



1949

**A GLICERIN-3-FOSZFÁT DEHIDROGENÁZ (*gfdB*) GÉN
FUNKCIÓJÁNAK VIZSGÁLATA AZ *ASPERGILLUS NIDULANS*
FONALAS GOMBÁBAN**

Egyetemi doktori (PhD) értekezés

GONDA-KIRÁLY ANITA

Témavezető

Prof. Dr. Pócsi István

Tanszékvezető egyetemi tanár

DEBRECENI EGYETEM

Természettudományi és Informatikai Doktori Tanács

Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola

Debrecen, 2020

A doktori értekezés betétlapja

Ezen értekezést a Debreceni Egyetem Természettudományi és Informatikai Doktori Tanács Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola Biológia doktori programja keretében készítettem a Debreceni Egyetem természettudományi doktori (PhD) fokozatának elnyerése céljából.

Nyilatkozom arról, hogy a tézisekben leírt eredmények nem képezik más PhD disszertáció részét.

Debrecen, 2020.

.....
Gonda-Király Anita

Tanúsítom, hogy Gonda-Király Anita doktorjelölt 2014-2017 között a fent megnevezett Doktori Iskola Biológia doktori programjának keretében irányításommal végezte munkáját. Az értekezésben foglalt eredményekhez a jelölt önálló alkotó tevékenységével meghatározóan hozzájárult. Nyilatkozom továbbá arról, hogy a tézisekben leírt eredmények nem képezik más PhD disszertáció részét.

Az értekezés elfogadását javaslom.

Debrecen, 2020.

.....
Prof. Dr. Pócsi István

**A GLICERIN-3-FOSZFÁT DEHIDROGENÁZ (*gfdB*) GÉN
FUNKCIÓJÁNAK VIZSGÁLATA AZ *ASPERGILLUS NIDULANS*
FONALAS GOMBÁBAN**

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

Írta: Gonda-Király Anita okleveles biológus

Készült a Debreceni Egyetem Juhász-Nagy Pál Doktori Iskolája
(Biológia Doktori Program) keretében

Témavezető: Prof. Dr. Pócsi István

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Vasas Gábor

tagok: Gálné Dr. Miklós Ida

Dr. Papp Tamás

.....

.....

.....

A doktori szigorlat időpontja: 2018. szeptember 18.

Az értekezés bírálói:

.....

.....

.....

.....

A bírálóbizottság:

elnök:

tagok:

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

Az értekezés védésének időpontja: 2020.

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés.....	1
2. Irodalmi áttekintés.....	6
2.1 Az <i>Aspergillus</i> nemzetség.....	6
2.2 A különböző mikrobák ozmoadaptációja.....	7
2.3 A HOG útvonal legfontosabb szabályozó elemei élesztőkben és az <i>A. nidulans</i> fonalas gombában.....	10
2.4 A poliolk bioszintézise és jelentősége.....	16
2.5 A felhasznált stresszorok biológiai hatásai	22
3. Eredmények.....	25
3.1 A vizsgált <i>Aspergillus</i> gombatörzsek genotípusának ellenőrzése.....	25
3.1.1 Az <i>A. nidulans gfdB</i> gén deléciójának ellenőrzése.....	25
3.1.2 A <i>gfdB</i> gén kópiaszámának meghatározása az <i>A. glaucus</i> transzgén törzsekben.....	26
3.1.3 A <i>gfdB</i> gén expresziójának vizsgálata az <i>A. glaucus</i> transzgén törzseiben	26
3.2 Stresszérzékenység vizsgálatok.....	28
3.2.1 Az <i>A. nidulans gfdB</i> gendeléciós mutánsok stresszérzékenység vizsgálata.....	28
3.2.2 Az <i>A. glaucus gfdB</i> transzgén törzsek stresszérzékenységének vizsgálata.....	32
3.3 Az <i>A. nidulans</i> THS30.3 és a $\Delta gfdB$ törzs RS tartalmának, néhány antioxidáns enzim aktivitásának és mikotoxin termelésének a vizsgálata	34
3.4 A THS30.3 és a $\Delta gfdB$ törzs poliolk tartalmának vizsgálata	36
3.5. A sejtek életképességének és az apoptotikus sejthalálnak a vizsgálata	36
4. Eredmények megbeszélése.....	40
5. Anyagok és módszerek.....	49
5.1 A vizsgálatainkhoz felhasznált törzsek és a mutánsok elkészítése	49
5.1.1 Az <i>A. nidulans gfdB</i> gendeléciós mutánsok elkészítése a Double-Joint PCR módszerrel.....	50
5.1.2 Az <i>A. glaucus gfdB</i> transzgén törzsek elkészítése <i>Agrobacterium</i> -indukált transzformálással	51
5.2 A vizsgált <i>Aspergillus</i> gombatörzsek tenyésztése.....	52

5.2.1 Felületi tenyészetek	52
5.2.2 Ráztatott tenyészetek	53
5.2.3 Alkalmazott táptalajok	53
5.3 A vizsgált <i>Aspergillus</i> gombatörzsek genotípusának ellenőrzése	55
5.3.1 Southern blot hibridizáció	55
5.3.2 Kópiaszám meghatározás	56
5.4 A vizsgált <i>Aspergillus</i> gombatörzsekkel végzett stresszkísérletek	58
5.5 Az <i>A. nidulans</i> THS30.3 és $\Delta gfdB$ törzs életképességének és a sejtek apoptózisának a vizsgálata	59
5.6 Az <i>A. nidulans</i> THS30.3 és $\Delta gfdB$ törzs poliol tartalmának a vizsgálata	60
5.7 Az <i>A. nidulans</i> THS30.3 és $\Delta gfdB$ törzs RS tartalmának, antioxidáns enzimtermelésének és mikotoxin termelésének a vizsgálata	61
5.8 Transzkripciós vizsgálatok	63
5.8.1 RNS izolálás <i>A. glaucus</i> ból	63
5.8.2 Génexpresszió vizsgálata RT-qPCR módszerrel	64
5.9 Statisztikai vizsgálatok	65
5.10 Felhasznált vegyszerek	65
6. Összefoglalás	66
7. Summary	70
8. Irodalomjegyzék	74
9. Köszönetnyilvánítás	89
10. Tudományos közlemények jegyzéke	91
11. Függelék	93

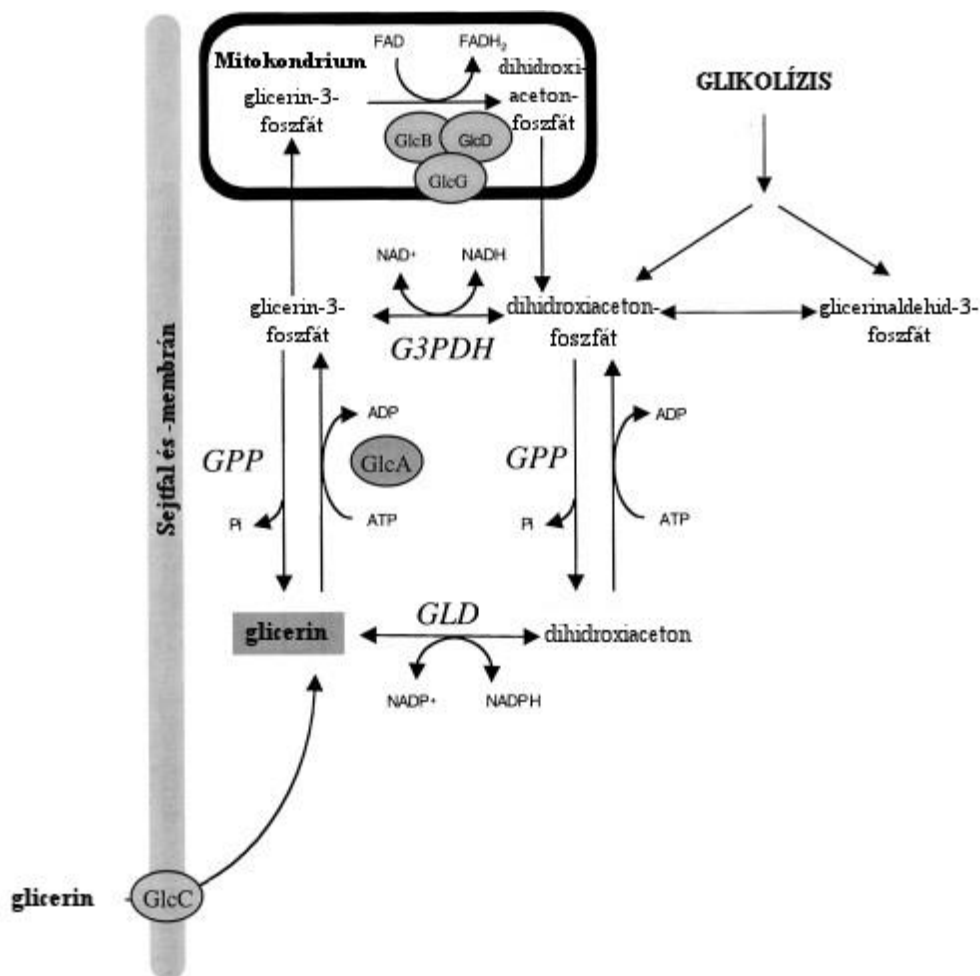
Rövidítések jegyzéke

AMM	minimál táptalaj („ <i>Aspergillus</i> Minimal Medium”)
a_w	vízaktivitás
CESR	központi környezeti stresszválasz („core environmental stress response”)
DCF	2',7'-diklórfluoreszcein
DCM	szárastömeg („dry cell mass”)
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav
GPx	glutation peroxidáz
GR	glutation reduktáz
GSSG	glutation-diszulfid (oxidált forma)
GSH	glutation (redukált forma)
HOG útvonal	magas ozmolaritás ellen fellépő glicerines válasz („High-Osmolarity Glycerol pathway”)
HPLC	nagy teljesítményű folyadékkromatográfia („High Performance Liquid Chromatography”)
IM	indukciós táptalaj („Induction Medium”)
MAPK	mitogén aktivált protein kináz
MES	2-morfolino-etán-szulfonsav-monohidrát
MOPS	3-(N-morfolino)-propánszulfonsav
MSB	menadion-nátrium-bisulfít („menadione sodium bisulfite”)
NSS	nitrátos sóoldat („nitrate salt solution”)
RS	szabad gyökök és reaktív oxigén gyökök
RT-qPCR	reverz transzkripció kapcsolt polimeráz láncreakció
SDS	nátrium-dodecil-szulfát
SOD	szuperoxid dizmutáz
<i>t</i> BOOH	<i>tercier</i> -butil-hidroperoxid
TRIsol	RNS izolálásra kifejlesztett reagens

A disszertációban a gének és fehérje termékek elnevezése a natív nomenklatúrának felel meg.

