

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**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

A GLUTATION ANYAGCSERE, AZ ENZIM SZEKRÉCIÓ ÉS A SZEKUNDER
METABOLIT TERMELÉS SZABÁLYOZÁSÁNAK VIZSGÁLATA
SZÉNSTRESSZNEK KITETT *ASPERGILLUS NIDULANS* TENYÉSZETEK BEN

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

Írta: Gila Csaba Barnabás okleveles biotechnológus

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

Témavezető: Prof. Dr. Emri Tamás, MTA doktora

Az értekezés bírálói:

Dr. Gazdag Zoltán, PhD

Dr. Kovács Renátó László, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Majoros László, PhD

tagok: Dr. Kredics László, PhD

Domokosné Dr. Szabolcsy Éva, PhD

Az értekezés védésének helyszíne és időpontja:

Debreceni Egyetem, ÁOK, Belgyógyászati Intézet „A” épületének tanterme,
2026. március 9., 13:00 óra

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	2
1. Bevezetés és célkitűzés	3
1.1. Bevezetés	3
1.2. Célkitűzés.....	5
3. Anyagok és módszerek	7
4. Eredmények.....	9
4.1. A szénéhezés alatti GSH-metabolizmus vizsgálata.....	9
4.2. A laktózon megfigyelhető szénforrás limitációs stresszválasz vizsgálata	13
5. Megbeszélés.....	18
5.1. Szénéhező tenyészetek GSH-metabolizmusa.....	18
5.1.1. <i>A DUG-útvonal szerepe a glutation intracelluláris lebontásában.....</i>	<i>18</i>
5.1.2. <i>A redox-szabályozás és a szénéhezésre adott stresszválasz kapcsolata....</i>	<i>19</i>
5.1.3. <i>Az oxidatív stressz hatása a szekunder metabolitok termelésére</i>	<i>20</i>
5.1.4. <i>A DUG-útvonal inaktiválásának szignáltranszdukciós aspektusai</i>	<i>21</i>
5.2. A laktózon megfigyelhető szénforrás-limitációs stresszválasz	22
5.2.1. <i>Enzimatisus „felderítés” szénéhezés során.....</i>	<i>22</i>
5.2.2. <i>Az adaptív előrejelzés jelentősége a CAZyme gének szabályozásában</i>	<i>24</i>
5.2.3. <i>„A közlegelők tragédiája” („Tragedy of the commons”)</i>	<i>25</i>
5.2.3.1. <i>A laktóz regulátor szerepe a fakultatív család korlátozásában.....</i>	<i>26</i>
5.2.3.2. <i>Az A. nidulans, mint fakultatív család</i>	<i>27</i>
5.2.4. <i>A CAZyme-szekréció szabályozásának jelentősége.....</i>	<i>29</i>
6. Összefoglalás.....	30
7. A PhD értekezés új tudományos eredményei.....	33
8. Irodalomjegyzék.....	34
Köszönetnyilvánítás	37

Rövidítések jegyzéke

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

CSR: szénstresszválasz (carbon-stress-response)

DCF: 2,7-diklórfloreszcein

DCM: száraz sejttömeg (dry cell mass)

DTT: ditiotreitól

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

A *Saccharomyces 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 glutation (GSH) degradációt, 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) funkciója még nem volt tisztázott (Spitzmüller és mtsai., 2015a). 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 (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* transzkripció 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). A GSH, mint antioxidáns molekula degradációjának 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 (Kozsa és mtsai., 2022).

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 (Keller, 2019; Sakekar és mtsai., 2021). 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. 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 (Chettri és mtsai., 2020).

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. Mivel másodlagos anyagcseretermékeik szintén jelentősen befolyásolhatják a humán patogén gombák virulenciáját (pl. *Aspergillus fumigatus*), klinikai szempontból is érdemes figyelmet fordítani ezen metabolitok stressz alatti képződésére (Pfliegler és mtsai., 2020).

Amikor a szénforrás mennyisége vagy minősége nem teszi lehetővé a tenyészetek gyors vegetatív növekedését szénstresszről (szénéhezés vagy szénforrás-limitáció) beszélünk. A szénstressz nemcsak a gombák GSH anyagcseréjét, de szekunder metabolit- és a CAZyme-termelését is jelentősen befolyásolja. Számos, minket érdeklő jelenség (a GSH lebontási útvonalak aktiválódása, mikotoxinok képződése, egyes CAZyme fehérjék termelődése) könnyebben tanulmányozható szénéhező, illetve szénforrás-limitált tenyészetekben, mint a gyors vegetatív növekedést lehetővé tévő glükóz szénforráson (Pócsi és mtsai., 2003, 2004; Contesini és mtsai., 2021). Vizsgálatainkban ezért elsősorban szénstressznek kitett

tenyészetekkel dolgoztunk. A transzkriptom változásának nyomonkövetésével átfogó képet kaphatunk a tenyészet egésznek viselkedésében bekövetkezett változásokról. Kísérleteink középpontjában az RNS szekvenálással gyűjtött transzkriptom adatok feldolgozása és értelmezése állt, ami lehetővé tette számunkra, hogy a GSH anyagcserét, a miktoxinok 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

