

Doktori (PhD) értekezés tézisei

AZ *ASPERGILLUS FUMIGATUS* HUMÁN PATOGÉN GOMBAFAJ STRESSZVÁLASZAINAK VIZSGÁLATA

Dr. Kurucz Vivien

Témavezető: Dr. Emri Tamás



DEBRECENI EGYETEM

Juhász Nagy Pál Doktori Iskola

Debrecen, 2020

1. Bevezetés és célkitűzések

Az *Aspergillus fumigatus* egy ubikviter, szaprotróf, opportunista 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). 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 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). Az emberi tevékenység hatására évente mintegy 13000 tonna kadmium kerül a környezetünkbe, leginkább a mezőgazdaságban is használt foszfát tartalmú műtrágyák által (Zhou és Qiu 2005; Chakraborty és mtsai. 2014; Tang és mtsai. 2016). 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 az 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. Annak érdekében, hogy megtaláljuk a választ a kérdésre, az alábbi vizsgálatok elvégzését terveztük:

- A kontroll (+Fe/-H₂O₂) és hidrogén-peroxiddal kezelt (+Fe/+H₂O₂), illetve a vaséhező (-Fe/-H₂O₂) és a hidrogén-peroxiddal kezelt vaséhező (-Fe/+H₂O₂) 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 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 kadmium toleranciája (de Vries és mtsai. 2017) kapcsolatba hozható-e vas anyagcseréjével és ezen keresztül befolyásolhatja-e *in vivo* virulenciáját. 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-diklorofluoreszcein (DCF) teszttel;

- A törzsek diamiddal, hidrogén-peroxiddal (H_2O_2), *terc*-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;
- Vaséhező tenyészetek 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. Anyagok és módszerek

2.1 Vizsgálatainkhoz felhasznált törzsek és tenyésztésük

A kísérleteinkhez felhasznált *A. fumigatus* törzsek a következők voltak: Af293; DBMCC101; DBMCC201-5; NCAIM F00056, F00673, F00948; SZMC3100, SZMC3102-4, SZMC3106. A törzsek fenntartása Barratt-féle minimál nitrátos táptalajon (Barratt és mtsai. 1965) történt.

A talajmintákból származó törzsek (DBMCC201-5) izolálásához Rose-Bengal Klóramfenikol Agart (Sigma-Aldrich Kft, Budapest, Magyarország), használtunk. Identifikálásuk a parciális kalmodulin génszekvenciák meghatározásával történt (Hong és mtsai. 2005).

2.2. Az *Aspergillus fumigatus* tenyésztése folyékony tápközegben

A kadmium élettani vizsgálatokhoz a 10 klinikai izolátum (Af293; DBMCC 101; 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 tápleveseket 5×10^7 db, frissen összegyűjtött spórával oltottuk be és rázógépből inkubáltuk őket 37 °C-on és 220 rpm fordulatszámon. A CdCl₂ 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 a mintavételig további 5 órán át inkubáltuk (37 °C, 220 rpm).

A transzkriptomikai és proteomikai vizsgálatokban az alábbi négyféle körülmény között felnövesztett *A. fumigatus* Af293 törzs tenyészeitel dolgoztunk: A kontroll (+Fe/-H₂O₂) és a H₂O₂-dal kezelt (+Fe/+H₂O₂), illetve a

vaséhező (-Fe/-H₂O₂) és a H₂O₂-dal kezelt vaséhező (-Fe/+H₂O₂) tenyészetekkel. Ebben az esetben is 500 mL-es Erlenmeyer lombikokat használtunk, melyek 100 mL táplevest tartalmaztak. A kontroll (+Fe/-H₂O₂) és a H₂O₂-dal kezelt (+Fe/+H₂O₂) tenyészetekhez Barratt-féle minimál tápfolyadékot használtunk, melyet 4×10^8 db spórával oltottunk le és 33 órán keresztül inkubáltuk (37 °C, 220 rpm). A vaséhező (-Fe/-H₂O₂) és a H₂O₂-dal kezelt vaséhező (-Fe/+H₂O₂) tenyészetekhez módosított Barratt-féle táplevest használtunk. Ebben a táplevesben a nyomelemoldat nem tartalmazott Na₂EDTA-t és vasat. Az inokulálás ebben az esetben 8×10^8 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) H₂O₂ (3 mM végkoncentráció) hozzáadásával kezeltük, majd a kezelt és a kezeletlen tenyészeteket is 1 órán át inkubáltuk a mintavételig.

2.3. Fémionok és oxidatív ágensek növekedést gátló hatásának, illetve az ezek közötti interakciók vizsgálata

Az *A. fumigatus* törzsek kadmium toleranciájának jellemzéséhez a Barratt-féle nitrátos minimál tápagarhoz CdCl₂-ot adtunk 0-3 mM végkoncentrációban. A tápagarokat 5 µL, 2×10^7 spóra/mL koncentrációjú spóraszuszpenzióval pontinokuláltuk, majd 5 napig 37 °C-on inkubáltuk. A kadmium toleranciát a kezelt és a kezeletlen tenyészetek telepátmérőinek arányával (relatív növekedés) és/vagy az 50 %-os növekedésgátlás eléréséhez szükséges kadmium koncentrációval (IC₅₀) jellemeztük. Hasonló módon jártunk el a törzsek CuSO₄

(0,5 mM), NiSO₄ (1 mM), CoCl₂ (3 mM), FeCl₃ (5 mM), ZnSO₄ (10 mM), illetve MSB (0,01 mM), tBOOH (0,8 mM), diamid (1 mM) és H₂O₂ (3 mM) jelenlétében mutatott növekedésének jellemzésekor is.

A növekedést gátló szerek közötti interakciók vizsgálata során az alkalmazott stressz ágensek a következők voltak: CuSO₄ (0,3 mM), FeCl₃ (5 mM), ZnSO₄ (5 mM) és/vagy 0,2, illetve 2 mM CdCl₂ a vizsgált 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.

2.4. Felületi *Aspergillus fumigatus* tenyészetek kadmium biszorpciójának tanulmányozása

A vizsgált törzseket (NCAIM F00056, SZMC3106, Af293) ebben az esetben steril celofán lappal lefedett Barratt-féle minimál nitrátos tápagarra oltottuk le. A törzstől függően a tápagar 0,2, illetve 2 mM CdCl₂-ot tartalmazott. A tenyészeteket 5 napig inkubáltuk 37 °C-on, majd a celofánlapok felszínéről összegyűjtöttük a micéliumot. A cc. HNO₃-val végzett feltárást követően a minták kadmium tartalmát atomemissziós spektrométerrel (Kurucz és mtsai. 2018) határoztuk meg.

2.5. Az oxidatív stresszválasz elemek detektálása

A tenyészetek (NCAIM F00056, SZMC3106, Af293) redox egyensúlyának felborulását a DCF-tesztrel (Royall és Ischiropoulos 1993) vizsgáltuk. A SOD (Oberley és Spitz 1984), kataláz (Roggenkamp és mtsai. 1974), G6PD (Emri és mtsai. 1997), GR (Pinto és mtsai. 1984) és GPx (Chiu és mtsai. 1976) enzimek specifikus aktivitását „rate assay” módszerrel fotometriásan detektáltuk. A

minták fehérjetartalmának meghatározása Bradford reagenssel történt (Bradford 1976). A hifák GSH és GSSG tartalmát DTNB (5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzoát sav) – GR assay segítségével mértük (Anderson 1985; Sági és mtsai. 2001).

2.6. Sziderofórok képződésének detektálása

A törzsek (Af293; DBMCC101; NCAIM F00056, NCAIM F00673, NCAIM F00948; SZMC3100, SZMC3102-4, SZMC3106) triacetilfuzarinin C (TAF-C) és ferrikrocin (FC) termelő képességét vaséhező tenyészetek felhasználásával (Szigeti és mtsai. 2014) HPLC-s eljárás segítségével határoztuk meg (Hördt és mtsai. 2000; Pócsi és mtsai. 2008).

Az omikai vizsgálatoknál a tenyészetek vaséhezésének kialakulását a fermentlé megnövekedett sziderofór tartalmával igazoltuk, amit ebben az esetben CAS-assay (Machuca és Milagres 2003) segítségével mértünk meg.

2.7. Transzkripció vizsgálatok

Az RNS izolálásához a sülyesztett kultúrákból származó mintákat liofileztük. A teljes RNS-t TRISOL reagens (Invitrogen, Lofer, Ausztria) felhasználásával izoláltuk (Chomczynski 1993; Emri és mtsai. 2017). Az RT-qPCR vizsgálatokhoz referencia génnek az Afu7g00250 (*tub2*), illetve az Afu6g12400 (*fk1*) géneket választottuk. Az RNS szekvenálási adatok feldolgozásánál a CASAVA szoftvert (adatok szűrése és demultiplexálása), a TopHat programot (a read-ek illesztése) (Trapnell és mtsai. 2009), illetve a Cuffdiff szoftvert (a differenciáltan expresszált gének meghatározása) (Trapnell és mtsai. 2013) használtuk. A felülszabályozott, alulszabályozott és stresszfüggő géneknek azokat a differenciáltan expresszált géneket ($p < 0,05$)

tekintettük, ahol $\log_2FC > 1$ (felülszabályozott gének), $\log_2FC < -1$ (alulszabályozott gének), $|\log_2FC| > 1$ (stressz-függő gének), illetve FC (“fold-change”) = $I_{\text{kezelt}}/I_{\text{referencia}}$ ahol I a génhez tartozó „read”-ek normalizált értéke.

