

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

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

Kocsis Beatrix

Témavezető: Dr. Leiter Éva



DEBRECENI EGYETEM

GYÓGYSZERÉSZETI TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2024

„Nem az a lényeges, hogy valamit elsőnek lássunk meg, hanem az, hogy szilárd kapcsolatot teremtünk az előzőleg megismert és az eddig ismeretlen között. Ez a tudományos felfedezés ábécéje.” (Selye János)

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék.....	3
Fontosabb rövidítések.....	5
1. Bevezetés	7
2. Irodalmi áttekintés	9
2.1. Az <i>Aspergillus</i> nemzetség	9
2.2. Az AtfA és AtfB bZIP TF-ok.....	11
2.3. Az AtfA szerepe a gombákban.....	13
2.4. Az AtfB szerepe a gombákban.....	17
2.5. A tanulmányozott stresszhatások	20
2.5.1. Oxidatív stressz	20
2.5.2. Ozmotikus stressz.....	21
2.5.3. Nehézfém stressz.....	22
2.5.4. Sejtfa integritási stressz.....	22
2.6. Szekunder metabolitok; sterigmatocisztin	23
3. Célkitűzések	25
4. Anyagok és módszerek.....	26
4.1. A kísérletekhez használt törzsek	26
4.2. Az alkalmazott táptalajok és egyéb oldatok	27
4.3. Az <i>atfA</i> és <i>atfB</i> géndeléción és a túltermelő mutánsok elkészítése	28
4.4. Protoplaszt transzformáció PEG jelenlétében	31
4.5. A deléción és túltermelő mutánsok genotípusának ellenőrzése.....	32
4.5.1. Genomi DNS izolálás	32
4.5.2. RNS izolálás	34
4.5.3. RT-qPCR-rel az <i>atfA</i> és <i>atfB</i> gének túltermelődések ellenőrzése és az <i>abaA</i> gén expressziójának meghatározása.....	35
4.6. Stresszérzékenységi vizsgálatok.....	36
4.7. Sterigmatocisztin termelés meghatározása.....	38
4.8. RNS szekvenálás	38
4.8.1. A transzkriptomikai adatok elemzése.....	40
4.8.2. Géncsoport dúsulás vizsgálat (Gene Set Enrichment Analysis = GSEA).....	41
4.9. A kísérletek statisztikai kiértékelése	42
4.10. Felhasznált vegyszerek.....	42
5. Eredmények	43
5.1. Az <i>atfA</i> és <i>atfB</i> gének túltermelésének ellenőrzése RT-qPCR-rel	43

5.2. Stresszérzékenységi vizsgálatok.....	44
5.3. A konídiospórák hőstresszel szembeni érzékenységének vizsgálata	47
5.4. Az ivaros és ivartalan szaporodás vizsgálata	48
5.5 Az <i>abaA</i> gén expressziójának RT-qPCR-rel kapott eredményei	51
5.6. Sterigmatocisztin termelés meghatározása.....	53
5.7. Transzkriptomikai adatok kiértékelése.....	55
5.7.1. Az <i>atfA</i> deléció az <i>atfB</i> represszióját okozza	55
5.7.2. Az AtfB – függő gének AtfA függése az MSB-vel nem kezelt micélium tenyészetnél	58
5.7.3. Az AtfB szerepe az MSB-kezelt micélium mintákban	61
5.7.4. Az AtfA és az AtfB szerepe a konídiospórákban.....	61
5.7.5. Az AtfA hatása a szénhidrát metabolizmusra és fényfüggő folyamatokra	63
6. Megbeszélés.....	67
6.1. Az élettani vizsgálatok eredményei.....	67
6.2. A transzkriptomikai adatok következtetései	70
7. Összefoglalás	74
8. Summary	77
9. Irodalomjegyzék	80
9.1. Az értekezésben hivatkozott közlemények jegyzéke	80
9.2. A jelölt saját közleményeinek a Kenézy Élettudományi Könyvtár által ellenőrzött jegyzéke.....	90
10. Társszerzői hozzájárulások, nem saját eredmények.....	92
11. Tárgyszavak.....	93
12. Keywords.....	93
13. Köszönetnyilvánítás	94
14. Függelék I.....	95
15. Függelék II.	97

Fontosabb rövidítések

6-AN	6-aminonikotinamid
AF	Aflatoxin
AMM (NMM)	<i>Aspergillus</i> <u>M</u> inimal <u>M</u> edium - <i>Aspergillus</i> Minimál táptalaj vagy Nitrát <u>M</u> inimál <u>M</u> edium táptalaj
ATF/CREB	<u>A</u> ctivating <u>T</u> ranscription <u>F</u> actor/ <u>c</u> AMP - <u>R</u> esponsive <u>E</u> lement – Bindig protein (Aktiváló Transzkripció Faktor/ cAMP válaszadó elemet kötő fehérje)
BiFC	<u>B</u> imolecular <u>F</u> luorescence <u>C</u> omplementation (Bimolekuláris Fluoreszcencia Komplementáció)
BUP	<u>A</u> tf <u>B</u> <u>U</u> pregulált Gének
cAMP/PKA	cAMP - függő <u>P</u> rotein <u>K</u> ináz <u>A</u>
CATs	<u>C</u> onidia-associated genes (konídiumokkal-asszociált gének)
CFW	Calcofluor-white (kalkofluor fehér) festék
ChIP-Seq	<u>C</u> hromatin <u>I</u> mmuno <u>P</u> recipitation with <u>S</u> equencing (Kromatin-ImmunPrecipitáció szekvenálással)
COSR	<u>C</u> ore <u>O</u> xidative <u>S</u> tress <u>R</u> esponse genes (Központi Oxidatív Stresszválasz gének)
CR	Congo Red (Kongóvörös)
DEG	<u>D</u> ifferentially <u>E</u> xpressed <u>G</u> ene (Differenciálisan Expresszáló Gén)
DON	Dezoxinivalenol
EDTA	<u>E</u> thylene <u>D</u> iamine <u>T</u> etraacetic <u>A</u> cid (Etilén-diamin-tetraecetsav)
GPx	Glutation peroxidáz
GR	Glutation reduktáz
GRAS	<u>G</u> enerally <u>R</u> ecognised <u>A</u> s <u>S</u> afe (Általánosan Biztonságosnak Elismert)
GSEA	<u>G</u> ene <u>S</u> et <u>E</u> nrichment <u>A</u> nalysis (géncsoport dúsulás vizsgálat)
GSH	Glutation redukált forma
GSSG	Glutation-diszulfid, oxidált forma
HOG	<u>H</u> igh- <u>O</u> smolarity <u>G</u> lycerol Pathway (Nagy ozmolaritás esetén aktiválódó glicerín választóvonal)

MOPS	3-(N-Morpholino) PropaneSulfonic acid (3-N-morfolino-propánszulfonsav)
MSB	Menadione Sodium Bisulfite (menadion-nátrium-biszulfit)
<i>niiA</i> promóter	Nitrate Inducable Promoter (Nitráttal Indukálható Promóter)
NRP	Nem-riboszómális peptid
NSS	Nitrate Salt Solution (nitrátos sóoldat)
OE mutáns	Overexpresszáló (túltermelő mutáns)
PCIA	Phenol:Chloroform:Isoamylalcohol (Fenol:Kloroform:Izoamilalkohol)
PEG	Polietilén-glikol
PK	Poliketid
RES	Reactive Electrophilic Species (Reaktív Elektrofil formák)
ROS	Reactive Oxygen Species (Reaktív Oxigén)
RPKM	Reads Per Kilobase of gene model per Million mapped reads (kilobázisonkénti leolvasások száma egy millió térképezett leolvasásra vonatkoztatva)
RT-qPCR	Reverse Transcription Quantitative Real-Time PCR (Reverz transzkripcióval kapcsolt kvantitatív valós idejű PCR)
SAPK/MAPK	Stress-activated protein kinase/ Mitogen-activated protein kinase (Stressz / Mitogén Aktivált Protein Kináz)
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate (Nátrium-dodecil-szulfát)
SOD	Superoxide dismutase (Szuperoxid - dizmutáz)
SS	Salt Solution (sóoldat)
ST	Sterigmatocisztin
<i>t</i> BOOH	<i>tert</i> -Butyl hydroperoxide (<i>terc</i> -butil-hidroperoxid)
TES	Trace Element Solution (nyomelemoldat)
TF	Transzkripció faktor
TRANSFAC	TRANScriptio FACtor database (Transzkripció faktor adatbázis)

1. Bevezetés

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

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

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

Így az AtfA a konídiumokban részt vesz többek között a stresszválaszok transzkripciós szintű szabályozásában, hozzájárul a konídiumok életképességének fenntartásához, biztosítja azok oxidatív, hő (Hagiwara és mtsai., 2008) és ozmotikus stresszel szembeni toleranciáját (Balázs és mtsai., 2010) *Aspergillus nidulans*ban, szerepe van továbbá az aszexuális

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

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

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

2. Irodalmi áttekintés

2.1. Az *Aspergillus* nemzetség

Az egyik legrégebben elnevezett gombanemzetséget az *Aspergillus* genuszt 1729-ben Pier Antonio Micheli jellemezte először. Nevét a római katolikus liturgiánál a szentelt víz hintésére használt eszközről, az *aspergillum*ról kapta (Bennett, 2008).

Az *Aspergillus* nemzetség tagjai rendszertanilag az *Ascomycota* törzs *Eurotiomycetes* osztályának *Eurotiales* rendjén belül az *Aspergillaceae* családhoz tartoznak (Houbraken és mtsai., 2011). A gazdasági és társadalmi szempontból is igen jelentős, nagy változatosságot mutató nemzetségbe tartozó fajok sokféle élőhelyen található meg világszerte (Knuf és Nielsen, 2012). Az ökoszisztémában fontos szerepük van olyan anyagok lebontásában, mint a keményítő, hemicellulóz, cellulóz, pektinek és egyéb cukorpolimerek, de egyes fajok a zsírok, olajok, kitin és keratin hasznosítására is képesek (Bennett, 2008).

Képviselőik között megemlíthetők az ipari célú felhasználásukról ismert fajok, mint az *A. niger*, amelynek általánosan biztonságosnak elismert minősítésű (GRAS) fermentációs termékek előállítására alkalmas ipari törzsének a citromsavgyártásban van jelentős szerepe. A globálisan előállított citromsav mennyisége 2022-ben elérte a 2,8 millió tonnát, amely 2028-ra várhatóan 3,3 millió tonna körül fog mozogni (<https://www.researchandmarkets.com/report/citric-acid>). Az antibiotikumok, gyógyszerek előállítására alkalmas fajok között példaként szolgál az *A. terreus*, amelyet a koleszterinszint csökkentő gyógyszer, a lovasztatin termelésénél alkalmaznak (Knuf és Nielsen, 2012) vagy az *A. oryzae*, amelyet Japánban a szaké, miso és szójaszószt előállítására használnak (Kitamoto, 2015). Az *Aspergillus* nemzetség számos tagja azonban képes betegséget is okozni, így például az *A. clavatus* allergiát, míg az *A. fumigatus* immunszuppresszáltakban súlyos tüdőaspergillózist vált ki (Klejnstrup és mtsai., 2012). Az *Aspergillus*ok fő taxonómiai bélyege, a spóratartó képlet, a konídiofór. A konídiofórok csúcsi részének megnagyobbodásával gömb, elliptikus vagy ütő formájú vezikulum képződik. A többmagvú vezikulumról sarjadzással több egymagvú metula fűződik le. A metula sejtek sarjadzásával létrejövő termékeny sejtréteget fialidnak (régőbbi irodalmi neve másodlagos sterigmata) nevezzük, amelyről pedig a mitotikus spórák hosszú láncai, a konídiumok vagy konídiospórák fűződnek le (Pontecorvo és mtsai., 1953). A konídiumképzésért felelős gének expresszióját szabályozó központi fejlődési útvonal 3 fő szabályozó TF-t tartalmaz: a BrlA, az AbaA és a WetA. A BrlA a konídiumok képződéséhez szükséges géneket, az AbaA főként a konídiofór fejlődésében és a fialidok képződésében szerepet játszó géneket szabályozza, míg a

WetA a konídiumok falának képződéséhez szükséges gének aktivációjáért felelős (Kim és mtsai., 2017). A konídiofór mellett a kleisztotéciumok (többsejtű termőtest) valamint a Hülle-sejtek is a fajra jellemző fontos morfológiai bélyegek. A kleisztotéciumok az ivaros szaporítóképletek, amelyekben a meiotikus aszkospórák foglalnak helyet, amelyek tápanyagdús környezetben csírázni kezdenek hifákat képezve. A Hülle-sejtek megvastagodott, gyakran gömbölyű, a kleisztotéciumokkal kapcsolatban lévő sejtek (Pontecorvo és mtsai., 1953).

Az általunk tanulmányozott *A. nidulans* a gombák királyságán (Fungi Regnum) belül az aszkomikóta fonalas gombák közé tartozik. Genetikai vizsgálatok ideális modellorganizmusa, mivel az ivartalan szaporodás mellett, ivaros (teleomorf megfelelője az *Emericella nidulans*) és paraszexuális fejlődésre egyaránt képes, emellett kis méretű haploid genomja van, olcsón és egyszerűen tenyészthető, gyors növekedésre és szaporodásra képes, de jellemző tulajdonsága még az első szeptum képződése után kialakuló többsejtű állapot, könnyű transzformálhatóság, a fenotípusváltozások jó nyomonkövethetősége is. Az *Aspergillus*on végzett genetikai munkák alapjainak lefektetése az 1940-es években Pontecorvo és munkatársainak volt köszönhető (Pontecorvo és mtsai., 1953).

Ezen fonalas gomba számos iparilag előállítható enzim, mint a cellulázok, β -glükózidázok, hemicellulázok, lakkázok, lipázok, proteázok, β -galaktozidázok, tannázok, keratinázok, kutinázok, aril-alkohol oxidázok emellett heterológ enzimek termelésére is felhasználható (Kumar, 2020). Az *Aspergillus* genomszekvenálások 1998-as (Cereon Genomika - Monsanto) indulásától 2003-ra az *A. nidulans* genomszekvenciája már 13-szoros lefedettséggel (coverage) állt rendelkezésre. Genomjának mérete 30,1 Mb, génjeinek száma 9396 (Knuf és Nielsen, 2012).

2.2. Az AtfA és AtfB bZIP TF-ok

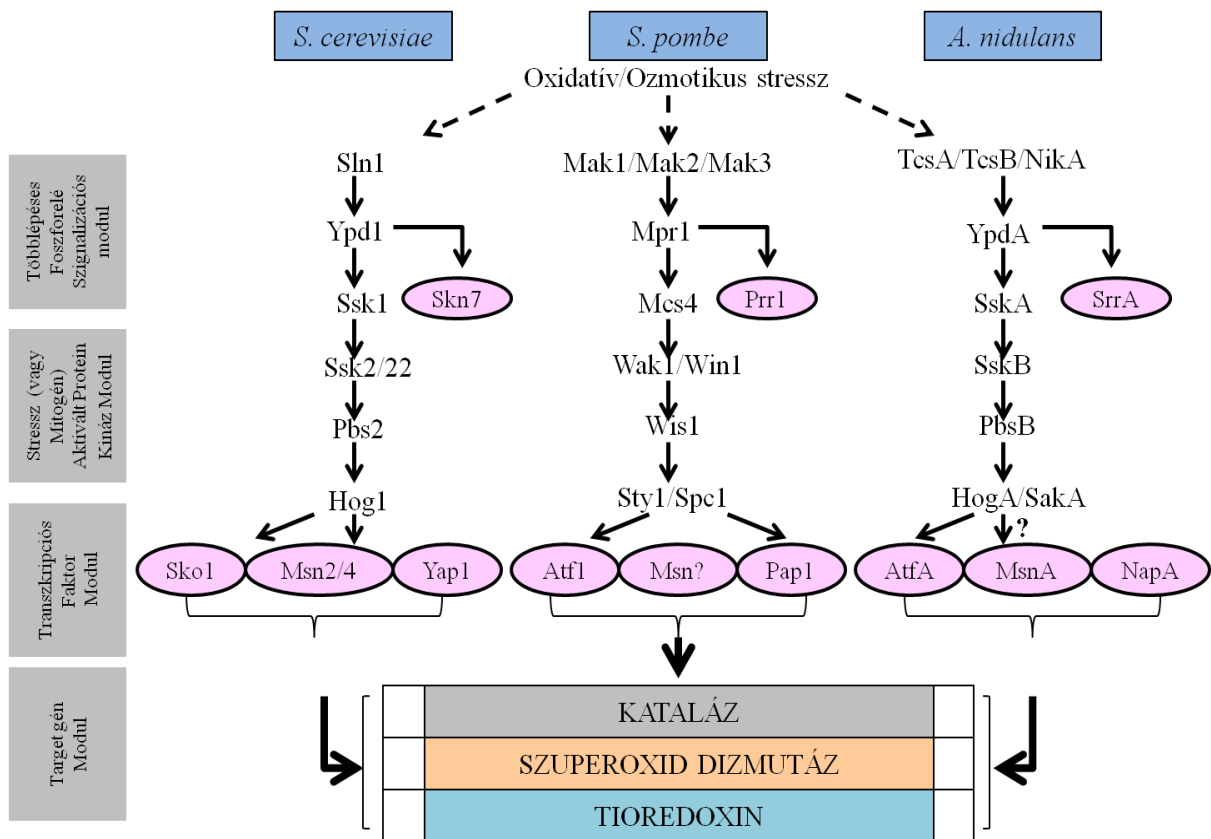
A bázikus leucin cipzár szupercsalád (bZIP) az egyik legősibb és legjobban jellemzett konzervált eukarióta TF család. Az eukariótákban változatos szerepük van az egyes sejttípusok differenciációjában, azok fenntartásában, de részt vesznek emellett különböző stresszválaszokban, a sejtproliferáció szabályozásában, illetve a homeosztázis fenntartásában. A bZIP elnevezés a nagymértékben konzervált 60-80 aminosavból álló bZIP doménre utal, amely 2 részből tevődik össze, a DNS kötésben szerepet játszó N-terminális bázikus régióból, valamint egy leucin cipzárból, amely a bZIP-ek homo-és heterodimerizációját teszi lehetővé. A dimerizációért felelős leucin cipzár domén egy 7 db aminosavból álló feltekeredett motívum, amelyet leucin aminosavak alkotnak (Landschulz és mtsai., 1988). Az ATF/CREB (Activating Transcription Factor/cAMP - Responsive Element – Binding protein) típusú transzkripciós faktor-család sok tagjára jellemző egy palindrom konszenzus szekvenciához, a TGACGTCA-hoz (az ATF/CRE helyhez) történő kötődés homo-vagy heterodimerként (Lara-Rojas és mtsai., 2011; Nathues és mtsai., 2004). A képződő homo-és heterodimerek eltérő funkciókkal jellemezhetők (Landschulz és mtsai., 1988).

Az élesztőkhöz és a magasabbrendű eukariótákhoz hasonlóan a fonalas gombáknál a különböző stresszreakciókra (oxidatív vagy ozmotikus stressz, UV sugárzás, magas hőmérséklet) konzervált jelátviteli útvonalak aktiválódnak, amelyek többlépéses foszforelé szignalizációs modul révén a jeleket a SAPK/MAPK jelátviteli útvonal (Stressz/Mitogén Aktivált Protein Kináz) felé továbbítják. Az útvonal tartalmaz egy MAPK-t, amely a target transzkripciós faktorokat és egyéb citoszolikus fehérjéket a szerin illetve treonin aminosavakon egy konszenzus motívumon foszforilálja. A MAPK aktivációja az aktivációs hurokban megtalálható konzervált treonin és tirozin aminosavak kettős foszforilációjával történik a MAPK kinázzal (MAPKK). A MAPKK-t pedig a MAPKK kináz (MAPKKK) aktiválja (Hong és mtsai., 2013).

A bZIP transzkripciós faktorok szabályozásáért a MAPK mellett a cAMP-PKA (Protein Kináz A) kaszkád is felelős. Ezen TF-ok többségében antioxidáns célgének működését szabályozzák, így például az oxidatív stresszel szembeni sejtválasz irányításában közreműködő katalázt, tioredoxint, és a szuperoxid dizmutázt (Hong és mtsai., 2013).

A. *nidulans*ban a környezeti stresszhatásokra a HogA/SakA aktiválódik, amely ezt követően transzkripciós faktorokat indukál, így például az AtfA működését, amely a target gének expressziós változását fogja eredményezni. A TcsA/TcsB/NikA szenzor kinázok közvetítik az oxidatív stressz szignálokat a HogA/SakA SAPK/MAPK kaszkád felé az YpdA

→ SskA/SskB → PbsB útvonalon keresztül. Ezen többlépcsős foszforelé rendszerben esszenciális komponensek a hibrid hisztidin kinázok (TcsA/NikA), a hisztidin tartalmú foszfortranszfer proteinek (YpdA), illetve a válaszsabályozó elemek (SskA). Ezen jelátvivő elemek a szignált konzervált hisztidinről aszpartát aminosavakhoz, így a SAPK/MAPK modulhoz szállítják (1. ábra) (Hong és mtsai., 2013).



1. ábra A *Saccharomyces cerevisiae*, a *S. pombe* és az *A. nidulans* stressz által aktivált jelátviteli útvonala (Hong és mtsai., 2013)

2.3. Az AtfA szerepe a gombákban

Az AtfA az ATF/CREB családhoz tartozó, 485 aminosavból álló, lokalizációját tekintve a sejtmagban megtalálható fehérje, amely a konídiumok életképességében (Lara-Rojas és mtsai., 2011), az ivaros és ivartalan szaporodás szabályozásában játszik szerepet *Neurospora crassa*, *A. nidulans* és *Fusarium graminearum* esetében (Orosz és mtsai., 2017), továbbá kulcsfontosságú a konídiumok stressztoleranciájának fenntartásában *A. nidulans*ban, *A. fumigatus*ban, és *A. oryzae*ben (Orosz és mtsai., 2017). Ezt támasztja alá az is, hogy a konídiumspecifikus gének több mint fele AtfA-függő módon szabályozott *A. fumigatus*ban (Hagiwara és mtsai.; 2016). Az AtfA ortológok részt vesznek számos folyamat koordinálásában a vegetatív micéliumokban, úgy mint a stresszhatásokkal szembeni tolerancia kialakításában vagy a másodlagos anyagcsere folyamatok irányításában *A. nidulans* (Lara-Rojas és mtsai., 2011), *F. graminearum* (Nguyen és mtsai.; 2013), *Fusarium oxysporum* (Qi és mtsai., 2013), *Botrytis cinerea* (Temme és mtsai.; 2012), *Magnaporthe oryzae* (Guo és mtsai.; 2010) és *Claviceps purpurea* (Nathues és mtsai.; 2004) fajokban, illetve hozzájárulnak a növénypatogén gombák (Orosz és mtsai., 2017), így például a *Fusarium graminearium* (Nguyen és mtsai.; 2013), *Botrytis cinerea* (Temme és mtsai.; 2012), *Magnaporthe oryzae* (Guo és mtsai.; 2010) vagy *Claviceps purpurea* (Nathues és mtsai.; 2004), de a humánpatogén *A. fumigatus* virulenciájához is (Orosz és mtsai., 2017).

A különféle stresszhatásokra (ozmotikus, UV-sugárzás által kiváltott, vagy magas hőmérséklet okozta stressz), így az oxidatív stresszre aktiválódó jelátviteli útvonalak evolúciós konzerváltságot mutatnak.

A *S. pombe* Atf1 a SAPK jelátviteli útvonalon a Sty1 foszforilációja révén aktiválódik. Oxidatív stressz hatására az Atf1 olyan gének expresszióját indukálja, mint a citoszolikus kataláz *ctt1*-et, a glutation peroxidáz *gpx1*-et valamint a tioredoxin reduktáz *trr1*-et. A Pcr1 bZIP transzkripciós faktoral heterodimert képezve néhány target gén transzkripció aktivációjában vesz részt (Hong és mtsai., 2013).

A *S. cerevisiae*-ben a Sko1 (*S. pombe* Atf1 ortológja) a target gének CRE szekvenciájához kötődve normál növekedési körülmények között transzkripciós represszorként funkcionál, míg ozmotikus stressz hatására foszforilációjával történő aktivációjával indukálja a célgén expresszióját (Hong és mtsai., 2013).

Az *A. nidulans atfA* génje, amely a hasadó élesztő *S. pombe atf1* génjével (Balázs és mtsai., 2010), illetve az emlősök, beleértve az ember *ATF2* génjével (Orosz és mtsai., 2017) mutat ortológiát, sokféle stresszválasz szabályozásában vesz részt. Delécióna oxidatív stresszre

érzékeny fenotípust eredményezett, míg ozmotikus stresszel szemben jelentős változást nem mutatott a kontroll törzshöz képest. A *S. pombe* *Δatf1* törzs ozmotikus és oxidatív stresszre érzékeny fenotípusai közül az *A. nidulans atfA* génje az ozmotikus stresszre való érzékenységet felületi tenyészetnél teljes mértékben, süllyesztett kultúrájánál mindkét stresszérzékenységet részlegesen komplementálta, amely bizonyítja, hogy a két gén között valódi funkcionális ortológia áll fenn (Balázs és mtsai., 2010).

*A. nidulans*ban a *ΔatfA* konídiumok érzékenységet mutattak fungicidekre (iprodisonra és fludioxonilra), az 50°C-on végzett hőkezelésre, emellett ozmotikus stresszre (enyhe növekedésbeli visszaesés volt tapasztalható) (Hagiwara és mtsai., 2008, 2009), illetve csökkent életképesség volt jellemző 4 °C-on történő tárolás hatására is (Balázs és mtsai., 2010), valamint az oxidatív stresszel szembeni érzékenység is növekedett (Balázs és mtsai., 2010; Emri és mtsai., 2015). Érdekes megfigyelés, hogy az AtfA SakA-val történő kötődése biztosította a konídiumok oxidatív stresszel szembeni védelmét, ezzel szemben a micéliumok H₂O₂-dal szembeni rezisztenciájához csak kis mértékben járult hozzá (Lara-Rojas és mtsai., 2011; Hong és mtsai., 2013).

A vad típusú és a deletált *atfA* mutáns esetében az oxidatív stressz által kiváltott genom szintű génexpressziós változások vizsgálata révén nagyszámú közösen szabályozott gént sikerült azonosítani. Ezen géneket nevezzük az ún. Központi Oxidatív Stresszválasz (Core Oxidative Stress Response, COSR) géneknek, amelyek oxidatív stressz alatt együtt szabályozódnak. A transzkriptom tanulmányozásából származó adatok megerősítették, hogy az AtfA sok stresszhez kapcsolódó és stresszhez nem kapcsolódó gén szabályozásában egyaránt részt vesz (Emri és mtsai., 2015, és Antal és mtsai., 2020). Többek között az AtfA által szabályozott gének között megemlíthető a kataláz B-t kódoló *catB*, amely oxidatív stresszre (H₂O₂ és *tBOOH*) (Emri és mtsai., 2015, Hong és mtsai., 2013). valamint a glicerin-3-foszfát dehidrogenázt kódoló *gfdB* gén, amely ozmotikus stresszre (NaCl) aktiválódott. A COSR gének közül kettő mutatott AtfA-függést, a sterigmatocisztin génklaszter egy feltételezett peroxidázt kódoló génje az AN7823, illetve az ismeretlen funkciójú AN9451 (Emri és mtsai., 2015).

*A. oryzae*ben oxidatív stressz hatására a *ΔatfA* konídiumok csírázási aránya sokkal kisebb volt a *ΔatfB* konídiumokhoz viszonyítva. A transzkriptomikai adatok alapján elkülöníthető egy AtfA és AtfB által egyaránt szabályozott géncsoport, azonban az oxidatív stressz szabályozásában az AtfA-nak van jelentősebb szerepe (Sakamoto és mtsai., 2009).

Az ATF/CREB típusú bZIP transzkripciós faktorok a különböző patogén gombák esetében a gomba virulenciagénjeit is szabályozzák.

*A. fumigatus*ban az *atfA* deléciója (*atfB* deléciónál úgyszintén) csökkentette a gomba fertőzőképességét a *Galleria mellonella* (nagy viaszmolylepke) modellszervezeten és az invazív pulmonáris aszpergillózis neutropéniás egérmódellen is. Emellett a $\Delta atfA$ mutánsok érzékenyek bizonyultak magas hőmérsékletre, valamint oxidatív stresszre, illetve csökkent a trehalóz bioszintézisük is (Silva és mtsai., 2017). Az AtfA az AtfB-D transzkripciós faktorokkal együtt szabályozza a stresszválasz útvonalakat és a virulenciát ebben a gombában. Az egyszeres és a kettős bZIP transzkripciós faktor deléciós mutánsokban a különböző környezeti stresszhatások esetén megfigyelt fenotípusos jellegzetességeket az AtfA-D közötti episztatikus, additív, és szupresszív kölcsönhatások eredményezték, ami alátámasztja, hogy ezek a gének sokféle kölcsönhatásba lépnek egymással és sokoldalú feladatokat látnak el *A. fumigatus*ban (Silva és mtsai., 2021).

*M. oryzae*ban a MoAtf1 az oxidatív stresszválaszt szabályozza, a *MoAtf1* deléciója esetén a micéliumok vegetatív növekedése zavart szenvedett, valamint a H₂O₂ érzékenység is fokozódott. Továbbá a *MoAtf1* deléciója nyomán az extracelluláris enzimek aktivitása, a lakkázok és peroxidázok transzkripciós szintje, ezáltal a gomba fertőzőképessége is jelentős mértékben csökkent (Guo és mtsai., 2010).

*B. cinerea*ban az *atfA* gén hiánya sokféle gén expressziójára, így például a stresszválaszban, primer anyagcserében vagy a sejtfalszintézisben közreműködő génekre volt hatással. Ezenkívül a szekunder anyagcsere szabályozásában is fontos szerepet tölt be, a mutáns által termelt toxinok koncentrációja jelentős mértékben megnőtt (Temme és mtsai., 2012), így például 2-10-szeres mennyiségben termelődött a poliketid botcinin A, a szeszkviterpén botridial és a botriendial (Hong és mtsai., 2013). A BcAtf1 a normál vegetatív növekedésben és differenciációban is részt vesz, 3 napos nappali-éjszakai körülmények melletti inkubálás esetén a deléciós mutánsnál nagyobb arányban képződtek légmicéliumok, „fluffy”fenotípust eredményezve, folyamatos megvilágítás mellett szintén a légmicéliumok képződését tapasztalták. A vad típusú törzssel ellentétben a deléciós mutánsban elmaradt a szkleróciumok képződése két hét sötétben történő tenyésztéskor, ami a fényfüggő fejlődési folyamatok zavarát jelzi (Temme és mtsai., 2012).

A *C. purpurea* fű-és gabonaféléken, így a rozson is élősködő fitopatogén gomba, a gazdanövény megfertőzésekor átíródó CPTF1 génje az ATF/CREB bZIP típusú TF-kal mutat homológiát. A CPTF1 deléció esetén szignifikáns mértékben csökkent a gomba fertőzőképessége. A vad típusú és az ektópiás beépülést mutató transzformánsal összevetve a deletált mutánsokban kifejlődő szkleróciumok száma csökkent, illetve többségük ki sem fejlődött teljes mértékben. A szekvencia analízisek szerint a CPTF1 leucin cipzárából hiányzik

egy leucin. Az emlős TF-ok esetében a leucin cipzárbán lévő leucin aminosavakat érintő mutációk a dimerek képződését megzavarva a DNS kötő képesség csökkenését idézik elő. Ezen eredményekkel ellentétben a CPTF1-gyel ortológ AtfA-nál *A. nidulans*ban és az Atf1-nél hasadó élesztőben ugyanazon leucin aminosavak hiányoznak, viszont ezeknek a mutációknak nincs káros hatása a gombákra (Nathues és mtsai., 2004).