Doktori munkám kidolgozásához 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* Δ *dugB*, Δ *dugC* és Δ *dugB*- Δ *dugC* géndeléciós törzsek, valamint egy referencia törzs süllyesztett folyadékkultúrák (szubmerz) tenyészeitének összehasonlítása szénforrásmentes (szénéhező) és glükóztartalmú (növekedő)

tápközegen: biomassza-gyarapodás nyomon követése (DCM); glutationtartalom és változásának meghatározása (GSH, GSSG); redox-státusz ellenőrzése (DCF-teszt); antioxidáns és autolízishez köthető enzimaktivitások meghatározása; globális génexpressziós mintázatok összehasonlítása (RNAseq) és validálása (RT-qPCR); szekunder metabolit-termelés vizsgálata (TLC, HPLC, klasztergének transzkripciójának vizsgálata).

A fenti *A. nidulans* törzsek felületi (tápagarra leoltott) tenyészeinek 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 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).

3. Anyagok és módszerek

A kísérleteink során vizsgált *A. nidulans* törzsek a következők voltak: THS30 (referencia törzs), THM2 ($\Delta dugB$ mutáns), THM3 ($\Delta dugC$ mutáns), THM4 ($\Delta dugB \Delta dugC$ mutáns), THM7 ($dugC^+$ komplementált törzs), THM8 ($dugB^+$ komplementált törzs). A deléciós, 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 törzsfenntartást, valamint a felületi tenyészetek vizsgálatát Barratt-féle minimál tápagarral (AMM) végeztük (Barratt és mtsai., 1965). A táptalajok leoltás előtt már külön-külön tartalmazták a stressz ágenseket, melyek koncentrációja a következő volt: 0,18 mM menadion-nátrium-biszulfit (MSB); 0,8 mM *terc*-butil-hidroperoxid (*t*BOOH); 1,5 mM diamid; 1 M NaCl, 50 mM kongóvörös (CR). A felületi tenyészetek által termelt konídiumok mennyiségének meghatározásához egységnyi agarhasábok felületéről származó spóraszámot határoztunk meg hemocitóméterrel (Emri és mtsai., 2018).

A süllyesztett kultúrákhoz Barratt-féle táplevest (a táptalaj agarmentes változatát) használtuk rázatott Erlenmeyer lombikokban. A még exponenciális növekedési fázisban lévő micéliumok átmosását követően a friss táplevesek szénforrástartalma 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) (Gila és mtsai., 2021, 2022).

Az RNS-izolálás fermentléből átszűrt micéliumból történt, amelyekből az RNS-tartalmat Chomczynski (1993) módszere alapján nyertük ki. Az RNS minták ellenőrzését, valamint szekvenálását a DE ÁOK Genomi Medicina és Bioinformatikai Szolgáltató Laboratórium munkatársai végezték.

Az RT-qPCR vizsgálatok során a relatív transzkripció mértékét a $\Delta\Delta Ct$ módszerrel határoztuk meg. Referencia génként a kísérletsorozatoktól függően a *gfdA* és az AN6700 géneket használtuk (Gila és mtsai., 2021, 2022).

Az RNS-szekvenciák illesztésért, valamint a differenciáltan expresszált gének meghatározását Dr. Antal Károly (EKKE TTK Állattani Tanszék) végezte.

A felül-, illetve alulszabályozott génekhez kapcsolható biológiai folyamatok meghatározását géncsoport dúsulás (Gene Set Enrichment; GSE) analízisek segítségével jellemeztük. Az általunk definiált kategóriákba tartozó gének dúsulását a Fisher-egzakt teszt segítségével teszteltük. A GSE analízist a szekunder metabolit klaszter gének esetében klaszterenként is elvégeztük (Gila és mtsai., 2021, 2022).

A fiziológiai vizsgálatokhoz szűrt micélium mintákat használtunk fel. Az intracelluláris paraméterek vizsgálatához a mintákat homogenizátor segítségével tártuk fel. A süllyesztett tenyészetek növekedését a biomassa száraztömegének meghatározásán keresztül jellemeztük. A tenyészetek metabolikus aktivitásának („életképességének”) meghatározásakor MTT-assay-t végeztünk. A szénforrás-hasznosítás mértékét a fermentlében lévő redukálócukor mennyiségének meghatározásán keresztül állapítottuk meg. A kultúrák redox egyensúlyában bekövetkező változásokat DCF-teszttel vizsgáltuk. A fehérjetartalmak vizsgálatát a feltárt sejtmentes micélium kivonatokból és a szűrt fermentlevekből is elvégeztük Bradford-módszerrel (Gila és mtsai., 2021, 2022).

A fehérje-, glutation- (GSH, GSSG) és melanintartalmak meghatározását, valamint az enzimaktivitás méréseket (proteáz, kitináz, β -glükozidáz, β -galaktozidáz, hexózaminidáz, γ -GT, celluláz, kataláz, nitrát reduktáz, glutation reduktáz, SOD) spektrofotométer segítségével végeztük (Szilágyi és mtsai., 2018).