2.8. Proteomikai vizsgálatok

A proteomikai vizsgálatokat a transzkriptomikai vizsgálatoknál használtakkal megegyező tenyészetek felhasználásával végeztük. A minták előkészítése során a fagyasztott szűrt micéliumot porítottuk, és kb. 50 mg homogenizátumból a fehérjéket kivontuk (Kniemeyer és mtsai. 2006). A mintában lévő RNS-t és DNS-t eltávolítottuk, majd a fehérjéket tripszinnel emésztettük. A triptikus peptidek jelölése iTRAQ 4-plex (Sciex, Darmstadt, Németország) kit-tel történt a gyártó által meghatározott eljárást követve. A minták proteomikai analízise LC-MS/MS készüléken történt (Baldin és mtsai. 2015). Az adatok elemzéséhez a Proteome Discoverer 1.4 (Thermo), MASCOT (Matrix Science, UK) 2.4, Sequest HT és MS Amanda programokat használtuk. Egy fehérjét akkor tekintettünk felül-, illetve alulszabályozottnak, ha a normalizált jelintenzitás változás mértéke (FC) nagyobb, illetve kisebb volt, mint 1,5.

2.9. A transzkriptom és proteom adatok funkcionális elemzése

A géncsoport dúsulási vizsgálatokhoz, a KEGG és a FunCat gén csoportok esetében a FungiFun2 programot (<https://elbe.hki-jena.de/fungifun/fungifun.php>) használtuk (Priebe és mtsai. 2015). A „biological process” GO kategóriák esetében az AspGD adatbázis Gene Ontology Term Finder (<http://www.aspergillusgenome.org/cgi-bin/GO/goTermFinder>) alkalmazásával dolgoztunk (Cerqueira és mtsai. 2014).

2.10. 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) végezték (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/törzs) használtak, melyeket 50 μL , 7×10^6 konídiumot tartalmazó frissen készített spórasuszpenzió segítségével intranazálisan fertőztek meg altatást követően (100 mg/tskg pentobarbitál). A kezelt állatokat 1, 4 és 7 nap múlva újra immunszupresszálták. A kontroll egerek a spórasuszpenzió készítéséhez is használt fiziológiás 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.

3. Eredmények és megbeszélésük

3.1. Az omikai vizsgálatok eredményei és megbeszélésük

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 reaktív oxigén részecskékre (ROS). A vaséhezés és az oxidatív stressz közötti interakció meghatározása érdekében az alábbi tenyészetek transzkriptomikai és proteromikai vizsgálatát végeztük el: +Fe/-H₂O₂ (kontroll,

kezeletlen tenyészet), $+Fe/+H_2O_2$ (H_2O_2 -dal kezelt tenyészet), $-Fe/-H_2O_2$ (vashiányos tenyészet) és $-Fe/+H_2O_2$ (vashiányos, H_2O_2 -dal kezelt tenyészet).

A vaséhezés kialakulását az extracelluláris sziderofór tartalom növekedésével, a H_2O_2 kezelés hatásosságát a DCF-teszt segítségével igazoltuk. Nem várt módon a vaséhezés már önmagában is képes volt megzavarni a sejtek redox egyensúlyát, azaz a vashiányos tenyészetekben a DCF teszttel mért érték szignifikánsan nagyobbak bizonyult, mint a kontroll tenyészet esetében.

A transzkriptom és proteom szinten tapasztalt változások nagyobb mértékű pozitív korrelációt mutattak a vaséhező ($-Fe/-H_2O_2$) és a kombinált stressznek kitett ($-Fe/+H_2O_2$) tenyészetek kontroll ($+Fe/-H_2O_2$) tenyészetekkel történő összehasonlításakor, mint a H_2O_2 kezelés hatását vizsgáló összevetésekben ($+Fe/+H_2O_2$ vs. $+Fe/-H_2O_2$, illetve $-Fe/+H_2O_2$ vs. $-Fe/-H_2O_2$).

A transzkriptom adatok főkomponens analízise alapján a tenyészetek viselkedését elsősorban a vaséhezés befolyásolta, a peroxid kezelésnek jelentősebb hatása csak vaséhező körülmények között volt. Az élettani adatokon is ez látszik. A kombinált kezelés sokkal nagyobb redox egyensúlyvesztést okozott, mint az az egyszerű kezelések szerint várható lett volna. A kétutas ANOVA teszt alapján szignifikáns interakció volt a két kezelés hatása között. A szárazanyagtartalom (DCM) változásában szignifikáns különbség nem volt, mivel 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 h-s hidrogén-peroxid kezelés ezen értékeken érdemben nem változtatott.

3.1.1. Hidrogén-peroxid kezelés hatása a kontroll tenyészetekre (+Fe/+H₂O₂ vs. +Fe/-H₂O₂)

Bár az alkalmazott oxidatív stresszkezelés jól detektálható változásokat okozott a hifák redox homeosztázisában, a transzkriptomban és a proteomban csak minimális változásokat tapasztaltunk. Transzkriptom szinten a réz transzportért felelős gének alulszabályozódtak, proteom szinten pedig egyes antioxidáns fehérjék, mint a Trx1 (feltételezett tioredoxin reduktáz) és Cat2 (kataláz) mennyiségének növekedését figyeltük meg.

3.1.2. A hidrogén-peroxid által indukált oxidatív stressz hatása a vashiányos tenyészetekre (-Fe/+H₂O₂ vs. -Fe/-H₂O₂)

Vashiányos tenyészetekben meglepő módon a Fe-S klaszter szintéziséért felelős gének felülszabályozódtak, míg a multidrog transzmembrán transzport génjei alulszabályozódtak hidrogén-peroxid kezelés hatására. Számos hem-kötő fehérje (9 fehérje), illetve Fe-S klaszter tartalmú fehérje (14 fehérje) génje szintén felülszabályozódott. További négy, a vasanyagcseréhez köthető gén aktiválódását szintén megfigyeltük: *acoA* (akonitáz), *hem13* (hem bioszintézis gén), *cat1* és *cat2* (kataláz gének). A hősokk és oxidatív stresszválasz gének nagyszámú felülszabályozódása szintén detektálható volt. A fentiek alapján a kétféle (megfelelő vas ellátottságú, illetve vaséhező tenyészeteken alkalmazott) hidrogén-peroxid kezelés a stresszre reagáló gének számában és típusában is jelentősen eltért egymástól.

3.1.3. A vashiány és a hidrogén-peroxid kezelés kombinált hatása a kontroll tenyészetekre (-Fe/+H₂O₂ vs. +Fe/-H₂O₂)

A kombinált kezelés igen jelentős transzkripciók változást okozott a tenyészetekben, ami a stresszre reagáló gének számában és típusában is eltért a vaséhezés önálló hatásától. (i) A glutation-glutaredoxin-tioredoxin rendszer számos eleme, valamint a szuperoxid dizmutázok (“vastól független anti-oxidáns enzimek”) felülszabályozódtak. (ii) A fehérje lebontó útvonalak (makroautofágia, ubikvitin-függő fehérje degradáció) aktiválódtak; segítségükkel a gomba növelhette a felhasználható (ebben az esetben „újrahasznosítható”) vas mennyiségét (Richie és mtsai. 2007). (iii) A riboszómák képződésében és a transzlációban közreműködő gének transzkripciója a kombinált kezelés alatt annak ellenére csökkent, hogy a vaséhezés már önmagában is jelentős alulszabályozódáshoz vezetett. Feltehetőleg ez tovább lassította a tenyészetek növekedését és ezen keresztül a vasszintézis sebességét. (iv) 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. Ez utóbbi arra utalhat, hogy ezen gének, illetve folyamatok kulcsfontosságúak lehetnek a kombinált stressz túlélésében. Ez azt is jelenti, hogy a vastartalmú fehérjék képzésének gátlása ígéretes terápiás célpont lehet a jövőben.