A kukorica patogén *F. verticilloides* FvAtfA a vegetatív és invazív növekedésben, az oxidatív (H_2O_2 és MSB) és sejtfal integritás (Kongóvíz) stresszekkel szembeni védelemben valamint a mikotoxin- (fumonizin) és a pigmenttermelésben (bikaverin, karotinoid) játszik szerepet. A deletált mutáns lassabban nőtt Czapek-Dox tápagon, illetve a paradicsomon megfigyelt invazív növekedésnél is csökkent kolóniaátmérők voltak jellemzők. A $\Delta FvatfA$ fokozott érzékenységet mutatott az oxidatív stresszt kiváltó H_2O_2 -ra és MSB-re és a Kongóvíz által okozott sejtfal integritás stresszre, illetve a fumonizin mikotoxin és a karotinoid mennyisége csökkent, a bikaverin bioszintézise viszont növekedett (Szabó és mtsai., 2020).

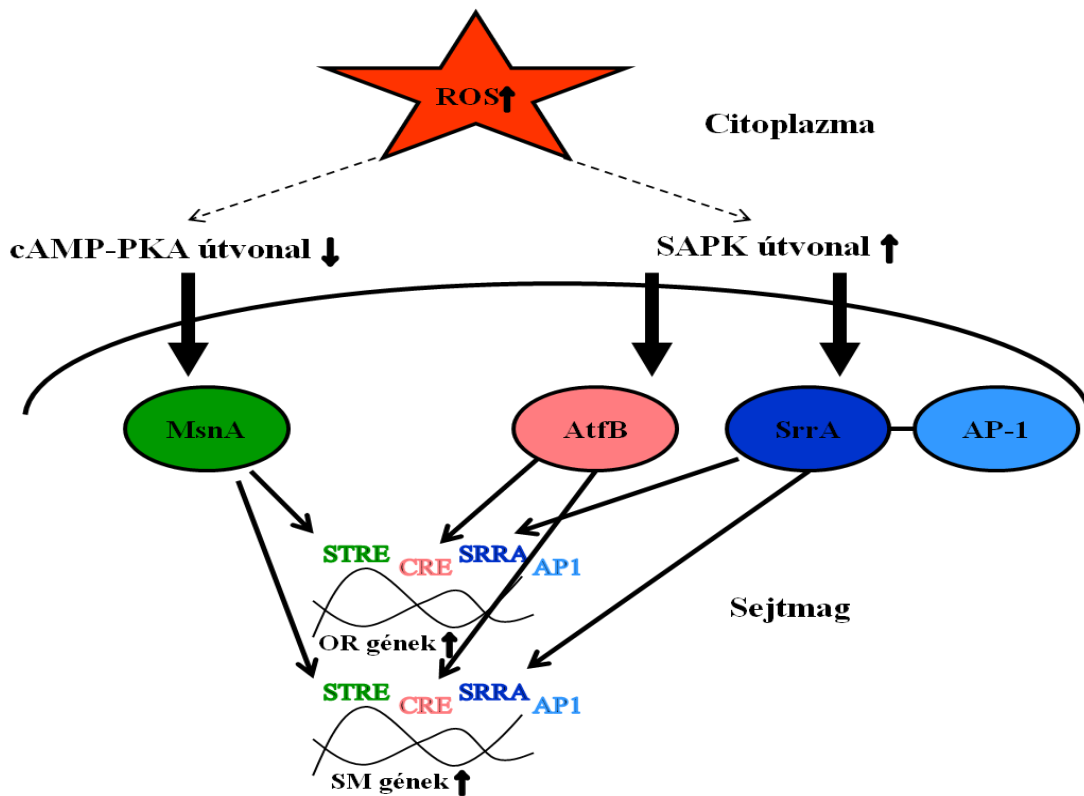
A *F. graminearum* egy, a gabonaféléken élősködő nekrotrof gomba. A sejtmagban lokalizálódó *Fgatf1* deletálása esetén az ozmotikus stresszérintékonyság növekedett, míg az oxidatív stressz szembeni érintékonyság csökkenése mellett a szexuális szaporodás időbeli eltolódása volt jellemző. A mikotoxin termelést vizsgálva elmondható, hogy *in vitro* körülmények között a deléciós mutáns a DON-t nagyobb mennyiségben termelte. Ezzel szemben a búza fertőzésekor jelentős mértékben csökkent ezen mikotoxin szintje. A $\Delta Fgatf1$ törzsek búzával és kukoricával szembeni virulenciája viszont jelentős mértékben csökkent (Nguyen és mtsai., 2013).

A *F. oxysporum* *Foatf1* bZIP TF-t kódoló gén deletálása az intracelluláris redox egyensúlyt az oxidált állapot felé tolta el a banán megfertőzésének korai fázisában. A deléciós mutáns H_2O_2 érintékonysége a vad típushoz képest növekedett. A gén tehát részt vesz az oxidatív stressz szembeni tolerancia szabályozásában. Ezen TF az extracelluláris enzimaktivitás, valamint a kataláz transzkripció szintjének jelentős csökkenését idézte elő, így a $\Delta Foatf1$ mutánsban a kataláz P2 és P3, A és C mutáltak csökkent expressziót. A katalázok a növény-mikroba interakcióból származó ROS detoxifikálásával segítik a patogén gombákat. Cavendish banánon (*Musa* spp.) a $\Delta Foatf1$ csökkent virulenciáját tapasztalták, vagyis a *Foatf1* szükséges a teljes virulencia eléréséhez ebben a gombában. A deléciós mutánsban a termelődő konídiumok morfológiája hasonló volt a vad típusú vagy a komplementált törzs konídiumaihoz, viszont méretük kisebb és csírázásuk is rendkívül lassú volt (Qi és mtsai., 2013).

2.4. Az AtfB szerepe a gombákban

Az AtfB az AtfA-val ortológiai mutató transzkripció faktor, amely többek között részt vesz a mikotoxin termelés és az oxidatív stresszválasz szabályozásában *A. parasiticus*ban (Wee és mtsai., 2017) és feltételezhetően más *Aspergillus* fajokban is (Orosz és mtsai., 2017).

Ez valószínűleg az alábbi jelátviteli útvonalon keresztül történik (**2. ábra**). A gombasejtek megnövekedett intracelluláris ROS szintje a cAMP-PKA jelátviteli útvonal represszióját idézi elő. Ennek következtében az MsnA, amely az oxidatív stresszválaszban szerepet játszó transzkripció faktor, az oxidatív stresszválasz valamint az antioxidáns gének promóterében található STRE kötőhelyre való kötődésével ezeknek a géneknek az aktiválódását eredményezi. Ezzel egyidőben zajlik a SAPK jelátviteli kaszkád túlermelődése a képződött ROS hatására. Ezt követően az AtfB és az SrrA kötődik az oxidatív stresszválasz és az antioxidáns gének promóterében lévő CRE, SRRA és AP1 kötőhelyekre, majd az MsnA, AtfB és SrrA fog kapcsolódni a szekunder anyagcserében részt vevő, így például az aflatoxin bioszintéziséért felelős gének promóterében lévő STRE, CRE, SRRA és AP1 kötőhelyekre, aktiválva ezeket a géneket. A ROS hatására termelt szekunder metabolitoknak a gombasejtek oxidatív stresszel szembeni védekező mechanizmusában van szerepe (Hong és mtsai., 2012, **2. ábra**).



2. ábra A szekunder metabolizmus és az oxidatív stresszválasz gének transzkripciósfaktorok kötésével, oxidatív stressz hatására megvalósuló transzkripciósfaktorok aktivációjának feltételezett modellje

Rövidítések: PKA=Protein Kináz A, SAPK=Stressz Aktivált Protein Kináz, OR=Oxidatív Stresszválasz, SM= Szekunder Metabolizmus (Hong és mtsai., 2012)

*A. parasiticus*ban az AtfB hét, az aflatoxin bioszintézisben résztvevő gén (*pksA*, *nor-1*, *fas2-fas1* intergénikus régiója, *omtA*, *orda*, *ver1* és *aflR*) promóterében lévő CRE szekvenciához kötődik (Hong és mtsai., 2013; Roze és mtsai., 2011). Az AtfB a *nor1*, az aflatoxin bioszintézis korai szakaszában résztvevő gén promóterében megtalálható CRE1 (5'-TGACATAA-3') és AP-1 (5'-TGAGTAC-3') kötőhelyekhez kapcsolódik (Hong és mtsai, 2012). A CRE szekvenciában bekövetkező mutációk hatására exogén cAMP indukciójával csökkent a *nor1* transzkripciója. Ez azt bizonyítja, hogy az aflatoxin bioszintézist a cAMP/PKA útvonal ha csak részben, de az AtfB-n keresztül szabályozza. Az *atfB* expressziója korrelációt mutatott az aflatoxin gén expressziójával AF termelést indukáló körülmények között, vagyis az AtfB aktiválni tudja az AF gén promóterét (Hong és mtsai., 2013).

Fontos koregulátor funkciókat betöltve az AtfB az AF gének mellett kötődik stresszválaszokat szabályozó génekhez, például a micélium-specifikus *cat1*-hez vagy a mitokondrium-specifikus *mnSOD*-hoz. Így az AtfB részt vesz az aflatoxin és antioxidáns gének expressziójának szabályozásában (Hong és mtsai., 2013). A *nor-1* promóterénél megfigyelt CRE1- vagy AP1

kötőhely, vagy mindkettő együttesen megtalálható az AF bioszintézisben résztvevő korai (*fas-1*) és köztes időpontban aktiválódó (*ver-1*) gének és a micéliumban termelődő stresszválasz gének, mint a *cat1* és *mnSOD* gének promóter régióiban is (Hong és mtsai., 2012).

Feltételezhetően a homo-vagy heterodimerképződés más transzkripciós faktorokkal (AP-1, SrrA, AtfA vagy más bZIP transzkripciós faktorral) az AtfB CRE-kötőhelyhez történő kötődését segíti elő (Hong és mtsai., 2012)

*A. oryzae*ban az AtfB felületi kultúrában a késői növekedési fázisban, konídiumképzéskor expresszáldott, a vegetatív növekedési szakaszban csak csekély mértékben íródott át (Hong és mtsai., 2013, Sakamoto és mtsai., 2008) szemben az AtfA-val, amely a teljes tenyésztési idő alatt konstans módon termelődött. Így elmondható, hogy az AtfB a konídiumképzés alatt játszik szerepet a génexpresszió szabályozásában. A microarray technikával végzett globális expressziós analízis eredményei alapján az AtfB hatására 29 db gén expressziója növekedett (BUP = *atfB* UPregulált gének). Az *A. oryzae* genomprojekt annotációja alapján a BUP gének csoportosítása révén megállapítást nyert, hogy az AtfB részt vesz számos celluláris folyamatban, mint a stresszel szembeni védelemben, illetve a szén - és aminosav anyagcserében is. A 29-ből 21 gén promóterében volt CRE-szerű motívum, amelyből 4-nél a konszenzus CRE-motívummal tökéletes egyezést figyeltek meg. Az *A. oryzae* ATF/CREB fehérjéit más eukarióta fajokból (pl. az *S. pombe*, *A. nidulans*, *C. purpurea*, *S. cerevisiae* vagy az emberből) származókkal összehasonlítva megállapítható, hogy ezen fehérjék között az AtfB-nél (AtfA esetében is) a bázikus régiók hasonlóságot mutatnak, míg az AtfB leucin cipzár régiói viszont nem mutattak egyezést (Sakamoto és mtsai., 2008).

A BUP gének közé tartoznak a valószínűleg a stressztoleranciáért felelős *catA*, amely specifikusan a konídiumokban expresszáldik és a reaktív oxigénradikálok szembeni védelemben van szerepe, valamint egy a trehalóz-6-foszfát szintáz génekkel homológiát mutató gén. Ez utóbbi gén csökkent expressziója előidézhetheti a trehalóz-6-foszfát tartalom csökkenését, ahogyan *S. cerevisiae*ban a homológ TPS3 deléciója is csökkentette a trehalóz-6-foszfát szintet. A deletált gén komplementálás után a vad típushoz képest csökkent expressziót mutatott, viszont a trehalóz mennyisége ugyanakkora volt, vagyis az AtfB szabályozhatja a konídium trehalóz tartalmát is (Sakamoto és mtsai., 2008).

Az *atfB* túltermelő (*atfBOE*) törzsben a legtöbb aktiválódott gén a deléció mutánsban represszáldott, emellett csak kevés gén aktiválódott a deléció vagy represszáldott a túltermelő mutáns esetében. Az AtfB ezek alapján transzkripciós aktivátor szerepet tölt be (Sakamoto és mtsai., 2008).

*A. oryzae*ben az *atfB* deléciós mutánsban az antioxidáns gének, így például a *catA* (konídium specifikus kataláz) csökkenő transzkripciós szintet mutatott, emellett konídumai érzékenyek bizonyultak H_2O_2 -ra (Hong és mtsai., 2013). A $\Delta atfB$ konídiumok stressztoleranciája tehát csökkent a vad típusú konídiumoknál megfigyeltékhez képest.

Ozmotikus stressz hatására a $\Delta atfB$ mutáns növekedése nem mutatott eltérést a vad típusú törzshöz képest, viszont a konídiumok száma a mutánsnál enyhe mértékben, de csökkent. Azaz az AtfB részt vesz a konídiumok fejlődésében ozmotikus stressz mellett. A $\Delta atfB$ konídiumszáma szilárd táptalajon való tenyésztéskor is csökkenést mutatott, hasonlóan az ozmotikus stresszt kiváltó táptalajon történő konídiumszám csökkenéssel. Hőstresszel szemben a deléciós mutáns konídiumainak érzékenysége szintén növekedett.

Az ATF/CREB fehérjék által megkötött CRE-szerű DNS motívumok a deléciós mutáns legtöbb represszált génjének promóterében megtalálhatók. Az AtfB ezért valószínűleg a konídiumok stressztoleranciájában játszik szerepet (Sakamoto és mtsai., 2008).

2.5. A tanulmányozott stresszhatások

2.5.1. Oxidatív stressz

Azt az élettani állapotot, amikor a reaktív oxigén formák (ROS) által okozott negatív hatások a stressznek kitett sejtek életképességét szignifikánsan rontják, oxidatív stressznek nevezzük. Gyakran következik be a gazdaszervezet és a patogén közti kölcsönhatáskor, xenobiotikumok lebomlásakor valamint a nehézfémek bioszorpciójakor. Oxidatív stressz következtében többek között a glutaredoxin-thioredoxin, a DNS hibajavító rendszerek aktiválódása, az antioxidáns enzimek (kataláz, peroxidáz, szuperoxid-dizmutáz), a NADPH fokozott termelése és a sejtciklus folyamatok gátlása megy végbe (Orosz és mtsai., 2017). A SOD a szuperoxid diszmutációját katalizálja H_2O_2 -á, amelyet a kataláz detoxifikál H_2O -ra és O_2 -re (Hong és mtsai., 2012).

A ROS, mint például a szuperoxid anion ($O_2^{\cdot-}$) vagy a hidrogén-peroxid (H_2O_2) a molekuláris oxigén nem teljes redukciójával keletkezik a légzési és metabolikus folyamatok közben (Qi és mtsai., 2013) (pl.: mitokondriális légzéskor, a peroxisómában a zsírsavak β -oxidációjával), vagy különböző környezeti hatásokra, mint az UV sugárzás vagy a tápanyaghiány (Hong és mtsai., 2012). Szerepük pl. a növények esetében a patogén invázió leküzdésében van (Qi és mtsai., 2013).

Az oxidatív stressz kiváltásához diamidot, MSB-t és *t*BOOH-t használtunk.

Diamid: A reaktív nitrogén formák, az ún. reaktív elektrofil vegyületek (RES), azon belül az azovegyületek közé tartozó diamid a tiol-redox egyensúlyra van hatással. Toxicitását tehát a fehérjék és kis molekulatömegű tiolok közötti diszulfid-hidak kialakításával fejt ki (Pöther és mtsai., 2009). Specifikusan a savas tiolcsoport különösen a glutation oxidálásában van szerepe (Toledano és mtsai., 2003). A diamid két GSH molekula (glutation redukált formája) GSSG-dá (glutation-diszulfid, oxidált forma) történő oxidációjával a GSH/GSSG redoxrendszer egyensúlyát zavarja meg hidrazin képződése közben. Ezt követően a H_2O_2 az intracelluláris peroxidszint (O_2^{2-}) növelésével a kén tartalmú aminosavak direkt oxidációját és hidroxilgyökök (OH^\bullet) képződését eredményezi (Kosower és Kosower 1995; Pócsi és mtsai., 2005).

***t*BOOH (terc-butil-hidroperoxid):** A kumén-hidroperoxid, a linolénsav és a linolsav-hidroperoxid mellett a *t*BOOH (terc-butil-hidroperoxid) a szerves peroxid származékok közé tartoznak. Hidrofóbicitásuk miatt inkább a membránkomponensekkel lépnek reakcióba (Toledano és mtsai., 2003). A *t*BOOH alkohollá történő kételektronos redukciója a glutation-peroxidázzal megy végbe, amelyet a GSH GSSG-dá történő oxidációja követ. A GSSG redukciója a glutation-reduktázzal NADPH felhasználásával történik. A GSH kimerülés valamint a nikotinamid-nukleotidok a pentóz-foszfát útvonal stimulációját és a Ca^{2+} szekvesztráció zavarát okozzák, azaz a citoszólikus szabad Ca^{2+} koncentráció növekszik, így a sejtmembrán működésében zavar következik be (Davies, 1989). A *t*BOOH-nak a glikolízisre nincs hatása, a pentóz-foszfát útvonal aktivitását viszont fokozza, az útvonal gátlása pedig pl. 6-aminonikotinammal (a NADPH képződés csökkenését okozza a pentóz-foszfát útvonalon keresztül) a *t*BOOH toxikus hatásának felerősítését eredményezte (Rush és Alberts, 1986). Citotoxicitását úgy fejt ki, hogy a *t*BOOH indukálja a NADPH és a tiol elhasználását, így előbbi a mitokondriális, utóbbi pedig az extramitokondriális kalcium raktárak zavarát idézi elő (Rush és Alberts, 1986).

MSB (Menadion-nátrium-biszulfit): A menadion redox ciklussal szuperoxid gyökionok ($O_2^{\bullet-}$) képződését generálja, amely a 4Fe-4S fehérjékre káros hatást gyakorolva, hidroxilgyökök (OH^\bullet) keletkezését váltja ki. Emellett közvetve hatása lehet a GSH tartalomra is a GST (glutation-S transzferáz) által katalizált detoxifikációban (Pócsi és mtsai., 2005). Továbbá a ROS felhalmozódását és/vagy a GSH-GSSG egyensúly zavarát idézi elő (Pócsi és mtsai., 2004).

2.5.2. Ozmotikus stressz

Celluláris szinten az ozmotikus stressz hatására a sejtek vizet veszítenek, a citoplazma ion koncentrációja nő, majd a sejtek zsugorodása következik be (Liu és mtsai., 2021). A

sejtsugorodás, azaz a turgornyomás elvesztése miatt a plazmamembránfehérjék, így a mechanoszenzitív csatornák működésében következik be változás. A vízvesztés pedig a biomolekulák hidratációját befolyásolva megváltoztatja a fehérjék konformációját és működését (Tamas és mtsai., 2000). Az ozmotikus stressz tanulmányozását NaCl és szorbit alkalmazásával végeztük.

2.5.3. Nehézfém stressz

Nehézfém stressz előidézéséhez CdCl₂-ot alkalmaztunk, amely majdnem minden élőlényre toxikus hatást fejt ki, rákkeltő hatású az emlősökre és így az emberi szervezetre is. A növényeknél növekedésgátlást okoz a gyökerekben való felhalmozódásával, valamint a ciszteint tartalmazó fémkötő peptidcsoportok szintézisét (fitokelatinok) váltja ki. A lipidperoxidáció és klorofill degradáció nyomán pedig reaktív oxigén részecskék képződését okozza (Guelfi és mtsai., 2003).

A nehézfém szennyezőanyagok, így a kadmium is a gombáknál sokfajta biológiai aktivitásra van negatív hatással, úgy, mint a légzési folyamatokra, micéliális növekedésre, spóráképzésre és a csírázásra (Ramadan és mtsai., 1988). *A. niger*ben gátolta a citromsav termelést, csökkent a sejtek fehérje és DNS tartalma, míg a lipidek és poliszacharidok mennyisége növekedett. A Plaza és mtsai. (1998) által végzett, potenciálisan patogén talajlakó gombafajok kadmiumstressz melletti micéliális növekedését vizsgáló tanulmány szerint a gombák kadmiummal szembeni érzékenysége nagy változatosságot mutat.

*S. cerevisiae*ben szabadgyök „scavenger”-ként (szabadgyök-eltávolító) az N-acetilcisztein a kadmium toxikus hatását semlegesíteni képes, ezzel szemben azon mutánsok, amelyek SOD aktivitást nem mutattak vagy nem voltak képesek glutationt szintetizálni, a kadmiumra hiperszenzitivitással reagáltak. Azt is megfigyelték, hogy az oxigénhiány mellett növekedő sejtek kadmiumra rezisztenciát mutattak, azaz ez alapján elmondható, hogy az oxidatív stressz hozzájárul a kadmium toxikus hatásához *S. cerevisiae*ben (Guelfi és mtsai., 2003).

2.5.4. Sejtfal integritási stressz

A CR egy vízben oldódó diazofesték, színe pH- függő, a kék és vörös szín között mozog 3 és 5,2 közötti pH tartományban. Jellemző rá a nagy szerkezeti stabilitás és a biodegradációval szembeni rezisztencia, ennek ellenére egyes *A. niger* törzsek képesek részleges lebontásukra extracelluláris lignin - és mangán-peroxidázokkal. Antifungális aktivitását a sejtfalba történő interkalálódás útján fejt ki, ahol a kitinnel és β-1,3 glükánokkal képez komplexet. Gátolja a kitinszintézist és a kitin β-1,3 glükánhoz történő kapcsolódását. Ezek következtében a CR

morfológiai változásokat, illetve a sejtfa gyengülését idézi elő a gombákban (Lima és mtsai., 2021; Csillag és mtsai., 2023).

2.6. Szekunder metabolitok; sterigmatocisztin

A szekunder metabolitok kis molekulatömegű, jelentős kémiai változatosságot mutató vegyületek, amelyek előállítása nem esszenciálisan fontos az élőlények számára (Hajjar és mtsai., 1989). Négy fő osztályukat lehet elkülöníteni: poliketidek (PK), terpenoidok, sikiminsavból származó vegyületek és a nem-riboszómális peptidek (NRP). Emellett ezen csoportok hibridjei is előfordulnak, ilyenek például a meroterpenoidok, amelyek a PK és terpének fúziójából jönnek létre. Ezek a hibrid vegyületek is hozzájárulnak a gombák metabolomjának komplexitásához és nagyfokú variabilitásához (Klejnstrup és mtsai., 2012).

Az *Aspergillus* fajok sokfajta szekunder metabolitot, köztük mikotoxinokat is képesek szekretálni (Mousavi és mtsai., 2016, Ráduly és mtsai., 2020). Ezen mikotoxinok élelmiszer- és takarmányszennyezőkként emberi- és állategészségügyi szempontból súlyos problémákat és komoly gazdasági károkat is okoznak (Rank és mtsai., 2011). A mikotoxinok egymást követő enzimreakciók eredményeként jönnek létre számos, biokémiaailag egyszerű köztesterméken keresztül.

Az *Aspergillus* fajok a legfontosabb ismert mikotoxinok közül az aflatoxin (AF), gliotoxin, ochratoxin A termelésére képesek (Mousavi és mtsai., 2016; Ráduly és mtsai., 2020). Az *A. flavus* és *A. parasiticus* által termelt aflatoxin a komplement kötéssel és a kötött opszoninok aktivációjával történő fagocitózissal fejt ki hatását, így a toxint termelő gombafajt ellenállóbbá teszi fagocitózissal szemben (Mousavi és mtsai., 2016).

Az *A. fumigatus* által termelt gliotoxinok immunszuppresszív és citocid (sejtpusztulást okozó) hatása is van. Ezek a gomba metabolitok a konídium és hifa forma ellen hatásos fagocita funkciók károsításával fejtik ki hatásukat (Mousavi és mtsai., 2016).

A sterigmatocisztin (ST) számos fonalas gomba, így az *A. nidulans* által is termelt karcinogén, toxikus, mutagén és teratogén mikotoxin (Hajjar és mtsai., 1989). Először 1948-ban *Sterigmatocystis sp.*-ből tisztították részlegesen (Nekam és Polgar, 1948), majd 1954-ben *Aspergillus versicolor*-ból izolálták (Hatsuda és mtsai., 1954) habár szerkezetét ($C_{18}H_{12}O_6$) csak később, 1962-ben írták le (Bullock és mtsai., 1962). Az ST az AF bioszintézis intermedier terméke (Hajjar és mtsai., 1989). Az AF-nal együtt az egyszerű acetát egységek alkotta szénláncokból álló PK szekunder metabolitok közé tartozik. Habár a ST az AF-hoz viszonyítva kevésbé toxikus, azonban néhány esetben a humán sejtekre kifejtett genotoxikus hatása erősebbnek bizonyult (Yu és mtsai., 1995). Az aflatoxinoknak 150-200-szor erősebb toxikus

hatása van, optimális körülmények mellett az egyes izolátumok által nagy mennyiségben termelt ST toxikus hatása ennek ellenére meghaladhatja az aflatoxinokét (Rank és mtsai., 2011).

A szekunder metabolitok termelésében szerepet játszó gének klaszterekben helyezkednek el (Amaike és Keller, 2011). A ST termelést sok, filogenetikailag és ökológiailag különböző nemzetségből származó faj esetében kimutatták (*Aschersonia*, *Aspergillus*, *Bipolaris*, *Botryotrichum*, *Farrowia*, *Fusarium*, *Humicola*, *Monocillium*, *Penicillium*, *Podospora*). Az ST génklaszternél valószínűleg horizontális géntranszfer valósul meg a nem rokon fajok között. Az ST termelést a növekedési feltételek és a tápanyagok is befolyásolják. Az egyszerű cukrok (glükóz, szacharóz), a savas pH valamint az enyhe oxidatív stressz kedvező hatással, az ammónium ionok (szemben a nitráttal) viszont negatív hatással vannak az ST termelésére. A pH-ra vonatkozóan az előző állítással ellentétben Delgado-Virgen és mtsai. 2009-es tanulmányukban arra a megállapításra jutottak, hogy a tápközeg pH-jának növekedésével az *aflR* mester-regulátor gén (a sterigmatocisztin klaszter expressziójának szabályozásáért felelős gén) expressziója a tenyésztési idő előrehaladtával lineárisan növekedett, tehát az ST termeléshez a lúgos pH járult hozzá. Az ST bioszintézis szabályozásában az *aflR* mellett a *laeA* (szekunder metabolizmus globális szabályozója *A. nidulans*ban), *fluG*, *flbA* gének (szerepük van a G-protein/ cAMP/PKA jelátviteli útvonalakban) vesznek még részt (Rank és mtsai., 2011; Delgado-Virgen és mtsai., 2009). A szekunder metabolizmust szabályozó molekuláris mechanizmusok gyakran közreműködnek az aszexuális és szexuális folyamatok irányításában is.

Az egyik ilyen fontos szabályozási kapcsolat a VelB-VeA által alkotott heterodimer komplex, amely a sejtmagban a LaeA-val kapcsolódik össze. A VelB-VeA-LaeA heterotrimer komplexe irányítja a szekunder metabolizmust és a sötétben zajló fejlődési folyamatokat (Kim és mtsai., 2017). A magi fehérje LaeA az *A. nidulans* több szekunder metabolit génklaszterének elsőik között azonosított kromatin szintű génszabályozás regulátora, amely tartalmaz egy S-adenozilmetionin (SAM) - kötő motívumot, amely a metiláz szupercsalád minden tagjánál megtalálható (így pl.: a kromatin módosításban és az epigenetikai génszabályozásban részt vevő hiszton metiltranszferázoknál) (Kim és mtsai., 2017; Reyes-Dominguez és mtsai., 2010). A LaeA-függő szabályozást mutató szekunder metabolit génklasztereken belül található meg azok a gének, amelyek a ST bioszintézisében részt vesznek (*aflR*, *stcA-X*) (Kim és mtsai., 2017). A LaeA deléciója az ST szintézis szignifikáns csökkenését vonta maga után (Klejnstrup és mtsai., 2012).

A mikotoxin termelő fajok esetében az ST/AF génklaszterek szekvenálása nyújthat segítséget evolúciós fejlődésük megértésében (Rank és mtsai., 2011).

3. Célkitűzések

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

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

4. Anyagok és módszerek

4.1.A kísérletekhez használt törzsek

Vizsgálatainkhoz az alábbiakban felsorolt törzseket használtuk fel:

1. táblázat A vizsgálatainkhoz felhasznált törzsek

Faj/Törzs	Genotípus	Referencia
<i>A. nidulans</i> / RJMP 1.59	<i>pyrG89; pyroA4; veA⁺</i>	Shaaban és mtsai., 2010
<i>A. nidulans</i> / TNJ36.1	<i>pyrG89; pyroA4; pyrG⁺; veA⁺</i>	Kong és mtsai., 2013
<i>A. nidulans</i> / THS30.3	<i>pyrG89; pyroA⁺; veA⁺; AfupyrG⁺</i>	Emri és mtsai., 2015
<i>A. nidulans</i> Δ atfA	<i>pyrG89; ΔatfA::AfupyrG⁺; pyroA⁺; veA⁺</i>	Kocsis és mtsai., 2022
<i>A. nidulans</i> Δ atfB	<i>pyrG89; ΔatfB::AfupyrG⁺; pyroA⁺; veA⁺</i>	Kocsis és mtsai., 2022
<i>A. nidulans</i> Δ atfA Δ atfB	<i>pyrG89; pyroA4; ΔatfB::AfupyrG⁺; ΔatfA::pyroA⁺; veA⁺</i>	Kocsis és mtsai., 2022
<i>A. nidulans</i> atfAOE	<i>pyroA4; niiA(p)::atfA::pyroA3/4</i>	Kocsis és mtsai., 2022
<i>A. nidulans</i> atfBOE	<i>pyroA4; niiA(p)::atfB::pyroA3/4</i>	Kocsis és mtsai., 2022
<i>A. nidulans</i> atfAOE atfBOE	<i>pyroA4; niiA(p)::atfA::pyroA3/4; pyrG89; niiA(p)::atfB::AfupyrG</i>	Kocsis és mtsai., 2022
<i>A. nidulans</i> atfAOE Δ atfB	<i>pyroA4; niiA(p)::atfA::pyroA3/4; pyrG89; ΔatfB::AfupyrG⁺; pyroA⁺; veA⁺</i>	Kocsis és mtsai., 2022
<i>A. nidulans</i> atfBOE Δ atfA	<i>pyroA4; niiA(p)::atfB::pyroA3/4; pyrG89; ΔatfA::AfupyrG⁺; pyroA⁺; veA⁺</i>	Kocsis és mtsai., 2022
<i>A. fumigatus</i> Af293		Brookman és Denning, 2000

4.2 Az alkalmazott táptalajok és egyéb oldatok

Az *A. nidulans* törzseket 6 napig 37 °C-on minimál Barratt-féle táptalajon tenyésztettük (Barratt és mtsai., 1965). Az így begyűjtött spórákat fenotípus vizsgálatok elvégzéséhez használtuk fel.