A tenyészetek STC-termelésének kvalitatív ellenőrzéséhez vékonyréteg-kromatográfiás (TLC) eljárást alkalmaztunk (Ámon és mtsai., 2018). A micéliumok STC-tartalmának kvantitatív vizsgálata HPLC analízissel Prof. Dr. Pusztahelyi Tünde segítségével (DE MÉK, Agrárműszerközpont) történt.

A fermentlébe szekretált fehérjék proteomikai vizsgálatához a a fehérjék 2D gélelektroforézissel történő elválasztását Dr. Keserű Judit (DE ÁOK, Humán genetikai Tanszék) végezte el. A kapott LC-MS/MS adatokból a fehérjék azonosítását Prof. Dr. Csósz Éva és munkatársai végezték (DE ÁOK, Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet).

4. Eredmények

4.1. A szénéhezés alatti GSH-metabolizmus vizsgálata

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. 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 géndelációk nem változtatták meg a sejtek GSSG-tartalmát. Szénéhező körülmények között, mindegyik deléciós törzsnek szignifikánsan nagyobb volt a GSH-tartalma. A $\Delta dugB$ és $\Delta dugC$ deléciós törzsek *dugB*, illetve *dugC* génekkel való komplementációja azonban csökkentette a törzsek GSH-tartalmát, és helyreállította a THS30 referencia törzs fenotípusát. 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.

A sülyesztett kultúrák vizsgálatai során exponenciális fázisú, növekedő micélium pelletek kerültek átmosásra szénforrásmentes tápközegbe. A *dugB* és/vagy *dugC* deléciója a várakozásoknak megfelelően a kontroll törzs GSH-szintjéhez képest emelkedett GSH-tartalmat eredményezett. A micéliumok GSSG-tartalmában egy esetben sem volt különbség, 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. Ezek az adatok arra utalnak, hogy a DUG-útvonalon kívül más útvonal(ak) is hozzájárul(nak) a GSH lebontásához szénéhezés során.

A csökkent GSH-lebontást a redox-egyensúly késleltetett felborulása kísérte, 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.

A szénéhezés alatti autolitikus sejtfallebontásban főként extracelluláris hidrolázok (pl. kitinázok, hexózaminidázok és glükánázok) vesznek részt (van Munster és mtsai., 2016). Az élő hifasejtek – többek között – melanint termelnek, hogy megvédjék sejtfalukat ezen hidrolázokkal szemben (Emri és mtsai., 2018). A DUG-útvonalban gátolt mutánsok kevesebb kitinázt és hexózaminidázt szekretáltak a fermentlébe, és esetükben a DCM is kisebb mértékben csökkent, emellett pedig kevesebb melanint termeltek, mint a kontroll törzs. A vizsgálatok során a deléciós törzsek kevesebb proteázt és γ GT-t termeltek a kontroll törzshöz képest.

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 törzsben ellentétes hatást fejtett ki.

Mivel a Δ *dugB* és Δ *dugC* mutánsok (THM2 és THM3), illetve a Δ *dugB*- Δ *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, a THM4 törzs oxidatív, só- és kongóvörös- (CR) stressztűrése nem különbözött jelentősen a referencia törzsetől. Azonban a THM4 mutáns fokozott toleranciát mutatott a CdCl₂-dal szemben.

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

A 10 g l⁻¹ glükózt tartalmazó tenyészetek esetében 10 mM GSH vagy ditiotreitolt (DTT) hozzáadása csökkentette a radiális növekedést, valamint a konídiumképződését mindkét törzsnél, továbbá 10 mM GSH jelenlétében a THM4 mutáns szignifikánsan kevesebb konídiumot termelt, mint a kontroll törzs. A 10 mM GSH jelenlétében megfigyelt különbség a két törzs konídium-termelése között a 40 g l⁻¹ glükózt tartalmazó táptalajon még szembetűnőbb volt.

Transzkriptomikai vizsgálatainkhoz a THM4 dupla mutáns és THS30 kontrolltörzs szénéhező süllyesztett kultúráinak RNAseq adatait vettük alapul, referenciaként pedig glükózon növekedő tenyészeteket használtunk. A felvehető szénforrás hiánya jelentősen módosította a tenyészetek transzkriptomát. A *dugB* és *dugC* gének kettős deléciója csak kis mértékben volt hatással a gomba transzkriptomára, ez a hatás glükóz esetén volt határozottabb, mintsem szénéhezés alatt.