3.1.4. Az *A. fumigatus* néhány, orvosi szempontból potenciálisan fontos tulajdonságának változása

A stressz jelentősen megváltoztathatja a gombasejtek fiziológiáját, ami hatással lehet a virulenciájának és/vagy az antifungális szerek iránti érzékenységének megváltozására is. A vaséhezés (-Fe/-H₂O₂) és a kombinált

stressz (-Fe/+H₂O₂) több olyan gén transzkripcióját is befolyásolta, melyek multidrog transzportereket kódolnak, ezek közül kiemelendő az *abcB* (Cdr1B) transzporter gén, mely igazolt módon szerepet játszik az *A. fumigatus* Cyp51a-független azol-rezisztencia kialakulásában (Fraczek és mtsai. 2013). Tekintettel arra, hogy a proteomikai adatok alapján az AbcB fehérje mennyisége is megnövekedett a kezelés hatására, 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. Kísérleteinkben a vaséhezés alulszabályozta a *zrfB* plazmamembrán Zn²⁺ transzportert és felülszabályozta a *zrcA* vakuoláris Zn²⁺ transzporter géneket, illetve alulszabályozta a *zafA* transzkripciós faktort, amely a cinkfelvétel szabályozásáért felelős (Yasmin és mtsai. 2009) és a gomba virulenciája szempontjából is alapvető fontosságú (Vicentefranqueira és mtsai. 2015). A cink anyagcsere gátlása/megzavarása az antifungális terápiák ígéretes célpontja lehet a jövőben (Yasmin és mtsai. 2009; Amich és Calera 2014; Vicentefranqueira és mtsai. 2015).

3.2. Az *A. fumigatus* Af293 törzs kadmium toleranciájának vizsgálata

3.2.1. A kadmium tolerancia és a *pcaA* gén kapcsolata

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 CdCl₂ toleranciáját határoztuk meg. Az IC₅₀ értéke széles tartományban

változott (0,25 mM - 1 mM), de meglepő módon egyik törzs sem rendelkezett olyan magas kadmium toleranciával, mint az Af293. Mindezek alapján 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. Az általunk vizsgált *A. fumigatus* törzsek mindegyikében jelen volt és kifejeződött a *pcaA* gén. Sőt pozitív korrelációt tapasztaltunk a gén transzkripciója és a törzs kadmium toleranciája között.

3.2.2. A kadmium hatása az oxidatív stressztoleranciára és a fémion toleranciára

A kadmium kezelés minden esetben redox egyensúlyvesztést okozott a DCF-teszt alapján. Fokozta a SOD (és egyes esetekben a GR) specifikus aktivitását, de a kezelés nem volt hatással a GPx és a kataláz specifikus aktivitásaira. A kadmium jelenléte eltérő mértékben növelte a GSH és a GSSG koncentrációját, ami a GSH/GSSG arány csökkenéséhez vezetett. 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. Nem találtunk pozitív korrelációt a kadmium tolerancia és az oxidatív stressztolerancia között sem.

Szintén nem volt összefüggés a kadmium tolerancia és fémion tolerancia (Cu^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} és Ni^{2+}) között, kivéve a Cd^{2+} és a Fe^{3+} tolerancia kapcsolatát, amely pozitív korrelációt mutatott. A Cd^{2+} és Cu^{2+} , Cd^{2+} és Zn^{2+} , illetve részben a Cd^{2+} és Fe^{3+} növekedésgátló hatása között megfigyelt szinergizmus 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 Fe^{3+} és a Cd^{2+} növekedést gátló hatása között.

3.2.3. A kadmium tolerancia és a vasmetabolizmus kapcsolata

A vizsgált törzsek kadmium toleranciája jól korrelált a vas felvételért felelős TAF-C sziderofór termelésével. Hasonlóan nagy korrelációt a vas raktározásában fontos FC termeléssel nem tapasztaltunk. Az intenzív extracelluláris sziderofór termelés védelmet nyújthat a kadmiummal szemben, mivel mérsékli azon kevésbé szelektív transzport folyamatok működését, melyen keresztül a kadmium bejuthat a sejtekbe (kis affinitású vastranszporterek) (Dimkpa és mtsai. 2009; Banakar és mtsai. 2017). Így az intenzív *pcaA* transzkripció mellett, az intenzív TAF-C termelés is hozzájárulhat az Af293 törzs jelentős kadmium toleranciájához.

Az egérmodellben végzett *in vivo* virulencia vizsgálatok alapján az Af293 törzs szignifikánsan virulensebbnek bizonyult, mint a kisebb kadmium toleranciát mutató törzsek.

A vasanyagcsere és a kadmium tolerancia között általunk is megfigyelt összefüggések alapján elképzelhető, hogy a PcaA elsődleges feladata a Fe^{2+} ionok kipumpálása a sejtekből és csak a Fe^{2+} és Cd^{2+} ionok hasonlósága miatt tudja a Cd^{2+} ionokat is eltávolítani. Feltételezésünk szerint az Af293 törzs természetes élőhelyén egyfajta „hol túl sok, hol túl kevés vas” helyzethez alkalmazkodva alakulhatott ki. Minthogy hasonló stressz az emberi szervezetben is előfordul, így adottságai révén e törzs itt is képes hatékonyan növekedni, ami megmagyarázza nagy *in vivo* virulenciáját. A fentiek alapján az intenzív TAF-C termelés és *pcaA* expresszió csak véletlenül vezetett nagy

kadmium tolerancia kialakulásához. E feltételezés alátámasztásához mindenekelőtt a PcaA Fe^{2+} transzportban betöltött szerepét kellene igazolni.

3.2.4. A nagy kadmium bioszorpció kapacitás gyakorlati jelentősége

Számos gomba rendelkezik kiemelkedően magas bioszorpció kapacitással, amely kihasználható a toxikus fémionok (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 nagy kadmium toleranciájának köszönhetően az Af293 törzs képes volt akár 2 mM Cd^{2+} koncentráció mellett is növekedni és ilyen körülmények között akár 850 mg kadmiumot is képes volt adszorbeálni száraz sejttömeg kilogrammonként. Ez egyben azt is jelenti, hogy minden olyan esetben, amikor élő gomba biomasszával szeretnénk a 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.

4. Összefoglalás

A dolgozatom első témája során arra voltunk kíváncsiak, hogyan befolyásolja a gomba oxidatív stresszel szembeni védekezését az emberi szervezetben való növekedéskor is jellemző vaséhezés. Kísérleteinkben felhasznált kontroll (+Fe/-H₂O₂), hidrogén-peroxiddal kezelt (+Fe/+H₂O₂), vaséhező (-Fe/-H₂O₂), illetve hidrogén-peroxiddal kezelt vaséhező (-Fe/+H₂O₂) kultúrák transzkriptomikai és proteomikai vizsgálataiból nyert adataiból az alábbi következtetéseket vontuk le:

A vaséhezés és az oxidatív stressz között szinergista kölcsönhatás van. Azaz a vaséhező *A. fumigatus* tenyészetek számára viszonylag gyenge oxidatív stressz leküzdése is igen komoly kihívást jelenthet.

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. Mindez azt is jelenti, hogy ha az *in vitro* vizsgálatokból nyert adatok segítségével akarjuk megjósolni a mikrobák *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 felülszabályozódása egybeesett a makroautofágiában és az ubikvitin-függő fehérje degradációban részt vevő gének felülszabályozódásával. Az előbbi arra utal, hogy aktiválódott a sejtvédelem,

amelynek célja, hogy megvédje a sejteket a ROS által okozott károsodásoktól. 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. E változások hozzájárulhattak a tenyészet növekedésének és ezen keresztül a vas igényének további csökkenéséhez.

Bár általában a vasigényes folyamatok alulszabályozódtak, egyes vastartalmú fehérjét kódoló gének, valamint a Fe-S klaszter bioszintézisben résztvevő gének jelentős felülszabályozódást mutattak. Ez alapján egy lehetséges terápiás célpont lehet a vastartalmú fehérjék képzésének gátlása a jövőben.

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. Ezek közül kiemelendő az *abcB* gén, melynek 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).

Dolgozatom második felében arra a kérdésre kerestük a választ, hogy miért rezisztens az *A. fumigatus* Af293 törzs a kadmiumra, illetve kadmium toleranciája (de Vries és mtsai. 2017) kapcsolatba hozható-e vas anyagszerével és ezen keresztül befolyásolhatja-e *in vivo* virulenciáját.

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 ($0,25 \text{ mM} < \text{IC}_{50} < 1 \text{ mM}$), viszont csak az Af293 törzs esetében tapasztaltunk kiemelkedően magas ($\text{IC}_{50} > 2 \text{ mM}$) kadmium toleranciát.

A *pcaA* gén minden törzsben aktív volt és relatív transzkripciója jól korrelált a kadmium toleranciával. Ez alapján úgy gondoljuk, hogy bár a *pcaA* gén jelenléte a genomban 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, a vizsgált törzsek esetében nem tapasztaltunk pozitív korrelációt az oxidatív stressz tolerancia és a kadmium tolerancia között. Azaz, bár az oxidatív stressz elleni védekezés fontos lehet a kadmium toxicitásának leküzdésében, az antioxidáns védelemben megmutatkozó különbségek nem magyarázták 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. A kadmium kezelés által okozott redox egyensúlyvesztés háttérének tisztázása további vizsgálatokat igényel.

