



1949

***Az *Aspergillus fumigatus* humán patogén gombafaj  
stresszválaszainak vizsgálata***

Egyetemi doktori (PhD) értekezés

A szerző neve: Dr. Kurucz Vivien

Témavezető neve: Dr. Emri Tamás

DEBRECENI EGYETEM

Természettudományi és Informatikai Doktori Tanács

Juhász Nagy Pál Doktori Iskola

Debrecen, 2020

*Ezen értekezést a Debreceni Egyetem Természettudományi és Informatikai Doktori Tanács **Juhász Nagy Pál** Doktori Iskola **Fermentációs Biotechnológiai és Biomérenői** programja keretében készítettem a Debreceni Egyetem **természettudományi/műszaki doktori (PhD)** fokozatának elnyerése céljából. Nyilatkozom arról, hogy a tézisekben leírt eredmények nem képezik más PhD disszertáció részét.*

*Debrecen, 2020.*

.....  
*a jelölt aláírása*

*Tanúsítom, hogy **Dr. Kurucz Vivien** doktorjelölt **2012-2015** között a fent megnevezett Doktori Iskola **Fermentációs Biotechnológiai és Biomérenői** programjának keretében irányításommal végezte munkáját. Az értekezésben foglalt eredményekhez a jelölt önálló alkotó tevékenységével meghatározóan hozzájárult. Nyilatkozom továbbá arról, hogy a tézisekben leírt eredmények nem képezik más PhD disszertáció részét. Az értekezés elfogadását javasolom.*

*Debrecen, 2020.*

.....  
*a témavezető aláírása*

**Az *Aspergillus fumigatus* humán patogén gombafaj stresszválaszainak vizsgálata**

**Investigation of stress responses of the human pathogenic fungal species *Aspergillus fumigatus***

Értekezés a doktori (Ph.D.) fokozat megszerzése érdekében  
a Biológia tudományágban

Írta: **Dr. Kurucz Vivien** okleveles gyógyszerész

Készült a Debreceni Egyetem **Juhász-Nagy Pál** doktori iskolája  
(**Fermentációs Biotechnológiai és Biomérnöki** programja) keretében

Témavezető: Dr. Emri Tamás

A doktori szigorlati bizottság

elnök: Dr. Magura Tibor .....  
tagok: Gálné Dr. Miklós Ida .....  
Dr. Gazdag Zoltán .....

A doktori szigorlat időpontja: 2019.10.30.

Az értekezés bírálói:

Dr. ....  
Dr. ....

A bírálóbizottság:

elnök: Dr. ....  
tagok: Dr. ....  
Dr. ....  
Dr. ....  
Dr. ....

Az értekezés védésének időpontja: 20.....

## Tartalomjegyzék

1. Bevezetés.....	1
2. Szakirodalmi áttekintés .....	5
2.1. Az <i>Aspergillus</i> genus és az <i>Aspergillus fumigatus</i> jellemzése .....	5
2.2. Az <i>Aspergillus fumigatus</i> patogenezise.....	11
2.3. Az <i>Aspergillus fumigatus</i> vas anyagcseréje .....	15
2.4. A kadmium biológiai vonatkozásai .....	18
2.4.1. A kadmium toxicitásának háttere .....	20
2.4.2. A kadmium detoxifikációja .....	21
2.4.2.1. A kadmium felvétel mérséklése.....	21
2.4.2.2. A kadmium eltávolítása a sejtekből .....	22
2.4.2.3. A kadmium megkötése a sejtekben .....	23
3. Eredmények.....	24
3.1. A vaséhezással kombinált oxidatív stressz hatása az <i>A. fumigatus</i> Af293 törzsrre .....	24
3.1.1. Transzkriptomikai és proteomikai adatok összehasonlítása .....	24
3.1.2. A stresszkezelések hatása az <i>A. fumigatus</i> tenyészetekre .....	29
3.1.2.1. A vaséhezés hatásai (-Fe/-H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> vs. +Fe/-H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) .....	29
3.1.2.2. Hidrogén-peroxid kezelés hatása a kontroll tenyészetekre (+Fe/+H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> vs. +Fe/-H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ).....	35
3.1.2.3. A vashiány és a hidrogén-peroxid kezelés kombinált hatása a kontroll tenyészetekre (-Fe/+H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> vs. +Fe/-H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) .....	35
3.1.2.4. A hidrogén-peroxid által indukált oxidatív stressz hatása a vashiányos tenyészetekre (-Fe/+H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> vs. -Fe/-H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ).....	37
3.2. Az <i>A. fumigatus</i> kadmium toleranciájának vizsgálata.....	39
3.2.1. Eltérő eredetű <i>A. fumigatus</i> törzsek kadmium érzékenységének összehasonlítása .....	39
3.2.2. Eltérő kadmium érzékenyséű törzsek összehasonlító vizsgálata .....	41
3.2.3. A kadmium tolerancia potenciális gyakorlati jelentősége.....	46
4. Eredmények megbeszélése.....	49
4.1. Omikai eredmények megbeszélése.....	49
4.1.1. Vaséhezéshez történő alkalmazkodás .....	49
4.1.2. Az oxidatív stressz hatása a vashiányos tenyészetekre.....	52
4.1.3. Az <i>A. fumigatus</i> néhány, orvosi szempontból fontos tulajdonságainak változása.....	56
4.2. A kadmium élettani hatásai .....	58
4.2.1. A kadmium tolerancia és a <i>pcaA</i> gén jelenlétének kapcsolata .....	58
4.2.2. A kadmium hatása az oxidatív stressztoleranciára és a fémion toleranciára ..	60
4.2.3. A kadmium tolerancia és a vasmetabolizmus kapcsolata.....	61
4.2.4. A nagy kadmium bioszorpciós kapacitás gyakorlati jelentősége .....	64
5. Anyagok és módszerek.....	65
5.1. A vizsgált gombatörzsek, törzsfenntartás.....	65
5.2. Az <i>Aspergillus fumigatus</i> törzsek izolálása és identifikálása .....	66
5.3. Az <i>Aspergillus fumigatus</i> tenyésztése folyékony tápközegben.....	69

5.3.1. A kadmium élettani hatásainak tanulmányozásához használt tenyészetek.....	69
5.3.2. Omikai vizsgálatokhoz használt tenyészetek.....	70
5.4. A tenyészetek növekedésének és életképességének vizsgálata .....	70
5.4.1. Szárazanyag tartalom (DCM) meghatározása .....	70
5.5. Glükózkoncentráció mérése .....	71
5.6. Fémionok és oxidatív ágensek növekedést gátló hatásának vizsgálata .....	71
5.7. A növekedést gátló szerek közötti interakció vizsgálata .....	72
5.8. Felületi <i>Aspergillus fumigatus</i> tenyészetek kadmium biszorpciójának tanulmányozása .....	73
5.9. Az oxidatív stresszválasz elemek detektálása .....	73
5.9.1. Diklorofluoreszcein (DCF) teszt.....	73
5.9.2. Antioxidatív enzimek aktivitásának mérése .....	74
5.9.3. A tenyészetek glutation (GSH) tartalmának mérése .....	75
5.10. Sziderofórok képződésének detektálása .....	76
5.10.1. Sziderofórkoncentrációk mérése HPLC eljárással.....	76
5.10.2. CAS (Chrome azurol S) assay .....	77
5.11. Transzkripciós vizsgálatok .....	77
5.11.1. RNS izolálás .....	77
5.11.2. RT-qPCR (reverztranszkripciós kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakció) .....	78
5.11.3. RNS szekvenálás .....	79
5.12. Proteomikai vizsgálatok .....	80
5.12.1. A minták előkészítése .....	80
5.12.2. LC-MS/MS mérés .....	81
5.12.3. MS/MS spektrumok elemzése.....	82
5.13. A transzkriptom és proteom adatok funkcionális elemzése .....	82
5.14. Állatkísérletek .....	84
6. Összefoglalás.....	86
7. Summary .....	92
8. Irodalomjegyzék.....	98
9. Mellékletek.....	125
10. Köszönetnyilvánítás .....	135
11. Tudományos közlemények jegyzéke.....	137

## Rövidítések jegyzéke

CAS	krómazurol S
DCF	2,7'-diklorofluoreszein
DCM	szárastömeg = dry cell mass
DHN-melanin	1,8-dihidroxi-naftalén-melanin
DTNB	5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzoát sav
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav
FC	ferrikrocin
G6PD	glükóz-6-foszfát dehidrogenáz
GPx	glutation peroxidáz
GR	glutation reduktáz
GSH	glutation (redukált)
GSSG	glutation-diszulfid (oxidált)
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	hidrogén-peroxid
HFC	hidroxi-ferrikrocin
iTRAQ	izobárikus jelölések a relatív és abszolút mennyiségi meghatározáshoz = isobaric tags for relative and absolute quantitation
MOPS	3-N-morfolinopropánszulfon sav
MSB	nátrium-menadion biszulfid
NADPH	nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát
NBT	nitro blue tetrazolium
RIA	reduktív vasfelvétel = reductive iron uptake
ROS	reaktív oxigén formák = reactive oxygen species

RT-qPCR	reverz transzkripció kvantitatív polimeráz lánreakció = reverse transcription quantitative polymerase chain reaction
SDS	nátrium-dodecil-szulfát
SOD	szuperoxid dizmutáz
TAE	tris-acetát-EDTA
TAFC	triacetil-fuzarinin C
tBOOH	<i>terc</i> -butilhidroperoxid
TEAB	tetraetilammónium-bromid

## 1. Bevezetés

Az *Aspergillus fumigatus* egy ubikviter, szaprotróf, oportunista patogén fonalas gomba. Bomló növényi maradványokban gazdag élőhelyeken a Föld nagy részén előfordul (Rhodes és Askew 2010). Az *Aspergillus* fajok által okozott humán fertőzések több, mint 90 %-áért ez a faj felelős (Paulussen és mtsai. 2016). Elsősorban a légző rendszeren keresztül jut be a szervezetbe, ahol – többek között – allergiás bronchopulmonáris aszpergillózist, aszpergillómát, illetve leginkább a legyengült immunrendszerű egyéneknél invazív aszpergillózist okozhat (Lalgé 1999; Park és Mehrad 2009). Az emberi szervezeten belül az *A. fumigatus*-nak többféle stresszel, illetve ezek kombinációjával is meg kell birkóznia. Ilyen tipikus stressz hatások a vaséhezés és az oxidatív stressz is (Brown és Goldman 2016). E két stressz szorosan kapcsolódik egymáshoz: a túl sok vas – redox aktivitásának köszönhetően – oxidatív stresszt generálhat, de a túl kevés vas is felboríthatja a sejtek redox egyensúlyát, hiszen számos antioxidáns enzim (pl. katalázok, peroxidázok) vasat igényel a működéséhez (Dlouhy és Outten 2013).

A stressz az emberi szervezeten kívül is alapvetően befolyásolja a gomba viselkedését. Az antropogén eredetű stresszhatások közül az egyik legjelentősebb a kadmium szennyezés okozta stressz (Godt és mtsai. 2006). A kadmium természetes körülmények között a cink-, réz- és ólomércekben fordul elő, következésképpen a vulkáni aktivitás ideiglenesen növelheti a természetben a helyi kadmiumkoncentrációkat. Jelentősebb kadmium szennyezés azonban jellemzően csak emberi tevékenység hatására (pl. kadmiummal szennyezett foszfát műtrágyák intenzív használata) alakul ki (Zhou és Qiu 2005; Chakraborty és mtsai. 2014; Tang és mtsai. 2016). Az emberi tevékenység következtében évente mintegy 13000 tonna kadmium



kerül ki környezetünkbe (Gallego és mtsai. 2012). A kadmium stressz szorosan kapcsolódik a vas anyagcseréhez (a kadmium transzportja gyakran vas transzporterek segítségével valósul meg) és bár a kadmium nem redox aktív fém, jelenléte oxidatív stressz kialakulásához is elvezet (Cuypers és mtsai. 2010; Rani és mtsai. 2014; Kukongviriyapan és mtsai. 2016).

Dolgozatomban a vaséhezés és oxidatív stressz közötti kölcsönhatásokat, valamint a kadmium stressz élettani hatásait vizsgáltam. Az első téma keretében arra voltunk kíváncsiak, hogy az emberi szervezetben való növekedéskor is jellemző vaséhezés hogyan befolyásolja a gomba oxidatív stresszel szembeni védekezését. Ezen vizsgálatok eredményei segíthetnek megérteni, hogy az *A. fumigatus* a vaséhezéssel kombinált oxidatív stresszhez hogyan alkalmazkodik, ami elvezethet új antifungális megoldások kifejlesztéséhez a jövőben. Annak érdekében, hogy megtaláljuk a válaszokat a kérdésekre, az alábbi vizsgálatok elvégzését terveztük:

- A kontroll (+Fe/-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) és hidrogén-peroxiddal kezelt (+Fe/+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), illetve a vaséhező (-Fe/-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) és a hidrogén-peroxiddal kezelt vaséhező (-Fe/+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) tenyészetekben a transzkriptom szintű változások detektálása RNS szekvenálás segítségével, illetve az RNS szekvenálással kapott eredmények ellenőrzése 26 gén esetében RT-qPCR mérésekkel;
- A fenti tenyészetekben a proteomikai vizsgálatok elvégzése LC-MS/MS készülékkel;
- A transzkriptom és proteom változások kiértékelése, illetve ezen eredmények alapján a vassal ellátott és a vaséhező tenyészetek oxidatív stresszválaszainak összehasonlítása.

A második téma keretében arra a kérdésre kerestük a választ, hogy az *A. fumigatus* Af293 törzs miért rezisztens a kadmiumra, illetve hogy kadmium toleranciája (de Vries és mtsai. 2017) kapcsolatba hozható-e vas anyagcseréjével és ezen keresztül befolyásolhatja-e *in vivo* virulenciáját. E vizsgálatok segíthetnek megérteni a kadmium tolerancia kialakulásának és mechanizmusának okait és hozzájárulhatnak nagy kadmium bioszorpciós potenciállal rendelkező *Aspergillus* törzsek, vagy kadmiumot nem akkumuláló szántóföldi növények kifejlesztéséhez. A kérdések megválaszolása érdekében az alábbi vizsgálatok elvégzését terveztük:

- Eltérő eredetű *A. fumigatus* törzsek kadmium toleranciájának összehasonlítása;
- A kadmium oxidatív stresszt kiváltó képességének ellenőrzése /igazolása a szuperoxid dizmutáz (SOD), kataláz, glükóz-6-foszfát dehidrogenáz (G6PD), glutation reduktáz (GR), glutation peroxidáz (GPx) antioxidatív enzimek specifikus aktivitásának és a sejtek glutation tartalmának mérésével, illetve a sejtek redox egyensúlyvesztésének vizsgálata 2,7'-diklorofluorescein (DCF) teszttel;
- A törzsek diamiddal, hidrogén-peroxiddal ( $H_2O_2$ ), *tert*-butil-hidroperoxiddal (tBOOH), illetve nátrium-menadion-biszulfittal (MSB) indukált oxidatív stresszel szembeni toleranciája és kadmium toleranciája közötti korreláció vizsgálata növekedési tesztek segítségével felületi kultúrákban;
- A törzsek  $FeCl_3$ ,  $CuSO_4$ ,  $ZnSO_4$ ,  $CoCl_2$ ,  $NiSO_4$  fémvegyületekkel szemben mutatott érzékenysége és kadmium toleranciája közötti kapcsolat vizsgálata felületi kultúrákban;

- A kadmium tolerancia mechanizmusának/háttérének kiderítése érdekében a *pcaA* gén transzkripciójának vizsgálata, illetve a törzsekben mért relatív transzkripciós értékek összevetése a kadmium tolerancia adatokkal;
- A vaséhező tényészetek intra- és extracelluláris sziderofórtartalmának meghatározása HPLC segítségével, majd a kapott adatok összevetése a törzsek kadmium toleranciájával;
- Eltérő kadmium toleranciájú törzsek bioszorpciós kapacitásának meghatározása atomemissziós spektrométerrel;
- Eltérő kadmium toleranciájú törzsek *in vivo* virulenciájának összehasonlítása.

## 2. Szakirodalmi áttekintés

### 2.1. Az *Aspergillus* genus és az *Aspergillus fumigatus* jellemzése

Az *Aspergillus* nemzetségbe több, mint 300 faj tartozik (Samson és mtsai. 2014). Az egyik legintenzívebben vizsgált gomba csoport, mivel jelentős élelmiszeripari, egészségügyi és biotechnológiai szerepe van (Gugnani 2003). Az *Aspergillus* fajok az *Ascomycota* törzs, *Peizizomycotina* altörzs, *Eurotiomycetes* osztály, *Eurotiales* rendjén belül a *Trichocomaceae* családba tartoznak (Lutzoni és mtsai. 2004). A jelenleg ebbe a taxonba sorolt fajok rDNS, ITS, illetve kalmodulin, parciális  $\beta$ -tubulin és RNS polimeráz II szekvenciáik szerint eredetüket tekintve monofiletikusak (Peterson 2008; Houbraken és mtsai. 2014). A szekvencia adatok alapján 8 alnemzetségre és 18 szekcióra tagolódik, melyek a következők: *Aspergillus* (*Aspergillus*, *Restricti*), *Candidi* (*Candidi*), *Circumdati* (*Circumdati*, *Nigri*, *Flavi*, *Cremeri*), *Fumigati* (*Fumigati*, *Clavati*, *Cervini*), *Nidulantes* (*Nidulantes*, *Usti*, *Sparsi*) *Ornati* (*Ornati*), *Terrei* (*Terrei*, *Flavipedes*), *Warcupi* (*Warcupi*, *Zonati*) (Samson és Varga 2010).

Az *Aspergillus* fajok telepei növekedés közben fonalas morfológiát mutatnak, ugyanakkor éhező körülmények között a hifáik képesek a feldarabolódásra (Emri és mtsai. 2004). Szeptált hifákkal rendelkeznek, a szeptumok egyszerű pórusai pedig lehetővé teszik az interszeptumok közötti szoros kapcsolatot. Több haploid mag is előfordulhat az interszeptumokban. A legtöbb sejtmag a hifacsúcsokban helyezkedik el. A sejtmagok rövid ideig fennálló diploid állapota csak az ivaros, illetve paraszexuális ciklusra jellemző (Jakucs és Vajna 2003). Az *Aspergillus* taxonómiában az egyik legfontosabb morfológiai karakter a konidiofór felépítése (Bennett 2010). A konidiofórok az ivartalan szaporodás során differenciálódnak; talpsejtből és az abból

kiinduló oldalelágazásból állnak. Az oldalelágazás végén elhelyezkedő vezikulumokhoz kapcsolódnak a konidiogén sejtek (fialidok). Ha a kapcsolódás közvetlenül történik, akkor uniszeriát típusról van szó, közvetett kapcsolódás esetén pedig biszeriát típusról beszélünk. A biszeriát konidiofóránál egy olyan sejtréteg ékelődik be a fialidok és a vezikulumok közé, amely nem termel konidiumot. Ezt a sejtréteget nevezzük a metulák rétegének. A kétféle felépítésű konidiofór akár egyszerre is jelen lehet a telepeken a tenyésztési körülményektől függően (Kevei és Kucsera 2010). A konidiofórokon fejlődő konidiumok (fialo konidium) gyakran színesek. Az *Aspergillus* fajok többségénél csak az aszexuális szaporodás ismert. Jelenleg azonban több kutatás is azt bizonyítja, hogy sok állítólagos obligát aszexuális *Aspergillus* faj valójában képes szexuális úton is szaporodni (O’Gorman és mtsai. 2009; Horn és mtsai. 2011). Ez azért is fontos jelenség, mert a szexuális ciklus jelenléte hatással van a faj populációbiológiájára, az antifungális rezisztencia gyorsabb kialakulására, ugyanakkor értékes genetikai eszközként szolgál a klasszikus genetikai elemzésekhez és a törzsek nemesítéséhez az iparban (Dyer és O’Gorman 2012). Az *Aspergillus* fajok többsége homotallikusan szaporodik (Dyer és O’Gorman 2012); a heterotallia csak elvétve fordul elő a nemzetségben (pl. *Aspergillus heterotallicus*, egyes *Neosartorya*, *Emericella* és *Petromyces* fajok). Az aszkuszok ovoid alakúak és zárt, kleisztotécium típusú termőtestekben képződnek (kivételt képez az *A. thecius*, ahol nem alakul ki kleisztotécium és így szabadon fejlődnek az aszkuszok). Az aszkuszokban 8 aszkospóra található (Dyer és O’Gorman 2012).

Az *Aspergillus* fajok életmódjukat tekintve jellemzően szaprofiták, így megtalálhatjuk őket a talajban (rizoszférában is), az avarban, a szénában és szalmában, a komposztban és más lebomló növényi maradványokban gazdag

habitatokban, de gyakoriak nedves, dohos épületekben is és előfordulhatnak sós, szikes talajokban, vagy akár tengerekben is. Léteznek opportunistá növényi, állati és humán patogén fajaik is. Például az *A. sydowii* a tengeri korall fajok fontos patogénje, egyes képviselőik lehetnek endofitonok és epifitonok is (Bruno és mtsai. 2011; Cai és mtsai. 2011; Xu és mtsai. 2015).

Az *Aspergillus* fajok kifejezetten magas páratartalmú közegben jelentős gazdasági károkat okozhatnak, mint raktári kártevők (Christensen és Kaufmann 1969), illetve mint a szántóföldi termények károsítói (Cotty és mtsai. 1994). Mikotoxintermelő képességük igen jelentős (Cole és Cox 1981). Az aflatoxinok az *Aspergillus* fajok által termelt mikotoxinok között a legtoxikusabbak és legkarcinogénebbek (Eaton és Groopman 1994; Bennett és Klich 2003). Az aflatoxinok olyan difurán-kumarin származékok, amelyek jelentős hőstabilitással bírnak. A legnagyobb mennyiségben olyan *Aspergillus* fajokban (pl. *A. pseudotamarii*, *A. nomius*, *A. flavus*, *A. parasiticus*) termelődnek, amelyek olajos magvakon (pl. szója, gyapotmag, napraforgó, mogyoró), illetve gabonanövényeken (pl. köles, búza, kukorica és rizs) élnek (Weidenböner 2001; Dagenais és Keller 2009). Az ochratoxinok dihidroizokumarin származékok, melyek amid kötéssel kapcsolódnak a  $\beta$ -fenilalaninhoz. Ezt a nefrotoxikus, karcinogén, mutagén, immunszuppresszív, teratogén hatású vegyületet először az *A. ochraceus*ból izolálták. Az *Aspergillus* fajok közül még az *A. niger* az a törzs, amelynek igazolták ochratoxin termelő képességét (Abarca és mtsai. 1994; Barkai-Golan 2008b). Elsősorban száraz élelmiszereken fordulnak elő (pl. kávé, száraz gyümölcsök, mogyoró). Szintén erősen mérgező, karcinogén vegyület az *A. giganteus*, *A. terreus*, *A. clavatus* és *A. nominus* által termelt patulin, amely károsíthatja a vesét, az emésztőszerveket, a lépét és a májat. Előfordul gyümölcsökben, zöldségekben, és az ezekből készült termékekben (Barkai-Golan 2008a). Az

*A. niveus* és *A. terreus* által termelt citrinin egy vesekárosító hatású toxin, amely leginkább gabonaféleségeken fordul elő (Turner és Aldridge 1981; Dame és mtsai. 2015).

Az *Aspergillus* fajokra nem csak kártevőként tekintünk, ugyanis számos lehetőség van - változatos enzim és metabolit termelésük miatt - biotechnológiai ipari, élelmiszeripari és gyógyszeripari felhasználásukra. Az *A. niger*-t például primer metabolitok (pl. citromsav, glükonsav) és enzimek (pl. glükóz oxidáz, amilázok, fitázok, proteázok és pektinázok) ipari termelésére alkalmazzák. Az *A. terreus*-t szekunder metabolitok (pl. lovasztatin, itakonsav és cisz-akonitsav) termeltetéséhez használják, míg az *A. pachicristatus*, *A. rugulosus*, *A. sydowi* és *A. aculeatus* fajokkal echinocandinokat állítanak elő (Ward és mtsai. 2005; Dagenais és Keller 2009; Okabe és mtsai. 2009; Jaivel és Marimuthu 2010). Az élelmiszeriparban az *A. oryzae*-t szójabab és rizs fermentációjához, szójaszószt és szaké előállításához alkalmazzák (Gugnani 2003; Dagenais és Keller 2009). Egyes kis proteáz termelésű *Aspergillus* törzsek (pl. *A. oryzae*, *A. niger* törzsek) intenzív fehérje szekréciónak köszönhetően alkalmasak lehetnek humánterápiás, vagy élelmiszeripari jelentőségű fehérjék (pl. laktoferrin, neokulin, taumatin) gazdaságos heterológ expressziójára ipari körülmények között is (Archer 2000; Abe és mtsai. 2006; Archer és Turner 2006; Fleissner és Dersch 2010). A szekunder metabolit gyártásban használt fajokat, más gombafajok, vagy akár növények szekunder metabolitjainak heterológ előállítására tervezik felhasználni (Anyag és Mortensen 2015). Sőt, az *Aspergillus* fajok, sejtfaluk igen nagy bioszorpció aktivitása miatt, az ipari szennyvizek tisztítására, vagyis nehézfém tartalmuk csökkentésére is alkalmasak lehetnek (Ahluwalia és Goyal 2007).

Az *Aspergillus* fajok között több opportunista humánpatogén fajt is ismerünk. Ezek közül kiemelendő az *A. niger*, *A. flavus* és az *A. fumigatus*. Ez utóbbit a leggyakoribb nem *Candida* típusú humánpatogén gombának tekintik. Többek között komoly légzőszervi kórképek kialakulásáért felelősek a szem és a fül fertőzései mellett (Gugnani 2003).

A *Fumigati* szekcióba tartozó *A. fumigatus* egy ubikviter, szaprotróf, opportunista patogén fonalas gomba. Az *Aspergillus* fajok által okozott humán fertőzések több, mint 90%-áért felelős (Paulussen és mtsai. 2016). Elsősorban bomló növényi maradványokban gazdag élőhelyeken fordul elő (Rhodes és Askew 2010). Az *A. fumigatus* egy fontos szereplő a komposztálási folyamatban, ahol központi szerepet játszik a szén és nitrogén újrafeldolgozásában (Rhodes és Askew 2010). Megtalálható az almozásra használt szalmában és a takarmányozásra használt szénában is (Marsh és mtsai. 1979; Gugnani 2003), fellelhető még gabonatarló tartályokban, kazánházakban, szaunákban és dohos épületekben (Marsh és mtsai 1979). Az igen változatos természetes környezetéhez való alkalmazkodása során számos olyan fiziológiai és metabolikus tulajdonságra tett szert, amelyek hozzájárulhatnak az emlős gazdaszervezethez történő alkalmazkodásához is (Rhodes és Askew 2010). A gomba termotoleranciája (37 °C-on nő a leggyorsabban, de elviseli az 50-55 °C-ot is, illetve 75 °C-ig képes túlélni) (Beffa és mtsai. 1998; Chang és mtsai. 2004; Tekaia és Latgé 2005) lehetővé teszi a gyors és erőteljes növekedést akár a komposztdombokban is. Ez a tulajdonsága hozzájárul opportunistásként való előfordulásához is (Rhodes és Askew 2010). Konidiumai bekebelezésük után képesek kicsírázni a protozoák fagolizozómáiban. Ez a jellemző viselkedés lehetővé teszi számukra, hogy túléljék a makrofágok támadását is az emberi szervezetben (Van Waeyenberghe és mtsai. 2013). Az *A. fumigatus* által termelt



mikotoxinok [a fumagillin (Guruceaga és mtsai. 2018), a gliotoxin (Spikes és mtsai. 2008; Scharf és mtsai. 2012), fumitremorgin C (Rabindran és mtsai. 2000), verrukulogén (Khoufache és mtsai. 2007), szulokrin (Ohashi és mtsai. 1998) és a pszeurotin (Ishikawa és mtsai. 2009; Vödisch és mtsai. 2011)] nem csak természetes élőhelyein jelentenek előnyt számára, de némelyikük az immunrendszer működésének megzavarásával jelentősen befolyásolhatja a gomba patogenitását is (Frisvad és Larsen 2016).

Az *A. fumigatus* („*Neosartorya fumigata*”) ivaros szaporodásának meglétét elsőként O’Gorman és munkatársai igazolták 2009-ben. Ivaros szaporodására a heterotallia jellemző (O’Gorman és mtsai. 2009). Ivartalan szaporodásakor 1,8-dihidroxinaftalin melanin tartalmuk miatt kékeszöld színű konidiumok termelődnek az uniszériát típusú konidiofórokon (Boylan és mtsai. 1987; Mirabito és mtsai. 1989; Adams és mtsai 1998; Etxebeste és mtsai. 2008). Konidiumai gömb alakúak, kicsik (átmérőjük 1,8-2  $\mu\text{m}$ , legfeljebb 3-3,5  $\mu\text{m}$ ), hidrofóbbok, ráadásul melanintartalmuk miatt ellenállnak az UV sugárzásnak. E tulajdonságaiknak köszönhetően igen nagy a diszperzibilitásuk. A levegő konidiumtartalma akár 1-100 konidium/ $\text{m}^3$  is lehet (Kwon-Chung és Sugui 2013). A konidiumokat az emberek és állatok könnyen belélegezhetik (Rhodes és Askew 2010). Kis méretük elegendő a mukociliáris clearance (a folyamat során a belélegzett mikroorganizmusok nyálkás váladékba burkolva a garat irányába sodródnak és általában a gyomorba kerülnek) elkerüléséhez és az alsó légutak eléréséhez (Kwon-Chung és Sugui 2013). A konidiális falban található melanin az emberi szervezetbe bejutó konidiumok számára is előnyös, ugyanis védelmet nyújt az immunsejtek által termelt reaktív oxigénformák (ROS) ellen, de megvédi a konidiumot a hidrolitikus enzimek károsító hatásaitól is (Tekaia és Latgé 2005; Kwon-Chung és Sugui 2013). Ráadásul a konidiumok felszínén elhelyezkedő, negatív

töltésű szialsav oldalláncok segítik a megtapadást a gazdaszervezet bazális membránfehérjéihez. Mindezen előnyös tulajdonságai ellenére az *A. fumigatus* konidiumai sem képesek ellenállni az egészséges emberi szervezet immunrendszerének (Kwon-Chung és Sugui 2013). Jelentősebb fertőzésveszélynek a legyengült immunrendszerű egyének (Kwon-Chung és Sugui 2013) vannak kitéve, mint például hematólogiai rosszindulatú daganatos, magas dózisu kortikoszteroidterápiát igénylő, illetve hematopoetikus őssejt- és szervtranszplantált betegek. Az invazív aszpergillózis egyéb kockázati tényezői között szerepel a széles spektrumú antibiotikus kezelés, a citomegalovírus fertőzés és örökletes állapotok is, mint például a krónikus granulomatózus rendellenesség (Rhodes és Askew 2010). Ezen veszélyeztetett betegcsoportokon belül a fertőzés akár a betegek 25%-ában is előfordulhat (Oren és Paul 2014) és a fertőzések kimenetele 50-96%-os halálalossággal járhat az antifungális terápia ellenére (Balloy és Chignard 2009; Park és Mehrad 2009; Brown és mtsai. 2012).

## **2.2. Az *Aspergillus fumigatus* patogenezise**

Az *A. fumigatus* fő bejutási pontja és fő fertőzési helye a gazdaszervezet légző rendszere (Latgé 1999). A nem-légzőrendszeri fertőzések ritkák. Leírtak már fertőzést normál immunrendszerű és immunszupprimált egyéneknél egyaránt, a bőr, a köröm, a hashártya, a vesék, a csontok, a szemek, a hallójárat és emésztőrendszer esetében is. Az *A. fumigatus* által okozott tüdőbetegségeket az immunrendszer állapota alapján csoportosítjuk (Latgé és Chamilos 2019).

Immunszuppresszió esetén: akut invazív aszpergillózis (IA) és szubakut invazív aszpergillózis. Az invazív aszpergillózist nehéz diagnosztizálni. Leggyakrabban a szív-tüdő transzplantált betegeknél fordul elő. Képes

elterjedni a szervezetben, így az agyat és más szerveket is érinthet (Latgé 1999).

Ép immunrendszer esetén: tracheobronchitis (a légcső és hörgők gyulladása), aszpergillóma és krónikus fibrózis. Aszpergillómánál a gomba már létező - tuberkulózis, szarkoidózis, vagy más hólyagos tüdőbetegség által okozott - tüdőüregekben fordul elő. Az aszpergillóma olyan fehérjetartalmú mátrixba ágyazott hifák gömbszerű tömegéből áll, amelynek periferiáján sporuláló struktúrák vannak (Latgé 1999). Ezek a labdák noninvazív, szaprofita formái az *Aspergillus*-nak. Lehet tünetmentes, de előfordulhat állandó és produktív köhögés, vércöpet (haemoptysis) és súlycsökkenés is (Paulussen és mtsai. 2016).

Immunrendszer túlműködés esetén: Allergiás Bronchopulmonáris Aszpergillózis (ABPA), allergiás sinusitis (arc-és orrmelléküreg, orrnyálkahártya gyulladás). Jelenleg az ABPA a legsúlyosabb allergiás tüdőkomplikáció, amelyet *Aspergillus* fajok okoznak. Jellemzően olyan betegeknél fordul elő, akik atópiás asztmában, vagy cisztikus fibrózisban szenvednek (Latgé 1999). A gomba szaprofitikusan növekszik a bronchiális lumenben (hörgőhám) bronchiális gyulladást (hörgőgyulladást) eredményezve; a konidiumok egy IgE mediált allergiás gyulladással választ váltanak ki, bronchiális obstrukciót (a hörgők elzáródását) okozva (Paulussen és mtsai. 2016). Tünetei a visszatérő láz, köhögés (barnás vagy véres köpettel), zihálás, rossz közérzet, általános gyengeség és fibrózis (Paulussen és mtsai. 2016).

Mi történik az *A. fumigatus*-sal, ha bekerül a gazdaszervezetbe? A spóra sérüléseken keresztül, táplálékfelvétel során, vagy leggyakrabban inhalációval jut be a gazdaszervezetbe. Az *A. fumigatus* rendkívül kisméretű spórái képesek az alveolusokig eljutni, ahol a tüdő hámsejteihez (pneumocita) kötődnek

(Paulussen és mtsai. 2016). A 2-es típusú pneumociták endocitózis segítségével gyorsan bekebelezik a megtapadt konidiumokat (Zhang és mtsai. 2005; Paulussen és mtsai. 2016). Ezt követi a kolonizáció és fertőzés. A bekebelezett konidiumok kicsíráznak (Slavin és mtsai. 1988), ami a pneumocita (a tüdő egyrétegű laphámsejtje) pusztulásához vezet a csírázó spórák által termelt proteázok miatt (Kauffman 2003). Ezután a hifák belenőnek a közeli véredényekbe, ahol hifaszegmenseket képeznek, amelyek a vérkeringés segítségével az egész szervezetben elterjedhetnek. A véredények penetrációja haemorrhágiát (vérzést) is okozhat (Lopes Bezerra és Filler 2004; Paulussen és mtsai. 2016). A hifák extracelluláris polimer anyagokat termelnek, így más mikróbákkal együtt biofilmet képezhetnek, aminek köszönhetően ellenállóbbak lesznek a gazdaszervezet védekező rendszerével, illetve az antifungális szerekkel szemben (Mowat és mtsai. 2007; Seidler és mtsai. 2008; Paulussen és mtsai. 2016). Az *A. fumigatus* hatással van a gazdaszervezet mikrobiomjára is. Jelenléte antimikrobiális peptidok termelődését indukálja (Kolwijck és van de Veerdonk 2014; Paulussen és mtsai. 2016); ezek, illetve a gomba által termelt szekunder metabolitok is képesek gátolni más mikróbák növekedését (Losada és mtsai. 2009; Paulussen és mtsai. 2016).

A gombának az emberi szervezetbe bejutva igen sokféle stresszel kell szembenéznie a megváltozott környezeti tényezők miatt (Askew 2008; Cooney és Klein 2008; Paulussen és mtsai. 2016). Ezek közül említésre érdemes az oxidatív, nitrozatív és réz stressz, a nagy CO<sub>2</sub> koncentráció okozta stressz, a tápanyag limitáció és – pl. a fagolizoszómák esetében – a tápanyag hiány, illetve a vas, cink és oxigén limitáció (Cooney és Klein 2008; Brown és Goldman 2016; Paulussen és mtsai. 2016). Alkalmazkodnia kell a szervezet hőmérsékletéhez, a nyálkahártyák és fagolizoszómák savas, illetve a vér és a

szövetek közel semleges kémhatásához, valamint az immunrendszer által termelt, vagy a terápia részeként az emberi szervezetbe juttatott antifungális hatású anyagok jelenlétéhez is (Cooney és Klein 2008).

A patogén *A. fumigatus* törzseknek számos olyan tulajdonsága van, melyek fontosak, esetenként nélkülözhetetlenek patogenitásához (Paulussen és mtsai. 2016). Ilyen virulenciát befolyásoló tulajdonság az adhéziós faktorok (pl. hidrofobinok) megléte, melyek segítségével a konidiumok a gazdaszervezet epiteliális sejtjeihez (hámsejtjeihez) képesek kötődni (Latgé 1999; Tomee és Kauffman 2000; Aïmanianda és mtsai. 2009; Paulussen és mtsai. 2016). A konidiumok felszínén elhelyezkedő, negatív töltésű szíalsav oldalláncok segítik a megtapadást a membránfehérjékhez (Kwon-Chung és Sugui 2013). A konidium pigmentáltsága a ROS és a hidrolitikus enzimekkel szemben nyújt védelmet (Heinekamp és mtsai. 2013). Idetartoznak még a hifák sejtfalában lévő gyulladásgátló hatású galaktózaminogalaktánok (Gresnigt és mtsai. 2014), a szöveti penetrációt elősegítő extracelluláris elasztinolitikus proteázok (Kothary és mtsai. 1984; Tomee és Kauffman 2000; Binder és Lass-Flörl 2013), a hatékony vas- és cink transzport (Haas 2012; Amich és Calera 2014), valamint a makrofágok és neutrofilek által generált oxidatív és nitrozatív stressz kivédését segítő enzimek és transzporterek (Abad és mtsai. 2010; Hillmann és mtsai. 2016; Cai és mtsai. 2017; Wiemann és mtsai. 2017). A mikotoxinok, mint a gliotoxin (Scharf és mtsai. 2012), a fumagillin és a restriktocin (Tomee és Kauffman 2000) immunszuppresszánsként gátolják a gazdaszervezet immunválaszát, így szintén hozzájárulnak a gomba virulenciájához (Latgé 1999; Sugui és mtsai. 2007; Sales-Campos és mtsai. 2013; Paulussen és mtsai. 2016).

Az *Aspergillus* fertőzést leggyakrabban tenyésztéssel, hisztopatológiával, illetve vérből vagy a bronchoalveoláris (tüdő) öblítési

folyadékából (BALF) történő galaktomannán antigén detektálásával diagnosztizálják. A fertőzés optimális kezelésének elemei a megelőzés, a korai diagnózis, az antifungális terápia korai megkezdése, az immunszuppresszív terápia csökkentése (ha lehetséges); néha műtetre is sor kerülhet (Jenks és Hoenigl 2018). Az aszpergillózis kezelésére leggyakrabban használt antifungális szerek a membrán permeabilizáló poliének (liposzomális amfotericin B), a sejtfal szintézis gátló echinocandinok (pl. caspofungin, micafungin) és az ergoszterolszintézis gátló azolok (pl. vorikonazol, itrakonazol, isavukonazol, posakonazol) (Odds és mtsai. 2003; Jenks és Hoenigl 2018; Toyotome és mtsai. 2018). Az Amerikai Fertőző Betegségek Társasága (IDSA) 2016. évi ajánlása szerint az első vonalbeli szer az IA kezelésére a vorikonazol, másodvonalbeli szerként pedig az isavukonazol és L-amfotericin B-t javasolják (Patterson és mtsai. 2016; Jenks és Hoenigl 2018). A posakonazol elsősorban olyan betegeken alkalmazzák, akik más kezelésre nem reagálnak (Walsh és mtsai. 2007; Jenks és Hoenigl 2018).

