

**Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei**  
**Theses of Doctoral (PhD) Dissertation**

***ASPERGILLUS* FAJOK OXIDATÍV  
STRESSZVÁLASZA**

**OXIDATIVE STRESS RESPONSE OF ASPERGILLUS  
SPP.**

Vassné Orosz Erzsébet

Témavezető/ Dissertation supervisor: Prof. Dr. Pócsi István



**DEBRECENI EGYETEM**  
**Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola**

Debrecen, 2018.

## 1. Bevezetések és célkitűzések

A gombák hatékony eszközöket fejlesztettek ki a különböző környezeti stressz típusok érzékelésére és leküzdésére, amely által különböző ökológiai helyek elfoglalására képesek.

Oxidatív stressz alatt a reaktív oxigénformák (ROS) száma és koncentrációja kórosan megnövekszik a sejten belül, amely a redox homeosztázis felborulását eredményezi. Az oxidatív stressz következtében lipidperoxidáció, továbbá fehérje és DNS degradáció jön létre.

A gombák oxidatív stresszválasza a modern mikrobiológia intenzíven tanulmányozott területe, amely segíthet megfejteni a gombák stresszhez való gyors alkalmazkodási stratégiáit.

Az *Aspergillus* nemzetséghez tartozó ismert gombák száma egyre növekszik, és egymástól nagyon eltérő élettani tulajdonságaik miatt gyakorlati felhasználásuk is egyre szélesebb körű. Találhatunk köztük élelmiszer- és gyógyszeriparban hasznos fajokat, mint például a keleti konyhakultúrában hasznos *A. oryzae*-t, és a citromsavgyártásban fontos *A. niger*-t (Papagianni, 2007; Pel és mtsi, 2007; Francis és mtsi, 2003; Vandenberghe és mtsi, 2000). Ugyanakkor léteznek veszélyes mikotoxinokat termelő *Aspergillus*ok is, amelyek állati és növényi betegségeket okozhatnak. Ilyen gomba például a humán opportunistá patogén *A. fumigatus* (Dagenais és mtsi, 2009; Latgé, 2001), az aflatoxint termelő *A. flavus* (Kozakiewicz, 1995), a patulin toxint termelő *A. clavatus* (Wortman és mtsi, 2006; Payne és mtsi, 2006), vagy az ochratoxin A bioszintézisére képes *A. ochraceus*, *A. carbonarius* és *A. niger* fajok (Bui-Klimke és

Wu; 2015). Mindezért ezen gombacsoport változatos genetikai és élettani jellemzőinek a feltárása az elmúlt néhány évtized mikrobiológiai kutatásainak egyik központi területe.

A Debreceni Egyetem Biotechnológiai és Mikrobiológiai Tanszékén mára már számos oxidatív stressz szabályozó mechanizmust tártak fel (Bakti és mtsi, 2017; Leiter és mtsi, 2012; Jakab és mtsi, 2015; 2014; Emri és mtsi, 2015; Spitzmüller és mtsi, 2015; Balázs és mtsi, 2010). Ezen belül néhány jelentős szerepet játszó bZIP-típusú transzkripciós faktort is jellemeztek. Ilyen az *A. nidulans* szekunder metabolizmusának helyreállításában fontos RsmA („restorer of secondary metabolism”) fehérje, vagy a gomba oxidatív és ozmotikus stresszválaszban jelentős NapA és AtfA transzkripciós faktorok (Yin és mtsi, 2013; Balázs és mtsi, 2010; Miskei és mtsi, 2009).

Doktori munkám során 18 *Aspergillus* törzset (két *A. niger* törzs) reprezentáló 17 *Aspergillus* faj oxidatív stressz vizsgálatában vettem részt. Ennek során célul tűztük ki az alábbi vizsgálatok megvalósítását:

- A kiválasztott 17 *Aspergillus* gombafaj összehasonlító genomikai és élettani elemzését.
- Fő célunk volt, hogy kiválasszunk közülük egy olyan gombafajt, amelyet a jövőben hatékonyan felhasználhatunk, mint modellorganizmust az *Aspergillus*ok vagy más fonalas gombák stresszválaszát megcélzó kutatásokban.
- Ezért az *A. nidulans* gombafaj oxidatív stresszválaszát vizsgáltuk részletesebben. Ennek során az *A. nidulans* kontroll és  $\Delta atfA$  törzsével transzkriptomikai és molekuláris genomikai kutatást végeztünk.

- Választ kerestünk arra a kérdésre, hogy vajon az AtfA (lokusz ID AN2911) transzkripciós faktor hogyan vesz részt az *A. nidulans* környezeti stresszválasz génjeinek szabályozásában?
- Végül jellemtük az AtfA fehérje *A. nidulans* oxidatív stresszválaszában betöltött szabályozó funkcióját.

## 2. Anyagok és módszerek

### 2.1 A 17 *Aspergillus* faj oxidatív stressz toleranciájának vizsgálata

Az alábbi *Aspergillus* törzsek oxidatív stresszválaszát tanulmányoztuk:

1. *Aspergillus aculeatus* (CBS 172.66)
2. *Aspergillus brasiliensis* (CBS 101740)
3. *Aspergillus carbonarius* (CBS 141172 = DTO 115-B6)
4. *Aspergillus clavatus* (CBS 513.65 = NRRL1)
5. *Aspergillus fisheri*  
(*Neosartorya fisheri*) (CBS 544.65)
6. *Aspergillus flavus* (CBS 128202 = NRRL 3357)
7. *Aspergillus fumigatus* (CBS 126847 = Af293)
8. *Aspergillus glaucus*  
(*Eurotium herbariorum*) (CBS 516.65)
9. *Aspergillus luchuensis (acidus)*(CBS 106.47)
10. *Aspergillus nidulans* (FGSCA4)
11. *Aspergillus niger* (CBS 113.46)
12. *Aspergillus niger* (NCCB 402)
13. *Aspergillus oryzae* (Rib40)
14. *Aspergillus sydowii* (CBS 593.65)
15. *Aspergillus terreus* (NIH2624)
16. *Aspergillus tubingensis* (CBS 134.48)
17. *Aspergillus versicolor* (CBS 795.97)
18. *Aspergillus wentii* (CBS 141173 = DTO 134-E9)

A 18 gombatörzseket 25 °C hőmérsékletű inkubátorban 6 napon át sötétben spóráztattuk malátás táptalajon, majd a 6. napon a gombaspórákat a stressz kísérletekhez összegyűjtöttük. Az *Aspergillus glaucus* (CBS 516.65) gombatörzs tenyésztése 1,0 M NaCl-dal kiegészített malátás táptalajon történt (de Vries és mtsi, 2017).

A stressz kísérleteket nitrát minimál tápagon végeztük 37 °C-os inkubációs hőmérséklet mellett 5 napig, míg 25 °C-os inkubációs hőmérsékleten 5 és 10 napig (Barratt és mtsi, 1965).

A kiválasztott törzseket  $10^5$  számú spórával 5  $\mu$ l térfogatban pontszerűen inokuláltuk stressz ágenseket tartalmazó nitrát minimál tápagarra. Oxidatív stressz ágensként a  $H_2O_2$ -t és MSB-t (menadion-nátrium-biszulfit) alkalmaztunk. A 17 *Aspergillus* faj stressz élettani adatainak összegyűjtésére a Fungal Stress Database adatbázist hoztuk létre (de Vries és mtsi, 2017; Fungal Stress Database; <http://www.fung-stress.org/>).

## **2.2 Az *Aspergillus nidulans* kontroll és *AtfA* törzsekkel végzett oxidatív stressz vizsgálatok és transzkriptomikai elemzések**

Az *Aspergillus nidulans* THS 30.3 kontroll és TNJ 92.4 *AtfA* törzseinek oxidatív stresszre adott válaszát tanulmányoztuk.

TNJ 92.4 (*pyrG89*, *AfupyrG*<sup>+</sup>; *pyroA4*; *AtfA::pyroA*; *veA*<sup>+</sup>)

THS 30.3 (*pyrG89*, *AfupyrG*<sup>+</sup>; *pyroA*<sup>+</sup>; *veA*<sup>+</sup>)

A két *A. nidulans* törzset szilárd nitrát minimál táptalajon tenyésztettük 37 °C-on, 6 napon keresztül (Barratt és mtsi, 1965). Ezt követően a kinőtt spórákat összegyűjtöttük, és  $10^5$  számú friss spórát különböző stressz ágens koncentrációjú szilárd minimál tápközegre pontinokuláltunk.

Az alkalmazott stressz ágensek és koncentrációik az alábbiak voltak:

*t*BOOH: 0,8 mM

$H_2O_2$ : 6,0 mM

MSB:0,12 mM

diamid: 2,0 mM

NaCl: 0,6 M

A felületi kultúrákat 37 °C-on, 5 napon át inkubáltuk. A tenyészetek átmérőinek leméréseivel a törzsek stresszérzékenységet jellemeztük (4 egymástól független kísérlet eredményei alapján).

A két *A. nidulans* törzs genomszintű transzkripciós változásainak vizsgálatához a törzseket szintén szilárd halmazállapotú nitrát minimál táptalajon 37 °C-on, 6 napon keresztül tenyésztettük (Barratt és mtsi, 1965). Ezután 10<sup>8</sup> számú spórát folyékony nitrát minimál tápközegbe oltottunk. A sülyesztett kultúras tenyészeteket 37 °C-os inkubációs hőmérsékleten, 3,7 Hz rázófrekvencián és 20 órán rázóttuk.