A szénéhezés által kiváltott főbb változásokat géncsoport dúsulási (GSE) vizsgálatokkal azonosítottuk, melyek során az alábbiakat állapítottuk meg: (i) A zsírsav-lebontás felülszabályozódott, a nukleotid- és aminosav-bioszintézis pedig alulszabályozódott. (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. (iii) A glikolízis, az oxidatív pentóz-foszfát útvonal, a citromsav ciklus és a légzés génjei alulszabályozódtak. (iv) A vas-kén klaszter összeszerelő gének, az ergosterol bioszintézis génjei és a transzlációban részt vevő gének alulszabályozódtak. (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. 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. (vi) A cisztein-, metionin- és GSH-anyagcseréhez kapcsolódó gének szintén feldúsultak a két törzs alulszabályozott génkészleteiben. 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. Az AN12476 GSH-szintáz és az AN2988 feltételezett γ -glutamil-ciklotranszferáz génjei a THS30 és a THM4 törzsben is alulszabályozódtak. A referencia törzsben a *dugB* alul-, a *dugC* pedig felülszabályozódott. (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. 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 mikroperfuranon klaszter és a „No PKS/NRPS backbone 1” klaszter.

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. Ami az STC-klasztert illeti, a THM4 mutánsban ezen klasztergének nagyobb transzkripciós aktivitását fokozott STC-termelés is kísérte. A $\Delta dugB$ - $\Delta dugC$ duplamutánsban a referencia törzshöz viszonyított mindösszesen 40 felülszabályozott gén közül 24 gén valamely SMG-klaszter tagja volt.

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. Ezen túlmenően számos MAPK-útvonal gén (pl. *steC*, *sskB*, *pbsA*, *hogA* és *mkkA*), valamint a fejlődési folyamatok (konídiumképződés és askospóráképződés; pl. *flbA*, *flbC*, *flbE*, *nosA*, *rosA*, *nsdC* és *nsdD*) és a sejtfal bioszintézisének szabályozásában részt vevő gének alulszabályozottsága is megfigyelhető volt. Ezek a transzkripciós változások összhangban voltak a felületi tenyészetek glükózban gazdag táptalajon megfigyelt mérsékelt konídium-termelésével és megváltozott ivaros fejlődésével.

4.2. A laktózon megfigyelhető szénforrás limitációs stresszválasz vizsgálata

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 glükóztartalmú tápközegből szénforrásmentes, illetve laktóz/arabinogalaktán tartalmú közegbe történő átmosása jelentősen csökkentette a kultúrák MTT-redukáló aktivitását. Ez a csökkenés azonban csak átmeneti volt, ugyanis 4 óra elteltével a szénstressznek kitett kultúrák MTT-redukáló aktivitása még a szénéhező tenyészetek esetében is növekedni kezdett. A szénstressz a várakozásnak megfelelően a gombák növekedését is mérsékelte. 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, esetünkben csak egy kismértékű (de

statisztikailag nem szignifikáns) DCM-csökkenés volt megfigyelhető a szénforrás mentes tenyészetekben 12 óra elteltével.

A szénstressz minden kultúrában jelentősen csökkentette a nitrát reduktáz és a glutation reduktáz aktivitását, míg az intracelluláris β -galaktozidáz aktivitását megemelte. Ez az emelkedés a laktózos tenyészetek esetében volt a legnagyobb, amit az arabinogalaktán tartalmú, majd a szénéhező tenyészetek követtek. 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. A szénstressz növelte az extracelluláris proteáz, γ GT, kitináz és β -glükozidáz aktivitást, emellett pedig a szénéhezést leszámítva a laktózon vagy arabinogalaktánon történő tenyésztés növelte az extracelluláris β -galaktozidáz és a celluláz aktivitását is.

A szénéhező kultúrák fermentlevéből az alábbi fehérjék jelenlétét mutattuk ki: 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). Mindennek megfelelően a 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. A SodA és az EglC (szénéhező tenyészetekben kimutatott), valamint a CatB (szénéhező és laktózos tenyészetekben is kimutatott) fehérjék esetében azonban a megfelelő gének még szénstressz hatására is alulszabályozódtak.

Bár 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. Azonban még ennek ellenére is jelentős átfedést tapasztaltunk a három kultúra genomszintű expressziós változásai között.

A GSE-analízisek 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. 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. 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. 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 prosztetikus csoportok bioszintézise) felülszabályozódtak, míg a poliszacharid katabolikus folyamatok és a lipidanyagcsere (pl. zsírsav-oxidáció) alulszabályozódott a glükózban gazdag tenyészeteknél a többi kultúrához képest. Ezzel párhuzamosan a szénstressznek kitett tenyészetekre a szénhidrát-katabolizmus különböző elemeinek felülszabályozása, valamint néhány, főként a növekedéssel kapcsolatos folyamat alulszabályozása volt jellemző. A glikolízis gének átírása lecsökkent a szénstressz hatására, 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.

A szénstressz jelentősen befolyásolta a sejtfal homeosztázisát is. Általánosságban csökkent a szintázok, transzglykozilázok és szabályozó fehérjék

génjeinek expressziója, valamint a hidroláz gének felülszabályozottsága volt megfigyelhető, ami szintén egybeesik a kultúrák mérsékelt növekedésével. Azonban a laktózos kultúrák esetében – amelyek a három stresszkezelés közül a legintenzívebb növekedést mutatták – 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 -glükozaminidáz), amelyek bizonyítottan fontosak az elhalt sejtek falának hasznosításában (autolitikus sejtfaldegradáció; van Munster és mtsai., 2016), felülszabályozódtak a szénéhező és arabinogalaktános tenyészetekben. Kiemelendő, hogy a sejtfalintegritás fenntartásáért felelős géncsoportok transzkripciós aktivitása sem változott meg. Ismert, 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. 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, emellett több sejtfal-hidroláz génje is alulszabályozottságot mutatott a tenyészetekben. Autofágiához köthető géneket csak a szénéhező tenyészeteknél azonosítottunk.