1. Aspergillus Minimál Médium (AMM) – 1literben:

- 10 g glükóz
- 50 ml 20X NSS (nitrate salt solution = nitrátos sóoldat)
- 1 ml 1000X TES (trace element solution =nyomelemoldat)
- Szilárdításhoz 18 g agar

pH=6,5

2. 20X NSS 1 literben:

- 120 g NaNO₃
- 10,4 g KCl
- 10,4 g MgSO₄·7 H₂O
- 30,4 g KH₂PO₄

3. 1000x TES 100 ml-ben:

- 2,2 g ZnSO₄·7 H₂O
- 1,1 g H₃BO₃
- 0,5 g MnCl₂·4 H₂O
- 0,5 g FeSO₄·7 H₂O
- 0,17 g CoCl₂·6 H₂O
- 0,16 g CuSO₄·5 H₂O
- 0,15 g Na₂MoO₄·7 H₂O
- 5 g Na₂EDTA

pH=6,5

4. Az auxotróf törzsek vitaminoldata:

Piridoxin törzsoldat:

Törzsoldat: 0,01 g 100 ml desztillált vízben
→ 50 µl törzsoldat adása
100 ml tápközeghez/táptalajhoz.

uracil, uridin törzsoldat:

Törzsoldat: 5,6 g uracil és 6,1 g uridin
100 ml desztillált vízben
→2 ml törzsoldat adása 100 ml
tápközeghez/táptalajhoz

5. Represszáló (NH₄ tartalmú) tápközeg a túltermelő mutánsok ellenőrzéséhez 1 literben:

- 10 g glükóz
- 2 g ammónium-tartarát
- 20 ml 50X SS (salt solution = sóoldat)
- 1 ml 1000X TES (trace element solution =nyomelemoldat)
- Szilárdításhoz 18 g agar

pH=6,5

6. 50X SS 1 literben (represszáló tápközeg sóoldata):

- 26 g KCl
- 26 g MgSO₄·7 H₂O
- 76 g KH₂PO₄
-

7. Spóramosó folyadék 1 literben:

- 9 g NaCl
- 100 µl Tween 80

4.3. Az *atfA* és *atfB* géndeléciós és a túltermelő mutánsok elkészítése

Az *atfA* (locus ID:AN2911) és az *atfB* (locus ID: AN8643) gének **deléciójának** előállítása Double-Joint PCR módszer alkalmazásával történt (Yu és mtsai., 2004; Leiter és mtsai., 2016). Ehhez géndeléciós kazettákat hoztunk létre, tehát a deletálni kívánt géntől upstream, 5'-flanking régiónál lévő, illetve a downstream elhelyezkedő 3'-flanking régiónál lévő szekvenciák lettek fuzionálva a recipiens törzs auxotrófiáját komplementáló marker génnel. Az egyes komponensek amplifikációja specifikus és kiméra primerekkel történt, ezt követte a fentebb leírt fúziója a 3 komponensnek, majd a végső termék amplifikációja nested primerek használatával valósult meg (**2. táblázat**). A PCR-rel amplifikált fúziós termékkel közvetlenül transzformáltuk az rJMP 1.59 (dupla deléció mutánshoz) és a TNJ36.1 (csak az egyik gén deletálásához) törzseket. A deléció mutánsokat Mi-Kyung Lee készítette el (Koreai Biotudományi és Biotechnológiai Kutatóintézet (KRIBB), Biológiai Erőforrás Központ, Jeongeup-si, Koreai Köztársaság).

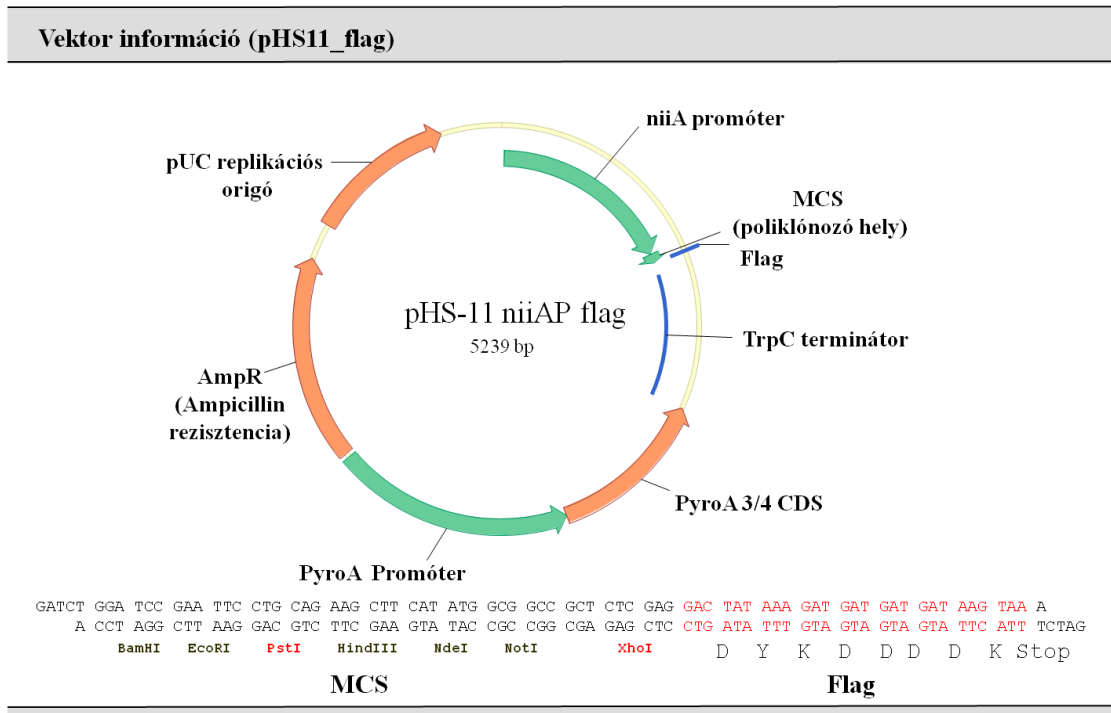
A deléciós mutánsok előállításához felhasznált primerek a következők:

2. táblázat A deléciós mutánsok elkészítéséhez felhasznált primerek

Szekvencia (5'→3')	Célszakasz
TTCGAGTGGCAATCTGATAAC	<i>atfA</i> gén 5'-flanking régiója
AATATACAGTCCAAAAAGGC	<i>atfA</i> gén 3'-flanking régiója
GCTTTGGCCTGTATCATGACTTCAAGTTCACCGGTC	5' <i>atfA AfupyrG</i> szakasszal
ATCGACCGAACCTAGGTAGGGTAAGGAATAATATCAC TTGACTAAC	3' <i>atfA AfupyrG</i> szakasszal
TCCATAAATAAACACTCCGACCA	5' nested <i>atfA</i> -ra
AACCGGGAGAGCCACAACAT	3' nested <i>atfA</i> -ra
GCTGAAGTCATGATACAGGCCAAA	5' <i>AfupyrG</i> marker
ATCGTCGGGAGGTATTGTCGTCAC	3' <i>AfupyrG</i> marker
AGTTCACCGGTCACTTCTGCAGTCGGAAT TGGCCTG	5' <i>atfA pyroA</i> szakasszal
TGGTGAGAACACATGCACAACCTGAGGAATAATATCA CTTGACTAAC	3' <i>atfA pyroA</i> szakasszal
ATCTCATGGGTGCTGTGCGAAAGG	5' <i>AnipyroA</i> marker
TTGCATCGCATAGCATTGCATTGC	3' <i>AnipyroA</i> marker
AAGCTCCTCTGTCCATCACGATG	<i>atfB</i> gén 5'-flanking régiója
GCTTTGGCCTGTATCATGACTTCACTGTTGGTTACCAAT ACTGTTCTT	5' <i>atfB AfupyrG</i> szakasszal
ATCGACCGAACCTAGGTAGGGTACGTTTATCCATTCTC TCCGGCTTC	3' <i>atfB AfupyrG</i> szakasszal
GCGTCTTGTCGTCTGCTCAGATC	<i>atfB</i> gén 3'-flanking régiója
CCAGGATGTAGTGAGTTGCAGGA	5' nested <i>atfB</i> -re
CGAAACGCACCCGCACATAAC	3' nested <i>atfB</i> -re

A **túltermelő mutánsok** előállításához a *pyroA* marker gént kódoló szekvenciájának háromnegyed részét tartalmazó pHS11 vektort használtuk (Kwon és mtsai, 2010) (**3. ábra**). Az ezzel a vektorral transzformálható recipiens törzsek pontmutáció miatt piridoxinra mutatnak auxotrófiát. Az *atfA* és *atfB* ORF régiókat az Expand Long Template PCR polimerázzal (Merck Kft.) amplifikáltuk. Az ampliconokat restrikciós enzimekkel emésztettük meg, az *atfA*-t az EcoRI és NdeI az *atfB*-t BamHI és HindIII enzimekkel a *niiA* promóter és *trpC* terminátor közé klónoztuk be (Leiter és mtsai., 2016). A piridoxin auxotrófia komplementálásához a *pyroA*-lókuszba történő beépülésre van szükség (ektopikus integrációk is bekövetkezhetnek). Az *atfA*-t vagy *atfB*-t tartalmazó plazmid a *pyroA4* helyre egyszeres rekombinációval történő beépülése megszünteti a piridoxin auxotrófiát.

A kívánt gént tartalmazó pHS11 plazmidot *Escherichia coli*-ban szaporítottuk fel, majd a tisztított plazmidban a gén jelenlétét szekvenálással is ellenőriztük. Az így létrehozott *atfAOE*-pHS11 és *atfBOE*-pHS11 plazmiddal transzformáltuk a $\Delta atfA$, $\Delta atfB$ és TNJ36.1 kontroll törzset. Az *atfAOE**atfBOE* mutáns előállításához a pHS11 vektorban, amelybe előzőleg már az *atfB* klónozása megtörtént, a *pyroA* markert lecseréltük az *A. fumigatus* *pyrG*-re. Ezzel a plazmidkonstrukttal transzformáltuk az *atfAOE* mutánst (Szewczyk és mtsai., 2006).



3. ábra Az *atfA* és *atfB* gének túltermeléséhez használt pHS11 plazmid térképe

A túltermelő mutánsok előállításához és ellenőrzéséhez felhasznált primerek a következők:

3. táblázat A túltermelő mutánsok elkészítéséhez felhasznált primerek

Szekvencia (5'→3')	Célszakasz
aagaattcATGTCTGCCGCCGTGGCTTCG	<i>atfAOE</i> EcoRI fwd
ggcatatgTCAAGTGTATGGAGGATTCGG	<i>atfAOE</i> NdeI rev
aaggatccATGACCAGCCAAACA ACTTTC	<i>atfBOE</i> BamHI fwd
ggaagcttCTAAGAAATGCTAATTTGCAGG	<i>atfBOE</i> HindIII rev
ccTTATAAtctctctgatctgcttgggtt	<i>AnipyrG</i> PsiI fwd
TTRTGCGCAYgatgtgccactaatgtaactagct	<i>AnipyrG</i> FspaI rev
GGTGACTCGTTGTGCCACACTATG	pHS11 fwd
TTGCAGATGAGCTGTATCTGGAAGAGG	pHS11 rev

4.4. Protoplaszt transzformáció PEG jelenlétében

Piridoxinnal és/vagy uracil-uridinnel kiegészített minimál táptalajon 37 °C-on inkubált tenyészetek spóráiból 2×10^8 spórárt inokuláltunk 40 ml komplex tápfolyadékba (0,5 % élesztő kivonattal kiegészített minimál tápközeg 2 % glükózzal) és 14 órán át rázattuk 120 rpm fordulatszámon 30 °C-on. A micéliumot szűrtük (Miracloth-on) steril desztillált vízzel mostuk és protoplasztáltuk. A protoplasztáló oldat elkészítéséhez 1,28 g Lallzyme MMX-et adtunk 8 ml KCl-citromsav oldathoz (8,2 g KCl és 2,1 g citromsav 100 ml desztillált vízben, pH5,8) kiegészítve 8 ml komplex tápfolyadékkal. Ezt követően 60 rpm-en 30 °C-on inkubáltuk tovább a tenyészetet 2-3 órán keresztül, közben mikroszkóppal ellenőrizve a protoplasztok képződésének állapotát. A protoplasztokat leszűrtük és 10 percig, 1800 g-n 4 °C-on centrifugáltuk. Szűrés után megismételtük ezt a lépést 10 ml 0,6 M KCl oldatot hozzáadva a protoplaszt pallethez. Ezt követően még kétszer mostuk 0,6 M KCl oldattal (2400g, 3 perc 22 °C-on történő centrifugálással gyűjtve össze a protoplasztokat). Végül 0,6 M KCl - 50 mM CaCl_2 oldatban vettük fel a protoplasztokat. 100 μl protoplaszt oldatot (2×10^6 protoplaszt) 5-8 μg DNS-sel és 50 μl PEG oldattal (4,47 g KCl, 0,74 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, 25 g PEG3350 100 ml desztillált vízben) kevertük össze, majd 25 percig jégen inkubáltuk. Ezt követően 1 ml PEG oldatot adtunk az elegyhez és 25 percig szobahőmérsékleten tovább inkubáltuk, majd szelekciós táptalajra szélesztettük, amely nem tartalmazott piridoxint és/vagy uracil-uridint emellett 0,6 M KCl-dal volt kiegészítve. A táptalajokat egy éjszakán át 30 °C-on, majd 37 °C-on inkubáltuk a transzformáns telepek megjelenéséig (Szewczyk és mtsai., 2006).

4.5. A deléciós és túltermelő mutánsok genotípusának ellenőrzése

4.5.1. Genomi DNS izolálás

A folyékony táptalajban felnövesztett, a 1,5 mL-es eppendorf cső kúpos részének megfelelő mennyiségű gombamicéliumhoz 150 µl lízis puffert (10 mM Tris-HCl, pH 7,5; 0.5M NaCl; 1% SDS) és 10 µl RNáz-t adtunk majd üveggyöngy segítségével, 30 s-ig 5000 rpm fordulatszámot alkalmazva MagNA Lyser (Roche Applied Science) sejtfeltáró készülékkel tártuk fel a micéliumokat. A mintákat ezt követően termoblokkban inkubáltuk 65 °C -on 10 percig 2 percenként vortexelve, majd 200 µl PCIA oldatot adtunk hozzájuk. 15 perc 13200 rpm-en, 4 °C centrifugálást követően, a tiszta nukleinsavat tartalmazó vizes felülúszót átmértük Eppendorf-csövekbe, majd 4/5 térfogat PCIA oldatot adtunk a mintákhoz. Újabb centrifugálás után a felülúszót átmértük tiszta Eppendorf-csövekbe és 0,54 térfogat izopropanolt adtunk hozzájuk. A kicsapódott DNS-t centrifugálással gyűjtöttük össze. A felülúszó eltávolítása után a pelletet 500 µl -20 °C-ra lehűtött 70%-os etanollal mostuk és 5 percig 13200 rpm-en centrifugáltuk. Végül a pelletekről vákuumal leszívtuk a folyadékot és 10-20 µl nukleázmentes vízben szuszpendáltuk fel. A DNS minták tisztaságát és koncentrációját NanoDrop segítségével határoztuk meg.

A túltermelő mutánsoknál a transzformálásból származó telepeket egyedi telepre oltottuk át, majd a telepeket folyékony represszáló táptalajba oltottuk be és 37 °C-on 220 rpm-en rázattuk 1-2 napig. A tenyészetekből ezt követően genomi DNS-t izoláltunk fenol-kloroform-izoamilalkoholos (PCIA) módszerrel (ld. a 4.5.1. Genomi DNS izolálás fejezetnél). Az *atfA* és *atfB* gén beépülését ezután PCR-rel (EmeraldAmp MAX PCR polimeráz, Takarabio) ellenőriztük a pHS11 fwd és rev primerpárral (**3. táblázat**), amely a pHS11 vektorban a *niiA* promóter és *trpC* terminátor régióhoz kötődik (**3. ábra**)

Emerald PCR reakció összetétele (25 µl):

- 12,5 µl EmeraldMix
- 1 µl pHS11fwd (10 pmol/µl)
- 1 µl pHS11rev (10 pmol/µl)
- 1 µl gDNS
- 9,5 µl ddH₂O

PCR reakció:

98 °C 10 másodperc
68 °C 2 perc
ismétlés: 30x

Azon klónokból, amelyeknél PCR-rel sikerült kimutatni az *atfA* és/vagy *atfB* gének jelenlétét a gének túltermelődését is ellenőriztük RT-qPCR módszerrel (ld. a 4.5.3 RT-qPCR-rel az *atfA* és

atfB gének túltermelésének ellenőrzése és az *abaA* gén expressziójának meghatározása c. fejezetnél) (Király és mtsai., 2020b).

4.5.2. RNS izolálás

A micélium- és spóraminták felületi tenyészetait (spórából 1 Petri-csészéről $\sim 5 \times 10^9$), micéliumnál (4 db Petri-csészéről) jégen gyűjtöttük össze az RNS degradálódásának elkerülése miatt. A Petri-csészék szilárd tenyészetéről a micélium- és spóramintákat jégen gyűjtöttük össze az RNS degradálódásának elkerülése miatt. Ezután 500 μ l TRIzol reagenst mértünk hozzájuk, majd 30 s-ig 5000 rpm fordulatszámot alkalmazva üveggyönggyel MagNA Lyser (Roche Applied Science) sejtfeltárási készülékkel tártuk fel a mintákat.

5 percig szobahőmérsékleten állni hagytuk, majd 200 μ l kloroformot adtunk a mintákhoz.

15 másodperc intenzív keverés után 3 percig szobahőmérsékleten inkubáltunk. 15 perc 10000 rpm-en 4 °C-on történő centrifugálás után a felülúszókat óvatosan, az interfázis megzavarása nélkül átmértük tiszta Eppendorf-csövekbe. Kb 500 μ l vizes fázishoz ugyanannyi 500 μ l izopropanolt mértünk.

Óvatos keverés után 10 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk majd 10 percig 10000 rpm-en 4 °C-on centrifugálva gyűjtöttük össze a pelletet. A felülúszó eltávolítása után 500 μ l -20 °C-ra lehűtött 70%-os etanollal történt a pellet mosása. Ezt 8800 rpm-en 5 percig 4 °C-on történő centrifugálási lépés követett. Az etanol vákuumos eltávolítása után 20-40 μ l dietil-pirokarbonáttal (DEPC) kezelt vízben szuszpendáltuk fel a pelleteket majd 68 °C-on 5 percig inkubáltuk (Chomczynski, 1993).

Az RNS minták tisztaságát és koncentrációját NanoDrop segítségével határoztuk meg. A minták minőségének ellenőrzése denaturáló agaróz gélelektroforézissel történt.

Az agaróz gél az alábbi komponensekből tevődött össze:

1. 1 % (w/v) agaróz,
2. 10 % (v/v) 10x MOPS-EDTA oldat (200 mmol/l MOPS, 50 mmol/l nátrium-acetát, 10 mmol/l EDTA, pH 7,0.)
3. 0,002 % (v/v) etídium-bromid (10 mg/ml)
4. és 5 % (v/v) formaldehid.

Futtatáshoz 20 μ l mintát (4 μ g RNS) 5 μ l 25 mmol/l EDTA-t és 10 g/l SDS-t tartalmazó oldattal valamint 25 μ l mintafelvívő pufferrel (RNA loading buffer, Fermentas) kevertük össze és mintafelvitel előtt 10 percig 68 °C-on inkubáltuk. Futtatópufferként az 1x MOPS-EDTA oldatot használtuk 80 V feszültség mellett.

4.5.3. RT-qPCR-rel az *atfA* és *atfB* gének túltermelésének ellenőrzése és az *abaA* gén expressziójának meghatározása

A túltermelő mutánsokat represszálo (ammónium ion tartalmú) és indukciós (nitrát tartalmú) tápfolyadékba (ld. a 4.2 Az alkalmazott táptalajok és egyéb oldatok c. résznél) inokuláltuk és 30-40 órán át 37 °C-on 220 rpm-en rázattuk, majd a micéliumokból RNS-t izoláltunk (ld. a 4.5.2. RNS izolálás résznél).

Egy lépéses real-time RT-qPCR módszert alkalmaztunk (Emri és mtsai., 2015), a méréseket LightCycler® 480 készüléken végezve:

RT-qPCR összetétele 20 µl:

- 5 µl RNS minta (500 nanogram) (DNáz kezelve)
- 10 µl SYBR Green enzim mix
- 0,8 µl primer forward
- 0,8 µl primer reverz
- 2,4 µl ddH₂O
- 1 µl RTáz

PCR reakció:

1. 45 °C, 10 perc
 2. 95 °C, 2 perc
 3. denaturálás: 95 °C, 5 sec
 4. hibridizáció: 51 °C, 10 sec
 5. lánchosszabítás: 65 °C, 20 sec
 6. 95 °C, 15 sec
 7. 50 °C, 15 sec
 8. 95 °C, 2 perc
 9. 37 °C, 1 sec
- } 40x

Az *atfA* és *atfB* gén transzkripciójának vizsgálatához normalizációra a γ -aktin (locus ID: AN6542, *actA*) háztartási (housekeeping) gén transzkripcióját is lemértük az RT-qPCR reakciók során (**4. táblázat**).

A konidiofórok fejlődését szabályozó *abaA* gén (locus ID: AN0422) expresszióját is meghatároztuk. Ehhez 6 napos 37 °C-on minimál táptalajon inkubált tenyészetek spóráiból 2×10^7 /ml spórakoncentrációval, 5 µl (100.000 spóra) spóraszuszpenziót pontinokuláltuk szilárd AMM táptalajra, 5 napig 37 °C-on inkubáltuk. A tenyészetekből RNS izolálást végeztünk. A kontroll THS30.3 törzsnél, illetve a $\Delta atfB$ és *atfBOE* mutánsoknál az RT-qPCR mérések kivitelezésében az *abaA* gén expressziójának meghatározására Dr. Batta Gyula a Debreceni Egyetem, Természettudományi és Technológiai Kar, Biotechnológiai Intézet, Genetikai és Alkalmazott Mikrobiológiai Tanszékének munkatársa nyújtott segítséget, majd elvégeztük az összegyűjtött adatok kiértékelését.

Az RT-qPCR termékek homogenitásának megállapítására olvadáspont analízist használtunk.

A következő oligonukleotid PCR primereket (IDT) használtuk:

4. táblázat Az RT-qPCR-hez felhasznált primerek

Gén	Forward primer	Reverz primer
<i>atfA</i>	ACTACTCCCCCTGCCTTATC	AAGCCCCTTCCGATACTGTC
<i>atfB</i>	GCCCTCTTTCTCATCCTT	TCCGTCTCTCGCTTCTTC
<i>actA</i>	GAAGTCCTACGAACTGCCTGATG	AAGAACGCTGGGCTGGAA
<i>abaA</i> (AN0422)	GAAGCGAAGGACCAGGAAAC	GCGTGAGTGCCGTAGTGAC

4.6. Stresszérzékenységi vizsgálatok

a) Stresszkísérletek stresszt generáló anyagokkal:

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

A következő stresszt okozó ágenseket használtuk a stresszkísérletekhez:

<u>Oxidatív stressz:</u>	2 mM diamid 0,08 mM MSB (Menadion- nátrium-biszulfit) 0,8 mM <i>t</i> BOOH (<i>terc</i> -butil-hidroperoxid)
<u>Ozmotikus stressz:</u>	1,5 M NaCl 2 M szorbit
<u>Nehézfém stressz:</u>	300 µM CdCl ₂
<u>Sejtfal integritás stressz:</u>	54 µM Kongóvörös

b) Hősokkal végzett stresszkísérletek:

6 napos 37 °C-on minimál táptalajon növesztett tenyészetek spóráiból 10^5 /ml koncentrációjú spóraszuszpenziót 50 °C-on inkubáltuk 10 percig. Ezután a hősokkolt és a nem-hősokkolt spórákat tartalmazó oldatokat is 10^2 /100 µl-re hígítottuk és minimál tápközegre szélesztettük ki. 2 napig, 37 °C-on történő tenyésztés után megszámloltuk a telepeket, referenciaként a hőkezelés nélküli telepszámot használtuk (Hagiwara és mtsai., 2008, 2009).

4.7. Az ivaros és ivartalan szaporodás vizsgálata

a) Ivaros szaporodás vizsgálata:

Az ivaros szaporodás vizsgálatokban kleisztotécium képzést indukáltunk 6 napos 37 °C-on inkubált tenyészetek spóráiból 10^5 spórát szélesztettünk ki minimál tápagarra és 37 °C-on inkubáltuk. 24 óra után a Petri csészéket parafilmmel légmentesen lezártuk, majd a törzseket tovább inkubáltuk 37 °C-on sötétben. Sztereomikroszkóp segítségével a Petri-csészéken megszámoltuk az érett kleisztotéciumokat és a területre (cm^2 -re) normálva meghatároztuk a mennyiségüket (Leiter és mtsai., 2016).

b) Ivartalan szaporodás vizsgálata:

A mutáns, valamint kontroll törzsek konidiospóra képzésének tanulmányozására 10^5 koncentrációjú spóraszuszpenziót pontinokuláltunk minimál táptalajra, majd 37 °C-on növesztettük a telepeket 5 napig. A spórákat 3 ml spóramosó folyadékban, a teljes telep lemosásával összegyűjtöttük, Bürker-kamra alatt leszámoltuk és cm^2 -re vonatkoztatva meghatároztuk a konidióspórák mennyiségét (Vargas-Pérez és mtsai., 2007).

c) A konidióspórák méretének meghatározása:

$5 \times 10^5 / 100 \mu\text{l}$ spóraszuszpenziót szélesztettünk ki a fénymikroszkópos vagy $10^5 / 5 \mu\text{l}$ spórát pontinokuláltunk a scanning elektronmikroszkópos felvételek elkészítéséhez. 5 nap 37 °C-on történő inkubációt alkalmaztunk. A kiszélesztett tenyészetről a ToupView képfeldolgozó szoftverrel Bürker-kamra alatt mikroszkópos felvételeket készítettünk és az így kapott képeken a spóraátmérők bejelölése után (50-50 db spóra átmérőjével számolva a mutáns és kontroll törzseknél egyaránt) a Bürker kamra ismert hosszúságú rácsvonalaihoz viszonyítva meghatároztuk a spórák méretét. A pontinokulált telepeket a pásztázó elektronmikroszkópos felvételek elkészítéséhez növekvő koncentrációjú etanollal dehidratáltuk, 30, 50, 75, 90, 100% etanollal kezelve 15 perces óvatos rázatásokkal. A mintákat ezután aranybevonattal láttuk el, majd elkészítettük a felvételeket (Hitachi S 4300, Schaumburg, United States) (Springer és Yanofsky, 1989). Az elektronmikroszkópos felvételeket Dr. Daróczy Lajos a Debreceni Egyetem, Természettudományi és Technológiai Kar, Fizikai Intézet, Szilárdtest Fizikai Tanszékének munkatársa készítette.

4.7. Sterigmatocisztin termelés meghatározása

Az egyes mutánsok sterigmatocisztin termelési képességét 5 napos 37 °C-on inkubált pontinokulált tenyészetek esetében határoztuk meg (Yin és mtsai., 2013). A tenyészetekből egyenlő nagyságú (2 cm²) darabokat vágunk ki, majd 800 µl 70% (v/v) acetonnal extraháltuk, ezután 13200 rpm-en 10 percig, 4°C-on centrifugáltuk. A metabolitok szétválasztását először vékonyréteg kromatográfiával végeztük, a felülúszóból 25 µl-t futtatva szilikagél bevonatú lemezen. A futtatópuffer toluol: etil-acetát: jégecet=8:1:1 arányú elegye volt. A vékonyréteg lemezeket 1% w/v AlCl₃ etanolos oldatával fújtuk le, szabad levegőn történő száradásuk után a ST-t 366 nm hullámhosszú UV fényforrással megvilágítva vizualizáltuk, illetve fényképeket készítettünk.

Emellett HPLC mérésekkel is meghatároztuk ezen mikotoxin termelésének mértékét. Az injektálási térfogat 10 µl volt. Az alkalmazott HPLC rendszer, a Waters 2,695 szeparációs modul volt, amely egy termosztálható (5 °C-os) mintaadagolóval és oszloppal (35 °C) felszerelt kromatográfiás rendszer. Az UV detektálás Waters 2,996 fotodióda detektor (254 nm) alkalmazásával, az elválasztás Agilent Zorbax SB-C18-as oszloppal történt (4.6 mm × 75 mm, 3.5 µm szemcseméret) 1 ml/perc áramlási sebességgel. Az analízis során izokratikus elúciót használtunk. A használt mobilfázis metanol:acetonitril:víz = 50:15:35 arányú elegye volt (Yin és mtsai., 2013). A méréseket Dr. Nagy Tibor a Debreceni Egyetem, Természettudományi és Technológiai Kar, Kémiai Intézet, Alkalmazott Kémiai Tanszékének munkatársa végezte.

4.8. RNS szekvenálás

Az újgenerációs RNS szekvenálás segítségével a deléciós mutánsok, a *ΔatfA*, *ΔatfB*, *ΔatfAΔatfB* valamint a kontroll törzs (THS 30.3) transzkriptomikai tanulmányozását valósítottuk meg.

6 napos 37 °C-on inkubált tenyészetekről 10⁵/100 µl spórát szélesztettünk ki 0,04 mM koncentrációjú MSB-vel kiegészített valamint stresszort nem tartalmazó minimál tápagarra, ezután 37 °C-on inkubáltuk a tenyészeteket.

A minták begyűjtése különböző időpontokban történt:

1. Micéliumok begyűjtése: 20-33 óra inkubálási idő elteltével történt gyűjtésük a konídiofórok megjelenése előtt (ezen minták könnyebb begyűjtése érdekében a tápagar felszínére celofánt tettünk). A tanulmányozott deléciós mutánsoknál a mutáció lassította a növekedést, amit az alkalmazott MSB kezelés, illetve valószínűleg a médiumhoz adott agar (VWR Kft) tovább lassított. Ezzel indokolható, hogy *A. nidulans*-nál a 14-16. órában megjelenő konídiofórok képződése a deléciós mutánsoknál és a kontroll törzsben sem következett még be

a micéliumok begyűjtésének időpontjában. A tenyészeteket mikroszkópos ellenőrzéssel folyamatosan monitoroztuk, hogy a begyűjtött micéliumok konidiofórt egyáltalán ne tartalmazzanak (Pontecorvo és mtsai., 1953; Kocsis és mtsai., 2023).

1. Konidiospórák lemosása: 3 nap tenyésztést követően történt a spórák begyűjtése. A vegetatív hifáktól való elválasztás 1600 rpm, 4 °C-on, 4 perc centrifugálással történt, ezt háromszor ismételve valamint Miracloth szűrőn is átszűrve (Kocsis és mtsai., 2023).

A mintákból teljes RNS izolálást végeztünk (Chomczynski, 1993; Kocsis és mtsai., 2023), (ld. a 4.5.2. RNS izolálás részénél).