A tenyészeteket 16 órányi inkubálása (220 rpm, 37 °C-on) után alábbi koncentrációjú stressz ágensekkel kezeltük:

- 0,12 mmol/l MBS
- 0,8 mmol/l tBOOH
- 1,8 mmol/l diamid

A stresszorok hozzáadását követő 30. percben DNS-chip és RT-qPCR vizsgálatokhoz a tenyészetekből mintát vettünk, a 4. órában pedig enzimaktivitás méréséhez, szterol tartalom meghatározásához és a stressz hatás következtében termelődött extracelluláris sziderofór mennyiségének meghatározásához.

A kezelt és kezeletlen minták liofilizált micéliumaiból teljes RNS-t izoláltunk, amelyeket microarray vizsgálatokhoz (DNS-chip) használtunk fel. Ezt követően géndúsulási vizsgálatokat végeztünk, hogy elemezzük az egyes géncsoportokhoz tartozó gének halmozódását. A DNS-chip eredményeket RT-qPCR kísérlettel validáltuk.

### 3. Eredmények és megbeszélésük

#### 3.1 A vizsgált 17 *Aspergillus* gombafaj eltérő oxidatív stresszválasza

Eredményeink azt mutatják, hogy a vizsgált 17 gombafaj egymástól eltérően reagált a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, illetve az MSB hatására kialakult stresszre (de Vries és mtsi, 2017).

A 17 *Aspergillus* faj közül H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> jelenlétében a két *A. niger* (CBS 113.46 és NCCB 402) törzs, valamint az *A. oryzae* (Rib40) és az *A. nidulans* (FGSCA4) fajok bizonyultak a legtűrőképesebbnak 37 °C-on történő 5 napos inkubáció során. Ezzel ellentétben azt tapasztaltuk, hogy az *A. fumigatus* volt a legérzékenyebb faj a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> okozta stresszre (de Vries és mtsi, 2017; <http://www.fung-stress.org/>).

A de Vries és munkatársai által elvégzett összehasonlító genomikai elemzés feltárta, hogy *A. fumigatus* gombában megfigyelt cIV csoportbeli CatC hiánya és a cIII csoportba tartozó CatC jelenléte talán magyarázat lehet a gomba viszonylag gyenge H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tűrésére. Mindezek alapján azt feltételezzük, hogy cIII csoportbeli katalázok egy ősi duplikációs esemény következtében alakultak ki, és valószínűleg a többi C-típusú kataláztól eltérő működésűek.

További oxidatív stressz toleráns fajok voltak az *A. brasiliensis*, *A. wentii*, *A. versicolor* és az *A. aculeatus*. Ezek a gombák viszont az MSB okozta stresszt voltak képesek erősen tolerálni 37 vagy 25 °C-on. Az *A. brasiliensis* esetében a kiemelkedő MSB rezisztenciát valószínűleg a benne újonnan feltárt két új típusú SodA fehérjék okozzák (de Vries és mtsi, 2017; Orosz és mtsi, 2018; <http://www.fung-stress.org/>; Oberegger és mtsi, 2000).

A vizsgált 16 *Aspergillus* fajhoz viszonyítva a modellorganizmusként használt *A. nidulans* tolerálta az H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> és MSB stresszt.

Ezért az *A. nidulans* AtfA fehérjéjének oxidatív stresszválaszban betöltött szabályozó szerepét vizsgáltuk.

### **3.2 Az *atfA* deléciójának élettani hatásai az *Aspergillus nidulans* gombafajban**

A tenyészeteket 37 °C-on 5 napon át inkubáltuk. Eredményül azt kaptuk, hogy a  $\Delta atfA$  mutáns sokkal érzékenyebb volt MSB, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, *t*BOOH jelenlétére, mint a kontroll törzs.

### **3.3 Az *Aspergillus nidulans atfA* deléciójával bekövetkezett genomszintű transzkripciós változások**

Összességében az *atfA* gén törlésével az alábbi fő stresszválasz szabályozásban létrejött változásokat tapasztaltuk:

- Számos gén (1045) expressziója elvesztette stresszérzékenységét az *atfA* gén deléciójával, míg más gének (704) stresszérzékennyé váltak
- Az AtfA hiányában meglévő együttesen szabályozott (koregulált) gének száma és a géncsoport összetétele is megváltozott a kontroll törzsben megtalálható COSR géncsoporthoz képest. Ugyanis az *atfA* gén deléciója következtében 88 gén elveszítette korábbi „koregulált természetét”, míg további 152 koregulált génné vált.

- Összesen 312 *tBOOH* specifikus gén *ΔatfA* mutáns törzsben MSB stresszfüggést mutatott. Továbbá 883 AtfA-függő gén elvesztette MSB stresszérzékenységét
- Mindemellett, 52 diamid stressz-specifikus gén *tBOOH* stressz-függést, míg 120 *tBOOH*-függő gén diamid-függést kezdtek mutatni az AtfA fehérje hiányában.

A géndúsulási vizsgálatok („gene enrichment analysis”) alapján az AtfA-függő gének között az alábbi GO kategóriák dúsulását sikerült kimutatnunk:

1. Riboszóma biogenezis gének”
2. ”Mitotikus sejtciklus” gének
3. Antioxidáns enzimeket kódoló gének
4. Sziderofór bioszintézisben résztvevő gének.
5. „Vas-kén klaszter összeszerelő” gének
6. „Két-komponensű szignáltranszdukciós rendszer” génjei
7. „Nitrát felhasználási” gének
8. „ER-tól Golgi készülékhez történő vezikulum transzport” gének
9. Szkvalén-ergoszterol bioszintézis útvonal génjei.
10. „Szignál-transzdukciós” gének

A kapott transzkripciós adatokból egy három hipotézisből álló modellt állítottunk fel, hogy értelmezhesük az *A. nidulans* AtfA transzkripciós faktorának oxidatív stresszben betöltött funkcióját.

**1. hipotézis:** Az AtfA fehérje közvetve vagy közvetlenül számos olyan gén szabályozásában vesz részt, amelyek a stresszválasz regulátor elemeket kódolnak. Mindez

magyarázat lehet arra, hogy az *atfA* deléció miatt volt hatással a különböző funkcióval rendelkező gének expressziójára ilyen nagy számban.

Kísérleteinkben összesen 26 szignáltranszdukciós fehérjét vagy feltehetően szignáltranszdukciós fehérjét kódoló gén kifejeződése mutatott AtfA-függést. Közülük a „kétkomponensű szignáltranszdukciós rendszer” néhány eleme érdekesnek tűnik. Sok, ebbe a csoportba tartozó gén más génekkel együtt szintén AtfA-függő szabályozást mutatott, amikor a stresszmentes körülmények között tenyésztett kontroll és  $\Delta atfA$  mutáns törzsből származó transzkriptomokat összehasonlítottuk (Emri és mtsi, 2015). Silva és munkatársai nemrégiben leírták, hogy *A. fumigatus* gombában az *atfA* és *atfB* szabályozás alatt álló MpkC és SakA fehérjék (Hog1 ortológok, hiperozmotikus stresszválasz elsődleges szabályozója) szintén hatással vannak a „kétkomponensű szignáltranszdukciós rendszer” génjeire (Pereira Silva és mtsi, 2017). A legtöbb, összesen 7 db „kétkomponensű szignáltranszdukciós rendszer” gén MSB stressz alatt up-regulálódott, amely valószínűleg fontos pozitív visszacsatolás ebben a fajta stresszválaszban. Ezek közül a gének közül 5 AtfA-függést mutatott, amely megindokolhatja az MSB stressz alatt bekövetkezett transzkriptomikai változást. Ugyanis az AtfA függő gének (1557) több mint a felének (57%) az expressziója MSB stresszkezelés hatására változott meg.

**2. hipotézis:** Az AtfA más stressz szabályozó elemekkel és/vagy transzkripciós szabályozó fehérjékkel működhet együtt. Korábban kimutatták, hogy az AtfA transzkripciós faktor más fajokban meglévő ortológjai és paralógjai képesek kölcsönhatásba lépni más bZIP-típusú transzkripciós faktorokkal, vagy akár szignáltranszdukciós útvonalak

fehérjével is (Reinke és mtsi, 2013). Ilyen például a *S. pombe* Atf1 fehérjéje, amely a Pcr1 bZIP-típusú transzkripciós faktorral heterodimert képez (Sanso és mtsi, 2008), míg a Cid12 poli(A) polimerázzal fizikai interakcióba lép (Vo és mtsi, 2016). Ezenkívül az *A. parasiticus* AtfB fehérjéje a szintén bZIP-típusú AP-1 fehérjével képez heterodimert (Roze és mtsi, 2011). Ezenfelül Sanso és munkatársai azt feltételezik, hogy az *A. nidulans* AtfA fehérje fizikai kölcsönhatást alakíthat ki az AtfB (AN8643) fehérjével (Sanso és mtsi, 2009). A létrejött kölcsönhatás módosíthatja mind az AtfA, mind az interakciós partner biológiai aktivitását. Feltételezzük, hogy az AtfA stresszenként különböző fehérjékkel léphet kölcsönhatásba, és ettől függően eltérő gének szabályozásában vesz részt. Ugyanis *tBOOH*, MSB és diamid okozta stresszben összesen 1557 génből 785 gén up-regulálódott és 772 gén down-regulálódott AtfA-függő módon, amelyek több mint a fele (883, a gének 57 %) MSB stressz alatt volt mérhető.

**3. hipotézis:** Az AtfA fehérje közvetve vagy közvetlenül gátolja a szignáltranszdukciós hálózat elemek és/vagy egyéb transzkripciós faktorok aktivitását. Ugyanis AtfA hiányában a koregulált gének számában meghatározó eltérést nem láttunk, viszont összetételük jelentősen megváltozott. Az AtfA fehérje MSB stressz alatt nagy valószínűséggel meggátolta a *tBOOH* stressz specifikus gének válaszát. A *tBOOH* és MSB stressz közötti ún. aszimmetrikus „cross talk” hatására számos AtfA-függő gén (883 gén) elveszítette MSB stresszérzékenységét, míg jó néhány *tBOOH* stresszválasz gén (312 gén) MSB stresszérzékennyé vált a *ΔatfA* mutáns törzsben.