### **2.3. Az *Aspergillus fumigatus* vas anyagcseréje**

A vas létfontosságú biogén elem az összes eukarióta és szinte az összes prokarióta számára (Johnson 2008). Gombákban nélkülözhetetlen – többek között – a citromsav-ciklushoz és a légzéshez, a nitrát és szulfát redukcióhoz, az ergoszterin és hem bioszintézishez, az aminosav-anyagcsere egyes lépéseire, valamint a fehérjék és a nukleinsavak szintéziséhez is (Moulis 2010; Schrettl és Haas 2011). Annak ellenére, hogy a vas az egyik leggyakrabban előforduló elem a földön, biológiai hozzáférhetősége oxigén jelenlétében (és semleges pH-n) korlátozott. Ilyen körülmények között ugyanis a vas ferri ( $\text{Fe}^{3+}$ ) oxidációs állapota a stabil, ami hajlamos igen rosszul oldódó

csapadékokat képezni (Johnson 2008; Schrettl és Haas 2011). Nem meglepő módon a vas limitáció és a vaséhezés igen gyakran előforduló stresszek a természetben. E stresszhatások az emberi szervezetben való növekedéskor is fellépnek. Szervezetünk mindent megtesz annak érdekében, hogy gátolja a bejutó gombák (és más mikroorganizmusok) vashoz jutását. Az emberi szervezetben a vas túlnyomó többsége raktározó és szállító fehérjékkel (ferritin, transferrin és laktoferrin) alkot komplexet, vagy a hemoglobinhoz kötött hem részeként fordul elő (Cassat és Skaar 2013; Blatzer és Latgé 2017; Matthaiou és mtsai. 2018). Az *A. fumigatus* ugyanakkor nem képes e molekulákat vasforrásként felhasználni (Schrettl és mtsai. 2004; Haas és mtsai. 2008). Ráadásul a neutrofil granulociták sziderofórkötő fehérjét (sziderocalin/lipocalin-2) termelnek, hogy megakadályozzák a gombák sziderofór-függő vashoz jutását (ld. lentebb) (Cassat és Skaar 2013). A B limfociták ugyanakkor olyan antitesteket (is) termelnek, melyek a gombasejt felszínéhez kötődve a sziderofór transzporterek működését gátolják (Ganz 2009; Weinberg 2009). A vas az egyetlen olyan ismert mikro tápanyag az emberi szervezetben, amelynek szabályozó hormonja, a hepcidin, nemcsak a tápanyagállapotra, de a fertőzésre is reagál (Blatzer és Latgé 2017). Fertőzés során a hepcidin hipoferrémiás választ alakít ki: gátolja a sejtek vas szekrécióját, mérsékli a mikróbákkal közvetlenül érintkező makrofágok és neutrofil granulociták vashoz jutását és alacsony szinten tartja fagolizozómáik vastartalmát is (Krause és mtsai. 2000; Park és mtsai. 2001; Cassat és Skaar 2013).

A gombákban 4 különböző vashoz jutási mechanizmust írtak le: kis affinitású vas transzporterek, redukív vas asszimiláció (RIA) (ezek nagy affinitású rendszerek), sziderofór mediált vashoz jutás, és hem transzporterek (Schrettl és Haas 2011; Blatzer és Latgé 2017). Ez utóbbi az *A. fumigatusból*

hiányzik (Schrettl és mtsai. 2007; Schrettl és Haas 2011). A kis affinitású vas permeázok nagy külső vas koncentráció esetén működnek hatékonyan és nemcsak vasat ( $\text{Fe}^{2+}$ ) szállítanak, hanem más kétértékű fémeket is, mint például rezet és cinket (Kaplan és Kaplan 2009; Schrettl és Haas 2011). A RIA működésének lényege, hogy a gomba a  $\text{Fe}^{3+}$  forrásait (szabad, vagy komplexben kötött  $\text{Fe}^{3+}$ ) a plazmamemberánon elhelyezkedő ferrireduktázokkal oldhatóbb  $\text{Fe}^{2+}$ -vé redukálja, majd a  $\text{Fe}^{2+}$  oxidációval kísért módon egy ferroxidázból (FetC) és egy vas permeázból (FtrA) álló fehérjekomplex segítségével bejut a sejtekbe (Kosman 2010; Schrettl és Haas 2011). A RIA aktiválódása – bár fontos eleme a vaséhezésre adott stresszválasznak – nem szükséges az *A. fumigatus* patogén növekedéséhez (Bairwa és mtsai. 2017; Blatzer és Latgé 2017).

A sziderofór mediált vastranszport során, a sejtek vaskelátoló molekulákat (extracelluláris sziderofórokat) szekretálnak a tápközegbe. E molekulák igen nagy affinitással kötik a  $\text{Fe}^{3+}$ -t, így akár az oldhatatlan  $\text{Fe}^{3+}$  csapadékokat is szolubilizálni tudják. A ferri-sziderofór komplexeket speciális sziderofór-vas transzporterek (SIT; MFS proton szinporterek) veszik fel. A sziderofórok észteráz általi hidrolízisét követően a  $\text{Fe}^{3+}$  felszabadul és más (intracelluláris) sziderofórokhoz kötődve tárolódik (Schrettl és Haas 2011; Haas 2012). Bár a sziderofór-mediált vasfelvétel a legtöbb baktériumban és néhány növényfajban is megtalálható, az intracelluláris sziderofórokhoz kötött vas raktározás kifejezetten a gombákra jellemző. A ferritin mediált vasraktározás a gombákból hiányzik (Schrettl és Haas 2011). Az *A. fumigatus* kétféle extracelluláris sziderofórt – fuzarinin C (FsC) és triacetil-fuzarinin C (TAFC) – és kétféle intracelluláris sziderofórt – ferrikrocin (FC) és hidroxiferrikrocin (HFC) – termel (Schrettl és mtsai. 2007; Wallner és mtsai. 2009; Schrettl és Haas 2011). A TAFC az *A. fumigatus* elsődleges



extracelluláris sziderofórja; a FC a vegetatív hifákban, a HFC a konidiumokban tárolja a vasat (Schrettl és Haas 2011). Szemben a RIA-val, a sziderofór mediált vastranszport nélkülözhetetlen az *A. fumigatus* patogeneziséhez (Schrettl és Haas 2011). A vasanyagcsere szabályozásában két központi jelentőségű transzkripciós faktor vesz részt az *A. fumigatus*-ban: a SreA és a HapX (Schrettl és mtsai. 2008; 2010; Schrettl és Haas 2011). Megfelelő vasellátottság alatt a SreA GATA típusú transzkripciós faktor gátolja a *hapX* transzkripcióját, valamint a RIA rendszer és a sziderofór rendszer működését megakadályozva a vas túlzott mértékű felhalmozódását. A vas redox tulajdonságainak köszönhetően erősen toxikus elsősorban a Fenton-reakció során keletkező hidroxil szabadgyök miatt (Blatzer és Latgé 2017), ezért a vasraktárak túlterhelése veszélyes lehet. Vashiány alatt a bZip-transzkripciós faktor HapX gátolja a *sreA* transzkripciót (Hortschansky és mtsai. 2007), represszálja a vasat igénylő folyamatokat, mint például a hembioszintézist, légzést és riboszómák képződését, illetve aktiválja a vastranszportot (Schrettl és mtsai. 2010; Schrettl és Haas 2011). A vas központi szerepének köszönhetően nem meglepő módon a vasanyagcsere szabályozása szorosan kapcsolódik a pH és a cink anyagcsere szabályozásához, valamint az oxidatív stressz válasz és az oxigén limitációra adott stressz válasz szabályozásához is (Eisendle és mtsai. 2004; Yasmin és mtsai. 2009; Liu és mtsai. 2010; Thön és mtsai. 2010; Schrettl és Haas 2011).

#### **2.4. A kadmium biológiai vonatkozásai**

A kadmium az egyik legártalmasabb nehézfém az élőlényekre nézve (Davis 1984; Dong és mtsai. 2008; Chakraborty és mtsai. 2014). A kadmium megtalálható a cink-, réz- és ólomércekben, vagyis a természetben a vulkáni

aktivitás hatására ideiglenesen nő a kadmium koncentráció (Godt és mtsai. 2006). A környezetben kimutatott megemelkedett kadmium szint jelentős része azonban antropogén eredetű, vagyis ipari (Godt és mtsai. 2006), illetve mezőgazdasági szennyezés okozza (Järup és Akesson 2009; Chakraborty és mtsai. 2014). Az emberi tevékenység miatt évente mintegy 13000 tonna kadmium kerül a környezetbe (Gallego és mtsai. 2012). Megtalálható újratölthető elemekben, elektronikus eszközökben, csapágy ötvözetekben, de felhasználják kerámia mázakhhoz, festékekhez és műanyagokhoz is (Ayres 1992; Adamis és mtsai. 2003; Chakraborty és mtsai. 2014). A kadmiumot az atomerőművek is használják neutronelnyelőként (Godt és mtsai. 2006). Jelen van a dohányfüstben is. Az emberi tüdő a dohányfüstben lévő kadmium 40-60%-át elnyeli (Elinder és mtsai. 1976; Godt és mtsai. 2006; Rani és mtsai. 2014), ami a légutak sérüléséhez, illetve légzőrendszeri problémákhoz vezethet, mint emfizéma (tüdőtágulat), anozmia (szagláshiány) és krónikus rinitisz (orrnyalkahártya gyulladás) (Lampe és mtsai. 2008; Rani és mtsai. 2014). A kadmium megtalálható egyes foszfáttartalmú műtrágyákban is (Pérez és Anderson 2009; Chakraborty és mtsai. 2014), amelyek igen nagymértékben felelősek környezetünk kadmium szennyezettségéért (Zhou és Qiu 2005; Chakraborty és mtsai. 2014). A műtrágyával kijutatott kadmium ráadásul könnyen bekerülhet a takarmányozásra, vagy élelmiszeripari felhasználásra szánt növényekbe is, így komoly egészségügyi kockázatot jelent (Zhou és Qiu 2005; Chakraborty és mtsai. 2014).

Legveszélyesebb tulajdonsága, hogy hosszú a biológiai felezési ideje, így felhalmozódhat a szervezetben (Jones és Cherian 1990; Ercal és mtsai. 2001; Shimada és mtsai. 2008; Rani és mtsai. 2014). Az 1960-as években Japánban leírt itai-itai betegség fő oka is a kadmiummal szennyezett élelmiszer volt (Nordberg 2009; Rani és mtsai. 2014). Az emberi szervezetben

felhalmozódott kadmium oszteoporózishoz (csonttrituráláshoz) vezet, de károsítja a vesét, a májat, a tüdőt, az agyat, a heréket, a szívet és a központi idegrendszert is (Jin és mtsai. 1998; Alfvén és mtsai. 2000; Valko és mtsai. 2005; Rani és mtsai. 2014). Szerepet játszik a rák kialakulásában is; a Nemzetközi Rákkutatási Ügynökség (International Agency of Cancer Research) 1. típusú karcinogén anyagként osztályozta (International Agency for Research on Cancer és International Agency for Research on Cancer 1993; Rani és mtsai. 2014).

#### *2.4.1. A kadmium toxicitásának háttere*

A kadmium többféle módon is befolyásolja a sejtek működését. Képes hozzákötödni a vicinális tiol-csoportokat tartalmazó enzimekhez és más fehérjékhez inaktiválva azokat (Wu és mtsai. 2016). Minthogy igen nagy a szerkezeti hasonlóság a  $\text{Cd}^{2+}$  és a  $\text{Zn}^{2+}$  között (Moulis 2010), a  $\text{Cd}^{2+}$  könnyen beépülhet a metalloproteinekbe a  $\text{Zn}^{2+}$  ionok helyére (Witkiewicz-Kucharczyk és Bal 2006). Ez utóbbi hatást tartják felelősnek a DNS repair rendszerek kadmium jelenlétében megfigyelt inaktiválódásáért és a kadmiummal kezelt sejtek genotoxikus szerekkel szemben mutatott fokozott érzékenységeért (Witkiewicz-Kucharczyk és Bal 2006). A  $\text{Cd}^{2+}$  nem csak a repair fehérjék, de más cink-ujj fehérjék, például transzkripciós faktorok, működését is képes megzavarni (Hartwig 2001). A  $\text{Cd}^{2+}$  interferálhat a  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  és  $\text{Ca}^{2+}$  transzporttal és ezen keresztül is hatást gyakorol a sejtek működésére (Jacobo-Estrada és mtsai. 2017). Bár nem Fenton fém, mégis képes oxidatív stresszt indukálni. Ennek több oka is van (Cuypers és mtsai. 2010; Rani és mtsai. 2014; Kukongviriyapan és mtsai. 2016): A  $\text{Cd}^{2+}$  nem csak a  $\text{Zn}^{2+}$ -et, de a  $\text{Fe}^{2+}$ -t és a  $\text{Cu}^{2+}$ -t is képes lecserélni a fehérjékben, ami ezen redox aktív fémionok

felszabadulásához és oxidatív stressz kialakulásához vezethet. A mitokondriális elektron transzport lánc fehérjéinek működését megzavarva szintén fokozhatja a légzés során keletkező ROS mennyiségét. Az antioxidáns enzimek inaktiválása (valamint a kadmium detoxifikálása következtében csökkenő GSH (glutation) koncentráció; ld. lentebb) szintén segítheti az oxidatív stressz létrejöttét. A kadmium oxidatív stresszt indukáló tulajdonságát teszik elsődlegesen felelőssé citotoxikus hatásáért (Jacobo-Estrada és mtsai. 2017).

#### 2.4.2. A kadmium detoxifikációja

A gombák sokféle olyan mechanizmussal rendelkeznek, amelyek alkalmasak a kadmium káros hatásainak kivédésére.

##### 2.4.2.1. A kadmium felvétel mérséklése

A kadmium leggyakrabban  $\text{Fe}^{2+}$  transzporterek, illetve aspecifikus fémion transzporterek segítségével jut be a sejtekbe. Ilyen, a kadmium toxikus hatásainak kialakításában fontos transzporterek a *S. cerevisiae* Fet4 (Dix és mtsai. 1997), illetve rizs OsIRT1 és OsNRAMP5 transzporterei is (Nakanishi és mtsai. 2006; Sasaki és mtsai. 2012). A kadmium felvétel megakadályozásának egyik módja a vasra specifikus transzportfolyamatok – pl. a sziderofór, illetve növényekben a fitosziderofór mediált vask felvétel – felülszabályozása a vasat és kadmiumot is szállító transzporterek rovására (Dimkpa és mtsai. 2009; Banakar és mtsai. 2017).

A gombasejtfaal igen jelentős  $\text{Cd}^{2+}$ -kötő képessége szintén mérsékli a kadmium bejutását a sejtekbe. E tulajdonsága révén a gomba biomassza felhasználható szennyvizek nehézfém tartalmának csökkentésére (biosorption, bioleaching), sőt egyes nehézfémek – közük tartozik a kadmium is – gazdaságos kinyerésére (biomining) is (Barros Júnior és mtsai. 2003; Aung és Ting 2005; Santhiya és Ting 2006; Abdel -Aty és mtsai. 2013; Chakraborty és mtsai. 2014; Johnson 2014; Jiang és mtsai. 2018; Zhao és Huang 2018).

Az *A. fumigatus* esetében is megfigyelt oxalát szekréció szintén mérsékli a kadmium bejutását a sejtekbe, hiszen a kadmiummal oldhatatlan csapadékot képez (Chakraborty és mtsai. 2014).

#### 2.4.2.2. A kadmium eltávolítása a sejtekből

Efflux pumpák segítségével a sejtek képesek eltávolítani a már bejutott  $\text{Cd}^{2+}$  -ot és ezáltal alacsony értéken tudják tartani az intracelluláris kadmium koncentrációt. A legismertebb  $\text{Cd}^{2+}$  efflux rendszer a *S. cerevisiae* *pca1p*,  $P_{1B}$ -típusú ATPáza (Rad és mtsai. 1994; Shiraishi és mtsai. 2000; Adle és mtsai. 2007). E fehérje amellet, hogy eltávolítja a  $\text{Cd}^{2+}$  ionokat a sejtekből, ciszteinben gazdag régiója segítségével megtudja kötni a  $\text{Cu}^{2+}$  ionokat is. Ez utóbbi tulajdonságával magyarázzák, hogy bár  $\text{Cu}^{2+}$  ionokat nem transzportál mégis hozzájárul a réz toxikus hatásainak mérsékléséhez (Rad és mtsai. 1994; Adle és mtsai. 2007). A *pca1p* ortológjai egyes *Aspergillus* fajokban is megtalálhatóak és bár nincs szoros összefüggés a *pca1* ortológok jelenléte és a kadmium tolerancia között (de Vries és mtsai. 2017), e fehérje az *A. fumigatus* esetében bizonyítottan részt vesz a kadmium káros hatásainak mérséklésében (Bakti és mtsai. 2018).

#### 2.4.2.3. A kadmium megkötése a sejtekben

A kadmium intracelluláris megkötésében tiol tartalmú molekulák (metallotioneinek, fitokelatinok és GSH) vesznek részt (Pal és Das 2005).

A metallotioneinek kis molekulaméretű (< 7 kDa), Cys-ben gazdag (akár 33%-os Cys tartalom) fehérjék (Rauser 1995; Cobbett és Goldsbrough 2002), különösen az ektomikorrhiza képző gombák esetén nagy jelentőségűek az intracelluláris Cd<sup>2+</sup> inaktív komplexbe történő zárásáért (Jacob és mtsai. 2004; Ramesh és mtsai. 2009).

A fitokelatinok glutationból fitokelatin-szintáz segítségével szintetizálódó, (γ-Glu-Cys)<sub>n</sub>-Gly szerkezetű polimerek (Grill és mtsai. 1989; Cobbett és Goldsbrough 2002). Viszonylag ritkán fordul elő gombákban; megtalálható a *Candida glabrata*-ban (J. Zhou és Goldsbrough 1995) és a *Heliscus lugdunensis*-ben (Jaeckel és mtsai. 2005), de nagy jelentőségű a *Schizosaccharomyces pombe* kadmium detoxifikációjában is (Clemens és Simm 2003).

A GSH nemcsak a fitokelatin szintézis révén vesz részt a Cd<sup>2+</sup> megkötésében, de önmagában is képes Cd-GS<sub>2</sub> szerkezetű komplexet képezni ezzel a fémionnal. E folyamatot tartják az egyik legelterjedtebb kadmium detoxifikációnak az élővilágban (Prévéral és mtsai. 2009).

A fentiekén túl a megfelelő antioxidáns védelem biztosítása és a Zn<sup>2+</sup> ionok akkumulálása szintén hozzájárul e nehézfém toxikus hatásainak mérsékléséhez (Jacquillet és mtsai. 2006; Jihen és mtsai. 2009; Rogalska és mtsai. 2009; Moulis 2010; Jacobo-Estrada és mtsai. 2017).

### 3. Eredmények

#### 3.1. A vaséhezással kombinált oxidatív stressz hatása az *A. fumigatus* Af293 törzsrre

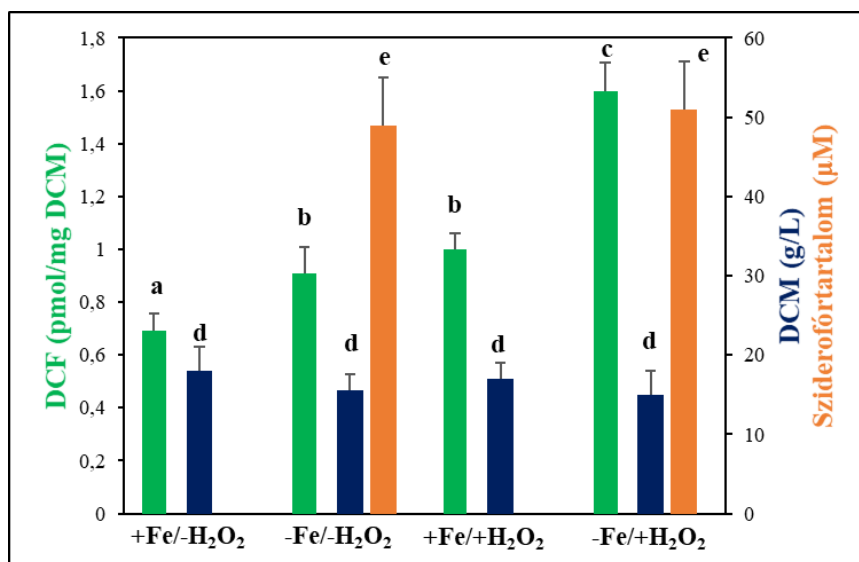
##### 3.1.1. Transzkriptomikai és proteomikai adatok összehasonlítása

Az emberi szervezetben a vashiány egy jellemző stressz, ami alapvetően befolyásolja az *A. fumigatus* virulenciáját (Haas és mtsai. 2008; Johnson 2008). A vaséhezés hatással lehet a gomba oxidatív stresszválaszára is, azaz befolyásolhatja, hogy a gomba hogyan reagál az immunrendszerünk által generált ROS-ra. A vaséhezés és az oxidatív stressz közötti interakció meghatározása érdekében az alábbi tenyészetek transzkriptomikai és proteomikai vizsgálatát végeztük el: +Fe/-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (kontroll, kezeletlen tenyészet), +Fe/+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dal kezelt tenyészet), -Fe/-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (vashiányos tenyészet) és -Fe/+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (vashiányos, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dal kezelt).

A vaséhezés kialakulását az extracelluláris sziderofórtartalom növekedésével, a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kezelés hatásosságát a DCF-teszt segítségével igazoltuk (1. ábra). A vaséhezés önmagában és a kombinált kezelés alatt is jól detektálható mennyiségű extracelluláris sziderofór termelődéséhez vezetett (1. ábra). A vastartalmú tenyészetekben az extracelluláris sziderofórok mennyisége kisebb volt, mint 3 µM (1. ábra). A statisztikai vizsgálatok (kétutas ANOVA, majd Tukey posthoc teszt) alapján a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kezelés és a vaséhezés önmagában is szignifikánsan ( $p < 0,05$ ) megnövelte a termelt DCF mennyiségét. A két kezelés együttes hatása szignifikánsan ( $p < 0,05$ ) eltért a két kezelés hatásának összegétől. Azaz, a kombinált kezelés szignifikánsan jobban növelte a tenyészetek redox egyensúlyvesztését, mint ahogy az az egyszerű stresszkezelések alapján várható lett volna (1. ábra). A szárazanyagtartalom (DCM) változásában szignifikáns különbséget nem találtunk. Ez nem

meglepő, hiszen a kísérlet tervezésénél arra törekedtünk, hogy a hidrogén-peroxidos kezelés időpontjában a vaséhező és a referencia tenyészetek szárazanyag-, és glükóztartalma közel azonos legyen (részletesebben ld. az „5.3.2. Omikai vizsgálatokhoz használt tenyészetek” fejezetet). Az 1 órás hidrogén-peroxid kezelés ezen értékeken érdemben nem változtatott (1. ábra).

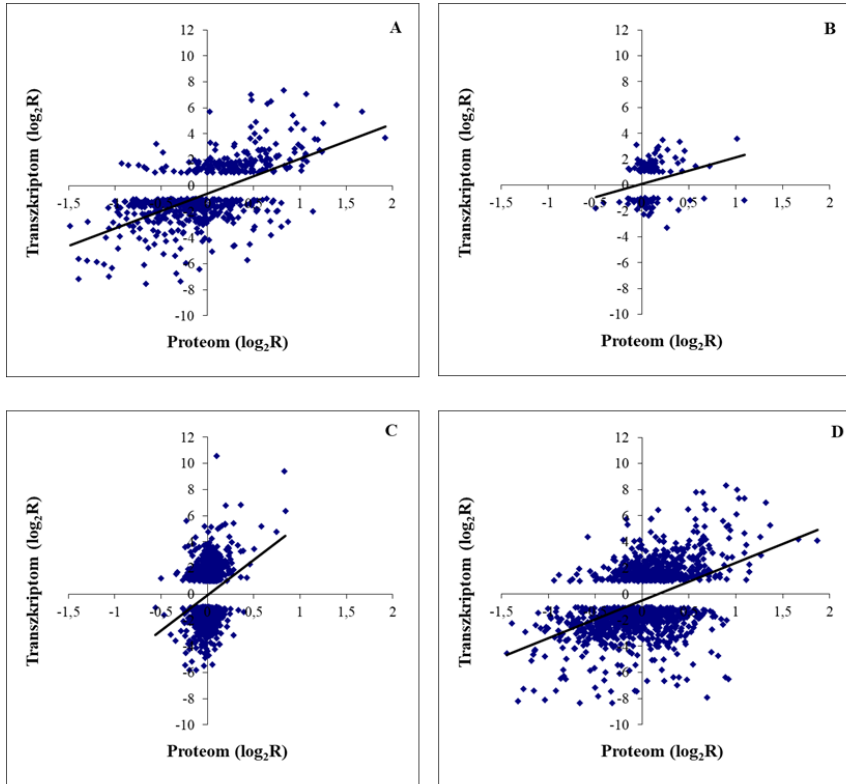
A transzkriptom adatok megbízhatóságát 26 gén esetében RT-qPCR mérésekkel is ellenőriztük (3. melléklet). Minden esetben szoros pozitív korrelációt tapasztaltunk az RNSseq és RT-qPCR adatsorok között. A Pearson-féle korrelációs koeficiens értékei a következők voltak: 0,94 (-Fe/-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> vs. +Fe/-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>); 0,78 (+Fe/+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> vs. +Fe/-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>); 0,71 (Fe/+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> vs. -Fe/-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>); 0,93 (-Fe/+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> vs. +Fe/-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).



**1. ábra** Az *A. fumigatus* Af293 tenyészetek extracelluláris sziderofór (narancs-sárga színnel jelölt oszlop) és DCF (2,7-diklorofluoreszcein) (zöld színnel jelölt oszlop) termelése, illetve a száraztömeg (DCM) változása a négyféle kezelés alatt

Az ábrákon három biológiai ismétlés átlagai és szórásai vannak feltüntetve. A statisztikai vizsgálatokhoz kétutas ANOVA, illetve Tukey posthoc tesztet használtunk. A szignifikánsan nem eltérő értékeket az oszlopok felett azonos betűk jelölik.





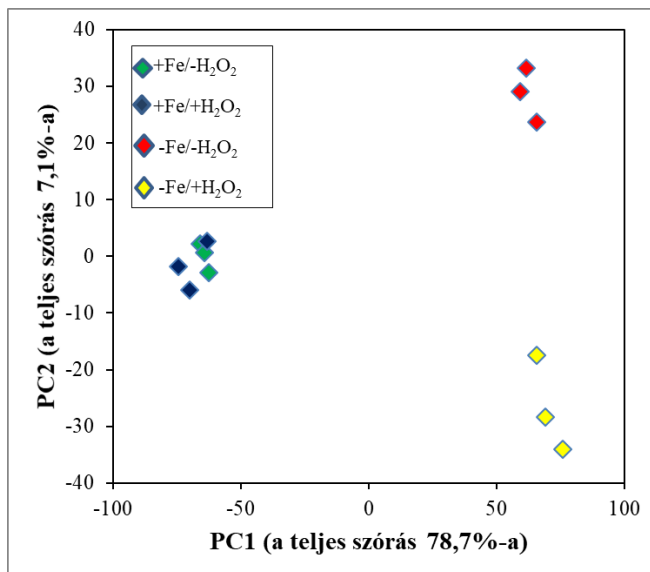
Kísérlet	$\rho^a$	$\rho^b$	$\rho^c$
-Fe/-H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> vs. +Fe/-H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0,39 (p<0,05)	0,52 (p<0,05)	0,68 (p<0,05)
+Fe/+H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> vs. +Fe/-H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0,15 (p<0,05)	0,36 (p<0,05)	-0,03 (p=0,89)
-Fe/+H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> vs. -Fe/-H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0,13 (p<0,05)	0,21 (p<0,05)	n.c.
-Fe/+H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> vs. +Fe/-H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0,32 (p<0,05)	0,42 (p<0,05)	0,66 (p<0,05)

## 2. ábra Korreláció a proteom és transzkriptóm adatok között

Az ábrák a felül-, illetve alulszabályozott gének transzkripciós változásai és a hozzájuk tartozó fehérjék abundancia változásai közötti kapcsolatot mutatják. A: -Fe/-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> vs. +Fe/-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; B: +Fe/+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> vs. +Fe/-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; C: -Fe/+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> vs. -Fe/-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; D: -Fe/+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> vs. +Fe/-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Az ábrához tartozó táblázatban a transzkriptóm és proteom változások közötti Spearman korrelációs koefficiens értéke van feltüntetve. a: A korrelációs koefficiens értékének kiszámolásakor az összes olyan gén adatát felhasználtuk, ahol transzkriptóm és proteom adat is rendelkezésre állt. b: A számoláshoz csak a felül-, illetve alulszabályozott gének transzkriptóm és proteom adatait használtuk fel. c: A számolás csak a felül-, illetve alulszabályozott fehérjék transzkriptóm és proteom adatainak figyelembevételével történt. n.c.: Mínt hogy ebben az összehasonlításban csak 3 felül-, vagy alulszabályozott fehérjét találtunk, ezért a korrelációs koefficiens értékét nem számoltuk ki.

A transzkriptom és proteom szinten tapasztalt változások nagyobb mértékű pozitív korrelációt mutattak a vaséhező (-Fe/-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) és a kombinált stressznek kitett (-Fe/+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) tenyészetek kontroll (+Fe/-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) tenyészetekkel történő összehasonlításakor (2./A és 2./D ábra), mint a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kezelés hatását vizsgáló összevetésekben (+Fe/+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> vs. +Fe/-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> és -Fe/+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> vs. -Fe/-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (2./B és 2./C ábra). Szemben a vaséhezéssel, amit egy hosszabb vashiányos körülmények között történő tenyésztéssel alakítottunk ki, a peroxidos kezelés rövid ideig tartott (a kezelés után egy órával történt a mintavétel). Elképzelhető, hogy ebben az esetben nem állt rendelkezésre elegendő idő a proteom detektálható mértékű megváltozására, ami megmagyarázhatja a korrelációs koefficiens kis értékét (2. ábra).

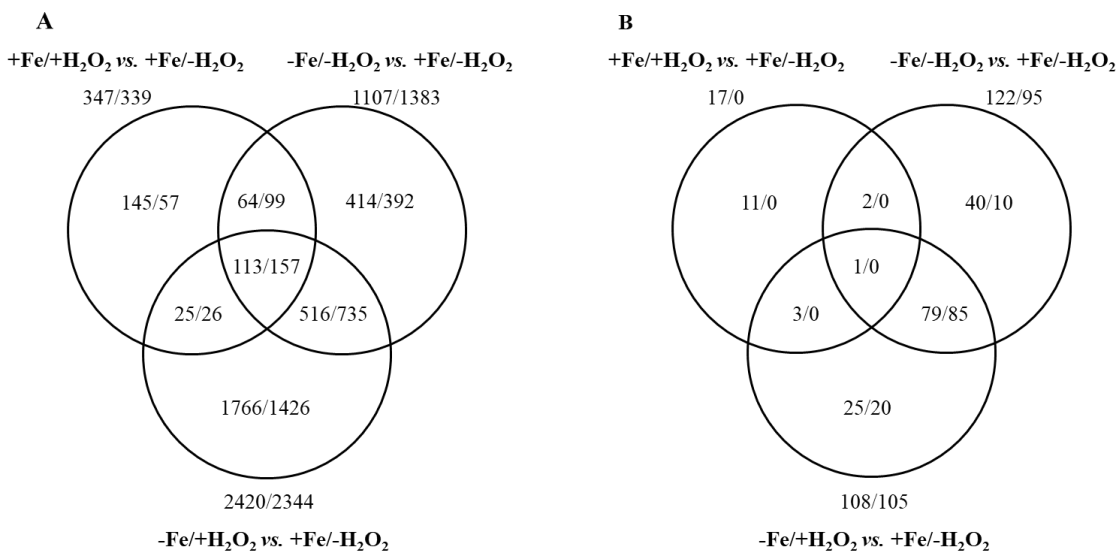
A transzkriptom adatok főkomponens analízise alapján a tenyészetek viselkedését elsősorban a vaséhezés befolyásolta, a peroxid kezelésnek jelentősebb hatása csak vaséhező körülmények között volt (3. ábra). A felül-, illetve alulszabályozott gének és fehérjék száma, valamint a kezelések közötti megoszlása szintén ezt mutatta (4. ábra).



### 3. ábra A transzkriptom adatok fő komponens analízise (PCA)

Az egyes kezeléseket eltérő színek jelölik: +Fe/-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (zöld), +Fe/+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (kék), -Fe/-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (piros) és -Fe/+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (sárga). Az ábrán az első két főkomponens (PC1 és PC2) értékei vannak feltüntetve.

### 4. ábra A transzkriptom és proteom szinten detektált változások Venn-



### diagramjai

Az ábrák az alulszabályozott/felül szabályozott gének (A) és fehérjék (B) számát, illetve a kezelésekek közötti megoszlását mutatják.

### 3.1.2. A stresszkezelések hatása az *A. fumigatus* tenyészetekre

#### 3.1.2.1. A vaséhezés hatásai (-Fe/-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> vs. +Fe/-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

A gén/fehérje csoport dúsulási vizsgálatok alapján a vaséhezés felülszabályozta a sziderofórok bioszintézisét és a ferri-sziderofórok transzportját, megváltoztatta a szekunder anyagcserét és az aminosav metabolizmust, valamint a transláció, a hem és Fe-S klaszter fehérjék képződésének, a citromsav-ciklus és a respiráció alulszabályozódásához vezetett (1-3. táblázatok, 2. melléklet).

A sziderofór anyagcsere felülszabályozódását az *amcA* és a *hmg2* gének felülszabályozódása is jelzi (4. melléklet). Az *AmcA* az L-ornitin, azaz az *A. fumigatus* sziderofór bioszintézise egyik prekursorának mitokondriális exportjában vesz részt (Haas 2014). A *hmg2* gén a hidroximetilglutaril-CoA reduktáz enzimet kódolja, amely az extracelluláris sziderofórok – fuzarinin C és TAF-C – képződéséhez szükséges mevalonsav szintéziséért felelős (Yasmin és mtsai. 2012). A fentiekén túl, a vaséhezésre adott stresszválasz kialakításáért felelős HapX bZip transzkripciós faktor génjének (Schrettl és mtsai. 2010) felülszabályozódását és a HapX által aktivált folyamatok gátlásáért felelős SreA GATA-faktor (Schrettl és mtsai. 2008; Blatzer és mtsai. 2011) egyidejű alulszabályozódását is megfigyeltük (3., 4. melléklet). Mindezen változások összhangban voltak a vaséhezés alatt megfigyelt intenzív extracelluláris sziderofór termeléssel (1. ábra).

A vaséhezés hatással volt az *A. fumigatus* antioxidáns enzimeinek képződésére is. Egyes vastartalmú enzimek, mint például a Cat1 (kataláz) és Ccp1 (citokróm c-függő peroxidáz) alulszabályozódtak transzkriptom és proteom szinten egyaránt. Ezzel párhuzamosan néhány, működéséhez vasat nem igénylő enzim, mint például a Trr1 (feltételezett tioredoxin reduktáz) és

az Afu5g11320 (feltételezett tioredoxin, aspf29) proteom szinten, a Sod1 (CuZn-SOD) proteom és transzkriptom szinten is felülszabályozódtak (3., 4. melléklet).

Figyelemre méltó, hogy bár számos Fe-S klaszter és hem-kötő fehérje, valamint egyes a Fe-S klaszter képzésért (pl.: *isa1*; Schrettl és mtsai. 2010) és hem bioszintéziséért (pl.: *hemA*) (Schrettl és mtsai. 2010) felelős gének alulszabályozódtak (4. melléklet), mégsem figyeltük meg ezen gének tömeges alulszabályozódását (2. melléklet). Sőt, egyes vas-függő enzimet kódoló gének esetében (*erg3A*, *erg3B*, *erg25A*, *erg25B*) transzkriptom szinten (az Erg3A proteom szinten is) kifejezetten felülszabályozódást detektáltunk (4. melléklet).

A fentiek mellett multidrog transzmembrán transzport gének (*abcB*), illetve egy  $Zn^{2+}$  transzport gén, a *zrcA* felülszabályozódását, valamint  $Cu^{2+}$  és más  $Zn^{2+}$  (*zrfB*) transzport gének alulszabályozódását figyeltük meg (2. melléklet). Öt szekunder metabolit bioszintetikus gén klaszter (fumagillin, sziderofór, hexadehidro-asztekróm, pszeurotin A és Afu3g02670 klaszterek) esetében felülszabályozódást, míg 10 klaszter (1,8-dihidroxinaftalén (DHN)-melanin, endokrocin, fumigaklavin C, fumipirrol, fumiquinazolin, fumitremorgin B, gliotoxin, Afu3g13730, Afu6g13930 és a “No PKS or NRPS backbone 6” klaszter) esetében alulszabályozódást tapasztaltuk transzkripció szinten (3. táblázat).

## 1. táblázat A géncsoport dúsulási vizsgálatok eredményeinek összefoglaló táblázata

Összehasonlítás	Felül-szabályozott gének száma	Alul-szabályozott gének száma	FunCat géncsoportok <sup>a</sup>	
			felülszabályozott génekre	alulszabályozott génekre
-Fe/-H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> vs. +Fe/-H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1107	1383	szekunder anyagcsere, drog/toxin transzport, fémion homeosztázis, ferri-sziderofór transzport, aszpartát katablizmus	transzláció, Fe/S klaszter kötés, riboszóma biogenezis, szekunder anyagcsere, aerob légzés, citokróm P450-függő detoxifikáció, hemkötés, citrát kör, melanin anyagcsere, kataláz aktivitás
+Fe/+H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> vs. +Fe/-H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	347	339	szekunder anyagcsere	szekunder anyagcsere, ferri-sziderofór transzport, extracelluláris poliszaharid degradáció, fémion homeosztázis
-Fe/+H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> vs. -Fe/-H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	2125	2028	proteozomális degradáció, hősokk válasz, vakuoláris/lizoszomális transzport, oxidatív stressz válasz, DNS repair	riboszóma biogenesis, transzláció, allantoin és allantoát transzport, szekunder anyagcsere, vitamin/kofaktor transzport, zsírsav anyagcsere, glutamin katabolizmus
-Fe/+H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> vs. +Fe/-H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	2420	2344	vakuoláris/lizoszomális transzport, hősokk válasz, proteozomális degradáció, a transzkripció iniciációja, vakuoláris/lizoszomális transzport, DNS repair	riboszóma biogenezis, transzláció, Fe/S klaszter kötés, citromsav ciklus, szekunder anyagcsere, aerob légzés, citokróm P450-függő detoxifikáció, allantoin és allantoát transzport, hemkötés

<sup>a</sup> – A táblázatban azon legfontosabbnak ítélt FunCat kategóriák szereplenek, melyek génjei szignifikánsan ( $p < 0,05$ ) felülreprezentálva voltak a stressz kezelésre felülszabályozódott vagy alulszabályozódott gének csoportján belül. A géncsoport dúsulási vizsgálatok összes eredménye megtalálható a Kurucz és munkatársai (Kurucz és mtsai. 2018a) közlemény 2. mellékletében. E táblázatok terjedelmi okok miatt nem kerültek bele a dolgozatba.

## 2. táblázat A fehérjecsoport dúsulási vizsgálatok eredményeinek összefoglaló táblázata

Összehasonlí-tás	Felül- szabályozott fehérjék száma	Alul- szabályozott fehérjék száma	FunCat géncsoportok <sup>a</sup>	
			felülszabályozott fehérjékre	alulszabályozott fehérjékre
-Fe/-H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> vs. +Fe/-H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	122	95	ferri-sziderofór transzport, ROS és szabadgyök detoxifikáció	Fe/S klaszter kötés, aerob légzés, transzláció, riboszóma biogenezis, szulfát asszimiláció, leucin bioszintézis, “unfolded” stresszválasz, homocisztein bioszintézis, citromsav ciklus
+Fe/+H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> vs. +Fe/-H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	17	0	-	-
-Fe/+H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> vs. -Fe/-H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	3	0	hősokk válasz, oxidatív stressz válasz	-
-Fe/+H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> vs. +Fe/-H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	108	105	ferri-sziderofór transzport	Fe/S klaszter kötés, aerob légzés, transzláció, riboszóma biogenezis, citromsav ciklus, glutamát bioszintézis, hemkötés, leucin bioszintézis, homocisztein bioszintézis

<sup>a</sup> – A táblázatban azon legfontosabbnak ítélt FunCat kategóriák szereplenek, melyek génjei szignifikánsan ( $p < 0,05$ ) felülreprezentálva voltak a stressz kezelésre felülszabályozódott, vagy alulszabályozódott gének csoportján belül. A géncsoport dúsulási vizsgálatok összes eredménye megtalálható a Kurucz és munkatársai (Kurucz és mtsai. 2018a) közlemény 2. mellékletében. E táblázatok terjedelmi okok miatt nem kerültek bele a dolgozatba.