Nem tapasztaltunk korrelációt a kadmium tolerancia és a Cu^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} ionokkal szemben mutatott tolerancia között. Ugyanakkor a Cd^{2+} és Cu^{2+} , illetve a Cd^{2+} és Zn^{2+} növekedésgátló hatása között szinergizmust figyeltünk meg. 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 Fe^{3+} toleranciájával és extracelluláris sziderofór termelésével. Ráadásul az Af293 törzs esetében nem tapasztaltunk szinergizmust a Cd^{2+} és Fe^{3+} növekedést gátló hatása között. Mindezek alapján szoros kapcsolat lehet a vas anyagszere és a kadmium tolerancia között. Az intenzív *pcaA* transzkripció mellett, az intenzív TAF-C termelés is magyarázhatja a törzs jelentős kadmium toleranciáját. Ugyanakkor az is elképzelhető, hogy a Fe^{2+} ionok eltávolítása a PcaA elsődleges feladata, és csak a Fe^{2+} és Cd^{2+} ionok hasonlósága miatt tudja a Cd^{2+} ionokat is kipumpálni a sejtekből, hasonlóan ahhoz, ahogy a Fe^{2+} transzporterek a Fe^{2+} ionok mellett Cd^{2+} -t is szállítanak. A vas – kadmium kapcsolat megmagyarázhatja a nagy kadmium toleranciájú Af293 törzs nagy *in vivo* virulenciáját is.

A nagy kadmium toleranciájának köszönhetően az Af293 törzs 2 mM Cd^{2+} koncentráció mellett is tudott növekedni és ilyen körülmények között akár 850 mg kadmiumot is képes volt adszorbeálni száraz sejtömeg kilogrammonként. A gombasejttel igen jelentős Cd^{2+} -kötő képessége révén a gomba biomassza felhasználható szennyvizek nehézfém tartalmának csökkentésére (biosorption, bioleaching), sőt egyes nehézfémek – közéjük tartozik a kadmium is – gazdaságos kinyerésére (biomining) is (Jiang és mtsai. 2018; Boczonádi és mtsai. 2020).

5. Tézisek

- 1) A vaséhezés és az oxidatív stressz között szinergista kölcsönhatást tapasztaltunk.
- 2) A két stressz együttes hatása erősségében és jellegében is eltért a külön-külön elvégzett stressz kezelésekre adott válaszoktól.
- 3) A vaséhezéssel kombinált oxidatív stressz során a vastól független antioxidáns rendszerek, a makroautofágia és egyes vastartalmú fehérjék, illetve Fe-S klaszter szintézis út felülszabályozódását, a növekedés és sok vastartalmú fehérje képződésének alulszabályozódását figyeltük meg.
- 4) Kombinált kezelés hatására a multidrog transzportert kódoló, az azolrezisztencia kialakulásában is fontos *abcB* gén felülszabályozódott.
- 5) Az *A. fumigatus* Af293 törzs kadmium toleranciája kiemelkedően nagy a többi vizsgált *A. fumigatus* törzshöz képest.
- 6) A *pcaA* gén minden törzsben aktív volt és relatív transzkripciója pozitív korrelációt mutatott a kadmium toleranciával.
- 7) A kadmium tolerancia pozitív korrelációt mutatott a törzsek Fe^{3+} toleranciájával és extracelluláris sziderofór termelésével is.
- 8) Az Af293 törzs esetében nem tapasztaltunk szinergizmust a Cd^{2+} és Fe^{3+} növekedésgátló hatása között.
- 9) A fentiek alapján a kadmium tolerancia és a vas anyagcsere között szoros kapcsolat van.
- 10) Nagy kadmium adszorpciós kapacitásának köszönhetően az Af293 törzsnek jelentős szerepe lehet a “bioleaching”, illetve “biomining” folyamatokban.

6. 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 Kniemeyernek 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 Krüger, aki az LC-MS/MS méréseket végezte.

Szeretném megköszönni Kiss Beáta szakdolgozónak alapos és megbízható munkáját, illetve Tóth Gáborné 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, bíztattak 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). Mindezen támogatásokat ezúton is nagyon köszönöm.



Nyilvántartási szám: DEENK/365/2020.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Kurucz Vivien
Doktori Iskola: Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10046447

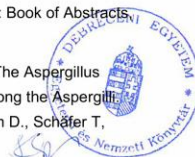
A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

Idegen nyelvű tudományos közlemények külföldi folyóiratban (2)

1. **Kurucz, V.**, Krüger, T., Antal, K., Dietl, A. M., Haas, H., Pócsi, I., Kniemeyer, O., Emri, T.:
Additional oxidative stress reroutes the global response of *Aspergillus fumigatus* to iron
depletion.
BMC Genomics. 19, 1-19, 2018. EISSN: 1471-2164.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/s12864-018-4730-x>
IF: 3.501
2. **Kurucz, V.**, Kiss, B., Máthéné Szigeti, Z., Szemán-Nagy, G., Orosz, E., Hargitai, Z., Harangi, S.,
Wiebenga, A., De Vries, R. P., Pócsi, I., Emri, T.: Physiological background of the remarkably
high Cd²⁺ tolerance of the *Aspergillus fumigatus* Af293 strain.
J. Basic Microbiol. 58 (11), 957-967, 2018. ISSN: 0233-111X.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/jobm.201800200>
IF: 1.76

Idegen nyelvű absztrakt kiadványok (5)

3. Emri, T., **Kurucz, V.**, Jakab, Á., Antal, K., Dombrádi, V., Kniemeyer, O., Pócsi, I.: Combinatorial
stress responses in Fungi.
Acta Microbiol. Immunol. Hung. Suppl., 128-129, 2019. ISSN: 1217-8950.
4. Emri, T., **Kurucz, V.**, Jakab, Á., Antal, K., Kniemeyer, O., Pócsi, I.: Coping with two stressors
concomitantly.
In: Annals of the International Symposium on Fungal Stress : ISFUS : Book of Abstracts,
Even3, Sao Paulo, 52-53, 2019. ISBN: 9788557222106
5. Pócsi, I., **Kurucz, V.**, Harangi, S., Wiebenga, A., Vries, R. P. d., Emri, T.: The *Aspergillus*
fumigatus Af293 strain has an unusually high cadmium tolerance among the *Aspergillus*
In: 17th Symposium on remediation Abstract Book / Kothe E., Mertem D., Schäfer T.,
Friedrich Schiller University, Jéna, 37, 2018.





6. **Kurucz, V.**, Krüger, T., Antal, K., Pócsi, I., Kniemeyer, O., Emri, T.: How does *Aspergillus fumigatus* cope with iron starvation under oxidative stress?
In: 12th Symposium of the VAAM special group Molecular Biology of Fungi : Abstract Book, Georg-August-Universität Göttingen, Göttingen, Németország, 98, 2017.
7. Emri, T., **Kurucz, V.**, Krüger, T., Antal, K., Kniemeyer, O., Pócsi, I.: 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, 2017, (Mikológiai Közlemények-Clusiana ; 56/1.)

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 5,261

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 5,261

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

Debrecen, 2020.12.01.



Short thesis for the degree of doctor of philosophy (PhD)

**INVESTIGATION OF STRESS RESPONSES OF THE HUMAN
PATHOGENIC FUNGAL SPECIES
*ASPERGILLUS FUMIGATUS***

by Vivien Kurucz Pharm. D.

Supervisor: Tamás Emri DSc.



UNIVERSITY OF DEBRECEN

Doctoral School of Juhász Nagy Pál

Debrecen, 2020

7. Introduction and objectives

Aspergillus fumigatus is a ubiquitous, saprotrophic, opportunistic pathogenic filamentous fungus found in habitats that are rich in decomposed plant remains, over most of the Earth (Rhodes and Askew 2010). This species is responsible for more than 90% of human infections caused by *Aspergillus* species (Paulussen et al. 2016). Within the human body, *A. fumigatus* has to cope with several types of stress, as well as a combination of these. Such typical stress effects include iron starvation and oxidative stress (Brown and Goldman 2016). These two stresses are closely related: too much iron can generate oxidative stress due to its redox activity, but a too low amount of iron can upset the redox balance of cells, as many antioxidant enzymes (e.g. catalases, peroxidases) require iron to function (Dlouhy and Outten 2013).

The behavior of the fungus is also fundamentally influenced by stress outside the human body. One of the most significant anthropogenic stress is cadmium pollution (Godt et al. 2006). As a result of human activity, about 13,000 tons of cadmium are released into our environment annually, mostly through phosphate-containing fertilizers used in agriculture (Zhou and Qiu 2005; Chakraborty et al. 2014; Tang et al. 2016). Cadmium stress is closely related to the iron metabolism (cadmium is often transported by iron transporters) and although cadmium is not a redox active metal, it also leads to oxidative stress (Cuypers et al. 2010; Rani et al. 2014; Kukongviriyapan et al. 2016).