E modell alapján az AtfA transzkripciós faktor az oxidatív stressz szabályozó mechanizmusaiban fontos szerepet tölt be, ezen belül közvetve vagy közvetlenül képes aktiválni és down-regulálni bizonyos oxidatív stresszválasz géneket.

### **3.4 Az AtfA fehérje szerepe az *Aspergillus nidulans* szekunder metabolizmusában**

Megfigyeléseink alapján feltételezzük, hogy az AtfA transzkripciós faktor fontos szerepet tölthet be az *A. nidulans* oxidatív stresszválaszának és szekunder metabolit termelésének összehangolt szabályozásában. Ugyanis a kontroll és a  $\Delta atfA$  törzs szekunder metabolit bioszintetikus génjeire szinte valamennyi stresszor hatással volt. Emellett a  $\Delta atfA$  törzs szekunder metabolit génjei kicsi (5,0 mM) és nagy (75,0 mM)  $H_2O_2$  koncentrációk hatására nagymértékben up-regulálódtak. Munkánk azt bizonyítja, hogy ha oxidatív stressz alatt egy gomba létfontosságú, oxidatív stresszválaszt szabályozó fehérjéjének génje hiányzik, akkor kedvező feltételek jöhetnek létre szekunder metabolitjainak a túltermelésére.

## 4. Összefoglalás

Az *Aspergillus* fajok molekuláris biológiai, mezőgazdasági, ipari és orvosbiológiai jelentőségük miatt napjaink egyre inkább kutatott organizmusai közé tartoznak. (Dagenais és mtsi, 2009; Sijmen és mtsi, 2007; Payne és mtsi 2006; Wortman és mtsi, 2009; Latgé, 2001; Oakley és mtsi, 1981).

A 17 *Aspergillus* faj oxidatív stresszválaszának kutatásához élettani elemzéseket végeztünk. Bioinformatikai módszerekkel de Vries és munkatársai megkeresték a kulcsfontosságú oxidatív stresszválasz fehérjék ortológjait. Ezeket az adatokat összevetettük az élettani kísérletek eredményeivel. Megfigyelésink közül az alábbiak a legfontosabbak:

- $H_2O_2$  által indukált oxidatív stresszben az *A. niger* (CBS 113.46 és NCCB 402), az *A. oryzae* (Rib40) és az *A. nidulans* (FGSCA4) fajok vizsgált törzsei voltak a legtoleránsabbak.
- Az *A. fumigatus* humán opportunistá patogén gomba volt a legérzékenyebb faj a  $H_2O_2$  okozta stresszre. Az összehasonlító genomikai vizsgálat eredményei alapján azt találtuk, hogy ennek háttérében a benne megtalálható, többi fajtól eltérő katalázok (cIII csoportbeli CatC) jelenléte/hiánya állhat (Dr. Miskei Márton munkája alapján, de Vries és mtsi, 2017)
- Az összehasonlító genomikai vizsgálatok az MSB stressz toleráns *A. brasiliensis* (CBS 101740) genomjában két új típusú SodA fehérje ortológot tártak fel. Valószínűleg az *A. brasiliensis* ezen genetikai tulajdonsága révén képes hatékonyan védekezni az MSB stressz alatt létrejött

szuperoxid gyökök ellen (Dr. Miskei Márton munkája alapján, de Vries és mtsi, 2017).

- Az *Aspergillus*ok oxidatív stresszválaszának megértéséhez, a továbbiakban az *A. nidulans* gombát vizsgáltuk részletesebben. Az *A. nidulans* egy jól ismert és jellemzett gombafaj, amelyről nagyszámú információ áll rendelkezésre a kutatók számára. Ezért modellorganizmusként hatékonyan felhasználható lehet a fonalas gombák oxidatív stresszválaszával kapcsolatos kutatásokban (Spörte, 2009; Sijmen és mtsi, 2007; Keller, 2005; Pócsi és mtsi, 2005; Sweeney és Dobson, 1998; Martinelli és Kinghorn, 1994; Oakley és mtsi, 1981).

Munkánk során *t*BOOH, MSB és diamid által kiváltott oxidatív stressz alatt az *A. nidulans* egy bZIP-típusú transzkripciós fehérjéjének, az AtfA-nak (AN2911) szabályozó szerepét tártuk fel.

Transzkriptomikai analízissel a különböző környezeti stresszválasz regulátor gének expressziójának AtfA-függését elemeztük. Funkciójuk alapján csoportosítottuk az AtfA-függő géneket. Közülük az antioxidáns gének mind a három különböző stressz kezelés alatt up-regulálódtak. Ez a jelenség egy általános oxidatív stresszválasznak is tekinthető. Az AtfA a „kétkomponensű szignáltranszdukciós rendszer” gének pozitív regulátora. Ezen gének AtfA-függő up-regulációja főleg MSB okozta oxidatív stressz alatt volt jelentős. Emellett glükóz szénforráson növekvő *A. nidulans* gombában a pentóz-foszfát útvonal génjei oxidatív stressz alatt nem up-regulálódtak. A *t*BOOH indukálta stresszben a szterin bioszintézis gének down-regulációját és a sziderofór bioszintézis gének fokozott expresszióját írtuk le. Emellett az AtfA fehérje kulcsfontosságú

szerepet tölt be az *A. nidulans* oxidatív stressz alatti szekunder metabolit termelésében.

Az eredmények alapján egy három hipotézisből álló modellt hoztunk létre az *A. nidulans*ban lévő AtfA fehérje oxidatív stresszválaszban betöltött szabályozó funkciójának meghatározására:

- 1. hipotézis:** Az AtfA fehérje közvetve vagy közvetlenül számos olyan gén szabályozásában vesz részt, amelyek fontos stresszválasz elemeket kódolnak. Ez a feltevés indokolhatja az *atfA* deléción különböző funkciójú génekre gyakorolt hatását.
- 2. hipotézis:** Az AtfA kölcsönhatásba lép más, fontos stressz szignál hálózati elemmel és/vagy transzkripciós szabályozó fehérjével.
- 3. hipotézis:** Az AtfA fehérje közvetve vagy közvetlenül gátolja bizonyos szignál transzdukciós hálózati elemek és/vagy egyéb transzkripciós faktorok aktivitását.

Eredményeink alapján megállapítottuk, hogy az AtfA nagyon fontos fehérje az *A. nidulans* oxidatív stresszválaszának szabályozásában. Feltehetően az AtfA fehérjének egy vagy több interakciós partner fehérjeje van.

Végeredményül elmondható, hogy az *A. nidulans* oxidatív stresszválasz szabályozását több jelátviteli mechanizmus és regulátor fehérje összehangolt működése végzi.

Várhatóan a jövőben az *A. nidulans* modell fonalas gomba hatékonyan felhasználható lesz sok más gombákban végbemenő stresszt szabályozó folyamatok modellezéséhez és megértéséhez.

## 5. Tézisek

- 1) A vizsgált 17 *Aspergillus* fajok a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> és MSB indukálta oxidatív stresszt eltérő mértékben tűrik.
- 2) A H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> által indukált oxidatív stresszben az *A. niger* (CBS 113.46 és NCCB 402), az *A. oryzae* (Rib40) és az *A. nidulans* (FGSCA4) fajok vizsgált törzsei voltak a legtoleránsabbak.
- 3) Az *A. fumigatus* (Af293) kiemelkedően oxidatív stressz érzékeny faj volt, amelynek háttérében valószínűleg a benne megtalálható, többi fajtól eltérő cIII-típusú katalázok jelenléte és cIV-típusú katalázok hiánya állhat.
- 4) Az *A. brasiliensis* kiemelkedő MSB stressz toleranciáját a benne található két SodA ortológ fehérjék okozhatják.
- 5) Az *A. nidulans* AtfA transzkripciós faktora fontos szerepet játszik a gomba oxidatív stresszválaszának szabályozásában.
- 6) Az AtfA fehérje kulcsfontosságú szerepet tölt be az *A. nidulans* oxidatív stressz alatti szekunder metabolit termelésében.
- 7) Az AtfA fehérje számos stresszválasz elemet kódoló gén szabályozásában vesz részt.
- 8) Az AtfA fehérje közvetve vagy közvetlenül bizonyos szignál transzdukciós hálózati elemek és/vagy egyéb transzkripciós faktorok aktivitását gátolja.
- 9) Az AtfA több fehérjével is kölcsönhatásba léphet az *A. nidulans* oxidatív stressz alatti szabályozásában.

## 6. Köszönetnyilvánítás

Nagyon köszönöm témavezetőmnek, Prof. Dr. Pócsi István egyetemi tanárnak, hogy lehetővé tette és szakmailag támogatta a doktori munkám elkészítését a Debreceni Egyetem Természettudományi Karának Biotechnológiai és Mikrobiológiai Tanszékén.

Hálásan köszönöm Dr. Emri Tamás egyetemi docensnek microarray és RT-qPCR kísérletek kivitelezésében és kiértékelésében nyújtott értékes és hasznos munkáját, továbbá szakmai tanácsait és önzetlen segítségét.

Köszönetemet szeretném kifejezni Prof. Dr. Ronald P. de Vries professzor úrnak (Westerdijk Fungal Biodiversity Institute and Fungal Molecular Physiology, Fungal Physiology Group, Utrecht University, The Netherlands), hogy kutatómunkám által bekapcsolódhattam a „Comparative analysis of Aspergilli to facilitate novel strategies in fungal biotechnology” nevezetű KNAW-JGI teljes genom szekvenálási és annotálási projektbe, továbbá, hogy lehetővé tette és támogatta, hogy kutatócsoportjában dolgozhassam. Mindez a Campus Hungary Pályázat féléves részképzésében valósulhatott meg számomra.