1. Bevezetés

A glicerín egy olyan szerves vegyület, amely mindenhol jelen van a természetben. Ez a molekula az alapja például a foszfolipideknek és a triglicerideknek, melyek a sejtmembránok, illetve a lipidek gyakori összetevői (Mattam és mtsai., 2013). A *Saccharomyces cerevisiae* élesztőben anaerob körülmények között a szénforrások körülbelül 5 %-a alakul glicerinné (Oura, 1977). A szerves savak (borostyánkősav, ecetsav, piroszőlősav) képződésekor a NAD^+ NADH-vá redukálódik (Oura, 1977; Vandijken és Scheffers, 1986; Nissen és mtsai., 1997), a glicerín termelődése révén pedig a NADH NAD^+ -dá oxidálódik vissza. Aerob körülmények között a glicerín nagy glükóz koncentráció mellett szintetizálódik, ugyanis ilyenkor a légzési kapacitás csökkenésével a bioszintézis reakciókban keletkezett NADH többlet oxidálása is visszaesik. Ezek alapján elmondható, hogy a glicerinképzésnek fontos szerepe van a sejtekben a NAD^+ koncentráció stabilizálásában úgy, hogy a dihidroxiaceton-foszfát glicerinné történő átalakulása révén a NADH citoszolikus NAD^+ -dá regenerálódik (**1. ábra**), ezáltal biztosítja a celluláris redox egyensúly fenntartását stresszmentes körülmények között (Ansell és mtsai., 1997; Bakker és mtsai., 2001; Klein és mtsai., 2017). Másrészt, a glicerín a sejtekben főként ozmotikus stressz hatására szintetizálódik és akkumulálódik, ezáltal jelentős szerepe van az ozmoregulációban (Pahlman és mtsai., 2001).



1. ábra A glicerín bioszintézise és lebontása az *Aspergillus nidulans* fonalas gombában (Fillinger és mtsai., 2001)

A glicerín szintézis útvonala hasonló a fonalas gomba modellorganizmus *Aspergillus nidulans*ban is, mint a *S. cerevisiae* élesztőben (Arst és mtsai., 1990; Norbeck és mtsai., 1996; Fillinger és mtsai., 2001). A glicerín két úton szintetizálódhat ebben a gombafajban: egyfelől a glicerín-3-foszfát dehidrogenáz enzimen keresztül, amely a dihidroxiaceton-foszfátot alakítja glicerín-3-foszfáttá, és ezután alakul tovább glicerinné, másfelől pedig a

dihidroxiaceton-foszfátból először dihidroxiaceton, majd végül glicerin keletkezik (**1. ábra**) (Fillinger és mtsai., 2001).

A *S. cerevisiae*-ben két paralóg glicerín-3-foszfát dehidrogenáz gén található; a *GPD1* és a *GPD2* gének. A *GPD1* gén részt vesz az ozmoadaptációban és expresszióját az ozmotikus stressz indukálja (André és mtsai., 1991). A *GPD2* gén transzkripciójára nincs hatással az extracelluláris ozmolaritás, és indukciója független a HOG útvonaltól, amely a *GPD1* ozmotikus indukcióját szabályozza. A *GPD2* gén deléciója anaerob körülmények között rendellenes növekedést eredményezett, míg a $\Delta gpd1\Delta gpd2$ mutáns nem termelt glicerint, jelentős ozmoszenzitivitást mutatott és nem volt képes anaerob körülmények között növekedni (Ansell és mtsai., 1997). Az *A. nidulans* gombában szintén két paralóg glicerín-3-foszfát dehidrogenáz gén található, a *gfdA* (*GPD1* ortológ) és *gfdB* (*GPD2* ortológ) gének (Miskei és mtsai., 2009; de Vries és mtsai., 2017).

A Debreceni Egyetem Molekuláris Biotechnológiai és Mikrobiológiai Tanszékén 17 *Aspergillus* faj (18 törzs) oxidatív stressztoleranciájának a tanulmányozása folyt. A Tanszékünkön végzett stresszkísérletek eredményeit a Fungal Stress Database adatbázisba (www.fung-stress.org) gyűjtötték össze Orosz és munkatársai (2018). Az elvégzett stresszkísérletek alapján jelentős ozmofilitást mutattak az *A. glaucus* és az *A. wentii* *Aspergillus* fajok 2 M szorbit mellett (de Vries és mtsai., 2017; Orosz és mtsai., 2018). Ezzel párhuzamosan a Debreceni Egyetem, Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet munkatársa, Dr. Miskei Márton összehasonlító genomikai elemzést végzett az *Aspergillus* fajokkal, mely alapján kiderült, hogy az *A. glaucus* és *A. wentii* fonalas gombák genomjában csak az *A. nidulans gfdA* génjének az ortológja található meg (de Vries és mtsai., 2017). Az *A. nidulans gfdA* géndeléciós mutánsát Fillinger és munkatársai (2001) készítették el és jellemezték. Megváltozott a mutáns törzs hifamorfológiája és a növekedése is

gyengült különböző szénforrásokon, kivéve glicerinen. Ugyanakkor ezen defektes növekedés az összes szénforráson helyreállítható volt 1 M NaCl jelenlétében, mely ozmotikus stabilizátorként funkcionál a *ΔgfdA* törzs esetében. Továbbá, érzékenynek bizonyult a sejtfalintegritás-stresszt okozó kalkofluor fehérre és a nátrium-dodecil-szulfátra. Ezenfelül Balázs és munkatársai megvizsgálták a *gfd* gének expresszióját oxidatív stresszorok (*tBOOH*, H_2O_2) és ozmotikus stresszt generáló ágens (NaCl) jelenlétében. Oxidatív stresszre egyik gén sem reagált, viszont NaCl expozícióra a *gfdB* gén up-regulálódott, a *gfdA* viszont nem (Balázs és mtsai., 2010).

Ezek alapján azt a hipotézist állítottuk fel, hogy az *A. glaucus* és az *A. wentii* gombafajok ozmofilitása a *gfdB* ortológok hiányával magyarázható. Doktori munkámban a *gfdB* (glicerin-3-foszfát dehidrogenáz B) gén funkciójának a feltárásában vettem részt különböző *Aspergillus* fajokban.

Munkám kezdetekor az alábbi célkitűzéseket fogalmaztuk meg:

- Fő célunk a *gfdB* gén deléciós mutánsának a létrehozása és fiziológiai jellemzése az *A. nidulans* modellorganizmusban, a Double-Joint PCR módszer segítségével.
- Keressük a választ arra a felvetésre, hogy a *gfdB* gén vajon ugyanolyan funkciót lát-e el, mint a *gfdA*; így az ozmotikus védelmi rendszerben van szerepe vagy más folyamatokban?
- Tanulmányozzuk az elkészült *ΔgfdB* mutánsok stresszérzékenységét és megfigyeljük a szabad gyökök és reaktív oxigén gyökök termelődését, az antioxidáns enzimtermelést, a toxintermelést, továbbá a törzsek micéliumából poliol tartalmat mérünk, és a sejtek apoptózisát, illetve életképességének változását is megvizsgáljuk oxidatív stresszor (*tBOOH*) jelenlétében és stresszmentes körülmények között is.

- További célunk az *A. nidulans gfdB* gén beépítése az *A. glaucus* ozmofil faj genomjába, az *Agrobacterium*-indukált transzformálási módszerrel.
- Választ keresünk arra a kérdésre, hogy vajon a *gfdB* gén hozzáadásával megszüntethető-e az *A. glaucus* ozmofilitása?
- Szeretnénk megvizsgálni, hogy hogyan változik a sikeresen előállított *A. glaucus* transzgén törzsek fenotípusa a különböző stresszt generáló szerek jelenlétében 2 M szorbittal, illetve 1 M NaCl-dal kiegészített táptalajon.

2. Irodalmi áttekintés

2.1 Az *Aspergillus* nemzetség

Az *Aspergillus* nemzetség az Ascomycota törzsön belül az Eurotiomycetes osztály Eurotiales rendjébe és Trichocomaceae családjába tartozik. 1729-ben írta le először egy olasz botanikus, Pier Antonio Micheli az *Aspergillus* nemzetséget. Az *Aspergillus* nemzetség gazdaságilag nagy jelentőséggel bír és több mint 300 ismert faj tartozik ide (Samson és mtsai., 2014). Ezek a fajok azon gombák közé tartoznak, amelyek a leggyakrabban fordulnak elő az ember környezetében. Megtalálhatók a talajban, takarmánynövényeken, különböző élelmiszeripari termékeken, a porban, vagy akár a bomló szerves anyagokban is. Számos olyan fajuk létezik – köztük patogén fajok is – amelyek nem igényelnek speciális tenyésztési körülményeket, a növekedésükhöz minimálisan szükséges anyagok mellett is képesek életben maradni. Számos szerves komponens (pl.: cukrok, zsírsavak, fehérjék, cellulóz) lebontásában játszanak szerepet (Fogarty, 1994).

Az *Aspergillus* nemzetség sok faja iparilag kiemelkedő jelentősége miatt kutatott. Az *A. oryzae* és az *A. niger* a celluláz, amiláz, proteáz, lipáz és pektináz enzim termelésük teszi a leginkább vizsgált fajokká a nemzetségen belül (Fogarty, 1994; Geiser és LoBuglio, 2001). Az *A. niger* glükuronsav és citromsav termelése miatt jelentős ipari faj. Az *A. oryzae*, az *A. soyae* és az *A. tamari* gombákat már mintegy 2000 éve használják élelmiszeripari folyamatokban (Fogarty, 1994; Geiser és LoBuglio, 2001).