In my dissertation, I investigated the interactions between iron starvation and oxidative stress as well as the physiological effects of cadmium stress. In the first topic, we were interested in how the protection of the fungus against oxidative stress is affected by iron starvation. In order to find the answer to this question, we planned to perform the following tests:

- The transcriptome level detection of changes by RNA sequencing and controlling of the results for 26 genes by RT-qPCR measurements in control (+Fe/-H₂O₂) and hydrogen peroxide-treated (+Fe/+H₂O₂) as well as iron-deprived (-Fe/-H₂O₂) and iron-deprived and hydrogen peroxide-treated (-Fe/+H₂O₂) cultures;
- Performing proteomic studies in the above cultures with LC-MS/MS;
- Evaluation of transcriptome and proteome changes as well as the comparison of the oxidative stress response of the control and iron-deprived cultures based on these results.

In the second topic, we investigated why the *A. fumigatus* strain Af293 is resistant to cadmium and whether its cadmium tolerance (de Vries et al. 2017) can be related to the iron metabolism and thereby affect its *in vivo* virulence. To answer these questions, we planned to carry out the following experiments:

- Comparison of the cadmium tolerance of *A. fumigatus* strains from different habitats;
- Verification of the oxidative stress-inducing ability of cadmium by measuring the specific activity of superoxide dismutase (SOD), catalase, glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD), glutathione reductase (GR), glutathione peroxidase (GPx) and cellular glutathione content, as well as examining the redox imbalance of cells with the 2,7-dichlorofluorescein (DCF) test;
- Studying the correlation between the cadmium tolerance and the oxidative stress tolerance of strains induced by diamide, hydrogen peroxide (H₂O₂), *tert*-butyl hydroperoxide (tBOOH) and sodium menadione bisulfite (MSB) using growth tests in surface cultures;

- Investigation of the connection between cadmium tolerance and the susceptibility of strains to FeCl₃, CuSO₄, ZnSO₄, CoCl₂, NiSO₄ in surface cultures;
- Studying the transcription of the *pcaA* gene as well as comparison of the relative transcription values measured in the strains with the cadmium tolerance data to elucidate the mechanism/background of the cadmium tolerance;
- To find out whether there is a correlation between the iron metabolism and high cadmium tolerance, determining the intra- and extracellular siderophore content of iron-starved cultures of *A. fumigatus* strains using HPLC, and then comparing the obtained data with the cadmium tolerance of the strains;
- Determination of the biosorption capacity of three strains with different cadmium tolerances by atomic emission spectrometry;
- Comparison of *in vivo* virulence of strains with different cadmium tolerance.

8. Materials and methods

8.1 Strains used for our experiments and their culturing

The *A. fumigatus* strains used for our experiments were: Af293; DBMCC101; DBMCC201-5; NCAIM F00056, F00673, F00948; SZMC3100, SZMC3102-4, SZMC3106. The strains were maintained on Barratt's minimal nitrate medium (Barratt et al. 1965).

Rose-Bengal Chloramphenicol Agar (Sigma-Aldrich Kft, Budapest, Hungary) was used to isolate the strains from soil samples (DBMCC101-5). They were identified by the determination of partial calmodulin gene sequences (Hong et al. 2005).

8.2. Culturing *Aspergillus fumigatus* in liquid medium

Cultures of 10 clinical isolates (Af293; DBMCC101; NCAIM F00056, NCAIM F00673, NCAIM F00948; SZMC3100, SZMC3102-4, SZMC3106) were used for cadmium physiological studies. For the experiments, 500 mL Erlenmeyer flasks containing 100 mL of Barratt minimal nitrate medium with yeast extract (0.5 w/v%) were used (Barratt et al. 1965). The broths were inoculated with 5×10^7 freshly collected spores and incubated in a shaker at 37 °C and 220 rpm. The CdCl₂ solution was added to cultures after 17 hours. The CdCl₂ solution final concentrations are 0,2; 0,5 and 1 mM depending on the cadmium tolerance of tested strains. Treated and control cultures were incubated for 1 additional hour (37 °C, 220 rpm) until sampling.

In transcriptomic and proteomic studies, cultures of *A. fumigatus* Af293 strain grown under the following four conditions: Control (+Fe/-H₂O₂) and H₂O₂-treated (+Fe/+H₂O₂) as well as iron-deprived (-Fe/-H₂O₂) and H₂O₂-treated iron-deprived (-Fe/+H₂O₂) cultures. In this case, we used 500 mL

Erlenmeyer flasks which contained 100 mL broth. Barratt's minimal medium was used for control (+Fe/-H₂O₂) and H₂O₂-treated (+Fe/+H₂O₂) cultures. They were inoculated with 4x10⁸ spores and incubated for 33 hours (37 °C and 220 rpm). Modified Barratt broth was used for iron-deprived (-Fe/-H₂O₂) and H₂O₂-treated iron-deprived (-Fe/+H₂O₂) cultures. In this case, the trace element solution did not contain Na₂EDTA and iron. They were inoculated with 8x10⁸ spores and incubated for 50 hours (37 °C, 220 rpm).

The reason for using different incubation times and spore numbers was that the dry cell mass of the cultures and the concentration of residual glucose should be nearly the same after incubation. Parts of the control and iron-deprived cultures (at the end of the incubation time given above) were treated with H₂O₂ (at 3 mM final concentration), and then they were incubated for 1 hour until sampling.

8.3. Study of the growth inhibitory effect of metal ions and oxidative agents as well as their interactions

To characterize the cadmium tolerance of *A. fumigatus* strains, CdCl₂ was added to Barratt's nitrate minimal medium at a final concentration of 0-3 mM. The media were point inoculated with spore suspension of 5 µL (2x10⁷ spores/mL) and incubated for 5 days at 37 °C. Cadmium tolerance was characterized by the ratio of colony diameters (relative growth) of treated and untreated cultures, and/or by the cadmium concentration required to achieve 50% growth inhibition (IC₅₀). A similar procedure was used to characterize the growth of the strains in the presence of CuSO₄ (0,5 mM), NiSO₄ (1 mM), CoCl₂ (3 mM), FeCl₃ (5 mM), ZnSO₄ (10 mM), and MSB (0,01 mM), tBOOH (0,8 mM), diamide (1 mM) and H₂O₂ (3 mM).

The following agents were used to study the interactions between the growth inhibitors: CuSO₄ (0,3 mM), FeCl₃ (5 mM), ZnSO₄ (5 mM) and/or depending on the cadmium tolerance of the strains, 0,2 or 2 mM CdCl₂. The interaction was characterized by IR ratio based on Abbott's formula (Galgóczy et al. 2008). For interaction experiments we used NCAIM F00056, SZMC3106, Af293 strains.

8.4. Study of cadmium bisorption on surface *Aspergillus fumigatus* cultures

In this case, the tested strains (NCAIM F00056, SZMC3106, Af293) were inoculated on Barratt's minimal nitrate medium covered with a sterile cellophane sheet. The medium contained 0,2 and 2 mM CdCl₂ depending on the strain. The cultures were incubated for 5 days at 37 °C and then the mycelium was collected from the surface of the cellophane sheets. After treatment with cc. HNO₃, the cadmium content of the samples was determined with an atomic emission spectrometer (Kurucz et al. 2018).

8.5. Detection of oxidative stress response elements

The redox imbalance in cultures (NCAIM F00056, SZMC3106, Af293) was determined using the DCF test (Royall and Ischiropoulos 1993). The specific activity of the enzymes SOD (Oberley and Spitz 1984), catalase (Roggkamp et al. 1974), G6PD (Emri et al. 1997), GR (Pinto et al. 1984) and GPx (Chiu et al. 1976) were detected photometrically using the „rate assay” method. The protein content of the samples was determined using the Bradford reagent (Bradford 1976). The GSH and GSSG contents of the hyphae were measured using DTNB (5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoic acid) - GR assay (Anderson 1985; Sámi et al. 2001).

8.6. Detection of siderophores

The ability of the strains (Af293; DBMCC 101; NCAIM F00056, NCAIM F00673, NCAIM F00948; SZMC3100; SZMC3102-4; SZMC3106) to produce triacetylfusarin C (TAF-C) and ferricicrocin (FC) was determined via HPLC (Hördt et al. 2000; Pócsi et al. 2008) using iron-deprived cultures (Szigeti et al. 2014).

In the omics studies, the development of iron starvation in cultures was confirmed by the increased siderophore content of the broth, which was measured using CAS assay (Machuca and Milagres 2003).

8.7. Transcriptional studies

Samples from submerged cultures were lyophilized to isolate RNA. Total RNA was isolated using TRISOL reagent (Invitrogen, Lofer, Austria) (Chomczynski 1993; Emri et al. 2017). Afu7g00250 (*tub2*) and Afu6g12400 (*fks1*) were selected as reference genes for RT-qPCR assays. When processing RNA sequencing data, the software CASAVA (data filtering and demultiplexing), TopHat (read alignment) (Trapnell et al. 2009), and Cuffdiff (determination of differentially expressed genes) (Trapnell et al. 2013) were used. Differentially expressed genes ($p < 0.05$) were considered upregulated, downregulated, and stress-dependent genes, where $\log_2FC > 1$, $\log_2FC < -1$, $|\log_2FC| > 1$, respectively. FC (“fold-change”) = $I_{\text{treated}}/I_{\text{reference}}$ where „I” is the normalized value of the “reads” belonging to the gene.