Köszönöm Dr. Miaomiao Zhou (Westerdijk Fungal Biodiversity Institute and Fungal Molecular Physiology, Fungal Physiology Group, Utrecht University, The Netherlands) bioinformatikus, a Fungal Stress Database létrehozásában végzett munkáját és szakmai segítségét.

Köszönettel tartozom Dr. Vincent Robert és Nathalie van de Wiele (Westerdijk Fungal Biodiversity Institute and Fungal Molecular Physiology, Bioinformatics Group, Utrecht University, The Netherlands) kutatóknak a Fungal Stress Database szerkezetének felépítésében és megvalósításában nyújtott felbecsülhetetlen és áldozatos munkájukért.

Továbbá hálásan köszönöm Dr. Miskei Márton (Debreceni Egyetem, Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet) *Aspergillus* fajokkal történő összehasonlító genomikai elemzését.

Köszönettel tartozom Prof. Dr. Jae-Hyuk Yu (Department of Bacteriology, University of Wisconsin, Madison, USA) professzor úrnak és munkatársainak, hogy az *Aspergillus nidulans* *Δatfa* törzset elkészítették és rendelkezésemre bocsátották.

Nagyon köszönöm Dr. Gazdag Zoltán (Pécsi Tudományegyetem, Természettudományi Kar, Általános és Környezeti Mikrobiológiai Tanszék) egyetemi adjunktusnak, hogy az *A. nidulans* tenyészetek szterin tartalmának meghatározását elvégezte.

Köszönöm Dr. Antal Károly (Eszterházy Károly Főiskola, Biológia Intézet, Állattani Tanszék Eger) főiskolai docensnek, hogy elvégezte a transzkriptomikai vizsgálati eredmények hasonlósági számításait.

Nagyon köszönöm Tóth Gáborné laboratóriumi asszisztens *Aspergillus* gombafajokkal végzett élettani kísérletekben nyújtott áldozatos munkáját és segítségét.

Köszönöm Szabó Zsuzsa PhD hallgató transzkriptomikai elemzésben nyújtott segítségét.

Köszönetemet szeretném kifejezni Szarvas Vera Etelka, Kicska Livia (Biotechnológus MSc) Radócz Orsolya, Rákosi Annamária, Gazdag Annamária, Mohácsi Rebeka (Biológia BSc) és Ittes Enikő (Biomérnök BSc) szakdolgozónak kitartó és lelkes munkájukért.

Hálásan köszönöm férjemnek, édesanyámnak, testvéreimnek (családomnak), és barátaimnak, hogy doktori munkám során mindvégig kitartóan támogattak és biztattak.

Kutatómunkám a NKFIH K100464, K112181 és K119494, valamint EFOP-3.6.1-16-2016-00022 pályázatok anyagi hozzájárulásával valósult meg, amelyet ezúton is nagyon köszönök.

## 7. Introduction and objectives

The fungi have evolved effective tools for sensing and overcoming various environmental stress types, hence they can occupy diverse ecological habitats.

During oxidative stress, the number and the concentration of reactive oxygen species (ROSs) are pathologically increased in the cell, what results the turnover of the redox homeostasis. Due to the oxidative stress lipid peroxidation, furthermore protein and DNA degradation occurs.

The fungal oxidative stress response is an intensively studied area of the modern microbiology, which can help to interpret fast stress adaptation strategies of fungi.

The number of the fungi belonging to *Aspergillus* genus is increasing, and because of their very different properties their practical use is becoming increasingly widespread. Among them we can find some useful species in the food and pharmaceutical industry, such as *A. oryzae* used in the eastern kitchen and *A. niger* that is important in the citric acid production (Papagianni, 2007; Pel *et al.*, 2007; Francis *et al.*, 2003; Vandenberghe *et al.*, 2000). There are, however, also dangerous mycotoxin producing aspergilli, which may cause animal and plant diseases. Such fungi are for example the human opportunistic pathogen *A. fumigatus* (Dagenais *et al.*, 2009; Latgé, 2001), aflatoxin producer *A. flavus* (Kozakiewicz, 1995), patulin toxin producer *A. clavatus* (Wortman *et al.*, 2006; Payne *et al.*, 2006), or *A. ochraceus*, *A. carbonarius* and *A. niger* capable of biosynthesis of ochratoxin (Bui-Klimke and Wu; 2015). For these reasons, exploring the diverse genetic and physiological characteristics of this group

of fungi is one of the central area of the microbiological research in the last few decades.

A number of oxidative stress control mechanisms have been discovered at the Department of Biotechnology and Microbiology of University of Debrecen. (Bakti *et al.*, 2017; Leiter *et al.*, 2012; Jakab *et al.*, 2015; 2014; Emri *et al.*, 2015; Spitzmüller *et al.*, 2015; Balázs *et al.*, 2010). Within these, some of the bZIP-type transcription factors were characterized which play a significant role. Such as the RsmA („restorer of secondary metabolism”) protein, which is important in the restoration of secondary metabolism of *A. nidulans*, or the NapA and AtfA proteins, which are remarkable transcription factors in the oxidative and osmotic stress response of the fungus. (Yin *et al.*, 2013; Balázs *et al.*, 2010; Miskei *et al.*, 2009).

During my PhD research I have participated in oxidative stress analysis of 18 *Aspergillus* strains representing 17 *Aspergillus* species (two *A. niger* strains).

In this context, we aimed the following experiments:

- Comparative genomics and stress physiological analysis of the selected 17 *Aspergillus* species.
- Our main goal was to select one species of them that could be used effectively in the future as a model organism in researches aimed at stress response of aspergilli or other filamentous fungus.
- Therefore the oxidative stress response of *A. nidulans* species was investigated in more detail. In this case we carried out transcriptomic and molecular genomics research with *A. nidulans* control and  $\Delta atfA$  strains.

- We were looking for an answer to the question of how the AtfA (locus ID AN2911) transcription factor participates in the regulation of the environmental stress response genes of *A. nidulans*.
- Finally, we characterized the function of AtfA protein in the oxidative stress response of *A. nidulans*.

## 8. Materials and methods

### 8.1 Investigating the oxidative stress tolerance of the 17 *Aspergillus* species

The oxidative stress response of the following *Aspergillus* species were studied:

1. *Aspergillus aculeatus* (CBS 172.66)
2. *Aspergillus brasiliensis* (CBS 101740)
3. *Aspergillus carbonarius* (CBS 141172 = DTO 115-B6)
4. *Aspergillus clavatus* (CBS 513.65 = NRRL1)
5. *Aspergillus fisheri*  
(*Neosartorya fisheri*) (CBS 544.65)
6. *Aspergillus flavus* (CBS 128202 = NRRL 3357)
7. *Aspergillus fumigatus* (CBS 126847 = Af293)
8. *Aspergillus glaucus*  
(*Eurotium herbariorum*) (CBS 516.65)
9. *Aspergillus luchuensis (acidus)*(CBS 106.47)
10. *Aspergillus nidulans* (FGSCA4)
11. *Aspergillus niger* (CBS 113.46)
12. *Aspergillus niger* (NCCB 402)
13. *Aspergillus oryzae* (Rib40)
14. *Aspergillus sydowii* (CBS 593.65)
15. *Aspergillus terreus* (NIH2624)
16. *Aspergillus tubingensis* (CBS 134.48)
17. *Aspergillus versicolor* (CBS 795.97)
18. *Aspergillus wentii* (CBS 141173 = DTO 134-E9)

The 18 strains were sporulated in the dark at 25 °C for 6 days, and the spores were collected on the sixth day for the stress experiments. The sporulation medium for *A. glaucus* (CBS 516.65) was supplemented with 1.0 M NaCl (de Vries *et al.*, 2017).

The stress experiments were performed on nitrate minimal medium at 37 °C for 5 days and at 25 °C for 5 and 10

days (Barratt *et al.*, 1965). The selected strains were inoculated with  $10^5$  and 5  $\mu$ l conidia to stress agents containing nitrate minimal medium agar. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and MSB (menadione sodium bisulfite) were used as oxidative stress agents. To collect the stress physiology data of 17 *Aspergillus* species the Fungal Stress Database was created (de Vries *et al.*, Fungal Stress Database; <http://www.fung-stress.org/>).

## **8.2 The oxidative stress tests and transcriptomic analyses carried out with *Aspergillus nidulans* control and $\Delta$ atfA strains**

The oxidative stress response of *A. nidulans* THS30.3 and TNJ 92.4 strains was studied.

TNJ 92.4 (*pyrG89*, *AfupyrG*<sup>+</sup>; *pyroA4*;  $\Delta$ *atfA::pyroA*; *veA*<sup>+</sup>)  
THS 30.3 (*pyrG89*, *AfupyrG*<sup>+</sup>; *pyroA*<sup>+</sup>; *veA*<sup>+</sup>)

The *A. nidulans* strains were cultured on nitrate minimal medium at 37 °C for 6 days (Barratt *et al.*, 1965). The conidia were collected and 10<sup>5</sup> pieces were spot-inoculated on nitrate minimal medium containing with different concentrations of stress agents

The stress agents used and their concentrations were as follows:

*t*BOOH: 0.8 mM

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: 6.0 mM

MSB:0.12 mM

diamide: 2.0 mM

NaCl: 0.6 M

The surface cultures were incubated at 37 °C for 5 days. Diameters of the colonies were measured and used for the

characterization of the stress sensitivities of the strains (based on 4 parallel experiments).