A laktóz hasznosításáért felelős gének transzkripciós faktorait kódoló *galR* és *galX* gének csak a laktózt tartalmazó tenyészetekben szabályozódtak felül. Ez együtt járt a D-galaktózt bontó oxidoreduktív útvonal génjeinek, 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*) génjeinek felülszabályozódásával is. A laktóz-lebontó Leloir-útvonal génjei közül azonban egy sem szabályozódott felül.

Az arabinogalaktános tenyészetek esetében az *araR* felülszabályozódott, 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, 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 esetében is alulszabályozottságot mutattak. A *lacpB* és *lacD*, valamint néhány más ismert vagy feltételezett β -galaktozidáz gén még szénéhezés hatására is felülszabályozódott.

A szénstressz minden kultúrában fokozta bizonyos extracelluláris peptidáz (proteáz) gének transzkripcióját. Felülszabályozott géncsoportok dúsulása csak a szénéhező és az arabinogalaktános tenyészetekben volt jelentős, azonban még a laktózon felülszabályozott 10 ismert/feltételezett extracelluláris peptidáz gén is kimutatható proteáz aktivitással járt együtt.

Mindhárom kezelés hatására szintén szignifikáns mértékben szabályozódtak felül a CAZyme fehérjék génjei. Az AN9166 (feltételezett exo-1,6-galaktanáz) 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 -glükozidáz, cellobiohidroláz és cellobiozidáz gének arabinogalaktánon, míg a xilozidáz, illetve a ramnogalakturonán hasznosító gének mindhárom kezelésnél is feldúsultak a felülszabályozott gének csoportjában. 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. Az arabinogalaktánon felülszabályozott CAZyme gének esetében számos külön alkategóriába tartozó géncsoport is szignifikáns dúsulást mutatott. A szénéhező tenyészeteknél ilyen dúsulást azonban nem tapasztaltunk. 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. A glükózos referencia kultúrákat ilyen szempontból a β -1,4-endoglükánáz/celluláz géncsoport dúsulása jellemezte.

A szénforrás-specifikus géneket illetően a transzkripciós faktorok génjeinek csoportja a stresszkezelt tenyészeteknél felülszabályozottságot, glükóz-specifikusan pedig alulszabályozottságot mutatott. A *galR* és *galX* laktózon, valamint az *araR*

arabinogalaktánon és szénéhezés során történő felülszabályozódása mellett a celluláz- és xilanáztermelés szabályozásáért felelős *clrA*, a ramnóz hasznosításáért felelős *rhaR*, valamint az extracelluláris peptidáz- és sejtfal-hidroláz-termelésért felelős *brlA* és *xprG* gének felülszabályozódása volt jellemző a szénstressznek kitett tenyészetekre. A rosszul feltekeredett fehérjeválaszért (unfolded protein response; UPR; endoplazmatikus retikulum stressz) felelős HacA transzkripció faktor génjének transzkripciója is megnőtt szénstressz hatására hatására.

Mivel a sejtek másodlagos anyagcseréjét nagymértékben meghatározza a rendelkezésre álló szénforrás minősége és mennyisége, az SMG-klaszterek transzkripció aktivitását is értékeltük. Ezeknél a géncsoportoknál vegyesen fordultak elő felül- és alulszabályozódott klaszterek mindhárom kezelés során. Mind a négy kultúrában volt egy-egy jellegzetes SMG-klaszter, amely a legnagyobb transzkripció aktivitást mutatta az adott tenyészetnél, de a differenciáltan expresszált klaszterek összességében hasonló mintázatot mutattak. A szénstressz hatására felülszabályozott legfontosabb SMG-klasztereket közül kiemelkedik a STC-klaszter transzkripció aktivitása, illetve a kódolt mikotoxin képződését TLC-lemezen is sikerült kimutatni. Habár az alulszabályozott génklaszterek glükózon jelentkeztek a legnagyobb számban, voltak olyan klaszterek (mikroperfuranon klaszter, pkh klaszter és AN3273 klaszter), amelyek a három stressznek kitett tenyészetéhez képest nagyobb aktivitást mutattak a referencia kultúrákban.

5. Megbeszélés

5.1. Szénéhező tenyészetek GSH-metabolizmusa

5.1.1. A DUG-útvonal szerepe a glutation intracelluláris lebontásában

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. 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 feed-back kontrollja (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 megváltoztathatja a sejtek redox-állapotát, továbbá aktiválhatja azokat a szabályozó útvonalakat, amelyek a szénéhezéskor fellépő stresszválaszok elemeit szabályozzák.