Az *A. nidulans* a molekuláris biológiai kutatásokban széles körben alkalmazott modellorganizmus. Közeli rokon faja az ipari szempontból kiemelkedő jelentőségű *A. niger* és *A. oryzae* fajoknak, illetve az egészségügyi szempontból fontos humán patogén *A. fumigatus*nak.

Laboratóriumi körülmények között könnyen tenyésztethető szilárd vagy folyékony tápközegben, emellett ivaros, ivartalan és paraszexuális életciklussal is rendelkezik (Pontecorvo és mtsai., 1953).

Az *A. nidulans* penicillin bioszintézis útvonala hasonló a *Penicillium chrysogenum* fonalas gombáéhoz, illetve az *A. flavus* és az *A. parasiticus* aflatoxin bioszintézis útvonalának legtöbb lépése is fellelhető az *A. nidulans*-ban (Brakhage és mtsai., 2004; Bok és mtsai., 2006). Ebben a fajban az aflatoxin bioszintézis útvonal végterméke a szterigmatocisztin, melynek a szerkezete hasonló az aflatoxin B₁-éhez, amely egy veszélyes karcinogén vegyület, ez alapján az *A. nidulans* fontos modellorganizmus ezeknek a szekunder metabolit útvonalaknak és szabályozásuknak a kutatásában (Barnes és mtsai., 1994).

Mára már a teljes genomsekvenciája ismert; elsőként az *A. fumigatus*, az *A. oryzae* és az *A. nidulans* genomsekvenciái váltak elérhetővé 2005-ben (Galagan és mtsai., 2005; Machida és mtsai., 2005; Nierman és mtsai., 2005). Wortman és munkatársai 8 ismert *Aspergillus* faj (*A. nidulans*, *A. flavus*, *A. terreus*, *A. oryzae*, *A. clavatus*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *Neosartorya fischeri*) genomjának az annotációját végezték el (Wortman és mtsai., 2009). Ezek mellett egy nemzetközi konzorcium keretében 10 *Aspergillus* faj genomját szekvenálták meg és annotálták (de Vries és mtsai., 2017). Továbbá jelentős mértékben előrehaladott a teljes *Aspergillus* nemzetség összehasonlító genomikai analízise (Vesth és mtsai., 2018; Kjærboelling és mtsai., 2019, 2020).

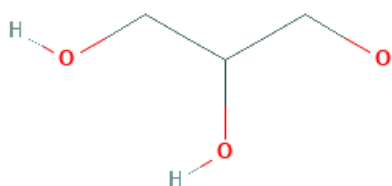
2.2 A különböző mikrobák ozmoadaptációja

Mindössze néhány olyan faj létezik, amely nagy ozmotikus nyomás mellett képes szaporodni, sőt ezt igénylik is. Ezeket a hipertóniás közegben kiválóan növekvő és szaporodó élesztő és penészgomba fajokat ozmofileknek

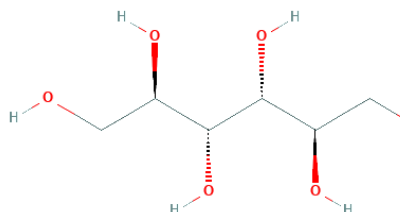
nevezzük. Az ozmofilek növekedésükhöz nagy koncentrációjú ozmolitokat, pl. cukoroldatokat igényelnek és 0,85 vízaktivitás (a_w) érték mellett vagy alatt növekednek optimálisan (Ventosa és mtsai., 1998). Továbbá, olyan fiziológiai mechanizmusokat fejlesztettek ki, amelyek lehetővé teszik, hogy a biokémiai és élettani folyamataik nagy ozmotikus nyomású körülmények között is normálisan működjenek. Ilyen mikroba például a *Xeromyces bisporus*, amely előfordul mézben, szirupokban és szárított gyümölcsökben (Hocking, 1993). A halofil kifejezést a baktériumoknak egy olyan csoportjára alkalmazzák, amelyek nagy koncentrációjú sóoldatokban szaporodnak. (Anand és Brown, 1968). Halofil fajok például a *Polypaecilum pisce* vagy a *Basipetospora halophila* (Hocking, 1993).

A különböző mikrobák csoportjai eltérő stratégiákat alkalmaznak a túlélés és a csökkent vízaktivitás melletti növekedés fenntartása érdekében, de mindegyik stratégia egy közös elven alapszik. Ez pedig bizonyos ozmolitok intracelluláris akkumulációja, amely fenntartja az egyensúlyt a sejten belüli a_w és a külső a_w között, így megakadályozva a víz kiáramlását a sejtből. Ezeknek az oldott anyagoknak nagy koncentrációban kell akkumulálódniuk kis a_w értéknél, de nem gátolhatják a sejtek normális funkcióit. Brown és Simpson ezeket a vegyületeket „kompatibilis oldott anyagok”-ként („compatible solutes”) írták le (Brown és Simpson, 1972).

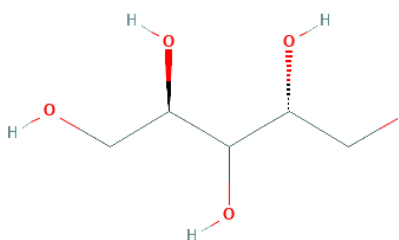
A gombákban a fő kompatibilis oldott anyagok általában polioloak, ezen belül pedig a glicerin, a mannit, az arabit és az eritrit (**2. ábra**), amelyeket a belső ozmotikus egyensúly fenntartása érdekében termelnek (Breuer és Harms, 2006). Ezek az anyagok a sejtek normál működését, így például az enzimek aktivitását nem befolyásolják még nagyobb koncentrációban sem (Yancey és mtsai., 1982).



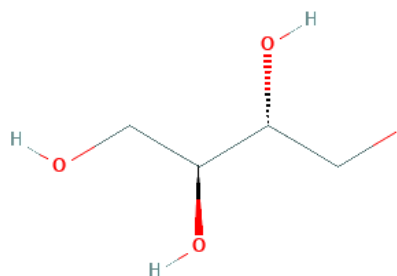
glicerín



D-mannit



D-arabit



eritrit

2. ábra A gombákban leggyakrabban előforduló poliolok szerkezeti képlete (forrás: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)

Megfigyelték, hogy az ozmotoleráns, halotoleráns, valamint xerotoleráns *Debaryomyces hansenii* élesztőben a tápközeg sótartalmának a növekedésével egyidejűleg glicerín akkumulálódik a sejtekben. A glicerín a növekedési fázisban, az arabit pedig a stacioner fázisban termelődik a *D. hansenii* sejtekben (Nobre és Costa, 1985). Larsson és Gustafsson ezek alapján megállapították, hogy ez az élesztő képes szabályozni a poliol metabolizmusát a növekedés optimalizálása érdekében (Larsson és Gustafsson, 1987). Ezenfelül a *D. hansenii* képes kizárni a nátriumiont és akkumulálni a káliumiont, úgy, hogy a belső $K^+ : Na^+$ arány sokkal nagyobb legyen, mint a tápközegé. Ebben a fajban egy P típusú H^+ -ATPáz – amely hasonló a *S. cerevisiae* PMA1 génje által kódolt ATPázhoz – energiával tölti fel a plazmamembránt, így transzmembrán potenciált és pH gradienst hoz létre, ez

a membránpotenciál pedig a Na^+ vagy a K^+ felvételének a hajtóereje egy vagy több uniporterén keresztül (Serrano, 1980; Breuer és Harms, 2006). A Na^+ egy másik, P-típusú ATPázon keresztül pumpálható ki, amely hasonló az *ENA1* gén által kódolt *S. cerevisiae* ATP-ázhoz (Almagro és mtsai., 2001). Továbbá létezik a *D. hansenii*-ben egy a *S. cerevisiae* *NHA1* génje által kódolt transzporterhez hasonló kation/ H^+ antiporter (Bañuelos és mtsai., 1998; Thomé-Ortiz és mtsai., 1998; Rodríguez-Navarro, 2000).

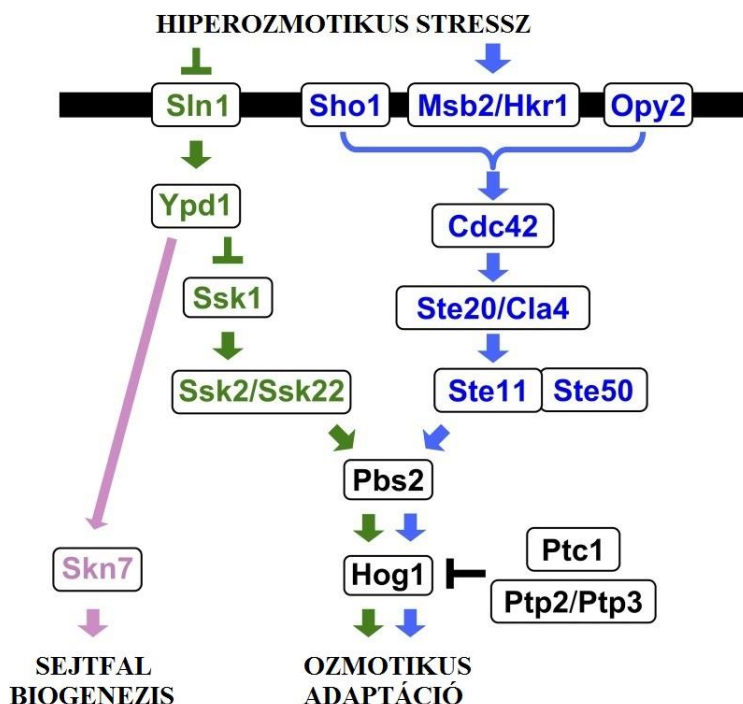
A nagy só és/vagy cukor koncentrációjú oldatokat kedvelő *Zygosaccharomyces rouxii* élesztő két plazmamembrán szimporterén (Stl1, Stl2) keresztül veszi fel a glicerint. Így járul hozzá a sejtek hiper- és hipoozmotikus stressz toleranciájához és az intracelluláris pH homeosztázis fenntartásához stresszmentes körülmények között (Dušková és mtsai., 2015).

A fonalas gombák esetében is nagy szerepe van a glicerinnek az a_w egyensúly fenntartásában, például néhány *Penicillium* faj, *Aspergillus* faj, vagy a *X. bisporus*, továbbá a *Wallemia sebi* esetében is. A glicerin a növekedés korai szakaszában akkumulálódik, viszont a későbbi szakaszokban elhasználódik, például a konídiumtermelés alatt, különösen akkor, ha a tenyészeteket korlátozott energiaforrás mellett, magas sótartalmú táptalajon tenyésztik (Hocking, 1993).