**3. táblázat** A jelentős transzkripció változást mutató szekunder metabolit génklaszterek transzkripció adatai

Klaszter	Klaszter méret <sup>a</sup>	Kapcsolódó gének (felülszabályozott/alulszabályozott) <sup>b</sup>			
		-Fe/-H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> vs. +Fe/-H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	+Fe/+H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> vs. +Fe/-H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	-Fe/+H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> vs. -Fe/-H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	-Fe/+H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> vs. +Fe/-H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
DHN-melanin klaszter	10	1/8 <sup>c</sup>	1/0	3/0	2/7 <sup>c</sup>
Endokrocin klaszter	9	2/4 <sup>c</sup>	5 <sup>c</sup> /1	1/4	1/5 <sup>c</sup>
Fumagillin klaszter	15	8 <sup>c</sup> /0	11 <sup>c</sup> /0	0/15 <sup>c</sup>	1/2
Fumigaklavin C (fga) klaszter	11	0/5 <sup>c</sup>	4 <sup>c</sup> /0	0/1	0/6 <sup>c</sup>
Fumipirrol klaszter	7	0/7 <sup>c</sup>	0/0	2/1	1/7 <sup>c</sup>
Fumiquinazolin klaszter	5	0/5 <sup>c</sup>	1/0	1/0	0/4 <sup>c</sup>
Fumitremorgin B (ftm) klaszter	9	0/4 <sup>c</sup>	0/0	0/7 <sup>c</sup>	0/8 <sup>c</sup>
Sziderofór klaszter	18	10 <sup>c</sup> /5	0/10 <sup>c</sup>	9 <sup>c</sup> /3	11 <sup>c</sup> /3
Gliotoxin (gli) klaszter	12	0/12 <sup>c</sup>	2/0	4/1	0/12 <sup>c</sup>
Hexadehidro-asztekróm klaszter	8	7 <sup>c</sup> /0	5 <sup>c</sup> /0	1/4	3/0
Pseurotin A klaszter	4	3 <sup>c</sup> /0	4 <sup>c</sup> /0	0/4 <sup>c</sup>	0/1
Afu1g01010 klaszter	4	2/0	1/0	0/4 <sup>c</sup>	0/1
Afu3g01410 klaszter	9	2/0	2 <sup>c</sup> /0	3/4	2/3



Afu3g02570 és Afu3g02530 klaszter	15	4/3	0/2	7 <sup>c</sup> /0	6/2
Afu3g02670 klaszter	7	3 <sup>c</sup> /0	0/1	1/2	3/0
Afu3g13730 klaszter	9	0/5 <sup>c</sup>	0/4 <sup>c</sup>	0/1	0/5 <sup>c</sup>
Afu5g10120 klaszter	10	3/0	1/0	2/0	6 <sup>c</sup> /0
Afu6g13930 klaszter	9	0/9 <sup>c</sup>	0/2 <sup>c</sup>	1/5 <sup>c</sup>	0/9 <sup>c</sup>
Afu7g00170 klaszter	7	1/1	4 <sup>c</sup> /0	1/0	1/0
No PKS vagy NRPS backbone 6 klaszter	13	1/5 <sup>c</sup>	0/2	3/1	3/5
Upregulált klaszterek száma		5	7	2	2
Downregulált klaszterek száma		10	3	5	9

<sup>a</sup> – A klaszterhez tartozó gének száma.

<sup>b</sup> – A szekunder metabolit klaszter gének és fehérjék adatai a Kurucz és munkatársai (Kurucz és mtsai. 2018a) közlemény 4. mellékletében találhatóak meg. A jelen táblázat ezen eredményeket foglalja össze. Az eredeti táblázat terjedelmi okok miatt nem kerültek bele a dolgozatba.

<sup>c</sup> – A Fischer-féle egzakt teszt alapján a klaszter génjei szignifikánsan ( $p < 0,05$ ) felülreprezentáltak voltak a kezelés hatására felülszabályozott, vagy alulszabályozott gének csoportjában. Ezen klasztereket tekintettük felülszabályozott, illetve alulszabályozott klaszternek.

### 3.1.2.2. Hidrogén-peroxid kezelés hatása a kontroll tenyészetekre (+Fe/+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> vs. +Fe/-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

Az alkalmazott oxidatív stresszkezelés jól detektálható változásokat okozott a hifák redox homeosztázisában (1. ábra), a transzkriptomban és a proteomban csak minimális változásokat tapasztaltunk. A transzkriptom szinten bekövetkezett változások alapján a kezelés jelentősen megváltoztatta a szekunder anyagcserét (3. táblázat). Hét gén klaszter (endokrocin, fumagillin, fumigaklavin C, hexadehidro-asztekróm, pszeurotin A, Afu3g01410 és a Afu7g00170 klaszter) felülszabályozódott, míg három klaszternél (sziderofór, Afu3g13730 és Afu6g13930) alulszabályozódást tapasztaltunk (3. táblázat).

A fentiekén túl, transzkriptom szinten a Cu<sup>2+</sup> transzport alulszabályozódását (2. melléklet), proteom szintjén a Trr1 (feltételezett tioredoxin reduktáz) és a Cat2 (kataláz) felülszabályozódását figyeltük meg (4. melléklet).

### 3.1.2.3. A vashiány és a hidrogén-peroxid kezelés kombinált hatása a kontroll tenyészetekre (-Fe/+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> vs. +Fe/-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

A vaséhező tenyészetek hidrogén-peroxid kezelése jelentősen megzavarta a hifák redox homeosztázisát; a bekövetkezett változás nagyobb volt, mint az önmagában elvégzett kétféle stresszkezelés alapján várható lett volna (4. ábra).

A kombinált kezelés igen jelentős transzkripciós változást okozott a tenyészetekben, ami a stresszre reagáló gének számában és típusában is eltért a vaséhezés önálló hatásától (1., 2. táblázat). A géncsoport dúsulási vizsgálatok alapján a sziderofór metabolizmus és a RIA útvonal (*freB*, *fetC*, *ftrA*), valamint

a multidrog transzmembrán transzport gének (közülük kiemelendő az *abcB* gén) és egy  $Zn^{2+}$  transzport gén, a *zrcA* felülszabályozódtak, míg a transzláció, a riboszóma biogenezis, a citromsav ciklus, a légzés, a szkvalén/ergoszterol bioszintézis útvonal, más  $Zn^{2+}$  transzport gének (*zrfB*) alulszabályozódtak (1. táblázat; 2., 4. melléklet). A fentiekén túl, a makroautofágia és az ubiquitin-függő fehérje degradáció génei, a DNS repair gének, a hősokk és az oxidatív stressz válaszban fontos gének (1. táblázat), valamint az e géncsoportok aktiválásában közreműködő transzkripció faktor gének (4. melléklet; *atfA*, *yap1* és *hsf1* gének; Lessing és mtsai. 2007; Albrecht és mtsai. 2010; Wong Sak Hoi és mtsai. 2011; Hagiwara és mtsai. 2014) szintén felülszabályozódtak.

Bár a hem-, illetve Fe-S klaszterkötő fehérjéket kódoló gének – a géncsoport dúsulási vizsgálatok alapján – jellemzően alulszabályozódtak (2. melléklet), 12 hem tartalmú fehérje, 11 Fe-S klaszter tartalmú fehérje, valamint 7 Fe-S klaszter képzésért felelős fehérje génje felülszabályozódott (2. melléklet). Érdeemes kihangsúlyozni azonban, hogy ezen felülszabályozódásokat (az Afu2g14960 gén kivételével) proteom szinten nem figyeltük meg (2. melléklet).

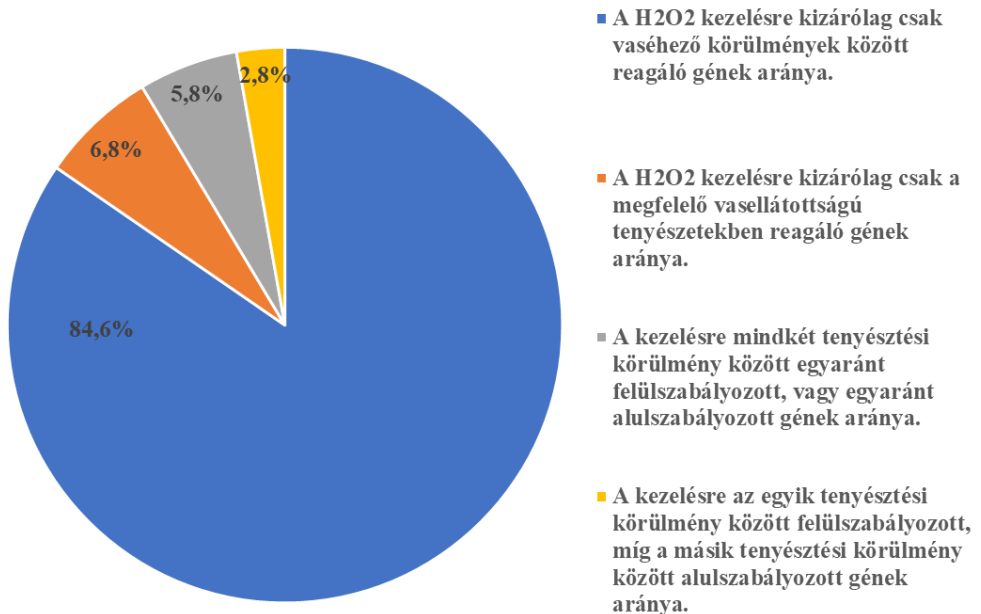
A szekunder metabolizmust tekintve az Afu5g10120 és sziderofór klaszterek mutattak felülszabályozódást, míg 9 klaszter (DHN-melanin, endokrocin, fumigaklavin C, fumipirrol, fumiquinazolin, fumitremorgin B gliotoxin, Afu3g13730 és Afu6g13930 klaszterrel) alulszabályozódott (3. táblázat).

#### 3.1.2.4. A hidrogén-peroxid által indukált oxidatív stressz hatása a vashiányos tenyészetekre (-Fe/+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> vs. -Fe/-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

Annak érdekében, hogy jobban megértsük a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kezelés hatását a vashiányos tenyészetekre, összehasonlítottuk a vashiányos és a kombinált stressznek kitett tenyészetek transzkriptom és proteom adatait is (-Fe/+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> vs. -Fe/-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). A fontosabb megállapításaink az alábbiak voltak: Vashiányos tenyészetekben a hidrogén-peroxid kezelés nem okozott további változást a vas, illetve a Zn<sup>2+</sup> transzportért felelős gének transzkripciójában (2. melléklet). Meglepő módon a Fe-S klaszter szintézisért felelős gének felülszabályozódtak, míg a multidrogoz transzmembrán transzport génjei alulszabályozódtak hidrogén-peroxid jelenlétében (2. melléklet). Számos hem-kötő fehérje (9 fehérje), illetve Fe-S klaszter tartalmú fehérje (14 fehérje) génje szintén felülszabályozódott, bár ezen esetben a géncsoport dúsulási vizsgálatok szignifikáns változást nem mutattak ki (2. melléklet). További négy, a vasanyagcseréhez köthető gén aktiválódását szintén megfigyeltük: *acoA* (akonitáz), *hem13* (hem bioszintézis gén), *cat1* és *cat2* (kataláz gének) (4. melléklet).

A kétféle (megfelelő vas ellátottságú, illetve vaséhez tenyészeteken alkalmazott) hidrogén-peroxid kezelés a stresszre reagáló gének számában és típusában is eltért egymástól (1., 2. táblázat). A stresszre reagáló gének alig 5,8%-a mutatott mindkét kezelésben felülszabályozódást, vagy mindkét kezelésben alulszabályozódást (5. ábra). Sőt, a gének egy része (2,8%-a) kifejezetten ellentétes módon viselkedett a kétféle kezelésben (5. ábra). A transzkripcionális változások vas függését jól szemlélteti az antioxidáns enzimeket kódoló gének viselkedése: A H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kezelés a megfelelő vas ellátottságú tenyészetekben csak egy gén aktivitását csökkentette, míg a

vaséhező körülmények között ugyan ez a kezelés 19 gént felülszabályozott és 3 gént alulszabályozott (2. melléklet).



**5. ábra** Az oxidatív stressz hatása vaséhező és megfelelő vas ellátottságú *A. fumigatus* tenyészetekben

Az ábra a +Fe/+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> vs. +Fe/-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> és a -Fe/+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> vs. -Fe/-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> összehasonlításokban stressz-függő viselkedést mutató gének százalékos megoszlását szemlélteti.

### 3.2. Az *A. fumigatus* kadmium toleranciájának vizsgálata

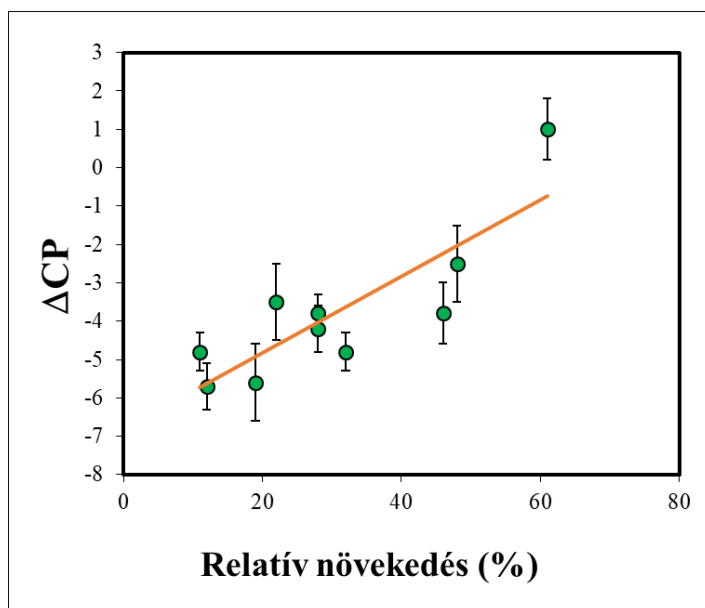
#### 3.2.1. Eltérő eredetű *A. fumigatus* törzsek kadmium érzékenységének összehasonlítása

Korábbi vizsgálatokban az Af293 törzs meglepően rezisztensnek bizonyult kadmiumra (de Vries és mtsai. 2017), ezért megvizsgáltuk, hogy más *A. fumigatus* törzsekre is jellemző-e ez a tulajdonság. Öt törzset izoláltunk talajból és a parciális kalmodulin génszekvenciájuk alapján igazoltuk, hogy valóban az *A. fumigatus* fajhoz tartoznak. Ezen törzsek és 10 különböző klinikai izolátum CdCl<sub>2</sub> toleranciáját határoztuk meg (4. táblázat), amit az IC50 értékkel jellemeztünk. Az IC50 érték azt a legkisebb hatóanyag koncentrációt jelenti, ahol a kezelt tenyészetben mért telepátmérő kevesebb, mint a fele volt a nem kezelt felületi tenyészetekben mért telepátmérőnek ( $R = D_{\text{kezelt}}/D_{\text{kezeletlen}} < 0,5$ , ahol R a relatív növekedés, míg D a kezelt, illetve kezeletlen tenyészetek telepátmérője). Ez az érték széles tartományban változott (0,25 mM - 1 mM), de meglepő módon egyik törzs sem rendelkezett olyan magas kadmiumtoleranciával, mint az Af293 (4. táblázat). A *pcaA* gén minden törzsben aktívnek bizonyult és aktivitása jól korrelált a kadmium toleranciával (6. ábra).

#### 4. táblázat A kiválasztott *A. fumigatus* törzsek kadmium toleranciája

Törzs	Növekedés 2 mM CdCl <sub>2</sub> jelenlétében <sup>a</sup>	IC50 (mM)
Af293	+	>2
SZMC3102-4 és SZMC3106	+	1
DBMCC101	-	1
F00673, DBMCC205 és SZMC3100	+	0,5
DBMCC201-4, F00056 és F00948	-	0,25

<sup>a</sup> - „+” szimbólummal jelöltük azon törzseket, ahol a 2 mM CdCl<sub>2</sub> tartalmú táptalajon növekvő telep átmérője meghaladta a CdCl<sub>2</sub> hiányában mért érték 10%-át. A táblázat három biológiai ismétlés eredményei alapján készült.



#### 6. ábra A *pcaA* gén relatív transzkripciója ( $\Delta$ CP) és a vizsgált törzsek kadmium toleranciája közötti korreláció

A relatív növekedés az 1 mM CdCl<sub>2</sub>-dal kezelt tenyészetek kezeletlen tenyészetek növekedésére vonatkoztatott százalékos növekedését jelenti. A Pearson-féle korrelációs koefficiens értéke:  $R = 0,84$  ( $p = 0,002$ ;  $n = 10$ ). Az ábrán három biológiai ismétlésből származó adatok átlagai és szórásai szerepelnek.

### *3.2.2. Eltérő kadmium érzékenyséű törzsek összehasonlító vizsgálata*

A megfelelő koncentrációkban alkalmazott  $\text{CdCl}_2$  minden vizsgált törzsben oxidatív stresszt idézett elő (függetlenül azok kadmium toleranciájától), amit a megnövekedett DCF szint is alátámaszt (5. táblázat). A kadmiumkezelés fokozta a SOD (és egyes esetekben a GR) specifikus aktivitását, de érdekes módon a kezelés nem volt hatással a GPx és a kataláz specifikus aktivitásaira. A kadmium jelenléte eltérő mértékben növelte a GSH és GSSG (glutation-diszulfid) koncentrációját, ami a GSH/GSSG arány csökkenéséhez vezetett (5. táblázat).

Bár minden tesztelt törzsnél tapasztaltunk  $\text{CdCl}_2$  által indukált oxidatív stresszt, nem találtunk korrelációt a kadmium tolerancia és az oxidatív stressztolerancia között (6. táblázat). Nem volt erős korreláció a kadmium tolerancia és fémion tolerancia ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  és  $\text{Ni}^{2+}$ ) között sem, kivéve a  $\text{Cd}^{2+}$  és a  $\text{Fe}^{3+}$  toleranciát, amely egy mérsékelten pozitív korrelációt mutatott (7. táblázat).



**5. táblázat** A kadmium redox homeosztázisra gyakorolt hatása három, eltérő kadmium toleranciájú *A. fumigatus* törzsből

	F00056 <sup>a</sup>		SZMC3106		Af293	
	Kontroll	0,2 mM CdCl <sub>2</sub>	Kontroll	0,5mM CdCl <sub>2</sub>	Kontroll	1mM CdCl <sub>2</sub>
GR (mkat/kg protein)	4,6±0,5	6,0±0,6 <sup>c</sup>	4,6±0,5	5,5±0,6 <sup>c</sup>	4,5±0,5	5,1±0,5
GPx (mkat/kg protein)	2,3±0,2	1,9±0,2	2,6±0,2	2,2±0,2	2,3±0,2	2,0±0,2
Kataláz (kat/kg protein)	1,2±0,2	1,0±0,2	2,0±0,2	2,0±0,2	1,6±0,2	1,4±0,2
SOD (U/mg protein)	22 ± 5	42 ± 6 <sup>c</sup>	33 ± 5	55 ± 7 <sup>c</sup>	28 ± 5	49 ± 7 <sup>c</sup>
GSH (nmol/mg DCM)	1,8±0,3	3,2±0,5 <sup>c</sup>	2,8±0,4	5,1±0,7 <sup>c</sup>	3 ± 0,3	4,8±0,7 <sup>c</sup>
GSSG (nmol/mg DCM)	0,1±0,03	0,8±0,1 <sup>c</sup>	0,3±0,04	1,5±0,3 <sup>c</sup>	0,2±0,04	1,1±0,2 <sup>c</sup>
GSH/GSSG	18 ± 6	4 ± 1 <sup>c</sup>	9 ± 2	3 ± 1 <sup>c</sup>	10 ± 2	4 ± 1 <sup>c</sup>
DCF <sup>b</sup> (pmol/mg DCM)	0,3±0,05	1,2±0,2 <sup>c</sup>	0,4±0,06	2 ± 0,4 <sup>c</sup>	0,3±0,05	1 ± 0,3 <sup>c</sup>

<sup>a</sup> – A táblázat 3 biológiai ismétlés alapján számolt átlag- és szórásértékeket tartalmazza. Hasonló redox változásokat figyeltünk meg az F00948, SZMC3100 és SZMC3104 törzsekben is.

<sup>b</sup> – A redox egyensúlyvesztés mértékét a képződött 2',7'-diklorofluoreszcein mennyiségével (DCF teszt) jellemeztük (Royall és Ischiropoulos 1993).

<sup>c</sup> – Szignifikáns különbség (Student féle t-teszt,  $p < 0,05$ ) a kontroll és kadmiummal kezelt tenyészetek között.

**6. táblázat** A vizsgált *A. fumigatus* törzsek oxidatív stressztoleranciája

	Kezeletlen mintára vonatkoztatott relatív növekedés (%) <sup>a</sup>										R <sup>b</sup>
	F	F	F	DBMCC	Af	SZMC	SZMC	SZMC	SZMC	SZMC	
	00673	00056	00948	101	293	3100	3102	3103	3104	3106	
1 mM CdCl <sub>2</sub>	19 ± 2 <sup>c</sup>	11 ± 1 <sup>c</sup>	12 ± 1 <sup>c</sup>	48 ± 3 <sup>c</sup>	61 ± 2	22 ± 2 <sup>c</sup>	28 ± 1 <sup>c</sup>	28 ± 2 <sup>c</sup>	32 ± 2 <sup>c</sup>	46 ± 3 <sup>c</sup>	
1 mM diamid	60 ± 4 <sup>c</sup>	77 ± 3	59 ± 2 <sup>c</sup>	56 ± 4 <sup>c</sup>	71 ± 4	60 ± 2 <sup>c</sup>	60 ± 4 <sup>c</sup>	64 ± 3	58 ± 3 <sup>c</sup>	89 ± 3 <sup>c</sup>	0,24
0,01 mM MSB	83 ± 3	81 ± 3	90 ± 4	92 ± 4	89 ± 3	87 ± 4	87 ± 4	86 ± 3	85 ± 5	67 ± 3 <sup>c</sup>	-0,02
0,8 mM tBOOH	60 ± 4	63 ± 4	87 ± 3 <sup>c</sup>	93 ± 4 <sup>c</sup>	64 ± 4	73 ± 3 <sup>c</sup>	67 ± 4	67 ± 4	67 ± 3	60 ± 3	-0,01
3 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	49 ± 4	34 ± 5 <sup>c</sup>	79 ± 3 <sup>c</sup>	84 ± 5 <sup>c</sup>	51 ± 4	59 ± 5	51 ± 4	47 ± 2	48 ± 6	48 ± 2	0,13

<sup>a</sup> – A táblázat három biológiai ismétlés alapján számolt átlag- és szórásértékeket tartalmazza. A kezeletlen (kontroll) kultúrák telepátmérői a következők voltak: 78 ± 2 mm (F00673) 74 ± 3 mm (F00056), 76 ± 4 mm (F00948), 77 ± 3 mm (DBMCC101), 67 ± 4 mm (Af293), 67 ± 5 mm (SZMC3100), 77 ± 3 mm (SZMC3102), 75 ± 3 mm (SZMC3103), 78 ± 3 mm (SZMC3104) és 77 ± 4 mm (SZMC3106).

<sup>b</sup> – A CdCl<sub>2</sub> kezelt tenyészet és a vizsgált oxidatív stresszt generáló szerrel kezelt tenyészetek telepátmérői között számolt Pearson-féle korrelációs koefficiens értéke.

<sup>c</sup> – Szignifikáns különbség (Student féle t-teszt,  $p < 0,05$ ) a vizsgált törzs és az Af293 törzs telepátmérői között.

**7. táblázat** A vizsgált *A. fumigatus* törzsek fémion toleranciája

	Kezeletlen mintára vonatkoztatott relatív növekedés (%) <sup>a</sup>										R <sup>b</sup>
	F	F	F	DBMCC	Af	SZMC	SZMC	SZMC	SZMC	SZMC	
	00673	00056	00948	101	293	3100	3102	3103	3104	3106	
1 mM CdCl <sub>2</sub>	19 ± 2 <sup>c</sup>	11 ± 1 <sup>c</sup>	12 ± 1 <sup>c</sup>	48 ± 3 <sup>c</sup>	61 ± 2	22 ± 2 <sup>c</sup>	28 ± 1 <sup>c</sup>	28 ± 2 <sup>c</sup>	32 ± 2 <sup>c</sup>	46 ± 3 <sup>c</sup>	
5 mM FeCl <sub>3</sub>	68 ± 3 <sup>c</sup>	74 ± 3	64 ± 2 <sup>c</sup>	76 ± 3	79 ± 3	79 ± 2	71 ± 4 <sup>c</sup>	68 ± 2 <sup>c</sup>	76 ± 3	84 ± 3	0,64
0,5 mM CuSO <sub>4</sub>	42 ± 2	46 ± 3 <sup>c</sup>	61 ± 2 <sup>c</sup>	67 ± 2 <sup>c</sup>	37 ± 2	55 ± 2 <sup>c</sup>	45 ± 2 <sup>c</sup>	42 ± 3	39 ± 2	47 ± 2 <sup>c</sup>	-0,14
10 mM ZnSO <sub>4</sub>	60 ± 4 <sup>c</sup>	59 ± 3 <sup>c</sup>	48 ± 2	58 ± 2 <sup>c</sup>	46 ± 2	57 ± 3 <sup>c</sup>	50 ± 4	46 ± 3	53 ± 2 <sup>c</sup>	56 ± 2 <sup>c</sup>	-0,24
3 mM CoCl <sub>2</sub>	68 ± 3 <sup>c</sup>	65 ± 2 <sup>c</sup>	85 ± 4 <sup>c</sup>	87 ± 3 <sup>c</sup>	46 ± 3	80 ± 3 <sup>c</sup>	82 ± 4 <sup>c</sup>	92 ± 3 <sup>c</sup>	65 ± 2 <sup>c</sup>	85 ± 4 <sup>c</sup>	-0,26
1 mM NiSO <sub>4</sub>	82 ± 3	82 ± 2	79 ± 2	60 ± 2 <sup>c</sup>	86 ± 4	58 ± 3 <sup>c</sup>	67 ± 3 <sup>c</sup>	70 ± 2 <sup>c</sup>	72 ± 2 <sup>c</sup>	79 ± 3	-0,01

<sup>a</sup> – A táblázat három biológiai ismétlés alapján számolt átlag- és szórásértékeket tartalmazza. A kezeletlen (kontroll) kultúrák telepátmérői a következők voltak: 78 ± 2 mm (F00673) 74 ± 3 mm (F00056), 76 ± 4 mm (F00948), 77 ± 3 mm (DBMCC101), 67 ± 4 mm (Af293), 67 ± 5 mm (SZMC3100), 77 ± 3 mm (SZMC3102), 75 ± 3 mm (SZMC3103), 78 ± 3 mm (SZMC3104) és 77 ± 4 mm (SZMC3106).

<sup>b</sup> – A CdCl<sub>2</sub> kezelt tenyészet és a vizsgált oxidatív stresszt generáló szerrel kezelt tenyészetek telepátmérői között számolt Pearson-féle korrelációs koefficiens értéke.

<sup>c</sup> – Szignifikáns különbség (Student féle t-teszt,  $p < 0,05$ ) a vizsgált törzs és az Af293 törzs telepátmérői között.

**8. táblázat** Bizonyos átmeneti fémek hatása a Cd<sup>2+</sup> toxicitására a kiválasztott törzsekben

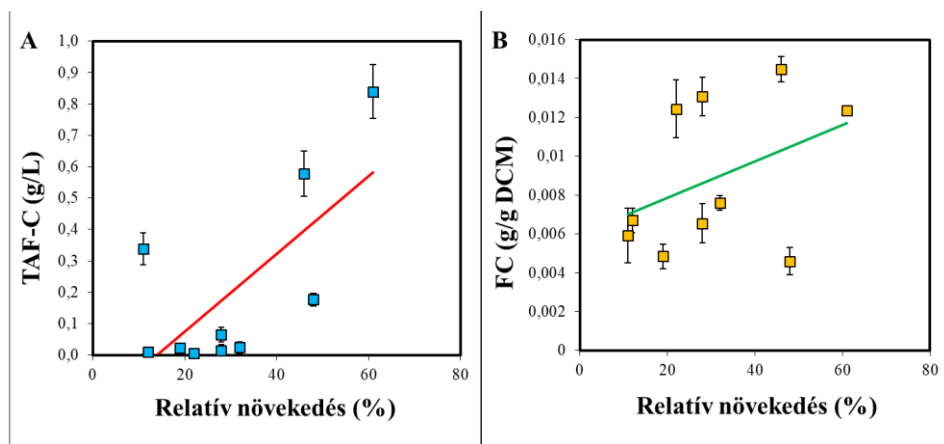
Tesztelt vegyületek	Kezeletlen mintára vonatkoztatott relatív növekedés (%) <sup>a</sup>		
	F00056	SZMC3106	Af293
0,2 mM CdCl <sub>2</sub>	57 ± 3	84 ± 5	91 ± 3
2 mM CdCl <sub>2</sub>	-	-	56 ± 3
0,3 mM CuSO <sub>4</sub>	92 ± 3	78 ± 4	96 ± 4
5 mM ZnSO <sub>4</sub>	99 ± 4	91 ± 4	94 ± 3
5 mM FeCl <sub>3</sub>	82 ± 3	79 ± 3	84 ± 3
0,3 mM CuSO <sub>4</sub> + 0,2 mM CdCl <sub>2</sub>	0	0	72 ± 4
IR <sup>b</sup>	2,10	2,90	2,22
5 mM ZnSO <sub>4</sub> + 0,2 mM CdCl <sub>2</sub>	0	32 ± 3	67 ± 4
IR	2,29	2,88	2,28
5 mM FeCl <sub>3</sub> + 0,2 mM CdCl <sub>2</sub>	0	0	72 ± 4
IR	1,88	2,97	1,18
0,3 mM CuSO <sub>4</sub> + 2 mM CdCl <sub>2</sub>	-	-	10 ± 2
IR			1,95
5 mM ZnSO <sub>4</sub> + 2 mM CdCl <sub>2</sub>	-	-	28 ± 3
IR			1,52
5 mM FeCl <sub>3</sub> + 2 mM CdCl <sub>2</sub>	-	-	51 ± 3
IR			0,93

<sup>a</sup> – A relatív növekedési értékek átlagát és szórását 3 független mérés alapján határoztuk meg. A kezeletlen (kontroll) kultúrák telepátmérői a következők voltak: 74 ± 3 mm (F00056), 77 ± 4 mm (SZMC3106) és 67 ± 4 mm (Af293).

<sup>b</sup> – IR < 0,5 antagonista és IR > 1,5 szinergista kölcsönhatásra utal; Ha 0,5 ≤ IR ≤ 1,5 esetén additív hatásról (interakció hiányáról) beszélünk (Moreno és mtsai. 2003; Galgóczy és mtsai. 2008).

A stressz interakciós vizsgálatokból kiderül, hogy a Cd<sup>2+</sup> növekedést gátló hatását szinergista módon a Cu<sup>2+</sup> és a Zn<sup>2+</sup> is felerősíti mindhárom vizsgált törzsnél (8. táblázat). Hasonló interakciót a Fe<sup>3+</sup> és a Cd<sup>2+</sup> esetében az Af293 törzsnél nem találtunk, noha az F00056 és SZMC3106 törzseknél megfigyelhető volt (8. táblázat). Szintén a kadmium és a vas anyagcsere

közötti kapcsolatra utal, hogy a vizsgált törzsek kadmium toleranciája jól korrelált a vas felvételért felelős TAF-C sziderofór termelésével (7./A ábra). Igaz, hasonló korrelációt a vas raktározásában fontos FC termeléssel nem tapasztaltunk (7./B ábra).



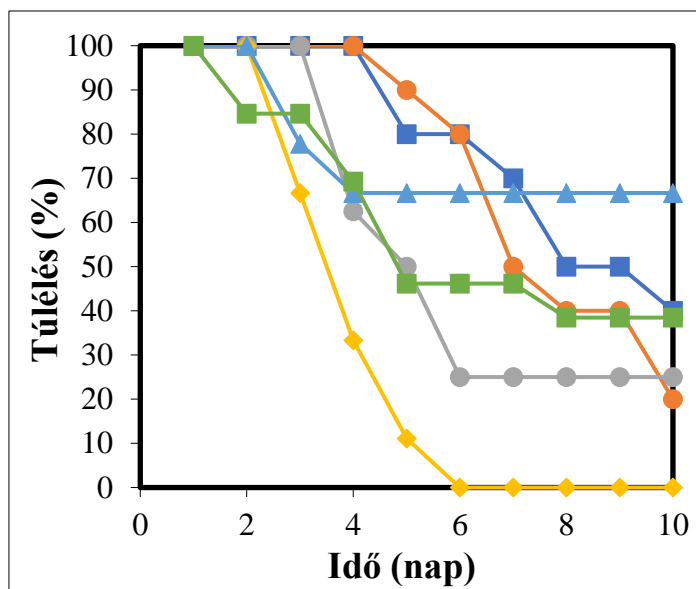
**7. ábra** A vizsgált törzsek kadmium toleranciája és sziderofórtermelése (TAF-C, A és FC, B) közötti korreláció

A relatív növekedés az 1 mM CdCl<sub>2</sub>-dal kezelt tenyészetek kezeletlen tenyészetek növekedésére vonatkoztatott százalékos növekedését jelenti. A Pearson-féle korrelációs koefficiens értéke: R = 0,70 ( $p = 0,024$ ;  $n = 10$ ; A) és R = 0,40 ( $p = 0,246$ ;  $n = 10$ ; B). Az ábrákon három biológiai ismétlésből származó adatok átlagai és szórásai szerepelnek.

### 3.2.3. A kadmium tolerancia potenciális gyakorlati jelentősége

Figyelembe véve, hogy az *A. fumigatus* vas anyagcsereje és *in vivo* virulenciája között régóta ismert a kapcsolat (Schrettl és mtsai. 2004; Haas 2012) és vizsgálataink arra utalnak, hogy a kadmium tolerancia és a vas anyagcsere is összefügghet egymással, így elképzelhető, hogy a kadmium tolerancia előrejelezheti a törzs *in vivo* virulenciáját. Az eltérő kadmium toleranciájú törzsek *in vivo* virulenciáját egérmodellben vizsgáltuk. A kísérlet

törzsenként 10 immunszupprimált egérrel lett elvégezve. A kontroll egereknél a sóoldat, a fertőzött egereknél a spóraszuszpenzió befecskendezése intranazálisan történt (bővebb leírás az „Anyagok és módszerek” rész „5.14 Állatkísérletek” fejezetben található). A Kaplan-Meier túlélési teszt alapján a nagy kadmium toleranciával, intenzív *pcaA* transzkripcióval és fokozott TAF-C termeléssel jellemezhető Af293 törzs szignifikánsan virulensebb volt, mint az SZMC3102, SZMC3104, SZMC3106, F00056 és F00948 törzsek, amelyeknél mérsékelt vagy gyenge kadmiumtoleranciát, alacsony *pcaA* transzkripciós szintet és mérsékelt TAF-C termelődést tapasztaltunk (8. ábra).



**8. ábra** A vizsgált *A. fumigatus* törzsek *in vivo* virulenciája

Az egereket az alábbi *A. fumigatus* törzsekkel fertőztük meg (10 egér/törzs): Af293 (♦; “nagy” kadmium tolerancia), F00056 (●; “kis” kadmium tolerancia), F00948 (○; “kis” kadmium tolerancia), SZMC3102 (■; “közepes” kadmium tolerancia), SZMC3104 (■; “közepes” kadmium tolerancia) és SZMC3106 (▲; “közepes” kadmium tolerancia). A Kaplan-Meier túlélési teszt alapján az Af293 törzs *in vivo* virulenciája szignifikánsan ( $p < 0,05$ ) eltért a többi törzsetől. A kontroll, sóoldattal kezelt egerek esetében elhullást nem tapasztaltunk.

Kis kadmiumkoncentrációt alkalmazva a tesztelt törzsek bioszorpciós kapacitása hasonló volt különböző kadmium toleranciájuk ellenére (9. táblázat). Nagy kadmium toleranciájának köszönhetően azonban az Af293 törzssel 2 mM kadmium jelenlétében is tudtunk dolgozni. Ilyen körülmények között akár 850 mg/kg száraztömeg kadmiumot is képes volt adszorbeálni (9. táblázat).

**9. táblázat** Eltérő kadmium toleranciájú *A. fumigatus* törzsek kadmium bioszorpciója

Kezelés	Cd tartalom (mg/kg DCM) <sup>a</sup>		
	F00056	SZMC3106	Af293
0,2 mM CdCl <sub>2</sub>	55 ± 6	60 ± 4	56 ± 5
2 mM CdCl <sub>2</sub>	-	-	850 ± 110

<sup>a</sup> – A táblázat három biológiai ismétlés átlagait és szórásait tartalmazza. A 0,2 mM CdCl<sub>2</sub>-ot tartalmazó tenyészetek bioszorpciója között szignifikáns eltérés nem volt (Student-féle t-teszt,  $p < 0,05$ ).

## 4. Eredmények megbeszélése

### 4.1. Omikai eredmények megbeszélése

A vas a Földön igen gyakori átmeneti fém, amelyre minden élő szervezetnek szüksége van. Gyakorisága ellenére a vas hozzáférhetősége számos habitatban kulcsfontosságú szerepet játszik a mikrobák életében. A vas éhezés és a vas limitáció az emberi szervezetben való növekedéskor is az egyik legfontosabb stressz a mikroorganizmusok számára (Haas 2012; 2014). Nem meglepő módon, a vas metabolizmus számos elemének meghatározó hatása van az *A. fumigatus* virulenciájára (Schrettl és mtsai. 2004; Haas és mtsai. 2008; Schrettl és mtsai. 2010; Moore 2013; Park és mtsai. 2016). A gazdaszervezetben való növekedés során nem a vashiány az egyedüli stressz, amivel az *A. fumigatus*-nak meg kell birkóznia. Kísérleteinkben arra a kérdésre kerestük a választ, hogy a vaséhezés hogyan befolyásolja az *A. fumigatus* egy másik, az emberi szervezetben gyakran kialakuló stresszhez, az oxidatív stresszhez való alkalmazkodását.

#### 4.1.1. Vaséhezéshez történő alkalmazkodás

A sziderofórok szintézisének és a ferri-sziderofórok transzportjának aktiválódása az egyik legismertebb eleme a vaséhezésre adott stresszválasznak *A. fumigatus*-ban (Hortschansky és mtsai. 2007; Schrettl és mtsai. 2008; 2010; Haas 2014). E jelenség a mi kísérleteinkben is megfigyelhető volt, amit a transzkriptomban, a proteomban és a fermentlé sziderofór tartalmában megfigyelt változások is alátámasztanak (1. ábra; 1., 2. táblázat; 2. melléklet). Érdekes módon, a RIA elemeinek – FetC, FreB, FtrA; (Schrettl és mtsai. 2004;



Blatzer és mtsai. 2011) – felülszabályozódása nem volt annyira egyértelmű, mint amit a sziderofór anyagcsere esetében megfigyeltünk (2.-4. melléklet).

A vasfelvétel intenzívebbé tétele mellett számos olyan változást figyeltünk meg, melyek elősegíthették a gomba alkalmazkodását a vas hiányához. E folyamatok alapvetően a vas igényes folyamatok gátlását célozták meg:

i) A mitokondriális elektrontranszport lánc, valamint a citromsav ciklus egyes elemeinek, mint például a vasat tartalmazó akonitáznak és szukcinát dehidrogenáznak, alulszabályozódását figyeltük meg (2., 4. melléklet), ami összhangban van a Schrettl és munkatársai (Schrettl és mtsai. 2010) korábbi megfigyeléseivel. A mitokondriális folyamatok gátlása nem meglepő, hiszen a mitokondriumok a gombák esetében is igen nagy mennyiségű vasat tartalmaznak (Miao és mtsai. 2011).

ii) A riboszómák képződésének folyamata és maga a transláció is szintén alulszabályozódott összhangban Schrettl és munkatársai (2010) korábbi eredményeivel.

iii) Összesen 21 Fe-S klaszter kötő fehérje és 22 hem kötő fehérje alulszabályozódott (2. melléklet).