Az itt bemutatott vizsgálatokból is kiderül, hogy a makroautofágia és az autolitikus sejtfallebontás a sejtek redoxállapotától is függ (Emri és mtsai., 2004; Bartoszewska és Kiel, 2011; Deng és mtsai., 2012), ugyanis a mérsékelt oxidatív stressz kedvezően hatott az sejtfal lebontó enzimek termelésére, míg a H₂O₂ okozta szélsőséges stressz azonban gátolta ezt a folyamatot (Emri és mtsai., 2004). A proteáz és γ GT aktivitásokat szintén befolyásolta a GSH-szint változása. Mivel a szénéhező tényezetek extracelluláris enzimaktivitásának nagy részéért felelős enzimeket (pl. ChiB, EngA, PrtA, PepJ és GgtA) kódoló gének transzkripciójában nem detektáltunk jelentős változásokat, lehetséges, hogy a redox-szabályozásnak ez a szegmense poszttranszkripció szinten fejtette ki a hatását. Azonban az is előfordulhat, hogy a sejtek redox-állapota közvetlenül a fehérje-szekréción szabályozásán keresztül befolyásolta a fehérjék termelését.

Habár a GSH-anyagcserében bekövetkezett változások módosították az intracelluláris ROS-szinteket, a megnövekedett ROS-képződés oka még így sem

teljesen nyilvánvaló. Ehhez a GSH-szintek csökkenése mellett a megnövekedett fehérjeszekréción (Yu és mtsai., 2016), valamint az antioxidáns enzimek termelésében bekövetkezett erőteljes változás is hozzájárulhatott. 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

Kísérletünkben több SMG-klaszter is felül szabályozódott a szénstressz (és a vele együtt járó oxidatív stressz) hatására, emellett néhány klaszter azonban alulszabályozottságot mutatott. 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 felül szabályozottság a THM4 DUG mutánsban lényegesen nagyobb volt, mint a kontroll törzsben. A klaszter működésében bekövetkezett változások a termelt STC mennyiségét is megváltoztatták. Korábban már kimutatták, hogy ivarosán fejlődő felületi tenyészetek esetében az STC-termelés időben egybeesik a kleisztotéciumok képződésével, és a Hülle-sejtekben lokalizálódik (Bayram és Braus, 2012; 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.

A korábbi megfigyelésekkel összhangban a mérsékelt oxidatív stressz serkentheti, míg az erős oxidatív stressz inkább gátolja egyes SMG-klaszterek működését (Emri és mtsai., 2015). 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 irodalmi adatok alapján az *A. nidulans* $\Delta glrA$ 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* deléciója nem növelte a gomba oxidatív stresszel szembeni toleranciáját. Lehetséges, hogy a GSH felhalmozódásának negatív mellékhatásai (pl. a túlzottan redukzív belső körülmények megakadályozhatják az oxidatív stresszválasz megfelelő szabályozását), ellensúlyozzák a megnövekedett antioxidáns kapacitást. Jól tükrözi a GSH túlzott jelenlétének káros következményeit egy korábbi 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. Ez a megfigyelés összeegyeztethető azzal a feltételezéssel, hogy a gomba GSH-kadmium komplex képzésével védekezik e nehézfém ellen (Emri és mtsai., 2021). Ebben az esetben a nagyobb GSH-szintek negatív mellékhatásai 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 törzsetől. Számos mitogén-aktivált protein-kináz (MAPK) útvonal gén (pl. *steC*, *sskB*, *pbsA*, *hogA*, *mkkA*) transzkripciójában mutatkozott változás. 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). 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. Ezen génexpressziós változásokkal összhangban a THM4 mutánsban csökkent konídium-képződést és az ivaros folyamatok szabályozásának zavarát figyeltük meg.

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 hisztidintartalmú foszfortranszferproteint kódol. 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 enzime reakív 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-kaszkádok aktivitását, amely számos gén, köztük a MAPK útvonalak fehérjéit kódoló gének és a differenciálódási folyamatok szabályozásában résztvevő gének transzkripcióját is módosította.

5.2. A laktózon megfigyelhető szénforrás-limitációs stresszválasz

5.2.1. Enzimatikus „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 (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 (van Munster és mtsai., 2014).

A mi esetünkben 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. Ezek az eredmények egybevágnak a felvázolt „enzimatis felderítés” stratégiával, miszerint a gombaéhezés során egyszerre több enzimet szekretál az alternatív szénforrások felkutatása érdekében anélkül, hogy felülszabályozná egy-egy poliszacharid hasznosításához szükséges teljes génkészletét.

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 (Szilágyi és mtsai., 2013; van Munster és mtsai., 2016). A potenciális szénforrások felderítése mellett az autolitikus sejtfallebontáshoz is intenzív extracelluláris enzimtermelésre 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* expressziója. Úgy tűnik tehát, hogy a sejtek szénstresszhez való alkalmazkodásában az ER megfelelő működése különösen fontos.