A Debreceni Egyetem Genomi Medicina és Bioinformatikai Szolgáltató Laboratóriumában Illumina NextSeq500 készülékkel végezték az újgenerációs RNS szekvenálást, a könyvtárkészítést és a fastq.gz file előállítását. A könyvtárkészítés TruSeq RNA Sample Preparation Kit (Illumina) segítségével történt a gyártó által előírt protokoll szerint. A minták szekvenálása Illumina HiScan SQ (San Diego, CA, USA) készülékkel 75 bp-os szekvencia leolvasással valósult meg. A micéliumból izolált RNS mintáknál 14-39 millió, a konidiospórákból izoláltaknál 10-28 millió szekvencia („read”) leolvasást készítettünk. A leolvasási adatokat az *A. nidulans* FGSC A4 referenciagenomra (http://www.aspergillusgenome.org/download/sequence/A_nidulans_FGSC_A4/current//A_nidulans_FGSC_A4_version_s10-m04-r14_chromosomes.fasta.gz) illesztettük az alábbi gff3 file felhasználásával: http://www.aspergillusgenome.org/download/gff/A_nidulans_FGSC_A4/A_nidulans_FGSC_A4_version_s10-m04-r14_features_with_chromosome_sequences.gff.gz. Az illesztés a hisat2 (2.1.0 verzió) (Kim és mtsai., 2015) programmal történt. A referencia genomra sikeresen illesztett szekvenciák aránya a micéliumból nyert mintáknál 77-96%, a konidiospóráknál 78-94% között változott. A differenciáltan expresszáldó gének meghatározását a hisat2 (2.1.0) és a DESeq2 (1.24.0 verzió) statisztikai programmal (Love és mtsai., 2014) Dr. Antal Károly (Eszterházy Károly Egyetem, Állattani Tanszék) végezte. Az analízis annak figyelembe vételével történt, hogy a konidiumból izolált RNS minták két különböző kísérletből származtak. A gének transzkripció aktivitásának bemutatására az RPKM értékkel (Reads Per Kilobase of gene model per Million mapped reads) jellemzett expressziós szinteket (Robinson és mtsai., 2010) használtuk (Kocsis és mtsai., 2023).

$$\text{RPKM} = \frac{\text{leolvasott readek száma (egy vizsgált génre)}}{\text{vizsgált gén hossza (kb)} * \text{a vizsgált minta összes leolvasási száma}}$$

4.8.1. A transzkriptomikai adatok elemzése

A transzkriptomikai adatok csoportosítása 3 különböző szempont szerint történt:

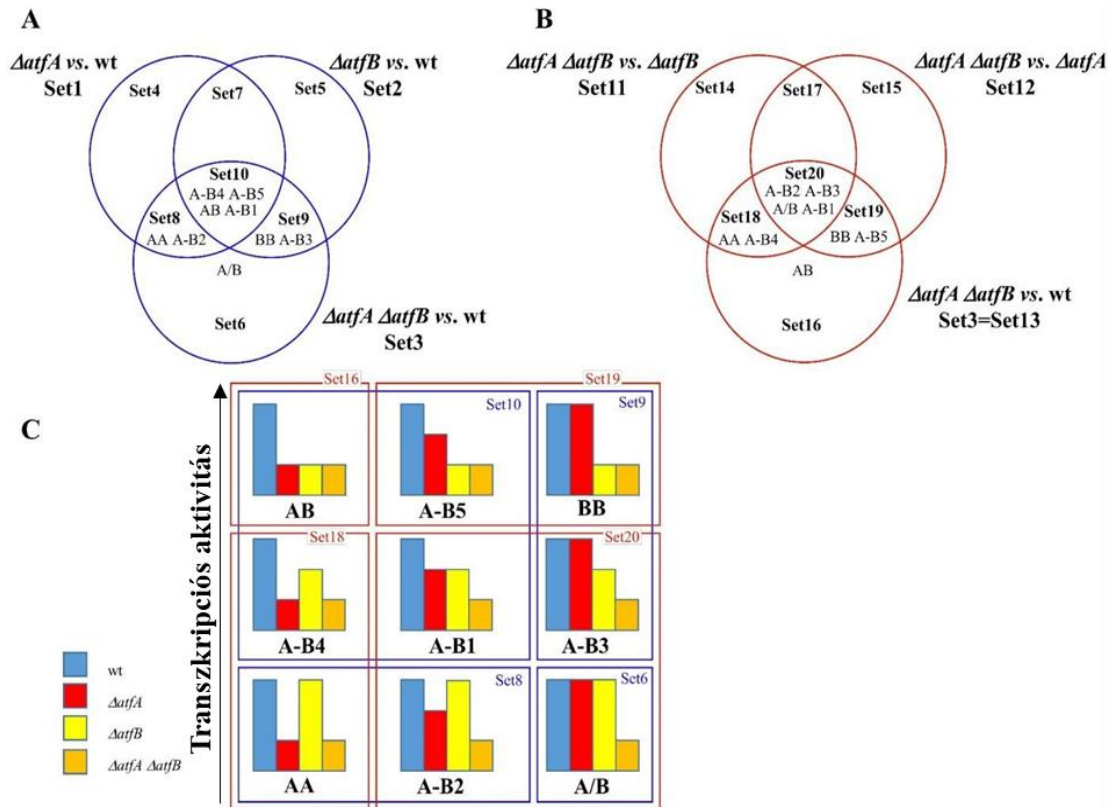
- 1) vizsgált törzs (kontroll, $\Delta atfA$, $\Delta atfB$, $\Delta atfA\Delta atfB$)
- 2) kezelés (nem kezelt valamint a 0,04 mM MSB kezelt minták)
- 3) illetve a fejlődési állapot (micélium vagy spóra).

A túltermelő és a represszáló géneket differenciáltan expresszáló génekként (DEG) határoztuk meg, ahol a transzkriptomok, amelyek között csak egy tulajdonságbeli eltérés volt jellemző (A_{törzs, kezelés, sejttípus} és a B_{törzs, kezelés, sejttípus} összehasonlítása) valamint a log₂FC értékek lettek összehasonlítva egymással. A DESeq2 szoftver segítségével számítottuk ki a log₂FC értékeket (a log₂FC > 1 vagy log₂FC < -1-nek adódott), amely logaritmus skálán azt mutatja meg 2 minta összehasonlításakor, hogy az egyik mintában a vizsgált gén hányszor nagyobb aktivitást mutat a másik minta megfelelő génjéhez viszonyítva. A log₂FC értékek segítségével történt azon DEG-ek kiválasztása, amelyek aktivitásában biológiailag is jelentős változás következett be. Mivel a micéliumok és a konidiospórák transzkriptom analízise, valamint a szekvenálások nem egyszerre történtek, illetve mivel a minták begyűjtése nem azonos időben történt, ezért a két fejlődési stádium transzkriptomjait nem hasonlítottuk össze. A transzkriptomikai adatok kiértékelését Dr. Antal Károly (Eszterházy Károly Egyetem, Állattani Tanszék) és Prof. Dr. Emri Tamás (Debreceni Egyetem Természettudományi és Technológiai Kar, Molekuláris Biotechnológiai és Mikrobiológiai Tanszék valamint a HUN-REN-DE Gomba Stresszbiológiai Kutatócsoport munkatársa) végezték (Kocsis és mtsai., 2023).

Az adatok kiértékeléséhez a gének alábbi kategóriáit hoztuk létre (4. ábra):

1. AA gének: csak az *atfA* gén szabályoz.
2. BB gének: csak az *atfB* gén szabályoz.
3. AB gének: mindkét gén (*atfA* és *atfB*) együttesen szükséges a gén normális működéséhez.
4. A/B gének: mindkét gén együttes szabályozása érvényesül, a hiányzó TF-t a másik TF teljesen helyettesíteni tudja.
5. A-B gének: mindkét gén együttes szabályozása érvényesül, de a hiányzó TF-t a másik csak részben tudja helyettesíteni.

A micélium és konidiospórák transzkriptomikai adatai alapján a géneket a Függelék 5. táblázata szerinti géncsoportokba soroltuk be: Set1-27⁺ számozással a túltermelőést mutató géncsoportok szerepelnek (Kocsis és mtsai., 2023).



4. ábra A lehetséges AtfA és AtfB-függő gének azonosítása. (A, B): A feltételezhetően AtfA- és AtfB-függő gének összehasonlításai és a létrehozott géncsoportok. (C): A gének feltételezett transzkripciós mintázata a jelölt alcsoportokban. A kék (kontroll), piros ($\Delta atfA$), sárga ($\Delta atfB$) és narancssárga ($\Delta atfA \Delta atfB$) oszlopok mutatják a szignifikánsan különböző transzkripciós aktivitással rendelkező géneket az egyes törzsek esetében.

4.8.2. Géncsoport dúsulás vizsgálat (Gene Set Enrichment Analysis = GSEA)

A bioinformatikai módszerekkel megvalósuló géncsoport dúsulás vizsgálatokban a géneket a közöttük lévő expressziós különbségek korrelációjával lehet rangsorolni. A rangsor magában foglalja a legnagyobb és a legkisebb expressziót mutató géneket is (Subramanian és mtsai., 2005).

Az AtfA-és AtfB-függő géncsoportokat az alábbi csoportok összehasonlításával határoztuk meg a tenyésztési körülmények (kezeletlen és MSB kezelt) és a fejlődési stádium (micélium és konídium) figyelembevételével:

- a $\Delta atfA$ -t a vad típussal illetve a $\Delta atfA \Delta atfB$ dupla deléziós mutánt a $\Delta atfB$ -vel valamint
- a $\Delta atfB$ -t a vad típussal illetve a $\Delta atfA \Delta atfB$ -t dupla deléziós mutánt a $\Delta atfA$ -val hasonlítottuk össze.

Az AtfA-és AtfB-függő géncsoportokat GSEA módszerrel analizáltuk a továbbiakban, a “Functional Catalogue” (FunCat), “Gene Ontology” (GO) és “Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes pathway” (KEGG pathway) adatbázisok és a FungiFun2 package

(<https://elbe.hki-jena.de/fungifun/fungifun.php>) szoftver segítségével. Az eredményeket a $p < 0,05$ értékek esetén tekintettük szignifikánsnak (Kocsis és mtsai., 2023).

Az alábbiakban felsorolt AtfA-és AtfB-függő géncsoportokat a Fisher-féle egzakt teszttel, az R project szoftverrel („fisher.test”; www.R-project.org/) is megvizsgáltuk:

- 1) Laktóz hasznosításért felelős gének: idetartoznak a galaktóz lebontás Leloir és oxidoreduktív (Christensen és mtsai., 2011) útvonala, valamint a feltételezett β -galaktozidáz és laktóz permeáz kódoló gének (Fekete és mtsai., 2012, 2016; Gila és mtsai., 2022).
- 2) Antioxidáns enzimet kódoló gének: ismert vagy feltételezett szuperoxid-dizmutázok, katalázok, peroxidázok és a glutation/glutaredoxin/tioredoxin redox rendszer génjei tartoznak ide (Gila és mtsai., 2021).
- 3) Glikolízis gének: az oxidatív pentóz-foszfát útvonal, a ribóz metabolizmus és a TCA (trikarbonsav ciklus vagy citrátkör) génjei, Flipphi és mtsai. (2009) által jellemzett gének.
- 4) Szénhidrát aktív enzimeket kódoló gének (CAZyme, Carbohydrate Active Enzymes), a Carbohydrate active Enzymes adatbázisból kigyűjtött gének (<http://www.cazy.org>), továbbá a foszforelé választ, a vas-kén klaszterek összeszerelését, illetve a légzést szabályozó gének, valamint a transzkripció faktor gének tartoznak ide. Ezen csoportokat a kapcsolódó GO terminológia alapján hozták létre (Gila és mtsai., 2021, 2022)
- 5) Szekunder metabolit génklaszter gének: irodalmi adatok alapján vagy kísérletes úton összegyűjtött gének (Inglis és mtsai., 2013), a géncsoport dúsulás vizsgálatokat az egyes klaszterek esetében külön-külön végezték el (Kocsis és mtsai., 2023).

4.9. A kísérletek stasztikai kiértékelése

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

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

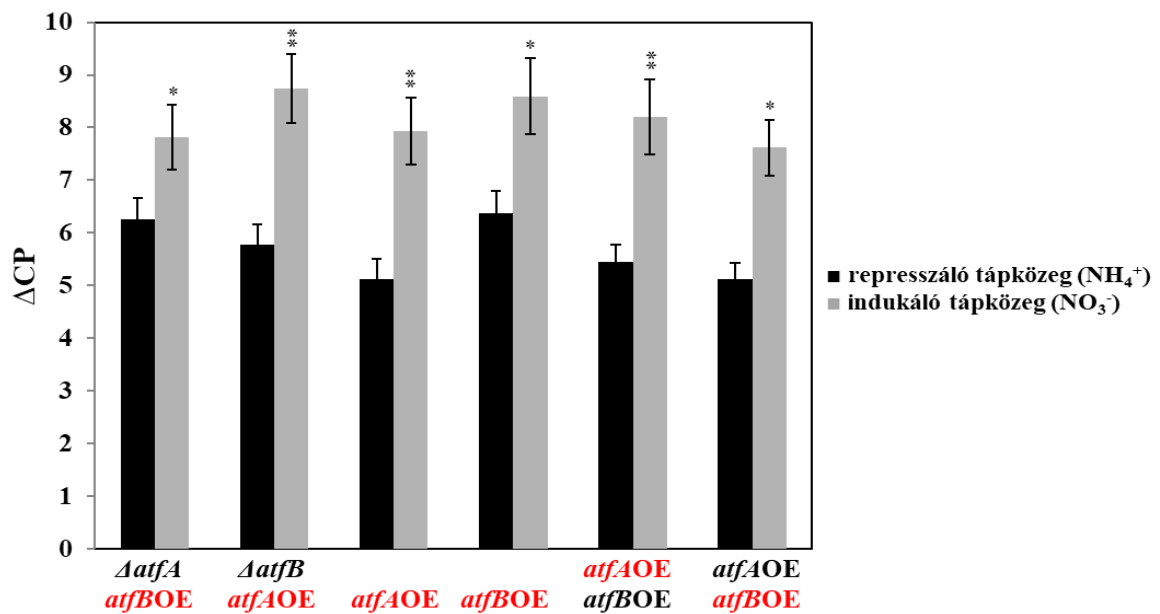
4.10. Felhasznált vegyszerek

Kísérleteinkhez a Merck Kft. és a VWR Kft analitikai tisztaságú vegyszereit használtuk.

5. Eredmények

5.1. Az *atfA* és *atfB* gének túltermelésének ellenőrzése RT-qPCR-rel

A vizsgált gének relatív transzkripciós szintjeit az indukáló (nitrátot tartalmazó) és represszáló táptalajon történő tenyésztés során mért expressziós szintek összehasonlításával határoztuk meg. A fenotípus vizsgálatokat a nitrát mellett megnövekedett génexpressziót mutató mutánsokkal végeztük el (5. ábra).



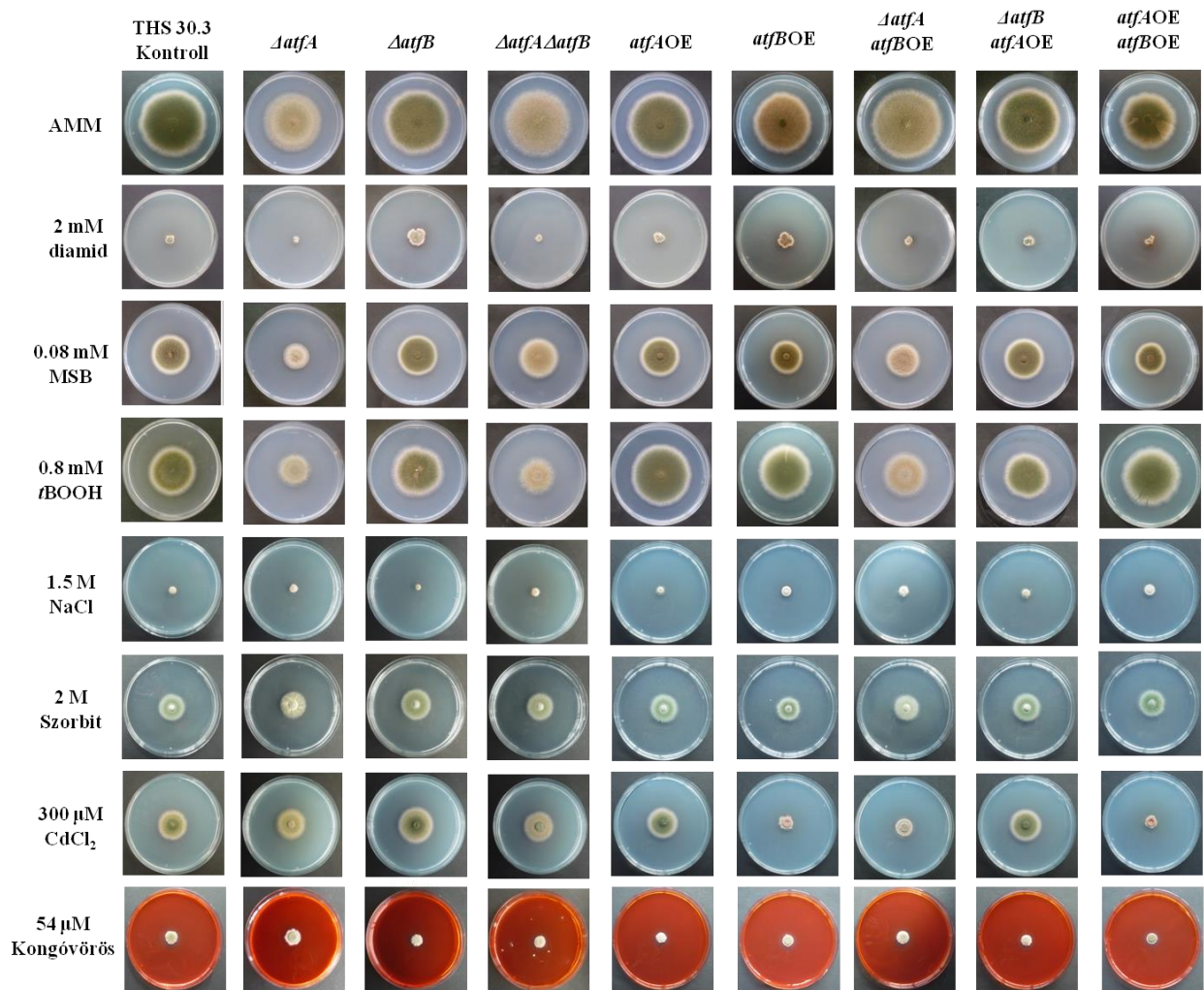
5. ábra Az *atfA* és *atfB* gének relatív expressziós szintjei indukáló és represszáló körülmények között. Az ábrán három független mérés átlaga és szórása lett feltüntetve. A relatív expressziós szinteket ΔC_P módszerrel határoztuk meg. A referenciagén az *actA* gén (locus ID: AN6542) volt. Student-féle t-teszt: * $p < 5\%$, ** $p < 1\%$. A pirossal jelzett gének voltak a tesztelt gének.

5.2. Stresszérzékenységi vizsgálatok

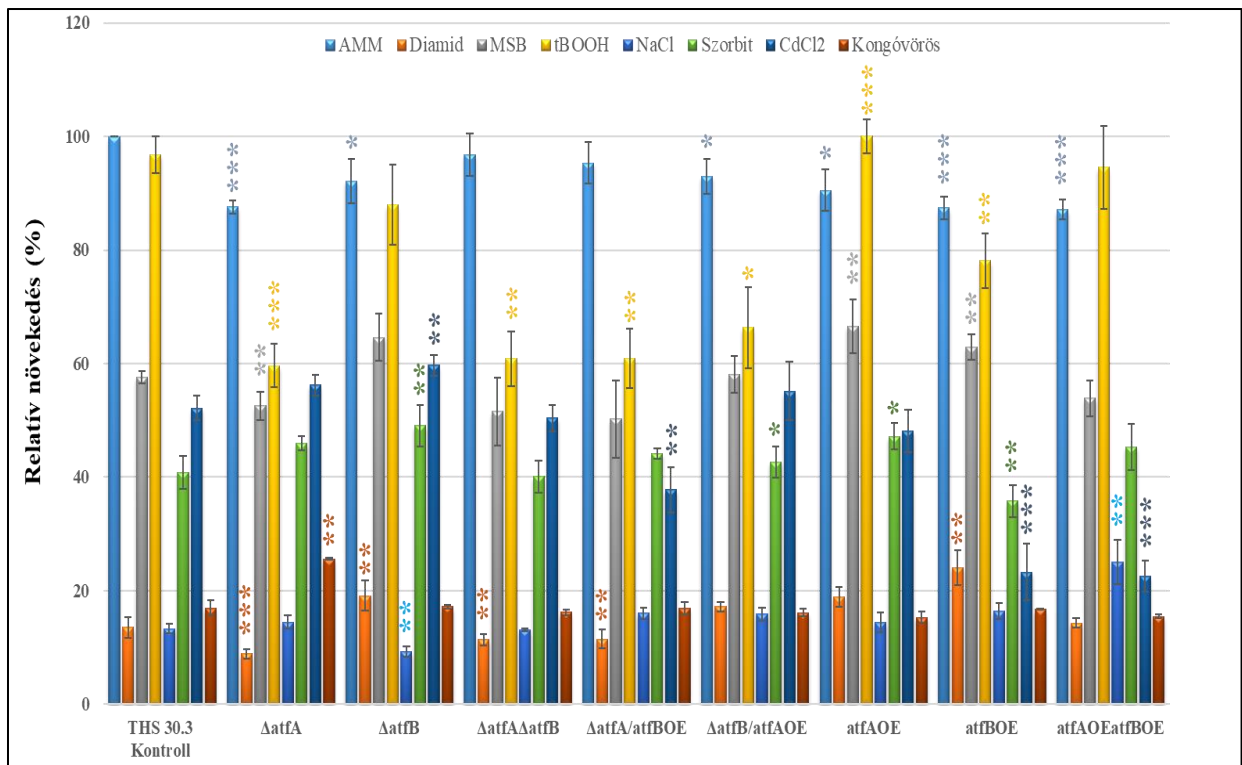
A *atfA* és *atfB* mutánsok és a kontroll THS 30.3 törzs stresszérzékenységének meghatározását különböző stresszt kiváltó ágensekkel kiegészített minimál táptalajon végeztük. Az oxidatív stressz tesztelésére három stresszor, a diamid, az MSB és a tBOOH hatását vizsgáltuk. Az ozmotikus stressz kiváltásához NaCl-ot és szorbitot alkalmaztunk. A nehézfém stresszt CdCl₂-dal, a sejtfal integritás stresszt Kongóvörössel idéztük elő. A diamidot 2 mM, MSB-t 0,08 mM, tBOOH-t 0,8 mM, NaCl-ot 1,5 M, szorbitot 2 M, CdCl₂-ot 300 μM, a Kongóvöröst 54 μM végkoncentrációban adtuk hozzá a táptalajhoz (6. ábra).

Az alábbi stresszválasz fenotípusokat tapasztaltuk a kísérletek során (6. ábra):

- 1) A $\Delta atfA$, *atfBOE* és az *atfAOEatfBOE* törzsek esetében a kontroll törzshöz képest kisebb telepátmérő volt jellemző, tehát csökkent növekedést mutattak minimál médiumon 37 °C-on, stresszort nem tartalmazó táptalajon.
- 2) A $\Delta atfA$, $\Delta atfA\Delta atfB$, $\Delta atfAatfBOE$ mutánsok az oxidatív stresszt indukáló diamidra érzékenységet mutattak, míg a $\Delta atfB$ és az *atfBOE* mutánsok toleranciája diamiddal szemben növekedett.
- 3) MSB-vel szemben csak a $\Delta atfA$ mutáns mutatott érzékenységet, amelyet az *atfB* túltermelése kompenzálni tudott a $\Delta atfAatfBOE$ -nél. Az *atfAOE* és *atfBOE* jobban növekedett MSB jelenlétében, mint a kontroll.
- 4) Az *atfAOE* mutáns tBOOH toleranciája növekedett. Ezzel szemben a $\Delta atfA$ törzs a telepátmérő kontrollhoz viszonyított körülbelül 50%-os csökkenésével érzékenynek bizonyult ezen stresszorra. A $\Delta atfA\Delta atfB$ és $\Delta atfAatfBOE$ szintén érzékenységet mutatott, ami valószínűleg az *atfA* deléciójával magyarázható.
- 5) Az ozmotikus stresszt okozó NaCl-dal szemben érzékenynek a $\Delta atfB$ mutáns bizonyult, ezzel szemben NaCl jelenlétében toleranciát az *atfAOEatfBOE* mutatott.
- 6) A $\Delta atfB$ mutánsnál míg a NaCl ozmotikus stresszérzékenységet okozott, ezzel ellentétben a szorbitot ez a mutáns tolerálta a legjobban. Az *atfBOE* törzs viszont a legérzékenyebbnek mutatkozott szorbittal szemben.
- 7) A CdCl₂-dal végzett nehézfémstresszel szemben a $\Delta atfAatfBOE$ mutáns enyhe érzékenységet mutatott. Az *atfBOE* és az *atfAOEatfBOE* törzseknél viszont CdCl₂- érzékeny fenotípus volt tapasztalható, mivel a telepátmérő esetükben körülbelül a felére csökkent a kontroll törzshöz képest. A $\Delta atfB$ nehézfém stresszre mérsékelt toleranciát mutatott.
- 8) A sejtfal integritás stresszt okozó Kongóvörössel szemben egyedül a $\Delta atfA$ törzs mutatott fenotípus változást a kontrollhoz képest, mérsékelt toleranciát tapasztaltunk.



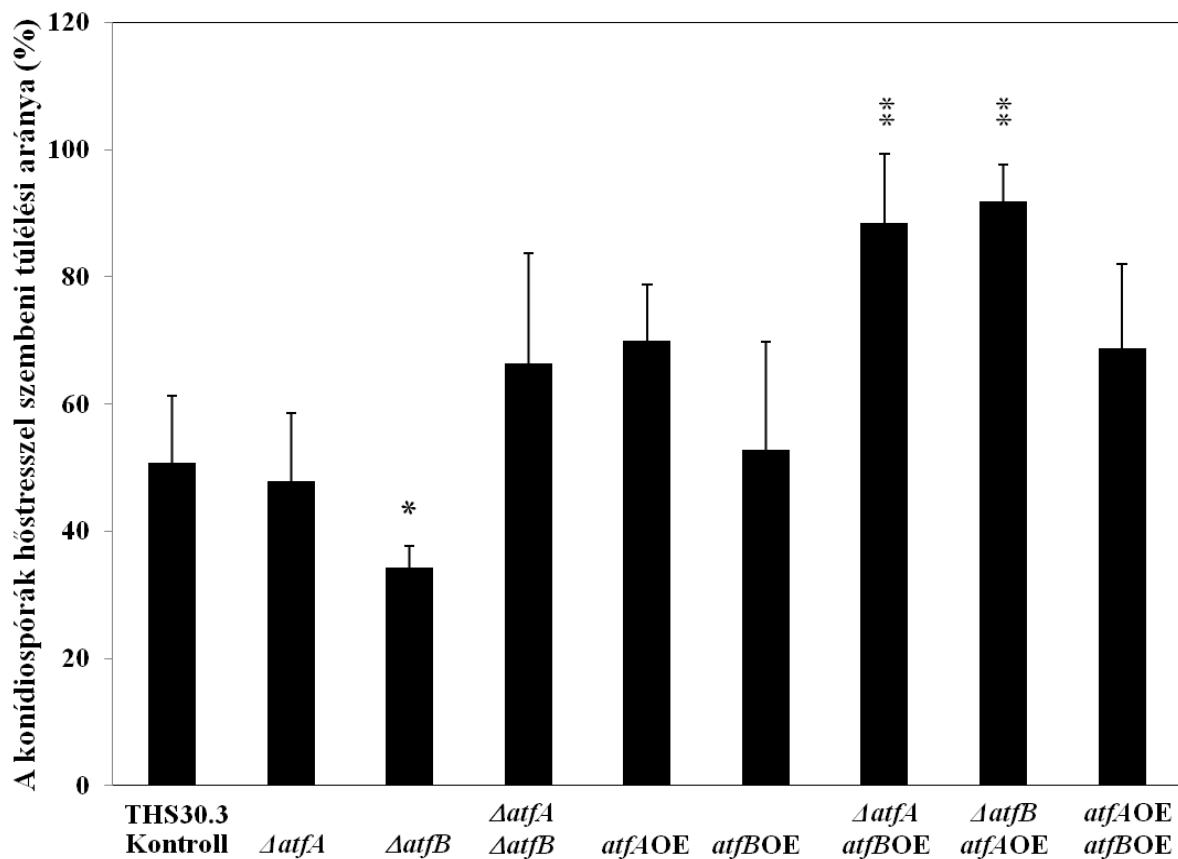
6A. ábra A kontroll (THS30.3) és az *atfA* és *atfB* deléciós és túltermelő mutánsok stresszérzékenységének vizsgálata. Oxidatív, ozmotikus, nehézfém vagy sejtfal integritás stresszt okozó anyaggal kiegészített szilárd AMM táptalajra 10^5 spórárt pontinokuláltunk, az inkubálás 5 napig 37 °C-on történt.



6B. ábra A kontroll (THS30.3) és az *atfA* és *atfB* deléciós és túltermelő mutánsok stresszérzékenységének vizsgálata. Az ábrán a relatív növekedést (%) ábrázoltuk a stresszmentes körülményhez viszonyítva. A * jelölések mutatják a kontroll és a mutáns tenyészet közötti szignifikáns különbséget (Student-féle t-teszt: * $p < 5\%$, ** $p < 1\%$, *** $p < 0,1\%$).

5.3. A konídiospórák hőstresszel szembeni érzékenységének vizsgálata

Megvizsgáltuk az egyes törzsek konídiospóráinak 50 °C-on 10 percig tartó hőszel szembeni érzékenységét (ld. a 4.6 Stresszérzékenységi vizsgálatok b, Hőszel végzett stresszkísérletek c. részénél) a CFU (Colony- Forming Unit) szélesztéses módszerrel történő meghatározásával. A $\Delta atfA atfBOE$ és a $\Delta atfB atfAOE$ mutánsok életképessége fokozódott a hőszelt követően, konídiospóráik túlélési aránya közel 100% körül mozgott. Ezzel szemben a kontroll törzshöz képest a $\Delta atfB$ mutáns csökkent életképességét tapasztaltuk hőszel hatására. A többi mutáns esetében nem volt szignifikáns különbség az aszexuális spórák hőszel szembeni érzékenységében (7. ábra).

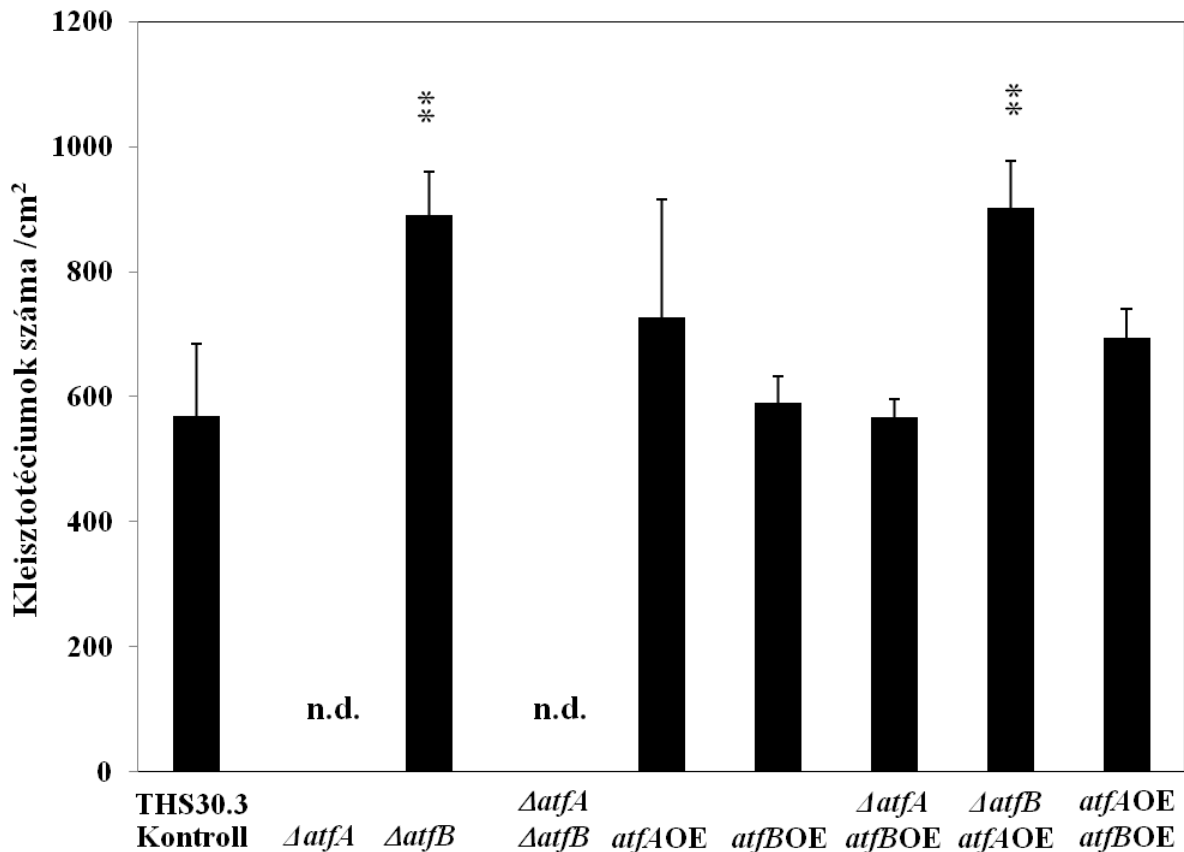


7. ábra A kontroll és mutáns törzsek hőszel érzékenységének vizsgálata. A 10 percig végzett 50 °C-os hőszel nem kezelt konídiumokat használtuk kontroll mintaként. Az ábrán szereplő adatok kiszámítása három független mérés átlagából és szórásértékeiből történt. A * jelölések mutatják a kontroll és a mutáns tenyészet közötti szignifikáns különbséget (Student-féle t-teszt: * $p < 5\%$, ** $p < 1\%$).