2.3 A HOG útvonal legfontosabb szabályozó elemei élesztőkben és az *A. nidulans* fonalas gombában

A HOG útvonal („High Osmolarity Glycerol Pathway”) egy élesztőkben jól ismert szignalizációs MAPK (mitogén aktivált protein kináz) útvonal, amely különböző stressz szignálokat továbbít. A *S. cerevisiae*-ben a Hog1 MAPK központi szerepet játszik ebben a jelátviteli rendszerben, ahol két útvonalon keresztül aktiválódhat: az Sln1 ozmoszenzor gátlása és/vagy a Sho1 ozmoszenzor aktiválása révén (**3. ábra**) (Saito és Posas, 2012).

Az Sln1 egy transzmembrán hisztidin kináz, amely normál körülmények között aktív, viszont a megnövekedett ozmotikus nyomás hatására inaktiválódik (Maeda és mtsai., 1994; Fassler és West, 2010). Ekkor aktiválódnak az Ssk2 és az Ssk22 MAPKKK-ok és ennek eredményeként aktiválódik a Pbs2 is (Maeda és mtsai., 1995; Saito és Posas, 2012). Végül az aktivált Pbs2 foszforilálja a Hog1-et (Tatebayashi és mtsai., 2003). Az ozmotikus nyomás csökkenésének hatására az Sln1 aktivál hisztidin tartalmú foszfortranszfer fehérjét, az Ypd1-et, amely foszforilálja az Ssk1 és az Skn7 fehérjék aszpartát fogadó doménjét, így aktiválódik az Skn7 és inaktiválódik az Ssk1. Ennek eredményeként hipoozmotikus stressz hatására az Skn7 aktiválódik, míg hiperozmotikus körülmények között az Ssk1 (Saito és Posas, 2012). Az Skn7 oxidatív stresszválasz elemeket is indukál, viszont ez a folyamat független az Sln1 általi foszforilációjától (Morgan és mtsai., 1997; He és mtsai., 2009, 7).



3. ábra A *S. cerevisiae* HOG útvonal (Saito és Posas, 2012)

A másik szignalizációs útvonal, amelyen keresztül aktiválódhat a Hog1, az a HOG útvonal Sho1 ága. A Sho1 egy ozmoszenzor transzmembrán fehérje foszforilálja a Ste11 MAPKKK-t, amely szintén aktiválja a Pbs2-t és így aktiválódik a Hog1 (Posas és Saito, 1997).

A Hog1 stresszmentes körülmények között a citoplazmában található, viszont ozmotikus stressz hatására foszforilálódik, majd a sejtmagba jut, mely folyamathoz a Gsp1 kis GTP-kötő fehérje, illetve az Nmd5 (importin- β homológ) szükségesek (Ferrigno és mtsai., 1998). A Hog1 szerepe a hiperozmotikus stressz szabályozásában többértű; hiszen a citoplazmában és a sejtmagban is bekövetkező változásokat indukál. A citoplazmában szabályozza az ion fluxust, a glicerint transzportot és a metabolikus enzimeket,

ezenfelül koordinálja a fehérje transzlációt is. A sejtmagban szabályozza a sejtciklus progressziót, valamint a génexpressziót is.

A következő elemek állnak Hog1 szabályozás alatt:

- A Pfk2 (6-foszfofrukto-2-kináz), amely szabályozza a glikolízis kulcsaktivátorának, a fruktóz-2,6-biszfoszfátnak a szintjét (Dihazi és mtsai., 2004).
- Az Fps1 glicerincsatorna transzport kapacitását és fehérje stabilitását befolyásolja (Thorsen és mtsai., 2006; Mollapour és Piper, 2007; Beese és mtsai., 2009).
- A Tok1 K^+ -csatorna és az Nha1 Na^+/H^+ -antiport membránfehérjék foszforilációját indukálja (Proft és Struhl, 2004). Ozmotikus stressz hatására a passzív vízkiáramlás miatt a sejtekben nő az intracelluláris Na^+ koncentráció, amely a kromatinfehérjék disszociációját idézi elő. Az Nha1 és a Tok1 is részt vesznek az intracelluláris ionkoncentráció stabilizálásában (Saito és Posas, 2012).
- Az mRNS biogenezis elemeit is szabályozza, például a transzkripció iniciációs vagy elongációs komplexeket; a Hog1 az RSC kromatin átformáló komplexhez kapcsolódik ozmotikus stressz alatt, és ez a komplex úgy alakítja át a nukleoszómát, hogy a DNS hozzáférhető legyen a transzkripciós faktorok számára (Mas és mtsai., 2009). Továbbá a Hog1 transzlációra gyakorolt hatását az Rck2 kináz közvetíti, mely befolyásolhatja a transzlációt, úgy, hogy közvetlenül szabályozza az EF-2 elongációs faktort, de az sincsen kizárva, hogy az iniciációs faktorokra is van hatása (Teige és mtsai., 2001).
- Transzkripciós faktorokat szabályoz, ilyenek például a Hot1, az Smp1, az Msn1, az Msn2, az Msn4 aktivátorok, valamint a Sho1 represszor (de Nadal és Posas, 2007).
- A sejtciklus szabályozásában részt vevő Cln és a Clb ciklinek transzkripcióját gátolja, valamint a Sic1 ciklin-dependens kináz inhibitort foszforilálja, ezáltal

stabilizálja az ubiquitináció és degradáció elkerülése végett. Ezen folyamat eredményeképpen a sejtciklus G₁ fázisából az S fázisba való átlépés késleltetődik (Escoté és mtsai., 2004; Clotet és Posas, 2007; Zapater és mtsai., 2007; Adrover és mtsai., 2011).

A *Schizosaccharomyces pombe* hasadó élesztőben a Hog1 funkcionális ortológ a Sty1/Spc1 MAPK, amelyet a hiperozmotikus stressz aktivál (Gasch, 2007), és amely az Atf1 aktiválódásán keresztül indukálja a stresszválasz géneket (Shiozaki és Russell, 1995; Gasch, 2007). Miskei és munkatársai (2009) azonosították az ozmotikus és oxidatív stresszválaszban közreműködő HOG MAPK szignalizációs útvonal tagjait *Aspergillus* fajokban:

A *S. pombe* Atf1 ortológ *A. nidulans*ban az AtfA, amelynek a legfőbb szerepe az ozmotikus és oxidatív stresszválasz gének szabályozása (Balázs és mtsai., 2010).

A Sty1 ortológja *A. nidulans*ban a HogA (SakA), mely az Ssk1 ortológ, az SskA ozmotikus (Han és Prade, 2002; Furukawa és mtsai., 2005), illetve oxidatív (Kawasaki és mtsai., 2002; Hagiwara és mtsai., 2007) stresszre aktiválódik. A *sakA* nullmutáns ozmotikus stresszre nem mutatott jelentős érzékenységet, ami azt jelzi, hogy az *A. nidulans* ozmoregulációja jelentősen különbözik a *S. cerevisiae* élesztőtől. Jaimes-Arroyo és munkatársai leírták, hogy *A. nidulans*ban a SakA az SrkA-val együtt az oxidatív és az általános stresszválasz egy olyan jelátviteli útvonalának részét képezik, amely szerepet játszik a sejtciklus szabályozásában, a DNS-károsodási válaszreakcióban, az mRNS és fehérje szintézisének a stabilitásában, valamint az energia metabolismus és a mitokondriális funkciók szabályozásában (Jaimes-Arroyo és mtsai., 2015). Az *A. nidulans*ban található egy másik Hog1 ortológ is, az MpkC, amely nincs jelen élesztőkben. A SakA és az MpkC az *A. nidulans*ban szabályozzák a sejtfalintegritást, a konídiumok oxidatívstressz-rezisztenciáját, valamint az aszexuális fejlődést. Továbbá megfigyelték, hogy az oxidatív és

az ozmotikus stressz növeli az MpkC sejtmagi akkumulációját mind a konídiumokban, mind a hifákban. Az MpkC és a SakA foszforilációjához szükség van a PbsB MAPKK-ra, amely a SakA-val együtt szabályozza a spórák életképességét (Garrido-Bazán és mtsai., 2018).

Az *A. nidulans* SrrA válaszregulátor fehérje (a *S. cerevisiae* Skn7 ortológja) részt vesz mind az ozmotikus, mind az oxidatív stressz rezisztenciában. Az SrrA ortológ hasadó élesztőben a Prr1 fehérje (Hagiwara és mtsai., 2007; Vargas-Pérez és mtsai., 2007).

A *S. cerevisiae* Yap1 ortológ az *A. nidulans* NapA bZIP-típusú transzkripciós faktor, valamint a *S. Pombe* Pap1, amely az Atf1 transzkripciós faktoralal együtt oxidatív stresszválasz gének (*gpx1*, *ctt1*) indukálódásáért felelősek (Yamada és mtsai., 1999; Nakagawa és mtsai., 2000). A *S. pombe* hasadó élesztőben a Sty1 protein kináz az Atf1 transzkripciós faktoralal irányítja a gomba központi környezeti stresszválaszát (CESR – „core environmental stress response”) (Chen és mtsai., 2003).

Az Sln1 ortológ a TcsB hisztidin kináz az *A. nidulans*ban, melynek a géndeléciós mutánsa nem volt érzékeny ozmotikus stresszre (Furukawa és mtsai., 2005), feltehetően az *A. nidulans* genomjában lévő, más hisztidin kináz gének funkciójának a redundanciája miatt (Vargas-Pérez és mtsai., 2007; Suzuki és mtsai., 2008).

Az *A. nidulans*ban az SskA (Ssk1 ortológ) szabályozza a konídiospórák stressztoleranciájában szerepet játszó gének expresszióját, ezen belül számos glicerín és trehalóz metabolizmusban szerepet játszó gént is (a *gfdA* és a *gfdB* géneket, a glicerín dehidrogenázt: *gldB*, a trehalóz-6-foszfát szintetázt: *tpsA*, a trehalóz-6-foszfát foszfátázt: *orlA*) (Fillinger és mtsai., 2001; Han és Prade, 2002; Furukawa és mtsai., 2007).