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 (Brown és mtsai., 2019). Ez azt jelenti, hogy egy adott stresszszorral 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 stresszszorral 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. Így nem meglepő, hogy számos, ennek a polimernek a lebontásában potenciálisan részt vevő enzimet kódoló gén, köztük galaktozidáz és arabinofuranozidáz gének is felülszabályozódtak. 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 génexpressziós mintázatában a xilán, a galakturonán, a ramnogalakturonán és a cellulóz hasznosításában részt vevő gének nagymértékű aktivitása is kimutatható volt. 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 több gén volt aktívabb. Az arabinogalaktánon növekedő tenyészetek ezen tulajdonsága leginkább az arabinogalaktán hasznosítása során felszabaduló molekulák „cross-upregulaton” hatásával magyarázható.

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 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 (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 sejtfelszínhez való rögzítésével, illetve az enzimet szekretáló egyedek térbeli izolációja a csalóktól (Lerch és mtsai., 2022). A biopolimerek extracelluláris lebontása általában feed-back gátlás és feed-back represszió által szabályozott (Glass és mtsai., 2013; Wang és Lu, 2016). E negatív visszacsatolásos 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 család 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, extenzinekben) gyakran megtalálható a növényi sejtfal-poliszacharidokban (Held és mtsai., 2015). A galaktóz szintén részét képezi a gombasejtfal galaktomannán (galaktofurán oldalláncok) és galaktózaminogalaktán (α -1-4-galaktozid és N-acetil-galaktózamin oldalláncok) összetevőinek is. Nem meglepő módon az *A. nidulans* genomja, sok más gombához hasonlóan, számos α - és β -galaktozidáz, valamint néhány galaktanáz gént is 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* laktóz permeázok, valamint a D-galaktóz oxidoreduktív útvonal aktív transzkripciója jellemezte. Ezek mellett csak 81 CAZyme gén szabályozódott felül laktózra, amelyekből egy gén kivételével mindegyik aktív volt arabinogalaktánon és szénéhezés alatt is. 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. Azonban a felülszabályozott galaktozidáz gének többsége alapvetően a laktóztól eltérő galaktóztartalmú vegyületek hasznosításában vesz részt. A galaktóztartalmú 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. A galaktózt nem tartalmazó vegyületek lebontásával kapcsolatos felülszabályozott gének (β -1,4-endoglükánáz, β -glükozidáz, cellobiosidáz és cellobióz-dehidrogenáz gének) közül 11 volt található laktózon, azaz több, mint a szénéhező tenyészeteknél (8 gén) és kevesebb, mint az arabinogalaktános kultúráknál (19 gén).

Ezek a változások együttesen azt sugallják, hogy a nagy laktózkoncentráció egy olyan szituációt imitálhatott a gomba számára, mintha a környezetben galaktóztartalmú poliszacharidok lettek volna jelen, amelyek lebontása olyan hatékony volt, hogy a galaktóztartalmú 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 csalogók elszaporodását. Épp ezért a potenciális közjavak megteremtésének és hasznosításának ütemét egyensúlyban kell tartani. Ez génexpressziós szinten egy olyan CAZyme-profil eredményezett laktózon, ahol több érzékelt/előrejelzett poliszacharid lebontásában részt vevő CAZyme-gén szabályozódik felül, mint szénéhezés során, de kevesebb, mint az arabinogalaktán jelenlétében. Igen nagy a valószínűsége, hogy a laktóz hatása szorosan összefügg annak koncentrációjával, és hogy a molekula kettős szabályozóként működik (azaz kis koncentrációban indukáló, nagy koncentrációban represszáló hatású).

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

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 glükóztartalmú vegyületek, míg a gombák sejtfalában a β -1,3- és α -1,3-glükánok rendelkeznek a legjelentősebb glükóztartalommal (de Groot és mtsai., 2009; Held és mtsai., 2015).

Esetünkben a glükózban gazdag körülmények felülszabályozták a glikolízis génjeit, 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. Érdekes módon néhány CAZyme gén glükózon érte el a legnagyobb transzkripciós aktivitást. Ezek a gének a glükóz-polimerek lebontásában részt vevő (vagy feltételezhetően részt vevő) enzimeket kódolnak. A glükózos tenyészetek jellemzői (pl. a β -glükán lebontásában részt vevő számos felül szabályozott glükóz-specifikus gén) hasonlítanak a laktóz esetében megfigyeltekhez. 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 elkezdtek 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 represszálódott az autofágia és az autolitikus sejtfaledbontás is. Az extracelluláris enzimek (pl. peptidázok vagy növényi és gombasejtfal-hidrolázok) génjeinek alacsony transzkripciós aktivitása a laktózhoz 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 közjóság 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” vonzza maga után. 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 csoportjai mellett az antioxidáns enzimgének csoportja dúsult fel glükóz-specifikusan a felülszabályozott gének közül. 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). Ezen túlmenően a legnagyobb számú alulszabályozott szekunder metabolit génklaszterek csoportja is a glükózos tényezetek génexpressziós profiljában volt megfigyelhető. A transzkripciós faktor gének alulszabályozott expressziója – 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.