8.8. Proteomic studies

Proteomic assays were performed applying the same cultures as used in the transcriptomic assays. During sample preparation, frozen filtered mycelium was pulverized, and proteins were extracted from approximately 50 mg of homogenate (Kniemeyer et al. 2006). RNA and DNA in the sample were removed and the proteins were digested using trypsin. Tryptic peptides were labeled with the iTRAQ 4-plex kit (Sciex, Darmstadt, Germany) following the manufacturer's protocol. Proteomic analysis of the samples was carried out by LC-MS/MS (Baldin et al. 2015). Data were analyzed using Proteome Discoverer 1.4 (Thermo), MASCOT (Matrix Science, UK) 2.4, Sequest HT, and MS Amanda. A protein was considered upregulated or downregulated if the rate of change in normalized signal intensity (FC) was greater or less than 1,5, respectively.

8.9. Functional analysis of transcriptome and proteome data

The program FungiFun2 (<https://elbe.hki-jena.de/fungifun/fungifun.php>) was used for the KEGG and FunCat gene groups (Priebe et al. 2015) in the gene enrichment studies. For the “biological process” GO categories, we worked using the AspGD database Gene Ontology Term Finder (<http://www.aspergillusgenome.org/cgi-bin/GO/goTermFinder>) (Cerqueira et al. 2014).

8.10. Animal experiments

The animal experiments were performed by Dr. Máthéné Dr. Zsuzsa Szigeti, Dr. Gábor Szemán-Nagy (University of Debrecen) and Dr. Zoltán Hargitai (Kenézy Gyula Hospital of University of Debrecen) (license number: 2/2014

DEMAB, GN). The following strains with different cadmium tolerance were used: Af293; NCAIM F00056; NCAIM F00948; SZMC 2103; SZMC 3104; SZMC 3106. For the experiments, BALB/c mice immunized with 200 mg/kg cyclophosphamide (10 mice/strain) 3 days before infection and infected intranasally with a freshly prepared spore suspension containing 50 μ L, 7×10^6 conidia after anesthesia (100 mg/kg). Treated animals were re-immunosuppressed after 1, 4 and 7 days. Control mice were treated with physiological saline solution, which was also used to prepare the spore suspension. In mice that died during the 10-day experiment, the development of infection was monitored by histological examinations (Palicz et al. 2016). There were no deaths in the control group.

9. Results and discussion

9.1. Results of omics studies and their discussion

In the human body, iron deficiency is a typical stress that fundamentally affects the virulence of *A. fumigatus* (Haas et al. 2008; Johnson 2008). Iron starvation can impact the oxidative stress response of the fungus, so it can affect how the fungus responds to reactive oxygen species (ROS) generated by our immune system. To determine the interaction between iron starvation and oxidative stress, we performed transcriptomic and proteomic studies of the following cultures: +Fe/-H₂O₂ (control, untreated culture), +Fe/+H₂O₂ (culture treated with H₂O₂), -Fe/-H₂O₂ (iron deficient culture) and -Fe/+H₂O₂ (iron deficient culture treated with H₂O₂).

The development of iron starvation was confirmed by the increase of the extracellular siderophore content, and the effectiveness of H₂O₂ treatment was verified using the DCF test. Unexpectedly, the iron starvation only was able to

disturb the redox balance of the cells, namely, the value measured by the DCF test was found to be significantly higher in iron-deficient cultures than in the control culture.

Changes at the transcriptome and proteome levels showed a more relevant positive correlation when comparing iron-deprived (-Fe/-H₂O₂) and combined stress (-Fe/+H₂O₂) cultures with control (+Fe/-H₂O₂) cultures than with H₂O₂ treatment (+Fe/+H₂O₂ vs. +Fe/-H₂O₂ and -Fe/+H₂O₂ vs. -Fe/-H₂O₂).

Based on the principal component analysis of the transcriptome data, the behavior of the cultures was mainly influenced by iron starvation, the more significant effect of peroxide treatment was only under iron starvation conditions. This is also evident from the physiological data. The combined treatment caused much greater redox imbalance than would have been expected with the simple treatments. There was a significant interaction between the effects of the two treatments based on the two-way ANOVA test. There was no significant difference in the change in dry cell mass (DCM), as the experimental design aimed to ensure that the dry matter and glucose contents of the iron-starved and reference cultures were almost the same at the time of hydrogen peroxide treatment. The 1 h hydrogen peroxide treatment did not substantially change these values.

9.1.1. The effect of hydrogen peroxide treatment on control cultures (+Fe/+H₂O₂ vs. +Fe/-H₂O₂)

Although the applied oxidative stress treatment caused well-detectable changes in the redox homeostasis of hyphae, only minimal changes were observed in the transcriptome and proteome. Genes responsible for copper transport were downregulated at the transcriptome level, and increase in some

antioxidant proteins such as Trr1 (putative thioredoxin reductase) and Cat2 (catalase) were observed at the proteome level.

9.1.2. The effect of hydrogen peroxide-induced oxidative stress on iron-deprived cultures (-Fe/+H₂O₂ vs. -Fe/-H₂O₂)

Surprisingly, in iron-deprived cultures, the genes responsible for Fe-S cluster synthesis were upregulated, while the multidrug transmembrane transport genes were downregulated by hydrogen peroxide treatment. The genes of several heme-binding proteins (9 proteins) and Fe-S cluster-containing proteins (14 proteins) were also upregulated. Activation of four other genes involved in iron metabolism was also observed: *acoA* (aconitase), *hem13* (heme biosynthesis), *cat1* and *cat2* (catalase). A large number of upregulations of heat shock and oxidative stress response genes were also detected. Based on the above, the two types of hydrogen peroxide treatment (used in iron-repleted and iron-deprived cultures) also differed significantly in the number and type of stress-responsive genes.

9.1.3. The combined effect of iron deficiency and hydrogen peroxide treatment on control cultures (-Fe/+H₂O₂ vs. +Fe/-H₂O₂)

The combined treatment caused a very significant transcriptional change in the cultures. It also differed from the independent effect of iron starvation in the number and type of genes responsive to stress. (i) Several elements of the glutathione-glutaredoxin-thioredoxin system as well as superoxide dismutases (“iron-independent antioxidant enzymes”) are upregulated. (ii) Protein degradation pathways (macroautophagy, ubiquitin-dependent protein degradation) were activated; thus, the fungus may have increased the amount of

„recycled” iron (Richie et al. 2007). (iii) Transcription of genes involved in ribosome formation and translation was reduced during combined treatment, despite the fact that iron starvation alone led to significant downregulation. This may indicate a further slowdown in the growth of cultures and through this, the rate of iron consumption. (iv) In iron-deprived cultures, hydrogen peroxide treatment upregulated the genes of 9 heme binding proteins, 14 Fe-S cluster binding proteins, and 13 Fe-S cluster proteins involved in synthesis. The latter may suggest that these genes or processes may be the key to surviving combined stress. This also means that inhibiting the formation of iron-containing proteins may be a promising therapeutic target in the future.

9.1.4. Changes in some medically important properties of *A. fumigatus*

Stress can significantly alter the physiology of fungal cells, which may also affect changes in its virulence and/or sensitivity to antifungal agents. Iron starvation (-Fe/-H₂O₂) and combined stress (-Fe/+H₂O₂) also affected the transcription of several genes encoding multidrug transporters, including the *abcB* (Cdr1B) transporter gene, which has a role in the development of Cyp51a-independent azole resistance in *A. fumigatus* (Fraczek et al. 2013). Considering that the amount of AbcB protein also increased as a result of treatment based on proteomic data, our results confirm the importance of antifungal strategies based on inhibition of these efflux systems (Cannon et al. 2009; Tegos et al. 2011).

Iron starvation negatively affected the transcription of several genes encoding zinc transporters. In our experiments, iron starvation downregulated the *zrfB* plasma membrane Zn²⁺ transporter and upregulated the *zrcA* vacuolar Zn²⁺ transporter genes, and downregulated the *zafA* transcription factor, which

is responsible for regulating zinc uptake (Yasmin et al. 2015). Inhibition /disruption of zinc metabolism may be a promising target for antifungal therapies in the future (Yasmin et al. 2009; Amich and Calera 2014; Vicentefranqueira et al. 2015).

9.2. Studying cadmium tolerance of *A. fumigatus* strain Af293

9.2.1. Connection between cadmium tolerance and the *pcaA* gene

In previous studies, the Af293 strain was found to be surprisingly resistant to cadmium (de Vries et al. 2017), so we examined whether this feature was characteristic of other *A. fumigatus* strains as well. Five strains were isolated from soil and they belonged to the species *A. fumigatus* confirmed by their partial calmodulin gene sequence. The CdCl₂ tolerance of these strains and 10 different clinical isolates was determined. The IC₅₀ values varied over a wide range (0,25 mM to 1 mM), but surprisingly, the Af293 strain had the highest cadmium tolerance. Based on these, the high cadmium tolerance of the Af293 strain is not unique in the genus *Aspergillus* (de Vries et al. 2017), but is not even necessarily characteristic of the *A. fumigatus* species. The *pcaA* gene was present and expressed in each of the *A. fumigatus* strains we examined. Moreover, we found a positive correlation between gene transcription and cadmium tolerance.

