi, K. L., Miskei, M., Szabó, Z., Pócsi, I., Emri, T.: Resynthesis of Damaged Fe-S Cluster Proteins Protects *Aspergillus fumigatus* Against Oxidative Stress in the Absence of Mn-Superoxide Dismutase.
J. Fungi. 10, 1-16, 2024.
DOI: <https://doi.org/10.3390/jof10120823>
IF: 4.2 (2023)
2. **Pákozdi, K.**, Emri, T., Antal, K., Pócsi, I.: Global Transcriptomic Changes Elicited by sodB Deletion and Menadione Exposure in *Aspergillus nidulans*.
J. Fungi. 9 (11), 1-15, 2023.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/jof9111060>
IF: 4.2





További közlemények

3. Leiter, É., Emri, T., **Pákozdi, K.**, Hornok, L., Pócsi, I.: The impact of bZIP Atf1 ortholog global regulators in fungi.
Appl. Microbiol. Biotechnol. 105, 5769-5783, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-021-11431-7>
IF: 5.56
4. Szabó, Z., **Pákozdi, K.**, Murvai, K., Pusztahelyi, T., Kecskeméti, Á., Gáspár, A., Logrieco, A. F., Emri, T., Ádám, A. L., Leiter, É., Hornok, L., Pócsi, I.: FvafA regulates growth, stress tolerance as well as mycotoxin and pigment productions in *Fusarium verticillioides*.
Appl. Microbiol. Biotechnol. 104 (18), 7879-7899, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-020-10717-6>
IF: 4.813
5. Szabó, Z., **Pákozdi, K.**, Murvai, K., Kecskeméti, Á., Oláh, V., Logrieco, A. F., Madar, A., Dienes, B., Csernoch, L., Emri, T., Hornok, L., Pócsi, I., Leiter, É.: FvmsSOD is involved in oxidative stress defence, mitochondrial stability and apoptosis prevention in *Fusarium verticillioides*.
J. Basic Microbiol. 60 (11-12), 994-1003, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/jobm.202000560>
IF: 2.281

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 21,054

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapján szolgáló közleményekre):
8,4**

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

Debrecen, 2025.04.02.