A működésükhöz vasat igénylő antioxidáns enzimek (katalázok, peroxidázok; pl. Cat1, Ccp1) alulszabályozódását a sejtek feltehetőleg a vas nélküli fehérjék, Trr1 (putatív tioredoxin reduktáz), Afu5g11320 (putatív tioredoxin) és Sod1 (CuZn-SOD) felülszabályozódásával próbálták ellensúlyozni (4. melléklet). A Sod1 – transzkriptom és proteom szinten is megfigyelt - felülszabályozódása összhangban van Oberegger és munkatársai (Oberegger és mtsai. 2000) korábbi eredményeivel. Ezen enzimnek fontos szerepe lehet abban, hogy szuperoxid ne károsíthassa a Fe-S klaszter fehérjéket (Fridovich 1995; Oberegger és mtsai. 2000).

A vashiány alatt megfigyelt redox egyensúlyvesztés (1. ábra) oka nem egyértelmű. A fentiek alapján a légzési elektron transzportlánc működésében, illetve az antioxidáns enzimek aktivitásában bekövetkezett változások egyaránt hozzájárulhattak kialakulásához.

Meglepő módon egyes vasfüggő folyamatok, pl. szterol bioszintézis (a szkvalén - ergoszterol útvonal), felülszabályozódtak (2. melléklet). Korábbi tanulmányok azt mutatták ki, hogy a vaséhezés csökkentette a sejtek szterin tartalmát (Hortschansky és mtsai. 2007), amit két fő okkal magyaráztak. Az első, hogy a mevalonsav mind a TAF-C, mind a szterin bioszintézis fontos alapanyaga (Yasmin és mtsai. 2012; Haas 2014), így az intenzív TAF-C termelés közvetett módon fékezte a szteránvázas vegyületek kialakulását. A második lehetséges ok, hogy a vas szükséges az ergoszterin bioszintézis útvonal több enzimjének működéséhez (Yasmin és mtsai. 2012). Annak érdekében, hogy a sejtekben a szterin tartalom ne csökkenjen le túlságosan vaséhezés alatt, meg kell találni az egyensúlyt a TAF-C és az ergoszterin bioszintézis között. Ez – többek között – úgy érhető el, hogy ha a sziderofór szintézis felülszabályozódik, akkor a sejtek a szkvalén-ergoszterin útvonal géneket is felülszabályozzák. Az ergoszterin bioszintézis gének felülszabályozódása, illetve a Fe-S klaszter képzés és a hem-bioszintézis gének alulszabályozódásának elmaradása (2. melléklet) arra utal, hogy a vaséhezés nem eredményezi szükségszerűen az összes vasfüggő folyamat alulszabályozódását. Leginkább arról lehet szó, hogy a sejtek megpróbálják a rendelkezésre álló vas felhasználását a megváltozott körülményekhez igazítani. Ez magában foglalja sok vasigényes folyamat gátlása mellett néhány vasigényes folyamat aktiválását is.

#### 4.1.2. Az oxidatív stressz hatása a vashiányos tenyészetekre

A tápközeghez adott  $H_2O_2$  csak kis mértékben befolyásolta a vassal kiegészített tenyészetek viselkedését (4. ábra; 1., 2. táblázat; 2. melléklet). Ezzel szemben vashiányos tenyészetek esetében a  $H_2O_2$  kezelés igen látványos következményekkel járt (4. ábra; 1., 2. táblázat; 2. melléklet): i) Több, mint hatszor annyi gén, illetve fehérje mutatott felül-, vagy alulszabályozódást vashiányos tenyészetek esetén, mint a kontroll, vasat tartalmazó kultúrákban, vagyis a vashiányos tenyészetekben 4764 gén, illetve 213 fehérje, a vasat tartalmazó kultúrákban pedig mindösszesen csak 686 gén, illetve 17 fehérje változtatta meg aktivitását (4./A ábra; 1.táblázat). ii) A hősokk és oxidatív stresszválasz gének (beleértve az ezen folyamatokat szabályzó transzkripciós faktor géneket is) szignifikáns mértékű akkumulálódása a felülszabályozott gének csoportjában szintén csak a hidrogén-peroxiddal kezelt vaséhező tenyészetekre volt jellemző (1. táblázat; 2., 4. melléklet). iii) A DNS repair, a hősokk és oxidatív stresszválasz gének felülszabályozódása egybeesett a makroautofágiában és az ubikvitinfüggő fehérje degradációban részt vevő gének felülszabályozódásával a kombinált kezelésnek kitett tenyészetekben, ami arra utal, hogy a hidrogén-peroxid kezelés ebben az esetben sokkal súlyosabb következményekkel járt (1. táblázat). iv) A  $H_2O_2$  kezelés hatására bekövetkező redox-egyensúlyvesztés mértéke szignifikánsan nagyobb volt a vaséhező, mint a vassal kiegészített tenyészetekben (1. ábra).

A fentiekén túl Haas és munkatársai (Kurucz és mtsai. 2018a) sziderofór szintézisben defektes *A. fumigatus* törzsek felhasználásával kísérletesen is igazolták, hogy a vaséhező (sziderofórt nem termelő) törzsek oxidatív stressz érzékenysége szignifikánsan nagyobb a megfelelő vasellátottságú törzsekénél. Hasonló jelenséget (a sziderofór termelés zavara növeli az oxidatív stressz

érzékenységet) a *Cochliobolus heterostrophus* esetében is megfigyeltek (Mitchell és mtsai. 2009).

Érdeemes kihangsúlyozni, hogy az a megfigyelés, miszerint egy stressz (ebben az esetben a vaséhezés) növeli egy másik stresszorzal (pl.  $H_2O_2$ ) szembeni érzékenységet, nem szükségszerű. Élesztők esetében például a szénéhezés nem csökkentette, hanem kifejezetten növelte az oxidatív stressztoleranciát (Roetzer és mtsai. 2011). Hasonló jelenséget az *A. nidulans* esetében a tanszék munkatársai szintén megfigyeltek (Emri és mtsai. 2019). Az emberi szervezet kórokozókkal szembeni védekezésének egyik fontos eleme, hogy megpróbálja korlátozni a mikroorganizmusok vashoz jutását és ezzel párhuzamosan ROS-kel is támadják őket. Az általunk a vaséhezés és az oxidatív stressz között megfigyelt szinergista kölcsönhatás (1., 2. táblázat; 1., 3. ábra) alapján ez a stratégia kifejezetten előnyös lehet és egyben megmagyarázza, hogy a vas hozzáféréseinek korlátozása, illetve a kórokozókkal szembeni oxidatív támadás miatt ennyire elterjedt stratégiák az állat- és növényvilágban egyaránt (Zarembler és mtsai. 2007; Haas 2012; Prüfer és mtsai. 2014).

A vashiánnyal kombinált oxidatív stressz kezelést az *A. fumigatus* tenyészetek feltehetőleg az alábbi folyamatok révén tudta túlélni (9. ábra):

i) A glutation-glutaredoxin-tioredoxin rendszer számos eleme, valamint a szuperoxid dizmutázok (“vastól független antioxidáns enzimek”) felülszabályozódtak (2., 4. melléklet). Ezzel párhuzamosan számos olyan folyamat aktiválódott (DNS repair, hőshock válasz, makroautofágia, ubikvitin-függő fehérje degradáció), melyek célja, hogy megvédjék a sejteket a ROS által okozott károsodásoktól (1. táblázat; 2. melléklet).

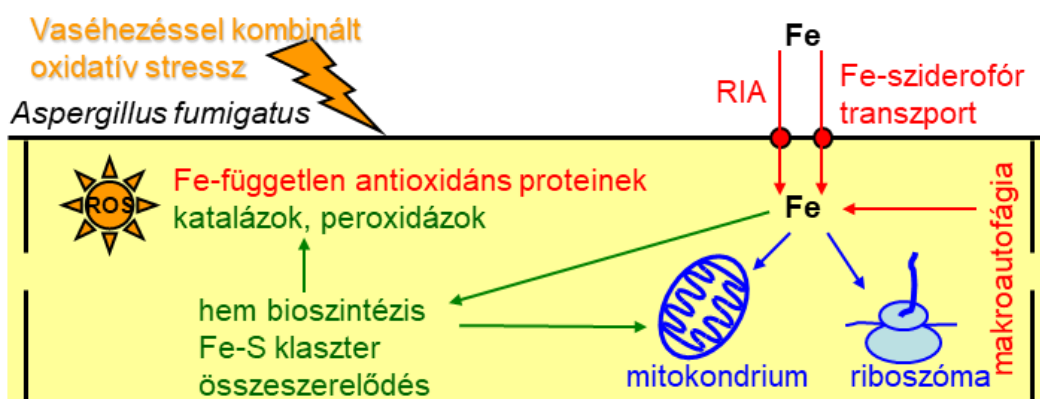
ii) Bár további felülszabályozódást a sziderofór anyagcsere génekben nem figyeltünk meg, a RIA gének felülszabályozódása jól detektálhatónak bizonyult (3., 4. melléklet).

iii) A korábban említett fehérje lebontó útvonalak (makroautofágia, ubikvitin-függő fehérje degradáció) segítségével a gomba szintén növelhette a felhasználható (ebben az esetben „újrahasznosítható”) vas mennyiségét. Richie és munkatársai (Richie és mtsai. 2007) makroautofágiában sérült mutáns (*Δatg1* törzs) felhasználásával kimutatták, hogy ez a folyamat lehetővé teszi a telepben felhalmozott fémionok (köztük a vas) újrahasznosítását olyan esetekben, amikor ezen ionok a tápközegből nem vehetők fel kellő mennyiségben. Ebből a szempontból nézve a vaséhezés hasonlít a szénéhezésre. Szénéhezés alatt a sejtek nagyszámú szénhidrát-aktív enzimet (CAZymes) szekretálnak, hogy a környezetükben esetlegesen jelenlévő tápanyagokat hasznosítani tudják. Ezzel párhuzamosan azonban aktiválják a makroautofágiát, valamint az elhalt sejtek sejtfal lebontó enzimeket termelnek, hogy újrahasznosítsák a telep saját anyagait (Szilágyi és mtsai. 2013; van Munster és mtsai. 2016).

iv) A riboszómák képződésében és a translációban közreműködő gének transzkripciója a kombinált kezelés alatt annak ellenére csökkent, hogy a vaséhezés már önmagában is jelentős alulszabályozódáshoz vezetett (1. táblázat; 2. melléklet). Feltehetőleg ez tovább lassította a tenyészetek növekedését és ezen keresztül a vasfelhasználás sebességét.

v) A vas-tartalmú fehérjék előállítása esetében még hangsúlyosabban megfigyelhető volt az a jelenség, amit a vaséhező tenyészetek viselkedése kapcsán is megfigyeltünk: Számos vas-függő fehérje/folyamat alulszabályozódott ugyan, de egyes esetekben felülszabályozódást is megfigyeltünk. A vaséhező tenyészetekben a hidrogén-peroxid kezelés összesen 9

hem kötő fehérje, 14 Fe-S klaszter kötő fehérje és 13 Fe-S klaszter szintézisben résztvevő fehérje génjét szabályozta felül (2. melléklet). Fontos kihangsúlyozni, hogy ezek a változások szinte minden esetben csak a transzkriptom és nem pedig proteom szinten voltak megfigyelhetők (2. melléklet). Ez azt jelentheti, hogy ezeknek a géneknek a felülszabályozódása, elegendő mennyiségű vas hiányában, nem képes megnövelni a kérdéses fehérje mennyiségét. Ugyanakkor e változásoknak fontos szerepe lehet abban, hogy a túléléshez alapvetően fontos vastartalmú fehérjék mennyisége ne csökkenhessen le túlságosan. Mindez azt is jelenti, hogy a vastartalmú fehérjék képzésének gátlása ígéretes terápiás célpont lehet a jövőben.



**9. ábra** A vaséhezással kombinált oxidatív stresszhez történő adaptáció mechanizmusának egyszerűsített modellje *A. fumigatus*-ban

A piros vonalak a transzkriptomikai és proteomikai adatok alapján felülszabályozott, míg a kék vonalak az alulszabályozott folyamatokat jelölik. Zöld vonallal olyan vas igényes folyamatok vannak jelölve, melyek aktivitását a gomba megpróbálja a vashiány ellenére is „szinten tartani”.

Vizsgálataink alapján a vaséhezással kombinált oxidatív stresszre adott stresszválasz erősségében és jellegében is eltért mind az oxidatív stresszválasztól, mind a vaséhezésre adott stresszválasztól. A kombinált kezelésre adott stresszválasz számos olyan elemet tartalmazott, melyek

megjelenése nem volt megjósolható az egyszerű stresszkezelésekből nyert adatok alapján (5. ábra). Hasonló jelenséget Owens és munkatársai (Owens és mtsai. 2014) is megfigyeltek, amikor az *A. fumigatus* proteomjának változásait vizsgálták a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> és gliotoxin kezelések kombinált alkalmazásakor. Sőt, számos *Candida albicans*-szal kapcsolatos vizsgálat is azt mutatta, hogy a kombinatorikus stresszválaszok nem jósolhatóak meg az egyszerű kezelésekre adott stresszválaszok segítségével (Brown és mtsai. 2014). Mindez azt is jelenti, hogy ha az *in vitro* vizsgálatokból nyert adatok segítségével akarjuk megjósolni a mikrobák *in vivo* viselkedését, igen körültekintőnek kell lennünk, mert viszonylag kis, az emberi szervezetben jelentkező, de az *in vitro* rendszerben figyelmen kívül hagyott (stressz) hatások igen jelentősen módosíthatják a mikroba viselkedését.

#### 4.1.3. Az *A. fumigatus* néhány, orvosi szempontból fontos tulajdonságainak változása

A stressz jelentősen megváltoztathatja a gombasejtek fiziológiáját, ami hatással lehet a virulenciájának és/vagy az antifungális szerek iránti érzékenységének megváltozására is. A vas éhezés (-Fe/-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) és a kombinált stressz (-Fe/+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) több olyan gén transzkripcióját is befolyásolta, melyek multidrog transzportereket kódolnak (2. melléklet). E gének többsége (17/25 gén) felülszabályozódott legalább az egyik stressz alatt (2. melléklet), ráadásul az *abcB* gén esetében a kódolt fehérje mennyiségének növekedését is megfigyeltük (4. melléklet). Az *AbcB* (*Cdr1B*) transzporter igazolt módon szerepet játszik az *A. fumigatus* Cyp51a-független azol-rezisztencia kialakulásában (Fraczek és mtsai. 2013). Eredményeink megerősítik az efflux

rendszerek gátlásán alapuló antifungális stratégiák jelentőségét (Cannon és mtsai. 2009; Tegos és mtsai. 2011).

A vaséhezés negatívan befolyásolta a cink transzportereket kódoló számos gén transzkripcióját (2. melléklet). E változásokat a növekedés intenzitásának stressz alatti csökkenése, illetve az átmeneti fémek homeosztázisát szabályozó folyamatok közötti interakciók is előidézhették. A vas és a cink homeosztázis közötti szoros kölcsönhatás létezését Yasmin és munkatársai (Yasmin és mtsai. 2009) vizsgálták *A. fumigatus*-ban. Kísérleteinkben a vaséhezés alulszabályozta a *zrfB* plazmamembrán  $Zn^{2+}$  transzportert és felülszabályozta a *zrcA* vakuoláris  $Zn^{2+}$  transzporter géneket, illetve alulszabályozta a *zafA* transzkripció faktorát (4. melléklet), amely a cinkfelvétel szabályozásáért felelős (Yasmin és mtsai. 2009) és a virulencia szempontjából alapvető fontosságú (Vicentefranqueira és mtsai. 2015). Meglepő módon a micélium  $Zn^{2+}$  tartalma ennek ellenére növekedett, amit a nem specifikus fém transzporterek aktivitásának tulajdonítottak (Yasmin és mtsai. 2009; Vicentefranqueira és mtsai. 2015). A cink anyagcsere a vas anyagcseréhez hasonlóan az antifungális terápiák ígéretes célpontja lehet (Yasmin és mtsai. 2009; Amich és Calera 2014; Vicentefranqueira és mtsai. 2015). Éppen ezért a cinkanyagcsere és szabályozásának mélyebb megértése, különösen vaslimitált körülmények között, fontos jövőbeli kutatási terület lehet. Megfigyeléseink (a cink transzport alulszabályozódása vaséhezés alatt) megerősítik a korábbi tanulmányokat (Yasmin és mtsai. 2009; Vicentefranqueira és mtsai. 2015), miszerint a vaséhező tenyészetek nem a megszokott módon veszik fel a működésükhöz szükséges cinket.

A szekunder anyagcsere és az oxidatív stressz közötti kapcsolattal számos tanulmány foglalkozik (Fréalle és mtsai. 2013; Hong és mtsai. 2013; Montibus és mtsai. 2015). Sőt, egyes szekunder metabolitok képződésének



vas-függő szabályozását szintén leírták már *A. fumigatus*-ban (Wiemann és mtsai. 2014). A stressz szekunder metabolit génklaszterekre gyakorolt hatása nagymértékben függ a stressz típusa mellett annak erősségétől és a vizsgált klasztertől is (Fallon és mtsai. 2011; Scharf és mtsai. 2012; Yin és mtsai. 2013). Ezt tapasztaltuk a vizsgálatainkban is (3. táblázat). Az *A. fumigatus* virulenciáját igazoltan befolyásoló szekunder metabolit génklaszterek (Fallon és mtsai. 2011; Scharf és mtsai. 2012; Yin és mtsai. 2013) közül a vaséhezés alulszabályozta a gliotoxin klaszter működését, miközben mind a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kezelés, mind a vaséhezés felülszabályozta a hexadehidro-asztekrom, fumagillin és pszeurotin A bioszintéziséért felelős klasztereket (3. táblázat). Fontos megjegyezni, hogy az erős stressz jellemzően alulszabályozza a szekunder metabolit génklaszterek többségét (Emri és mtsai. 2015). Ezzel összhangban a vaséhezéssel kombinált oxidatív stressz a virulencia kialakításában igazoltan közreműködő szekunder metabolit génklaszter transzkripcióját sem növelte (3. táblázat).

## **4.2. A kadmium élettani hatásai**

### *4.2.1. A kadmium tolerancia és a *pcaA* gén jelenlétének kapcsolata*

Egy korábbi, 17 *Aspergillus* fajt magába foglaló összehasonlító stressztolerancia vizsgálatban, bár a tenyésztési körülmények (inkubációs idő, hőmérséklet, a spórák eredete) eltérőek voltak az általunk használtaktól, az *A. fumigatus* Af293 törzs szintén nagy kadmium toleranciát mutatott az összes tesztelt kondíció mellett (de Vries és mtsai. 2017). E vizsgálatban az IC50 értéke (25°C-on, 10 nap tenyésztési idő mellett) 1,5 mM volt, míg más *Aspergillus* fajok esetében ugyanazon körülmények között mérve ez az érték 0,15-3 mM között változott (de Vries és mtsai. 2017). A legkisebb IC50 értékkel jellemzett törzsek (*A. glaucus* CBS 516.65, 0,19 mM; *A. aculeatus*

CBS 172.66, 0,19 mM és *A. carbonarius* DTO 115-B6, 0,15 mM) nem rendelkeznek *pcaA* ortológgal, míg a legnagyobb IC50 értékű törzsek (*A. fumigatus* Af293, 1,5 mM; *A. versicolor* CBS 795.97, 3 mM és *A. sydowii* CBS 593.65, 2,9 mM) genomjában egy, vagy akár két (*A. sydowii*) *pcaA* ortológ gén is található (de Vries és mtsai. 2017). A Kruskal-Wallis teszt azonban nem mutatott szignifikáns különbséget ( $p = 0.068$ ) a három csoport (“nincs *pcaA* ortológja”, “egy *pcaA* ortológja van”, “két *pcaA* ortológja van”) kadmium toleranciája között (Kurucz és mtsai 2018b). Fazli és munkatársai számos gombatörzset izoláltak kadmiummal szennyezett talajból (Fazli és mtsai. 2015). E törzsek közül egy *A. versicolor* és egy *A. fumigatus* törzs (mindkét faj genomjában megtalálható egy-egy *pcaA* ortológ) is megtalálható volt, melyek IC50 értéke meghaladta az 1,6 mM-t (Fazli és mtsai. 2015). Ezzel szemben, Chakraborty és munkatársai (Chakraborty és mtsai. 2014) egy *A. foetidus* törzset izoláltak szennyezett talajból, amely 63 mM kadmium jelenlétében is képes volt növekedni annak ellenére, hogy ezen faj genomja nem tartalmaz *pcaA* ortológot (de Vries és mtsai. 2017). A fenti megállapítások és a 4. táblázatban szereplő adatok alapján megállapítható, hogy az Af293 törzs nagy kadmium toleranciája nem, hogy nem egyedülálló az *Aspergillus* nemzetségben (de Vries és mtsai. 2017), de még csak nem is szükségszerűen jellemző az *A. fumigatus* fajra. Továbbá a *pcaA* gén jelenléte a genomban önmagában nem elegendő a magas kadmium tolerancia kialakulásához.

A *pcaA* gén jelenléte – megfelelően aktív kifejeződése esetén - ugyanakkor lehetőséget biztosít a nagy kadmium tolerancia kialakulásához. Erre utal, hogy az általunk vizsgált *A. fumigatus* törzsekben erős pozitív korrelációt tapasztaltunk a gén transzkripciója és a törzs kadmium toleranciája között (6. ábra). Sőt, az Af293 törzs *pcaA* génjének deléciója számottevően

csökkentette annak kadmium toleranciáját, míg overexpressziója lényegesen növelte azt (Bakti és mtsai. 2018).

#### 4.2.2. *A kadmium hatása az oxidatív stressztoleranciára és a fémion toleranciára*

Bár a kadmium nem-Fenton fém, irodalmi adatok alapján mégis oxidatív stresszt indukáló képességével magyarázzák erős toxicitását (Cuypers és mtsai. 2010). Az *A. foetidus*-ban (Chakraborty és mtsai. 2014) megfigyeltekhez hasonlóan azonban a kadmium kezelés az *A. fumigatus* esetében is oxidatív stressz kialakulásához vezetett (5. táblázat). Az oxidatív stressz ezen esetben egyértelműen nem a GSH raktárak kiürülésének, vagy az általunk vizsgált antioxidáns enzimek (kataláz, SODs, GPx és GR) aktivitásvesztésének volt a következménye (5. táblázat). Meglepő módon a vizsgált *A. fumigatus* törzsek esetében nem tapasztaltunk pozitív korrelációt az oxidatív stressz tolerancia és a kadmium tolerancia között (6. táblázat). Szintén nem volt összefüggés a kadmium tolerancia és fémionokkal ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  és  $\text{Ni}^{2+}$ ) szemben mutatott tolerancia között, kivéve a  $\text{Cd}^{2+}$  és a  $\text{Fe}^{3+}$  tolerancia kapcsolatát, amely pozitív korrelációt mutatott (7. táblázat). A  $\text{Cd}^{2+}$  és  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  és  $\text{Zn}^{2+}$ , illetve részben a  $\text{Cd}^{2+}$  és  $\text{Fe}^{3+}$  növekedésgátló hatása között megfigyelt szinergizmus (8. táblázat) ugyanakkor arra utal, hogy a kadmium megzavarhatja a sejtek fémion homeosztázisát, ami irodalmi adatok alapján elvezethet oxidatív stressz kialakulásához, de önmagában is károsíthatja a sejteket (Rani és mtsai. 2014; Jacobo-Estrada és mtsai. 2017). Meglepő módon az Af293 törzs esetében nem tapasztaltunk szinergizmust a  $\text{Fe}^{3+}$  és a  $\text{Cd}^{2+}$  növekedést gátló hatása között.

#### 4.2.3. A kadmium tolerancia és a vasmetabolizmus kapcsolata

A kadmium, amellet, hogy helyettesítheti a vasat a fehérjékben (Cuypers és mtsai. 2010), már a vasfelvétel során kölcsönhatásba léphet a vas anyagcserével: A *S. cerevisiae* esetében kimutatták, hogy a  $Cd^{2+}$  jelentős része a Fet4 kis affinitású  $Fe^{2+}$  transzporter segítségével jut be a sejtekbe (Dix és mtsai. 1997; Caetano és mtsai. 2015). Az OsIRT1 és OsNRAMP5  $Fe^{2+}$  transzporterek ugyanakkor a rizs gyökerében teszik lehetővé a kadmium „beszivárgását” a sejtekbe (Nakanishi és mtsai. 2006; Sasaki és mtsai. 2012). Nem meglepő módon a növények vasra specifikus vas transzport rendszerek – fitosziderofór mediált vas transzport – aktiválásával és a vasra kevésbé specifikus fémion transzporterek alulszabályozásával próbálják mérsékelni a vasfelvételhez kötött kadmium transzportjukat kadmiummal szennyezett körülmények között (Dimkpa és mtsai. 2009; Banakar és mtsai. 2017). Ez alapján az *A. fumigatus* TAF-C termelése és  $CdCl_2$  jelenlétében mutatott növekedése közötti pozitív korreláció (7./A ábra) is értelmezhető: az intenzív sziderofór anyagcsere védelmet nyújt a kadmiummal szemben, mivel mérsékli azon kevésbé szelektív transzport folyamatok működését, melyen keresztül a kadmium bejuthat a sejtekbe (Dimkpa és mtsai. 2009; Banakar és mtsai. 2017). Így az intenzív *pcaA* transzkripció mellett, az intenzív TAF-C termelés is magyarázhatja a törzs jelentős kadmium toleranciáját.

Nem egyértelmű azonban, hogy miért alakult ki az Af293 törzsben nagy kadmium tolerancia. E fenotípus legegyszerűbb magyarázata az lehetne, hogy kadmiummal szennyezett élőhelyen (talajban) való növekedés érdekében jött létre. Sajnos az Af293 törzs természetes élőhelye nem ismert, mivel ezt a törzset egy invazív aszpergillózisban szenvedő beteg tüdejéből izolálták. Ráadásul a trágya, az állati alom, a szennyvíziszap és a komposzt, melyek

tipikus élőhelyei az *A. fumigatus*-nak, kadmiumban jellemzően szegények (Wong 1999; Sistani és mtsai. 2003; Sager 2007).

A *S. cerevisiae* Pca1 P<sub>1B</sub>-típusú ATPáza nemcsak egy hatékony kadmium efflux pumpa (Rad és mtsai. 1994; Shiraishi és mtsai. 2000; Adle és mtsai. 2007), de részt vehet más toxikus fémionok hatástalanításában is (De Freitas és mtsai. 2004; Adle és mtsai. 2007). Bár nem képes Cu<sup>2+</sup> ionokat transzportálni, az intracelluláris régiója jelentős mennyiségű rezet képes megkötni és ezáltal növeli a gomba réz toleranciáját (De Freitas és mtsai. 2004; Adle és mtsai. 2007). Sőt, a *pca1* transzkripcióját az Aft1 (a vas anyagcsere fontos transzkripció faktor a *S. cerevisiae*ben) szabályozza, ami arra utal, hogy a Pca1-nek köze lehet a vas anyagcseréhez is (De Freitas és mtsai. 2004). Az *A. fumigatus*-ban a *pcaA* gén expresszióját a vas (Fe<sup>2+</sup>), a réz (Cu<sup>2+</sup>), illetve kadmium (Cd<sup>2+</sup>) is megnövelte (Bakti és mtsai. 2018). A *pcaA* gén deléciója csökkentette, míg overexpressziója növelte az *A. fumigatus in vivo* virulenciáját viasz moly (*Galleria mellonella*) modellben (Bakti és mtsai. 2018). Ráadásul mi is azt tapasztaltuk, hogy a nagy *pcaA* expresszióval jellemezhető Af293 törzs egér modellben mutatott *in vivo* virulenciája nagyobb volt, mint a kisebb *pcaA* transzkripció aktivitású törzseké (8. ábra). A fentiek alapján valószínűsíthető, hogy a PcaA fehérje nem csak a kadmium sejtekből való eltávolításában vesz részt, funkciója ennél összetettebb kell, hogy legyen.

Vizsgálatainkban az Af293 viszonylag kis Cu<sup>2+</sup> toleranciát mutatott a többi vizsgált törzshöz képest (7. táblázat). Így feltehetőleg a PcaA nem központi eleme az *A. fumigatus* Cu<sup>2+</sup> homeosztázis fenntartásának. Az Af293 vastűrő képessége azonban meghaladta a többi vizsgált törzsét (7. táblázat), és az Af293 volt az egyetlen olyan törzs, amelyben nem volt szinergizmus a kadmium és a vas növekedést gátló hatása között (8. táblázat). Elképzelhető, hogy a PcaA elsődleges feladata a Fe<sup>2+</sup> ionok eltávolítása és csak a Fe<sup>2+</sup> és Cd<sup>2+</sup>

ionok hasonlósága miatt tudja a  $\text{Cd}^{2+}$  ionokat is kipumpálni a sejtekből, hasonlóan ahhoz, ahogy a  $\text{Fe}^{2+}$  transzporterek a  $\text{Fe}^{2+}$  ionok mellett  $\text{Cd}^{2+}$ -t is szállítanak.

A  $\text{Fe}^{2+}$  pumpák ( $\text{Fe}^{2+}$   $\text{P}_{1\text{B}}$  típusú ATPázok) széles körben elterjedtek a baktériumok között. E fehérjék feladata, hogy megvédjék a baktérium sejteket a felesleges vas toxikus hatásaitól (Pi és Helmann 2017). Humán patogén baktériumokban (*Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium tuberculosis* és *Streptococcus* fajok) a  $\text{P}_{1\text{B}}$  típusú  $\text{Fe}^{2+}$  ATPázok (FrvA, CtpD és PmtA) virulencia faktorokként is ismertek (McLaughlin és mtsai. 2012; Pi és mtsai. 2016; Patel és mtsai. 2016; VanderWal és mtsai. 2017). Feltételezések szerint az a feladatuk, hogy amikor a fagociták által bekebelezett baktériumok kiszabadulnak a vasban szegény fagolizozómákból és bekerülnek a vasban gazdag citoszolba, akkor védelmet nyújtsanak a sejtekbe hirtelen beáramló nagy mennyiségű vastól (Pi és Helmann 2017). Egy másik elképzelés szerint, a gazdaszervezet által generált oxidatív stressz során elszabaduló vas eltávolítása a feladatuk (Pi és Helmann 2017). Hasonló mechanizmusok human patogén gombák esetében is elképzelhetőek.

Bár a vas a talajban nagy mennyiségben előforduló elem (Colombo és mtsai. 2014), a vas-oxidok kis oldékonysága miatt az oldott vas ionok koncentrációja igen kicsi (mintegy  $10^{-10}$  mol/L), legalább is levegővel érintkező talajban 7-es pH mellett (Boukhalfa és Crumbliss 2002). Lokálisan és időlegesen azonban a felvehető vas mennyisége sokszorosára nőhet (Becker és Asch 2005). Emiatt fellépő vas toxicitás komoly problémát okoz pl. a rizstermesztés során is (Becker és Asch 2005). Azaz, a „hol túl sok, hol túl kevés vas” okozta probléma nem csak a gazdaszervezetben növekvő patogén fajok számára jelent kihívást, hanem egy lényegesen általánosabb probléma lehet a mikroorganizmusok számára.

Az *A. fumigatus* Af293 intenzív TAF-C termelésnek köszönhetően (7./A ábra) igen hatékonyan képes felvenni a vasat a környezetéből. Ez az intenzív vas felvétel azonban, a vas elérhetőségének növekedése esetén veszélyes is lehet, ami miatt a gombának szüksége lehet a veszélyes  $\text{Fe}^{2+}$  ionokat hatékonyan eltávolító mechanizmusokra, mint pl. kellően aktív  $\text{P}_{1\text{B}}$  típusú  $\text{Fe}^{2+}$  ATPázokra. Feltételezésünk szerint az Af293 törzs természetes élőhelyén egyfajta „hol túl sok, hol túl kevés vas” helyzethez alkalmazkodva jött létre, és a kérdéses ATPáz a PcaA. Minthogy hasonló stressz az emberi szervezetben is kialakul, így adottságai révén e törzs az emberi szervezetben is képes hatékonyan növekedni, ami megmagyarázza nagy *in vivo* virulenciáját (8. ábra). A fentiek alapján az intenzív TAF-C termelés és *pcaA* expresszió csak véletlenül vezetett nagy kadmium tolerancia kialakulásához. E feltételezés igazolásához mindenekelőtt a PcaA  $\text{Fe}^{2+}$  transzportban betöltött szerepét kellene igazolni.

#### 4.2.4. A nagy kadmium bioszorpció kapacitás gyakorlati jelentősége

Számos gomba rendelkezik kiemelkedően magas bioszorpció kapacitással, amely kihasználható a toxikus fémionok ( $\text{Cd}^{2+}$ -ot is beleértve) szennyvízből történő eltávolítására (Boczonádi és mtsai. 2020), vagy kis koncentrációjú oldatokból az értékes fémionok további felhasználás céljából történő kinyerésére (biomining) (Johnson 2014). Vizsgálatainkban a *pcaA* nagy relatív transzkripciója nem csökkentette az Af293 törzs bioszorpció kapacitását a kis *pcaA* transzkripciót mutató törzsekéhez viszonyítva (9. táblázat). Sőt, nagy kadmium toleranciájának köszönhetően az Af293 törzs képes volt akár 2 mM  $\text{Cd}^{2+}$  koncentráció mellett is növekedni és ilyen körülmények között akár 850 mg kadmiumot is képes volt adszorbeálni száraz

sejttömeg kilogrammonként (6. táblázat). Ez egyben azt is jelenti, hogy minden olyan esetben, amikor élő gomba biomasszával szeretnék a  $\text{Cd}^{2+}$ -ot megkötni, a *pcaA* gén heterológ expressziója a kérdéses gombában előnyös lehet, hiszen képes növelni a törzs kadmium toleranciáját anélkül, hogy csökkentené bioszorpció potenciálját.

## 5. Anyagok és módszerek

### 5.1. A vizsgált gombatörzsek, törzsfenntartás

A kísérletekhez felhasznált *A. fumigatus* törzsek a 10. táblázatban vannak feltüntetve. A törzsek fenntartása Barratt-féle minimál nitrátos táptalajon (Barratt és mtsai. 1965) történt. A tápagar az alábbi komponensekből állt: 10 g/L glükóz, 6 g/L  $\text{NaNO}_3$ , 1,5 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,5 g/L  $\text{MgSO}_4 \times 4\text{H}_2\text{O}$ , 0,5 g/L KCl, 0,1 v/v % nyomelem oldat, 20 g/L agar, pH 6,5. A nyomelem oldat az alábbi összetevőket tartalmazta: 22 g/L  $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ , 11 g/L  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 5 g/L  $\text{MnCl}_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$ , 5 g/L  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ , 1,6 g/L  $\text{CoSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ , 1,6 g/L  $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ , 1,1 g/L  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \times 4\text{H}_2\text{O}$  és 50 g/L  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  (dinátrium-etilén-diamin-tetraecetsav). Kísérleteimben az 5 (proteomikai/transzkriptomikai vizsgálatok), illetve 6 (kadmiumos vizsgálatok) napon át 37 °C-on inkubált tenyészetek frissen lemosott konidiumai lettek felhasználva. A spórák lemosásához az alábbi összetételű oldatot használtam: 0,9 w/v % NaCl, 0,001 v/v % Tween 80.



## 5.2. Az *Aspergillus fumigatus* törzsek izolálása és identifikálása

A DBMCC201-205 törzsek különböző talajmintákból származnak. A minták eredete, a mintavétel helyének GPS koordinátái és a gyűjtés dátuma a következők voltak:

- DBMCC201: Farkaslaka, Románia (N46.393333; E25.257222)  
(2013/10/06);
- DBMCC202: Debrecen, Magyarország (N47.561169; E21.617483)  
(2013/09/21);
- DBMCC203: Hortobágy, Magyarország (N47.492965; E21.143861)  
(2013/09/22);
- DBMCC204: Hajdúszoboszló, Magyarország (N47.490558; E21.318920)  
(2013/09/22);
- DBMCC205: Debrecen, Magyarország (N47.559087; E21.622407)  
(2013/10/02).

## 10. táblázat A vizsgált gombatörzsek

Törzs <sup>a</sup>	Leírás <sup>b</sup>
Af293	FGSC1100, CBS 101355; humán szisztémás aszpergillózisból izolált minta
DBMCC101	humán szisztémás aszpergillózisból izolált minta
DBMCC201-5	talaj izolátumok
NCAIM F.00056	NVK 33
NCAIM F.00673	CCM F-373
NCAIM F.00948	CBS 457.75; talajból izolált minta
SZMC3100, SZMC3102-4, SZMC3106	humán keratitiszből izolált minta

<sup>a</sup> – FGSC (Fungal Genetic Stock Centre, Kansas City, Missouri, USA); NCAIM (National Collection of Agricultural and Industrial Microorganisms; Budapest, Magyarország, <http://ncaim.uni-corvinus.hu>); SZMC (Szegei Mikrobiológiai Gyűjtemény; Szegei Tudományegyetem, Szeged, Magyarország; <http://www2.sci.u-szeged.hu/microbiology/collection.htm>); DBMCC (Molekuláris Biotechnológiai és Mikrobiológiai Tanszék Törzsgyűjtemény; Debreceni Egyetem; Debrecen, Magyarország).

<sup>b</sup> – A DBMCC201-205 törzsek saját izolátumok, az SZMC törzseket (Manikandan és mtsai. 2013) Prof. Dr. Varga János (Szegei Tudományegyetem) bocsátotta rendelkezésünkre. Az összes többi törzset a feltüntetett törzsgyűjteményektől szereztük be.

A talajmintákat (1 g) 2 mL steril vízben szuszpendáltuk, majd 0,1 mL térfogatokat szélesztettünk ki Rose-Bengal Klóramfenikol Agar táptalajokra (Sigma-Aldrich Kft, Budapest, Magyarország), illetve Cd-minimál táptalajra. A Rose-Bengal tápagar a következő komponensekből állt: 10 g/L glükóz, 5 g/L szója pepton, 1 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5 g/L MgSO<sub>4</sub>, 50 mg/L Rose-Bengal, 100 mg/L klóramfenikol és 30 g/L agar. A kadmium-minimál táptalaj csak abban

különbözött a Barratt-féle minimál nitrátos tápagartól (Barratt és mtsai. 1965), hogy 2 mM CdCl<sub>2</sub>-t is tartalmazott.

A tenyészeteket 7 napig inkubáltuk szobahőmérsékleten és „*A. fumigatus*-szerű” (az *Aspergillus*-okra jellemző konidiofórral rendelkező, és zölden pigmentált konidiumokat termelő) telepeket izoláltunk. A telepeket 18 órán keresztül, 220 rpm fordulatszámon, 37 °C-on folyékony Barratt-féle nitrátos minimál táplevesben növesztettük fel. A kezeletlen tenyészetekből származó micéliumból Thermo Scientific GeneJet Gel Extraction kit segítségével genomi DNS-t izoláltunk, majd a kalmodulin gén (Afu1g02930) variábilis régióját amplifikáltuk a cmd5 és cmd6 primerekkel (Hong és mtsai. 2005). A PCR reakcióelegy (50 µl) a következőket tartalmazta: 10 v/v % 10x Taq polimeráz puffer, 2 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0,2 µmol/L génspecifikus primer pár, 0,2 µmol/L dNTP (deoxinukleotid-trifoszfát) mix, 2 U/50 µL Taq polimeráz. A PCR reakció hőmérséklet profilja az alábbi volt:

- (1) Iniciáció, 95 °C, 5 perc
- (2) Denaturáció, 95 °C, 45 másodperc
- (3) Annealing, 52,3 °C, 30 másodperc
- (4) Extenzió, 72 °C, 80 másodperc (35 ciklusban ismételve a 2.-4. lépést)
- (5) Befejező extenzió, 72 °C, 10 perc

A PCR termékek elválasztása agaróz gélelektroforézis segítségével történt. Ennek során 1%-os TAE agaróz gélt és TAE puffert használtunk. A TAE puffer 0,4 mol/L Tris-t, 0,01 mol/L EDTA-t és 0,2 mol/L ecetsavat (pH 8,5) tartalmazott. A sávok/termékek kinyerése a gélből a Silica Bead DNA Extraction Kit K0513 (Fermentas) felhasználásával a gyártó utasításai szerint történt. A megtisztított PCR termékek szekvenálása a Debreceni Egyetem Genomi Medicina és Bioinformatikai Szolgáltató Laboratóriumában történt. A DBMCC201-5 törzsek esetében a kalmodulin gén parciális szekvenciája

100%-os azonosságot mutatott az *A. fumigatus* NRRL163 törzs kalmodulin génjének szekvenciájával. A szekvenciákat a GeneBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank) adatbázisba töltöttük fel, ahol az alábbi hivatkozási számmal érhetőek el: KY421201-5. A talajból izolált törzseket (DBMCC201-5) csak a kadmium tolerancia meghatározásánál használtuk fel, a további élettani vizsgálatokban nem szerepeltek.