9.2.2. The effect of cadmium on oxidative stress tolerance and metal ion tolerance

Cadmium treatment caused redox imbalance based on the DCF test. It increased the specific activity of SOD (and in some cases GR), but it had no effect on the specific activities of GPx and catalase. The presence of cadmium

increased GSH and GSSG concentrations to varying degrees, leading to a decrease of the GSH/GSSG ratio. In this case, oxidative stress was clearly not the result of the depletion of GSH stores or loss of activity of the antioxidant enzymes we examined (catalase, SODs, GPx and GR). No positive correlation was found between cadmium tolerance and oxidative stress tolerance either.

There was also no correlation between cadmium tolerance and metal ion tolerance (Cu^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} and Ni^{2+}), except for the connection between Cd^{2+} and Fe^{3+} tolerance, which showed a positive correlation. However, the synergism observed between the growth inhibitory effects of Cd^{2+} and Cu^{2+} , Cd^{2+} and Zn^{2+} , and, in part, Cd^{2+} and Fe^{3+} , suggests that cadmium may interfere with cellular metal ion homeostasis, leading to oxidative stress, but may also damage cells (Rani és mtsai. 2014; Jacobo-Estrada et al. 2017). Surprisingly, no synergism was observed between the growth inhibitory effect of Fe^{3+} and Cd^{2+} in the Af293 strain.

9.2.3. Connection between cadmium tolerance and iron metabolism

The cadmium tolerance of the tested strains correlated well with the production of the TAF-C siderophore responsible for iron uptake. A similarly high correlation was not found with FC production accountable for iron storage. Intensive extracellular siderophore production may provide protection against cadmium by reducing the function of less selective transport processes, through which cadmium can enter cells (low-affinity iron transporters) (Dimkpa et al. 2009; Banakar et al. 2017). Thus, intense *pcaA* transcription and TAF-C production may also contribute to significant cadmium tolerance in the Af293 strain.

Based on *in vivo* virulence studies in a mouse model, the Af293 strain was found to be significantly more virulent than strains with lower cadmium tolerance.

On the basis of correlations we observed between iron metabolism and cadmium tolerance, it is conceivable that the primary function of PcaA is to pump out Fe^{2+} ions from cells and it can remove Cd^{2+} ions only due to the similarity of Fe^{2+} and Cd^{2+} ions. We hypothesize that the Af293 strain may have evolved in its natural habitat by adapting to a kind of “sometimes too much, sometimes too little iron” situation. As similar stress occurs in the human body, due to the features of this strain it can effectively grow here, which explains the high virulence *in vivo*. Based on the above, intensive TAF-C production and *pcaA* expression only accidentally led to the development of high cadmium tolerance. To support this hypothesis, the role of PcaA in Fe^{2+} transport should be confirmed.

9.2.4. The practical significance of high cadmium biosorption capacity

Many fungi have an exceptionally high biosorption capacity that can be exploited to remove toxic metal ions (including Cd^{2+}) from wastewater (Boczonádi et al. 2020) or to extract valuable metal ions from low-concentration solutions for further use (biomining) (Johnson 2014). In our studies, the Af293 strain was able to grow up to a concentration of 2 mM Cd^{2+} due to its high cadmium tolerance, and it was able to adsorb up to 850 mg of cadmium per kilogram of dry cell mass under these conditions. This also means when we want to bind Cd^{2+} with living fungal biomass, heterologous expression of the *pcaA* gene in the fungus may be beneficial, as it can increase the cadmium tolerance of the strain without reducing its biosorption potential.

10. Summary

In the first topic of my dissertation, we were interested in how the defense of the fungus against oxidative stress is affected by iron starvation, which is also characteristic during the growth of fungus in the human body. From transcriptomic and proteomic studies of control (+Fe/-H₂O₂), hydrogen peroxide-treated (+Fe/+H₂O₂), iron-deprived (-Fe/-H₂O₂) and hydrogen peroxide-treated-iron-deprived (-Fe/+H₂O₂) cultures used in our experiments. The following conclusions were drawn from the data obtained:

There is a synergistic interaction between iron starvation and oxidative stress. That is, coping with relatively weak oxidative stress can also be a very serious challenge for iron-starving *A. fumigatus* cultures.

The strength and nature of the stress response to oxidative stress combined with iron starvation also differed from the stress response to both oxidative and iron starvation. Thus, the appearance of many elements of the stress response to the combined treatment could not be predicted from data obtained from simple stress treatments. This also means that if we want to predict the *in vivo* behavior of microbes using data from *in vitro* studies, we need to be careful, because the relatively small (stress) effects that are present in the human body and not taken into account in the *in vitro* system, can significantly change the microbial response.

During iron starvation combined with oxidative stress, the following changes were observed:

In combined cultures, upregulation of DNA repair, heat shock, and oxidative stress response genes coincided with upregulation of genes involved in macroautophagy and ubiquitin-dependent protein degradation. The former suggests that cell defense has been activated to protect cells from ROS-induced

damage. And the latter presumably not only allowed the disposal of damaged proteins, but increased the amount of usable iron by breaking down damaged/excess iron-containing proteins (Richie et al. 2007);

Transcription of genes involved in ribosome formation and translation was reduced during combined treatment, despite the fact that iron starvation alone led to significant downregulation. These changes may have contributed to a further decrease in growth and iron demand;

Although iron-demanding processes were generally downregulated, some genes encoding iron-containing protein as well as genes involved in Fe-S cluster biosynthesis showed significant upregulation. Based on this, a potential therapeutic target may be to inhibit the formation of iron-containing proteins in the future.

The combined stress also affected the transcription of several genes encoding multidrug transporters. It may have affected the sensitivity of the fungus to antifungal agents. Most of these genes are upregulated. Highlighted the *abcB* gene, which plays a role in the development of *A. fumigatus* Cyp51a-independent azole resistance (Fraczek et al. 2013). Based on this, inhibition of efflux systems in drug therapy may be an important target for attack (Cannon et al. 2009; Tegos et al. 2011);

In the second half of my dissertation, we sought to answer the question of why *A. fumigatus* Af293 strain is resistant to cadmium and whether high cadmium tolerance (de Vries et al. 2017) can be related to iron metabolism and thereby affect its virulence *in vivo*. To understand all this, we compared the physiological properties of strains from environmental and medical samples with different cadmium tolerances. Our main findings were:

The cadmium tolerance of the tested *A. fumigatus* strains varied over a wide range ($0.25 \text{ mM} < \text{IC}_{50} < 1 \text{ mM}$), but only the Af293 strain showed an exceptionally high ($\text{IC}_{50} > 2 \text{ mM}$) cadmium tolerance.

The *pcaA* gene was active in all strains and its relative transcription correlated well with cadmium tolerance. Based on this, it is believed that although the presence of the *pcaA* gene in the genome alone is not sufficient for cadmium tolerance, but it provides the potential for high cadmium tolerance if properly expressed.

Although cadmium treatment led to the development of oxidative stress, no positive correlation was found between oxidative stress tolerance and cadmium tolerance in the tested strains. Although protection against oxidative stress may be important in overcoming cadmium toxicity, differences in antioxidant protection did not explain differences in cadmium tolerance between strains.

Oxidative stress was clearly not the result of depletion of GSH stores or loss of activity of the antioxidant enzymes we examined (catalase, SODs, GPx, and GR). Clarification of the background of redox imbalance caused by cadmium treatment requires further investigation.

No correlation was found between cadmium tolerance and tolerance to Cu^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} ions. However, a synergism was observed between the growth inhibitory effects of Cd^{2+} and Cu^{2+} , as well as Cd^{2+} and Zn^{2+} . This may suggest that cadmium may disrupt the metal ion homeostasis of cells, which, according to literature data, may lead to the development of oxidative stress, but may also damage cells alone (Rani et al. 2014; Jacobo-Estrada et al. 2017).

Cadmium tolerance correlated well with Fe^{3+} tolerance and extracellular siderophore production in the strains. In addition, no synergism was observed between the growth inhibitory effects of Cd^{2+} and Fe^{3+} in Af293 strain. Based

on all this, there may be a close relationship between iron metabolism and cadmium tolerance. In addition to intense *pcaA* transcription, intense TAF-C production may also explain the significant cadmium tolerance of the strain. However, it is also conceivable that the removal of Fe^{2+} ions is the primary function of PcaA and can pump Cd^{2+} ions out of cells only because of the similarity of Fe^{2+} and Cd^{2+} ions, similar to the way Fe^{2+} transporters transport Cd^{2+} . The iron - cadmium relationship may also explain the high *in vivo* virulence of the high cadmium tolerant Af293 strain.