To study for the genome-wide transcription changes, the two *A. nidulans* strains were also cultured on solid nitrate minimal medium at 37 °C for 6 days. Conidia were harvested and 10<sup>8</sup> pieces of conidia were inoculated in liquid nitrate minimal medium (Barratt *et al.* 1965). The submerged cultures were shaken at 37 °C incubation temperature, 3.4 Hz shaking frequency for 20 h.

The cultures were treated after 16 hours incubations with the following concentrations of stress agents:

- 0.12 mmol/l MBS
- 0.8 mmol/l *t*BOOH
- 1.8 mmol/l diamide

In the 30th minute following the addition of stressors, samples were taken from the cultures for the DNA-chip and RT-qPCR assays, and at 4 hours for measuring specific enzyme activities, sterol contents, and extracellular siderophore contents after stress exposures.

Total RNA was isolated from lyophilized mycelia of treated and untreated cultures, which were used for microarray analyses (DNA-chip). Subsequently, gene enrichment analyses were carried out to analyse the accumulation of genes belonging to specific groups. The DNA-chip results were validated by RT-qPCR experiments.

## 9. Results and discussion

### 9.1 The different oxidative stress responses of the 17 tested *Aspergillus* species

Our results show that the 17 examined fungi species reacted differently - compared to each other - to the stress indicated by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and MSB (de Vries *et al.*, 2017).

The most tolerant ones among the 17 *Aspergillus* species in the presence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> were the two *A. niger* (CBS 113.46 and NCCB 402) together with the *A. oryzae* (Rib40) and the *A. nidulans* (FGSCA4) in the course of five days of incubation at 37 °C. Conversely we found that *A. fumigatus* was the most sensitive to stress indicated by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (de Vries *et al.*, 2017)

The comparative genomic analysis performed by de Vries and his associates revealed that the lack of group cIV catalase CatC and the presence of the group cIII catalase CatC can explain the comparatively poor tolerance of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in *A. fumigatus*. Based on all these findings, we suppose that group cIII catalases has been evolved through an ancient duplication, and they likely operate different compared to other C-type catalases.

Further oxidative stress tolerant species were the *A. brasiliensis*, *A. wentii*, *A. versicolor* and the *A. aculeatus*. But these species were specific in tolerating oxidative stress caused by MSB at either 37 or 25 degrees. In the case of *A. brasiliensis* the outstanding MSB resistance was probably caused by the two SodA proteins newly discovered in it. (de Vries *et al.*, 2017; Orosz *et al.*, 2018; <http://www.fung-stress.org/>; Oberegger *et al.*, 2000)

The *A. nidulans* used as a model organism tolerated H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and MSB induced stress well compared to the other examined 16 *Aspergillus* species. That is why we studied the regulatory role of the AtfA protein of the *A. nidulans* in the oxidative stress response.

## **9.2 The physiological effects of deletion of *atfA* in the *Aspergillus nidulans* species**

We incubated the fungi at 37 degrees for five days. Our results showed that the  $\Delta atfA$  mutant was far more sensitive to the presence of MSB, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and *t*BOOH, than the control species.

## **9.3 Genome-wide transcription changes caused by deletion of *atfA* in the *Aspergillus nidulans***

The undermentioned main changes in stress response regulation caused by deletion of *atfA* gene were experienced:

- Numerous genes' (1045) expression lost its stress sensitivity with deletion of *atfA* gene, whilst other genes (704) became sensitive to stress.
- The number of coregulated genes and the constitution of gene group also changed in the absence of AtfA compared to the COSR gene group of the control strain. Because of the deletion of *atfA* gene 88 genes lost their former „coregulated nature”, whilst further 152 genes became coregulated.
- Altogether 312 *t*BOOH specific genes showed MSB stress

dependence in  $\Delta atfA$  mutant strains. Further 883 AtfA-dependent genes lost its sensitivity to stress caused by MSB.

- 52 diamide stress specific genes started to show dependence to stress caused by *t*BOOH, at the same time 120 diamide stress specific genes got dependent to *t*BOOH stress in the lack of AtfA protein.

On the basis of gene enrichment analysis the enrichment of the listed GO categories were traceable among the AtfA dependent genes:

1. "Ribosome biogenesis" genes
2. "Mitotic cell cycle" genes
3. Genes encoding antioxidant enzymes
4. Siderophore biosynthesis genes
5. "Iron-sulphur cluster assembly" genes
6. "Two component signal transduction system" genes
7. "Nitrate utilization" genes
8. "ER to Golgi vesicle-mediated transport" genes
9. "Squalene-ergosterol biosynthetic pathway" genes
10. "Signal transduction" genes

From the obtained transcription data a model of three hypothesis was set up to interpret the function of AtfA transcription factor of *A. nidulans* under oxidative stress.

**Hypothesis 1.** AtfA directly or indirectly takes part in the regulation of numerous genes encoding elements of stress response network. This assumption may explain why *atfA* deletion affected a great number of genes with versatile functions.

Altogether, 26 genes encoding or putatively encoding signal transduction proteins showed AtfA-dependent expression in our experiments. Among them, some “two-compartment signal transduction system” genes seems interesting. Many of the genes in this group, together with other genes, also exhibited AtfA-dependent regulation compared to the transcripts derived from stress free conditions enhanced control and  $\Delta atfA$  strains (Emri *et al.*, 2015). Silva and co-workers recently reported that the MpkC and SakA protein controlled by regulatory of *atfA* and *atfB* also affect the “two-component signal transduction system” genes (Pereira Silva *et al.*, 2017). The most „two-component signal transduction system” genes (7 genes) were upregulated under MSB stress suggesting that this positive feedback regulation is particularly important under this type of oxidative stress. Five of these genes were AtfA-dependent which can be a possible reason for why the highest changes observed in the transcriptome were detected under MSB stress. Namely, the expression of more than half (57%) of AtfA-dependent genes (1557) changed under MSB stress treatment.

**Hypothesis 2.** AtfA interacts with other stress signalling elements and/or transcriptional regulatory proteins.

Previously, it was shown that the orthologues or paralogues of AtfA transcription factor in other species were able to interact with bZIP-type transcription factor or proteins of signal transduction network (Reinke *et al.*, 2013). The Atf1 proteins of *S. pombe* is an example of this, which forms a heterodimer with the Pcr1 bZIP-type transcription factor (Sanso *et al.*, 2008), while the Cid12 physically interacts with the poly(A) polymerase (Vo *et al.*, 2016). In addition, the AtfB protein of *A. parasiticus* also forms a heterodimer with the bZIP-type AP-1 protein (Roze *et al.*, 2011). More, Sanso *et al.* suggest that the

AtfA protein of *A. nidulans* may form physical interaction with the AtfB protein (AN8643) (Sanso *et al.*, 2009). The resulting interaction may modify the biological activity of both AtfA and the interaction partner.

We assume that AtfA can interact with different proteins and participates in regulation of different genes depending on the type of the persisting stress. Indeed, 785 genes upregulated and 772 genes downregulation from the total 1557 genes under *t*BOOH, MSB and diamide induced stress in an AtfA-dependent manner, more than half of which (883, 57% of genes) were measurable under MSB stress.

**Hypothesis 3.** AtfA directly or indirectly inhibits the activity of certain signal transduction network elements and/or other transcriptional factors. As there was no determining difference in the number of coregulated genes in the absence of AtfA, but their spectrum changed significantly. The AtfA protein most likely prevented the response of *t*BOOH stress specific genes. As a consequence of this AtfA-mediated asymmetric cross talk between MSB-elicited and *t*BOOH-elicited stress responses, several AtfA-dependent genes lost their MSB stress responsiveness (883 genes), while several *t*BOOH stress responsive genes became MSB stress responsive (312 genes).

Based on this model, the AtfA transcription factor plays an important role in the oxidative stress control mechanisms of *A. nidulans*, including directly or indirectly activating and downregulating certain oxidative stress response genes.

#### **9.4 The role of AtfA protein in secondary metabolism of *Aspergillus nidulans***

On the basis of our results, we assume that AtfA transcription factor may play an important role in the harmonized regulation of oxidative stress response and secondary metabolite production of *A. nidulans*. Since the biosynthetic genes of secondary metabolite of control and  $\Delta atfA$  strains were affected by almost all stressors. In addition, the secondary metabolite genes of  $\Delta atfA$  strains were greatly upregulated at low (5.0 mM) and high (75.0 mM) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentrations. Our work proves that if the gene of an essential oxidative stress response protein is missing in a fungus under oxidative stress, then favourable conditions may arise for overproduction of their secondary metabolites.

## 10. Summary

The *Aspergillus* species, owing to their remarkable molecular biological, agricultural, industrial and biomedical importance, are among today's most studied microorganisms. (Dagenais *et al.*, 2009; Papagianni, 2007; Pel *et al.*, 2007; Sijmen *et al.*, 2007; Wortman *et al.*, 2006; Payne *et al.*, 2006; Latgé, 2001; Oakley *et al.*, 1981).

To investigate the oxidative stress responses of 17 *Aspergillus* species stress physiological analysis was performed. The orthologs of the key oxidative stress response proteins have been identified with bioinformatics methods by de Vries *et al.* These data were collated with the results of the physiological experiments to shed light on the genetic background of the diverse stress tolerances (de Vries *et al.*, 2017; Orosz *et al.*, 2018). The following are our most important observations:

- Under H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced oxidative stress, the studied strains of *A. niger* (CBS 113.46 and NCCB 402), *A. oryzae* (Rib40) and *A. nidulans* (FGSCA4) were the most tolerant species.
- The human opportunistic pathogen *A. fumigatus* fungus was the most sensitive species under H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced oxidative stress. Based on the results of comparative genomic analyses we found that this observation could be coupled to the presence or absence of some catalases present in other *Aspergillus* species (based on the work of Dr. Márton Miskei, de Vries *et al.*, 2017).
- As a result of the comparative genomic analyses two new-type SodA orthologues were revealed in the genome of MSB stress tolerant *A. brasiliensis* (CBS 101740). Probably because of this genetic feature this fungus is able

to cope effectively with superoxide radicals formed under MSB stress (based on the work of Dr. Márton Miskei, de Vries *et al.*, 2017).