Az élesztőkben és a fonalas gombákban a HOG útvonal aktiválódásával létrejött ozmoreguláció eredménye az olyan ozmolitok bioszintézise és

akkumulációja, mint a prolin, a trehalóz, vagy a glicerín. Ezek az anyagok fenntartják az ozmotikus nyomást és megakadályozzák a vízvesztést (Duran és mtsai., 2010).

2.4 A polioloak bioszintézise és jelentősége

A fonalas gombákban a glicerín az egyik legjelentősebb poliól. Megfigyelték, hogy a glicerintermelés az egyike a korai metabolikus folyamatoknak a konídiumok csírázásakor (van Schaftingen és van Laere, 1985; Witteveen és Visser, 1995; d'Enfert és Fontaine, 1997). A *S. cereviae*ben az intracelluláris glicerín változását részben a plazmamembrán Fps1 glicerín transzporter szabályozza (Luyten és mtsai., 1995; Sutherland és mtsai., 1997; Tamás és mtsai., 1999). Az Fps1 csatorna bezáródik a külső ozmolaritás növekedése következtében, míg az ozmolaritás csökkenésével kinyílik (Tamás és mtsai., 1999). Jelentős szerepe van a hipoozmotikus stressznek kitett sejtek túlélésében, illetve a turgor nyomás szabályozásában az élesztősejtek fúziója alatt (Luyten és mtsai., 1995; Philips és Herskowitz, 1997; Tamás és mtsai., 1999). Az ozmolaritásban bekövetkezett változás szabályozásában részt vevő Fps1 részben a Hog1 MAPK útvonal kontrollja alatt áll. A Hog1 jelátviteli útvonal hiperozmotikus stresszre aktiválódik, így szabályozza a glicerín szintézisét, esetleg gátlását az Fps1 csatornán keresztül (Tamás és mtsai., 1999; Hohmann, 2002; Hohmann és mtsai., 2007).

A glicerín katabolizmus útvonala A. *nidulans*ban egy glicerín felvevő rendszerből, egy glicerín kinázból és mitokondriális FAD-dependens glicerín-3-foszfát dehidrogenázokból áll (Visser és mtsai., 1988; Arst és mtsai., 1990; Witteveen és mtsai., 1990; Hondmann és mtsai., 1991).

1. táblázat A glicerín metabolizmusban érintett gének az *A. nidulans* fonalas gombában.

Gén azonosító	(Feltételezett) géntermék	Referencia
AN8979	alkohol dehidrogenáz (AlcA)	Creaser és mtsai., 1985; Gwynne és mtsai., 1987; Waring és mtsai., 1989; David és mtsai., 2006, 2008; Wartenberg és mtsai., 2012
AN3741	alkohol dehidrogenáz II (AlcB)	Hunter és mtsai., 1996; David és mtsai., 2008
AN2286	alkohol dehidrogenáz III (AlcC)	McKnight és mtsai., 1985; Jones és Sealy-Lewis, 1990; Kelly és mtsai., 1990; David és mtsai., 2008
AN0351	feltételezett NAD ⁺ -függő glicerín-3-foszfát dehidrogenáz (GfdA)	Fillinger és mtsai., 2001; David és mtsai., 2008
AN6792	feltételezett NAD ⁺ -függő glicerín-3-foszfát dehidrogenáz (GfdB)	David és mtsai., 2008; Miskei és mtsai., 2009
AN5563	feltételezett dehidrogenáz (GldB)	de Vries és mtsai., 2003; David és mtsai., 2006, 2008; Savoldi és mtsai., 2008
AN1216	feltételezett glicerín-3- foszfát foszfatáz (GppA)	David és mtsai., 2008; Miskei és mtsai., 2009
AN7193	feltételezett NADPH- függő glicerín dehidrogenáz (LarA)	David és mtsai., 2006, 2008; Savoldi és mtsai., 2008; Kowalczyk és mtsai., 2015
AN0034	feltételezett glicerín kináz	David és mtsai., 2006, 2008
AN0567	feltételezett alkohol oxidáz	David és mtsai., 2008
AN1396	feltételezett FAD-függő glicerín-3-foszfát dehidrogenáz	David és mtsai., 2006, 2008; Savoldi és mtsai., 2008; Wartenberg és mtsai., 2012
AN1679	feltételezett oxidoreduktáz	David és mtsai., 2008
AN1868	feltételezett glicerín dehidrogenáz	Hortschansky és mtsai., 2007; David és mtsai., 2008
AN3916	feltételezett glicerín kináz	David és mtsai., 2008
AN4829	feltételezett reduktáz	David és mtsai., 2008
AN5178	feltételezett glicerín dehidrogenáz	David és mtsai., 2008
AN5589	feltételezett glicerín kináz	Arst és mtsai., 1990; Clutterbuck, 1994; David és mtsai., 2006, 2008
AN7632	feltételezett dehidrogenáz	David és mtsai., 2008
AN5563	feltételezett dehidrogenáz (GldB)	de Vries és mtsai., 2003; David és mtsai., 2006, 2008; Savoldi és mtsai., 2008
AN5589	feltételezett glicerín kináz	Arst és mtsai., 1990; Clutterbuck, 1994; David és mtsai., 2006, 2008

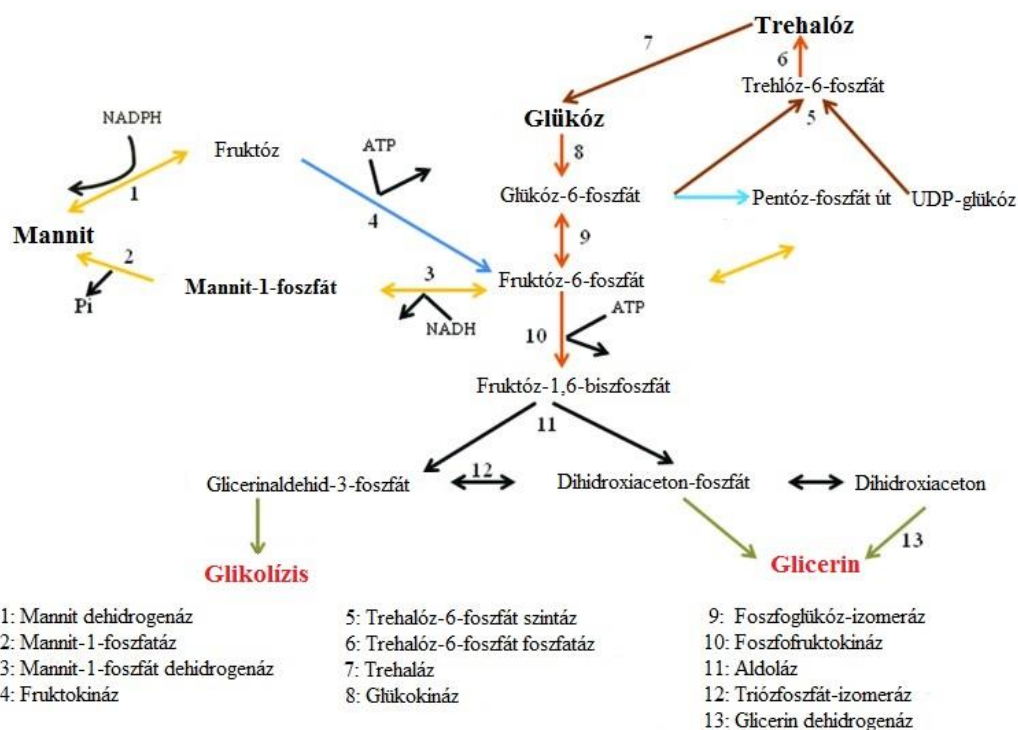
A dihidroxiaceton és a D-glicerinaldehid metabolizmus szorosan összefügg a glicerín metabolizmusával. A dihidroxiaceton egy glicerín dehidrogenáz segítségével konvertálódik glicerinné. Ezt a glicerín dehidrogenázt már jellemezték az *A. nidulans* és az *A. niger* fonalas gombákban (**1. táblázat**). Ugyanez az enzim alakítja át a D-glicerinaldehidet glicerinné (Schuurink és mtsai., 1990).

A nagy sókoncentrációhoz adaptálódott sejtekben azt figyelték meg, hogy a NADP⁺-dependens glicerín dehidrogenáz indukálódott, ami arra utal, hogy a glicerín bioszintézis fő útvonala a hiperozmotikus stressznek kitett környezetben a dihidroxiaceton-foszfát dihidroxiacetonná történő átalakítása, majd ezt követően glicerinné történő redukciója (Redkar és mtsai., 1995).

A glicerín mellett a mannit a legszélesebb körben ismert poliol a gombákban, hiszen megtalálható a spórákban és a gombamicéliumban is (Solomon és mtsai., 2007).

A gombákban a mannit bioszintézisét Hult és Gatenbeck írták le, melyben a mannit két metabolikus útvonalon szintetizálódhat; fruktózon vagy mannit-1-foszfáton keresztül (Hult és Gatenbeck, 1978) (**4. ábra**). Számos tanulmányban közölték, hogy a mannit szintézise elsősorban a fruktóz-6-foszfát redukciójával megy végbe a NADH-dependens mannit-1-foszfát dehidrogenáz enzim segítségével (Ruijter és mtsai., 2003; Solomon és mtsai., 2007; Véléz és mtsai., 2007). Ez egy reverzibilis reakció; a mannit-1-foszfát mannittá defoszforilálódik a mannit-1-foszfát foszfatáz enzimmal, illetve a fruktóz-6-foszfát fruktózzá alakul a fruktóz-6-foszfát foszfatáz által. Végül a fruktóz mannittá redukálódik a NADPH-függő mannit dehidrogenáz enzimmal (Wyatt és mtsai., 2014) (**4. ábra**). Az *A. niger*-ben az *mpdA* (mannit-1-foszfát dehidrogenázt kódolja) csak a vegetatív micéliumban, míg az *mtdA* (mannit dehidrogenázt kódolja) kizárólag a konídiospórákban expresszálódik (Aguilar-Osorio és mtsai., 2010). Az *mpdA* delécioja csökkentette a konídiumokban a

mannit koncentrációját, viszont növelte a trehalózét, a géndeléciós törzs konídiosporái pedig fokozott stresszérzékenységet mutattak (Ruijter és mtsai., 2003). Elkészítették a *Beauveria bassiana* gomba *Bbmpd* (*mpdA* ortológ) géndeléciós törzsét, amely konídiosporái érzékenyek mutatkoztak UV-, hidrogén-peroxid- és hőstresszre (Wang és mtsai., 2012).