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 (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 viselkedésökológiai aspektusainak részletes vizsgálata a jövőben

hozzásegíthet minket a gombák CAZyme-szekréciójának alaposabb megértésében, ami javíthatja ipari alkalmazhatóságukat.

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 *A. nidulans* fonalas gomba modell szénstressznek kitett tenyészeinek 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 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 $\Delta dugB$ - $\Delta dugC$ 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 enzimszekréciót, de megnövelte az STC-termelést. Transzkriptomikai vizsgálataink alapján feltételezhető, hogy a gomba enzimszekréciója 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 felül szabályozódást arabinogalaktánon (138 és 62 gén), ahol galaktozidáz és arabinánbontó enzim gének mellett cellulolitikus, pektinolitikus, mannán- és xilánbontó enzim gének 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 „közlegelő 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.

7. A PhD értekezés új tudományos eredményei

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-klasztereket 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.

8. Irodalomjegyzék

- 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.
- 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.
- 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.
- Barratt, R. W., Johnson, G. B., és Ogata, W. N. (1965). Wild-Type And Mutant Stocks Of *Aspergillus Nidulans*. *Genetics* 52, 233–246.
- Bartoszewska, M., és Kiel, J. A. K. W. (2011). The Role Of Macroautophagy In Development Of Filamentous Fungi. *Antioxidants & Redox Signaling* 14, 2271–2287.
- Bayram, Ö., és Braus, G. H. (2012). Coordination Of Secondarymetabolism And Development In Fungi: The Velvet Family Of Regulatory Proteins. *FEMS Microbiology Reviews* 36, 1–24.
- 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 In Microbiology* 27, 219–230.
- 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.
- Chettri, D., Verma, A. K., és Verma, A. K. (2020). Innovations In Cazyme Gene Diversity And Its Modification For Biorefinery Applications. *Biotechnology Reports* 28, E00525.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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, S72–S81.
- Deng, Y., Qu, Z., és Naqvi, N. I. (2012). Role Of Macroautophagy In Nutrient Homeostasis During Fungal Development And Pathogenesis. *Cells* 1, 449–463.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.

- 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 Microbiologia* 63, 619–626.
- 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.
- 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.
- 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.
- Glass, N. L., Schmoll, M., Cate, J. H. D., és Coradetti, S. (2013). Plant Cell Wall Deconstruction By Ascomycete Fungi. *Annual Review Of Microbiology* 67, 477–498.
- 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.
- Hallsworth, J. E. (2018). Stress-Free Microbes Lack Vitality. *Fungal Biology* 122, 379–385.
- Hardin, G. (1968). The Tragedy Of The Commons. *Science* 162, 1243–1248.
- 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.
- 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.
- Keller, N. P. (2019). Fungal Secondary Metabolism: Regulation, Function And Drug Discovery. *Nature Reviews Microbiology* 17, 167–180.
- 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.
- 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.
- Lushchak, V. I. (2012). Glutathione Homeostasis And Functions: Potential Targets For Medical Interventions. *Journal Of Amino Acids* 2012, E736837.
- Pfliegler, W. P., Pócsi, I., Győri, Z., és Pusztahelyi, T. (2020). The *Aspergilli* And Their Mycotoxins: Metabolic Interactions With Plants And The Soil Biota. *Frontiers In Microbiology* 10.
- Pócsi, I., Prade, R. A., és Penninckx, M. J. (2004). „Glutathione, Altruistic Metabolite In Fungi”, In *Advances In Microbial Physiology*, (Academic Press), 1–76.
- Pócsi, I., Pusztahelyi, T., Saw, L., és Emri, T. (2003). Autolysis Of *Penicillium Chrysogenum*-A Holistic Approach. *Indian Journal Of Biotechnology*. 2, 293–301.
- Sakekar, A. A., Gaikwad, S. R., és Punekar, N. S. (2021). Protein Expression And Secretion By Filamentous Fungi. *Journal Of Bioscience* 46, 5.
- 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.

- Smith, P., és Schuster, M. (2019). Public Goods And Cheating In Microbes. *Current Biology* 29, R442–R447.
- Spitzmüller, Z., Hajdú, M., Pócsi, I., és Emri, T. (2015a). Degradation Of Glutathione In *Aspergillus Nidulans*. *Biologia Futura* 66, 242–245.
- 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.
- Staadén, S., Milcu, A., Rohlf, 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.
- 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.
- Szilágyi, M., Miskei, M., Karányi, Z., Lenkey, B., Pócsi, I., és Emri, T. (2013). Transcriptome Changes Initiated By Carbon Starvation In *Aspergillus Nidulans*. *Microbiology* 159, 176–190.
- Van Munster, J. M., Burggraaf, A.-M., Pócsi, 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Znameroski, E. A., és Glass, N. L. (2013). Using A Model Filamentous Fungus To Unravel Mechanisms Of Lignocellulose Deconstruction. *Biotechnology For Biofuels* 6, 6.

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 Humángenetikai 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 utolsó sorban 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.



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-Győri, 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 tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2025.02.06.