To understand the oxidative stress responses of the aspergilli more deeply, we examined the stress response of the model organism *A. nidulans* in more details. This is a well-known and well-characterized species with a large amount of information available for the researchers. Therefore, it can be effectively used as a model organism for research the oxidative stress responses of filamentous fungi (Spörte, 2009; Sijmen *et al.*, 2007; Keller, 2005; Pócsi és *et al.*, 2005; Sweeney and Dobson, 1998; Martinelli and Kinghorn, 1994; Oakley *et al.*, 1981).

In our work, we revealed the important regulatory role of the bZIP-type transcription factor AtfA (locus ID AN2911) of *A. nidulans* under *t*BOOH, MSB and diamide induced oxidative stress.

We investigated the AtfA-dependent expression of different stress response genes with transcriptomic methods. AtfA-dependent genes were categorized according to their functions. Among them, the antioxidant genes up-regulated for the all three stress treatments. This phenomenon can be considered as a general oxidative stress response. AtfA is a positive regulator of the “two-component signal transduction system” genes. The AtfA-dependent upregulation of these genes was significant under MSB stress. In addition, the pentose phosphate pathway was not activated under oxidative stress agents in *A. nidulans* grown on glucose carbon source. The repression of the sterol biosynthesis genes and the increased expression of the siderophore biosynthesis genes have been

described under *t*BOOH induced stress. Furthermore, AtfA protein played a key role in the regulation of secondary metabolite production in *A. nidulans* under oxidative stress.

Based on these results, a model was constructed for the determination of the regulatory function of the AtfA in the oxidative stress response of *A. nidulans*. The model includes the following three hypotheses:

**Hypothesis 1.** AtfA directly or indirectly takes part in the regulation of numerous genes encoding elements of stress response network. This assumption may justify the effects of *atfA* deletion on genes with versatile functions.

**Hypothesis 2.** AtfA interacts with other important stress signalling elements and/or transcriptional regulatory proteins.

**Hypothesis 3.** AtfA directly or indirectly inhibits the activity of certain signal transduction network elements and/or other transcriptional factors.

From these data and observations, we concluded that AtfA is a very important regulatory protein in the oxidative stress response of *A. nidulans*. Putatively, AtfA has one or more interacting partner proteins.

Finally, we can conclude that the regulation of oxidative stress response in *A. nidulans* is accomplished by the coordinated action of several signalling mechanisms and regulator proteins.

Probably in the future the *A. nidulans* model filamentous fungus can be effectively used to model and understand stress-control processes in many other fungi.

## 11. Thesis

- 1) The studied 17 *Aspergillus* species tolerate the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and MSB induced oxidative stress differently.
- 2) Under H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced oxidative stress the tested strains of *A. niger* (CBS 113.46 and NCCB 402), *A. oryzae* (Rib40) and *A. nidulans* (FGSCA4) are the most tolerant species.
- 3) The *A. fumigatus* (Af293) is an outstandingly sensitive species to oxidative stress, probably due to the presence of cIII-type catalases which differ from the ones of other *Aspergillus* species and because of the absence of cIV-type catalases.
- 4) The outstanding MSB stress tolerance of *A. brasiliensis* (CBS 101740) can be caused by the presence of two SodA orthologue proteins.
- 5) AtfA transcription factor of *A. nidulans* is a very important regulator protein in the oxidative stress response of the fungus.
- 6) The AtfA protein plays a key role in the secondary metabolite production of *A. nidulans* under oxidative stress.
- 7) AtfA takes part in regulation of numerous genes encoding elements of stress response.
- 8) AtfA directly or indirectly inhibits the activity of certain signal transduction network elements and/or other transcriptional factors.
- 9) AtfA can interact with other proteins in the regulation of oxidative stress response of *A. nidulans*.

## 12. Acknowledgements

I thank my supervisor Prof. Dr. István Pócsi, head of department, that he professionally supported my work and made it possible at the Department of Biotechnology and Microbiology of the University of Debrecen.

I thank very much Dr. Tamás Emri associate professor for his valuable and useful work in the implementing and evaluation of microarray and RT-qPCR experiments, and his professional advice and selfless help.

I would like to thank Prof. Dr. Ronald P. de Vries (Westerdijk Fungal Biodiversity Institute and Fungal Molecular Physiology, Fungal Physiology Group, Utrecht University, The Netherlands) for the possibility to join the KNAW-JGI genome sequencing and annotation project called „Comparative analysis of Aspergilli to facilitate novel strategies in fungal biotechnology”, and that he enabled and supported me to work in his research team.

I thank Dr. Miaomiao Zhou bioinformatics (Westerdijk Fungal Biodiversity Institute and Fungal Molecular Physiology, Fungal Physiology Group, Utrecht University, The Netherlands) for her work and professional help in the creation of Fungal Stress Database.

I am grateful to Dr. Vincent Robert and Nathalie van de Wiele (Westerdijk Fungal Biodiversity Institute and Fungal Molecular Physiology, Bioinformatics Group, Utrecht University, The Netherlands) for their invaluable and hard work provided in the structure and implementation of Fungal Stress Database.

Furthermore, I am grateful to Dr. Márton Miskei (University of Debrecen, Biochemistry and Molecular Biology

Institute) for comparative genomics analyses of *Aspergillus* species.

I thank Prof. Dr. Jae-Hyuk Yu (Department of Bacteriology, University of Wisconsin, Madison, USA) and his associates for preparing *Aspergillus nidulans*  $\Delta atfA$  strain and making it available to us.

I really thank Dr. Zoltán Gazdag associate professor (Pécs University of Science, Faculty of Science, Department of General and Environmental Microbiology) for the determination of sterol content of *A. nidulans* cultures.

I thank Dr. Károly Antal associate professor (Eszterházy Károly College, Biological Institute, Zoology Department, Eger,) for completed the similarity calculations of transcriptional test results.

I am very grateful to Gáborné Tóth laboratory assistant for her sacrificial work and her help provided in work of physiological experiment with *Aspergillus* species.

I thank Zsuzsa Szabó Ph.D. student for her help in transcriptional analyses.

I would like to say thanks to Vera Etelka Szarvas, Lívía Kicska biotechnologist, Orsolya Radócz, Annamária Rákosi, Annamária Gazdag, Rebeka Mohácsi Biology BSc students for their persistent and enthusiastic work.

I really thank to my husband, mother, sisters, friends, for that they persistently supported and encouraged me during my doctoral work.

My research was realized with the financial contribution of NKFIH K100464, K112181 and K119494 and EFOP-3.6.1-16-2016-00022, which I thank very much hereby.

### 13. Hivatkozások / References

- Bakti, F., Király, A., Orosz, E., Miskei, M., Emri, T., Leiter, É., & Pócsi, I. (2017). Study on the glutathione metabolism of the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Acta microbiologica et immunologica Hungarica*, 64(3), 255-272.
- Balázs, A., Pócsi, I., Hamari, Z., Leiter, É., Emri, T., Miskei, M., Oláh, J., Tóth, V., Hegedűs, N., Prade, R.A., Molnár, M. and Pócsi, I. (2010) AtfA BZIP-type transcription factor regulates oxidative and osmotic stress responses in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Genet. Genom.* 283, 289-303.
- Barratt, R. W., Johnson, G. B., & Ogata, W. N. (1965). Wild-type and mutant stocks of *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, 52(1), 233-246.
- Bui-Klimke, T. R., & Wu, F. (2015). Ochratoxin A and human health risk: A review of the evidence. *Critical reviews in food science and nutrition*, 55(13), 1860-1869.
- Dagenais, T. R., & Keller, N. P. (2009). Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in invasive aspergillosis. *Clinical microbiology reviews*, 22(3), 447-465.
- Dagenais, T. R., & Keller, N. P. (2009). Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in invasive aspergillosis. *Clinical microbiology reviews*, 22(3), 447-465.
- de Vries R. P., Riley R., Wiebenga A., Aguilar-Osorio G., Amillis S., Uchima C. A., Anderluh G., Asadollahi M., Askin M, Barry K, Battaglia E, Bayram Ö, Benocci T, Braus-Stromeier SA, Caldana C, Cánovas D, Cerqueira GC, Chen F, Chen W, Choi C, Clum A, Dos Santos RA, Damásio AR, Diallinas G, Emri T, Fekete E, Flippi M, Freyberg S, Gallo A, Gournas C, Habgood R, Hainaut M, Harispe ML, Henrissat B, Hildén KS, Hope R, Hossain A, Karabika E, Karaffa L, Karányi Z, Kraševac N, Kuo A, Kusch H, LaButti K, Lagendijk EL, Lapidus A, Lévassieur A, Lindquist E, Lipzen A, Logrieco AF, MacCabe A, Mäkelä MR, Malavazi I, Melin P, Meyer V, Mielnichuk N, Miskei M, Molnár ÁP, Mulé G, Ngan CY, Orejas M, Orosz E, Quedraogo JP, Overkamp KM, Park HS, Perrone G, Piumi F, Punt PJ, Ram AF, Ramón A, Rauscher S, Record E, Riaño-Pachón DM, Robert V, Röhrig J, Ruller R, Salamov A, Salih NS, Samson RA, Sándor E, Sanguinetti M, Schütze T, Sepčić K, Shelest E, Sherlock G, Sophianopoulou V, Squina FM, Sun H, Susca A, Todd RB, Tsang A, Unkles SE, van de Wiele N, van Rossum-Uffink D, Oliveira JV, Vesth TC, Visser J, Yu JH, Zhou M, Andersen MR, Archer DB, Baker SE, Benoit I, Brakhage AA, Braus GH, Fischer R, Frisvad JC, Goldman GH, Houbraken J, Oakley B, Pócsi I, Scazzocchio C, Seiboth B, vanKuyk PA, Wortman J, Dyer PS, Grigoriev IV (2017). Comparative genomics reveals high biological diversity and specific adaptations in the industrially and medically important fungal genus *Aspergillus*. *Genome Biology* 18 (28), 1-45.