### **5.3. Az *Aspergillus fumigatus* tenyésztése folyékony tápközegben**

#### *5.3.1. A kadmium élettani hatásainak tanulmányozásához használt tenyészetek*

Az élettani vizsgálatokhoz a 10 klinikai izolátum (Af293; DBMCC101; NCAIM F00056, NCAIM F00673, NCAIM F00948; SZMC3100; SZMC3102-4; SZMC3106) tenyészeit alkalmaztuk. A kísérletekhez 500 mL-es Erlenmeyer lombikokat használtunk, melyek 100 mL, élesztőkivonatot is (0,5 w/v %) tartalmazó Barratt-féle minimál nitrátos tápfolyadékot tartalmaztak (Barratt és mtsai. 1965). A Barratt-féle minimál nitrátos tápfolyadék összetétele megegyezett a korábban említett tápagar összetételével, de agart nem tartalmazott. A tápleveseket  $5 \times 10^7$  db, frissen összegyűjtött spórával oltottuk be és rázógépből inkubáltuk őket  $37\text{ }^\circ\text{C}$ -on és 220 rpm fordulatszámon. A  $\text{CdCl}_2$  oldatot a 17 órás, még exponenciális fázisú tenyészetekhez adtuk – a vizsgált törzs kadmium toleranciájától függően 0,2; 0,5 és 1 mM végkoncentrációban. A kezelt és a kontroll tenyészeteket további 5 órán át inkubáltuk ( $37\text{ }^\circ\text{C}$ , 220 rpm).

### 5.3.2. Omikai vizsgálatokhoz használt tenyészetek

A transzkriptomikai és proteomikai vizsgálatokhoz az *A. fumigatus* Af293 törzs süllyesztett kultúráit használtuk. Négyféle tenyészettel dolgoztunk, mindegyiknél 500 mL-es Erlenmeyer lombikokat használtunk, melyek 100 mL táplevest tartalmaztak: A kontroll (+Fe/-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) és a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dal kezelt (+Fe/+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) tenyészetekhez Barratt-féle minimál tápfolyadékot használtunk, melyet 4x10<sup>8</sup> db spórával oltottunk le és 33 órán keresztül inkubáltuk 37 °C-on 220 rpm mellett. A vaséhező (-Fe/-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) és a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dal kezelt vaséhező (-Fe/+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) tenyészetekhez módosított Barratt-féle táplevest használtunk. Ebben a táplevesben a nyomelemoldat nem tartalmazott Na<sub>2</sub>EDTA-t és vasat. Az inokulálás ebben az esetben 8x10<sup>8</sup> db spórával történt és a tenyészeteket 50 órán át inkubáltuk (37 °C, 220 rpm). Az eltérő inkubálási idő és spóraszám használatának célja az volt, hogy a tenyészetek szárazanyagtartalma és a megmaradt glükóz koncentrációja közel azonos legyen az inkubálást követően. A kontroll és a vaséhező tenyészetek egy részét (a fent megadott inkubációs idő leteltekor) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3 mM végkoncentráció) hozzáadásával kezeltük, majd a kezelt és a kezeletlen tenyészeteket is 1 órán át tovább inkubáltuk a mintavételig.

## 5.4. A tenyészetek növekedésének és életképességének vizsgálata

### 5.4.1. Szárazanyag tartalom (DCM) meghatározása

A mérés során 5 mL tenyészetet átszűrtünk zsugorított üvegszűrőn, ezután desztillált vízzel átmostuk, ezt követően súlyállandóságig (2 napig) szárítottuk. A megszáradt micélium tömegét lemértük (Pusztahelyi és mtsai. 1997) és g/L mértékegységben adtuk meg a kapott értéket.

## 5.5. Glükózkoncentráció mérése

A glükózkoncentráció mérése során egy olyan „rate assay” módszert használtunk, amelyet Leary és munkatársai (Leary és mtsai. 1992) dolgoztak ki. A reakcióelegy a következőket tartalmazta: 1 kU/L peroxidáz, 4 kU/L glükóz-oxidáz, 0,1 mol/L K-Na-foszfát puffer (pH 6,6), 0,76 mmol/L 4-aminoantipirin, 11 mmol/L fenol és 3 v/v % minta. Az adszorbancia változás detektálása 500 nm-en történt. A minták glükóztartalmát az 1 perc alatt bekövetkezett adszorbancia változás alapján glükóz oldat tartalmú kalibráló sor segítségével számoltuk ki.

## 5.6. Fémionok és oxidatív ágensek növekedést gátló hatásának vizsgálata

Az *A. fumigatus* törzsek (Af293; DBMCC101; NCAIM F00056, NCAIM F00673, NCAIM F00948; SZMC3100; SZMC3102-4; SZMC3106) kadmium toleranciájának jellemzéséhez a Barratt-féle nitrátos minimál tápagarhoz CdCl<sub>2</sub>-ot adtunk 0-3 mM végkoncentrációban. A táptalajokat 5 µL frissen készített spórasuszpenzióval (2x10<sup>7</sup> spóra/mL) pontinokuláltuk és a tenyészeteket 5 napig 37 °C-on inkubáltuk. A kadmiumtoleranciát a kezelt és a kezeletlen tenyészetek telepátmérőinek arányával (relatív növekedés), és/vagy az 50 %-os növekedésgátlás eléréséhez szükséges kadmium koncentrációval (IC<sub>50</sub>) jellemeztük. Hasonló módon jártunk el a törzsek CuSO<sub>4</sub> (0,5 mM), NiSO<sub>4</sub> (1 mM), CoCl<sub>2</sub> (3 mM), FeCl<sub>3</sub> (5 mM), ZnSO<sub>4</sub> (10 mM), illetve MSB (0,01 mM), tBOOH (0,8 mM), diamid (1 mM) és H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3 mM) jelenlétében mutatott növekedésének jellemzésekor is.

A méréseket 3 független kísérletben végeztük el és az eredményeket az átlag és a szórás értékek feltüntetésével adtuk meg. A vizsgált törzsek adatait

a Dunnett-teszt ( $p < 0,05$ ) segítségével vetettük egybe az Af293 referencia törzsünk adataival. A törzsek kadmium és oxidatív stressz tolerancia, illetve a kadmium és fémion tolerancia adatai közötti kapcsolatot a Pearson-féle korrelációs koefficienssel jellemeztük.

### **5.7. A növekedést gátló szerek közötti interakció vizsgálata**

A vizsgálatokat az előző fejezetben (5.6.) leírtak alapján végeztük el. A növekedést gátló szerek közötti interakciók vizsgálata során az alkalmazott stressz ágensek a következők voltak:  $\text{CuSO}_4$  (0,3 mM),  $\text{FeCl}_3$  (5 mM),  $\text{ZnSO}_4$  (5 mM) és/vagy 0,2, illetve 2 mM  $\text{CdCl}_2$  a törzsek (NCAIM F00056; SZMC3106; Af293) kadmium toleranciájától függően. Az interakciót az IR hányadossal jellemeztük, amit az Abbott formula segítségével (Galgóczy és mtsai. 2008) határoztunk meg.  $IR = I_0/I_e$ , ahol  $I_0$  a két összetevő együttes jelenlétében mért százalékos növekedésgátlás,  $I_e$  pedig a két összetevő együttes jelenlétében várható (a külön-külön mért növekedésgátlások alapján számolt) százalékos növekedésgátlás. Ehhez feltételeztük, hogy a két komponens egymástól függetlenül hat, így  $I_e = X + Y - (XY/100)$ , ahol X és Y a vizsgált anyagok jelenlétében külön-külön mért százalékos növekedésgátlás. Ha  $IR < 0,5$  akkor antagonista, ha  $IR > 1,5$  akkor szinergista, ha  $0,5 \leq IR \leq 1,5$  akkor additív (vagyis nincs interakció) hatást állapítottunk meg (Moreno és mtsai. 2003; Galgóczy és mtsai. 2008).

## 5.8. Felületi *Aspergillus fumigatus* tenyészetek kadmium biszorpciójának tanulmányozása

A NCAIM F.00056, SZMC3106 és Af293 törzseket Barratt-féle minimál nitrátos tápagarra pontinokuláltuk 5  $\mu\text{L}$ ,  $2 \times 10^7$  spóra/mL koncentrációjú, frissen készített spóraszuszpenzióval. A táptalajt a leoltás előtt steril celofánlappal fedtük le. A törzstől függően a tápagar 0,2-2 mM  $\text{CdCl}_2$ -ot tartalmazott. A tenyészeteket 5 napig inkubáltuk 37 °C-on, majd a celofánlapok felszínéről összegyűjtöttük a micéliumot. Liofilezést követően meghatároztuk a minták szárazanyag tartalmát, majd 3 mL cc.  $\text{HNO}_3$  -ban forraltuk őket mindaddig, amíg az oldat színtelenné nem vált. A sejtmentes kivonatok kadmium tartalmát Dr. Harangi Sándor (Debreceni Egyetem) határozta meg Agilent MP-AES 4100 típusú atomemissziós spektrométeren (Kurucz és mtsai. 2018b). A mért értékeket a minták szárazanyagtartalmára vonatkoztatva adtuk meg.

## 5.9. Az oxidatív stresszválasz elemek detektálása

### 5.9.1. Diklorofluoreszcein (DCF) teszt

A tenyészetek (NCAIM F00056; NCAIM F00948; SZMC3106; SZMC3100; SZMC3104; Af293) redox egyensúlyának felborulását a DCF-teszttel (Royall és Ischiropoulos 1993) vizsgáltuk. A sülllesztett kultúrák 15 mL-éhez 50  $\mu\text{L}$ , 3 mg/mL töménységű etanolban oldott 2',7'-diklorodihidrofluoreszcein-diacetátot adtunk. A tenyészeteket 1 órán keresztül 37 °C-on, 220 rpm-el rázattuk, majd a micéliumot zsugorított üvegszűrőn leszűrtük, és desztillált vizes mosást követően 5 w/v %-os, 4 °C-os szulfoszalicilsav oldatban szuszpendáltuk. Rövid inkubálást követően (10



perc, 4 °C) a mintákat centrifugáltuk (10000 G, 10 perc, 4 °C), majd a felülúszót 1:1 arányban meghígítottuk 2 M NaOH oldattal. A minták DCF tartalmát egy kalibráló görbe segítségével spektrofluoriméterrel 523 nm-en (502 nm-en történő gerjesztés mellett) határoztuk meg. A tenyészetek által termelt DCF mennyiségét a tenyészetek DCM tartalmára vonatkoztatva nmol DCF/mg DCM mértékegységgel adtuk meg (Emri és mtsai. 1997).

### *5.9.2. Antioxidatív enzimek aktivitásának mérése*

A SOD, kataláz, G6PD, GR és GPx enzimek specifikus aktivitását „rate assay” módszerrel fotometriásan határoztuk meg. A tenyészetekből (NCAIM F00056; NCAIM F00948; SZMC3100; SZMC3104; SZMC3106; Af293) kiszűrt micéliumot ezen méréseknél 0,1 M K-foszfát pufferben (pH 7,6) szuszpendáltuk fel és a fagyasztott (-20 °C) mintákat X-press segítségével tártuk fel (Emri és mtsai. 1997). 1 mL volt a reakcióelegyek végtérfogata és 5-15 (v/v) % sejtmentes kivonatot tartalmaztak. Az egyes mérések esetében a reakcióelegy összetétele az alábbi volt:

- GR: 0,1 M Na-foszfát puffer (pH 7,6), 0,1 mmol/L NADPH (nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát), 1,5 mmol/L GSSG. A NADPH fogyásának detektálása 340 nm-en történt 1 percen keresztül (Pinto és mtsai. 1984).

- GPx: 50 mmol/L Tris-HCl (pH 7,6), 0,091 mmol/L EDTA, 0,12 mmol/L NADPH, 0,25 mmol/L GSH, 440 U/L GR, 0,1 mmol/L kumén-hidroperoxid. A NADPH fogyásának detektálása 340 nm-en történt 1 percen keresztül (Chiu és mtsai. 1976).

- G6PD: 20 mmol/L Hepes (pH=7,6), 1 mmol/L glükóz-6-foszfát, 1 mmol/L NADP, 10 mmol/L MgCl<sub>2</sub>. A NADPH képződésének nyomonkövetése 340 nm-en történt 1 percen keresztül (Emri és mtsai. 1997).

- Kataláz: 20 mmol/L Hepes (pH=7,6), 0,1 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fogyását 1 percen keresztül 240 nm-en követtük nyomon (Roggenkamp és mtsai. 1974).

- SOD: 50 mmol/L Na-foszfát puffer (pH=7,8), 1,4 mmol/L DETAPAC (dietylén-triamin-pentaecetsav), 70 µmol/L Nitro Blue Tetrazolium (NBT), 0,2 mmol/L xantin, 10 U/L xantin oxidáz, 1000 U/L kataláz. Az NBT oxidálódását 560 nm-en mértük 1 percen keresztül (Oberley és Spitz 1984). A mért enzimaktivitási értékeket a minták fehérjetartalmára vonatkoztattuk és a specifikus aktivitásokat – a SOD aktivitások kivételével - kat/kg protein mértékegységgel adtuk meg. A SOD esetében azt az enzimmennyiséget, amely 50 %-os gátlást okozott az NBT redukciójában 1 U-nak (unit) tekintettük. A minták fehérjetartalmának meghatározása Bradford reagenssel történt (Bradford 1976).

### 5.9.3. A tenyészetek glutation (GSH) tartalmának mérése

A hifák GSH és GSSG tartalmát DTNB (5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzoát sav) – GR assay segítségével határoztuk meg (Anderson 1985; Sági és mtsai. 2001). A vizsgált micéliumot, amelyet 5 mL tenyészetből (NCAIM F00056; NCAIM F00948; SZMC3100; SZMC3104; SZMC3106; Af293) szűrtük ki és mostunk át desztillált vízzel, 1 mL 5 w/v % 5-szulfoszalicilsav oldatban tártuk fel. A GSSG tartalom mérésekor a sejtmentes kivonat GSH tartalmát előzetesen elreagáltattuk 2-vinilpiridines kezeléssel (185 mmol/L, 1 óra, pH 6,0-7,0). A felhasznált reakcióelegy 1 mL végtérfogatú volt és 10 (v/v) % 2-vinilpiridinnel kezelt mintán kívül még az alábbi összetevőkből állt: 115 mM Na-foszfát puffer (pH 7,5), 1,5 kU/L GR, 50 mM Na<sub>2</sub>-EDTA, 0,2 mM NADPH és 0,6 mM DTNB. A DTNB redukálódásának nyomonkövetése 412 nm-en történt 1 percen keresztül. A GSSG mennyiségét kalibráló sor segítségével

számoltuk ki, és a kapott értékeket a minták szárazanyag tartalmára vonatkoztatva nmol/mg DCM mértékegységgel adtuk meg. A GSH meghatározását a fentiek alapján végeztük el, viszont itt meghatároztuk a minták teljes glutation (GSH+GSSG) tartalmát, mégpedig egy olyan kalibráló sor segítségével, amely GSH-val készült a 2-vinilpiridines kezelés elhagyásával. Így ki tudtuk számolni a GSH mennyiségét a GSSG tartalom ismeretében.

## **5.10. Sziderofórok képződésének detektálása**

### *5.10.1. Sziderofórkonzentrációk mérése HPLC eljárással*

A törzsek (Af293; DBMCC101; NCAIM F00056, NCAIM F00673, NCAIM F00948; SZMC3100; SZMC3102-4; SZMC3106) triacetilfuzarinin C (TAF-C) és a ferrikrocin (FC) termelő képességét vaséhező tenyészetek segítségével határoztuk meg (Szigeti és mtsai. 2014). Ebben az esetben 100 mL vasmentes Barratt-féle minimál nitrátos tápközeget tartalmazó 500 mL-es Erlenmeyer lombikokat (ld. 5.3.1. fejezet)  $5 \times 10^7$  db frissen lemosott spórával inokuláltunk és 37 °C-on, 220 rpm mellett 6 napon keresztül inkubáltuk. Ezt követően szűréssel elválasztottuk a micéliumot a fermentlétől. A fermentléhez 1 g/L FeCl<sub>3</sub>-ot adtunk 1 g/L végkoncentrációban és a pH-t 6,5-re állítottuk. A micéliumot liofilizáltuk, majd desztillált víz segítségével extraháltuk. Centrifugálást (5000 g, 10 perc, 4 °C) követően a felülúszót FeCl<sub>3</sub>-dal kezeltük a korábbiak szerint. A fermentlé ferri-TAF-C és a micélium ferri-FC tartalmát Dr. Máthéné Dr. Szigeti Zsuzsa (Debreceni Egyetem) határozta meg HPLC-s eljárás segítségével (Hördt és mtsai. 2000; Pócsi és mtsai. 2008). A minták sziderofór tartalmát a minta térfogatára (g/L) (TAF-C), illetve szárazanyagtartalmára (g/g) (FC) vonatkoztatva adtuk meg.

### 5.10.2. CAS (*Chrome azurol S*) assay

Az omikai vizsgálatoknál a tenyészetek vaséhezésének kialakulását a fermentlé megnövekedett sziderofór tartalmával ellenőriztük. A fermentlé sziderofórtartalmát ebben az esetben CAS assay segítségével határoztuk meg (Machuca és Milagres 2003). A minták 0,5 mL-éhez 0,5 mL frissen készített CAS oldatot adtunk, majd 1 h szobahőmérsékleten és sötétben történő inkubációt követően a keletkezett színes komplex mennyiségét fotometriásan határoztuk meg 630 nm-en. A sziderofór koncentrációt EDTA-val készített kalibráló sor segítségével becsültük meg. A CAS oldat összetétele az alábbi volt: 1 mM FeCl<sub>3</sub> oldat (10 mM HCl-ben feloldva), 2 mM Kromazurol-S oldat, 10 mM hexadecil-trimetil-ammóniumbromid, 1 M piperazin (pH beállítás: 37%-os HCl oldattal; pH: 5,6), 4 mM 5'-szulfoszalicilsav (Schwyn és Neilands 1987).

## 5.11. Transzkripció vizsgálatok

### 5.11.1. RNS izolálás

Az RNS izolálásához a sülyesztett kultúrákból származó mintákat zsugorított üvegszűrőn átszűrtük, és a micéliumot átmostuk jéghideg (4 °C-os) dietil-pirokarbonáttal (DEPC) kezelt vízzel, ezután liofileztük. A teljes RNS-t TRIZOL reagenssel (Invitrogen, Lofer, Ausztria) izoláltuk a gyártó leírását követve (Chomczynski 1993; Emri és mtsai. 2017). Az RNS minőségét denaturáló agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük. Az utóbbi vizsgálatához az 1 w/v %-os MOPS (3-N-morfolinopropánszulfon sav)-EDTA agaróz gélt kiegészítettük 5 v/v % formaldehiddel. A mintákat előzőleg 10 percig 68 °C-on inkubáltuk 25 mmol/L Na<sub>2</sub>-EDTA és 10 g/L SDS (nátrium-dodecil-szulfát)

jelenlétében. A MOPS-EDTA puffer az alábbiakból állt: 200 mmol/L MOPS, 10 mmol/L EDTA, 50 mmol/L Na-acetát (pH 7,0).

### 5.11.2. RT-qPCR (reverztranszkripció kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakció)

Az RT-qPCR reakciókhoz az Xceed qPCR SG 1-step 2 × Mix Lo-ROX kittet használtuk (iBioTech, Prága, Csehország) a gyártó utasításainak megfelelően. A reakcióelegy 400 ng DNÁzzal kezelt teljes RNS-t, 0,5 μmol/L génspecifikus primer párt és 2,5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>-ot tartalmazott. Az RT-qPCR-hez használt primerpárok az 1. mellékletben vannak feltüntetve. A primer párokat az *Aspergillus* Genome Database (<http://aspergillusgenome.org/>) adatbázisból elérhető szekvenciák alapján terveztük. Az RT-qPCR reakció az alábbi lépések alapján ment végbe:

- (1) reverz transzkripció, 45 °C, 10 perc
  - (2) reverz transzkriptáz denaturáció, 95 °C, 2 perc
  - (3) DNS denaturáció, 95 °C, 5 sec
  - (4) annealing (primer hibridizáció), 51 °C, 10 sec
  - (5) extenzió (lánc hosszabbítás), 65 °C, 20 sec
- a (3)-(5) lépések ismétlése 40 ciklus erejéig

Az RT-qPCR termékek homogenitásának és minőségének ellenőrzése olvadáspontjának meghatározásával történt. A relatív transzkripció mértékét a  $\Delta CP$ , illetve  $\Delta\Delta CP$  értékekkel jellemeztük.  $\Delta\Delta CP = \Delta CP_{\text{kezelt}} - \Delta CP_{\text{kontroll}}$ , és  $\Delta CP = CP_{\text{referencia gén}} - CP_{\text{vizsgált gén}}$ . A képletben szereplő CP az a ciklusszám, amely a PCR termék akkumulálódásához szükséges. A referencia gén a kadmium élettani hatásainak vizsgálatánál az Afu7g00250 (*tub2*), míg az omikai vizsgálatok esetében az Afu6g12400 (*fks1*) volt.

Kísérleteinkhez a Debreceni Egyetem a Genomi Medicina és Bioinformatikai Szolgáltató Laboratórium (DE-ÁOK, Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet) LightCycler-480 (Roche Applied Science, Penzberg, Németország) PCR készülékét használtuk.

### 5.11.3. RNS szekvenálás

Az RNS szekvenáláshoz az alábbi tenyészetekből lettek izolálva az RNS minták: +Fe/-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (kontroll), +Fe/+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dal kezelt), -Fe/-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (vaséhező) és -Fe/+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dal kezelt vaséhező) (ld. 5.3.2. fejezet). Az RNS szekvenálást (a könyvtárak elkészítésétől a fastq.gz file-ok generálásáig) a Genomi Medicina és Bioinformatikai Szolgáltató Laboratórium (Biokémiai és Molekuláris Biológiai Tanszék, Orvostudományi Kar, Debreceni Egyetem) munkatársai végezték. A szekvenáláshoz („single-read sequencing”, 50 bp, 14,6-19x10<sup>6</sup> read/sample) az Illumina HiScan SQ (Illumina, San Diego, CA, USA) készüléket és az Illumina által meghatározott protokollokat használták. A szekvencia adatok szűrését és demultiplexálását a CASAVA szoftver segítségével, a „read”-eknek a 2.0.9 verziójú „TopHat” program (Trapnell, Pachter, és Salzberg 2009) felhasználásával az *A. fumigatus* (Af293) genomjára (Genome: *A\_fumigatus\_Af293\_version\_s03-m05-r04\_chromosomes.fasta.gz*; [http://www.aspergillusgenome.org/download/sequence/A\\_fumigatus\\_Af293/archive](http://www.aspergillusgenome.org/download/sequence/A_fumigatus_Af293/archive); Genome features file (GFF): *A\_fumigatus\_Af293\_version\_s03-m05-r04\_features\_with\_chromosome\_sequences.gff.gz*; [http://www.aspergillusgenome.org/download/gff/A\\_fumigatus\\_Af293/archive](http://www.aspergillusgenome.org/download/gff/A_fumigatus_Af293/archive)) történő illesztését (minden minta esetében 95-96%-os volt), a differenciáltan expresszált gének 2.2.1 verziójú „Cuffdiff” (Trapnell és mtsai. 2013) szoftver segítségével történő meghatározását Dr. Antal Károly (Eszterházy Károly

Egyetem) végezte. A felül-, alulszabályozott és stressz-függő géneknek azokat a differenciáltan expresszált géneket ( $p < 0,05$ ) tekintettük, ahol  $\log_2FC > 1$  (felül szabályozott gének),  $\log_2FC < -1$  (alul szabályozott gének),  $|\log_2FC| > 1$  (stressz-függő gének), ahol FC (“fold-change”) =  $I_{\text{kezelt}}/I_{\text{referencia}}$  és I a génhez tartozó „read”-ek normalizált értéke.

## 5.12. Proteomikai vizsgálatok

### 5.12.1. A minták előkészítése

A proteomikai vizsgálatokat a transzkriptomikai vizsgálatoknál használtakkal megegyező tenyészetek felhasználásával végeztük. A minták előkészítése során a fagyasztott szűrt micéliumot folyékony nitrogén jelenlétében porítottuk, és kb. 50 mg homogenizátumból a fehérjéket triklórecetsavas-acetonos precipitációval kivontuk (Kniemeyer és mtsai. 2006), majd 300  $\mu\text{L}$  lízis pufferben (Összetétele: 1 w/v % SDS, 150 mM NaCl, 100 mM TEAB (tetraetilammónium-bromid), 1 tableta/10 ml cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail, Roche és 1 tableta/10 ml PhosSTOP, Roche) feloldottuk. Szonikálást (15 perc, szobahőmérséklet) követően a mintában lévő RNS-t és DNS-t 5  $\mu\text{L}$  benzonáz (25 U/ $\mu\text{L}$ , Novagen) kezeléssel (37 °C, 30 perc) távolítottuk el. Centrifugáltuk 4 °C-on 15 percig, 14000 g-n. A felülúszó fehérjekoncentrációját Bradford reagens segítségével meghatároztuk (Bradford 1976) és a mintákat 50 mM TEAB segítségével 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ -re hígítottuk. A fehérjék diszulfid hídjait redukciós puffer segítségével szüntettük meg (5  $\mu\text{L}$  redukciós puffer/100  $\mu\text{L}$  minta; 1 h, 55 °C). A redukciós puffer 200 mM TCEP-et (tris(2-karboxiletil)foszfin) tartalmazott 200 mM TEAB-ban oldva. Ezt követően a mintákhoz 5  $\mu\text{L}$  alkilációs puffert (375 mM jódatamid 100 mM TEAB-ban) adtunk és sötétben 30 percen keresztül inkubáltuk

szobahőmérsékleten, majd -20 °C-on tovább inkubáltuk 15 percig. A fehérjék kicsapása érdekében a mintákhoz 4 térfogategység -20 °C-os metanolt, 1 térfogategység -20 °C-os kloroformot és végül 3 térfogategység jéghideg vizet adtunk és 5 percig -20 °C-on inkubáltuk. Vortexelést és centrifugálást (4 °C, 5 perc, 14000 G) követően eltávolítottuk a legfelső vizes réteget, majd 400 µL -20 °C-os metanolt adtunk hozzá. Ismételt vortexelés és centrifugálás (4 °C, 5 perc, 14000 G) után eltávolítottuk a metanos felülúszót és a fehérje csapadékot óvatosan megszárítottuk SpeedVac (ThermoFisher Scientific) segítségével. A fehérje mintákat 100 µL 100 mM TEAB-ban, 20 perces szonikálás segítségével oldottuk vissza. A liofilizált tripszint (Trypsin + LysC proteáz mix, Promega) 50 mM ecetsavban (reszuspenziós puffer) oldjuk fel, hogy a végkoncentrációja 1 µg/µL legyen. A tripszin fehérje arány 1:25 volt és az emésztés 18 órán keresztül 37 °C-on történt. A triptikus peptidek jelölése iTRAQ (izobárikus jelölések a relatív és abszolút mennyiségi meghatározáshoz) 4-plex (Sciex, Darmstadt, Németország) kit-tel történt a gyártó által meghatározott eljárást követve.

### 5.12.2. LC-MS/MS mérés

A minták proteomikai analízisét Dr. Thomas Krüger (Molecular and Applied Microbiology, Leibniz Institute for Natural Product Research and Infection Biology – Hans Knöll Institute (HKI), Jéna, Németország) végezte Ultimate 3000 nano RSLC / QExactive Plus LC-MS/MS készüléken (Thermo Fisher Scientific). Mindegyik 4-plex reakció elemzése háromszor lett elvégezve 4 µl-nyi minta injektálásával. A vizsgálatokat Baldin és munkatársai (Baldin és mtsai. 2015) által leírtak szerint végezték a következő változtatásokkal: Az A mozgófázis 0,1%-os hangyasavat tartalmazó LC-MS



minőségű vízből, míg a B mozgófázis 0,1%-os hangyasavat tartalmazó acetonitrilből állt. Az elválasztás során a B fázis térfogatarányát az alábbiak szerint változtatták: 0-4 perc 0→4%, 5-150 perc 14%, 151-200 perc 19%, 201-300 perc 42%, 319-329 perc 90%, majd 330-400 perc 90%→4%.

### 5.12.3. MS/MS spektrumok elemzése

Az emésztett fragmentált peptidek tömegspektrumából a fehérjék azonosítása a Proteome Discoverer 1.4 (Thermo) szoftverrel történt. Az MS/MS spektrumokat az *A. fumigatus* Af293 AspGD fehérje adatbázisához hasonlítottuk ([www.aspergillusgenome.org/download/sequence/A\\_fumigatus\\_Af293/current/A\\_fumigatus\\_Af293\\_current\\_orf\\_trans\\_all.fasta.gz](http://www.aspergillusgenome.org/download/sequence/A_fumigatus_Af293/current/A_fumigatus_Af293_current_orf_trans_all.fasta.gz)), MASCOT (Matrix Science, UK) 2.4, Sequest HT és MS Amanda keresőprogramok alkalmazásával. A MASCOT keresés esetében a következők voltak a változó módosítások: Met oxidáció és Tyr maradványok iTRAQ jelölése; az állandó módosítások pedig: Cys karbamidometiláció, illetve Lys maradványok és a peptidek N-terminális végének iTRAQ jelölése. A hasító enzim a tripszin volt, és a kihagyott hasítási hely legfeljebb 2. Egy fehérjét akkor tekintettünk felül, illetve alulszabályozottnak, ha a normalizált jelintenzitás változás mértéke (FC) nagyobb, illetve kisebb volt, mint 1,5.

### 5.13. A transzkriptom és proteom adatok funkcionális elemzése

A géncsoport dúsulási vizsgálatokhoz, a KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes = Gének és genomok kyotoi enciklopédiája) és a FunCat gén csoportok (kategóriák) esetében a FungiFun2 programot (<https://elbe.hki->

jena.de/fungifun/fungifun.php) használtuk (Priebe és mtsai. 2015). A „biological process” GO (Gene Ontology) kategóriák esetében az AspGD adatbázis Gene Ontology Term Finder (<http://www.aspergillusgenome.org/cgi-bin/GO/goTermFinder>) alkalmazásával dolgoztunk (Cerqueira és mtsai. 2014). A proteomikai adatok feldolgozásakor a fehérjék azonosítóit előzetesen a megfelelő génazonosítókra cseréltük le. Az alábbi gén csoportok esetében a vizsgálatokat Fisher egzakt-teszt segítségével is elvégeztük:

- „Antioxidáns enzimek”. Az *Aspergillus* Genome Database (<http://aspergillusgenome.org/>) adatbázisból kigyűjtött ismert antioxidáns enzimek (pl. kataláz, peroxidáz, szuperoxid dizmutáz, a tioredoxin és glutaredoxin rendszer enzimeit stb.) génei, illetve feltételezhetően antioxidáns enzimeket kódoló gének csoportja.
- „Citromsav ciklus”. A Flipphi és munkatársai (Flipphi és mtsai. 2009) közleményben szereplő a citromsav ciklus enzimeit kódoló gének csoportja.
- „Vas transzport”. A Haas (Haas 2012) közleménye és az *Aspergillus* Genome Database alapján összeállított, a sziderofór anyagcseréhez és a RIA útvonalhoz köthető gének.
- „Szkvalén-ergoszterin útvonal”. Az Alcazar-Fuoli és munkatársai (Alcazar-Fuoli és Mellado 2012) cikkében szereplő, a szkvalén – ergoszterin átalakításhoz köthető gének. (A géncsoport nem tartalmazza az ergoszterin bioszintézis útvonal első – többek között a sziderofór anyagcserével is átfedő – szakaszának génjeit.)
- „Hem-kötő fehérjék”. Ez a csoport a „Heme bind” FunCat kifejezéshez tartozó fehérjék génjeit tartalmazza.
- „Szekunder metabolit klaszter gén”. Ezt a géncsoportot Inglis és munkatársai (Inglis és mtsai. 2013), valamint Lin és munkatársai (Lin és mtsai. 2013) közleményei alapján állítottuk össze. A szekunder metabolit génklaszterek

manuálisan (is) annotált, illetve kísérletesen is igazolt génjeit tartalmazza. E gének esetében a dúsulási vizsgálatokat nem csak a teljes csoporttal, de klaszterenként is elvégeztük.

- „Respiráció”. A géncsoportot az *Aspergillus* Genome Database alapján állítottuk össze a respirációval kapcsolatba hozható GO kifejezésekhez tartozó gének összegyűjtésével. A géncsoportból utólag eltávolítottuk azon géneket, melyek a „citromsav ciklus” géncsoportban már szerepeltek.

- „Cu<sup>2+</sup> transzport”, „Zn<sup>2+</sup> transzport”, „Fe-S klaszter képzés”, „Fe-S klaszter kötő fehérjék”, „hem bioszintézis”, „transzkripció faktor”, „multidrog transzporterek”. E géncsoportokat szintén az *Aspergillus* Genome Database alapján állítottuk össze a megfelelő GO géncsoportok felhasználásával.

A fenti géncsoportok pontos összetétele a Kurucz és munkatársai (Kurucz és mtsai. 2018a) közlemény 3. mellékletében érhető el.

#### **5.14. Állatkísérletek**

A dolgozatban szereplő állatkísérleteket Dr. Máthéné Dr. Szigeti Zsuzsa és Dr. Szemán-Nagy Gábor (Debreceni Egyetem), valamint Dr. Hargitai Zoltán (Kenézy Gyula Egyetemi Korház) végezte (engedélyszám: 2/2014 DEMAB, GN). A következő különböző kadmium toleranciájú törzseket használtuk fel: Af293; NCAIM F00056; NCAIM F00948; SZMC 2103; SZMC 3104; SZMC 3106. A kísérletekhez 3 nappal a fertőzés előtt 200 mg/tskg ciklofoszfamiddal immunszupprimált BALB/c egereket (10 egér/A. *fumigatus* törzs) alkalmaztak, melyeket 50µL, 7x10<sup>6</sup> konídiumot tartalmazó frissen készített spóraszuszpenzió segítségével intranazálisan (orron keresztül) fertőzték meg altatás után (100 mg/ tskg pentobarbitál). A kezelt állatokat 1, 4, 7 nap múlva újra immunszupresszálták a már leírt módszerrel. A kontroll

egerek a spóraszuszpenzió készítéséhez is használt fiziológias sóoldattal lettek kezelve. A 10 napos kísérlet alatt elpusztult egerekben a fertőzés kialakulását szövettani vizsgálatokkal ellenőrizték (Palicz és mtsai. 2016). A kontroll csoportban elhullás nem történt.

## 6. Összefoglalás

Az *A. fumigatus* bomló növényi maradványokban gazdag élőhelyeken a Föld nagy részén előforduló ubikviter, szaprotróf, opportunistá patogén fonalas gomba (Rhodes és Askew 2010). Ez a gomba felelős az *Aspergillus* fajok által okozott humán fertőzések több, mint 90 %-áért (Paulussen és mtsai. 2016). Többnyire a légző rendszeren keresztül jut be a szervezetbe, ahol elsősorban a legyengült immunrendszerű egyéneknél különböző tüdőbetegségeket okozhat (Latgé 1999; S. J. Park és Mehrad 2009; Latgé és Chamilos 2019). Az emberi szervezeten belül az *A. fumigatus*-nak többféle stresszel, illetve ezek kombinációjával is meg kell birkóznia. Ilyen tipikus stressz hatások a vaséhezés és az oxidatív stressz is (Brown és Goldman 2016). E két stressz szorosan kapcsolódik egymáshoz: a túl sok vas – redox aktivitásának köszönhetően – oxidatív stresszt indukálhat, de a túl kevés vas is felboríthatja a sejtek redox egyensúlyát, hiszen számos olyan antioxidáns enzim (pl. katalázok, peroxidázok) van, melyek vasat igényelnek működésükhöz (Dlouhy és Outten 2013).

A dolgozatom első témája során arra voltunk kíváncsiak, hogyan befolyásolja a gomba oxidatív stresszel szembeni védekezését az emberi szervezetben való növekedéskor is jellemző vaséhezés. Ezen vizsgálatok eredményei alapján megérthetjük, hogy hogyan alkalmazkodik az *A. fumigatus* a vaséhezéssel kombinált oxidatív stresszhez, ami új antifungális szerek kifejlesztéséhez vezethet el. Kísérleteinkben kontroll (+Fe/-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), hidrogén-peroxiddal kezelt (+Fe/+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), vaséhező (-Fe/-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), illetve hidrogén-peroxiddal kezelt vaséhező (-Fe/+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) kultúrák transzkriptomikai és proteomikai analízisével próbáltunk közelebb kerülni a válaszokhoz. Eredményeinkből az alábbi következtetéseket vontuk le:

A vaséhezés és az oxidatív stressz között szinergista kölcsönhatás van (1., 2. táblázat; 1., 3. ábra). Azaz a vaséhező *A. fumigatus* tenyészetek számára viszonylag gyenge oxidatív stressz leküzdése is igen komoly kihívást jelenthet. Ez a jelenség – amennyiben más mikróbákra is általánosítható – megmagyarázhatja, hogy a vas hozzáféréseinek korlátozása, illetve a kórokozókkal szembeni oxidatív támadás miatt ennyire elterjedt stratégiák a fertőzések leküzdésére az állat- és növényvilágban egyaránt (Zarembler és mtsai. 2007; Haas 2012; Prüfer és mtsai. 2014).

A vaséhezéssel kombinált oxidatív stresszre adott stresszválasz erősségében és jellegében is eltért mind az oxidatív, mind a vaséhezésre adott stresszválasztól. Így a kombinált kezelésre adott stresszválasz számos elemének megjelenése nem volt megjósolható az egyszerű stresszkezelésekből nyert adatok alapján (5. ábra). Mindez azt is jelenti, hogy ha az *in vitro* vizsgálatokból nyert adatok segítségével akarjuk megjósolni a mikróbák *in vivo* viselkedését, körültekintőnek kell lennünk, mert igen jelentősen módosíthatják a mikroba reakcióját a viszonylag kis, az emberi szervezetben jelentkező, de az *in vitro* rendszerben figyelmen kívül hagyott (stressz) hatások.

Az oxidatív stresszel kombinált vaséhezés alatt a következő változásokat tapasztaltuk:

A kombinált kezelésnek kitett tenyészetekben a DNS repair, a hősokk és oxidatív stresszválasz gének (elsősorban a „vastól független antioxidáns enzimek”: Sod1, Trr1, Aspf29) (4. melléklet) felülszabályozódása (1., 2. táblázat; 2. melléklet) egybeesett a makroautofágiában és az ubikvitin-függő fehérje degradációban részt vevő gének felülszabályozódásával (1. táblázat). Az előbbi arra utal, hogy aktiválódott a sejtvédelem, amelynek célja, hogy megvédje a sejteket a ROS által okozott károsodásuktól. Az utóbbi pedig

feltehetőleg nem csak a sérült fehérjéktől való megszabadulást tette lehetővé, de a sérült/felesleges vastartalmú fehérjék lebontásával növelte a felhasználható vas mennyiségét (Richie és mtsai. 2007).

A riboszómák képződésében és a translációban résztvevő gének transzkripciója annak ellenére csökkent kombinált kezelés alatt, hogy a vaséhezés már önmagában is jelentős alulszabályozódáshoz vezetett (1. táblázat; 2. melléklet). E változások hozzájárulhattak a tenyészet növekedésének és ezen keresztül vas igényének további csökkenéséhez.