4. ábra Szénhidrátok átalakulása és mannit metabolikus útvonalak gombákban (Meena és mtsai., 2015).

A polioloknak különböző élettani szerepeik vannak élesztőkben és fonalas gombákban:

- Ozmoreguláció: Számos élesztőben és fonalas gombában a glicerint az elsődleges ozmolit; például a *S. cerevisiae* élesztőben szerepet játszik az ozmotikus egyensúly fenntartásában (Shen és mtsai., 1999).

A kukorica szárkorhadását okozó *Giberella zeae* gomba glicerint, eritritet, arabitot és mannitot termel, főként amikor száraz környezetnek van kitéve (Ramirez és mtsai., 2004).

- Reaktív részecskék eliminálása: A mannitnak jelentős szerepe van a reaktív részecskékkel szembeni védelemben. Korábbi tanulmányok már *in vivo* és *in vitro* is igazolták, hogy a mannit gyökfogó molekulaként eliminálja a reaktív részecskéket, de ennek a pontos mechanizmusa még nem ismert (Smirnoff és Cumbes, 1989; Chaturvedi és mtsai., 1997; Hema és mtsai., 2014). A hidroxilgyökökkel való reakcióknak három fő típusa van: a hidrogén absztrakció (hidrogénelvonás), az addíció és az elektron transzfer (Halliwell és Gutteridge, 1995). A hidrogénelvonás folyamán egy gyök elvon egy hidrogénatomot egy molekuláról és ennek eredményeként egy új molekulát és gyököt képez (Lai és mtsai., 2012). A hidroxilgyökök mannittal való hidrogénelvonása révén víz keletkezik és párosítatlan elektront képez az egyik C atomon (általában C1 vagy C6) és egy olyan mannitgyököt hoz létre, amely a tiobarbitursavval képes reagálni. Oxigén jelenlétében pedig ez a mannitgyök mannittá alakul (Franzini és mtsai., 1994). Továbbá a mannitgyök diszproporción is keresztülmehet, melynek végeredményeképpen ketonok jönnek létre, vagy dimerizálódik (Moore és Devadatham, 1979).

A paradicsom patogén *Cladosporium fulvum* gomba például mannitot termel a gazdanövény fertőzésekor. Kimutatták a mannitot a fertőzött paradicsom levelek intracelluáris folyadékában. Ugyanakkor avirulens fajok esetében nem detektáltak mannit termelést (Joosten és mtsai., 1990). A parazita

C. fulvum gomba glükóz és fruktóz metabolizálásával szintetizál mannitot, majd a sporulációhoz használja fel (Joosten és mtsai., 1990). Mivel a mannit inaktív módon az apoplasztba jut, ennek is lehet szerepe a szabad gyökök és reaktív oxigén gyökök semlegesítésében.

- Tartalék tápanyagok: A poliolok raktározott tápanyagként is hasznosulnak a gombákban. A mannit visszaáramoltatható a metabolizmusba a fő katabolikus enzim, a mannit dehidrogenáz segítségével, melynek eredményeként fruktózzá oxidálódik (Hult és mtsai., 1980). Továbbá Dulermo és munkatársai kimutatták a *Botrytis cinerea* szürkerothadást okozó penészgombában, hogy létezik egy mannit foszforilációs útvonal, amelyben a mannit képes visszaalakulni mannit-1-foszfáttá (Dulermo és mtsai., 2010). A mannit a fonalas gombák különböző részeiben fordulhat elő. A *Penicillium chrysogenum* konídiospóráiban glicerint, eritritet, arabitot, mannitot és trehalózt mértek (Ballio és mtsai., 1964). Továbbá bizonyos fajokban a mannit a szkleróciumban koncentrálódhat, úgy, mint a *Sclerotinia sclerotiorum*, a *S. cureyana*, a *Claviceps purpurea*, vagy a *C. nigricans* fajok esetében (Cooke, 1969). Számos példa van arra, hogy a mannit a konídiospórákban lelhető fel, ilyen fajok az *A. nidulans*, az *A. oryzae*, az *A. clavatus*, a *Neurospora crassa*, a *N. sitophila*, és a *Myrothecium verrucaria* (Lewis és Smith, 1967; Karácsony és mtsai., 2014).

- pH szabályozása: A poliolok részt vehetnek a gombák pH szabályozásában is. A poliolok redukciójuk vagy oxidációjuk révén protonokat vehetnek fel vagy protonforrásként szolgálhatnak, így részt vehetnek a citoplazmatikus pH szabályozásában (Jennings, 1984).

Nguyen és munkatársai kidolgoztak egy elméletet, miszerint a *Staphylococcus aureus* baktérium mannit-1-foszfát dehidrogenáz enzimének a működése függ az intracelluláris pH-tól és a sókoncentrációtól. Kis pH vagy nagy sókoncentráció mellett a mannit bioszintézise a mannit-1-foszfát

útvonalon megy végbe, amely vízbeáramlást okoz. Ezzel ellentétben a nagy pH vagy a kis sókoncentráció eredménye a mannit katabolizmusa és a vízkiáramlás. Ezek alapján elmondható, hogy baktériumokban összefüggés van az intracelluláris pH, a sóstressz, valamint a mannit metabolizmus mannit-1-foszfát dehidrogenáz enzimmal való szabályozása között (Nguyen és mtsai., 2019).

- Morfogenezis és konídiumtermelés: Mannit szükséges a *Septoria nodorum* vegetatív sporulációjakor *in planta*, valamint *in vitro* (Solomon és mtsai., 2006, 2007). A mannitot metabolizálni képtelen mutáns törzset mannit nélküli táptalajon tenyésztették és azt találták, hogy az aszexuális sporuláció gátolva volt.

Emellett Wyatt és munkatársai (2014) kimutatták, hogy a mannit létfontosságú elem az aszkospórák fejlődése és a konídiospórák stresszrezisztenciája szempontjából, a hőstressznek, illetve oxidatív stressznek kitett *N. fischeri* esetében.

2.5 A felhasznált stresszorok biológiai hatásai

Hiperozmotikus stresszt szorbittal és NaCl-dal idéztünk elő. Ezen vegyületek jelenlétében a sejtek vizet veszítenek és összezsugorodnak, mely folyamat befolyásolja a membránra ható turgor nyomást és a membránhoz kötött transzport folyamatokat is. A turgor nyomásban keletkezett zavar megváltoztatja bizonyos plazmamembrán fehérjék, például a mechanoszenzitív csatornák működését. A vízvesztés pedig a fehérjeszintézisben okozhat letális károkat (Tamás és mtsai., 2000).

Az oxidatív stressz kiváltásához *tBOOH*-t, hidrogén-peroxidot, diamidot, valamint *MSB*-t használtunk. A *tBOOH* lipid peroxidációt okoz a biológiai membránokban (Greenley és Davies, 1992), valamint képes reakcióba lépni a *GSH*-val a *GSH*-peroxidázon keresztül, ennek a folyamatnak

az eredményeképpen jön létre a GSSG. A GSSG a GSH visszaredukálásában vesz részt a GSSG reduktázzal, miközben NADPH-t használ el. A GSH elhasználása és a NADPH oxidációja összefüggésben áll a Ca^{2+} homeosztázis felborulásával, ez pedig a sejtek életképességének a csökkenéséhez vezet (Bellomo és mtsai., 1982). Továbbá a *t*BOOH vasfüggő reakciókkal szabadgyökökké alakul, így idézi elő a lipidek peroxidációját (Rush és Alberts, 1986). A H_2O_2 növeli az intracelluláris peroxid koncentrációt, valamint felborítja a GSH/GSSG egyensúlyt. A H_2O_2 -dal való reakciók fő forrásai a NADPH oxidázok (Nox), valamint a mitokondriumban lejátszódó légzési lánc. A mitokondriális légzési lánc működése során keletkezett szuperoxid gyök a szuperoxid dizmutázok (SOD1, SOD2, SOD3) segítségével alakul H_2O_2 -dá (Sies, 2017). A H_2O_2 a kéntartalmú aminosavak közvetlen oxidációját okozza (Pócsi és mtsai., 2005). A diamid szintén a GSH/GSSG egyensúlyt zavarja meg, mivel egy tiol-oxidáló ágens, amely a GSH GSSG-vé történő gyors oxidálását idézi elő. Az MSB pedig GSH/GSSG egyensúly felborításán és a peroxid tartalom növelésén kívül szuperoxid anion koncentrációját is növeli, amely reagál a 4Fe-4S fehérjékkel hidroxilgyököket képezve. A menadion befolyásolhatja közvetlenül a GSH-t a glutation-S-transzferáz által katalizált detoxifikálási reakción keresztül (Toledano és mtsai., 2003; Pócsi és mtsai., 2004, 2005).

Kongóvöröst használtunk a sejtfalintegritás-stressz előidézéséhez. A kongóvörös festék számos poliszachariddal képes kölcsönhatásba lépni, különösen magas az affinitása a β -glükánokkal szemben (Wood, 1980). Hidrogénkötésekkel kötődik a glükán láncokhoz, így gátolja a mikrofibrillumoknak az összeszerelődését (Pancaldi és mtsai., 1984), továbbá

gyengíti a sejtfalat a kitin láncok és a β -glükán közötti kovalens kötések megzavarásával (Ram és Klis, 2006).

Nehézfémstressz indukálásához CdCl_2 -ot alkalmaztunk a kísérleteinkben. A kadmium nagy koncentrációban megzavarhat számos biokémiai folyamatot, például növeli a szabad gyök és reaktív oxigén gyök koncentrációt, ezáltal módosíthatja a gombák oxigén metabolizmusát (Avery, 2001). A kadmium (II) jelentősen gátolja a növekedési folyamatokat és indukálja a ciszteint tartalmazó peptidcsoportok és a metallotioninek szintézisét (Höfgen és mtsai., 2001).