- Emri, T., Szarvas, V., Orosz, E., Antal, K., Park, H., Han, K. H., Yu J. H., Pócsi, I. (2015). Core oxidative stress response in *Aspergillus nidulans*. *BMC genomics*, 16(1), 478.
- Francis, F., Sabu, A., Nampoothiri, K. M., Ramachandran, S., Ghosh, S., Szakacs, G., & Pandey, A. (2003). Use of response surface methodology for optimizing process parameters for the production of  $\alpha$ -amylase by *Aspergillus oryzae*. *Biochemical Engineering Journal*, 15(2), 107-115.
- Jakab Á., Emri T., Sipos L., Kiss Á., Kovács R., Dombrádi V., Kemény-Beke Á., Balla J., Majoros L., Pócsi I. (2015) Betamethasone augments the antifungal effect of menadione--towards a novel anti-*Candida albicans* combination therapy. *J Basic Microbiol.* Aug;55(8):973-81.
- Keller, N. P., Turner, G., Bennett, J. W. (2005) Fungal secondary metabolism –from biochemistry to genomics. *Nat Rev Microbio*, 3; 937-947.
- Kozakiewicz, Z. 1995 *Aspergillus flavus*. *IMI Descriptions of Fungi and Bacteria*; 1251.
- Latgé, J. P. (2001). The pathobiology of *Aspergillus fumigatus*. *Trends in microbiology*, 9(8), 382-389.
- Leiter, É., González, A., Erdei, É., Casado, C., Kovács, L., Ádám, C., Oláh, J., Miskei, M., Molnár, M., Farkas, I., Hamari, Z., Ariño, J., Pócsi, I. and Dombrádi, V. (2012) Protein phosphatase Z modulates oxidative stress response in fungi. *Fungal Genet. Biol.* 49, 708-716.
- Martinelli S. D., Kinghorn J. R. (1994) *Aspergillus: 50 years on*. Elsevier ISBN 0-444-81762-X.
- Miskei, M., Karányi, Z. and Pócsi, I. (2009) Annotation of stress-response proteins in the aspergilli. *Fungal Genet. Biol.* 46, S105-S120.
- Oakley, B. R., Morris, N. R. (1981) A beta tubulin mutation in *Aspergillus nidulans* that blocks microtubule function without bolcking assembly. *Cell* 24 (3), 837-845.
- Oberegger, H., Zadra, I., Schoeser, M., & Haas, H. (2000). Iron starvation leads to increased expression of Cu/Zn-superoxide dismutase in *Aspergillus*. *FEBS letters*, 485(2-3), 113-116.
- Papagianni, M. (2007). Advances in citric acid fermentation by *Aspergillus niger*: biochemical aspects, membrane transport and modeling. *Biotechnology advances*, 25(3), 244-263.
- Payne, G. A., Nierman, W. C., Wortman, J. R., Pritchard, B. L., Brown, D., Dean, R. A., ... & Yu, J. (2006). Whole genome comparison of *Aspergillus flavus* and *A. oryzae*. *Medical Mycology*, 44(Supplement\_1), S9-S11.

- Pel, H. J., de Winde, J. H., Archer, D. B., Dyer, P. S., Hofmann, G., Schaap, P. J., ... & Andersen, M. R. (2007). Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory *Aspergillus niger* CBS 513.88. *Nature biotechnology*, 25(2), 221-231.
- Pereira Silva, L., Alves de Castro, P., Reis, T. F., Paziani, M. H., Von Zeska Kress, M. R., Riaño-Pachón, D. M., ... & Goldman, G. H. (2017). Genome-wide transcriptome analysis of *Aspergillus fumigatus* exposed to osmotic stress reveals regulators of osmotic and cell wall stresses that are SakAHOG1 and MpkC dependent. *Cellular microbiology*, 19(4).
- Pócsi, I., Miskei, M., Karányi, Z., Emri, T., Ayoubi, P., Pusztahelyi, T., Balla, G. (2005) Comparison of gene expression signatures of diamide, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and menadione exposed *Aspergillus nidulans* cultures-linking genome-wide transcriptional changes to cellular physiology. *BMC Genomics* 6, 182.
- Reinke, A. W., J. Baek, Ashenberg, O., and Keating, A. E., (2013) Networks of bZIP protein-protein interactions diversified over a billion years of evolution, *Science*, vol. 340, pp. 730–734
- Roze, L. V., Chanda, A., Wee, J., Awad, D., .Linz, J. E. (2011) Stress-related transcription factor AtfB integrates secondary metabolism with oxidative stress response in aspergilli. *J Biol Chem*. 2011; 286:35137–48.
- Sanso, M., Gool, M., Ayte, J., Seidel, C., and Hidalgo, E., (2008) Transcription factors Pcr1 and Atf1 have distinct roles in stressand Sty1-dependent gene regulation, *Eukaryotic Cell*, vol. 7, pp. 826–835.
- Sweeney, M. J., & Dobson, A. D. (1998). Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. *International journal of food microbiology*, 43(3), 141-158.
- Sijmen, E. S., Alfons, J. M. D., Marijke, S., Rolf, F. H. (2007) Mitotic Recombination Accelerates Adaptation in the Fungus *Aspergillus nidulans*. *PLoS Genetics* 3 (4), e68.
- Spitzmüller, Z., Kwon, N. J., Szilágyi, M., Keserű, J., Tóth, V., Yu, J. H., ... & Emri, T. (2015).  $\gamma$ -Glutamyl transpeptidase (GgtA) of *Aspergillus nidulans* is not necessary for bulk degradation of glutathione. *Archives of microbiology*, 197(2), 285-297.
- Spröte, P., Brakhage, A. A., & Hynes, M. J. (2009). Contribution of peroxisomes to penicillin biosynthesis in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryotic cell*, 8(3), 421-423.
- Vandenbergh, L. P., Soccol, C. R., Pandey, A., & Lebeault, J. M. (2000). Solid-state fermentation for the synthesis of citric acid by *Aspergillus niger*. *Bioresource Technology*, 74(2), 175-178.
- Wortman, J. R., Gilseman, J. M., Joardar, V., Deegan, J., Clutterbuck, J., Andersen, M.R., Archer, D., Bencina, M., Braus, G., Coutinho, P., von Döhren, H., Doonan, J., Driessen, A. J. M., Durek, P., Espeso, E., Fekete, E., Flipphi, M., Estrada, C. G., Geysens, S., Goldman, G., de Groot, P. W. J., Hansen, K., Harris, S. D., Heinekamp,

T., Helmstaedt, K., Henrissat, B., Hofmann, G., Homan, T., Horio, T., Horiuchi, H., James, S., Jones, M., Karaffa, L., Karányi, Z., Kato, M., Keller, N., Kelly, D. E., Kiel, J. A. K., Kim, J.-M., van der Klei, I. J., Klis, F. M., Kovalchuk, A., Kraševac, N., Kubicek, C. P., Liu, B., MacCabe, A., Meyer, V., Mirabito, P., Miskei, M., Mos, M., Mullins, J., Nelson, D. R., Nielsen, J., Oakley, B. R., Osmani, S. A., Pakula, T., Paszewski, A., Paulsen, I., Pilsyk, S., Pócsi, I., Punt, P. J., Ram, A. F. J., Ren, Q., Robellet, X., Robson, G., Seiboth, B., van Solingen, P., Specht, T., Sun, J., Taheri-Talesh, N., Takeshita, N., Ussery, D., van Kuyk, P. A., Visser, H., van de Vondervoort, P. J. I., de Vries, R. P., Walton, J., Xiang, X., Xiong, Y., Zeng, A. P., Brandt, B. W., Cornell, M. J., van den Hondel, C. A. M., Visser, J., Oliver, S. G., Turner, G. (2009) The 2008 update of the *Aspergillus nidulans* genome annotation: a community effort. *Fungal Genet. Biol.* 46, S2-S13.

Yin, W. B., Amaike, S., Wohlbach, D. J., Gasch, A. P., Chiang, Y. M., Wang, C. C., Bok, J. W., Rohlfs, M., Keller, N.P. (2012) An *Aspergillus nidulans* bZIP response pathway hardwired for defensive secondary metabolism operates through aflR. *Mol Microbiol*, 83:1024–34.