Bár általában a vas igényes folyamatok alulszabályozódtak – összhangban a *hapX* felülszabályozódásával – egyes vastartalmú (hem és Fe-S klaszter tartalmú) fehérjét kódoló gének, valamint a Fe-S klaszter bioszintézisben résztvevő gének jelentős felülszabályozódást mutattak (3. táblázat; 2., 4. melléklet). A proteomikai vizsgálataink alapján ezen géneknek a felülszabályozódása, elegendő vas hiányában, nem volt képes megnövelni a fehérje mennyiségét (3. táblázat; 4. melléklet). Ugyanakkor ezen változásoknak fontos szerepe lehetett a kombinált kezelés túlélésében. Ez alapján egy lehetséges terápiás célpont lehet a vastartalmú fehérjék képzésének gátlása.

A kombinált stressz több olyan gén transzkripcióját is befolyásolta, amelyek multidrog transzportereket kódolnak, vagyis hatással lehetett a gomba antifungális szerek iránti érzékenységre. Ezen gének többsége felülszabályozódott (2. melléklet), ráadásul az *abcB* gén esetében a kódolt fehérje mennyiségének növekedését is megfigyeltük (4. melléklet). Az AbcB (Cdr1B) transzporternek szerepe van az *A. fumigatus* Cyp51a-független azol-rezisztencia kialakulásában (Fraczek és mtsai. 2013). Ez alapján fontos támadási célpont lehet az efflux rendszerek gátlása a gyógyszeres terápiában (Cannon és mtsai. 2009; Tegos és mtsai. 2011).

Az *A. fumigatus* viselkedését az emberi szervezeten kívül érő stressz is alapvetően befolyásolja. Az antropogén eredetű stresszhatások közül az egyik legjelentősebb a kadmium szennyezés okozta stressz (Godt és mtsai. 2006). A kadmium az egyik legártalmasabb nehézfém az élőlényekre nézve (Davis 1984; Dong és mtsai. 2008; Chakraborty és mtsai. 2014). A környezeti kadmiumszennyezés jelentős része ipari (Godt és mtsai. 2006), illetve mezőgazdasági eredetű (Järup és Akesson 2009; Chakraborty és mtsai. 2014). A kadmium megtalálható egyes foszfáttartalmú műtrágyákban is (Pérez és Anderson 2009; Chakraborty és mtsai. 2014), így az ezáltal kijutatott kadmium könnyen felhalmozódhat a takarmányozásra, vagy élelmiszeripari felhasználásra szánt növényekben is, ami pedig komoly egészségügyi kockázatot jelent (Zhou és Qiu 2005; Chakraborty és mtsai. 2014).

Dolgozatom második felében arra a kérdésre kerestük a választ, hogy az *A. fumigatus* Af293 törzs miért rezisztens a kadmiumra, illetve kapcsolatba hozható-e kadmium toleranciája (de Vries és mtsai. 2017) vas anyagcseréjével és ezen keresztül befolyásolhatja-e *in vivo* virulenciáját. E vizsgálatok segíthetnek megérteni a kadmium tolerancia kialakulásának és mechanizmusának okait, és hozzájárulhatnak nagy kadmium bioszorpciós potenciállal rendelkező *Aspergillus* törzsek, vagy kadmiumot nem akkumuláló szántóföldi növények kifejlesztéséhez is. Mindezek megismeréséhez környezeti és orvosi mintákból származó, eltérő kadmium toleranciájú törzsek élettani tulajdonságait hasonlítottuk össze. Legfontosabb megállapításaink a következők voltak:

A vizsgált *A. fumigatus* törzsek kadmium toleranciája széles tartományban változott ( $0,25 \text{ mM} < \text{IC}_{50} < 1 \text{ mM}$ ) (4. táblázat). Csak az Af293 törzs esetében tapasztaltunk kiemelkedően magas ( $\text{IC}_{50} > 2 \text{ mM}$ ) kadmium toleranciát (4. táblázat).



A *pcaA* gén minden törzsben aktív volt és relatív transzkripciója jól korrelált a kadmium toleranciával (6. ábra). Ez alapján úgy gondoljuk, hogy a PcaA önmagában nem elegendő a kadmium toleranciához, de megfelelően aktív kifejeződése esetén lehetőséget biztosít a nagy kadmium tolerancia kialakulására.

Noha a kadmium kezelés oxidatív stressz kialakulásához vezetett (5. táblázat), a vizsgált törzsek esetében nem tapasztaltunk pozitív korrelációt az oxidatív stressz tolerancia és a kadmium tolerancia között (6. táblázat). Bár az oxidatív stressz elleni védekezés fontos lehet a kadmium toxicitásának leküzdésében, az antioxidáns védelemben megmutatkozó különbségek nem magyarázzák a törzsek kadmium tolerancia különbségeit.

Az oxidatív stressz egyértelműen nem a GSH raktárak kiürülésének, vagy az általunk vizsgált antioxidáns enzimek (kataláz, SODs, GPx és GR) aktivitásvesztésének volt a következménye (5. táblázat). A kadmium kezelés által okozott redox egyensúlyvesztés háttérének tisztázása további vizsgálatokat igényel.

Nem tapasztaltunk korrelációt a kadmium tolerancia és a  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  ionokkal szemben mutatott tolerancia között (7. táblázat). Ugyanakkor a  $\text{Cd}^{2+}$  és  $\text{Cu}^{2+}$ , illetve a  $\text{Cd}^{2+}$  és  $\text{Zn}^{2+}$  növekedésgátló hatása között szinergizmust figyeltünk meg (8. táblázat). Ez arra utalhat, hogy a kadmium megzavarhatja a sejtek fémion homeosztázisát, ami irodalmi adatok alapján elvezethet oxidatív stressz kialakulásához, de önmagában is károsíthatja a sejteket (Rani és mtsai. 2014; Jacobo-Estrada és mtsai. 2017).

A kadmium tolerancia jól korrelált a törzsek  $\text{Fe}^{3+}$  toleranciájával (7. táblázat) és extracelluláris sziderofór termelésével (7. ábra). Az Af293 törzs esetében nem volt szinergizmus a  $\text{Cd}^{2+}$  és  $\text{Fe}^{3+}$  között (8. táblázat). A fentiek alapján szoros kapcsolat lehet a vas anyagcsere és a kadmium tolerancia

között. Az intenzív sziderofór termelés miatt a gomba nincs ráutalva a vasat a hifákba beengedő vas transzporterek működtetésére. Így, az intenzív *pcaA* transzkripció mellett (6. ábra), az intenzív TAF-C termelés (7./A ábra) is magyarázhatja a törzs jelentős kadmium toleranciáját. Ugyanakkor az is elképzelhető, hogy a  $\text{Fe}^{2+}$  ionok eltávolítása a PcaA elsődleges feladata, és csak a  $\text{Fe}^{2+}$  és  $\text{Cd}^{2+}$  ionok hasonlósága miatt tudja a  $\text{Cd}^{2+}$  ionokat is kipumpálni a sejtekből, hasonlóan ahhoz, ahogy a  $\text{Fe}^{2+}$  transzporterek a  $\text{Fe}^{2+}$  ionok mellett  $\text{Cd}^{2+}$ -t is szállítanak. A vas - kadmium kapcsolat megmagyarázhatja a nagy kadmium toleranciájú Af293 törzs nagy *in vivo* virulenciáját is (8. ábra).

Nagy kadmium toleranciájának köszönhetően az Af293 törzs akár 2 mM  $\text{Cd}^{2+}$  koncentráció mellett is tudott növekedni és ilyen körülmények között akár 850 mg kadmiumot is képes volt adszorbeálni száraz sejttömeg kilogrammonként (9. táblázat). A gombasejtfal igen jelentős  $\text{Cd}^{2+}$ -kötő képessége révén a gomba biomassza felhasználható szennyvizek nehézfém tartalmának csökkentésére (biosorption, bioleaching), sőt egyes nehézfémek – köztük tartozik a kadmium is – gazdaságos kinyerésére (biomining) is (Jiang és mtsai. 2018; Boczonádi és mtsai. 2020). A *pcaA* gén heterológ expressziója, vagy a megfelelő ortológ gén homológ expressziója segítségével növelhető a gombatorzsek kadmium toleranciája, ami minden olyan esetben hasznos lehet, amikor a kadmiumot élő biomasszával szeretnénk megkötni. A *pcaA*, illetve ortológjainak növényekben történő expressziója ugyanakkor elvezethet kadmiumot nem akkumuláló haszonnövények kifejlesztéséhez.

## 7. Summary

*A. fumigatus* is a saprotrophic, ubiquitous, opportunistic, pathogenic filamentous fungi found in habitats, that are rich in decomposed plant remains, over the Earth (Rhodes and Askew 2010). This fungus is responsible for more than 90 % of human infections caused by *Aspergillus* species (Paulussen *et al.* 2016). It enters primarily through the respiratory system in the body, where it can cause various lung diseases mostly in individuals with immunosuppressed immune system (Latgé 1999; Park and Mehrad 2009). *A. fumigatus* has to cope with several stresses or a combination of them within the human body. Such typical stresses are iron starvation and oxidative stress (Brown and Goldman 2016). These two stresses are closely related: excess iron can generate oxidative stress due to its redox activity, but too low amount of iron can upset the redox balance of cells, as many antioxidant enzymes (e.g. catalases, peroxidases) require iron to their function (Dlouhy and Outten 2013).

In the first topic of my dissertation, we were interested in how the protection of the fungus against oxidative stress is affected by iron starvation. The results of these studies may help us to understand the adaptation of *A. fumigatus* to oxidative stress combined with iron starvation in the human body, which may conduct to the development of new antifungal strategies and agents. To find answers, we compared the transcriptom and proteom of control (iron-replete) (+Fe/-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), hydrogen-peroxide-treated (+Fe/+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), iron-deprived (-Fe/-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) and iron-deprived-hydrogen-peroxide-treated (-Fe/+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) cultures. From the results of these experiments, we concluded the followings:

A synergistic interaction was observed between iron starvation and oxidative stress (Tables 1, 2; Fig. 1, 3). Thus, coping with relatively weak oxidative stress can also be a very serious challenge for iron-starving *A.*

fumigatus cultures. This phenomenon, if generalized to other microbes, may explain why limitation of iron access and oxidative attack on pathogens are such widespread strategies to combat infections in both the plant and animal world (Zarembler *et al.* 2007; Haas 2012; Prüfer *et al.* 2014).

The stress response to oxidative stress combined with iron starvation differs in both strength and quality from oxidative and iron starvation stress responses, separately. The presence of many elements of the stress response to the combination therapy was not predictable based on data from simple stress treatments (Fig. 5). It also means that we have to be very careful if we want to forecast the *in vivo* behavior of microbes based on data obtained from *in vitro* studies. Even a relatively small difference between the *in vitro* and *in vivo* systems can substantially modify the response of the microbes.

During the combined (iron starvation plus oxidative) stress treatment, the following changes were observed:

Heat shock response, DNA repair, and oxidative stress response genes (mainly the genes of “iron-independent antioxidant enzymes” such as Sod1, Trr1, Aspf29; Appendix 4) (Tables 1, 2; Appendix 2) were upregulated which was followed by the upregulation of genes included in macroautophagy and ubiquitin-dependent protein degradation (Table 1). The former suggests that cell defense has been activated to protect cells from ROS-induced damage. The latter presumably not only made it possible to eliminate the damaged proteins, but also increased the amount of (re)usable iron by breaking down the damaged /excess iron-containing proteins (Richie *et al.* 2007).

Transcription of genes involved in ribosome formation and translation was reduced during combination therapy, despite the fact that only iron starvation led to their significant downregulation (Table 1; Appendix 2). These

changes may have contributed to the growth of the culture and thus to a further decrease in iron demand.

Although iron-dependent processes were generally downregulated in accordance with *hapX* upregulation, some genes encoding iron-containing proteins (*i.e.* heme and Fe-S cluster binding proteins) as well as genes involved in Fe-S cluster biosynthesis showed significant upregulation (Table 3; Appendix 2, 4). Based on our proteomic studies, the upregulation of these genes, in the absence of sufficient iron, was not able to increase the amount of protein (Table 3; Appendix 4). However, these changes may have played an important role in the survival of combination therapy. Based on this, inhibition of iron-containing proteins can be a potential therapeutic target in the future.

The combined stress also impacted the transcription of numerous genes encoding multidrug transporters thus it may have affected the sensitivity of the fungus to antifungal agents. Most of these genes were upregulated (Appendix 2). Moreover, an increase in the amount of encoded protein was also detected for the *abcB* gene (Appendix 4). The AbcB (Cdr1B) transporter has a role in the development of Cyp51a-independent azole resistance in *A. fumigatus* (Fraczek *et al.* 2013). Based on these results, the inhibition of the efflux systems during antifungal therapy may be an important target for attack. (Cannon *et al.* 2009; Tegos *et al.* 2011).

The behavior of *A. fumigatus* is also fundamentally influenced by stress outside the human body. One of the most significant effects of anthropogenic origin is the stress caused by cadmium pollution (Godt *et al.* 2006). Cadmium is one of the most harmful heavy metals for living organisms (Davis 1984; Dong *et al.* 2008; Chakraborty *et al.* 2014). A significant proportion of environmental cadmium pollution is derived from industry (Godt *et al.* 2006) and agriculture (Järup and Akesson 2009; Chakraborty *et al.* 2014). Cadmium

is found in some phosphate-containing fertilizers (Pérez and Anderson 2009; Chakraborty *et al.* 2014), therefore cadmium can easily accumulate in plants utilized for feed or food, which represent a serious health risk (Zhou and Qiu 2005; Chakraborty *et al.* 2014).

In the second half of my dissertation, we investigated why *A. fumigatus* Af293 is resistant to cadmium, and whether cadmium tolerance of this strain (de Vries *et al.* 2017) can be related to iron metabolism and through it can affect its *in vivo* virulence. These studies may help to understand the molecular background of cadmium tolerance and may also contribute to the development of *Aspergillus* strains with high cadmium biosorption potential or plants that do not accumulate cadmium. To understand all this, we compared the physiological properties of strains with different cadmium tolerances isolated from environmental and medical samples. Our main findings were as follows:

The cadmium tolerance of the tested *A. fumigatus* strains is variable over a wide range ( $0.25 \text{ mM} < \text{IC}_{50} < 1 \text{ mM}$ ) (Table 4). Only the Af293 represented a remarkably high ( $\text{IC}_{50} > 2 \text{ mM}$ ) cadmium tolerance (Table 4).

The *pcaA* gene was active in all tested strains and its relative transcription correlated well with cadmium tolerance (Fig. 6). Based on this, it is believed that PcaA alone is not sufficient for cadmium tolerance, but if properly expressed, it provides an opportunity for the development of it.

Though cadmium treatment induced oxidative stress (Table 5), no positive correlation was discovered between oxidative stress tolerance and cadmium tolerance in the tested strains (Table 6). Although protection against oxidative stress can be important in coping with cadmium toxicity, differences in antioxidant protection do not explain the observed differences in cadmium tolerance between strains.

The observed oxidative stress was clearly not the result of the depletion of GSH pools or the loss of catalase, GPx, GR or SODs activities (Table 5). Therefore, further researches are needed to clarify the background of the cadmium induced oxidative stress.

No correlation was detected between cadmium tolerance and tolerance to  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  ions (Table 7). However, a synergism was observed between the growth inhibitory effects of  $\text{Cd}^{2+}$  and  $\text{Cu}^{2+}$  as well as of  $\text{Cd}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$  (Table 8). This suggests that cadmium may perturb the metal ion homeostasis of cells, which – according to literature data (Rani *et al.* 2014; Jacobo-Estrada *et al.* 2017) – may lead to the development of oxidative stress, but it may also damage the cells directly.

Cadmium tolerance correlated well with  $\text{Fe}^{3+}$  tolerance (Table 7) and extracellular siderophore production (Fig. 7). Moreover, in the case of the Af293 strain showing high cadmium tolerance, there was no synergism between  $\text{Cd}^{2+}$  and  $\text{Fe}^{3+}$  (Table 8). According to it, there can be a close connection between iron metabolism and cadmium tolerance. Due to the intensive siderophore production, the fungus does not need to use iron transporters that allow to enter cadmium into the hyphae. Thus, in addition to elevated *pcaA* expression (Fig. 6), the increased TAF-C production (Fig. 7./A) may also explain the significant cadmium tolerance of the strain. It is also feasible that the main function of PcaA is to remove excess  $\text{Fe}^{2+}$  from cells and it can pump  $\text{Cd}^{2+}$  only because it is similar to  $\text{Fe}^{2+}$  as it was described with  $\text{Fe}^{2+}$  transporters responsible for iron uptake. The iron-cadmium connection may also explain the high *in vivo* virulence of the high cadmium-tolerant strain Af293 (Fig. 8).

Due to its high cadmium tolerance, Af293 strain was able to grow at concentrations up to 2 mM  $\text{Cd}^{2+}$  and under these conditions it was able to

adsorb up to 850 mg Cd/ kg DCM (Table 9). Due to the very significant Cd<sup>2+</sup>-binding capacity of the fungal cell wall, fungal biomass can be used to diminish the heavy metal content of wastewater (biosorption, bioleaching) and even to extract certain heavy metals, economically (biomining) including cadmium (Jiang *et al.* 2018; Boczonádi *et al.* 2020) . Heterologous expression of the *pcaA* gene, or homologous expression of the corresponding orthologous gene, can increase the cadmium tolerance of fungal strains, which can be useful in all cases where cadmium is wished to be bound by living biomass. Moreover, expression of *pcaA* or its orthologs in plants may lead to cultivate crops that do not accumulate cadmium.



## 8. Irodalomjegyzék

- Abad, A., JV Fernández-Molina, J. Bikandi, A. Ramírez, J. Margareto, J. Sendino, FL. Hernando, J. Pontón, J. Garaizar, A. Rementeria. 2010. „What Makes *Aspergillus Fumigatus* a Successful Pathogen? Genes and Molecules Involved in Invasive Aspergillosis”. *Revista Iberoamericana De Micologia* 27 (4): 155–82. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2010.10.003>.
- Abarca, M L, M R Bragulat, G Castellá, F J Cabañes. 1994. „Ochratoxin A production by strains of *Aspergillus niger* var. *niger*.” *Applied and Environmental Microbiology* 60 (7): 2650–52.
- Abdel -Aty, Azza M., Nabila S. Ammar, Hany H. Abdel Ghafar, Rizka K. Ali. 2013. „Biosorption of Cadmium and Lead from Aqueous Solution by Fresh Water Alga *Anabaena Sphaerica* Biomass”. *Journal of Advanced Research* 4 (4): 367–74. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2012.07.004>.
- Abe, Keietsu, K. Gomi, F. Hasegawa, M. Machida. 2006. „Impact of *Aspergillus Oryzae* Genomics on Industrial Production of Metabolites”. *Mycopathologia* 162 (3): 143–53. <https://doi.org/10.1007/s11046-006-0049-2>.
- Adamis, PD. B., AD. Panek, Selma G. F. Leite, ECA. Eleutherio. 2003. „Factors Involved with Cadmium Absorption by a Wild-Type Strain of *Saccharomyces Cerevisiae*”. *Brazilian Journal of Microbiology* 34 (1): 55–60. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822003000100012>.
- Adams, Thomas H., Jenny K. Wieser, Jae-Hyuk Yu. 1998. „Asexual Sporulation in *Aspergillus nidulans*”. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62 (1): 35–54.
- Adle, David J., D. Sinani, H. Kim, J. Lee. 2007. „A Cadmium-Transporting P1B-Type ATPase in Yeast *Saccharomyces Cerevisiae*”. *The Journal of Biological Chemistry* 282 (2): 947–55. <https://doi.org/10.1074/jbc.M609535200>.
- Ahluwalia, S. Singh, D. Goyal. 2007. „Microbial and Plant Derived Biomass for Removal of Heavy Metals from Wastewater”. *Bioresource Technology* 98 (12): 2243–57. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.12.006>.
- Aimanianda, Vishukumar, J. Bayry, S. Bozza, O. Kniemeyer, K. Perruccio, SR. Elluru, C. Clavaud, et al.. 2009. „Surface Hydrophobin Prevents Immune Recognition of Airborne Fungal Spores”. *Nature* 460 (7259): 1117–21. <https://doi.org/10.1038/nature08264>.

Albrecht, Daniela, R. Guthke, A.A. Brakhage, Olaf Kniemeyer. 2010. „Integrative Analysis of the Heat Shock Response in *Aspergillus Fumigatus*”. *BMC Genomics* 11: 32. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-32>.

Alcazar-Fuoli, Laura, E. Mellado. 2012. „Ergosterol Biosynthesis in *Aspergillus Fumigatus*: Its Relevance as an Antifungal Target and Role in Antifungal Drug Resistance”. *Frontiers in Microbiology* 3: 439. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00439>.

Alfvén, T., C. G. Elinder, M. D. Carlsson, A. Grubb, L. Hellström, B. Persson, C. Pettersson, G. Spång, A. Schütz, és L. Järup. 2000. „Low-Level Cadmium Exposure and Osteoporosis”. *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 15 (8): 1579–86. <https://doi.org/10.1359/jbmr.2000.15.8.1579>.

Amich, Jorge, JA. Calera. 2014. „Zinc Acquisition: A Key Aspect in *Aspergillus Fumigatus* Virulence”. *Mycopathologia* 178 (5–6): 379–85. <https://doi.org/10.1007/s11046-014-9764-2>.

Anderson, Mary E. 1985. „Determination of Glutathione and Glutathione Disulfide in Biological Samples”. In *Methods in Enzymology*, 113:548–55. Glutamate, Glutamine, Glutathione, and Related Compounds. Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(85\)13073-9](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(85)13073-9).

Anyaogu, Diana Chinyere, UH. Mortensen. 2015. „Heterologous Production of Fungal Secondary Metabolites in *Aspergilli*”. *Frontiers in Microbiology* 6: 77. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00077>.

Archer, DB. 2000. „Filamentous Fungi as Microbial Cell Factories for Food Use”. *Current Opinion in Biotechnology* 11 (5): 478–83. [https://doi.org/10.1016/s0958-1669\(00\)00129-4](https://doi.org/10.1016/s0958-1669(00)00129-4).

Archer, DB, G Turner. 2006. „Genomics of Protein Secretion and Hyphal Growth in *Aspergillus*.” In *Mycota*. Köt. XIII. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag.

Askew, DS. 2008. „*Aspergillus Fumigatus*: Virulence Genes in a Street-Smart Mold”. *Current Opinion in Microbiology* 11 (4): 331–37. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2008.05.009>.

Aung, Khin Moh Moh, YP. Ting. 2005. „Biobleaching of Spent Fluid Catalytic Cracking Catalyst Using *Aspergillus Niger*”. *Journal of Biotechnology* 116 (2): 159–70. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2004.10.008>.

Ayres, R U. 1992. „Toxic heavy metals: materials cycle optimization.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89 (3): 815–20.

Bairwa, Gaurav, WH. Jung, JW. Kronstad. 2017. „Iron acquisition in fungal pathogens of humans”. *Metallomics integrated biometal science* 9 (3): 215–27. <https://doi.org/10.1039/c6mt00301j>.

Bakti, Fruzsina, C. Sasse, T. Heinekamp, I. Pócsi, GH. Braus. 2018. „Heavy Metal-Induced Expression of PcaA Provides Cadmium Tolerance to *Aspergillus Fumigatus* and Supports Its Virulence in the *Galleria Mellonella* Model”. *Frontiers in Microbiology* 9: 744. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00744>.

Baldin, Clara, V. Valiante, T., L. Schafferer, H. Haas, O. Kniemeyer, AA. Brakhage. 2015. „Comparative Proteomics of a Tor Inducible *Aspergillus Fumigatus* Mutant Reveals Involvement of the Tor Kinase in Iron Regulation”. *Proteomics* 15 (13): 2230–43. <https://doi.org/10.1002/pmic.201400584>.

Balloy, Viviane, M. Chignard. 2009. „The Innate Immune Response to *Aspergillus Fumigatus*”. *Microbes and Infection* 11 (12): 919–27. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2009.07.002>.

Banakar, Raviraj, ÁA. Fernández, J. Abadía, T. Capell, P. Christou. 2017. „The Expression of Heterologous Fe (III) Phytosiderophore Transporter HvYS1 in Rice Increases Fe Uptake, Translocation and Seed Loading and Excludes Heavy Metals by Selective Fe Transport”. *Plant Biotechnology Journal* 15 (4): 423–32. <https://doi.org/10.1111/pbi.12637>.

Barkai-Golan, R. 2008a. „*Aspergillus* Mycotoxins”. In *Mycotoxins in Fruits and Vegetables*. Academic Press.

Barkai-Golan, R. 2008b. „*Penicillium* Mycotoxin”. In *Mycotoxins in Fruits and Vegetables*. Academic Press.

Barratt, RW., GB. Johnson, WN. Ogata. 1965. „Wild-Type and Mutant Stocks of *Aspergillus Nidulans*”. *Genetics* 52 (1): 233–46.

Barros Júnior, L.M., GR. Macedo, MML. Duarte, EP. Silva, AKCL. Lobato. 2003. „Biosorption of cadmium using the fungus *Aspergillus niger*”. *Brazilian Journal of Chemical Engineering* 20 (3): 229–39. <https://doi.org/10.1590/S0104-66322003000300003>.

Becker, Mathias, F. Asch. 2005. „Iron Toxicity in Rice – Conditions and Management Concepts”. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 168 (4): 558–73. <https://doi.org/10.1002/jpln.200520504>.

Beffa, T., F. Staib, J. Lott Fischer, P. F. Lyon, P. Gumowski, O. E. Marfenina, S. Dunoyer-Geindre, és mtsai. 1998. „Mycological Control and Surveillance of Biological Waste and Compost”. *Medical Mycology* 36 Suppl 1: 137–45.

Bennett, J. W., M. Klich. 2003. „Mycotoxins”. *Clinical Microbiology Reviews* 16 (3): 497–516. <https://doi.org/10.1128/cmr.16.3.497-516.2003>.

Bennett, JW. 2010. „An Overview of the Genus *Aspergillus*”. In *Aspergillus: Molecular Biology and Genomics*, 238. Norfolk, UK: Caister Academic Press. <https://www.caister.com/openaccess/pdf/aspergillus1.pdf>.

Binder, Ulrike, C. Lass-Flörl. 2013. „New Insights into Invasive Aspergillosis—from the Pathogen to the Disease”. *Current Pharmaceutical Design* 19 (20): 3679–88. <https://doi.org/10.2174/13816128113199990366>.

Blatzer, Michael, U. Binder, H. Haas. 2011. „The Metalloreductase FreB Is Involved in Adaptation of *Aspergillus Fumigatus* to Iron Starvation”. *Fungal Genetics and Biology: FG & B* 48 (11): 1027–33. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2011.07.009>.

Blatzer, Michael, JP. Latgé. 2017. „Metal-Homeostasis in the Pathobiology of the Opportunistic Human Fungal Pathogen *Aspergillus Fumigatus*”. *Current Opinion in Microbiology* 40: 152–59. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2017.11.015>.

Boczonádi, Imre, Zs. Török, Á. Jakab, G. Kónya, K. Gyurcsó, E. Baranyai, Z. Szoboszlai, és mtsai. 2020. „Increased Cd<sup>2+</sup> Biosorption Capability of *Aspergillus Nidulans* Elicited by *CrpA* Deletion”. *Journal of Basic Microbiology* 60 (7): 574–84. <https://doi.org/10.1002/jobm.202000112>.

Boukhalfa, Hakim, AL. Crumbliss. 2002. „Chemical Aspects of Siderophore Mediated Iron Transport”. *Biometals: An International Journal on the Role of Metal Ions in Biology, Biochemistry, and Medicine* 15 (4): 325–39. <https://doi.org/10.1023/a:1020218608266>.

Boylan, M. T., P. M. Mirabito, C. E. Willett, C. R. Zimmerman, és W. E. Timberlake. 1987. „Isolation and Physical Characterization of Three Essential Conidiation Genes from *Aspergillus Nidulans*”. *Molecular and Cellular Biology* 7 (9): 3113–18. <https://doi.org/10.1128/mcb.7.9.3113>.

Bradford, M.M. 1976. „A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding”. *Analytical Biochemistry* 72 (1): 248–54. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).

Brown, Alistair J. P., S. Budge, D. Kaloriti, A. Tillmann, MD. Jacobsen, Z. Yin, IV. Ene, és mtsai. 2014. „Stress Adaptation in a Pathogenic Fungus”. *The Journal of Experimental Biology* 217 (Pt 1): 144–55. <https://doi.org/10.1242/jeb.088930>.

- Brown, Gordon D., DW. Denning, NAR. Gow, SM. Levitz, MG. Netea, Theodore C. White. 2012. „Hidden Killers: Human Fungal Infections”. *Science Translational Medicine* 4 (165): 165rv13. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3004404>.
- Brown, Neil A., GH. Goldman. 2016. „The Contribution of *Aspergillus Fumigatus* Stress Responses to Virulence and Antifungal Resistance”. *Journal of Microbiology (Seoul, Korea)* 54 (3): 243–53. <https://doi.org/10.1007/s12275-016-5510-4>.
- Bruno, John F., S P. Ellner, I. Vu, K. Kim, CD. Harvell. 2011. „Impacts of Aspergillosis on Sea Fan Coral Demography: Modeling a Moving Target”. *Ecological Monographs* 81 (1): 123–39. <https://doi.org/10.1890/09-1178.1>.
- Caetano, Soraia M., R. Menezes, C. Amaral, C. Rodrigues-Pousada, C. Pimentel. 2015. „Repression of the Low Affinity Iron Transporter Gene FET4: A NOVEL MECHANISM AGAINST CADMIUM TOXICITY ORCHESTRATED BY YAP1 VIA ROX1”. *The Journal of Biological Chemistry* 290 (30): 18584–95. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.600742>.
- Cai, Shengxin, T. Zhu, L. Du, B. Zhao, D. Li, Q. Gu. 2011. „Sterigmatocystins from the Deep-Sea-Derived Fungus *Aspergillus Versicolor*”. *The Journal of Antibiotics* 64 (2): 193–96. <https://doi.org/10.1038/ja.2010.154>.
- Cai, Z, W. Du, Q. Zeng, N. Long, C. Dai, és L. Lu. 2017. „Cu-Sensing Transcription Factor Mac1 Coordinates with the Ctr Transporter Family to Regulate Cu Acquisition and Virulence in *Aspergillus Fumigatus*.” *Fungal Genetics and Biology: FG & B* 107 (augusztus): 31–43. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2017.08.003>.
- Cannon, Richard D., E. Lamping, AR. Holmes, K. Niimi, PV. Baret, MV. Keniya, K. Tanabe, M. Niimi, A. Goffeau, BC. Monk. 2009. „Efflux-Mediated Antifungal Drug Resistance”. *Clinical Microbiology Reviews* 22 (2): 291–321, Table of Contents. <https://doi.org/10.1128/CMR.00051-08>.
- Cassat, James E., EP. Skaar. 2013. „Iron in Infection and Immunity”. *Cell host & microbe* 13 (5): 509–19. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.04.010>.
- Cerqueira, Gustavo C., MB. Arnaud, DO. Inglis, MS. Skrzypek, G. Binkley, M. Simison, SR. Miyasato, és mtsai. 2014. „The *Aspergillus* Genome Database: Multispecies Curation and Incorporation of RNA-Seq Data to Improve Structural Gene Annotations”. *Nucleic Acids Research* 42 (Database issue): D705-710. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1029>.
- Chakraborty, Shatarupa, A. Mukherjee, AR Khuda-Bukhsh, TK Das. 2014. „Cadmium-Induced Oxidative Stress Tolerance in Cadmium Resistant *Aspergillus Foetidus*: Its Possible Role in Cadmium Bioremediation”. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 106: 46–53. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.04.007>.

- Chang, Yun C., HF. Tsai, M. Karos, KJ. Kwon-Chung. 2004. „THTA, a Thermotolerance Gene of *Aspergillus Fumigatus*”. *Fungal Genetics and Biology: FG & B* 41 (9): 888–96. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2004.06.004>.
- Chiu, D. T., F. H. Stults, A. L. Tappel. 1976. „Purification and Properties of Rat Lung Soluble Glutathione Peroxidase”. *Biochimica Et Biophysica Acta* 445 (3): 558–66. [https://doi.org/10.1016/0005-2744\(76\)90110-8](https://doi.org/10.1016/0005-2744(76)90110-8).
- Chomczynski, P. 1993. „A Reagent for the Single-Step Simultaneous Isolation of RNA, DNA and Proteins from Cell and Tissue Samples”. *BioTechniques* 15 (3): 532–34, 536–37.
- Christensen, CM, HH Kaufmann. 1969. *Grain storage: The role of fungi in quality loss*. Minneapolis: University of Minnesota Press.
- Clemens, Stephan, C. Simm. 2003. „Schizosaccharomyces Pombe as a Model for Metal Homeostasis in Plant Cells: The Phytochelatin-Dependent Pathway Is the Main Cadmium Detoxification Mechanism”. *New Phytologist* 159 (2): 323–30. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2003.00811.x>.
- Cobbett, Christopher, P. Goldsbrough. 2002. „Phytochelatin and Metallothioneins: Roles in Heavy Metal Detoxification and Homeostasis”. *Annual Review of Plant Biology* 53: 159–82. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.53.100301.135154>.
- Cole, Richard J., RH. Cox. 1981. *Handbook of toxic fungal metabolites*. New York: Academic Press.
- Colombo, Claudio, G. Palumbo, JZ. He, R. Pinton, S. Cesco. 2014. „Review on Iron Availability in Soil: Interaction of Fe Minerals, Plants, and Microbes”. *Journal of Soils and Sediments* 14 (3): 538–48. <https://doi.org/10.1007/s11368-013-0814-z>.
- Cooney, Nicole M., BS. Klein. 2008. „Fungal Adaptation to the Mammalian Host: It Is a New World, after All”. *Current Opinion in Microbiology* 11 (6): 511–16. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2008.09.018>.
- Cotty, PJ, P Bayman, DS Egel, KE Elias. 1994. „Agriculture, aflatoxins and *Aspergillus*”. In *The Genus Aspergillus*, 380. F.E.M.S. Symposium Series. Bracknell, UK: Zeneca Agrochemicals.
- Cuypers, Ann, M. Plusquin, T. Remans, M. Jozefczak, E. Keunen, H. Gielen, K. Opendakker, és mtsai. 2010. „Cadmium Stress: An Oxidative Challenge”. *Biometals: An International Journal on the Role of Metal Ions in Biology, Biochemistry, and Medicine* 23 (5): 927–40. <https://doi.org/10.1007/s10534-010-9329-x>.

- Dagenais, Taylor R. T., NP. Keller. 2009. „Pathogenesis of *Aspergillus Fumigatus* in Invasive Aspergillosis”. *Clinical Microbiology Reviews* 22 (3): 447–65. <https://doi.org/10.1128/CMR.00055-08>.
- Dame, Zerihun T., N. Suwannarach, S. Lumyong, H. Laatsch. 2015. „A New Citrinin Dimer Isolated from *Aspergillus Terreus* Strain ZDF21”. *Natural Product Communications* 10 (4): 623–24.
- Davis, R. D. 1984. „Cadmium – A Complex Environmental Problem Part II”. *Experientia* 40 (2): 117–26. <https://doi.org/10.1007/BF01963574>.
- De Freitas, Jeane Maria, JH. Kim, H. Poynton, T. Su, H. Wintz, T. Fox, P. Holman, és mtsai. 2004. „Exploratory and Confirmatory Gene Expression Profiling of Mac1Delta”. *The Journal of Biological Chemistry* 279 (6): 4450–58. <https://doi.org/10.1074/jbc.M212308200>.
- Dimkpa, C. O., D. Merten, A. Svatos, G. Büchel, E. Kothe. 2009. „Siderophores Mediate Reduced and Increased Uptake of Cadmium by *Streptomyces Tendae* F4 and Sunflower (*Helianthus Annuus*), Respectively”. *Journal of Applied Microbiology* 107 (5): 1687–96. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04355.x>.
- Dix, D., J. Bridgham, M. Broderius, D. Eide. 1997. „Characterization of the FET4 Protein of Yeast. Evidence for a Direct Role in the Transport of Iron”. *The Journal of Biological Chemistry* 272 (18): 11770–77. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.18.11770>.
- Dlouhy, Adrienne C., CE. Outten. 2013. „The Iron Metallome in Eukaryotic Organisms”. *Metal Ions in Life Sciences* 12: 241–78. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-5561-1\\_8](https://doi.org/10.1007/978-94-007-5561-1_8).
- Dong, J., W.H. Mao, G.P. Zhang, F.B. Wu, Y. Cai. 2008. „Root excretion and plant tolerance to cadmium toxicity - a review”. *Plant, Soil and Environment* 53 (No. 5): 193–200. <https://doi.org/10.17221/2205-PSE>.
- Dyer, Paul S., CM. O’Gorman. 2012. „Sexual Development and Cryptic Sexuality in Fungi: Insights from *Aspergillus* Species”. *FEMS Microbiology Reviews* 36 (1): 165–92. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00308.x>.
- Eaton, David L., JD. Groopman, szerk. 1994. *The Toxicology of aflatoxins: human health, veterinary, and agricultural significance*. San Diego: Academic Press.
- Eisendle, Martin, H. Oberegger, R. Buttinger, P. Illmer, Hubertus Haas. 2004. „Biosynthesis and Uptake of Siderophores Is Controlled by the PacC-Mediated Ambient-pH Regulatory System in *Aspergillus nidulans*”. *Eukaryotic Cell* 3 (2): 561–63. <https://doi.org/10.1128/EC.3.2.561-563.2004>.

Elinder, C. G., B. Lind, T. Kjellström, L. Linnman, L. Friberg. 1976. „Cadmium in Kidney Cortex, Liver, and Pancreas from Swedish Autopsies. Estimation of Biological Half Time in Kidney Cortex, Considering Calorie Intake and Smoking Habits”. *Archives of Environmental Health* 31 (6): 292–302. <https://doi.org/10.1080/00039896.1976.10667239>.

Emri, T., Z. Molnár, T. Pusztahelyi, I. Pócsi. 2004. „Physiological and Morphological Changes in Autolyzing *Aspergillus Nidulans* Cultures”. *Folia Microbiologica* 49 (3): 277–84. <https://doi.org/10.1007/BF02931043>.

Emri, T., I. Pócsi, A. Szentirmai. 1997. „Glutathione Metabolism and Protection against Oxidative Stress Caused by Peroxides in *Penicillium Chrysogenum*”. *Free Radical Biology & Medicine* 23 (5): 809–14. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(97\)00065-8](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(97)00065-8).

Emri, T, V. Szarvas, E. Orosz, K. Antal, HS. Park, KH. Han, JH. Yu, I. Pócsi. 2015. „Core Oxidative Stress Response in *Aspergillus Nidulans*”. *BMC Genomics* 16 (június): 478. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1705-z>.

Emri, T, A Zalka, I Pócsi. 2017. „Detection of Transcriptionally Active Mycotoxin Gene Clusters: DNA Microarray”. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 1542: 345–65. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6707-0\\_23](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6707-0_23).

Emri T, Kurucz V, Jakab Á, Antal K, Kniemeyer O, Pócsi I. (2019) Coping with two stressors concomitantly. In: Annals of the International Symposium on Fungal Stress – ISFUS: Book of Abstracts, Even3, Sao Paolo, 52-53.

Ercal, N., H. Gurer-Orhan, N. Aykin-Burns. 2001. „Toxic Metals and Oxidative Stress Part I: Mechanisms Involved in Metal-Induced Oxidative Damage”. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 1 (6): 529–39. <https://doi.org/10.2174/1568026013394831>.

Etxebeste, Oier, M. Ni, A. Garzia, NJ Kwon, R. Fischer, JH. Yu, EA. Espeso, U. Ugalde. 2008. „Basic-Zipper-Type Transcription Factor FlbB Controls Asexual Development in *Aspergillus Nidulans*”. *Eukaryotic Cell* 7 (1): 38–48. <https://doi.org/10.1128/EC.00207-07>.

Fallon, John P., EP. Reeves, K. Kavanagh. 2011. „The *Aspergillus Fumigatus* Toxin Fumagillin Suppresses the Immune Response of *Galleria Mellonella* Larvae by Inhibiting the Action of Haemocytes”. *Microbiology (Reading, England)* 157 (Pt 5): 1481–88. <https://doi.org/10.1099/mic.0.043786-0>.

Fazli, MM., N. Soleimani, M. Mehrasbi, S. Darabian, J. Mohammadi, A. Ramazani. 2015. „Highly Cadmium Tolerant Fungi: Their Tolerance and Removal Potential”. *Journal of Environmental Health Science & Engineering* 13: 19. <https://doi.org/10.1186/s40201-015-0176-0>.