5.4. Az ivaros és ivartalan szaporodás vizsgálata

a) Ivaros szaporodás vizsgálata

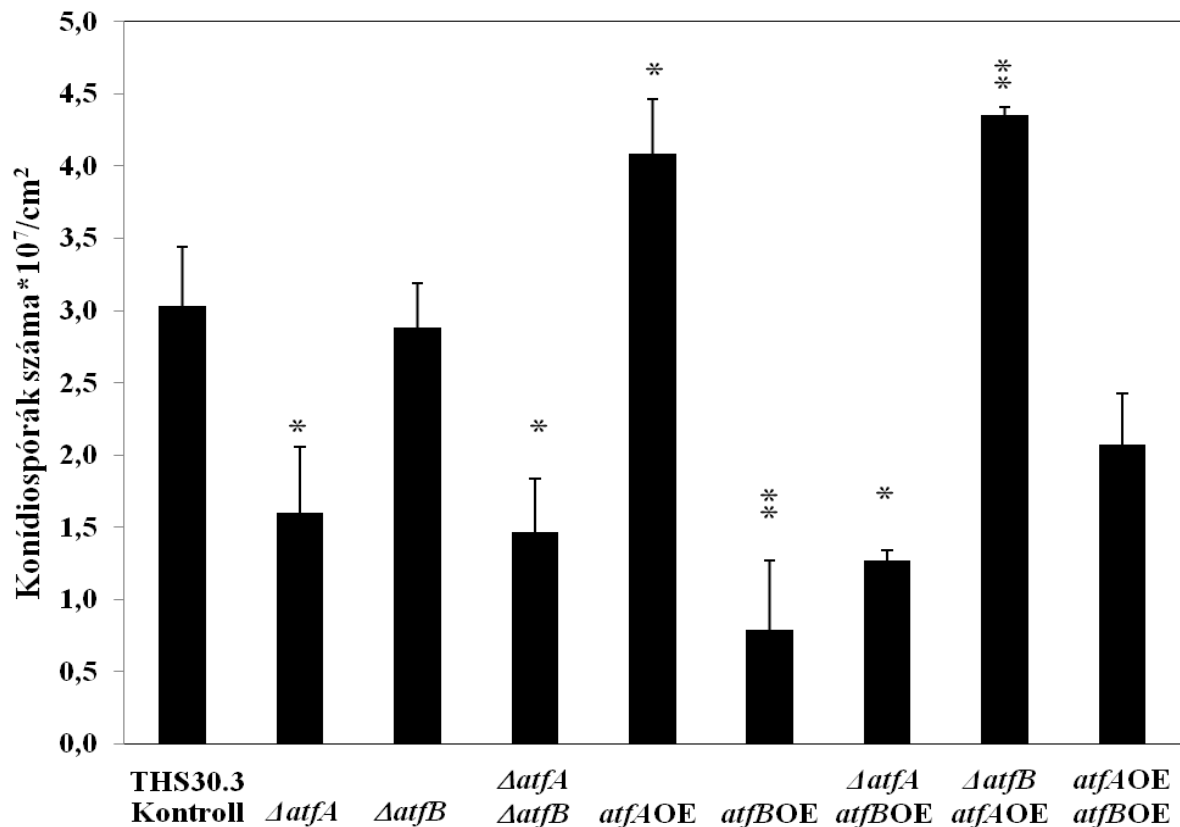
Az ivaros szaporodást tanulmányozó kísérletekben a kleisztotéciumok képződésének mértékét határoztuk meg. A $\Delta atfA$ és $\Delta atfA\Delta atfB$ mutánsok esetében a kleisztotécium képződés elmaradt, ezzel ellentétben a kontrollhoz viszonyítva a $\Delta atfB$ és $\Delta atfB atfAOE$ mutánsoknál másfélszer több termőtest képződött (8. ábra).



8. ábra A kontroll és mutáns törzsek kleisztotécium képződésének vizsgálata. Az ábrán szereplő adatokat három független mérés átlagából és szórásából számoltuk. A * jelölések mutatják a kontroll és a mutáns tenyészet közötti szignifikáns különbséget (Student-féle t-teszt: ** $p < 1\%$). n.d.=not detectable, azaz nem megfigyelhető

b) Ivartalan szaporodás vizsgálata

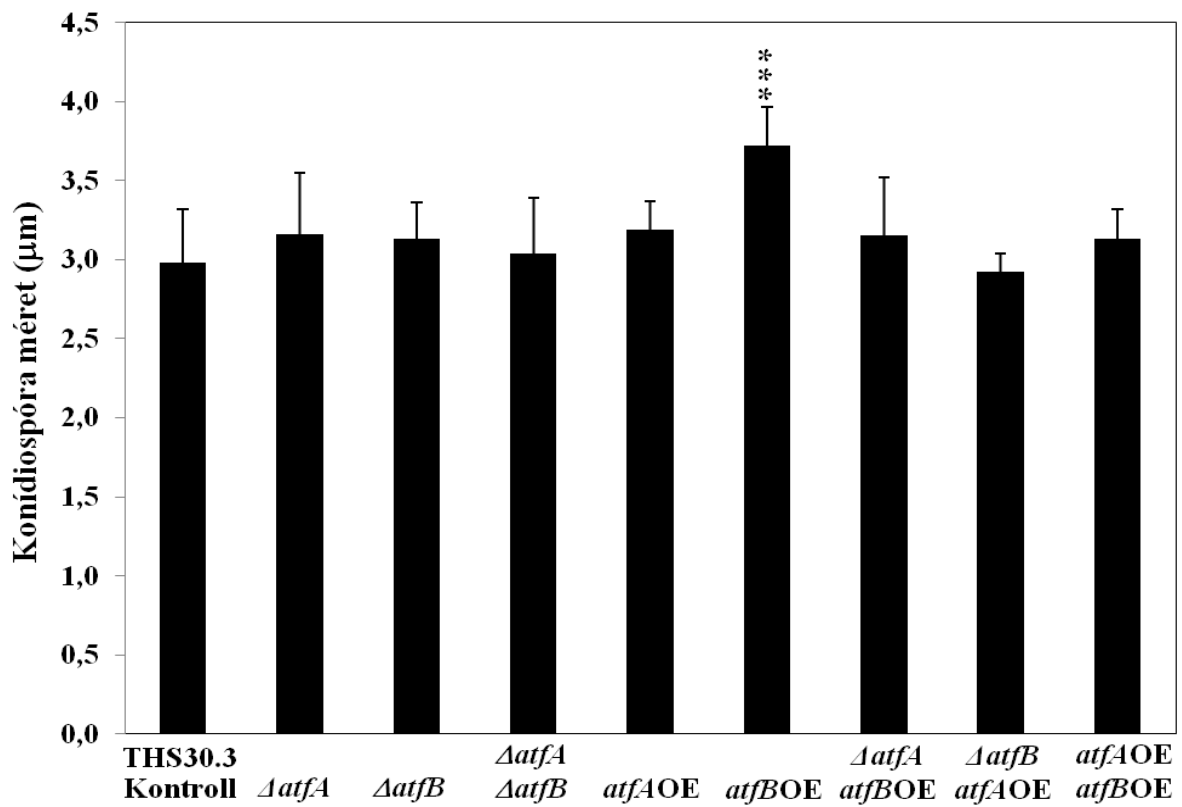
A mutánsok és a kontroll törzs konídiospóra számát fénymikroszkóposan Bürker-kamra alatt határoztuk meg. A $\Delta atfA$ és $\Delta atfA\Delta atfB$, $atfBOE$, $\Delta atfAatfBOE$ mutánsok esetén csökkent spóraszámot figyeltünk meg. Az $atfAOE$ és $\Delta atfBatfAOE$ törzsek konídiospóráinak száma viszont növekedett (9. ábra).



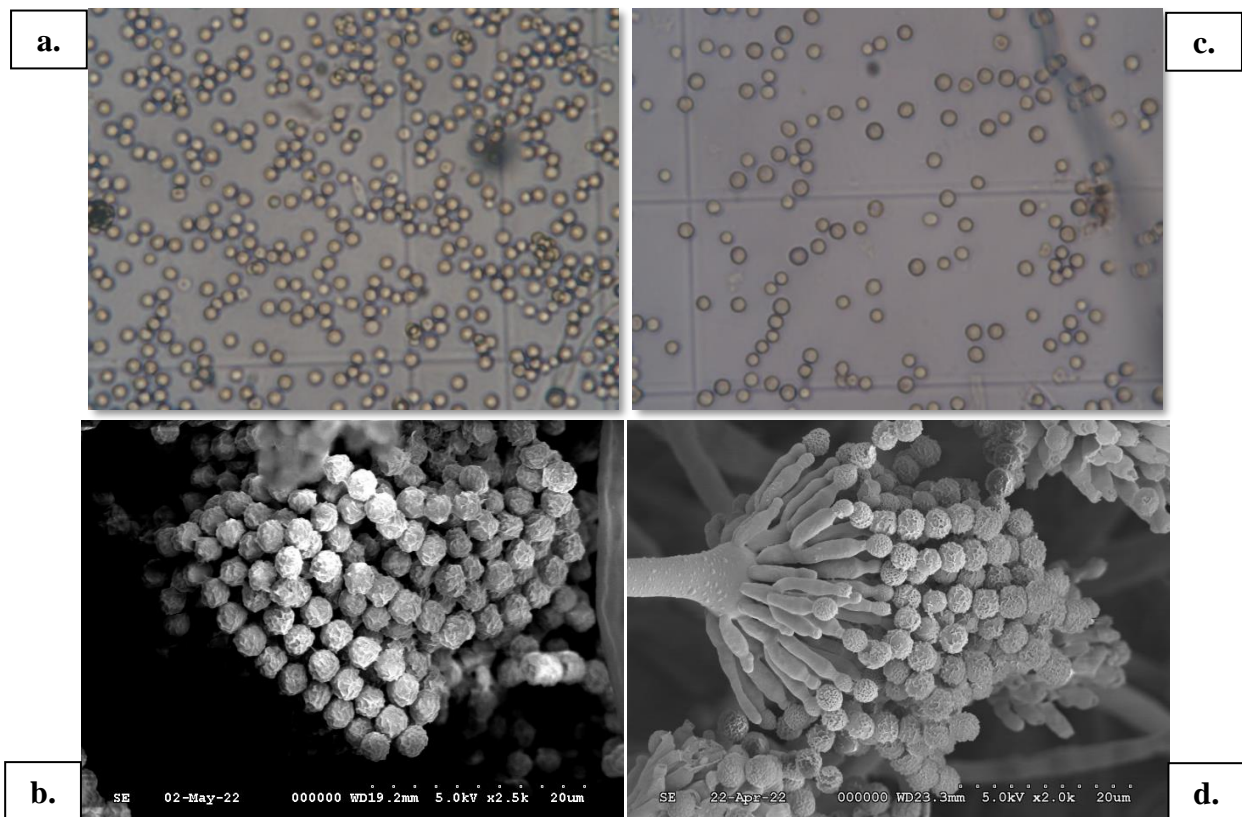
9. ábra A kontroll és mutáns törzsek konídiospóra képződésének vizsgálata. Az ábrán feltüntetett adatok három független mérés átlagának és szórásának eredményei. A * jelölések mutatják a kontroll és a mutáns tenyészetek közötti szignifikáns különbséget (Student-féle t-teszt: * $p < 5\%$, ** $p < 1\%$).

c) A konídiospórák méretének meghatározása

A konídiospórák méretét fénymikroszkóp és pásztázó elektronmikroszkópos felvételek készítésével ToupView képfeldolgozó szoftverrel határoztuk meg. Ennek eredménye, hogy az $atfBOE$ mutáns spóráinak mérete $3,72 \pm 0,24 \mu\text{m}$ -nek bizonyult (a kontroll törzs spórái $2,98 \pm 0,33 \mu\text{m}$ méretűek voltak), ezért itt szignifikáns eltérést tudtunk megállapítani. A többi mutáns spóraméretében nem volt különbség a kontroll törzshöz viszonyítva (10. és 11. ábra).



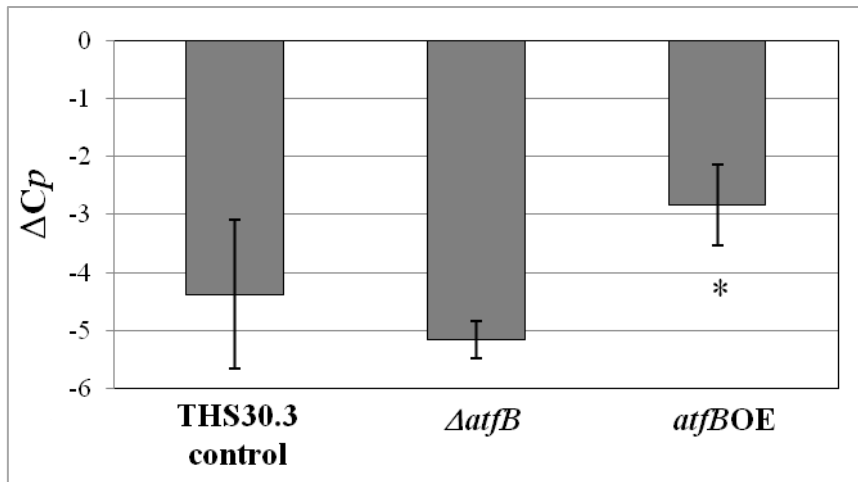
10. ábra A törzsek konídiospóra méretének meghatározása. Az ábrán feltüntetett adatok három független mérés átlagának és szórásának eredményei. A * jelölések mutatják a kontroll és a mutáns tenyészetek közötti szignifikáns különbséget (Student-féle t-teszt: *** $p < 0,1\%$).



11. ábra a-b. A kontroll törzs fény-és elektronmikroszkópos felvétele (spóraszám: $3,03 \times 10^7 / \text{cm}^2 \pm 0,41$, spóraméret: $2,98 \pm 0,33 \mu\text{m}$)
c-d. Az *atfBOE* mutáns fény-és elektronmikroszkópos felvétele spóraszám: $0,79 \times 10^7 / \text{cm}^2 \pm 0,48$, spóraméret: $3,72 \pm 0,24 \mu\text{m}$.

5.5 Az *abaA* gén expressziójának RT-qPCR-rel kapott eredményei

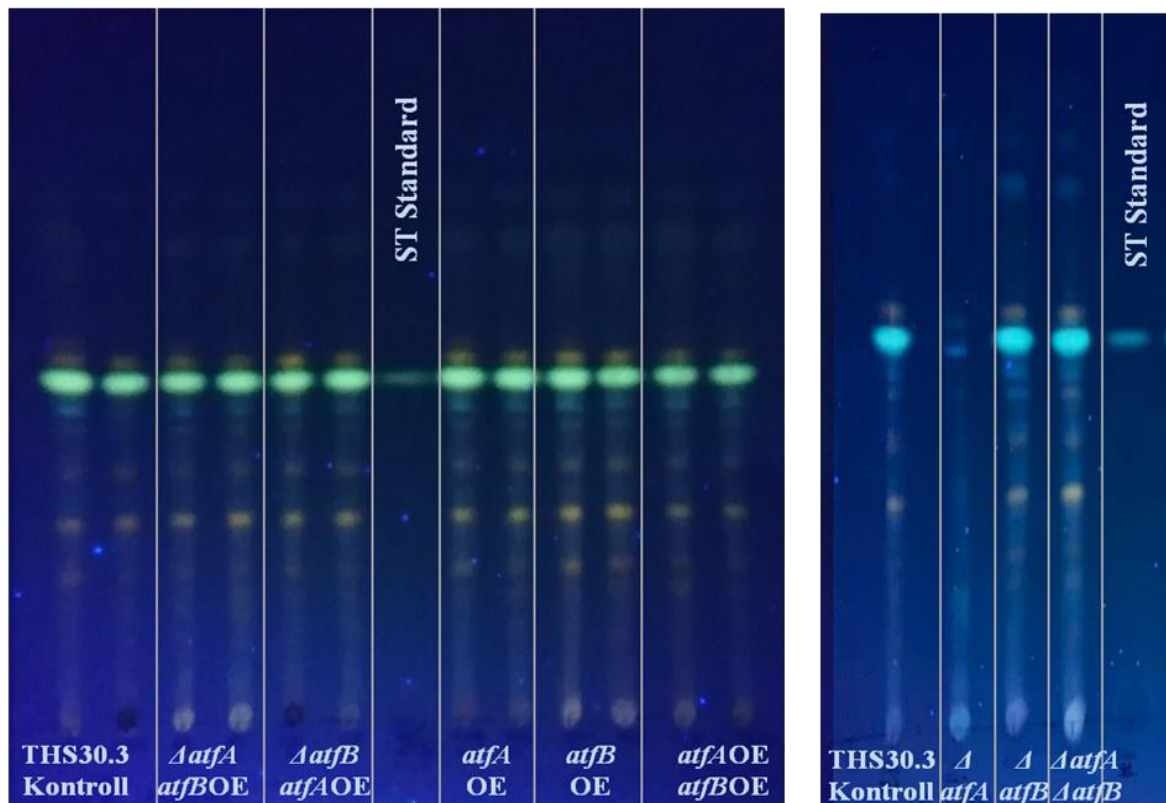
Az *abaA* gén (locus ID: AN0422) a konidiogenezis központi útvonalának szabályozó eleme. Az *atfBOE* konidiospóráinak méretbeli eltérése miatt RT-qPCR-el meghatároztuk ezen gén expresszióját felületi pontinokulált tenyészetekből. Az RT-qPCR adatai szerint az *atfBOE* mutánsnál az *abaA* gén upregulálódott, a $\Delta atfB$ esetében viszont nem volt szignifikáns különbség a kontroll törzshöz képest (12. ábra).



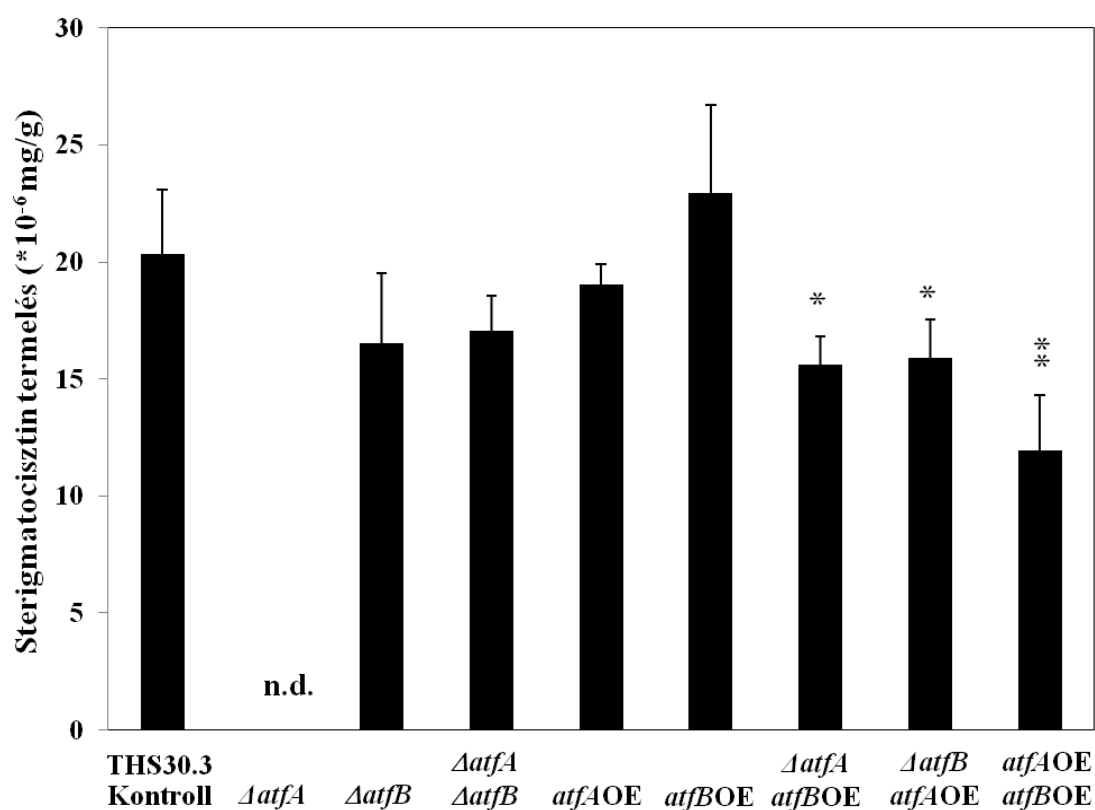
12. ábra Az *abaA* gén expressziójának kiértékelése a kontroll, a $\Delta atfB$ és *atfBOE* törzsek esetében. Az adatok és szórások három független kísérletből származnak. A * jelölés mutatja a kontroll és a mutáns tenyészet közötti szignifikáns különbséget (Student-féle t-teszt: * $p < 5\%$).

5.6. Sterigmatocisztin termelés meghatározása

A sterigmatocisztin termelés mértékét 5 napos pontinokulált tenyészetekből határoztuk meg vékonyréteg kromatográfiával, illetve HPLC analízissel. A mérési eredmények szerint a ST a $\Delta atfA$ mutáns esetében a kimutatási határ alatt volt az 5 napos inkubáció után. Ezzel szemben a $\Delta atfA\Delta atfB$ dupla deletált mutáns ST termelő képessége nem változott. A $\Delta atfAatfBOE$, $\Delta atfBatfAOE$ és a $atfAOEatfBOE$ törzsek szintén kevesebb ST termelésére voltak képesek. A dupla túltermelő, $atfAOEatfBOE$ ST szintje a kontroll törzshöz képest körülbelül a felére csökkent (13. és 14. ábra).



13. ábra A kontroll és mutáns törzsek sterigmatocisztin termelésének vékonyréteg kromatográfiás felvétele 366 nm UV fényel megvilágítva. A pontinokulált tenyészetből kivágott 2 cm²-es agarkocka extrakciója 800 μ l 70% acetonnal történt. A futtatópuffer Toluol: Etil-acetát: Jégecet=8:1:1 arányú elegye volt.

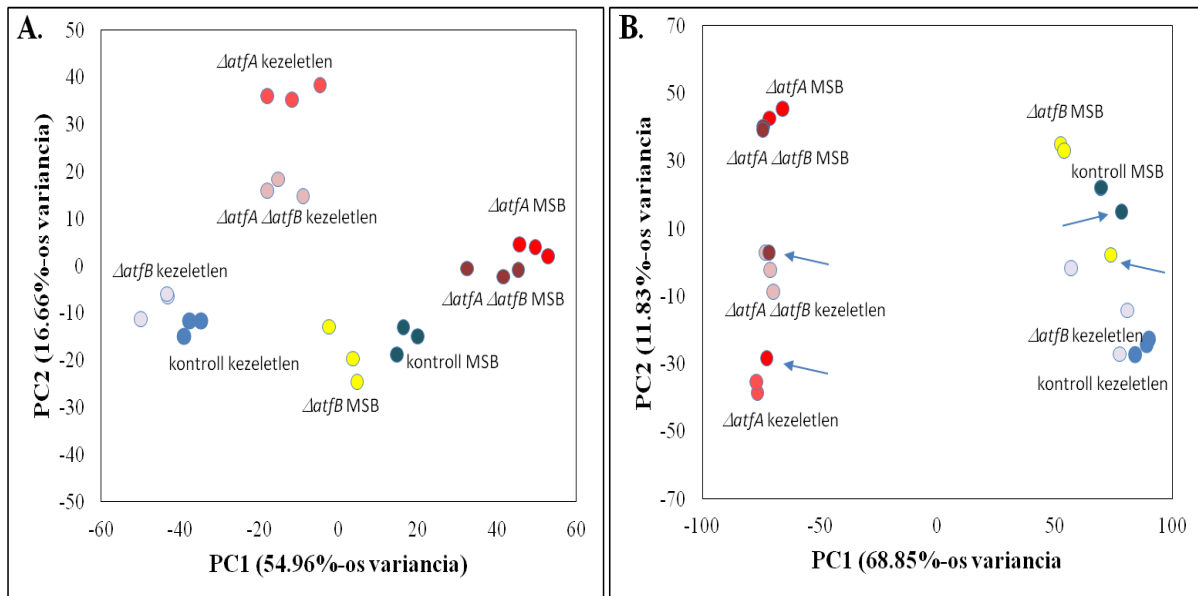


14. ábra Sterigmatocisztin termelés a kontroll és mutáns törzsekben. Az adatokat 3 független mérés átlaga és szórása adta. A * jelölések mutatják a kontroll és a mutáns tenyészet közötti szignifikáns különbséget (Student-féle t-teszt: * $p < 5\%$, ** $p < 1\%$). n.d.= not detectable, azaz nem megfigyelhető

5.7. Transzkriptomikai adatok kiértékelése

5.7.1. Az *atfA* deléció az *atfB* represszióját okozza

Elvégeztük a stresszorzal nem kezelt illetve az oxidatív stresszt okozó MSB-vel kezelt deléciós mutánsok, a $\Delta atfA$, $\Delta atfB$, $\Delta atfA\Delta atfB$ és a kontroll törzs két fejlődési stádiumának (micélium és konídiospóra) transzkriptomikai adatainak elemzését. A törzs és a kezelés egyaránt jelentős hatással volt a transzkriptombeli változásokra (**15. ábra**) (Kocsis és mtsai., 2023).



15. ábra A transzkriptomok főkomponens analízise a DESeq2 szoftver által generált rlog adatok felhasználásával. A. Micélium **B.** Konídiumok. A konídiumokkal végzett vizsgálat esetében a kezelésenkénti három minta két eltérő időpontban végzett kísérletből származott. Az egyik alkalommal két-két mintát, a második alkalommal egy-egy mintát vettünk. A nyilak ezen, második alkalommal vett mintákat jelölik.

A transzkriptomikai adatok alapján a micélium és konídium tenyészeteknél azonosítottuk:

- a géndelécióra érzékeny géneket (a kezelés nélküli és MSB kezelt tenyészeteknél),
- az MSB kezelésre érzékenységet mutató géneket (a kontroll törzsben)
- illetve az *AtfA*- és/vagy *AtfB*-függő géneket (**5. és 6. táblázat** és a **Függelék 1. táblázata**).

Az MSB kezelés és az *atfB* deléciója nem okozott az *atfA* gén esetében expressziós változást az *atfA*⁺ törzseknél (**16. ábra**). Ezzel ellentétben az MSB jelenléte a micélium mintáknál valamint az *atfA* deléciója mindkét morfológiai állapot esetén az *atfB* gén repressziójához vezetett (**16. ábra**). Ezért megállapítható, hogy az *atfA* az *atfB* transzkripcióján keresztül szabályozni képes az *atfB*-függő géneket. Ezért az *atfA* és az *atfB* által feltételezhetően együtt szabályozott gének

egy részét közvetlenül csak az *atfB* szabályozza. Ezek a gének jellemzően azokban a géncsoportokban található meg, ahol az *atfB* deléciója jobban érvényesül, mint az *atfA* deléció, vagy azzal megegyező mértékű hatást fejt ki. Ezek a géncsoportok a következők: AB (Set23), A-B1 and A-B5 (Set25) (5. és 6. táblázat). Az A-B5 (Set25) géncsoportba egyetlen gén sem volt besorolható (5. és 6. táblázat) (Kocsis és mtsai., 2023).

5. táblázat A micélium-mintáknál azonosított fő géncsoportok jellemzői

Géncsoport	Micélium a kezeletlen tenyészetéről	Micélium az MSB kezelt tenyészetéről	Átfedés az MSB-kezelt és kezeletlen tenyészetek között
<i>atfA</i> géndelécióra érzékeny (Set1 és Set1 ⁺)	326 felülszabályozott gén 865 alulszabályozott gén	255 felülszabályozott gén 583 alulszabályozott gén	85 felülszabályozott gén 336 alulszabályozott gén
<i>atfB</i> géndelécióra érzékeny (Set2 és Set2 ⁺)	213 felülszabályozott gén 159 alulszabályozott gén	201 felülszabályozott gén 77 alulszabályozott gén	71 felülszabályozott gén 12 alulszabályozott gén
<i>atfA atfB</i> dupla géndelécióra érzékeny (Set3 és Set3 ⁺)	200 felülszabályozott gén 457 alulszabályozott gén	131 felülszabályozott gén 296 alulszabályozott gén	45 felülszabályozott gén 142 alulszabályozott gén
AtfA-függő gének^a (Set 26)	329 gén (236 AA, 16 AB, 40 A/B, 1 A-B1, 3 A-B2 és 33 A-B4 gének) (10 felülszabályozott és 218 ^b alulszabályozott MSB stressz érzékeny gén)	240 gén (232 AA, 2 AB, 4 A/B és 2 A-B3 gének) (17 felülszabályozott és 143 ^b alulszabályozott MSB stressz érzékeny gén)	110 gén
AtfB-függő gének (Set27)	96 gén (3 BB, 16 AB, 40 A/B, 1 A-B1, 3 A-B2 és 33 A-B4 gén) (2 felülszabályozott és 68 ^b alulszabályozott MSB stressz érzékeny gén)	9 gén (1 BB, 2 AB, 4 A/B és 2 A-B3 gén) (1 felülszabályozott és 3 alulszabályozott MSB stressz érzékeny gén)	3 gén

^a – Az AtfA és AtfB - függő gének listája a **Függelék 1. táblázat**ban található meg

^b - Géncsoport dúsulás vizsgálat (Fisher-féle egzakt teszt, $p < 0.05$). Az MSB stressz kezelés 786 gén aktivációját (Set0⁺) és 912 gén represszióját okozta (Set0).

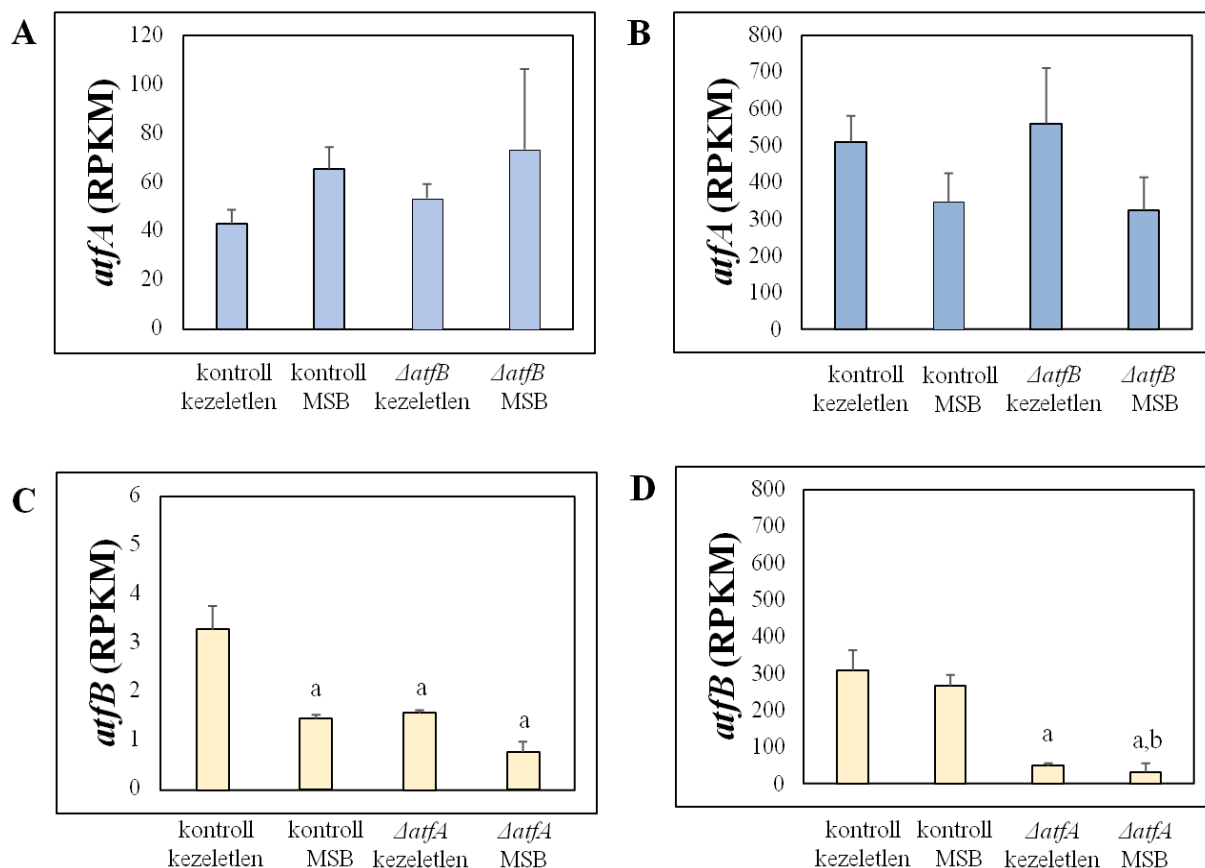
6. táblázat A konídium-mintáknál azonosított fő géncsoportok jellemzői

Géncsoport ^a	Kezeletlen konídium minta	MSB kezelt konídium minta	Átfedés az MSB-kezelt és kezeletlen tenyészetek között
<i>atfA</i> géndelécióra érzékeny (Set1 és Set1 ⁺)	1875 felülszabályozott gén (82; 25% ^c) 2116 alulszabályozott gén (326; 38%)	1386 felülszabályozott gén (57; 22%) 1480 alulszabályozott gén (167; 29%)	902 felülszabályozott gén 1274 alulszabályozott gén
<i>atfB</i> géndelécióra érzékeny (Set2 és Set2 ⁺)	117 felülszabályozott gén (5; 2%) 396 alulszabályozott gén (36; 23%)	74 felülszabályozott gén (7; 3%) 161 alulszabályozott gén (1; 1%)	30 felülszabályozott gén 108 alulszabályozott gén
<i>atfA atfB</i> dupla géndelécióra érzékeny (Set3 és Set3 ⁺)	1604 felülszabályozott gén (32; 16%) 2018 alulszabályozott gén (248; 54%)	1553 felülszabályozott gén (27; 21%) 1547 alulszabályozott gén (125; 42%)	848 felülszabályozott gén 1374 alulszabályozott gén
<i>AtfA</i> -függő gének (Set 26)	1496 gén (185; 56%) (1079 AA, 80 AB, 84 A/B, 13 A-B1, 75 A-B2, 4 A-B3 and 161 A-B4 gén) (6 felülszabályozott és 319 ^b alulszabályozott MSB stressz érzékeny gén)	1143 gén (105; 44%) (989 AA, 41 AB, 8 A/B, 2 A-B1, 12 A-B2 és 91 A-B4 gén) (21 felülszabályozott and 154 ^b alulszabályozott MSB stressz érzékeny gén)	1043 gén
<i>AtfB</i> -függő gének (Set 27)	439 gén (26; 27%) (22 BB, 80 AB, 84 A/B, 13 A-B1, 75 A-B2, 4 A-B3 és 161 A-B4 gén) (1 felülszabályozott és 178 ^b alulszabályozott MSB stressz érzékeny gén)	155 gén (1; 11%) (1 BB, 41 AB, 8 A/B, 2 A-B1, 12 A-B2 és 91 A-B4 gén) (5 felülszabályozott és 22 alulszabályozott MSB stressz érzékeny gén)	114 gén

^a- A géncsoportokhoz tartozó gének listája a **Függelék 1. táblázatban** található meg.