Nyilvántartási szám: DEENK/65/2018.PL  
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Vassné Orosz Erzsébet  
Neptun kód: HVKOSN  
Doktori Iskola: Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola  
MTMT azonosító: 10053248

## A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

### Idegen nyelvű tudományos közlemények külföldi folyóiratban (2)

1. Orosz, E., Wiele, N. v. d., Emri, T., Zhou, M., Robert, V., De Vries, R. P., Pócsi, I.: Fungal Stress Database (FSD) - a repository of fungal stress physiological data. Database Online. "Accepted by publisher", 1-6, 2018. EISSN: 1758-0463. IF: 3.29 (2016)
2. Orosz, E., Antal, K., Gazdag, Z., Szabó, Z., Han, K. H., Yu, J. H., Pócsi, I., Emri, T.: Transcriptome-based modeling reveals that oxidative stress induces modulation of the AtfA-dependent signaling networks in *Aspergillus nidulans*. Int. J. Genomics. 2017, 1-16, 2017. ISSN: 2314-436X. DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2017/6923849> IF: 2.402 (2016)





### További közlemények

#### Idegen nyelvű tudományos közlemények hazai folyóiratban (1)

3. Bakti, F., Király, A., Orosz, E., Miskei, M., Emri, T., Leiter, É., Pócsi, I.: Study on the glutathione metabolism of the filamentous fungus.  
*Acta Microbiol. Immunol. Hung.* 64 (3), 255-272, 2016. ISSN: 1217-8950.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/030.64.2017.003>  
IF: 0.921

#### Idegen nyelvű tudományos közlemények külföldi folyóiratban (3)

4. Vries, R. P. d., Riley, R., Wiebenga, A., Aguilar-Osorio, G., Amillis, S., Akemi Uchima, C., Anderluh, G., Asadollahi, M., Askin, M., Barry, K., Battaglia, E., Bayram, Ö., Benocci, T., Braus-Stromeyer, S. A., Caldana, C., Cánovas, D., Cerqueira, G. C., Chen, F., Chen, W., Choi, C., Clum, A., Corrêa dos, S. R. A., Lima Damásio, A. R. d., Diallinas, G., Emri, T., Fekete, E., Flippini, M., Freyberg, S., Gallo, A., Gournas, C., Habgood, R., Hainaut, M., Harispe, M. L., Henrissat, B., Hildén, K. S., Hope, R., Hossain, A., Karabika, E., Karaffa, L., Karányi, Z., Kraševc, N., Kuo, A., Kusch, H., LaButti, K., Lagendijk, E. L., Lapidus, A., Levasseur, A., Lindquist, E., Lipzen, A., Logrieco, A. F., MacCabe, A., Mäkelä, M. R., Malavazi, I., Melin, P., Meyer, V., Mielnichuk, N., Miskei, M., Molnár, Á. P., Mulé, G., Ngan, C. Y., Orejas, M., Orosz, E., Ouedraogo, J. P., Overkamp, K. M., Park, H. S., Perrone, G., Piumi, F., Punt, P. J., Ram, A. F., Ramón, A., Rauscher, S., Record, E., Riaño-Pachón, D. M., Robert, V., Röhrig, J., Ruller, R., Salamov, A., Salih, N. S., Samson, R. A., Sándor, E., Sanguinetti, M., Schütze, T., Sepčić, K., Shelest, E., Sherlock, G., Sophianopoulou, V., Squina, F. M., Sun, H., Susca, A., Todd, R. B., Tsang, A., Unkles, S. E., Wiele, N. v. d., Rossen-Uffink, D. v., Velasco de, C. O. J., Vesth, T. C., Visser, J., Yu, J. H., Zhou, M., Andersen, M. R., Archer, D., Baker, S. E., Benoit, I., Brakhage, A. A., Braus, G., Fischer, R., Frisvad, J. C., Goldman, G., Houbraken, J., Oakley, B. R., Pócsi, I., Scazzocchio, C., Seiboth, B., Kuyk, P. A. v., Wortman, J. R., Dyer, P. S., Grigoriev, I. V.: Comparative genomics reveals high biological diversity and specific adaptations in the industrially and medically important fungal genus *Aspergillus*.  
*Genome Biol.* 18 (28), 1-45, 2017. ISSN: 1474-760X.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/s13059-017-1151-0>  
IF: 11.908 (2016)
5. Leiter, É., Bálint, M., Miskei, M., Orosz, E., Szabó, Z., Pócsi, I.: Stress tolerances of null mutants of function-unknown genes encoding menadione stress-responsive proteins in *Aspergillus nidulans*.  
*J. Basic Microbiol.* 56 (7), 827-833, 2016. ISSN: 0233-111X.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/jobm.201500500>  
IF: 1.438





6. Emri, T., Szarvas, V., Orosz, E., Antal, K., Park, H. S., Han, K. H., Yu, J. H., Pócsi, I.: Core oxidative stress response in *Aspergillus nidulans*.  
BMC Genomics. 16 (478), [19], 2015. ISSN: 1471-2164.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/s12864-015-1705-z>  
IF: 3.867

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 23,826**

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):**  
5,692

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, 2018.03.09.





Registry number:  
Subject:

DEENK/65/2018.PL  
PhD Publikációs Lista

Candidate: Erzsébet Vassné Orosz

Neptun ID: HVKOSN

Doctoral School: Pál Juhász-Nagy Doctoral School of Biology and Environmental Sciences

MTMT ID: 10053248

### List of publications related to the dissertation

#### Foreign language scientific articles in international journals (2)

1. Orosz, E., Wiele, N. v. d., Emri, T., Zhou, M., Robert, V., De Vries, R. P., Pócsi, I.: Fungal Stress Database (FSD) - a repository of fungal stress physiological data.  
Database Online. "Accepted by publisher", 1-6, 2018. EISSN: 1758-0463.  
IF: 3.29 (2016)
2. Orosz, E., Antal, K., Gazdag, Z., Szabó, Z., Han, K. H., Yu, J. H., Pócsi, I., Emri, T.:  
Transcriptome-based modeling reveals that oxidative stress induces modulation of the AtfA-dependent signaling networks in *Aspergillus nidulans*.  
Int. J. Genomics. 2017, 1-16, 2017. ISSN: 2314-436X.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2017/6923849>  
IF: 2.402 (2016)





List of other publications

Foreign language scientific articles in Hungarian journals (1)

3. Bakti, F., Király, A., Orosz, E., Miskei, M., Emri, T., Leiter, É., Pócsi, I.: Study on the glutathione metabolism of the filamentous fungus.  
*Acta Microbiol. Immunol. Hung.* 64 (3), 255-272, 2016. ISSN: 1217-8950.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/030.64.2017.003>  
IF: 0.921

Foreign language scientific articles in international journals (3)

4. Vries, R. P. d., Riley, R., Wiebenga, A., Aguilar-Osorio, G., Amillis, S., Akemi Uchima, C., Anderluh, G., Asadollahi, M., Askin, M., Barry, K., Battaglia, E., Bayram, Ö., Benocci, T., Braus-Stromeier, S. A., Caldana, C., Cánovas, D., Cerqueira, G. C., Chen, F., Chen, W., Choi, C., Clum, A., Corrêa dos, S. R. A., Lima Damásio, A. R. d., Diallinas, G., Emri, T., Fekete, E., Flippi, M., Freyberg, S., Gallo, A., Gourmas, C., Habgood, R., Hainaut, M., Harispe, M. L., Henrissat, B., Hildén, K. S., Hope, R., Hossain, A., Karabika, E., Karaffa, L., Karányi, Z., Kraševc, N., Kuo, A., Kusch, H., LaButti, K., Lagendijk, E. L., Lapidus, A., Levasseur, A., Lindquist, E., Lipzen, A., Logrieco, A. F., MacCabe, A., Mäkelä, M. R., Malavazi, I., Melin, P., Meyer, V., Mielnichuk, N., Miskei, M., Molnár, Á. P., Mulé, G., Ngan, C. Y., Orejas, M., Orosz, E., Ouedraogo, J. P., Overkamp, K. M., Park, H. S., Perrone, G., Piumi, F., Punt, P. J., Ram, A. F., Ramón, A., Rauscher, S., Record, E., Riaño-Pachón, D. M., Robert, V., Röhrig, J., Ruller, R., Salamov, A., Salih, N. S., Samson, R. A., Sándor, E., Sanguinetti, M., Schütze, T., Sepčić, K., Shelest, E., Sherlock, G., Sophianopoulou, V., Squina, F. M., Sun, H., Susca, A., Todd, R. B., Tsang, A., Unkles, S. E., Wiele, N. v. d., Rossen-Uffink, D. v., Velasco de, C. O. J., Vesth, T. C., Visser, J., Yu, J. H., Zhou, M., Andersen, M. R., Archer, D., Baker, S. E., Benoit, I., Brakhage, A. A., Braus, G., Fischer, R., Frisvad, J. C., Goldman, G., Houbraeken, J., Oakley, B. R., Pócsi, I., Scazzocchio, C., Seiboth, B., Kuyk, P. A. v., Wortman, J. R., Dyer, P. S., Grigoriev, I. V.: Comparative genomics reveals high biological diversity and specific adaptations in the industrially and medically important fungal genus *Aspergillus*.  
*Genome Biol.* 18 (28), 1-45, 2017. ISSN: 1474-760X.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/s13059-017-1151-0>  
IF: 11.908 (2016)
5. Leiter, É., Bálint, M., Miskei, M., Orosz, E., Szabó, Z., Pócsi, I.: Stress tolerances of null mutants of function-unknown genes encoding menadione stress-responsive proteins in *Aspergillus nidulans*.  
*J. Basic Microbiol.* 56 (7), 827-833, 2016. ISSN: 0233-111X.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/jobm.201500500>  
IF: 1.438





6. Emri, T., Szarvas, V., Orosz, E., Antal, K., Park, H. S., Han, K. H., Yu, J. H., Pócsi, I.: Core oxidative stress response in *Aspergillus nidulans*.  
BMC Genomics. 16 (478), [19], 2015. ISSN: 1471-2164.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/s12864-015-1705-z>  
IF: 3.867

Total IF of journals (all publications): 23,826

Total IF of journals (publications related to the dissertation): 5,692

The Candidate's publication data submitted to the iDEa Tudóstér have been validated by DEENK on the basis of Web of Science, Scopus and Journal Citation Report (Impact Factor) databases.

09 March, 2018