Fleissner, A., P. Dersch. 2010. „Expression and Export: Recombinant Protein Production Systems for *Aspergillus*”. *Applied Microbiology and Biotechnology* 87 (4): 1255–70. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2672-6>.

Flippin, Michel, J. Sun, X. Robellet, L. Karaffa, E. Fekete, AP. Zeng, CP. Kubicek. 2009. „Biodiversity and Evolution of Primary Carbon Metabolism in *Aspergillus nidulans* and Other *Aspergillus* Spp”. *Fungal Genetics and Biology: FG & B* 46 Suppl 1: S19–44. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2008.07.018>.

Fraczek, Marcin G., M. Bromley, A. Buied, CB. Moore, R. Rajendran, R. Rautemaa, G. Ramage, DW. Denning, P. Bowyer. 2013. „The Cdr1B Efflux Transporter Is Associated with Non-Cyp51a-Mediated Itraconazole Resistance in *Aspergillus fumigatus*”. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 68 (7): 1486–96. <https://doi.org/10.1093/jac/dkt075>.

Fréalte, Emilie, CM. Aliouat-Denis, L. Delhaes, D. Hot, E. Dei-Cas. 2013. „Transcriptomic Insights into the Oxidative Response of Stress-Exposed *Aspergillus fumigatus*”. *Current Pharmaceutical Design* 19 (20): 3713–37. <https://doi.org/10.2174/1381612811319200011>.

Fridovich, I. 1995. „Superoxide Radical and Superoxide Dismutases”. *Annual Review of Biochemistry* 64: 97–112. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.64.070195.000525>.

Frisvad, Jens C., TO. Larsen. 2016. „Extrolites of *Aspergillus fumigatus* and Other Pathogenic Species in *Aspergillus* Section *Fumigati*”. *Frontiers in Microbiology* 6 (január). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01485>.

Galgóczy, L., T. Papp, I. Pócsi, N. Hegedus, Cs. Vágvölgyi. 2008. „In Vitro Activity of *Penicillium chrysogenum* Antifungal Protein (PAF) and Its Combination with Fluconazole against Different Dermatophytes”. *Antonie Van Leeuwenhoek* 94 (3): 463–70. <https://doi.org/10.1007/s10482-008-9263-x>.

Gallego, Susana M., LB. Pena, RA. Barcia, CE. Azpilicueta, MF. Iannone, EP. Rosales, MS. Zawoznik, MD. Groppa, MP. Benavides. 2012. „Unravelling Cadmium Toxicity and Tolerance in Plants: Insight into Regulatory Mechanisms”. *Environmental and Experimental Botany* 83: 33–46. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2012.04.006>.

Ganz, T. 2009. „Iron in Innate Immunity: Starve the Invaders”. *Current opinion in immunology* 21 (1): 63–67. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2009.01.011>.

Godt, Johannes, F. Scheidig, C. Grosse-Siestrup, V. Esche, P. Brandenburg, A. Reich, DA. Groneberg. 2006. „The toxicity of cadmium and resulting hazards for human health”. *Journal of Occupational Medicine and Toxicology (London, England)* 1 (szeptember): 22. <https://doi.org/10.1186/1745-6673-1-22>.

- Gresnigt, Mark S., S. Bozza, KL. Becker, LAB. Joosten, S. Abdollahi-Roodsaz, WB. van der Berg, CA. Dinarello, és mtsai. 2014. „A Polysaccharide Virulence Factor from *Aspergillus Fumigatus* Elicits Anti-Inflammatory Effects through Induction of Interleukin-1 Receptor Antagonist”. *PLoS Pathogens* 10 (3): e1003936. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003936>.
- Grill, Erwin, S. Löffler, EL. Winnacker, MH. Zenk. 1989. „Phytochelatin, the heavy-metal-binding peptides of plants, are synthesized from glutathione by a specific  $\gamma$ -glutamylcysteine dipeptidyl transpeptidase (phytochelatin synthase)”. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86 (18): 6838–42.
- Gugnani, H. C. 2003. „Ecology and Taxonomy of Pathogenic Aspergilli”. *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library* 8 (május): s346-357. <https://doi.org/10.2741/1002>.
- Guruceaga, Xabier, G.Ezpeleta, E. Mayayo, M. Sueiro-Olivares, A. Abad-Diaz-De-Cerio, JMA. Urizar, HG. Liu, és mtsai. 2018. „A possible role for fumagillin in cellular damage during host infection by *Aspergillus fumigatus*”. *Virulence* 9 (1): 1548–61. <https://doi.org/10.1080/21505594.2018.1526528>.
- Haas, H. 2012. „Iron – A Key Nexus in the Virulence of *Aspergillus fumigatus*”. *Frontiers in Microbiology* 3 (február). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00028>.
- Haas, H. 2014. „Fungal Siderophore Metabolism with a Focus on *Aspergillus Fumigatus*”. *Natural Product Reports* 31 (10): 1266–76. <https://doi.org/10.1039/c4np00071d>.
- Haas, H., M. Eisendle, BG. Turgeon. 2008. „Siderophores in Fungal Physiology and Virulence”. *Annual Review of Phytopathology* 46: 149–87. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.45.062806.094338>.
- Hagiwara, D., S. Suzuki, K. Kamei, T. Gono, S. Kawamoto. 2014. „The Role of AtfA and HOG MAPK Pathway in Stress Tolerance in Conidia of *Aspergillus Fumigatus*”. *Fungal Genetics and Biology: FG & B* 73: 138–49. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2014.10.011>.
- Hartwig, A. 2001. „Zinc Finger Proteins as Potential Targets for Toxic Metal Ions: Differential Effects on Structure and Function”. *Antioxidants & Redox Signaling* 3 (4): 625–34. <https://doi.org/10.1089/15230860152542970>.
- Heinekamp, T., A. Thywißen, J. Macheleidt, S. Keller, V. Valiante, AA. Brakhage. 2013. „*Aspergillus fumigatus* melanins: interference with the host endocytosis pathway and impact on virulence”. *Frontiers in Microbiology* 3 (január). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00440>.

Hillmann, F., K. Bagramyan, M. Straßburger, T. Heinekamp, TB. Hong, KP. Bzymek, JC. Williams, AA. Brakhage, M. Kalkum. 2016. „The Crystal Structure of Peroxiredoxin Asp F3 Provides Mechanistic Insight into Oxidative Stress Resistance and Virulence of *Aspergillus Fumigatus*”. *Scientific Reports* 6: 33396. <https://doi.org/10.1038/srep33396>.

Hong, SB., SJ. Go, HD. Shin, JC. Frisvad, RA. Samson. 2005. „Polyphasic Taxonomy of *Aspergillus Fumigatus* and Related Species”. *Mycologia* 97 (6): 1316–29. <https://doi.org/10.3852/mycologia.97.6.1316>.

Hong, SY., LV. Roze, J. Wee, JE. Linz. 2013. „Evidence That a Transcription Factor Regulatory Network Coordinates Oxidative Stress Response and Secondary Metabolism in *Aspergilli*”. *MicrobiologyOpen* 2 (1): 144–60. <https://doi.org/10.1002/mbo3.63>.

Horn, BW., GG. Moore, I. Carbone. 2011. „Sexual Reproduction in Aflatoxin-Producing *Aspergillus Nomius*”. *Mycologia* 103 (1): 174–83. <https://doi.org/10.3852/10-115>.

Hortschansky, P., M. Eisendle, Q. Al-Abdallah, AD Schmidt, S. Bergmann, M. Thön, O. Kniemeyer, és mtsai. 2007. „Interaction of HapX with the CCAAT-binding complex—a novel mechanism of gene regulation by iron”. *The EMBO Journal* 26 (13): 3157–68. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601752>.

Houbraken, J., C. M. Visagie, M. Meijer, J. C. Frisvad, P. E. Busby, J. I. Pitt, K. A. Seifert, és mtsai. 2014. „A Taxonomic and Phylogenetic Revision of *Penicillium* Section *Aspergilloides*”. *Studies in Mycology* 78 (június): 373–451. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.09.002>.

Hördt, W., V. Römheld, G. Winkelmann. 2000. „Fusarinines and Dimerum Acid, Mono- and Dihydroxamate Siderophores from *Penicillium Chrysogenum*, Improve Iron Utilization by Strategy I and Strategy II Plants”. *Biometals: An International Journal on the Role of Metal Ions in Biology, Biochemistry, and Medicine* 13 (1): 37–46. <https://doi.org/10.1023/a:1009234612486>.

Inglis, DO, J. Binkley, MS. Skrzypek, MB. Arnaud, GC. Cerqueira, P. Shah, F. Wymore, JR. Wortman, G. Sherlock. 2013. „Comprehensive annotation of secondary metabolite biosynthetic genes and gene clusters of *Aspergillus nidulans*, *A. fumigatus*, *A. niger* and *A. oryzae*”. *BMC Microbiology* 13 (április): 91. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-13-91>.

International Agency for Research on Cancer, és International Agency for Research on Cancer, szerk. 1993. *Beryllium, cadmium, mercury, and exposures in the glass manufacturing industry: views and expert opinions of an IARC Working Group on the*

*Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, which met in Lyon, 9 - 16 February 1993*. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans 58. Lyon.

Ishikawa, M., T. Ninomiya, H. Akabane, N. Kushida, G. Tsujiuchi, M. Ohyama, S. Gomi, K. Shito, T. Murata. 2009. „Pseurotin A and Its Analogues as Inhibitors of Immunoglobulin E [Correction of Immunoglobuline E] Production”. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 19 (5): 1457–60. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2009.01.029>.

Jacob, C., M. Courbot, F. Martin, A. Brun, M. Chalot. 2004. „Transcriptomic Responses to Cadmium in the Ectomycorrhizal Fungus *Paxillus involutus*”. *FEBS Letters* 576 (3): 423–27. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.09.028>.

Jacobo-Estrada, T., M. Santoyo-Sánchez, F. Thévenod, O. Barbier. 2017. „Cadmium Handling, Toxicity and Molecular Targets Involved during Pregnancy: Lessons from Experimental Models”. *International Journal of Molecular Sciences* 18 (7). <https://doi.org/10.3390/ijms18071590>.

Jacquillet, G., O. Barbier, M. Cougnon, M. Tauc, M. C. Namorado, D. Martin, J. L. Reyes, P. Poujeol. 2006. „Zinc Protects Renal Function during Cadmium Intoxication in the Rat”. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 290 (1): F127–37. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00366.2004>.

Jaeckel, P., G. Krauss, S. Menge, A. Schierhorn, P. Rücknagel, GJ. Krauss. 2005. „Cadmium Induces a Novel Metallothionein and Phytochelatin 2 in an Aquatic Fungus”. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 333 (1): 150–55. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.05.083>.

Jaivel, N, P Marimuthu. 2010. „Optimization of Lovastatin Production in Solid State Fermentation by *Aspergillus Terreus*”. *International Journal of Engineering Science and Technology* 2 (7): 2730–33.

Jakucs, E, L. Vajna. 2003. *Mikológia*. Budapest: AGROINFORM.

Järup, Lars, A. Akesson. 2009. „Current Status of Cadmium as an Environmental Health Problem”. *Toxicology and Applied Pharmacology* 238 (3): 201–8. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2009.04.020>.

Jenks, Jeffrey D., M. Hoenigl. 2018. „Treatment of Aspergillosis”. *Journal of Fungi (Basel, Switzerland)* 4 (3). <https://doi.org/10.3390/jof4030098>.

Jiang, Y., R. Huang, S. Jiang, Z. Qin, X. Yan. 2018. „Adsorption of Cd(II) by rhizosphere and non-rhizosphere soil originating from mulberry field under laboratory condition”. *International Journal of Phytoremediation* 20 (4): 378–83. <https://doi.org/10.1080/15226514.2017.1393396>.

- Jihen, El Heni, M. Imed, H. Fatima, K. Abdelhamid. 2009. „Protective Effects of Selenium (Se) and Zinc (Zn) on Cadmium (Cd) Toxicity in the Liver of the Rat: Effects on the Oxidative Stress”. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72 (5): 1559–64. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2008.12.006>.
- Jin, T., J. Lu, M. Nordberg. 1998. „Toxicokinetics and Biochemistry of Cadmium with Special Emphasis on the Role of Metallothionein”. *Neurotoxicology* 19 (4–5): 529–35.
- Johnson, D Barrie. 2014. „Biomining—Biotechnologies for Extracting and Recovering Metals from Ores and Waste Materials”. *Current Opinion in Biotechnology*, Chemical biotechnology • Pharmaceutical biotechnology, 30: 24–31. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2014.04.008>.
- Johnson, L. 2008. „Iron and Siderophores in Fungal–Host Interactions”. *Mycological Research*, Fungal Secondary Metabolite Research, 112 (2): 170–83. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2007.11.012>.
- Jones, MM., MG. Cherian. 1990. „The Search for Chelate Antagonists for Chronic Cadmium Intoxication”. *Toxicology* 62 (1): 1–25. [https://doi.org/10.1016/0300-483x\(90\)90027-e](https://doi.org/10.1016/0300-483x(90)90027-e).
- Kaplan, CD., J. Kaplan. 2009. „Iron Acquisition and Transcriptional Regulation”. *Chemical Reviews* 109 (10): 4536–52. <https://doi.org/10.1021/cr9001676>.
- Kauffman, HF. 2003. „Immunopathogenesis of Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis and Airway Remodeling”. *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library* 8: e190-196. <https://doi.org/10.2741/990>.
- Kevei, F, J Kucsera. 2010. *Mikrobiológia: tankönyv az alapkursus előadásaihoz*. Köt. 1. kötet. Szeged: JATEPress.
- Khoufache, K., O. Puel, N. Loiseau, M. Delaforge, D. Rivollet, A. Coste, C. Cordonnier, E. Escudier, F. Botterel, S. Bretagne. 2007. „Verruculogen Associated with *Aspergillus Fumigatus* Hyphae and Conidia Modifies the Electrophysiological Properties of Human Nasal Epithelial Cells”. *BMC Microbiology* 7: 5. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-7-5>.
- Kniemeyer, O., F. Lessing, O. Scheibner, C. Hertweck, AA. Brakhage. 2006. „Optimisation of a 2-D Gel Electrophoresis Protocol for the Human-Pathogenic Fungus *Aspergillus Fumigatus*”. *Current Genetics* 49 (3): 178–89. <https://doi.org/10.1007/s00294-005-0047-9>.

- Kolwijck, E., FL. van de Veerdonk. 2014. „The Potential Impact of the Pulmonary Microbiome on Immunopathogenesis of Aspergillus-Related Lung Disease”. *European Journal of Immunology* 44 (11): 3156–65. <https://doi.org/10.1002/eji.201344404>.
- Kosman, DJ. 2010. „Redox Cycling in Iron Uptake, Efflux, and Trafficking”. *The Journal of Biological Chemistry* 285 (35): 26729–35. <https://doi.org/10.1074/jbc.R110.113217>.
- Kothary, M. H., T. Chase, J. D. Macmillan. 1984. „Correlation of Elastase Production by Some Strains of *Aspergillus Fumigatus* with Ability to Cause Pulmonary Invasive Aspergillosis in Mice”. *Infection and Immunity* 43 (1): 320–25.
- Krause, A., S. Neitz, H. J. Mägert, A. Schulz, W. G. Forssmann, P. Schulz-Knappe, K. Adermann. 2000. „LEAP-1, a Novel Highly Disulfide-Bonded Human Peptide, Exhibits Antimicrobial Activity”. *FEBS Letters* 480 (2–3): 147–50. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(00\)01920-7](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(00)01920-7).
- Kukongviriyapan, U., K. Apaijit, V. Kukongviriyapan. 2016. „Oxidative Stress and Cardiovascular Dysfunction Associated with Cadmium Exposure: Beneficial Effects of Curcumin and Tetrahydrocurcumin”. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine* 239 (1): 25–38. <https://doi.org/10.1620/tjem.239.25>.
- Kurucz, V., T. Krüger, K. Antal, AM. Dietl, H. Haas, I. Pócsi, O. Kniemeyer, T. Emri. 2018a. „Additional Oxidative Stress Reroutes the Global Response of *Aspergillus Fumigatus* to Iron Depletion”. *BMC Genomics* 19 (1): 357. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-4730-x>.
- Kurucz, V., B. Kiss, Zs.M. Szigeti, G. Szemán-Nagy, E. Orosz, Z. Hargitai, S. Harangi, és mtsai. 2018b. „Physiological Background of the Remarkably High Cd<sup>2+</sup> Tolerance of the *Aspergillus Fumigatus* Af293 Strain”. *Journal of Basic Microbiology* 58 (11): 957–67. <https://doi.org/10.1002/jobm.201800200>.
- Kwon-Chung, KJ., JA. Sugui. 2013. „*Aspergillus Fumigatus*--What Makes the Species a Ubiquitous Human Fungal Pathogen?” *PLoS Pathogens* 9 (12): e1003743. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003743>.
- Lampe, BJ., SK. Park, T. Robins, B. Mukherjee, AA. Litonjua, C. Amarasiriwardena, M. Weisskopf, D. Sparrow, H. Hu. 2008. „Association between 24-Hour Urinary Cadmium and Pulmonary Function among Community-Exposed Men: The VA Normative Aging Study”. *Environmental Health Perspectives* 116 (9): 1226–30. <https://doi.org/10.1289/ehp.11265>.
- Latgé, JP. 1999. „*Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis”. *Clinical Microbiology Reviews* 12 (2): 310–50.

- Latgé, JP., G. Chamilos. 2019. „*Aspergillus Fumigatus* and Aspergillosis in 2019”. *Clinical Microbiology Reviews* 33 (1): e00140-18, /cmr/33/1/CMR.00140-18.atom. <https://doi.org/10.1128/CMR.00140-18>.
- Leary, N O, A Pembroke, P F Duggan. 1992. „Improving Accuracy of Glucose Oxidase Procedure for Glucose Determinations on Discrete Analyzers”. *Clinical Chemistry* 38 (2): 298–302. <https://doi.org/10.1093/clinchem/38.2.298>.
- Lessing, F., O. Kniemeyer, I. Wozniok, J. Loeffler, O. Kurzai, A. Haertl, AA. Brakhage. 2007. „The *Aspergillus Fumigatus* Transcriptional Regulator AfYap1 Represents the Major Regulator for Defense against Reactive Oxygen Intermediates but Is Dispensable for Pathogenicity in an Intranasal Mouse Infection Model”. *Eukaryotic Cell* 6 (12): 2290–2302. <https://doi.org/10.1128/EC.00267-07>.
- Lin, HC., YH. Chooi, S. Dhingra, W. Xu, AM. Calvo, Y. Tang. 2013. „The Fumagillin Biosynthetic Gene Cluster in *Aspergillus Fumigatus* Encodes a Cryptic Terpene Cyclase Involved in the Formation of  $\beta$ -Trans-Bergamotene”. *Journal of the American Chemical Society* 135 (12): 4616–19. <https://doi.org/10.1021/ja312503y>.
- Liu, H., FN. Gravelat, LY. Chiang, D. Chen, G. Vanier, DE. Ejzykowicz, AS. Ibrahim, WC. Nierman, DC. Sheppard, SG. Filler. 2010. „*Aspergillus Fumigatus* AcuM Regulates Both Iron Acquisition and Gluconeogenesis”. *Molecular Microbiology* 78 (4): 1038–54. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07389.x>.
- Lopes B., LM., SG. Filler. 2004. „Interactions of *Aspergillus Fumigatus* with Endothelial Cells: Internalization, Injury, and Stimulation of Tissue Factor Activity”. *Blood* 103 (6): 2143–49. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-06-2186>.
- Losada, L., O Ajayi, JC. Frisvad, J. Yu, WC. Nierman. 2009. „Effect of Competition on the Production and Activity of Secondary Metabolites in *Aspergillus* Species”. *Medical Mycology* 47 Suppl 1: S88-96. <https://doi.org/10.1080/13693780802409542>.
- Lutzoni, F., F. Kauff, CJ. Cox, D. McLaughlin, G. Celio, B. Dentinger, M. Padamsee, és mtsai. 2004. „Assembling the Fungal Tree of Life: Progress, Classification, and Evolution of Subcellular Traits”. *American Journal of Botany* 91 (10): 1446–80. <https://doi.org/10.3732/ajb.91.10.1446>.
- Machuca, A., A. M. F. Milagres. 2003. „Use of CAS-Agar Plate Modified to Study the Effect of Different Variables on the Siderophore Production by *Aspergillus*”. *Letters in Applied Microbiology* 36 (3): 177–81. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765x.2003.01290.x>.

Manikandan, P., J. Varga, S. Kocsubé, R. Anita, R. Revathi, TM. Németh, V. Narendran, és mtsai. 2013. „Epidemiology of *Aspergillus* Keratitis at a Tertiary Care Eye Hospital in South India and Antifungal Susceptibilities of the Causative Agents”. *Mycoses* 56 (1): 26–33. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2012.02194.x>.

Marsh, P. B., P. D. Millner, J. M. Kla. 1979. „A Guide to the Recent Literature on Aspergillosis as Caused by *Aspergillus Fumigatus*, a Fungus Frequently Found in Self-Heating Organic Matter”. *Mycopathologia* 69 (1–2): 67–81. <https://doi.org/10.1007/BF00428605>.

Matthaiou, EI., G. Sass, DA. Stevens, JL. Hsu. 2018. „Iron: An Essential Nutrient for *Aspergillus Fumigatus* and a Fulcrum for Pathogenesis”. *Current Opinion in Infectious Diseases* 31 (6): 506–11. <https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000487>.

McLaughlin, HP., Q. Xiao, RB. Rea, H. Pi, PG. Casey, T. Darby, A. Charbit, és mtsai. 2012. „A Putative P-Type ATPase Required for Virulence and Resistance to Haem Toxicity in *Listeria Monocytogenes*”. *PloS One* 7 (2): e30928. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030928>.

Miao, R., GP. Holmes-Hampton, PA. Lindahl. 2011. „Biophysical Investigation of the Iron in Aft1-1(up) and Gal-YAH1 *Saccharomyces Cerevisiae*”. *Biochemistry* 50 (13): 2660–71. <https://doi.org/10.1021/bi102015s>.

Mirabito, P. M., T. H. Adams, W. E. Timberlake. 1989. „Interactions of Three Sequentially Expressed Genes Control Temporal and Spatial Specificity in *Aspergillus* Development”. *Cell* 57 (5): 859–68. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90800-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90800-3).

Mitchell, A., GH. Romano, B. Groisman, A. Yona, E. Dekel, M. Kupiec, O. Dahan, Y. Pilpel. 2009. „Adaptive Prediction of Environmental Changes by Microorganisms”. *Nature* 460 (7252): 220–24. <https://doi.org/10.1038/nature08112>.

Montibus, M., L. Pinson-Gadais, F. Richard-Forget, C. Barreau, N. Ponts. 2015. „Coupling of Transcriptional Response to Oxidative Stress and Secondary Metabolism Regulation in Filamentous Fungi”. *Critical Reviews in Microbiology* 41 (3): 295–308. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2013.829416>.

Moore, Margo M. 2013. „The Crucial Role of Iron Uptake in *Aspergillus Fumigatus* Virulence”. *Current Opinion in Microbiology* 16 (6): 692–99. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2013.07.012>.

Moreno, AB., AM. Del Pozo, M. Borja, B. San Segundo. 2003. „Activity of the Antifungal Protein from *Aspergillus Giganteus* Against *Botrytis Cinerea*”. *Phytopathology* 93 (11): 1344–53. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2003.93.11.1344>.



- Moulis, JM. 2010. „Cellular Mechanisms of Cadmium Toxicity Related to the Homeostasis of Essential Metals”. *Biometals: An International Journal on the Role of Metal Ions in Biology, Biochemistry, and Medicine* 23 (5): 877–96. <https://doi.org/10.1007/s10534-010-9336-y>.
- Mowat, E., J. Butcher, S. Lang, C. Williams, G. Ramage. 2007. „Development of a Simple Model for Studying the Effects of Antifungal Agents on Multicellular Communities of *Aspergillus Fumigatus*”. *Journal of Medical Microbiology* 56 (Pt 9): 1205–12. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.47247-0>.
- Munster, JM van, AM Burggraaf, I Pócsi, M Szilágyi, T Emri, AFJ Ram. 2016. „Post-genomic Approaches to Dissect Carbon Starvation Responses in *Aspergilli*”. In *Aspergillus and Penicillium in the Post-genomic Era*, 89–112. Norfolk, UK: Caister Academic Press.
- Nakanishi, H., I. Ogawa, Y. Ishimaru, S. Mori, NK. Nishizawa. 2006. „Iron deficiency enhances cadmium uptake and translocation mediated by the Fe<sup>2+</sup> transporters OsIRT1 and OsIRT2 in rice”. *Soil Science and Plant Nutrition* 52 (4): 464–69. <https://doi.org/10.1111/j.1747-0765.2006.00055.x>.
- Nordberg, GF. 2009. „Historical Perspectives on Cadmium Toxicology”. *Toxicology and Applied Pharmacology* 238 (3): 192–200. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2009.03.015>.
- Oberegger, H., I. Zadra, M. Schoeser, H. Haas. 2000. „Iron Starvation Leads to Increased Expression of Cu/Zn-Superoxide Dismutase in *Aspergillus*”. *FEBS Letters* 485 (2–3): 113–16. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(00\)02206-7](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(00)02206-7).
- Oberley, LW., DR. Spitz. 1984. „Assay of Superoxide Dismutase Activity in Tumor Tissue”. In *Methods in Enzymology*, 105:457–64. Oxygen Radicals in Biological Systems. Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05064-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05064-3).
- Odds, FC., AJP. Brown, NAR. Gow. 2003. „Antifungal Agents: Mechanisms of Action”. *Trends in Microbiology* 11 (6): 272–79. [https://doi.org/10.1016/s0966-842x\(03\)00117-3](https://doi.org/10.1016/s0966-842x(03)00117-3).
- O’Gorman, CM., HT. Fuller, PS. Dyer. 2009. „Discovery of a Sexual Cycle in the Opportunistic Fungal Pathogen *Aspergillus Fumigatus*”. *Nature* 457 (7228): 471–74. <https://doi.org/10.1038/nature07528>.
- Ohashi, H., Y. Motegi, H. Kita, G. J. Gleich, T. Miura, M. Ishikawa, H. Kawai, H. Fukamachi. 1998. „Sulochrin Inhibits Eosinophil Activation and Chemotaxis”. *Inflammation Research: Official Journal of the European Histamine Research Society ... [et Al.]* 47 (10): 409–15. <https://doi.org/10.1007/s000110050352>.

- Okabe, M., D. Lies, S. Kanamasa, EY. Park. 2009. „Biotechnological Production of Itaconic Acid and Its Biosynthesis in *Aspergillus Terreus*”. *Applied Microbiology and Biotechnology* 84 (4): 597–606. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2132-3>.
- Oren, I., M. Paul. 2014. „Up to Date Epidemiology, Diagnosis and Management of Invasive Fungal Infections”. *Clinical Microbiology and Infection* 20 (s6): 1–4. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12642>.
- Owens, RA., S. Hammel, KJ. Sheridan, GW. Jones, S. Doyle. 2014. „A Proteomic Approach to Investigating Gene Cluster Expression and Secondary Metabolite Functionality in *Aspergillus Fumigatus*”. *PloS One* 9 (9): e106942. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106942>.
- Pal, SK., TK. Das. 2005. „Biochemical Characterization of N-Methyl N'-Nitro-N-Nitrosoguanidine-Induced Cadmium Resistant Mutants of *Aspergillus Niger*”. *Journal of Biosciences* 30 (5): 639–46. <https://doi.org/10.1007/BF02703564>.
- Palicz, Z., T. Gáll, É. Leiter, S. Kollár, I. Kovács, K. Miszti-Blasius, I. Pócsi, L. Csernoch, P. Szentesi. 2016. „Application of a low molecular weight antifungal protein from *Penicillium chrysogenum* (PAF) to treat pulmonary aspergillosis in mice”. *Emerging Microbes & Infections* 5 (11): e114. <https://doi.org/10.1038/emi.2016.116>.
- Park, C. H., E. V. Valore, A. J. Waring, T. Ganz. 2001. „Hepcidin, a Urinary Antimicrobial Peptide Synthesized in the Liver”. *The Journal of Biological Chemistry* 276 (11): 7806–10. <https://doi.org/10.1074/jbc.M008922200>.
- Park, SJ., B. Mehrad. 2009. „Innate Immunity to *Aspergillus* Species”. *Clinical Microbiology Reviews* 22 (4): 535–51. <https://doi.org/10.1128/CMR.00014-09>.
- Park, YS., JY. Kim, CW. Yun. 2016. „Identification of Ferrichrome- and Ferrioxamine B-Mediated Iron Uptake by *Aspergillus Fumigatus*”. *The Biochemical Journal* 473 (9): 1203–13. <https://doi.org/10.1042/BCJ20160066>.
- Patel, SJ., BE. Lewis, JE. Long, S. Nambi, CM. Sasseti, TL. Stemmler, JM. Argüello. 2016. „Fine-Tuning of Substrate Affinity Leads to Alternative Roles of *Mycobacterium Tuberculosis* Fe<sup>2+</sup>-ATPases”. *The Journal of Biological Chemistry* 291 (22): 11529–39. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.718239>.
- Patterson, TF., GR. Thompson, DW. Denning, JA. Fishman, S. Hadley, R. Herbrecht, DP. Kontoyiannis, és mtsai. 2016. „Practice Guidelines for the Diagnosis and Management of Aspergillosis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America”. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* 63 (4): e1–60. <https://doi.org/10.1093/cid/ciw326>.

- Paulussen, C., JE. Hallsworth, S. Álvarez-Pérez, WC. Nierman, PG. Hamill, D. Blain, H. Rediers, B. Lievens. 2016. „Ecology of aspergillosis: insights into the pathogenic potency of *Aspergillus fumigatus* and some other *Aspergillus* species”. *Microbial Biotechnology* 10 (2): 296–322. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12367>.
- Pérez, AL., KA. Anderson. 2009. „DGT Estimates Cadmium Accumulation in Wheat and Potato from Phosphate Fertilizer Applications”. *The Science of the Total Environment* 407 (18): 5096–5103. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2009.05.045>.
- Peterson, SW. 2008. „Phylogenetic analysis of *Aspergillus* species using DNA sequences from four loci”. *Mycologia* 100 (2): 205–26. <https://doi.org/10.1080/15572536.2008.11832477>.
- Pi, H., SJ. Patel, JM. Argüello, JD. Helmann. 2016. „The *Listeria Monocytogenes* Fur-Regulated Virulence Protein FrvA Is an Fe(II) Efflux P1B4 -Type ATPase”. *Molecular Microbiology* 100 (6): 1066–79. <https://doi.org/10.1111/mmi.13368>.
- Pi, H., JD. Helmann. 2017. „Ferrous Iron Efflux Systems in Bacteria”. *Metallomics: Integrated Biometal Science* 9 (7): 840–51. <https://doi.org/10.1039/c7mt00112f>.
- Pinto, M. C., A. M. Mata, J. Lopez-Barea. 1984. „Reversible Inactivation of *Saccharomyces Cerevisiae* Glutathione Reductase under Reducing Conditions”. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 228 (1): 1–12. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(84\)90040-7](https://doi.org/10.1016/0003-9861(84)90040-7).
- Pócsi, I., V. Jeney, P. Kertai, I. Pócsi, T. Emri, Gy. Gyémánt, L. Fésüs, J. Balla, Gy. Balla. 2008. „Fungal Siderophores Function as Protective Agents of LDL Oxidation and Are Promising Anti-Atherosclerotic Metabolites in Functional Food”. *Molecular Nutrition & Food Research* 52 (12): 1434–47. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200700467>.
- Prévéral, S., L. Gayet, C. Moldes, J. Hoffmann, S. Mounicou, A. Gruet, F. Reynaud, és mtsai. 2009. „A Common Highly Conserved Cadmium Detoxification Mechanism from Bacteria to Humans: Heavy Metal Tolerance Conferred by the ATP-Binding Cassette (ABC) Transporter SpHMT1 Requires Glutathione but Not Metal-Chelating Phytochelatin Peptides”. *The Journal of Biological Chemistry* 284 (8): 4936–43. <https://doi.org/10.1074/jbc.M808130200>.
- Priebe, S., C. Kreisel, F. Horn, R. Guthke, J. Linde. 2015. „FungiFun2: A Comprehensive Online Resource for Systematic Analysis of Gene Lists from Fungal Species”. *Bioinformatics (Oxford, England)* 31 (3): 445–46. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu627>.

- Prüfer, S., M. Weber, P. Stein, M. Bosmann, M. Stassen, A. Kreft, H. Schild, MP. Radsak. 2014. „Oxidative Burst and Neutrophil Elastase Contribute to Clearance of *Aspergillus Fumigatus* Pneumonia in Mice”. *Immunobiology* 219 (2): 87–96. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2013.08.010>.
- Pusztahelyi, T., I. Pócsi, J. Kozma, A. Szentirmai. 1997. „Aging of *Penicillium Chrysogenum* Cultures under Carbon Starvation: I: Morphological Changes and Secondary Metabolite Production”. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 25 (1): 81–86. <https://doi.org/10.1111/j.1470-8744.1997.tb00417.x>.
- Rabindran, S. K., D. D. Ross, L. A. Doyle, W. Yang, L. M. Greenberger. 2000. „Fumitremorgin C Reverses Multidrug Resistance in Cells Transfected with the Breast Cancer Resistance Protein”. *Cancer Research* 60 (1): 47–50.
- Rad, M. R., L. Kirchrath, C. P. Hollenberg. 1994. „A Putative P-Type Cu(2+)-Transporting ATPase Gene on Chromosome II of *Saccharomyces Cerevisiae*”. *Yeast (Chichester, England)* 10 (9): 1217–25. <https://doi.org/10.1002/yea.320100910>.
- Ramesh, G., G. K. Podila, G. Gay, R. Marmeisse, M. S. Reddy. 2009. „Different Patterns of Regulation for the Copper and Cadmium Metallothioneins of the Ectomycorrhizal Fungus *Hebeloma Cylindrosporum*”. *Applied and Environmental Microbiology* 75 (8): 2266–74. <https://doi.org/10.1128/AEM.02142-08>.
- Rani, A., A. Kumar, A. Lal, M. Pant. 2014. „Cellular Mechanisms of Cadmium-Induced Toxicity: A Review”. *International Journal of Environmental Health Research* 24 (4): 378–99. <https://doi.org/10.1080/09603123.2013.835032>.
- Rausser, W E. 1995. „Phytochelatin and related peptides. Structure, biosynthesis, and function.” *Plant Physiology* 109 (4): 1141–49.
- Rhodes, JC, DS. Askew. 2010. „*Aspergillus fumigatus*”. In *Cellular and Molecular Biology of Filamentous Fungi*, 802. Washington DC: American Society for Microbiology Press.
- Richie, DL., KK. Fuller, J. Fortwendel, MD. Miley, JW. McCarthy, M. Feldmesser, JC. Rhodes, DS. Askew. 2007. „Unexpected Link between Metal Ion Deficiency and Autophagy in *Aspergillus Fumigatus*”. *Eukaryotic Cell* 6 (12): 2437–47. <https://doi.org/10.1128/EC.00224-07>.
- Roetzer, A., E. Klopff, N. Gratz, M. Marcet-Houben, E. Hiller, S. Rupp, T. Gabaldón, P. Kovarik, C. Schüller. 2011. „Regulation of *Candida Glabrata* Oxidative Stress Resistance Is Adapted to Host Environment”. *FEBS Letters* 585 (2): 319–27. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.12.006>.

- Rogalska, J., MM. Brzóška, A. Roszczenko, J. Moniuszko-Jakoniuk. 2009. „Enhanced Zinc Consumption Prevents Cadmium-Induced Alterations in Lipid Metabolism in Male Rats”. *Chemico-Biological Interactions* 177 (2): 142–52. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2008.09.011>.
- Roggenkamp, R., H. Sahm, F. Wagner. 1974. „Microbial Assimilation of Methanol Induction and Function of Catalase in *Candida Boidinii*”. *FEBS Letters* 41 (2): 283–86. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(74\)81230-5](https://doi.org/10.1016/0014-5793(74)81230-5).
- Royall, J. A., H. Ischiropoulos. 1993. „Evaluation of 2',7'-Dichlorofluorescein and Dihydrorhodamine 123 as Fluorescent Probes for Intracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Cultured Endothelial Cells”. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 302 (2): 348–55. <https://doi.org/10.1006/abbi.1993.1222>.
- Sager, M. 2007. „Trace and Nutrient Elements in Manure, Dung and Compost Samples in Austria”. *Soil Biology and Biochemistry* 39 (6): 1383–90. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2006.12.015>.
- Sales-Campos, H., L. Tonani, CRBarros Cardoso, MR. Von Zeska Kress. 2013. „The Immune Interplay between the Host and the Pathogen in *Aspergillus Fumigatus* Lung Infection”. *BioMed Research International* 2013: 693023. <https://doi.org/10.1155/2013/693023>.
- Sámi, L., T. Emri, I. Pócsi. 2001. „Autolysis and Ageing of *Penicillium Chrysogenum* Cultures under Carbon Starvation: Glutathione Metabolism and Formation of Reactive Oxygen Species”. *Mycological Research* 105 (10): 1246–50. [https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(08\)61996-6](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(08)61996-6).
- Samson, R. A., C. M. Visagie, J. Houbraken, S.-B. Hong, V. Hubka, C. H. W. Klaassen, G. Perrone, és mtsai. 2014. „Phylogeny, Identification and Nomenclature of the Genus *Aspergillus*”. *Studies in Mycology* 78 (június): 141–73. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.07.004>.
- Samson, RA, J Varga. 2010. „Molecular Systematics of *Aspergillus* and Its Teleomorphs”. In *Aspergillus: Molecular Biology and Genomics*, 234. Norfolk, UK: Caister Academic Press.
- Santhiya, D., YP. Ting. 2006. „Use of Adapted *Aspergillus Niger* in the Bioleaching of Spent Refinery Processing Catalyst”. *Journal of Biotechnology* 121 (1): 62–74. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2005.07.002>.
- Sasaki, A., N. Yamaji, K. Yokosho, JF. Ma. 2012. „Nramp5 Is a Major Transporter Responsible for Manganese and Cadmium Uptake in Rice”. *The Plant Cell* 24 (5): 2155–67. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.096925>.

- Scharf, DH., T. Heinekamp, N. Remme, P. Hortschansky, AA. Brakhage, C. Hertweck. 2012. „Biosynthesis and Function of Gliotoxin in *Aspergillus Fumigatus*”. *Applied Microbiology and Biotechnology* 93 (2): 467–72. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3689-1>.
- Schrettl, M., E. Bignell, C. Kragl, C. Joechl, T. Rogers, HN. Arst, K. Haynes, H. Haas. 2004. „Siderophore Biosynthesis but Not Reductive Iron Assimilation Is Essential for *Aspergillus Fumigatus* Virulence”. *The Journal of Experimental Medicine* 200 (9): 1213–19. <https://doi.org/10.1084/jem.20041242>.
- Schrettl, M., E. Bignell, C. Kragl, Y. Sabiha, O. Loss, M. Eisendle, A. Wallner, HN. Arst Jr, K. Haynes, H. Haas. 2007. „Distinct Roles for Intra- and Extracellular Siderophores during *Aspergillus Fumigatus* Infection”. *PLOS Pathogens* 3 (9): e128. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030128>.
- Schrettl, M., HS Kim, M. Eisendle, C. Kragl, WC Nierman, T. Heinekamp, ER Werner, és mtsai. 2008. „SreA-mediated iron regulation in *Aspergillus fumigatus*”. *Molecular Microbiology* 70 (1): 27–43. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06376.x>.
- Schrettl, M., N. Beckmann, J. Varga, T. Heinekamp, ID. Jacobsen, C. Jöchl, TA. Moussa, és mtsai. 2010. „HapX-Mediated Adaption to Iron Starvation Is Crucial for Virulence of *Aspergillus Fumigatus*”. *PLOS Pathogens* 6 (9): e1001124. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001124>.
- Schrettl, M., H. Haas. 2011. „Iron homeostasis—Achilles’ heel of *Aspergillus fumigatus*?” *Current Opinion in Microbiology* 14 (4): 400–405. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2011.06.002>.
- Schwyn, B., J. B. Neilands. 1987. „Universal Chemical Assay for the Detection and Determination of Siderophores”. *Analytical Biochemistry* 160 (1): 47–56. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90612-9](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90612-9).
- Seidler, MJ., S. Salvenmoser, FMC. Müller. 2008. „*Aspergillus Fumigatus* Forms Biofilms with Reduced Antifungal Drug Susceptibility on Bronchial Epithelial Cells”. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 52 (11): 4130–36. <https://doi.org/10.1128/AAC.00234-08>.
- Shimada, H., A. Yasutake, T. Hirashima, Y. Takamura, T. Kitano, MP. Waalkes, Y. Imamura. 2008. „Strain Difference of Cadmium Accumulation by Liver Slices of Inbred Wistar-Imamichi and Fischer 344 Rats”. *Toxicology in Vitro* 22 (2): 338–43. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2007.09.013>.