^b- Géncsoport dúsulás vizsgálat (Fisher-féle egzakt teszt, $p < 0.05$). Az MSB stressz kezelés 485 gén aktivációját (Set0⁺) és 1070 gén represszióját okozta (Set0).

^c- A zárójelben feltüntetett szám adatok mutatják a konidiális és micéliális minták közötti átfedést valamint az átfedés százalékos arányát a micéliális géncsoport méretéhez viszonyítva. A micéliális és konidiális Set0⁺ és Set0 géncsoportoknál az átfedés 45 felülszabályozott és 225 alulszabályozott gén volt, amely a micéliális géncsoportok 6% és 25%-át jelenti.



16. ábra Az *atfA* és *atfB* gének transzkripció profilja

A,B: Az *atfA* expressziója MSB kezelés hatására és a kezelés nélküli tenyészténel a kontroll típusú illetve a $\Delta atfB$ törzsnél.

C,D: Az *atfB* expressziója MSB kezelés hatására és a kezelés nélküli tenyészténel a kontroll típusú illetve a $\Delta atfA$ törzsnél.

Az ábrán az RPKM értékek átlaga van feltüntetve a szórásokkal 3 független mérésből a micélium- (**A,C**) és a konídium- (**B,D**) mintákból.

a- alulszabályozott gén a kezelés nélküli kontroll tenyészetéhez viszonyítva.

b- alulszabályozott gén az MSB kezelt kontroll tenyészetéhez viszonyítva.

Az egyes mintákban a leolvasások átlagai az alábbiak voltak:

micélium: $24,6 \times 10^6$ ($\Delta atfA$, kezeletlen), $19,7 \times 10^6$ ($\Delta atfA$, kezelt), $32,5 \times 10^6$ ($\Delta atfB$, kezeletlen), $20,8 \times 10^6$ ($\Delta atfB$, kezelt), $26,6 \times 10^6$ (vad, kezeletlen), $20,5 \times 10^6$ (vad kezelt)

konidium: $22,1 \times 10^6$ ($\Delta atfA$, kezeletlen), $18,5 \times 10^6$ ($\Delta atfA$, kezelt), $18,6 \times 10^6$ ($\Delta atfB$, kezeletlen), $20,0 \times 10^6$ ($\Delta atfB$, kezelt), $15,5 \times 10^6$ (vad, kezeletlen), $18,0 \times 10^6$ (vad kezelt)

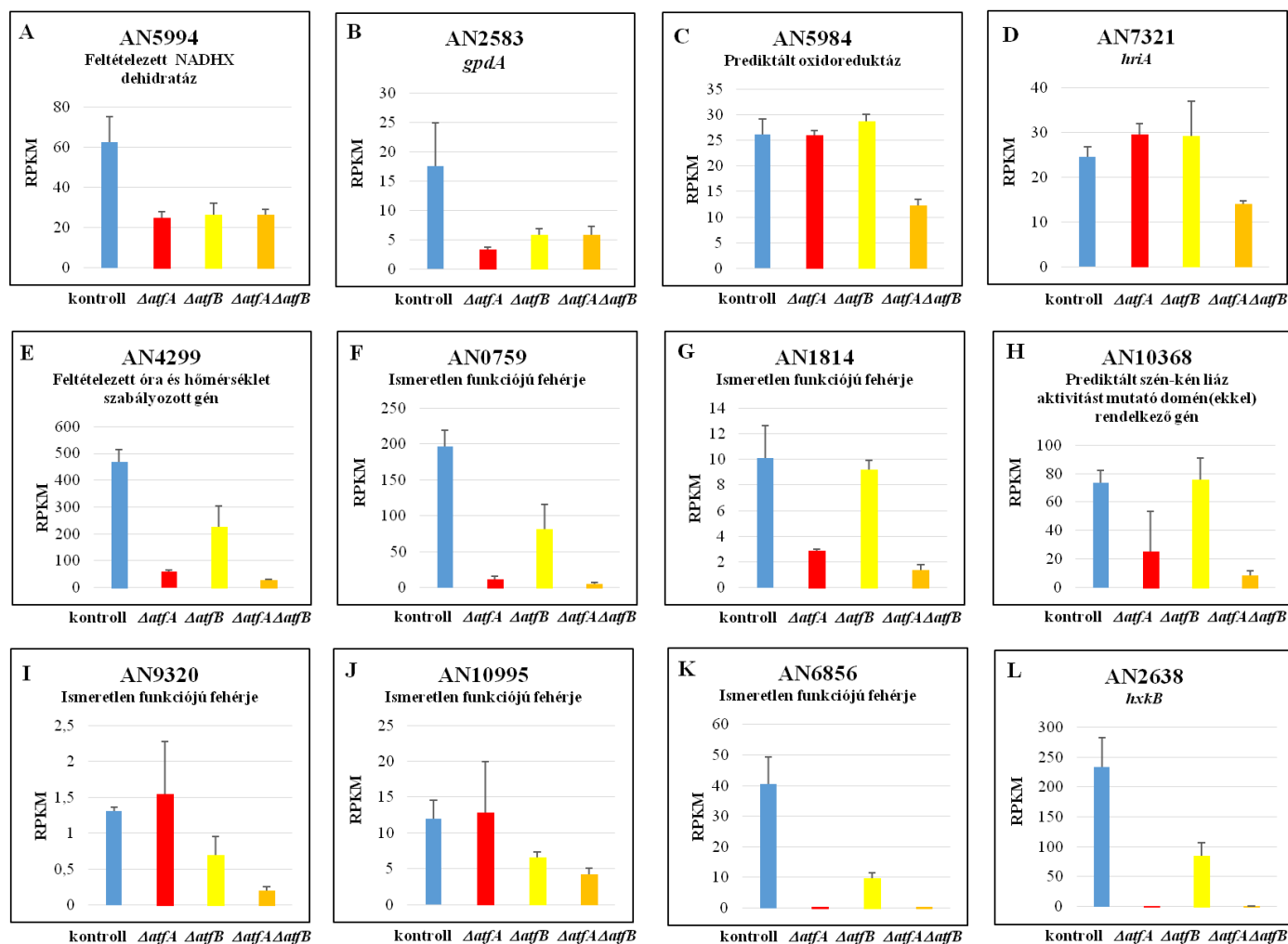
5.7.2. Az *AtfB* – függő gének *AtfA* függése az MSB-vel nem kezelt micélium tenyészténel

Az *AtfA*-függő gének száma a kezeletlen micélium minták esetében jóval nagyobb volt, mint az *AtfB*-függő géneké (**5. táblázat**). A legnagyobb különbséget a $\Delta atfA$ és $\Delta atfB$ törzsek között az alulszabályozott génekben találtuk. Eredményeink szerint az *AtfA*-függő gének száma 329 volt, míg 96 gén volt *AtfB*-függő (többségük *AtfA*-függő is volt) (**5. táblázat**). Az *AtfA*-függő

gének nagy száma tükrözi azt, hogy az *atfA* gén hiánya jelentősebb transzkriptomikai (**15. ábra, 5. táblázat**) és élettani hatással bír (Kocsis és mtsai., 2022; 2023).

Az AtfA-és AtfB-függő géneket 3 géncsoportba (AB, A/B, és A-B) soroltuk be (**17. ábra, 5. táblázat**):

- Az **AB** géncsoportba tartozó gének transzkripció mintázata is mutatja, hogy az AtfA és AtfB együttes jelenléte szükséges a normál körülmények között megfigyelhető, vad típusú génaktivitás eléréséhez.
- Azon géneket, amelyeket az AtfA és AtfB együttesen szabályoz **A/B** vagy **A-B** csoportokba soroltuk be (**5. táblázat** és a **Függelék 2. táblázata**), előbbinél a hiányzó transzkripció faktor teljesen, utóbbi esetben csak részben volt helyettesíthető a másik transzkripció faktorral. Az A-B géncsoportba tartozó legtöbb gén esetében az *atfA* gén deléciójának volt nagyobb hatása az *atfB* delécióval szemben (A-B2 és A-B4 gének) (**17. ábra, Függelék 2. táblázata**) (Kocsis és mtsai., 2023).



17. ábra Néhány, feltételezhetően az *AtfA* és/vagy *AtfB* szabályozása alatt álló gén transzkripció mintázata.

(A,B): AN5994 és AN2583 (AB gének; Set 23), (C,D): AN5984 és AN7321 (A/B genes; Set24), (E,F): AN4299 és AN0759 (A-B1 gének; Set25), (G,H): AN1814 and AN10368 (A-B2 gének; Set25), (I,J): AN9320 and AN10995 (A-B3 gének; Set25), (K,L): AN6856 és AN2638 (A-B4 gének; Set25) (ld.: S2 ábra). A grafikonokon az RPKM értékek átlagai a szórásokkal 3 független mérésből származnak a micéliális (A,C,E,G,I,K) és a konidiális (B,D,F,H,J,L) minták nem kezelt (A–D,F–L) és MSB kezelt tenyészetéből.

5.7.3. Az AtfB szerepe az MSB-kezelt micélium mintákban

Az MSB kezelés hatására az *atfA* és/vagy *atfB* deléció miatt kevesebb gén esetében következett be transzkripciós változás (**5. táblázat**). Az AtfB-függő gének (többségük AtfA-függést is mutatott) száma igen csekély volt (**5. táblázat**). Ezzel összhangban MSB kezelés hatására a kontroll törzs esetében az *atfB* repressziója következett be (**16. ábra**) (Kocsis és mtsai., 2023). Nem volt meglepő az sem, hogy MSB kezelésre a $\Delta atfB$ mutáns a kontroll törzsszel megegyező érzékenységet mutatott (Kocsis és mtsai., 2022).

Az MSB kezelt és nem kezelt tenyészetek közötti átfedés a géndelációra érzékeny valamint az AtfA-függő géncsoportok tekintetében viszonylag kicsi volt (**5. táblázat**), ami alátámasztja azt, hogy az AtfA (közvetlenül vagy közvetve) a micéliumban a különböző tenyésztési körülmények között különböző géneket szabályoz (Emri és mtsai., 2015; Orosz és mtsai., 2017; Antal és mtsai., 2020; Kocsis és mtsai., 2023). Meglepő módon az MSB kezelt tenyészetek esetében az AtfA-függő génkészletben az MSB stresszre érzékeny alulszabályozott gének feldúsulása volt jellemző, hasonlóan a kezelés nélküli AtfA- és AtfB-függő génkészletekhez (**5. táblázat**). Vagyis sok, az MSB jelenlétében alulszabályozódást mutató génnek az AtfA hiánya miatt további alulműködése következett be. Ezen jelenség azt mutatja, hogy az MSB toleráns fenotípust mutató tenyészetekben az AtfA fő feladata nem az, hogy fenntartsa a stresszhatásra felül szabályozódó gének transzkripciós aktivitását, hanem hogy megakadályozza a gének további alulszabályozását. Ez természetesen nem zárja ki annak lehetőségét, hogy az AtfA néhány gén felül szabályozásához is hozzájáruljon az MSB stresszre adott korai stresszválasz során (Kocsis és mtsai., 2023).

5.7.4. Az AtfA és az AtfB szerepe a konídiospórákban

Az *atfA* és *atfB* egyaránt jóval nagyobb transzkripciós aktivitást mutatott a konídiumokban, mint a micéliummintákban (**16. ábra**). Továbbá nagy számban találtunk *atfA* és/vagy *atfB* géndeláció érzékeny és AtfA- és/vagy AtfB függő géneket (**6. táblázat**) a konídiospórákban. Ezen gének tehát a csírázó konídiumokban fontosabb szerepet töltenek be, mint a vegetatív micéliumban. Az MSB kezelés a konídiumokban nem csökkentette az *atfB* mRNS mennyiségét (**16. ábra**). Azonban MSB jelenlétében az AtfB-függő gének számának jelentősebb mértékű csökkenése volt jellemző az AtfA-függő génekhez képest (**6. táblázat**) (Kocsis és mtsai., 2023).

Az AtfB-függő gének többsége a konídiumokban is AtfA-függést mutatott (**6. táblázat** és **Függelék 2. táblázata**). Az AtfA-és AtfB-függést is mutató géncsoportok közül a legtöbb gént az AB, A/B, A-B2 és A-B4 csoportokon belül találtuk meg (**6. táblázat** és **Függelék 2. táblázata**). Ez azt jelenti, hogy az AtfB az AtfA-tól függetlenül csak néhány gén szabályozásában vesz részt (BB gének, **6. táblázat** és **Függelék 1. táblázata**). Egyes gének szabályozása viszont az AtfA közreműködésével valósul meg (AB gének, **6. táblázat**), emellett azon géneknél, amelyek a legjelentősebb AtfB-függést mutatták az AtfA képes volt helyettesíteni a hiányzó AtfB-t (A/B, A-B2, A-B4 gének, **6. táblázat** és **Függelék 2. táblázata**) (Kocsis és mtsai., 2023).

Az MSB kezelés a konídiumok és a micéliumok transzkriptomját is jelentősen módosította, a konídiumoknál 485 db felülszabályozott gént és 1070 db alulszabályozott MSB stresszérzékeny gént, a micéliumnál 786 db felülszabályozott és 912 db alulszabályozott MSB-re érzékeny gént találtunk. Az MSB kezelésnek a konídiumok transzkriptomjára kifejtett hatása előrevetíti azt, hogy a micéliumok élettanára hatással lévő stresszhatások a stresszkezelt micéliumok által termelt konídiumok transzkriptomjára is hatással vannak. Érdekes módon ezen változások az AtfA és AtfB konídiumokban betöltött szabályozó szerepét csak kis mértékben módosították: a kezeletlen és MSB-kezelt tenyészetekből származó konídiumok AtfA (AtfB)-függő génei közötti átfedés a micéliumnál megfigyeltékhez képest nagy volt (**5. és 6. táblázat**). Így feltételezhető, hogy a micéliumot érintő transzkripciós változások azt tükrözik, hogy a vegetatív sejtek alkalmazkodnak az MSB jelenlétéhez, míg a konídiumokban bekövetkező transzkripciós változások arra utalnak, hogy a micéliumok által megszerzett „ismeretek” hogyan épülnek be a konídiumok csírázási programjába. Ez azt jelenti, hogy a spóráknak nem kell alkalmazkodniuk a hosszú ideig tartó MSB kezelés mindenfajta következményeihez, csupán az MSB által okozott stressz megnövekedett esélyével kell számolniuk csírázás során (Kocsis és mtsai., 2023).

A konídiospórákban azonosított géncsoportok meglepően kis átfedést mutattak a megfelelő micéliumban azonosított géncsoportokkal (**6. táblázat**). Még az AtfA-függő gének esetében is az átfedés csak 50% körüli volt (**6. táblázat**). A micélium- és spóraminták közötti jelentős különbség rávilágít arra, hogy a két gén különböző funkciót tölt be és ennek megfelelően az *atfA* és *atfB* géndelációknak eltérő következményei vannak a micéliumban és a spórákban (Kocsis és mtsai., 2023).

5.7.5. Az AtfA hatása a szénhidrát metabolizmusra és fényfüggő folyamatokra

A géncsoport dúsulás vizsgálatokat 4 db AtfA-és 4 db AtfB-függő géncsoporttal végeztük el (nem kezelt valamint MSB-kezelt micélium és konídium mintákkal, **7., 8. táblázat** és a **Függelék 3. és 4. táblázata**) (Kocsis és mtsai., 2023).

7. táblázat A FunCat, GO és KEGG adatbázisokkal meghatározott AtfA-és AtfB-függő géncsoportok

Tenyészet	AtfA-függő gének (Set26)	AtfB-függő gének (Set27)
Micélium (Kezelés nélkül)	Szén/szénhidrát anyagcsere; galaktóz anyagcsere folyamat	
Micélium (MSB-kezelt)	Amin/poliamin transzport	
Konídium (Kezelés nélkül)	Szén/szénhidrát anyagcsere; szén/szénhidrát transzport; Glikolízis és glükoneogenezis;Pentóz-foszfát útvonal; Fruktóz és mannóz metabolizmus; Piruvát anyagcsere; Glioxilát és dikarboxilát anyagcsere; Foszfát homeosztázis; Proton-vezérelt antiporter; Nátrium-vezérelt szimporter; Szekunder metabolitok bioszintézise; Celluláris érzékelés és válasz a külső ingerekre; Oxidatív stresszválasz	Szén/szénhidrát anyagcsere;szén/szénhidrát transzport; Glikolízis és glükoneogenezis; Keményítő és szacharóz anyagcsere; Valin, leucin és izoleucin degradáció; Szekunder metabolitok bioszintézise
Konídium (MSB-kezelt)	Szén/szénhidrát anyagcsere; Glikolízis és glükoneogenezis; Pentóz-foszfát útvonal; Fruktóz és mannóz metabolizmus; Glioxilát és dikarboxilát anyagcsere; TCA ciklus; Foszfát homeosztázis; Szekunder metabolitok bioszintézise; Celluláris érzékelés és válasz a külső ingerekre; Peroxiszóma	

8. táblázat Az AtfA-és AtfB-függő géncsoportokon belül szignifikáns (Fisher-egzakt teszt; p< 0,05) dúsulást mutató géncsoportok

Tenyészet	AtfA-függő gének (Set26)	AtfB-függő gének (Set27)
Micélium (Kezelés nélkül)	Szekunder metabolizmus: No PKS/NRPS backbone 1 klaszter, Mikroperforanon klaszter, AN2924 klaszter, AN9005 klaszter; AN10297 klaszter, Emericellamid klaszter	Szekunder metabolizmus: AN2924 cluster; AN10297 klaszter; emericellamid (eas) klaszter
Micélium (MSB-kezelt)	CAZyme gének, Foszforelé válasz regulátor gének Szekunder metabolizmus: aspercryptin klaszter, AN2924 klaszter; AN10297 klaszter; emericellamid (eas) klaszter	
Konídium (Kezelés nélkül)	Glikolízis; Pentóz-foszfát útvonal; Leloir útvonal Antioxidatív enzim gének; Vas-kén klaszter fehérjék Foszforelé válasz regulátor gének Szekunder metabolizmus: AN9005 klaszter; AN1594 klaszter; AN10297 klaszter; AN1242 klaszter	Transzkripció faktorok Szekunder metabolizmus:AN9005 klaszter, AN10297 klaszter
Konídium (MSB-kezelt)	Glikolízis; Pentóz-foszfát útvonal; Leloir útvonal; TCA ciklus; Légzés Vas-kén klaszter szintézis Foszforelé válasz regulátor gének Szekunder metabolizmus: AN1594 klaszter; AN10297 klaszter; AN1242 klaszter	

Az AtfA-függő gének között nagy számban találtunk szénhidrát metabolizmusban részvevő géneket. Közülük a glikolitikus gének AtfA-függése volt a legjelentősebb a konídiospórák esetében (**Függelék 3. táblázata**). A foszforelé választ szabályozó gének száma megnövekedett az összes AtfA-függő géncsoportban, viszont ezen gének dúsulása nem volt jellemző a kezeletlen micélium mintáknál (**8. táblázat** és **Függelék 4. táblázata**), ezzel szemben a vas-kén klaszter összeszerelő géneket a spóraminták AtfA-függő génjei között azonosítottuk (**8. táblázat** és **Függelék 4. táblázata**). Érdekes módon az antioxidáns enzimeket kódoló gének feldúsulását csak a spóraminták kezeletlen tenyészetéből származó AtfA-függő géncsoportjaiban mutattuk ki (**8. táblázat** és **Függelék 4. táblázata**). A trikarbonsav ciklus (TCA ciklus) és a légzési lánc génjei a spórák MSB-kezelt tenyészetéből származó AtfA-függő génjei között voltak megtalálhatók. A fentebb említett gének többségét csak az AtfA szabályozta (AA gének, **Függelék 4. táblázata**). Néhány szekunder metabolit klaszter génjei szintén AtfA-függő szabályozás alatt álltak (**8. táblázat** és **Függelék 4. táblázata**). Közülük az emericellamid klaszter a legfigyelemreméltóbb, mivel a kezeléstől függően az 5 klasztergéből 4 vagy 5 gén volt AtfA-függő (**17. ábra**, **Függelék 3. táblázata**). Érdekes módon a kezelés nélküli tenyészetekben ezen gének AtfA-és AtfB függést egyaránt mutattak (**16. ábra**), viszont az MSB-kezelt tenyészetekben, ahol az *atfB* alulszabályozódott (**16. ábra**) ezek a gének csak AtfA-függést mutattak (AA gének).

A négy AtfA-függő géncsoportban összesen 87 db gén mutatott AtfA-függést. Többségük ismeretlen funkciójú fehérjét kódol (**9. táblázat**). Az ismert vagy feltételezett funkciójú gének között megemlíthető a *catA* kataláz, továbbá 6 gén, amelyek a szénhidrát metabolizmusban vesznek részt, valamint a *hk-8-1* és *hk2* feltételezett hisztidin-tartalmú foszfortranszfer fehérjéket kódoló gének, illetve 10 gén, amelyek a fényérzékelésben és a fényre adott válaszreakciókban vesznek részt (**Függelék 1. és 4. táblázata**) (Kocsis és mtsai., 2023).

9. táblázat Néhány példa az összes tenyésztési körülménynél AtfA-függést mutató génekre.

Gén ID	Gén neve	Funkció	AtfA/AtfB függés			
			Micélium (Kezeletlen)	Micélium (MSB kezelt)	Konídium (Kezeletlen)	Konídium (MSB kezelt)
Fényfüggő szabályozás						
AN0387	<i>cryA</i>	UV-A és kék fény érzékelés	AA	AA	AA	AA
AN5056		Fény hatására indukálódik	A-B	AA	AA	AA
AN9285	<i>ccgA</i>	Fény hatására indukálódik	AA	AA	AA	A-B
AN4299		Fény hatására indukálódik	A-B	AA	AA	AA
AN8638	<i>cetJ</i>	Fény hatására indukálódik	AA	AA	AA	AA
AN0045		Fény hatására indukálódik	A-B	AA	AA	AA
AN0693		Fény hatására indukálódik	AA	AA	AA	AA
AN5004		Fény hatására indukálódik	A-B	AA	A-B	AA
AN8339		Fény hatására indukálódik	AA	AA	AA	AA
AN8641		Fény hatására indukálódik	A-B	AA	A-B	AA
Szénhidrát metabolizmus						
AN8138	<i>aglC</i>	α -galaktozidáz	A-B	AA	A-B	AA
AN2835		Feltételezett D-arabinono-1,4 lakton oxidáz aktivitás	AA	AA	A-B	AA
AN8639		Feltételezett α -trehalóz foszfát szintáz	AA	AA	A-B	A-B
AN10060		Feltételezett α -amiláz	AA	AA	AA	AA
AN3200		Feltételezett β -glükuronidáz	AA	AA	AA	AA
AN9180		Feltételezett transzketoláz	AA	AA	AA	AA
Egyéb funkciójú gének						
AN2470		Nitrózatív stresszel szembeni sejtválasz	AA	AA	AA	AA
AN8637	<i>catA</i>	Konídium-specifikus kataláz	AA	AA	AA	AA
AN2581	<i>hk-8-1</i>	Feltételezett hisztidin-tartalmú foszfortranszfer fehérje	AA	AA	AA	AA
AN7945	<i>hk2</i>	Feltételezett hisztidin-tartalmú foszfortranszfer fehérje	AA	AA	AA	AA
AN9005		Feltételezett poliketid szintáz	AA	AA	AB	AB

AA: Feltételezhetően csak az AtfA által szabályozott gének. **AB:** feltételezhetően mindkét gén (AtfA és AtfB) által szabályozott gének; az *atfA* vagy *atfB* deléciója a génexpressziót a dupla deletált mutáns szintjére csökkenti. **A-B:** feltételezhetően mindkét gén (*atfA* és *atfB*) által szabályozott gének; az *atfA* és/vagy az *atfB* deléciója a génexpresszió kizárólag részleges csökkenését idézi elő.

Csak 23 db AtfB-függő gént találtunk, ezek viszont egyetlen esetben sem mutattak AtfA-függést (**Függelék 1. táblázata**). Példaként 4 jelentősebb gént lehet megemlíteni: az AN8953 (*agdB*) egy feltételezett α -glikozidáz, az AN3402 (*amyB*) egy feltételezett α -amiláz, az AN7619 (*calA*) a korai konídium-csírázásban tölt be szerepet, valamint az AN2099 gént, amely feltehetően egy alternatív oxidázt kódol (Kocsis és mtsai., 2023).

6. Megbeszélés

Doktori munkámban az *A. nidulans* fonalas gomba bZIP típusú transzkripciós faktorait kódoló *atfA* és *atfB* gének funkcionális analízisét, valamint újgenerációs RNS szekvenálással a deléciós mutánsok (a $\Delta atfA$, $\Delta atfB$, $\Delta atfA\Delta atfB$) transzkriptomikai tanulmányozását valósítottuk meg. Az *atfA* és *atfB* gének élettani funkcióinak vizsgálatához létrehoztuk a deléciós és a túltermelő mutánsokat az összes kombinációban: ($\Delta atfA$, $\Delta atfB$, $\Delta atfA\Delta atfB$, $\Delta atfAatfBOE$, $\Delta atfBatfAOE$, *atfAOE*, *atfBOE* és *atfAOEatfBOE*).

6.1. Az élettani vizsgálatok eredményei

Az AtfA oxidatív stresszel szembeni védelemben betöltött szerepét (Hagiwara és mtsai., 2008, 2009; Balázs és mtsai., 2010; Emri és mtsai., 2015) alátámasztották pontinokulációs kísérleteink, mivel az *atfA* deléciója esetén nőtt az oxidatív stresszt okozó diamiddal, *tBOOH*-val és menadionnal szembeni érzékenység (6. ábra). Más fajok esetében is hasonló eredményeket tapasztaltak: *S. pombe*-ben az *A. nidulans* AtfA ortológ Atf1 deléciójakor süllyesztett és szilárd tenyészetben egyaránt csökkent a túlélési arány H_2O_2 jelenlétében (Sansó és mtsai., 2008). Az *A. fumigatus atfA* deléciós mutáns konídiumok oxidatív stresszre érzékeny fenotípust mutattak (Hagiwara és mtsai., 2014). A *Penicillium marneffei* dimorf gomba *atfA* génje esetében is igazolták, hogy szerepet játszik az oxidatív stresszben, mivel a deléciós mutáns kismértékű *tBOOH* érzékenységet mutatott (Nimmanee és mtsai., 2014), az *A. oryzae* $\Delta atfA$ konídiumok ugyancsak érzékenyek voltak oxidatív stresszre (Sakamoto és mtsai., 2009). Ehhez hasonló fenotípust figyeltek meg növénypatogén gombákban, így a *M. oryzae MoAtf1* (Guo és mtsai., 2010), a *F. graminearum FgAtf1* (Jiang és mtsai., 2015), valamint a *F. verticilloides FvAtfA* (Szabó és mtsai., 2020) deléciója esetén is fokozódott az oxidatív stresszel szembeni érzékenység.

A bZIP transzkripciós faktorok a fonalas gombák körében az ivaros szaporodási folyamatokban is részt vesznek (Bayram és mtsai., 2008; Yin és mtsai., 2013). Erre példa a YAP-szerű (Yeast Activator Protein= Élesztő Aktivátor fehérje) bZIP-ek közé tartozó, a szekunder metabolizmus helyreállításáért felelős *rsmA* (restorer of secondary metabolism A) túltermelése, ami az askospóra képződés teljes megszűnését eredményezte. További két bZIP TF-nál is hasonló változás volt tapasztalható, a *napA* overexpressziója esetén az ivaros helyett az ivartalan szaporodás került túlsúlyba, a *zipA* túltermelő mutáns esetében is szignifikáns mértékben csökkent a termelődött askospóra mennyisége (Yin és mtsai., 2013). Szexuális szaporodás vizsgálatunk eredményei is összhangban voltak ezzel az állítással, mivel az *atfA*

deléciója önmagában vagy az *atfB* deléciójával együtt gátolta a kleisztotécium képződést (**8. ábra**).

A Velvet komplex gombákban az ivaros szaporodást és a szekunder metabolizmust kapcsolja össze (Bayram és mtsai, 2008). Az *rsmA* túltermelése nem csak az ivaros szaporodás elmaradását eredményezte, hanem az ST termelésre is hatással volt, mivel 100-szor több termelődött belőle *A. nidulans*ban (Yin és mtsai., 2013). Másik példát szolgáltatja az AtfA-hoz és AtfB-hez hasonlóan, a *S. cerevisiae yap1* ortológ *napA* gén overexpressziója, aminek következtében csökkent az ST, emericellin, aszpertecín, shamixanthon és epishamixanthon termelés és ezzel egyidőben az ivaros szaporodásról az ivartalan szaporodás felé történő eltolódás következett be (Yin és mtsai., 2013). *F. verticilloides*ben is hasonló fenotípust tapasztaltak, vagyis az *FvatfA* deletált mutánsban a kisebb méretű és kevesebb spóra termelődése, csökkent mikrokonídium képződése mellett a fumonizin termelés elmaradását igazolták (Szabó és mtsai., 2020). Eredményeink szerint a $\Delta atfA$ mutánsban volt hasonló zavar az ivaros szaporodásban, amivel egyidőben az ST szintézis leállása is bekövetkezett (**14. ábra**).