Due to its high cadmium tolerance, Af293 strain was able to grow at a concentration of 2 mM Cd^{2+} and was able to adsorb up to 850 mg of cadmium per kilogram of dry cell mass under these conditions. Due to the very significant Cd^{2+} -binding capacity of the fungal cell wall, fungal biomass can be used to reduce the heavy metal content of wastewater (biosorption, bioleaching) and even to economically extract certain heavy metals (Jiang et al. 2018; Boczonádi et al. 2020).

11. Theses

- 1) A synergistic interaction was observed between iron starvation and oxidative stress.
- 2) The combined effect of the two stresses differed in both their strength and nature from the responses to the stress treatments performed separately.
- 3) During oxidative stress combined with iron starvation, we observed the upregulation of iron-independent antioxidant systems, macroautophagy and certain iron-containing proteins, as well as the Fe-S cluster synthesis pathway, and downregulation of growth and formation of many iron-containing proteins.
- 4) As a result of combined treatment, the *abcB* gene encoding the multidrug transporter, which is important in the development of azole resistance, was upregulated.
- 5) The cadmium tolerance of the Af293 *A. fumigatus* strain is remarkably high compared to the other tested strains of *A. fumigatus*.
- 6) The *pcaA* gene was active in all strains and its relative transcription showed a positive correlation with cadmium tolerance.
- 7) Cadmium tolerance also showed a positive correlation with Fe^{3+} tolerance and extracellular siderophore production of the strains.
- 8) No synergism was observed between the growth inhibitory effect of Cd^{2+} and Fe^{3+} in the Af293 strain.
- 9) Based on the above, there is a close connection between cadmium tolerance and iron metabolism.
- 10) Due to its high cadmium adsorption capacity, the Af293 strain can play a significant role in “bioleaching” and “biomining” processes.

12. Acknowledgements

I thank my supervisor, Dr. Tamás Emri, associate professor very much for his professional support of my work, and for his selfless, valuable, professional help. I thank Prof. Dr. István Pócsi, head of the department, who contributed and facilitated my work and made it possible at the Department of Molecular Biotechnology and Microbiology of the Faculty of Science and Technology of the University of Debrecen.

I am also grateful to Dr. Máthéné Dr. Zsuzsa Szigeti (University of Debrecen), Dr. Gábor Szemán-Nagy (University of Debrecen) and Dr. Zoltán Hargitai (Kenézy Gyula Hospital, University of Debrecen) for performing animal experiments, Dr. Sándor Harangi (University of Debrecen) for atomic emission spectrometric measurements, for the assistance of Dr. Károly Antal (Károly Eszterházy University) in statistical analyses. We are grateful to Dr. János Varga (University of Szeged) for providing us with 5 *A. fumigatus* strains (SZMC3100, SZMC3102-4, SZMC3106). Furthermore, to Dr. Olaf Kniemeyer and colleagues (Leibniz Institute for Natural Product Research and Infection Biology - Hans Knoll Institute, Jena, Germany) who provided the opportunity, support and assistance in conducting proteomic studies at the Hans-Knöll Institute in Jena. I would like to highlight Dr. Thomas Krüger, who performed LC-MS/MS measurements.

I would like to thank Beáta Kiss for her reliable work, and laboratory assistant Gáborné Tóth, who helped me to adjust in the laboratories of the Department, as well as each of the workers and PhD students of the Department of Molecular Biotechnology and Microbiology for their reliable help.

Last but not least, I would like to thank my husband and family, who supported, encouraged me during my doctoral work.

My research was realized with the financial contribution of the projects EFOP-3.6.1-16-2016-00022, NKFIH K112181 and K119494, as well as TÁMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0045, DAAD (German Academic Exchange Service - 91529720-50015537), Campus Hungary (B2/1F/7506) and the partial support of the Infect-ERA program (grant FWF I1616 / Infect-ERA AspMetNet project) and the A-M.D. HOROS doctoral program (W1253), which I thank very much.



Registry number: DEENK/365/2020.PL
Subject: PhD Publication List

Candidate: Vivien Kurucz

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

MTMT ID: 10046447

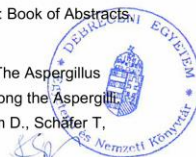
List of publications related to the dissertation

Foreign language scientific articles in international journals (2)

1. **Kurucz, V.**, Krüger, T., Antal, K., Dietl, A. M., Haas, H., Pócsi, I., Kniemeyer, O., Emri, T.:
Additional oxidative stress reroutes the global response of *Aspergillus fumigatus* to iron
depletion.
BMC Genomics. 19, 1-19, 2018. EISSN: 1471-2164.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/s12864-018-4730-x>
IF: 3.501
2. **Kurucz, V.**, Kiss, B., Máthéné Szigeti, Z., Szemán-Nagy, G., Orosz, E., Hargitai, Z., Harangi, S.,
Wiebenga, A., De Vries, R. P., Pócsi, I., Emri, T.: Physiological background of the remarkably
high Cd²⁺ tolerance of the *Aspergillus fumigatus* Af293 strain.
J. Basic Microbiol. 58 (11), 957-967, 2018. ISSN: 0233-111X.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/jobm.201800200>
IF: 1.76

Foreign language abstracts (5)

3. Emri, T., **Kurucz, V.**, Jakab, Á., Antal, K., Dombrádi, V., Kniemeyer, O., Pócsi, I.: Combinatorial
stress responses in Fungi.
Acta Microbiol. Immunol. Hung. Suppl., 128-129, 2019. ISSN: 1217-8950.
4. Emri, T., **Kurucz, V.**, Jakab, Á., Antal, K., Kniemeyer, O., Pócsi, I.: Coping with two stressors
concomitantly.
In: Annals of the International Symposium on Fungal Stress : ISFUS : Book of Abstracts,
Even3, Sao Paulo, 52-53, 2019. ISBN: 9788557222106
5. Pócsi, I., **Kurucz, V.**, Harangi, S., Wiebenga, A., Vries, R. P. d., Emri, T.: The *Aspergillus*
fumigatus Af293 strain has an unusually high cadmium tolerance among the *Aspergillus*
In: 17th Symposium on remediation Abstract Book / Kothe E., Mertem D., Schäfer T,
Friedrich Schiller University, Jéna, 37, 2018.





6. **Kurucz, V.**, Krüger, T., Antal, K., Pócsi, I., Kniemeyer, O., Emri, T.: How does *Aspergillus fumigatus* cope with iron starvation under oxidative stress?
In: 12th Symposium of the VAAM special group Molecular Biology of Fungi : Abstract Book, Georg-August-Universität Göttingen, Göttingen, Németország, 98, 2017.
7. Emri, T., **Kurucz, V.**, Krüger, T., Antal, K., Kniemeyer, O., Pócsi, I.: 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, 2017, (Mikológiai Közlemények-Clusiana ; 56/1.)

Total IF of journals (all publications): 5,261

Total IF of journals (publications related to the dissertation): 5,261

The Candidate's publication data submitted to the iDEa Tudóstér have been validated by DEENK on the basis of the Journal Citation Report (Impact Factor) database.

01 December, 2020



13. Hivatkozások/References

- Amich, J., 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, ME. 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).
- Baldin, C., V. Valiante, T. Krüger, 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>.
- Banakar, R., 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>.
- Barratt, R. W., G. B. Johnson, W. N. Ogata. 1965. „Wild-Type and Mutant Stocks of *Aspergillus nidulans*”. *Genetics* 52 (1): 233–46.
- Boczonádi, I., Zs. Török, Á. Jakab, G. Kónya, K. Gyurcsó, E. Baranyai, Z. Szoboszlai, és mtsai. 2020. „Increased Cd²⁺ Biosorption Capability of *Aspergillus Nidulans* Elicited by CrpA Deletion”. *Journal of Basic Microbiology* 60 (7): 574–84. <https://doi.org/10.1002/jobm.202000112>.

Bradford, MM. 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, NA., 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>.

Cannon, RD., 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>.

Cerqueira, GC., 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, S., 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>.

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.

Cuyper, A., M. Plusquin, T. Remans, M. Jozefczak, E. Keunen, H. Gielen, K. Opdenakker, 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>.

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>.

Dlouhy, Adrienne C., Caryn E. 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.

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., 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.

Fraczek, MG., 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>.

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>.

Godt, J., 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>.

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>.

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>.

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>.

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>.

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>.

Johnson, DB. 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>.

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>.

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., B. Kiss, Zs. M. Szigeti, G. Szemán-Nagy, E. Orosz, Z. Hargitai, S. Harangi, és mtsai. 2018. „Physiological Background of the Remarkably High Cd²⁺ Tolerance of the *Aspergillus Fumigatus* Af293 Strain”. *Journal of Basic Microbiology* 58 (11): 957–67. <https://doi.org/10.1002/jobm.201800200>.

Machuca, A., AMF. 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>.

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).

Palicz, Z., T., 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>.

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>.

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>.

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>.

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>.

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>.

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 H₂O₂ in Cultured

Endothelial Cells”. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 302 (2): 348–55. <https://doi.org/10.1006/abbi.1993.1222>.

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).

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>.

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. Bologa, 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>.

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>.

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>.

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/s13059-017-11510>.

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>.

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>.