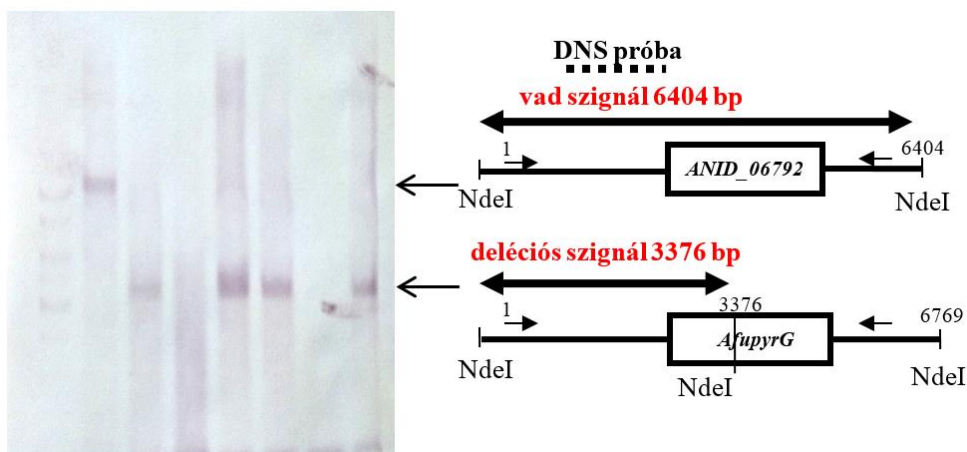
3. Eredmények

3.1 A vizsgált *Aspergillus* gombatörzsek genotípusának ellenőrzése

3.1.1 Az *A. nidulans* *gfdB* gén deléciójának ellenőrzése

Az *A. nidulans* *gfdB* gén delécióját Southern blot hibridizációval ellenőriztük. Egy DIG-oxigeninnel megjelölt próbát (amely a *gfdB* gén upstream 5' végi szakaszához volt specifikus) hibridizáltattunk az NdeI restrikciós enzimmal emésztett genomra (5. ábra). Az enzim egyszer hasít az általunk bevitt kazettába, de az eredeti genomi szakaszba nem, így a hibridizációval megállapítottuk, hogy a géndeléciós kazetta egy kópiában és jó helyre épült be.

1 kb létra K 1 2 3 4 5 6



5. ábra A *gfdB* gén deléciójának a Southern blot hibridizációval való vizsgálata. Az 1-es, a 3-as, a 4-es és a 6-os klónt választottuk a vizsgálatainkhoz, mivel ezekbe a géndeléciós kazetta egy kópiában és jó helyre épült be.

3.1.2 A *gfdB* gén kópiaszámának meghatározása az *A. glaucus* transzgén törzsekben

Az *A. glaucus gfdB* transzgén törzsek üveggyönggyel feltárt micéliumából genomi DNS-t izoláltunk, majd meghatároztuk a koncentrációját és az ismert koncentrációkból hígítási sort készítettünk. Az *Aspg11_0039306* (*A. nidulans* γ -glutamilcisztein-szintetáz ortológ) gént használtuk referenciagénként, ezután pedig a kvantitatív PCR módszer segítségével meghatároztuk az általunk keresett gén (*gfdB*), illetve a referenciagén kópiaszámát, melyet Herrera és munkatársai (2009) leírása alapján számoltunk ki (2. táblázat).

2. táblázat A *gfdB* gén kópiaszámának meghatározása az *A. glaucus* 'c *gfdB1* és 'c *gfdB2* transzgén törzsekben.

Törzsek	<i>gfdB</i>	R^2 ^a	<i>Aspg11_0039306</i>	R^2	Kópiaszám
'c <i>gfdB1</i>	$y = -6,76x + 39,54$ ^b	1,00	$y = -6,01x + 36,99$ ^b	0,99	1,01±0,14
'c <i>gfdB2</i>	$y = -5,65x + 34,56$ ^b	0,98	$y = -5,15x + 31,61$ ^b	0,99	0,97±0,16

^a determinációs együttható

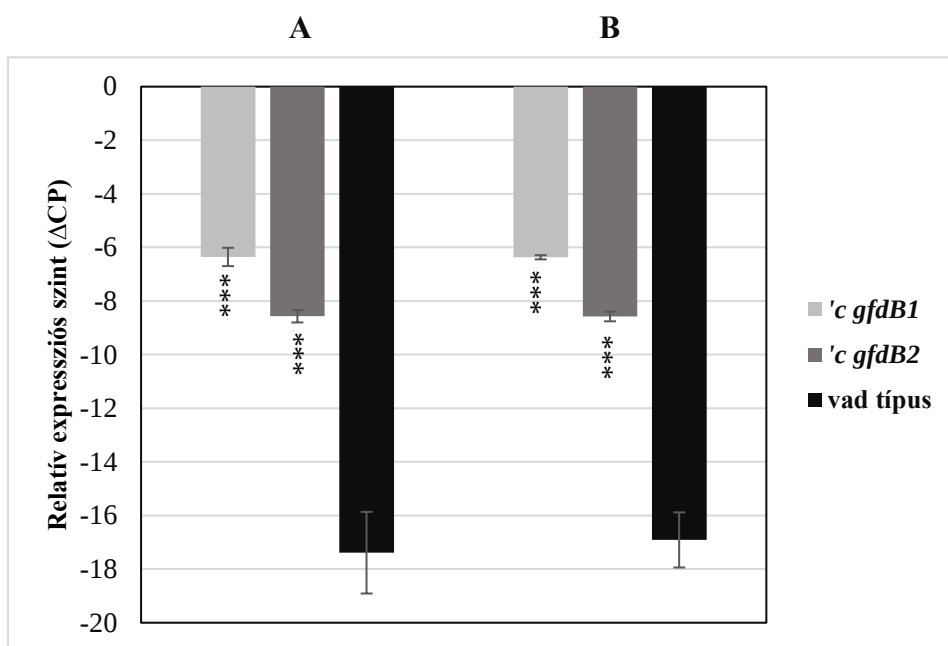
^b regressziós egyenes egyenlete

Az eredmények alapján elmondhatjuk, hogy az *A. glaucus* transzgén törzsekben lévő *gfdB* gén egyetlen kópiában van jelen.

3.1.3 A *gfdB* gén expresziójának vizsgálata az *A. glaucus* transzgén törzseiben

A törzseket négy napig inkubáltuk 25 °C-on 2 M szorbit, illetve 2 M szorbit + 0,4 mM *t*BOOH jelenlétében. Ezt követően a liofilizált micéliumból RNS-t izoláltunk. Az RNS minták három, egymástól független felületi kultúrák tenyészetéből származtak. Ezt követően RT-qPCR segítségével megvizsgáltuk az *A. glaucus* mutáns törzseiben a *gfdB* gén relatív expressziós szintjét.

Vizsgálataink alapján elmondhatjuk, hogy mind a 'c *gfdB1*, mind a 'c *gfdB2* transzgén törzsben expresszálódik a *gfdB* gén. Továbbá a *tBOOH* kezelés nem okozott szignifikáns változást egyik törzs esetében sem a *gfdB* gén expressziójában (6. ábra).

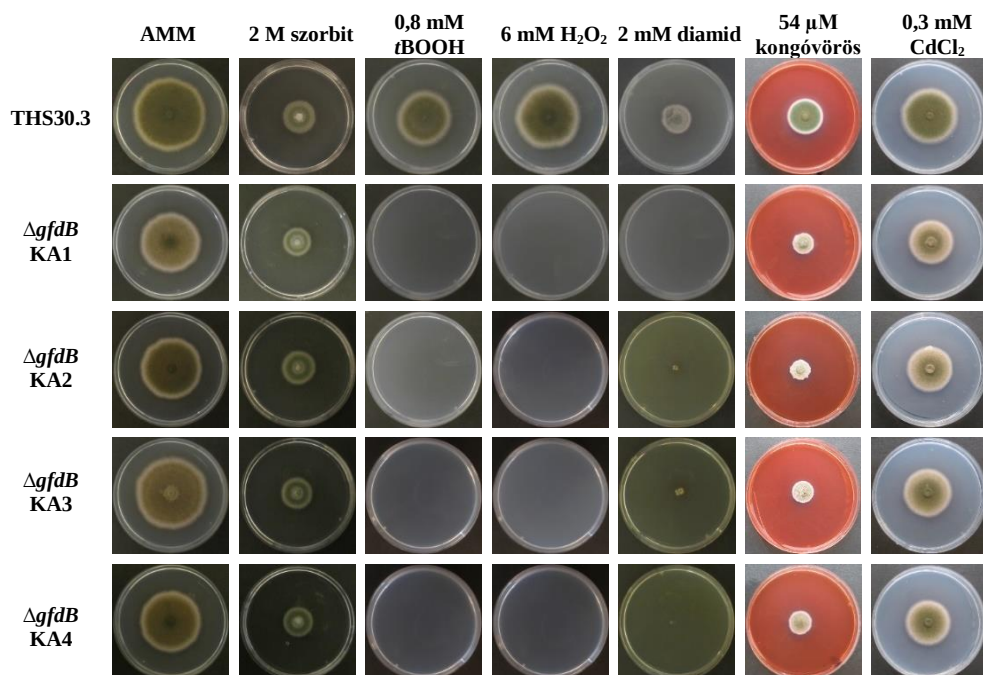


6. ábra A *gfdB* gén relatív expressziós szintje az *A. glaucus* ozmotikus és oxidatív stressznek kitett kontroll, 'c *gfdB1* és 'c *gfdB2* törzsében. A transzkripció szinteket megvizsgáltuk 2 M szorbittal (**A**), illetve 2 M szorbittal + 0,4 mM *tBOOH*-val (**B**) kezelt tenyészetekben. Az ábrán 3 független mérés átlagát és szórását tüntettük fel. A relatív expressziós szintet a ΔCP módszerrel számoltuk ki. Referenciaként az *A. fumigatus tif1* gén ortológját (*Aspgl1_0030273*) használtuk. A „*” jelölés a kontroll és a mutáns törzsek közötti szignifikáns különbséget mutatja (Student-féle *t* teszt; * $p < 5\%$, ** $p < 1\%$ és *** $p < 0,1\%$).