Az AtfB esetében megállapíthatjuk, hogy a hő-és nehézfémstresszel szembeni érzékenységben tölt be fontos szerepet (**6. ábra**), emellett a konídiospórák mennyiségének (**9. ábra**) és méretének meghatározásában (**10. ábra**) is. Az *A. nidulans*on végzett korábbi génexpressziós tanulmány szerint a $CdCl_2$ az *atfB* gén expresszióját a kontroll törzsben alulszabályozta. Az *atfB* expressziójában nem következett be változás a $\Delta atfA$ mutánsban (a transzkriptom adat hozzáférési száma: GSE166128) (Emri és mtsai., 2021). A fenotípus vizsgálataink szerint ezzel a nehézfém stresszel szemben az *atfB* túltermelő mutáns toleranciája csökkenést mutatott (**6. ábra**).

Az általunk végzett aszexuális szaporodás vizsgálatok révén kiderült, hogy ha az *atfB*-t túltermeltetjük, akkor a konídiospórák száma csökkent, méretük viszont a kontroll törzs spóráihoz viszonyítva növekedett, valamint az *abaA* gén expressziója is emelkedett (Adams és mtsai., 1998). Az *atfBOE* törzsnél a kontrollhoz képest az átlagos spóraméretben szignifikáns különbség volt tehát tapasztalható (**9-12. ábra**).

Hasonló eredményre példaként megemlíthető a *Beauveria bassiana* fonalas entomopatogén faj, amelyben a $\Delta wetA$ mutánsban az *abaA* gén expressziójának 90%-os csökkenése, valamint ezzel egyidejűleg kisebb konídiumméret volt tapasztalható (Li és mtsai., 2015). A *F. graminearum abaA* overexpresszió pleiotróp zavarokat idézett elő, mint a szexuális és aszexuális fejlődést érintő zavarok, a konídiumok csírázásának időbeli eltolódása, de a mutáns trichotecén termelése is csökkent (Son és mtsai., 2013). *A. fumigatus*ban az *AfuabaA* túltermelés autolízist és sejthalált okozott (Tao és Yu, 2011). *A. oryzae*ben az AtfB konídium

képzésben betöltött szerepe szintén igazolást nyert, hiszen az ozmotikus stressz mellett csökkent konídiumképzést írtak le a $\Delta atfB$ mutánsban (Sakamoto és mtsai., 2008, 2009).

Emellett a $\Delta atfB$ mutáns életképessége csökkent 50 °C-on, 10 percig tartó hőstressz hatására (**7. ábra**), ami összhangban van az *A. oryzae*ben kapott eredményekkel, ahol szintén az *atfB* deléciója esetén tapasztaltak hőstresszel szembeni érzékenységet (Sakamoto és mtsai., 2008).

A bZIP transzkripciós faktorok fonalas gombákban a különböző fejlődési folyamatok, a stresszválaszok és a szekunder metabolit termelés fontos szabályozóiként szerepelnek (Kocsis és mtsai., 2022, 2023, Roze és mtsai., 2011; Yin és mtsai., 2012, 2013; Bákány és mtsai., 2021). Képesek homodimerek képzésére, de számos folyamat szabályozásában megfigyelték már más bZIP-típusú transzkripciós faktorokkal heterodimer képzésüket is vagy fizikai interakciójukat jelátviteli fehérjékkel (Reinke és mtsai., 2013).

Az *A. fumigatus* AtfA például három másik szintén bZIP transzkripciós faktorial, az AtfB, AtfC és AtfD TF-kal valamint a MAPK SakA-val lép interakcióba, és így stresszválaszok irányításában működnek közre (Silva és mtsai., 2021). Emberben az ATF-2 heterodimert képez a *S. cerevisiae* Yap1-el homológ Jun-nal vagy homodimert hoz létre a CRE kötőhelynél, amíg az *A. nidulans* AtfB homológ ATF-1 homodimer kialakítására képes (Hong és mtsai., 2012). *A. parasiticus*ban az AtfB és AP-1 bZIP-ek funkcionálisan aktív heterodimert hoznak létre, és az aflatoxin termelést és az oxidatív stresszválaszokat szabályozzák (Roze és mtsai., 2011), továbbá az AtfB az AtfA-val feltételezhetően oxidatív stressz hatására lép interakcióba (Hong és mtsai., 2012).

*A. nidulans*ban is elképzelhető az AtfA AtfB-vel való interakciója a közös target gének szabályozásában (Lara-Rojas és mtsai., 2011; Hong és mtsai., 2012), mivel az *A. nidulans* AtfB génje az *S. pombe* Atf1-el heterodimert képző Pcr1-el mutat hasonlóságot. Az *S. pombe*-ban az Atf1-Pcr1 által létrehozott heterodimer pedig transzkripciós aktivátorként vagy represszorként a kromatin remodellingben játszik szerepet (Hong és mtsai., 2012).

Bizonyos élettani funkciókat az AtfA és AtfB TF-k együttesen szabályoznak *A. nidulans*ban. Erre példa, hogy a $\Delta atfA atfB$ OE és $\Delta atfB atfA$ OE mutánsok voltak a legjelentősebb hőstresszel szembeni toleranciával jellemezhetők az összes többi mutánséhoz és a kontroll törzshöz képest (**7. ábra**). A dupla deléziós mutánsnál ($\Delta atfA \Delta atfB$) a fentebb már leírtak alapján a $\Delta atfA$ -hoz hasonlóan, elmaradt az ivaros termőtest képzése, ezzel szemben a $\Delta atfB atfA$ OE törzsnél több kleisztotécium termelődött a kontroll törzsszel összevetve. A $\Delta atfB atfA$ OE és $\Delta atfB$ esetében hasonló mennyiségben volt megfigyelhető képződésük (**8. ábra**).

Az ST termelésre vonatkozóan is érdekes megfigyeléseket tettünk. Habár a *ΔatfA* mutánsban ezen mikotoxin a detektálási határ alatti mennyiségben termelődött, a dupla deléció mutánsban (*ΔatfAΔatfB*) viszont ezen mikotoxin termelése nem állt le, az ST mennyisége összevethető volt a kontroll törzsével. Szintén érdekes eredmény az is, hogy a dupla túltermelő mutáns (*atfAOEatfBOE*) ST szintje csökkent, szemben a szimpla *atfAOE* és *atfBOE* mutánsokkal. Ezen eredmények arra engednek következtetni, hogy ezen mikotoxin termelése valószínűleg mindkét bZIP kontrollja alatt áll *A. nidulans*ban.

6.2. A transzkriptomikai adatok következtetései

Az AtfA által szabályozott gének

Az *Aspergillus* fajokban sok, az AtfA által közvetve vagy közvetlenül szabályozott gént azonosítottak már eddig, mint például az antioxidáns fehérjéket, hősokkfehérjéket, foszforelé rendszer szabályozó fehérjéit, vas-kén klaszter összeszerelő fehérjéket kódoló géneket továbbá a trehalóz és glikogén képződésben, a különböző szénhidrátok hasznosításában, a szekunder metabolitok szintézisében, valamint a konídiogenezis fény általi szabályozásában résztvevő géneket (Silva és mtsai., 2021; Emri és mtsai., 2015; Orosz és mtsai., 2017; Antal és mtsai., 2020; Sakamoto és mtsai., 2009; Hagiwara és mtsai., 2014, 2016; van Leeuwen és mtsai., 2013; Yu és mtsai., 2016; 2019).

Az általunk kapott transzkriptomikai adatok megerősítették, hogy az AtfA által szabályozott gének közé tartoznak (**7., 8. táblázatok** és a **Függelék 4. táblázata**):

- az antioxidáns enzimeket kódoló gének,
- a foszforelé-rendszert szabályozó gének,
- a trehalóz és glikogén metabolizmus gének,
- a glükóz hasznosításban résztvevő gének,
- a szekunder metabolit klaszterek génjei,
- fényfüggő gének (ld. lentiéknél).

A citoplazmában lévő FphA fitokróm (vörös fényt érzékelő szenzor) a nagy ozmolaritás ellen fellépő glicerinválasz (HOG) MAPK útvonalon keresztül aktiválja az AtfA-t *A. nidulans*ban (Yu és mtsai., 2016, 2019). Ennek megfelelően az AtfA néhány fényfüggő gén működését is szabályozta (**9. és a Függelék 1. táblázata**). Ilyen fényfüggő gén volt a *cryA*, amely egy feltételezett UV-A/kékfény szenzort (kriptokrómot) kódoló gén (Bayram és mtsai., 2008). A HOG útvonal kék fény-függő aktivációja csak az FphA géntől függ, a kék fény-érzékelő LreA és LreB komplexnek viszont nincs ebben szerepe. Erre magyarázatként az szolgál, hogy egy másik kék fény-receptor (pl.: a *CryA*) vesz részt ebben a folyamatban, a működését pedig

valamilyen módon az FphA szabályozza (Yu és mtsai., 2016). A *cryA* AtfA-függő transzkripciója (9. és a **Függelék 1. táblázata**) is alátámasztja a kék és vörös fényfüggő jelátviteli útvonalak közötti interakciót.

A tenyésztési körülmény (MSB kezelés és stresszor nélküli tenyésztés) hatása

A konídiumok stressztoleranciája jelentős mértékben függ a tenyésztési körülményektől a konidiogenezis során (Hallsworth és mtsai., 1994; Rangel és mtsai., 2015; Hagiwara és mtsai., 2017; de Vries és mtsai., 2017). A micélium MSB stresszel való kezelése hatással volt a micélium és konídium transzkriptomra egyaránt (5., 6. táblázat). Az AtfA szabályozó szerepét a tenyésztési körülmények is meghatározták, mivel különböző gének mutattak AtfA-függést MSB-stresszhez adaptálódott és MSB-vel nem kezelt tenyészetek esetében (5., 6. táblázat). Az AtfA-függést mutató géncsoportok közötti különbség sokkal egyértelműbb volt a vegetatív micéliumokban a konídiumokhoz képest (5., 6. táblázat). Úgy gondoljuk, hogy a konídiumok a konidiogenezis során alkalmazkodnak az MSB-hez. Mivel a konidiogén sejtek képesek megváltoztatni a konídiumok mRNS tartalmát, így azok a legvalószínűbben a csírázás során megjelenő stresszhatásokkal szemben már felkészülten tudnak reagálni.

Az *atfA* és *atfB* konídiumokban mutatott jelentősebb transzkripciós aktivitása

Az *atfA* nagyobb mértékben expresszáldott a konídiumokban, mint a micéliumokban (16. ábra), emellett az *atfA* gén deléciója genomszintű transzkripciós, valamint fenotípusos következményekkel járt együtt (5., 6. táblázat; Leiter és mtsai., 2021., Kocsis és mtsai., 2022). Ezen adatok arra utalnak, hogy az AtfA-függő szabályozás fontos szerepet játszik a micéliumban és konídiumban egyaránt. Az adatok viszont alátámasztják azt is, hogy az AtfA sokkal fontosabb szabályozó szereppel bír a konídiumokban, mint a vegetatív micéliumokban (16. ábra, 5., 6. táblázat). Erre példa, hogy az AtfA a konídiumok számára biztosított védelmet hőmérsékleti stresszekkel (4 és 50 °C), valamint oxidatív stresszel szemben is (Hagiwara és mtsai., 2008; Balázs és mtsai., 2010). De az AtfA más *Aspergillus* fajok esetében is jelentős szerepet töltött be a konídium-specifikus gének szabályozásában. Egy átfogó tanulmányban igazolták, hogy a konídium-asszociált gének (CAG) több, mint 50%-a AtfA-függést mutat *A. fumigatus*-ban, *A. oryzae*-ban és *A. niger*-ben (Hagiwara és mtsai., 2016).

A vegetatív micéliumokban az *atfB* transzkripciós szintje alacsony, a konídiumokban ezzel ellentétben az *atfB* mRNS szintje magas volt (16. ábra), vagyis ezen TF a vegetatív növekedésben csak csekély szabályozó szerepet tölt be. Ezt az is alátámasztotta, hogy az *atfB*

gén deléciója csak elhanyagolható transzkriptomikai (**5., 6. táblázat**) és fenotípusos változásokat (Kocsis és mtsai., 2022) eredményezett.

A transzkriptomikai eredmények legfőbb következtetései:

- 1) Az AtfA-nak és AtfB-nek a micéliumban is van néhány szabályozó funkciója, azonban a konídiumokban fontosabb szerepet látnak el.
- 2) Az antioxidáns enzimeket kódoló, foszforelé rendszert koordináló, szekunder metabolizmus klaszter és fényfüggő gének szabályozása mellett az AtfA irányítja a szénhidrát metabolizmusban közreműködő géneket (pl. trehalóz és glikogén metabolizmus gének illetve a glükóz hasznosításban résztvevő gének) is, mint ahogy ezt az *A. fumigatus*-ban is igazolták már (Silva és mtsai., 2021).
- 3) A két transzkripció faktor között összetett genetikai és feltételezhetően fizikai interakció áll fenn. Ezen interakcióban az AtfA domináns szerepe kulcsfontosságú. Feltehetően az AtfB fő feladata pedig az AtfA szabályozó szerepének támogatása.

Megállapítottuk, hogy az AtfB-függő gének többségét az AtfA is szabályozza (**17. ábra, 5., 6., Függelék 2. táblázata**). Ezt korábban már *A. oryzae*-ben is leírták, ahol szintén a legtöbb AtfB által szabályozott stresszérzékenységet mutató gén AtfA-függést is mutatott (Sakamoto és mtsai., 2009).

- Néhány ilyen kettős, azaz AtfA- és AtfB-függést is mutató gén normál expressziójához mindkét génre szükség volt (AB-vel jelölt gének, **17. ábra, 5., 6. táblázat, a Függelék 2. táblázata**). Elképzelhető annak lehetősége is, hogy ezen gének némelyikét az AtfA-AtfB által alkotott heterodimer szabályozza, ez azonban kísérletes igazolásra szorul.
- Az AtfA-, AtfB-függő gének többségénél a két TF-ből az egyik teljesen vagy részlegesen képes helyettesíteni a hiányzó TF-t (A/B és A-B gének, **17. ábra, 5., 6. táblázat, a Függelék 2. táblázata**). Közülük néhány gént közvetlenül mindkét TF szabályoz, amelynek háttérében szintén a két TF promóter régiói közötti fizikai interakciót lehet feltételezni.

A transzkriptomikai adatok szerint az *atfB* is AtfA-függést mutatott, ugyanis az *atfA* deléciója alulszabályozta az *atfB*-t a micélium és konídium mintákban egyaránt, függetlenül attól, hogy MSB kezelést alkalmaztunk vagy sem (**16. ábra**). Következésképpen a mindkét gén szabályozása alatt álló gének közül néhány AtfB-függő, amelyeket az AtfA csak közvetve az *atfB* transzkripción keresztül szabályoz.

Tanulmányunk révén azonosítottunk néhány olyan AtfB-függő gént, amely nem mutatott AtfA-függést (**5., 6. táblázat és a Függelék 1. és 4. táblázata**). Erre példa a *calA*, ami a konídiumok

csírázásáért felelős, ami magyarázatként szolgál a $\Delta atfB$ magas hőmérséklettel szembeni érzékenységére (Kocsis és mtsai., 2022, 2023).

7. Összefoglalás

Jelen doktori értekezésben az *A. nidulans* fonalas gomba bZIP-típusú transzkripciós faktorait kódoló *atfA* és *atfB* géneknek a funkcionális analízisét, valamint újgenerációs RNS szekvenálással a deléciós mutánsok (a $\Delta atfA$, $\Delta atfB$, $\Delta atfA\Delta atfB$) transzkriptomikai tanulmányozását hajtottuk végre. Az *atfA* és *atfB* gének élettani funkcióinak analíziséhez először létrehoztuk a deléciós és a túltermelő mutánsokat az összes kombinációban: $\Delta atfA$, $\Delta atfB$, $\Delta atfA\Delta atfB$, $\Delta atfAatfBOE$, $\Delta atfBatfAOE$, *atfAOE*, *atfBOE* és *atfAOEatfBOE*.

Az alábbi jelentősebb következtetéseket tudtuk levonni kísérleteink alapján az **AtfA**-ról illetve **AtfB**-ről:

- A $\Delta atfA$ mutáns oxidatív stresszre való érzékenységét diamid, *t*BOOH és menadionnal történő kezeléskor egyaránt bizonyítottuk.
- Az ivaros szaporodás és a szekunder metabolizmus között fennálló kapcsolatot jól szemléltette a $\Delta atfA$ mutánsban az ivaros szaporodásban bekövetkező zavar, ami együttjárt a ST szintézis leállásával. Az ivaros szaporodást vizsgáló kísérleteinkben tehát a $\Delta atfA$ és a $\Delta atfA\Delta atfB$ mutánsoknál gátolt, a $\Delta atfB$ és $\Delta atfBatfAOE$ törzsek esetében viszont fokozott kleisztotécium képződést figyeltünk meg.
- A micélium és konídium mintáknál egyaránt a $\Delta atfA$ -nál jóval nagyobb mennyiségben találtunk differenciálisan expresszált géneket (DEG) a $\Delta atfB$ -hez képest.
- Az MSB kezelés a micélium mintáknál illetve az *atfA* deléciója a micélium és konídium mintáknál egyaránt az *atfB* alulszabályozását okozta, vagyis az AtfA az *atfB* aktiválását idézte elő.
- Az AtfA-függő gének között sok szénhidrát metabolizmusban résztvevő gént azonosítottunk, mint például a glikolitikus géneket a konídiumok esetében, továbbá egyes szekunder metabolit génklaszterek transzkriptjének szintje is AtfA-függő szabályozást mutatott, emellett a kataláz és hisztidin-tartalmú foszfortranszfer fehérjéket kódoló gének AtfA-függését is sikerült igazolni az összes vizsgált kísérleti körülményben.
- A CdCl₂-dal tesztelt nehézfémstressz vizsgálatainkból arra a következtetésre jutottunk, hogy mivel a $\Delta atfAatfBOE$ mutáns enyhe, az *atfBOE* és *atfAOEatfBOE* törzsek viszont jelentősebb érzékenységgel reagáltak, így többek között az AtfB a CdCl₂-érzékenységben tölt be fontos szerepet.

- Az AtfB másik fontos szerepe a hőstresszel szembeni védelemben volt, deléciójakor csökkent életképesség volt jellemző az 50 °C-os hőstressz hatására. A *ΔatfAatfBOE* és *ΔatfBatfAOE* mutánsok életképessége viszont fokozódott.
- Megfigyeltük továbbá, hogy az AtfB a konídiospórák mennyiségét és méretét is meghatározza. Az AtfB túltermelés hatására csökkent a konídiospórák száma, ezzel ellentétben viszont méretük a kontroll törzshöz képest növekedett. A konídiofórok fejlődését szabályozó *abaA* gén (locus ID: AN0422) expressziója is növekedett az *atfBOE* mutánsban az RT-qPCR eredményei szerint.
- A transzkriptomikai adatok alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy az AtfB-függő gének az AtfA-tól is függttek.
- Az összes transzkriptomikai adat alapján csak 23 db AtfB-függő gént találtunk, példaként említhető meg egy feltételezett- α -glikozidáz (*agdB*), egy feltételezett- α -amiláz, a *calA*, amelynek a konídiumok korai csírázásában van szerepe és egy alternatív oxidáz.

Eredményeink arra utalnak, hogy bizonyos élettani folyamatok szabályozásában mind az AtfA, mind az AtfB részt vesz. Az *atfA* és *atfB* mRNS szintje sokkal magasabb volt a konídiospórákban, emellett nagyobb számban mutattuk ki az AtfA és AtfB-függő géneket is ebben a fejlődési stádiumban, tehát ezek a gének jelentősebb szabályozó szereppel bírnak a spórákban, mint a vegetatív szövetben.

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

- 1) Hőstressz elleni védelem: A *ΔatfAatfBOE*, *ΔatfBatfAOE* mutánsok mutatták a legnagyobb toleranciát hőstresszel szemben.
- 2) Kleisztotécium képzés: A *ΔatfA* és a *ΔatfAΔatfB* törzsből az ivaros szaporodás elmaradt, ezzel szemben a *ΔatfBatfAOE* törzsből hasonló mennyiségű kleisztotécium képződött, mint a *ΔatfB* mutánsban, illetve a két utóbbi mutánsban szignifikánsan nagyobb volt a kleisztotéciumok száma, mint a kontrollban.
- 3) Konídiospóra képzés: Mind az *atfA* deléciója, mind az *atfB* túltermelése csökkentette a konídiumok számát. Az *atfA* túltermelése önmagában, illetve az *atfB* gén deléciójával együtt is növelte a konídiospórák számát.
- 4) ST termelés: A *ΔatfA* ST termelése a kimutatási határ alatt maradt, míg a dupla túltermelő, valamint a *ΔatfAatfBOE*, *ΔatfBatfAOE* mutánsok ST termelése is csökkent a kontrollhoz képest.

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

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

8. Summary

In this doctoral thesis we performed the functional analysis of the *atfA* and *atfB* genes encoding the bZIP-type transcription factors of the filamentous fungus *A. nidulans* and we also carried out the transcriptomic study of the deletion mutants ($\Delta atfA$, $\Delta atfB$, $\Delta atfA\Delta atfB$) using next-generation RNA sequencing. To analyze the physiological functions of the *atfA* and *atfB* genes, first we generated the deletion and overexpression mutants in all combinations, namely: $\Delta atfA$, $\Delta atfB$, $\Delta atfA\Delta atfB$, $\Delta atfAatfBOE$, $\Delta atfBatfAOE$, *atfAOE*, *atfBOE* and *atfAOEatfBOE*.

We reached the following major conclusions based on our experiments about **AtfA** and **AtfB**:

- The sensitivity of the $\Delta atfA$ mutant to oxidative stress in the presence of diamide, *t*BOOH as well as menadione was also proved.
- The relationship between sexual reproduction and secondary metabolism was well reflected by the disturbances in sexual reproduction in the $\Delta atfA$ mutant, which was accompanied by the inhibition of ST synthesis. According to our experiments the cleistothecium formation was hindered in the $\Delta atfA$ and $\Delta atfA\Delta atfB$ mutants, but increased in the $\Delta atfB$ and $\Delta atfBatfAOE$ strains.
- In both the mycelium and conidium samples we found differentially expressed genes (DEGs) in much higher number in the $\Delta atfA$ compared to $\Delta atfB$ strain.
- The MSB treatment in the mycelium samples and the deletion of *atfA* both in the mycelium and conidium samples caused the downregulation of *atfB* therefore AtfA induces the activation of *atfB*.
- Among the AtfA-dependent genes we identified many genes involved in carbohydrate metabolism such as glycolytic genes in conidia; the transcript level of some secondary metabolite gene clusters also showed AtfA-dependent regulation and the AtfA-dependence of the genes encoding catalase and histidine-containing phosphotransfer proteins was also confirmed in all tested experimental conditions.
- Based on our stress sensitivity assays with the heavy metal CdCl₂, we concluded that AtfB plays an important role in CdCl₂ sensitivity, since the $\Delta atfAatfBOE$ mutant reacted mild sensitivity, while the *atfBOE* and *atfAOEatfBOE* strains showed significant sensitivity to this heavy metal.

- Another important role of the AtfB is in the protection against heat stress, since its deletion resulted in a reduced viability after heat stress at 50 °C. Meanwhile the viability of the *ΔatfAatfBOE* and *ΔatfBatfAOE* mutants increased compared to the control.
- AtfB also influences the amount and size of conidiospores. As a result of the *atfB* overexpression the number of conidiospores decreased, while their size increased compared to the control strain. The expression of the *abaA* gene (locus ID: AN0422) regulating the development of conidiophores, also increased in the *atfBOE* mutant according to the RT-qPCR results.
- Based on the transcriptomic data, we concluded that the AtfB-dependent genes were also dependent on AtfA.
- Based on all transcriptomic data, only 23 AtfB-dependent genes were found, examples include a putative α -glycosidase (*agdB*), a putative α -amylase, *calA*, which has a role in the early germination of conidia, and an alternative oxidase.

Our results indicate that some physiological functions are governed by AtfA as well as AtfB. The mRNA levels of *atfA* and *atfB* were much higher in conidiospores and the AtfA- and AtfB-dependent genes are also more abundant in this developmental stage, therefore these genes have a more significant regulatory role in spores than in vegetative tissue.

Both AtfA and AtfB can probably coordinate the following functions:

- 1) Heat stress defense: The *ΔatfAatfBOE*, *ΔatfBatfAOE* mutants showed the most significant tolerance to heat stress.
- 2) Cleistothecium production: In the *ΔatfA* and *ΔatfAΔatfB* strains sexual reproduction hindered, contrarily the *ΔatfBatfAOE* strain produced similar amount of cleistothecia as the *ΔatfB* mutant. The number of cleistothecia were significantly greater in *ΔatfBatfAOE* and *ΔatfB* mutants than that in the control strain.
- 3) Formation of conidia: Both the deletion of *atfA* and overexpression of *atfB* reduced the number of conidia. Overexpression of *atfA* alone and with the deletion of *atfB* increased the number of conidia.
- 4) ST production: ST production of the *ΔatfA* mutant remained under the limit of detection, and the ST production of the *atfAOEatfBOE*, *ΔatfAatfBOE*, *ΔatfBatfAOE* mutants also reduced compared to the control.

To sum it up, according to our results an interaction between AtfA and AtfB is feasible, which can regulate the expression of genes involved in stress tolerance, sexual and asexual reproduction and secondary metabolite production. To prove the physical interaction between AtfA and AtfB, we are planning to perform the following experiments: determination of the AtfA and AtfB binding sites on the promoters by chromatin immunoprecipitation sequencing (ChIP-Seq) and confirmation of AtfA-AtfB heterodimer formation by bimolecular fluorescence complementation (BiFC) technique.

9. Irodalomjegyzék

9.1. Az értekezésben hivatkozott közlemények jegyzéke

- Adams TH, Wieser JK, Yu JH. (1998) Asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62:35–54. doi: 10.1128/MMBR.62.1.35-54.1998.
- Amaike S, Keller NP (2011) *Aspergillus flavus*. Annu Rev Phytopathol. 107-133. doi: 10.1146/annurev-phyto-072910-095221.
- Antal K, Gila BC, Pócsi I, Emri T. (2020) General stress response or adaptation to rapid growth in *Aspergillus nidulans*? Fungal Biol. 124:376-386. doi: 10.1016/j.funbio.2019.10.009.
- Bákány B; Yin W-B, Dienes B, Nagy T, Leiter É, Emri T, Keller NP, Pócsi I. (2021) Study on the bZIP-type transcription factors NapA and RsmA in the regulation of intracellular reactive species levels and sterigmatocystin production of *Aspergillus nidulans*. Int. J. Mol. Sci. 22: 15777. doi: 10.3390/ijms222115777.
- Balázs A, Pócsi I, Hamari Z, Leiter É, Emri T, Miskei M, Oláh J, Tóth V, Hegedus N, Prade RA, Molnár M, Pócsi I. (2010) AtfA bZIP-type transcription factor regulates oxidative and osmotic stress responses in *Aspergillus nidulans*. Mol. Gen. Genomics 283:289-303. doi: 10.1007/s00438-010-0513-z.
- Barratt RW., Johnson GB., Ogata WN. (1965): Wild-type and mutant stocks of *Aspergillus nidulans*. Genetics 52:233-246. doi: 10.1093/genetics/52.1.233.
- Bayram O, Krappmann S, Ni M, Bok JW, Helmstaedt K, Valerius O Braus-Stromeyer S, Kwon N-J, Keller NP, Yu J-H, Braus GH. (2008) VelB/VeA/LaeA complex coordinates light signal with fungal development and secondary metabolism. Science. 320:1504–1506. doi: 10.1126/science.1155888.
- Bennett JW. (2008) An Overview of the Genus *Aspergillus*. caister.com/aspergillus2. Plant Biology (SEBS). doi:10.1201/9781420008517-6.
- Brookman JL, Denning DW (2000). Molecular genetics in *Aspergillus fumigatus*. Curr. Opin. Microbiol. 3: 468-474. doi: 10.1016/s1369-5274(00)00124-7.
- Bullock E, Underwood JGV, Roberts JC. (1962) Studies in mycological chemistry. 11. Structure of isosterigmatocystin and an amended structure for sterigmatocystin. J. Chem. Soc. 10, 4179–4183.
- Chomczynski P. (1993) A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. BioTechniques. 15:532-534, 536-537.
- Christensen U, Gruben BS, Madrid S, Mulder H, Nikolaev I, de Vries RP. (2011) Unique regulatory mechanism for D-galactose utilization in *Aspergillus nidulans*. Appl. Environ. Microbiol. 77:7084-7087. doi: 10.1128/AEM.05290-11.

- Csillag K, Emri T, Rangel Drauzio EN, Pócsi I (2023) pH-dependent effect of Congo Red on the growth of *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus niger*. *Fungal Biol.* 127: :1180-1186. doi: 10.1016/j.funbio.2022.05.006.
- Davies MJ. (1989) Detection of peroxy and alkoxy radicals produced by reaction of hydroperoxides with rat liver microsomal fractions, *Biochem. J.* 257:603-606. doi: 10.1042/bj2570603.
- de Vries RP, Riley R, Wiebenga A, Aguilar-Osorio G, Amillis S, Uchima CA, Anderluh G, Asadollahi M, Askin M, Barry K, Battaglia E, Bayram Ö, Benocci T, Braus-Stromeier SA, Caldana C, Cánovas D, Cerqueira G C, Chen F, Chen W, Choi C, Clum A, Santos RACD, Damásio ArdL, Diallinas G, Emri T, Fekete E, Flipphi M, Freyberg S, Gournas C, Habgood R, Hainaut M, Harispe ML, Henrissat B, Hildén KS, Hope R, Hossain A, Karabika E, Karaffa L, Karányi Zs, Kraševc N, Kuo A, Kusch H, LaButti K, Lagendijk EL, Lapidus A, Levasseur A, Lindquist E, Lipzen A, AF Logrieco, MacCabe A, Mäkelä MR, Malavazi I, Melin P, Meyer V, Mielnichuk N, Miskei M, Molnár ÁP, Mulé G, Ngan CY, Orejas M, Orosz E, JP Ouedraogo, Overkamp KM, Park H-S, Perrone G, Piumi F, Punt PJ, Ram AFJ, Ramón A, Rauscher S, Record E, Riaño-Pachón DM, Robert V, Röhrig J, Ruller R, Salamov A, Salih NS, Samson RA, Sanguinetti M, Schütze T, Sepčić K, Shelest E, Sherlock G, Sophianopoulou V, Squina FM, Sun H, Susca A, RB Todd, Tsang A, SE Unkles, van de Wiele N, van Rossen-Uffink D, JV de Castro Oliveira, Vesth TC, Visser J, Yu J-H, Zhou M, Andersen MR, Archer DB, Baker SE, Benoit I, Brakhage AA, Braus GH, Fischer R, JC Frisvad, 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 Biol.* 18:28. doi: 10.1186/s13059-017-1151-0.
- Delgado-Virgen F, Guzman-de-Peña D. (2009) Mechanism of sterigmatocystin biosynthesis regulation by pH in *Aspergillus nidulans*. *Braz. J. Microbiol.* 40:933-942. doi: 10.1590/S1517-838220090004000027.
- Emri T, Szarvas V, Orosz E, Antal K, Park H, Han K-H, Yu J-H, Pócsi I. (2015). Core oxidative stress response in *Aspergillus nidulans*. *BMC Genomics.* 16:478. doi: 10.1186/s12864-015-1705-z.
- Fekete E, Karaffa L, Seiboth B, Fekete E, Kubicek CP, Flipphi M. (2012) Identification of a permease gene involved in lactose utilisation in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet. Biol.* 49:415-425. doi: 10.1016/j.fgb.2012.03.001.
- Fekete E, Orosz A, Kulcsár L, Kavalecz N, Flipphi M, Karaffa L. (2016) Characterization of a second physiologically relevant lactose permease gene (*lacpB*) in *Aspergillus nidulans*. *Microbiology (Reading, Engl.)*. 162:837-847. doi: 10.1099/mic.0.000267.
- Flipphi M, Sun J, Robellet X, Karaffa L, Fekete E, Zeng A-P, Kubicek CP. (2009) Biodiversity and evolution of primary carbon metabolism in *Aspergillus nidulans* and other *Aspergillus* spp. *Fungal Genet. Biol.* 46 Suppl 1:S19-S44. doi: 10.1016/j.fgb.2008.07.018.
- Galagan JE, Calvo SE, Cuomo C, Ma L-J, Wortman JR, Batzoglou S, Lee S-I, Bastürkmen M, Spevak CC, Clutterbuck J, Kapitonov V, Jurka J, C Scazzocchio C, Farman M, Butler J,

- Purcell S, Harris S, Braus GH, Draht O, Busch S, D'Enfert C, Bouchier C, Goldman GH, Bell-Pedersen D, Griffiths-Jones S, Doonan JH, Yu J, Vienken K, Pain A, Freitag M., Selker EU, Archer DB, Peñalva MA, Oakley BR, Momany M, Tanaka T, Kumagai T, Asai K, Machida M, Nierman WC, Denning DW, Caddick M, Hynes M, Paoletti M, Fischer R, B Miller R, P Dyer P, Sachs MS, Osmani SA, Birren BW. (2005) Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae*. *Nature*. 438:1105-1115. doi: 10.1038/nature04341.
- Geiser DM, Timberlake, WE, Arnold ML. (1996) Loss of meiosis in *Aspergillus*. *Mol. Biol. Evol.* 13:809–817. doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a025641.
- Gila BC, Antal K, Birkó Z, Keserű JS, Pócsi I, Emri T. (2022) Strategies shaping the transcription of carbohydrate-active enzyme genes in *Aspergillus nidulans*. *J. Fungi (Basel)*. 8:79. doi: 10.3390/jof8010079.
- Gila BC, Moon H, Antal K, Hajdu M, Kovács R, Jónás AP, Pusztahelyi T, Yu JH, Pócsi I, Emri T. (2021) The DUG pathway governs degradation of intracellular glutathione in *Aspergillus nidulans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 87:e01321-20. doi: 10.1128/AEM.01321-20.
- Guan N, Li J, Shin H-D, Du G, Chen J, Liu L. (2017) Microbial response to environmental stresses: from fundamental mechanisms to practical applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 101:3991-4008. doi: 10.1007/s00253-017-8264-y.
- Guelfi A, Azevedo RA, Lea PJ, Molina SMG. (2003) Growth inhibition of the filamentous fungus *Aspergillus nidulans* by cadmium: an antioxidant enzyme approach. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 49:63-73. doi: 10.2323/jgam.49.63.
- Guo M, Guo W, Chen Y, Dong S, Zhang X, Zhang H, Song W, Wang W, Wang Q, Lv R, Zhang Z, Wang Y, Xiaobo Z. (2010) The basic leucine zipper transcription factor Moatf1 mediates oxidative stress responses and is necessary for full virulence of the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 23:1053–1068. doi: 10.1094/MPMI-23-8-1053.
- Hagiwara D, Asano Y, Yamashino T és Mizuno T. (2008) Characterization of bZip-type transcription factor AtfA with reference to stress responses of conidia of *Aspergillus nidulans*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 72:2756–2760. doi: 10.1271/bbb.80001.
- Hagiwara D, Asano Y, Marui J, Yoshimi A, Mizuno T, Abe K. (2009) Transcriptional profiling for *Aspergillus nidulans* HogA MAPK signaling pathway in response to fludioxonil and osmotic stress. *Fungal Genet. Biol.* 46:868–878. doi: 10.1016/j.fgb.2009.07.003.
- Hagiwara, D, Suzuki S, Kamei K, Gono T, Kawamoto S. (2014) The role of AtfA and HOG MAPK pathway in stress tolerance in conidia of *Aspergillus fumigatus*. *Fungal Genet. Biol.* 73:138–149. doi: 10.1016/j.fgb.2014.10.011.
- Hagiwara D, Takahashi H, Kusuya Y, Kawamoto S, Kamei K, Gono T. (2016) Comparative transcriptome analysis revealing dormant conidia and germination associated genes in *Aspergillus* species: an essential role for AtfA in conidial dormancy. *BMC Genomics.* 17:358. doi: 10.1186/s12864-016-2689-z.