- Shiraishi, E., M. Inouhe, M. Joho, H. Tohyama. 2000. „The Cadmium-Resistant Gene, CAD2, Which Is a Mutated Putative Copper-Transporter Gene (PCA1), Controls the Intracellular Cadmium-Level in the Yeast *S. Cerevisiae*”. *Current Genetics* 37 (2): 79–86. <https://doi.org/10.1007/s002940050013>.
- Sistani, K. R., G. E. Brink, S. L. McGowen, D. E. Rowe, J. L. Oldham. 2003. „Characterization of Broiler Cake and Broiler Litter, the by-Products of Two Management Practices”. *Bioresource Technology* 90 (1): 27–32. [https://doi.org/10.1016/s0960-8524\(03\)00096-8](https://doi.org/10.1016/s0960-8524(03)00096-8).
- Slavin, R. G., C. W. Bedrossian, P. S. Hutcheson, S. Pittman, L. Salinas-Madrigal, C. C. Tsai, G. J. Gleich. 1988. „A Pathologic Study of Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis”. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 81 (4): 718–25. [https://doi.org/10.1016/0091-6749\(88\)91044-5](https://doi.org/10.1016/0091-6749(88)91044-5).
- Spikes, S., R. Xu, CK Nguyen, G. Chamilos, DP. Kontoyiannis, RH. Jacobson, DE. Ejzykiewicz, LY. Chiang, SG. Filler, GS. May. 2008. „Gliotoxin Production in *Aspergillus Fumigatus* Contributes to Host-Specific Differences in Virulence”. *The Journal of Infectious Diseases* 197 (3): 479–86. <https://doi.org/10.1086/525044>.
- Sugui, JA., J. Pardo, YC. Chang, KA. Zarembek, G. Nardone, EM. Galvez, A. Müllbacher, JI. Gallin, MM. Simon, KJ. Kwon-Chung. 2007. „Gliotoxin Is a Virulence Factor of *Aspergillus fumigatus*: gliP Deletion Attenuates Virulence in Mice Immunosuppressed with Hydrocortisone”. *Eukaryotic Cell* 6 (9): 1562–69. <https://doi.org/10.1128/EC.00141-07>.
- Szigeti, ZsM., Sz. Szaniszló, E. Fazekas, Gy. Gyémánt, J. Szabon, K. Antal, T. Emri, és mtsai. 2014. „Optimization of Triacetylfusarinine C and Ferricrocin Productions in *Aspergillus Fumigatus*”. *Acta Microbiologica Et Immunologica Hungarica* 61 (2): 107–19. <https://doi.org/10.1556/AMicr.61.2014.2.2>.
- Szilágyi, M., M. Miskei, Zs. Karányi, B. Lenkey, I. Pócsi, T. Emri. 2013. „Transcriptome Changes Initiated by Carbon Starvation in *Aspergillus Nidulans*”. *Microbiology (Reading, England)* 159 (Pt 1): 176–90. <https://doi.org/10.1099/mic.0.062935-0>.
- Tang, X., Q. Li, M. Wu, L. Lin, M. Scholz. 2016. „Review of Remediation Practices Regarding Cadmium-Enriched Farmland Soil with Particular Reference to China”. *Journal of Environmental Management* 181 (október): 646–62. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.08.043>.
- Tegos, GP., M. Haynes, JJ. Strouse, M. Md T. Khan, CG. Bologna, TI. Oprea, LA. Sklar. 2011. „Microbial Efflux Pump Inhibition: Tactics and Strategies”. *Current Pharmaceutical Design* 17 (13): 1291–1302. <https://doi.org/10.2174/138161211795703726>.

Tekaia, F., JP. Latgé. 2005. „*Aspergillus Fumigatus*: Saprophyte or Pathogen?” *Current Opinion in Microbiology* 8 (4): 385–92. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2005.06.017>.

Thön, M., QA. Abdallah, P. Hortschansky, DH. Scharf, M. Eisendle, H. Haas, AA. Brakhage. 2010. „The CCAAT-Binding Complex Coordinates the Oxidative Stress Response in Eukaryotes”. *Nucleic Acids Research* 38 (4): 1098–1113. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp1091>.

Tomee, J. F., H. F. Kauffman. 2000. „Putative Virulence Factors of *Aspergillus Fumigatus*”. *Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 30 (4): 476–84. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2222.2000.00796.x>.

Toyotome, T., D. Hagiwara, H. Takahashi, A. Watanabe, K. Kamei. 2018. „Emerging Antifungal Drug Resistance in *Aspergillus Fumigatus* and Among Other Species of *Aspergillus*”. *Current Fungal Infection Reports* 12 (3): 105–11. <https://doi.org/10.1007/s12281-018-0318-9>.

Trapnell, C., L. Pachter, SL. Salzberg. 2009. „TopHat: Discovering Splice Junctions with RNA-Seq”. *Bioinformatics (Oxford, England)* 25 (9): 1105–11. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp120>.

Trapnell, C., DG. Hendrickson, M. Sauvageau, L. Goff, JL. Rinn, L. Pachter. 2013. „Differential Analysis of Gene Regulation at Transcript Resolution with RNA-Seq”. *Nature Biotechnology* 31 (1): 46–53. <https://doi.org/10.1038/nbt.2450>.

Turner, W. B., D. C. Aldridge. 1981. *Fungal metabolites*. Köt. 2. kötet. London, New York: Academic Press.

Valko, M., H. Morris, M. T. D. Cronin. 2005. „Metals, Toxicity and Oxidative Stress”. *Current Medicinal Chemistry* 12 (10): 1161–1208. <https://doi.org/10.2174/0929867053764635>.

Van Waeyenberghe, L., J. Baré, F. Pasmans, M. Claeys, W. Bert, F. Haesebrouck, K. Houf, A. Martel. 2013. „Interaction of *Aspergillus Fumigatus* Conidia with *Acanthamoeba Castellanii* Parallels Macrophage-Fungus Interactions”. *Environmental Microbiology Reports* 5 (6): 819–24. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12082>.

VanderWal, AR., N. Makthal, A. Pinochet-Barros, JD. Helmann, RJ. Olsen, M. Kumaraswami. 2017. „Iron Efflux by PmtA Is Critical for Oxidative Stress Resistance and Contributes Significantly to Group A *Streptococcus* Virulence”. *Infection and Immunity* 85 (6). <https://doi.org/10.1128/IAI.00091-17>.



- Vicente-franqueira, R., J. Amich, P. Laskaris, O. Ibrahim-Granet, JP. Latgé, H. Toledo, F. Leal, JA. Calera. 2015. „Targeting Zinc Homeostasis to Combat *Aspergillus Fumigatus* Infections”. *Frontiers in Microbiology* 6: 160. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00160>.
- Vödisch, M., K. Scherlach, R. Winkler, C. Hertweck, HP. Braun, M. Roth, H. Haas, ER. Werner, AA. Brakhage, O. Kniemeyer. 2011. „Analysis of the *Aspergillus Fumigatus* Proteome Reveals Metabolic Changes and the Activation of the Pseurotin A Biosynthesis Gene Cluster in Response to Hypoxia”. *Journal of Proteome Research* 10 (5): 2508–24. <https://doi.org/10.1021/pr1012812>.
- Vries, RP. de, R. Riley, A. Wiebenga, G. Aguilar-Osorio, S. Amillis, C. Akemi Uchima, G. Anderluh, és mtsai. 2017. „Comparative genomics reveals high biological diversity and specific adaptations in the industrially and medically important fungal genus *Aspergillus*”. *Genome Biology* 18 (február). <https://doi.org/10.1186/s13059-017-1151-0>.
- Wallner, A., M. Blatzer, M. Schrettl, B. Sarg, H. Lindner, H. Haas. 2009. „Ferricrocin, a Siderophore Involved in Intra- and Transcellular Iron Distribution in *Aspergillus fumigatus*”. *Applied and Environmental Microbiology* 75 (12): 4194–96. <https://doi.org/10.1128/AEM.00479-09>.
- Walsh, TJ., I. Raad, TF. Patterson, P. Chandrasekar, GR. Donowitz, R. Graybill, RE. Greene, és mtsai. 2007. „Treatment of Invasive Aspergillosis with Posaconazole in Patients Who Are Refractory to or Intolerant of Conventional Therapy: An Externally Controlled Trial”. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* 44 (1): 2–12. <https://doi.org/10.1086/508774>.
- Ward, O. P., W. M. Qin, J. Dhanjoo, J. Ye, A. Singh. 2005. „Physiology and Biotechnology of *Aspergillus*”. *Advances in Applied Microbiology* 58C: 1–75. [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(05\)58001-8](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(05)58001-8).
- Weidenbörner, M. 2001. *Encyclopedia of food mycotoxins*. Berlin; New York: Springer.
- Weinberg, ED. 2009. „Iron Availability and Infection”. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1790 (7): 600–605. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2008.07.002>.
- Wiemann, P., BE. Lechner, JA. Baccile, TA. Velk, WB. Yin, JW. Bok, S. Pakala, és mtsai. 2014. „Perturbations in Small Molecule Synthesis Uncovers an Iron-Responsive Secondary Metabolite Network in *Aspergillus Fumigatus*”. *Frontiers in Microbiology* 5: 530. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00530>.

- Wiemann, P., A. Perevitsky, FY. Lim, Y. Shadkchan, BP. Knox, JA. Landero Figueora, T. Choera, és mtsai. 2017. „*Aspergillus Fumigatus* Copper Export Machinery and Reactive Oxygen Intermediate Defense Counter Host Copper-Mediated Oxidative Antimicrobial Offense”. *Cell Reports* 19 (5): 1008–21. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.04.019>.
- Witkiewicz-Kucharczyk, A., W. Bal. 2006. „Damage of Zinc Fingers in DNA Repair Proteins, a Novel Molecular Mechanism in Carcinogenesis”. *Toxicology Letters*, Proceedings of the 42nd Congress of the European Societies of Toxicology, 162 (1): 29–42. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2005.10.018>.
- Wong, J. 1999. „Utilization of a Manure Compost for Organic Farming in Hong Kong”. *Bioresource Technology* 67 (1): 43–46. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(99\)00066-8](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(99)00066-8).
- Wong Sak Hoi, J., C. Lamarre, R. Beau, I. Meneau, A. Berepiki, A. Barre, E. Mellado, ND. Read, JP. Latgé. 2011. „A Novel Family of Dehydrin-like Proteins Is Involved in Stress Response in the Human Fungal Pathogen *Aspergillus Fumigatus*”. *Molecular Biology of the Cell* 22 (11): 1896–1906. <https://doi.org/10.1091/mbc.E10-11-0914>.
- Wu, X., SJ. Cobbina, G. Mao, H. Xu, Z. Zhang, és L. Yang. 2016. „A Review of Toxicity and Mechanisms of Individual and Mixtures of Heavy Metals in the Environment”. *Environmental Science and Pollution Research International* 23 (9): 8244–59. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6333-x>.
- Xu, L., W. Meng, C. Cao, J. Wang, W. Shan, Q. Wang. 2015. „Antibacterial and Antifungal Compounds from Marine Fungi”. *Marine Drugs* 13 (6): 3479–3513. <https://doi.org/10.3390/md13063479>.
- Yasmin, S., B. Abt, M. Schrettl, TAA. Moussa, ER. Werner, H. Haas. 2009. „The Interplay between Iron and Zinc Metabolism in *Aspergillus Fumigatus*”. *Fungal Genetics and Biology* 46 (9): 707–13. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2009.05.003>.
- Yasmin, S., L. Alcazar-Fuoli, M. Gründlinger, T. Puempel, T. Cairns, M. Blatzer, JF. Lopez, JO. Grimalt, E. Bignell, H. Haas. 2012. „Mevalonate Governs Interdependency of Ergosterol and Siderophore Biosyntheses in the Fungal Pathogen *Aspergillus Fumigatus*”. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (8): E497-504. <https://doi.org/10.1073/pnas.1106399108>.
- Yin, WB., JA. Baccile, JW. Bok, Y. Chen, NP. Keller, FC. Schroeder. 2013. „A Nonribosomal Peptide Synthetase-Derived Iron (III) Complex from the Pathogenic Fungus *Aspergillus Fumigatus*”. *Journal of the American Chemical Society* 135 (6): 2064–67. <https://doi.org/10.1021/ja311145n>.

- Zarembek, KA., JA. Sugui, YC. Chang, KJ. Kwon-Chung, JI. Gallin. 2007. „Human Polymorphonuclear Leukocytes Inhibit *Aspergillus Fumigatus* Conidial Growth by Lactoferrin-Mediated Iron Depletion”. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 178 (10): 6367–73. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.10.6367>.
- Zhang, Z., R. Liu, JA. Noordhoek, HF. Kauffman. 2005. „Interaction of Airway Epithelial Cells (A549) with Spores and Mycelium of *Aspergillus Fumigatus*”. *The Journal of Infection* 51 (5): 375–82. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2004.12.012>.
- Zhao, FJ, XY. Huang. 2018. „Cadmium Phytoremediation: Call Rice CAL1”. *Molecular Plant* 11 (5): 640–42. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2018.03.016>.
- Zhou, J., P. B. Goldsbrough. 1995. „Structure, Organization and Expression of the Metallothionein Gene Family In *Arabidopsis*”. *Molecular and General Genetics MGG* 248 (3): 318–28. <https://doi.org/10.1007/BF02191599>.
- Zhou, W., B. Qiu. 2005. „Effects of Cadmium Hyperaccumulation on Physiological Characteristics of *Sedum Alfredii Hance (Crassulaceae)*”. *Plant Science* 169 (4): 737–45. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2005.05.030>.

## 9. Mellékletek

### 1. melléklet: Az RT-qPCR vizsgálatokban használt primerpárok

#### A vaséhezéssel kombinált oxidatív stresszválasz kísérletekben használt primer párok:

A vizsgált gén	A primerek szekvenciája
Afu1g06390	5'-AAGTCCGAGCGTGAGCGTG-3' 5'-GGTGAAAGCGAGCAGAGCG-3'
Afu1g06810	5'-GCTATCGGTGTCGGTGGTG-3' 5'-ACTGGGGGAGAAGGGGAAG-3'
Afu1g15960	5'-GTGTTTATGCTCTCGGTGATGTC-3' 5'-CGGGTTCTTCTTCTTCTTCTG-3'
Afu1g16130	5'-TGCGGGAATGCGAGATGAG-3' 5'-AGTGATGTGCGAAGGGAGC-3'
Afu1g17270	5'-CAGTCAGATGCGGGTAGTTG-3' 5'-AAGGAAAAGGAGGTAGCGATG-3'
Afu2g07680	5'-TCTTCTGTGTGTTGGGTTTGG-3' 5'-TTCTGGTGGAGGTAGTTGAG-3'
Afu2g17600	5'-CTCAACGACACCAACACCAAC-3' 5'-TGCTTCAACATCAACAGGACC-3'
Afu3g02270	5'-TCACTGCGGCTTCTTTCC-3' 5'-ATCTCGTTGTCACCTCTGGG-3'
Afu3g03420	5'-CTTTTATCGTGGCTCATTGCG-3' 5'-AACCCCTTCATCTTTTGCTTCGTC-3'
Afu3g08160	5'-GGTCGTTGTTGCCATCGGTG-3' 5'-CATCTTCAGGTTGTCGGTGCG-3'
Afu3g12270	5'-AGTCGTCCTCGTCGTCAAC-3' 5'-TTCAGCCCCATAAGTCCAG-3'

Afu3g12920 5'-GTAACGGGACTCAATGGACAC-3'  
5'-CAAAAGCGATGGAACAGATG-3'

Afu3g14240 5'-GGAACACACCACGCTCAATG-3'  
5'-CAATGCCAAAACGAATGCTG-3'

Afu4g06770 5'-CTCCTGATGTCGGTCTCGG-3'  
5'-TAATAGCGTCCTCGGCAAGC-3'

Afu4g09110 5'-GGCACTGGAGGAAGCAAC-3'  
5'-GCGGTAGAAGATGTCACGG-3'

Afu5g03790 5'-TCATCAGCATCAGCAATCCC-3'  
5'-TCCACCTCAACAATCTTCATCG-3'

Afu5g03800 5'-TTGACTGGCGGCACATTC-3'  
5'-TGGAGGGAGGCTTGGTTTC-3'

Afu5g03920 5'-ATTCCACCACGACCAAAACC-3'  
5'-CACCGATACCTCCTTCTCCAAC-3'

Afu5g10370 5'-CGCTACTGGTGTCTGGTCG-3'  
5'-GGAAGGTCAAGGTGGGGTC-3'

Afu5g11260 5'-GAGACCACATCATCCACCG-3'  
5'-TTCAAGTTCAGACACGCCAG-3'

Afu5g11760 5'-GGAGACAGCGGGTGATAAG-3'  
5'-GAGGGAGGGAGTTGAGTTG-3'

Afu6g03480 5'-ATCAGCCACTTCTTCCTCAGC-3'  
5'-ACCTTGTTAGCCACCACCG-3'

Afu6g03890 5'-CTTGTGCCCTTCGTGTG-3'  
5'-GCCAGTAGTTGACCGTGCC-3'

Afu6g04360 5'-ATCGGCAACAAGCACAACAATGG-3'  
5'-TCCTCATCTCCTCAAATCCTCC-3'

Afu6g09660 5'-GAGGGCACCGATGATGAAG-3'  
5'-AGGCAGACCAGAATGAGCAAG-3'

Afu6g12400 5'-GTCAGGTCCCCGTTTCCAAG-3'  
5'-GGCATCATCCAAGTCCAGGTG-3'

Afu8g00370	5'-GATACTCTTTCCCGCTGCTG-3' 5'-TGACGATGATGACGATGCTAC-3'
Afu8g00490	5'-GACGCCCTGCCTATCAAG-3' 5'-GAAAACCCAACGCTCTGC-3'
Afu8g00540	5'-GGGCGTGTGTGTCTTCTTC-3' 5'-CAATGGCGTATGCTTCTCTG-3'

---

### A CdCl<sub>2</sub> stressválasz vizsgálatokban használt primerpárok:

A vizsgált gén	A primerek szekvenciája
Afu2g18030 (feltételezett kataláz C gén)	F: 5'-AGTTGACGCTGAATCGCATCC-3' R: 5'-GAATTTTGTGGTGGTTGGGGC-3'
Afu1g16130 (feltételezett pca1 kadmium pumpa gén)	F: 5'-TGCGGGAATGCGAGATGAG-3' R: 5'-AGTGATGTGCGAAGGGAGC-3'
Afu7g00250 (feltételezett β-tubulin gén)	F: 5'-ACCTGCTCGGCTCTTTTCC-3' R: 5'-CATCTCGTCCATTCCCTCGC-3'
Afu1g06390 (feltételezett EF-1 transzlációs elongációs faktor α-alegység gén)	F: 5'-AAGTCCGAGCGTGAGCGTG-3' R: 5'-GGTGAAAGCGAGCAGAGCG-3'
Afu3g13900 (feltételezett γ-glutamil-cisztein ligáz gén)	F: 5'-GATGCGATGGCGTTTGGGAATG-3' R: 5'-GAGATGTAGGTGGAGTTGGAC-3'

---

## 2. melléklet: A vizsgált gén/fehérje csoportok viselkedése

A gén/fehérje csoport neve <sup>a</sup>	A stressz-függő gének/fehérjék száma <sup>b</sup>							
	Transzkriptomikai adatok				Proteomikai adatok			
	A	B	C	D	A	B	C	D
Antioxidáns enzimek (31)	1/12 <sup>c</sup>	0/1	19 <sup>c</sup> /3	16 <sup>c</sup> /10	4 <sup>c</sup> /2 <sup>c</sup>	2 <sup>c</sup> /0	0/0	3 <sup>c</sup> /2 <sup>c</sup>
Vastranszport (35)	20 <sup>c</sup> /7	0/11 <sup>c</sup>	10/5	23 <sup>c</sup> /7	10 <sup>c</sup> /0	0/0	0/0	11 <sup>c</sup> /0
Fe-S klaszter képzés (16)	0/5	0/0	13 <sup>c</sup> /0	7/2	0/1	0/0	0/0	0/1
Hem bioszintézis (11)	0/4	0/0	1/2	0/4	0/0	0/0	0/0	0/1
Fe-S klaszter kötés (43)	0/21	0/0	14/4	11/20 <sup>c</sup>	1/10 <sup>c</sup>	0/0	0/0	1/12 <sup>c</sup>
Hem kötés (64)	8/22 <sup>c</sup>	4/3	9/22 <sup>c</sup>	12/28 <sup>c</sup>	0/3 <sup>c</sup>	0/0	0/0	0/5 <sup>c</sup>
Citromsav-ciklus (36)	3/12 <sup>c</sup>	1/0	9/15 <sup>c</sup>	6/21 <sup>c</sup>	0/4 <sup>c</sup>	0/0	0/0	1/6 <sup>c</sup>
Légzés (53)	1/15 <sup>c</sup>	0/0	9/3	6/18 <sup>c</sup>	0/7 <sup>c</sup>	0/0	0/0	0/7 <sup>c</sup>
Szkvalén-ergoszterin útvonal (21)	7 <sup>c</sup> /3	0/0	5/8 <sup>c</sup>	8/10 <sup>c</sup>	2 <sup>c</sup> /0	0/0	0/0	2 <sup>c</sup> /0

Cu <sup>2+</sup> transzport (18)	2/6 <sup>c</sup>	0/4 <sup>c</sup>	7/3	5/5	0/0	0/0	0/0	0/0
Zn <sup>2+</sup> transzport (9)	2/5 <sup>c</sup>	0/1	1/2	2/5 <sup>c</sup>	0/0	0/0	0/0	0/0
Multidrog transzporterek (25)	8 <sup>c</sup> /1	2/0	7/10 <sup>c</sup>	12 <sup>c</sup> /5	1/0	0/0	0/0	1/0
Transzkripciós faktorok (331)	56 <sup>c</sup> /29	14/5	65/88 <sup>c</sup>	82/73	0/0	0/0	0/0	1/0

<sup>a</sup> – A gén/fehérje csoport mögötti szám a csoportba tartozó gének/fehérjék számát jelöli.

<sup>b</sup> – A gén/fehérje csoportok adatai a Kurucz és munkatársai (Kurucz és mtsai. 2018a) közlemény 3. mellékletében találhatóak meg. A jelen táblázat ezen eredményeket foglalja össze. A számok a felülszabályozott/alulszabályozott gének, illetve fehérjék számát jelölik. Az eredeti táblázatok terjedelmi okok miatt nem kerültek bele a dolgozatba. A: -Fe/-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> vs. +Fe/-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; B: +Fe/+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> vs. +Fe/-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; C: -Fe/+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> vs. -Fe/-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; D: -Fe/+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> vs. +Fe/-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

<sup>c</sup> – Szignifikáns (p<0,05; Fischer-féle egzakt teszt) dúsulás a felülszabályozott, vagy az alulszabályozott gének csoportján belül.



### 3. melléklet: Az RT-qPCR mérések eredményei

Gén ID	Gén név	Kódolt fehérje	RT-qPCR ( $\Delta\Delta CP$ ) <sup>a</sup>			
			A	B	C	D
Afu3g02270	<i>cat1</i>	kataláz	$-3,2 \pm 0,5^c$	$0,63 \pm 0,5$	$0,58 \pm 0,5$	$-2,6 \pm 0,7^c$
Afu6g03890	<i>catA</i>	spóraspecifikus kataláz	$-1,1 \pm 0,5^c$	$0,62 \pm 0,5$	$0,02 \pm 0,4$	$-1,1 \pm 0,6^c$
Afu4g09110	<i>ccp1</i>	feltételezett citokróom c peroxidáz	$-1,1 \pm 0,4^c$	$0,02 \pm 0,4$	$-0,53 \pm 0,5$	$-1,7 \pm 0,6^c$
Afu1g15960		feltételezett glutation reduktáz	$-0,20 \pm 0,4$	$0,55 \pm 0,6$	$1,3 \pm 0,6^b$	$1,1 \pm 0,7^b$
Afu3g12270		feltételezett glutation peroxidáz	$-0,96 \pm 0,5^c$	$-0,27 \pm 0,4$	$1,2 \pm 0,7^b$	$0,23 \pm 0,9$
Afu5g10370	<i>sdh2</i>	a szukcinát-dehidrogenáz vas-kénfehérje alegysége	$-1,3 \pm 0,5^c$	$-0,77 \pm 0,6$	$-0,75 \pm 0,6$	$-2,1 \pm 0,8^c$
Afu1g06810		feltételezett akonitáz	$-2,4 \pm 0,4^c$	$-0,53 \pm 0,4$	$1,2 \pm 0,6^b$	$-1,2 \pm 0,7^c$
Afu3g14240		Fe-S klaszter képződésben résztvevő fehérje	$-0,04 \pm 0,4$	$0,33 \pm 0,5$	$1,2 \pm 0,6^b$	$1,1 \pm 0,7^b$
Afu4g06770		Fe-S klaszter képződésben résztvevő fehérje	$0,49 \pm 0,4$	$-0,40 \pm 0,4$	$1,2 \pm 0,6^b$	$1,6 \pm 0,7^b$

Afu5g03790	<i>fetC</i>	feltételezett ferroxidáz; a RIA tagja	0,30 ± 0,5	-0,20 ± 0,4	0,81 ± 0,4 <sup>b</sup>	1,1 ± 0,6 <sup>b</sup>
Afu1g17270	<i>freB</i>	feltételezett metalloreduktáz; a RIA tagja	4,7 ± 1,0 <sup>b</sup>	-0,07 ± 0,5	-0,11 ± 0,4	4,6 ± 1,1 <sup>b</sup>
Afu5g03800	<i>frA</i>	feltételezett nagy affinitású vas permeáz; a RIA tagja	-0,50 ± 0,4	-1,0 ± 0,6 <sup>c</sup>	1,7 ± 0,7 <sup>b</sup>	1,2 ± 0,8 <sup>b</sup>
Afu2g07680	<i>sidA</i>	L-ornitin N5-oxigenáz (sziderofórok bioszintézise)	3,0 ± 1,1 <sup>b</sup>	0,21 ± 0,5	0,91 ± 0,5 <sup>b</sup>	4,0 ± 1,2 <sup>b</sup>
Afu3g03420	<i>sidD</i>	NRPS (sziderofórok bioszintézise)	5,8 ± 1,5 <sup>b</sup>	-2,0 ± 0,8 <sup>c</sup>	0,28 ± 0,6	6,1 ± 1,6 <sup>b</sup>
Afu5g11260	<i>sreA</i>	GATA transzkripció faktor (vas anyagcsere)	-2,3 ± 0,6 <sup>c</sup>	-0,38 ± 0,5	1,2 ± 0,6 <sup>b</sup>	-1,2 ± 0,8 <sup>c</sup>
Afu5g03920	<i>hapX</i>	bZIP transzkripció faktor (vas anyagcsere)	2,8 ± 0,4 <sup>b</sup>	0,33 ± 0,4	0,67 ± 0,5	3,5 ± 0,6 <sup>b</sup>
Afu2g17600	<i>pksP</i>	PKS (DHN-melanin klaszter)	-2,0 ± 1,0 <sup>c</sup>	-0,75 ± 0,6	0,26 ± 0,5	-1,7 ± 1,1 <sup>c</sup>
Afu8g00370	<i>fma-PKS</i>	PKS (fumagillin klaszter)	2,4 ± 0,9 <sup>b</sup>	2,0 ± 1,1 <sup>b</sup>	-1,6 ± 0,9 <sup>c</sup>	0,76 ± 1,3
Afu8g00490		PKS (fumagillin klaszter)	0,55 ± 0,7	2,2 ± 1,0 <sup>b</sup>	-1,4 ± 0,6 <sup>c</sup>	-0,81 ± 0,9
Afu6g09660	<i>gliP</i>	NRPS (gliotoxin klaszter)	-3,1 ± 1,2 <sup>c</sup>	0,47 ± 0,4	-0,38 ± 0,6	-3,4 ± 1,3 <sup>c</sup>
Afu3g12920	<i>nrps5</i>	NRPS (hexadehidro-asztechrom klaszter)	0,23 ± 0,4	2,0 ± 1,0 <sup>b</sup>	-1,1 ± 0,7 <sup>c</sup>	-0,89 ± 0,8

Afu6g03480	NRPS (fumipirrol klaszter)	-1,4 ± 0,6 <sup>c</sup>	-0,03 ± 0,4	0,18 ± 0,5	-1,3 ± 0,8 <sup>c</sup>
Afu8g00540 <i>nrps14</i>	hibrid NRPS/PKS (pszeurotin A klaszter)	2,7 ± 0,9 <sup>b</sup>	0,71 ± 0,6	-0,64 ± 0,7	2,0 ± 1,1 <sup>b</sup>
Afu6g04360 <i>atrF</i>	feltételezett ABC transzporter	1,5 ± 0,8 <sup>b</sup>	0,51 ± 0,5	1,1 ± 0,5 <sup>b</sup>	2,6 ± 0,9 <sup>b</sup>
Afu5g11760 <i>hemC</i>	feltételezett hem bioszintézis enzim	-0,14 ± 0,5	0,71 ± 0,6	1,4 ± 0,8 <sup>b</sup>	1,3 ± 0,8 <sup>b</sup>
Afu1g16130 <i>pca1</i>	feltételezett kadmium efflux pumpa	-0,21 ± 0,7	0,81 ± 0,6	0,37 ± 0,4	0,16 ± 0,8

<sup>a</sup> – A táblázatban három biológiai ismétlésből származó mérés átlagai és szórásai szerepelnek.  $\Delta\Delta\text{CP} = \Delta\text{CP}_{\text{kezelt}} - \Delta\text{CP}_{\text{kontroll}}$ , ahol  $\Delta\text{CP}_{\text{kezelt}} = \text{CP}_{\text{referencia gén}} - \text{CP}_{\text{tesztelt gén}}$  a tesztelni kívánt kultúrából mérve, míg  $\Delta\text{CP}_{\text{kontroll}} = \text{CP}_{\text{referencia gén}} - \text{CP}_{\text{tesztelt gén}}$  a referenciának választott kultúrából mérve. A referencia gén az *fks1* gén volt. A: -Fe/-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> vs. +Fe/-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; B: +Fe/+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> vs. +Fe/-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; C: -Fe/+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> vs. -Fe/-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; D: -Fe/+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> vs. +Fe/-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

<sup>b</sup> – felül szabályozott gén (A  $\Delta\Delta\text{CP}$  a Student-féle t-teszt alapján szignifikánsan nagyobb volt, mint nulla;  $p < 0,05$ .)

<sup>c</sup> – alul szabályozott gén (A  $\Delta\Delta\text{CP}$  a Student-féle t-teszt alapján szignifikánsan kisebb volt, mint nulla;  $p < 0,05$ .)

4. melléklet A dolgozat szempontjából fontosnak ítélt gének transzkriptomikai és proteomikai adatai

Gén név	Transzkriptom adatok <sup>a,b</sup>				Proteom adatok			
	A	B	C	D	A	B	C	D
<i>amcA</i>	3,636	-0,173	-0,148	3,487	0,467	-0,085	-0,014	0,421
<i>hmg2</i>	2,286	0,466	-2,082	0,204				
<i>hapX</i>	3,350	-0,219	0,652	4,002	0,514	0,107	0,134	0,644
<i>sreA</i>	-3,628	-0,385	1,791	-1,837				
<i>cat1</i>	-6,033	-0,529	3,633	-2,400	-1,120	-0,057	-0,003	-1,132
<i>ccp1</i>	-5,886	-0,208	2,968	-2,918	-1,198	0,367	-0,056	-1,248
<i>trr1</i>	0,172	-0,354	4,984	5,157	0,607	0,610	0,114	0,668
<i>aspf29</i>	-1,145	-0,481	3,228	2,083	0,712	0,509	-0,181	0,536
<i>sod1</i>	2,345	0,464	1,160	3,505	0,772	0,072	-0,038	0,720
<i>isal</i>	-3,576	-0,276	2,170	-1,406				
<i>hemA</i>	-3,647	-0,700	-0,593	-4,239	-0,265	-0,047	0,011	-0,249
<i>erg3A</i>	2,024	-0,362	0,814	2,838	0,892	0,048	0,080	0,962
<i>erg3B</i>	1,640	-0,536	1,549	3,189				
<i>erg25A</i>	1,011	-0,644	1,600	2,611				

<i>erg25B</i>	1,605	0,062	0,396	2,000	0,163	-0,063	0,318	0,359
<i>abcB</i>	1,324	-0,377	-1,063	0,262	0,860	0,163	-0,014	0,828
<i>zrcA</i>	4,320	0,645	3,470	7,790				
<i>zrfB</i>	-4,975	-2,323	-0,013	-4,989				
<i>cat2</i>	-4,820	0,301	10,563	5,743	-0,289	1,394	0,103	-0,168
<i>fetC</i>	0,333	-0,821	0,892	1,225	0,771	0,029	-0,206	0,546
<i>freB</i>	4,572	-0,877	-0,309	4,263				
<i>frA</i>	0,291	-1,104	1,889	2,180				
<i>atfA</i>	-1,035	-0,271	2,249	1,214	0,269	0,059	0,159	0,425
<i>yap1</i>	-0,309	-0,381	1,838	1,529	0,034	0,070	0,061	0,133
<i>hsf1</i>	0,022	-0,028	1,039	1,061	0,385	0,100	-0,264	0,106
<i>acoA</i>	-3,141	-0,158	4,262	1,121	-0,804	-0,083	0,045	-0,745
<i>hem13</i>	-2,293	-0,759	2,113	-0,180	-0,358	0,009	-0,007	-0,321

<sup>a</sup> – A táblázat a Kurucz és munkatársai (Kurucz és mtsai. 2018a) közlemény 3. mellékletének rövidített változata, amely a dolgozat szempontjából fontos gének/fehérjék transzkriptomikai és proteomikai adatait tartalmazza. Az eredeti melléklet terjedelmi okok miatt nem került bele a dolgozatba. A: -Fe/-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> vs. +Fe/- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; B: +Fe/+ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> vs. +Fe/- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; C: -Fe/+ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> vs. -Fe/- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>;

D: -Fe/+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> vs. +Fe/- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

<sup>b</sup> – A felülszabályozott géneket/fehérjéket piros, az alulszabályozottakat kék szín jelöli.

## 10. Köszönetnyilvánítás

Őszinte köszönetet szeretnék mondani témavezetőmnek, Dr. Emri Tamás egyetemi docensnek, önzetlen szakmai segítségnyújtásáért, lendületes és dinamikus témavezetéséért, illetve szakmai tudásának továbbadásáért. Köszönetemet szeretném kifejezni Prof. Dr. Pócsi István tanszékvezető egyetemi tanárnak, aki értékes tanácsaival hozzájárult és elősegítette a doktori munkám elkészítését a Debreceni Egyetem Természettudományi és Technológiai Karának Molekuláris Biotechnológiai és Mikrobiológiai Tanszékén.

Köszönettel tartozom továbbá Dr. Máthéné Dr. Szigeti Zsuzsának (Debreceni Egyetem), Dr. Szemán-Nagy Gábornak (Debreceni Egyetem) és Dr. Hargitai Zoltánnak (Kenézy Gyula Kórház, Debrecen) az állatkísérletek elvégzéséért, Dr. Harangi Sándornak (Debreceni Egyetem) az atomemissziós spektrométeres mérésekért, Dr. Antal Károlynak (Eszterházy Károly Egyetem) a statisztikai elemzésekben nyújtott segítségéért. Dr. Varga Jánosnak (Szegedi Tudományegyetem) köszönettel tartozunk, hogy rendelkezésünkre bocsátott 5 *A. fumigatus* törzset (SZMC3100, SZMC3102-4, SZMC3106). Továbbá Dr. Olaf Kniemayernek és munkatársainak (Leibniz Institute for Natural Product Research and Infection Biology- Hans Knoll Institute, Jena, Germany), hogy lehetőséget adtak, támogattak és segítséget nyújtottak a proteomikai vizsgálatok elvégzéséhez a jénai Hans-Knöll Intézetben, közülük kiemelném Dr. Thomas Krügerert, aki az LC-MS/MS méréseket végezte.

Szeretném megköszönni Kiss Beáta szakdolgozónak alapos és megbízható munkáját, illetve Tóth Gábornének laboránsnak, aki segített kiigazodni a Tanszéki laborokban, továbbá a Molekuláris Biotechnológiai és Mikrobiológiai Tanszék minden egyes munkatársának, PhD hallgatójának

megbízható segítségüket, és hogy munkám során kellemes légkörben dolgozhattam.

Végül, de nem utolsó sorban köszönetemet és hálámat szeretném kifejezni férjemnek és családomnak, akik támogattak, biztattak a munkám során, és türelemmel viselték az elmúlt időszak megpróbáltatásait.

Kutatómunkám elkészítése az EFOP-3.6.1-16-2016-00022 számú projekt (Európai Unió, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával), az Innovációs és Technológiai Minisztérium által meghirdetett Felsőoktatási Intézményi Kiválóság Program NKFIH K112181 és K119494, valamint a TÁMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0045, DAAD (German Academic Exchange Service - 91529720-50015537), Campus Hungary (B2/1F/7506) anyagi hozzájárulásával valósult meg, illetve részben támogatta az Osztrák Tudományos Alap / Infect-ERA program (FWF I1616 támogatás / Infect-ERA AspMetNet projekt) és A-M.D. HOROS doktori program (W1253), amelyet ezúton is nagyon köszönök.

## 11. Tudományos közlemények jegyzéke

### A dolgozat alapjául szolgáló publikációk:

Kurucz V, Kruger T, Antal K, Dietl AM, Haas H, Pócsi I, Kniemeyer O, Emri T. (2018) Additional oxidative stress reroutes the global response of *Aspergillus fumigatus* to iron depletion. BMC Genomics. 19:1-19.

Kurucz V, Kiss B, Máthéné Szigeti Zs, Szemán-Nagy G, Orosz E, Hargitai Z, Harangi S, Wiebenga A, de Vries RP, Pócsi I, Emri T. (2018) Physiological background of the remarkably high Cd<sup>2+</sup> tolerance of the *Aspergillus fumigatus* Af293 strain. J Basic Microbiol. 58(11):957-967.

### Az értekezés témakörében elhangzott előadások és poszterek:

Emri T, Kurucz V, Jakab Á, Antal K, Dombrádi V, Kniemeyer O, Pócsi I. (2019) Combinatorial stress responses in Fungi. Acta Microbiol. Immunol. Hung. Suppl. 2019, 66:128-129. 18th International Congress of the Hungarian Society for Microbiology, 2019, Budapest.

Emri T, Kurucz V, Jakab Á, Antal K, Kniemeyer O, Pócsi I. (2019) Coping with two stressors concomitantly. In: Annals of the International Symposium on Fungal Stress – ISFUS: Book of Abstracts, Even3, Sao Paolo, 52-53.

Pócsi I, Kurucz V, Harangi S, Wiebenga A, de Vries RP, Emri T. (2018) The *Aspergillus fumigatus* Af293 strain has an unusually high cadmium tolerance among the Aspergilli. In: 17<sup>th</sup> Symposium on remediation. Abstract Book /Kothe E, Mertem D, Schäfer T, Friedrich Schiller University, Jéna, 37.



Kurucz V, Krüger T, Antal K, Pócsi I, Kniemeyer O, Emri T. (2017) How does *Aspergillus fumigatus* cope with iron starvation under oxidative stress? In: 12<sup>th</sup> Symposium of the VAAM special group Molecular Biology of Fungi: Abstract Book, George-August-Universität Göttingen, Göttingen, Németország, 98.

Emri T, Kurucz V, Krüger T, Antal K, Kniemeyer O, Pócsi I. (2017) Studying combinatorial stress responses - an approach to understand how *Aspergillus fumigatus* adapts to the human body. In: VI. Magyar Mikológiai Konferencia absztraktkötete. Szerk.: Dima Bálint, Magyar Mikológiai Társaság, Szeged, 22-24. (Mikológiai Közlemények-Clusiana; 56/1.).