- Hagiwara D, Sakai K, Suzuki S, Umemura M, Nogawa T, Kato N, Osada H, Watanabe A, Kawamoto S, Gono T, Kamei K. (2017) Temperature during conidiation affects stress tolerance, pigmentation, and tryptacidin accumulation in the conidia of the airborne pathogen *Aspergillus fumigatus*. *PloS One* 12:e0177050. doi: 10.1371/journal.pone.0177050.
- Hajjar JD, Bennett JW, Bhatnagar D, Bahu R. (1989) Sterigmatocystin production by laboratory strains of *Aspergillus nidulans*. *Mycol. Res.* 93:548–551. doi: 10.1016/S0953-7562(89)80052-8.
- Hallsworth JE, Magan N. (1994) Improved biological control by changing polyols/trehalose in conidia of entomopathogens. *Bright Crop Prot. Conf. Pests Dis.* 8D:1091-1096.
- Hatsuda, Y, Kuyama, S. (1954) Studies on the metabolic products of *Aspergillus versicolor*. Part 1. Cultivation of *Aspergillus versicolor*, isolation and purification of metabolic products. *J. Agric. Chem. Soc. Jpn.* 28, 989–991.
- Hatsuda, Y, Kuyama, S, Terashima, N. (1954) Studies on the metabolic products of *Aspergillus versicolor*. Part 2. Physical and chemical properties and the chemical structure of sterigmatocystin. *J. Agric. Chem. Soc. Jpn.* 28, 992–998.
- Hong S-Y, Roze LV, Linz JE. (2013) Oxidative stress-related transcription factors in the regulation of secondary metabolism. *Toxins.* 5: 683-702. doi:10.3390/toxins5040683.
- Hong S-Y, Roze LV, Wee J, Linz JE. (2012) Evidence that a transcription factor regulatory network coordinates oxidative stress response and secondary metabolism in *aspergilli*. *MicrobiologyOpen.* 2:144-160. doi: 10.1002/mbo3.63.
- Houbraken J, Samson RA. (2011) Phylogeny of *Penicillium* and the segregation of *Trichocomaceae* into three families. *Stud. Mycol.* 70:1-51. doi: 10.3114/sim.2011.70.01.
- Inglis DO, Binkley J, Skrzypek MS, Arnaud MB, Cerqueira GC, Shah P, Wymore F, Wortman JR, Sherlock G. (2013) Comprehensive annotation of secondary metabolite biosynthetic genes and gene clusters of *Aspergillus nidulans*, *A. fumigatus*, *A. niger* and *A. oryzae*. *BMC Microbiol.* 13:91. doi: 10.1186/1471-2180-13-91.
- Jiang C, Zhang S, Zhang Q, Tao Y, Wang C, Xu J-R. (2015) FgSKN7 and FgATF1 have overlapping functions in ascosporeogenesis, pathogenesis and stress responses in *Fusarium graminearum*. *Environ. Microbiol.* 17:1245-1260. doi: 10.1111/1462-2920.12561.
- Kim D, Langmead B, Salzberg SL. (2015) HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements. *Nat. Methods.* 12:357-360. doi: 10.1038/nmeth.3317.
- Kim YJ, Yu YM, Maeng PJ. (2017) Differential control of asexual development and sterigmatocystin biosynthesis by a novel regulator in *Aspergillus nidulans* *Sci. Rep.* 7:46340. doi: 10.1038/srep46340.

- Király A, Hámori C, Gyémánt G, Kövér KE, Pócsi I, Leiter É. (2020a) Characterization of *gfdb*, putatively encoding a glycerol 3-phosphate dehydrogenase in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Biol.* 124:352–360. doi: 10.1016/j.funbio.2019.09.011.
- Király A, Szabó IG, Emri T, Leiter É, Pócsi I. (2020b) Supplementation of *Aspergillus glaucus* with *gfdb* gene encoding a glycerol 3-phosphate dehydrogenase in *Aspergillus nidulans*. *J. Basic Microbiol.* 60:691-698. doi: 10.1002/jobm.202000067.
- Kitamoto K. (2015) Cell biology of the Koji mold *Aspergillus oryzae*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 79:863-869. doi: 10.1080/09168451.2015.1023249.
- Klejnstrup ML, Frandsen RJN, Holm DK., Nielsen MT, Mortensen UH, Larsen TO, Nielsen JB (2012) Genetics of Polyketide Metabolism in *Aspergillus nidulans*. *Metabolites.* 2:100–133. doi: 10.3390/metabo2010100.
- Knuf C, Nielsen J. (2012) *Aspergilli*: Systems biology and industrial applications. *Biotechnol. J.* 7:1147-1155. doi: 10.1002/biot.201200169.
- Kocsis B, Lee M.-K, Yu J.-H, Nagy T, Daróczy L, Batta G, Pócsi I, Leiter É. (2022) Functional analysis of the bZIP-type transcription factors AtfA and AtfB in *Aspergillus nidulans*. *Front. Microbiol.* 13:1003709. doi: 10.3389/fmicb.2022.1003709.
- Kocsis B, Lee M.-K, Antal K, Yu J.-H, Pócsi I, Leiter É, Emri T. (2023) Genome-Wide Gene Expression Analyses of the AtfA/AtfB-Mediated Menadione Stress Response in *Aspergillus nidulans*. *Cells.* 12:463. doi: 10.3390/cells12030463.
- Kong Q, Wang L, Liu Z, Kwon N-J, Kim SC, Yu J-H. (2013) G β -like CpcB plays a crucial role for growth and development of *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus fumigatus*. *PLoS One.* 8:e70355. doi: 10.1371/journal.pone.0070355.
- Kosower NS, Kosower EM. (1995) Diamide: an oxidant probe for thiols. *Methods Enzymol.* 251:123-133. doi: 10.1016/0076-6879(95)51116-4.
- Kumar A. (2020) *Aspergillus nidulans*: A potential resource of the production of the native and heterologous enzymes for industrial applications. *Int. J. Microbiol.* 2020:8894215. doi: 10.1155/2020/8894215.
- Kwon NJ, Shin K-S, Yu J-H. (2010) Characterization of the developmental regulator FlbE in *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet. Biol.* 47:981-993. doi: 10.1016/j.fgb.2010.08.009.
- Landschulz WH, Johnson PF, McKnight SL. (1988) The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science.* 240:1759-1764. doi: 10.1126/science.3289117.
- Lara-Rojas F, Sanchez O, Kawasaki L, Aguirre J. (2011) *Aspergillus nidulans* transcription factor AtfA interacts with the MAPK SakA to regulate general stress responses, development and spore functions. *Mol. Microbiol.* 80:436-454. doi: 10.1111/j.1365-2958.2011.07581.x

- Leiter É, Park H-S, Kwon N-J, Han K-H, Emri T, Oláh, V, Mészáros I, Dienes B, Vincze J, Csernoch L, Yu J-H, Pócsi I. (2016) Characterization of the *aodA*, *dnmA*, *mnSOD* and *pimA* genes in *Aspergillus nidulans*. *Sci. Rep.* 6:20523. doi: 10.1038/srep20523.
- Leiter É, Emri T, Pákozdi K, Hornok L, Pócsi I. (2021) The impact of bZIP Atf1 ortholog global regulators in fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 105:5769-5783. doi: 10.1007/s00253-021-11431-7.
- Li F, Shi H-Q, Ying S-H és Feng M-G. (2015) WetA and VosA are distinct regulators of conidiation capacity, conidial quality, and biological control potential of a fungal insect pathogen. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99:10069–10081. doi: 10.1007/s00253-015-6823-7.
- Lima DMCG, Costa TPC, Emri T, Pócsi I, Pupin B, Rangel DEN. (2021) Fungal tolerance to Congo red, a cell wall integrity stress, as a promising indicator of ecological niche, *Fungal Biol.* 125:646-657. doi: 10.1016/j.funbio.2021.03.007.
- Liu Y, Gong X, Li M, Si H, Zhou Q, Liu X, Fan Y, Zhang X, Han J, Gu S, Dong J. (2021) Effect of osmotic stress on the growth, development and pathogenicity of *Setosphaeria turcica*. *Front Microbiol.* 12: 706349. doi: 10.3389/fmicb.2021.706349.
- Love MI, Huber W, Anders S. (2014) Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* 15:550. doi: 10.1186/s13059-014-0550-8.
- Metzenberg RL, Glass NL. (1990) Mating type and mating strategies in *Neurospora*. *Bioessays* 12:53-59. doi: 10.1002/bies.950120202.
- Mousavi B, Hedayati MT, Hedayati N, Ilkit M, Syedmousavi S. (2016): *Aspergillus* species in indoor environments and their possible occupational and public health hazards. *Curr. Med. Mycol.* 2:36-42. doi: 10.18869/acadpub.cmm.2.1.36.
- Nathues E, Joshi S., Tenberge KB, von den Driesch M, Oeser B, Bäumer N, Mihlan M, Tudzynski P. (2004) CPTF1, a CREB-like transcription factor, is involved in the oxidative stress response in the phytopathogen *Claviceps purpurea* and modulates ROS level in its host *Secale cereale*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 17:383-393. doi: 10.1094/MPMI.2004.17.4.383.
- Nekam L, Polgar P. (1948) The inhibitory effect of a mold upon staphylococcus. *Urol. Cutaneous Rev.* 52:372-373.
- Nguyen TV, Kröger C, Bönnighausen J, Schäfer W, Bormann J. (2013) The ATF/CREB transcription factor Atf1 is essential for full virulence, deoxynivalenol production, and stress tolerance in the cereal pathogen *Fusarium graminearum*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 26:1378-1394. doi: 10.1094/MPMI-04-13-0125-R.
- Nimmanee P, Woo PCY, Vanittanakom P, Youngchim S, Vanittanakom N. (2014) Functional analysis of *atfA* gene to stress response in pathogenic thermal dimorphic fungus *Penicillium marneffeii*. 9:e111200. doi: 10.1371/journal.pone.0111200.

- Orosz E, Antal K, Gazdag Z, Szabó Z, Han K-H, Yu J-H, Pócsi I, Emri T. (2017) Transcriptome-based modeling reveals that oxidative stress induces modulation of the AtfA dependent signaling networks in *Aspergillus nidulans*. *Int. J. Genom.* 2017:6923849. doi: 10.1155/2017/6923849.
- Płaza G, Lukasik W, Ulfing K. (1998) Effect of cadmium on growth of potentially pathogenic soil fungi. *Mycopathologia.* 141:93-100. doi: 10.1023/a:1006991306756.
- Pócsi I, Miskei M, Karányi Z, Emri T, Ayoubi P, Pusztahelyi T, Balla G, Prade RA. (2005) Comparison of gene expression signatures of diamide, H₂O₂ and menadione exposed *Aspergillus nidulans* cultures-linking genome-wide transcriptional changes to cellular physiology. *BMC Genomics.* 6:182. doi: 10.1186/1471-2164-6-182.
- Pócsi I, Prade RA, Penninckx MJ. (2004) Glutathione, altruistic metabolite in fungi. *Adv. Microb. Physiol.* 49:1-76. doi: 10.1016/S0065-2911(04)49001-8.
- Pontecorvo G, Roper JA, Hemmons LM, Macdonald KD, Bufton AWJ. (1953) The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Adv. Genet.* 5:141-238. doi: 10.1016/s0065-2660(08)60408-3.
- Powers-Fletcher MV, Kendall BA, Griffin AT, Hanson KE. (2016) Filamentous Fungi. *Microbiol Spectr.* 4. doi: 10.1128/microbiolspec.DMIH2-0002-2015.
- Pöther D-C, Liebeke M, Hochgráfe F, Antelmann H, Becher D, Lalk M, Lindequist U, Borovok I, Cohen G Aharonowitz Y, Hecker M. (2009) Diamide triggers mainly S thiolations in the cytoplasmic proteomes of *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 191:7520-7530. doi:10.1128/JB.00937-09.
- Qi X, Guo L, Yang L, Huang J. (2013) Foatf1, a bZIP transcription factor of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, is involved in pathogenesis by regulating the oxidative stress responses of Cavendish banana (*Musa* spp.). *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 84:76-85. doi:10.1016/j.pmpp.2013.07.007.
- Ramadan SE, Razak AA, Soliman HG. (1988) Influence of cadmium on certain biological activities in a cadmium-tolerant fungi. *Biol. Trace Elem. Res.* 18:179-190. doi:10.1007/BF02917502.
- Rangel DEN, Braga GUL, Fernandes ÉKK, Keyser CA, Hallsworth JE, Roberts DW. (2015) Stress tolerance and virulence of insect-pathogenic fungi are determined by environmental conditions during conidial formation. *Curr. Genet.* 61:383–404. doi: 10.1007/s00294-015-0477-y.
- Rank C, Nielsen KF, Larsen TO, Varga J, Samson RA, Frisvad JC. (2011) Distribution of sterigmatocystin in filamentous fungi. *Fungal Biol.* 115:406-420. doi: 10.1016/j.funbio.2011.02.013.
- Ráduly Zs, Szabó L, Madar A, Pócsi I, Csernoch L (2020) Toxicological and Medical Aspects of *Aspergillus*-Derived Mycotoxins Entering the Feed and Food Chain. *Front Microbiol.* 9:10:2908. doi: 10.3389/fmicb.2019.02908. eCollection 2019.

- Reinke AW, Baek J, Ashenberg O, Keating AE. (2013) Networks of bZIP protein-protein interactions diversified over a billion years of evolution. *Science*. 340:730-734. doi: 10.1126/science.1233465.
- Reyes-Dominguez Y, Bok JW, Berger H, Shwab EK, Basheer A, Gallmetzer A, Scazzocchio C, Keller N, Strauss J. (2010) Heterochromatic marks are associated with the repression of secondary metabolism clusters in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol*. 76:1376-1386. doi: 10.1111/j.1365-2958.2010.07051.x. Epub 2010 Feb 1.
- Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. (2010) edgeR: a Bioconductor package for differential expression. *Bioinform*. 26:139-140. doi: 10.1093/bioinformatics/btp616.
- Roze LV, Chanda A, Wee J, Awad D, Linz JE. (2011) Gene Regulation: Stress-related transcription factor AtfB integrates secondary metabolism with oxidative stress response in *Aspergilli*. *J. Biol. Chem*. 286:35137-35148. doi: 10.1074/jbc.M111.253468.
- Rush GF, Alberts D. (1986) *tert*-butyl hydroperoxide metabolism and stimulation of the pentose phosphate pathway in isolated rat hepatocytes, *Toxicol. Appl. Pharmacol*. 85:324-31. doi: 10.1016/0041-008x(86)90339-x.
- Sakamoto K, Arima T-h, Iwashita K, Yamada O, Gomi K, Akita O. (2008) *Aspergillus oryzae atfB* encodes a transcription factor required for stress tolerance in conidia. *Fungal Genet. Biol*. 45:922-932. doi: 10.1016/j.fgb.2008.03.009.
- Sakamoto K, Iwashita K, Yamada O, Kobayashi K, Mizuno A, Akita O, Mikami S, Shimoi H, Gomi K. (2009) *Aspergillus oryzae atfA* controls conidial germination and stress tolerance. *Fungal Genet. Biol*. 46:887-897. doi: 10.1016/j.fgb.2009.09.004.
- Samson RA, Visagie CM, Houbraken J, Hong S-B, Hubka V, Klaassen CHW, Perrone G, Seifert KA, Susca A, Tanney JB, Varga J, Kocsubé S, Szigeti G, Yaguchi T, Frisvad JC. (2014) Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Stud. Mycol*. 78:141–173. doi: 10.1016/j.simyco.2014.07.004.
- Sansó M, Gogol M, Ayté J, Seidel C, Hidalgo E. (2008) Transcription factors Pcr1 and Atf1 have distinct roles in stress- and Sty1-dependent gene regulation. *Eukaryot. Cell*. 7:826-835. doi: 10.1128/EC.00465-07.
- Selye J. Életünk és a stress (The stress of life). (Ford. Both Miklós.) 6. kiadás., (1973) Budapest. Akadémiai Kiadó, Alföldi ny. Debrecen. 57 p.
- Shaaban MI, Bok JW, Lauer C, Keller NP. (2010) Suppressor mutagenesis identifies a velvet complex remediator of *Aspergillus nidulans* secondary metabolism. *Eukaryot. Cell*. 9:1816-1824. doi: 10.1128/EC.00189-10.
- Shelest E. (2008) Transcription factors in fungi. *FEMS Microbiol. Lett*. 286:145-51. doi: 10.1111/j.1574-6968.2008.01293.x.
- Silva LP, de Castro PA, Reis TFD, Paziani MH, Von Zeska Kress MR, Riaño-Pachón DM, Hagiwara D, Ries LNA, Brown NA, Goldman GH. (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. *Cell. Microbiol.* 19. doi: 10.1111/cmi.12681.
- Silva LP, Horta MAC, Goldman GH. (2021) Genetic interactions between *Aspergillus fumigatus* basic leucine zipper (bZIP) transcription factors AtfA, AtfB, AtfC and AtfD. *Front. Fungal Biol.* 2:632048. doi: 10.3389/ffunb.2021.632048.
- Son H, Kim MG, Min K, Seo YS, Lim JY, Choi GJ, Kim J-C, Chae S-K, Lee Y-W. (2013) AbaA regulates conidiogenesis in the ascomycete fungus *Fusarium graminearum*. *PLoS One.* 8:e72915. doi: 10.1371/journal.pone.0072915.
- Springer ML, Yanofsky C. (1989) A morphological and genetic analysis of conidiophore development in *Neurospora crassa*. *Genes Dev.* 3:559-571. doi: 10.1101/gad.3.4.559.
- Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, Paulovich A, Pomeroy SL, Golub TR, Lander ES, Mesirov JP. (2005) Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102:15545-15550. doi: 10.1073/pnas.0506580102.
- Szabó Z, Pákozdi K, Murvai K, Pusztahelyi T, Kecskeméti Á, Gáspár A, Logrieco AF, Emri T, Ádám AL, Leiter É, Hornok L, Pócsi I. (2020) *FvatfA* regulates growth, stress tolerance as well as mycotoxin and pigment productions in *Fusarium verticillioides*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 104:7879-7899. doi: 10.1007/s00253-020-10717-6.
- Szewczyk E, Nayak T, Oakley CE, Edgerton H, Xiong Y, Taheri-Talesh N, Osmani SA, Oakley BR. (2006) Fusion PCR and gene targeting in *Aspergillus nidulans*. *Nat. Protoc.* 1:3111-3120. doi: 10.1038/nprot.2006.405.
- Takeda T, Toda T, Kominami K, Kohnosu A, Yanagida M, Jones N. (1995) *Schizosaccharomyces pombe* atf1+ encodes a transcription factor required for sexual development and entry into stationary phase. *EMBO J.* 14:6193-6208. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1995.tb00310.x>
- Tamas MJ, Rep M, Thevelein JM, Hohmann S. (2000) Stimulation of the yeast high osmolarity glycerol (HOG) pathway: evidence for a signal generated by a change in turgor rather than by water stress. *FEBS Lett.* 472:159-165. doi: 10.1016/s0014-5793(00)01445-9.
- Tao L, Yu JH. (2011) AbaA and WetA govern distinct stages of *Aspergillus fumigatus* development. *Microbiology.* 157:313–326. doi: 10.1099/mic.0.044271-0.
- Temme N, Oeser B, Massaroli M, Heller J, Simon A, Collado IG, Viaud M, Tudzynski P. (2012) BcAtf1, a global regulator, controls various differentiation processes and phytotoxin production in *Botrytis cinerea*. *Mol. Plant Pathol.* 13:704–718. doi: 10.1111/j.1364-3703.2011.00778.x.
- Toledano MB, Delaunay A, Biteau B, Spector D, Azevedo D. (2003) Oxidative stress responses in yeast. *Yeast stress responses. Topics in Current Genetics.* Hohmann S, Mager WH (szerk.), Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 246 p.

- van Leeuwen MR, Krijghsheld P, Bleichrodt R, Menke H, Stam H, Stark J, Wösten HA; Dijksterhuis J. (2013) Germination of conidia of *Aspergillus niger* is accompanied by major changes in RNA profiles. *Stud. Mycol.* 74: 59–70. doi: 10.3114/sim0009.
- Vargas-Pérez I, Sánchez O, Kawasaki L, Georgellis D és Aguirre J. (2007) Response regulators SrrA and SskA are central components of a phosphorelay system involved in stress signal transduction and asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot. Cell.* 6:1570-1583. doi: 10.1128/EC.00085-07.
- Watson G, Ronai ZA, Lau E. (2017) ATF2, a paradigm of the multifaceted regulation of transcription factors in biology and disease. *Pharmacol. Res.* 119:347-357. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2017.02.004>
- Wee, J, Hong S-Y, Roze LV, Day DM, Chanda A, Linz JE. (2017) The fungal bZIP transcription factor AtfB controls virulence-associated processes in *Aspergillus parasiticus*. *Toxins (Basel).* 9:287. doi: 10.3390/toxins9090287
- Yin W-B, Amaike S, Wohlbach DJ, Gasch AP, Chiang Y-M, Wang CCC, Bok JW, Rohlf M, Keller NP. (2012) An *Aspergillus nidulans* bZIP response pathway hardwired for defensive secondary metabolism operates through aflR. *Mol. Microbiol.* 83:1024-1034. doi: 10.1111/j.1365-2958.2012.07986.x.
- Yin, W-B, Reinke AW, Szilágyi M, Emri T, Chiang Y-M, Keating, AE, Pócsi I, Wang CCC, Keller NP. (2013) bZIP transcription factors affecting secondary metabolism, sexual development and stress responses in *Aspergillus nidulans*. *Microbiology (Reading, Engl.).* 159:77-88. doi: 10.1099/mic.0.063370-0.
- Yu J-H, Leonard TJ. (1995) Sterigmatocystin biosynthesis in *Aspergillus nidulans* requires a novel type I polyketide synthase. *J. Bacteriol.* 177:4792-4800. doi: 10.1128/jb.177.16.4792-4800.1995.
- Yu J-H, Hamari Z., Han K-H, Seo J-A., Reyes-Dominguez Y, Scazzocchio C. (2004) Double-joint PCR: a PCR-based molecular tool for gene manipulations in filamentous fungi. *Fungal Genet. Biol.* 41:973-981. doi: 10.1016/j.fgb.2004.08.001.
- Yu Z, Armant O, Fischer R. (2016) Fungi use the SakA (HogA) pathway for phytochrome-dependent light signalling. *Nat. Microbiol.* 1:16019. doi: 10.1038/nmicrobiol.2016.19.
- Yu Z, Fischer R. (2019) Light sensing and responses in fungi. *Nat. Rev. Microbiol.* 17:25-36. doi: 10.1038/s41579-018-0109-x.
- Zhao J, Peng M, Chen W, Xing X, Shan Y, Fan Z, Shi Y, Li H, Yang X, Li H, Chen L. (2022) Transcriptome analysis and functional validation identify a putative bZIP transcription factor, Fpkapc, that regulates development, stress Responses, and virulence in *Fusarium pseudograminearum*. *Phytopathology.* 112:1299-1309. doi: 10.1094/PHYTO-12-21-0520-R.

9.2. A jelölt saját közleményeinek a Kenézy Élettudományi Könyvtár által ellenőrzött jegyzéke



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

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

Nyilvántartási szám: DEENK/49/2024.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

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

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

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





További közlemények

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

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 15,017

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

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

Debrecen, 2024.02.15.



10. Társszerzői hozzájárulások, nem saját eredmények

- A értekezésben vizsgált deléciós mutánsokat (*ΔatfA*, *ΔatfB* és a dupla deléciós *ΔatfAΔatfB* mutáns) Dr. Mi-Kyung Lee (Koreai Biotudományi és Biotechnológiai Kutatóintézet (KRIBB), Biológiai Erőforrás Központ, Jeongeup-si, Koreai Köztársaság) állította elő.
- A műszeres méréseket Dr. Daróczy Lajos, Dr. Nagy Tibor és Dr. Batta Gyula végezték.
- Az újgenerációs RNS szekvenálást Dr Póliska Szilárd és a Genomi Medicina és Bioinformatikai Szolgáltató Laboratórium munkatársai készítették el.
- A transzkriptomikai adatokat Dr. Antal Károly és Prof. Dr. Emri Tamás értékelték ki.

11. Tárgyszavak

Aspergillus nidulans, bZIP típusú transzkripciós faktorok, *atfA* és *atfB*, sterigmatocisztin mikotoxin, stresszérzékenységi vizsgálatok, ivaros és ivartalan szaporodás, transzkriptomika

12. Keywords

Aspergillus nidulans, bZIP-type transcription factors, *atfA* and *atfB*, sterigmatocystin mycotoxin, stress sensitivity studies, sexual and asexual reproduction, transcriptomics

13. Köszönetnyilvánítás

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

14. Függelék I.

Az értekezés egyes kiegészítő jellegű adatokat (ábrákat, táblázatokat) azok terjedelme miatt, az eredeti publikációkhoz hasonlóan online elérhetőségük megadásával mutatja be.

Függelék 1. táblázat: Az *atfA* és *atfB*-függő gének listája és tulajdonságai. <https://www.mdpi.com/article/10.3390/cells12030463/s1>

Függelék 2. táblázat: A micélium és a konídiummintákban *atfA*-és *atfB*-függést egyaránt mutató gének listája, tulajdonságai és RPKM értékei. <https://www.mdpi.com/article/10.3390/cells12030463/s1>

Függelék 3. táblázat: Az *atfA* és *atfB*-függő gének géncsoport dúsulási analíziseinek eredményei. <https://www.mdpi.com/article/10.3390/cells12030463/s1>

Függelék 4. táblázat: Az *atfA* és *atfB*-függő gének jellemzése ismert vagy feltételezett funkcióik alapján. <https://www.mdpi.com/article/10.3390/cells12030463/s1>

Függelék 5. táblázat:

Set0	MSB kezelt vad típus vs. kezelés nélküli vad típus (MSB kezelés hatására represszálódó gének)
Set0+	MSB kezelt vad típus vs. kezelés nélküli vad típus (MSB kezelés hatására aktiválódó gének)
Set1	$\Delta atfA$ vs. vad típus (<i>atfA</i> deléció mellett represszálódó gének)
Set2	$\Delta atfB$ vs. vad típus (<i>atfB</i> deléció mellett represszálódó gének)
Set3	$\Delta atfA\Delta atfB$ vs. vad típus (<i>atfA</i> és <i>atfB</i> együttes deléciója mellett represszálódó gének)
Set4	$Set1 \setminus (Set2 \cup Set3)$
Set5	$Set2 \setminus (Set1 \cup Set3)$
Set6	$Set3 \setminus (Set1 \cup Set2)$ (A/B gének)
Set7	$(Set1 \cap Set2) \setminus Set3$
Set8	$(Set1 \cap Set3) \setminus Set2$ (AA és A-B gének)
Set9	$(Set2 \cap Set3) \setminus Set1$ (BB és A-B gének)
Set10	$Set1 \cap Set2 \cap Set3$ (AB és A-B gének)
Set11	$\Delta atfA\Delta atfB$ vs. $\Delta atfB$ (<i>atfA</i> gén deléció mellett represszálódó gének)
Set12	$\Delta atfA\Delta atfB$ vs. $\Delta atfA$ (<i>atfB</i> gén deléció mellett represszálódó gének)
Set13	Set3
Set14	$Set11 \setminus (Set12 \cup Set13)$
Set15	$Set12 \setminus (Set11 \cup Set13)$
Set16	$Set13 \setminus (Set11 \cup Set12)$ AB gének)
Set17	$(Set11 \cap Set12) \setminus Set13$
Set18	$(Set11 \cap Set13) \setminus Set12$ (AA és A-B gének)
Set19	$(Set12 \cap Set13) \setminus Set11$ (BB és A-B gének)
Set20	$Set11 \cap Set12 \cap Set13$ (A/B és A-B gének)
Set21	$Set11 \cap Set12 \cap Set13$ (A/B és A-B gének)
Set22	$Set9 \cap Set19$ (BB gének)
Set23	$Set10 \cap Set16$ (AB gének)
Set24	$Set20 \cap Set6$ (A/B gének)
Set25	$Set10 \cap Set20 \cup (Set8 \cap Set20) \cup (Set9 \cap Set20) \cup (Set18 \cap Set10) \cup (Set19 \cap Set10)$ (A-B gének; az A-B 1-5 géncsoportok összessége)
Set26	$Set21 \cup Set23 \cup Set24 \cup Set25$ (AtfA függő gének)
Set27	$Set22 \cup Set23 \cup Set24 \cup Set25$ (AtfB függő gének)

15. Függelék II.

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények teljes terjedelmükben.