3.2 Stresszérzékenység vizsgálatok

3.2.1 Az *A. nidulans* *gfdB* géndeléciós mutánsok stresszérzékenység vizsgálata

Az *A. nidulans* kontroll (THS30.3) és a $\Delta gfdB$ törzsek felületi kultúráinak megvizsgáltuk a stresszérzékenységét minimál táptalajon (AMM – „*Aspergillus* Minimal Medium”) (7. ábra, 3. táblázat). Ozmotikus stresszt 2 M szorbittal váltottunk ki, oxidatív stressz előidézésére 0,8 mM *t*BOOH-t, 6 mM H₂O₂-t és 2 mM diamidot alkalmaztunk. Továbbá sejtfalintegritás-stressz indukálásához 54 μ M kongóvöröst, nehézfémstressz előidézéséhez pedig 0,3 mM CdCl₂-ot használtunk. A törzseket 37 °C-on 5 napon keresztül inkubáltuk. Azt az eredményt kaptuk, hogy a $\Delta gfdB$ mutánsok növekedése elmaradt minimál táptalajon a kontrolléhoz képest és jelentős oxidatívstressz-érzékenységet mutattak *t*BOOH, H₂O₂ és diamid jelenlétében is. Továbbá, a géndeléciós törzsek érzékenynek bizonyultak a sejtfalintegritás-stresszt generáló kongóvörösre is. Ugyanakkor szorbit és CdCl₂ jelenlétében nem volt különbség a kontroll és a mutánsok növekedésében.



7. ábra A THS30.3 (kontroll) és a $\Delta gfdB$ (KA1-4) mutáns törzsek stresszérzékenységének vizsgálata. A friss spórákat (10^5) pont inokuláltuk a táptalajra, majd 37 °C-on, 5 napon keresztül inkubáltuk a tenyészeteket.

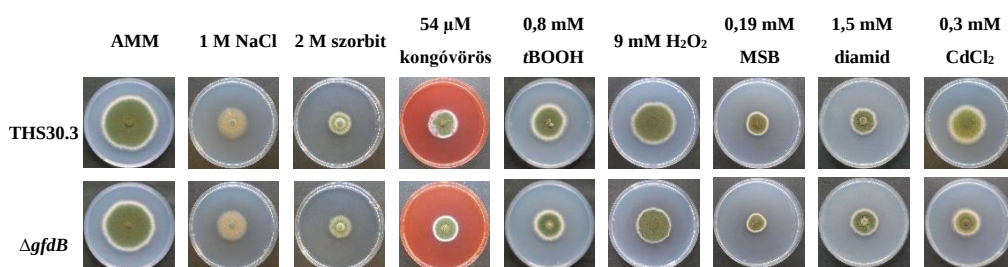
3. táblázat Az *A. nidulans* kontroll (THS30.3) és a $\Delta gfdB$ mutáns törzsek (KA1-4) felületi tenyészetek stresszérzékenysége.

	AMM	2 M szorbit	0,8 mM <i>t</i> BOOH	6 mM H ₂ O ₂	2 mM diamid	54 μ M kongóvörös	0,3 mM CdCl ₂
THS30.3	6.26±0.19	2.87±0.1***	4.85±0.21***	5.8±0.06***	2.5±0***	2.98±0.19***	4.72±0.09***
$\Delta gfdB$ KA1	5.1±0.19###	2.78±0.12***	0±0***###	0±0***###	0±0***###	1.79±0.12***###	3.99±0.15***###
$\Delta gfdB$ KA2	5.2±0.16###	2.82±0.16***	0±0***###	0±0***###	0.33±0.05***###	1.68±0.08***###	3.82±0.12***###
$\Delta gfdB$ KA3	5.5±0.2###	2.84±0.09***	0±0***###	0±0***###	0.5±0***###	1.78±0.12***###	3.92±0.08***###
$\Delta gfdB$ KA4	5.09±0.15###	2.79±0.15***	0±0***###	0±0***###	0±0***###	1.77±0.05***###	3.85±0.16***###

* A kezeletlen és a kezelt (2 M szorbit, 0,8 mM *t*BOOH, 6 mM H₂O₂, 2 mM diamid, 54 μ M kongóvörös, 0,3 mM CdCl₂) tenyészetek telepátmérői (cm) közötti szignifikáns eltérést a Student-féle t-tesztel ellenőriztük (***) p<0,1 %).

A kontroll és a mutáns törzsek telepátmérői (cm) közötti szignifikáns eltérést a Student-féle t-tesztel ellenőriztük (###) p<0,1 %).

Megfigyeltük a törzsek növekedését 25 °C-on is, 10 napos inkubációt követően. Ozmotikus stresszt 1 M NaCl-dal és 2 M szorbittal váltottunk ki, sejtfalintegritás-stressz generáló ágensként 54 μ M kongóvöröst, oxidatív stresszorként pedig 0,8 mM *t*BOOH-t, 9 mM H₂O₂-t, 0,19 mM MSB-t, valamint 1,5 mM diamidot használtunk, továbbá nehézfémstresszt 0,3 mM CdCl₂-dal váltottunk ki. Azt találtuk, hogy NaCl, szorbit, valamint diamid mellett nem volt jelentős különbség a törzsek növekedésében, a többi esetben viszont szignifikáns különbségeket mértünk (8. ábra, 4. kiegészítő ábra A-C).



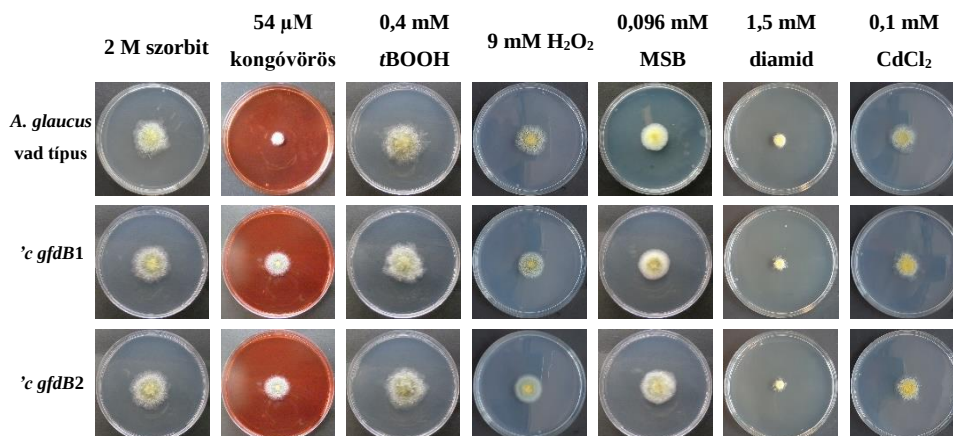
8. ábra A THS30.3 (kontroll) és a $\Delta gfdB$ mutáns törzs stresszérzékenységének vizsgálata. A friss spórákat (10^5) pont inokuláltuk a táptalajra, majd 25 °C-on, 10 napon keresztül inkubáltuk a tenyészeteket.

A törzsek stresszérzékenységét megvizsgáltuk felületi tenyészeteken különböző szénforrások mellett (1 % glükóz, 1 % fruktóz, 1 % glicerín, 1 % etanol) 0,8 mM *t*BOOH kezeléssel, illetve anélkül. A törzseket 37 °C-on 5 napon keresztül inkubáltuk. Azt tapasztaltuk, hogy a $\Delta gfdB$ törzs oxidatívstressz-érzékenysége nem fokozódott sem 1 % fruktózon, sem 1 % glicerinen. Továbbá a THS30.3 kontroll törzs növekedésében glükóz és glicerín szénforrásokon nem volt számottevő különbség az oxidatív stresszor jelenlétében (1. kiegészítő ábra A-D).

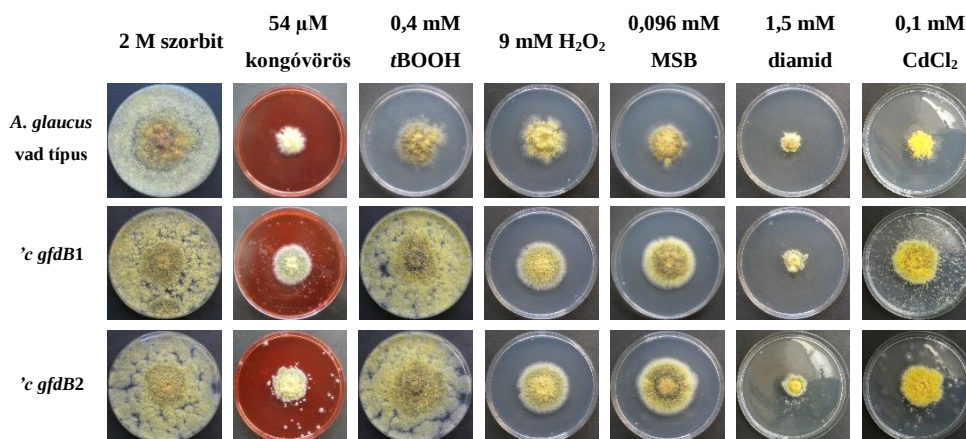
Megvizsgáltuk a törzsek ozmotikusstressz-érzékenységét is különböző szénforrásokon 1 M NaCl-dal, illetve 2 M szorbittal kiegészített táptalajokon. 1 M NaCl mellett 1 % glükózon a *ΔgfdB* géndeléciós törzs a kontrolléhoz hasonló növekedést mutatott, a különbség nem volt szignifikáns, ahogy a többi szénforrás mellett sem. Ha összevetjük ezt a stresszmentes körülmények között mutatott növekedéssel, a kontroll törzs növekedése nagyobb visszaesést mutat 1 M NaCl mellett, mint a mutánsé. Az oxidatív stresszt okozó 0,8 mM *tBOOH* mellett nem növekedtek a törzsek (**2. kiegészítő ábra**). Amikor 2 M szorbit mellett vizsgáltuk a törzseket, nem detektáltunk különbséget a kontroll és a *ΔgfdB* törzs növekedésében (**3. kiegészítő ábra**).

3.2.2 Az *A. glaucus gfdB* transzgén törzsek stresszérzékenységének vizsgálata

Megvizsgáltuk az *A. glaucus* kontroll és a *gfdB* mutánsok (*'c gfdB1*, *'c gfdB2*) stresszérzékenységét 2 M szorbittal kiegészített minimál táptalajon. Sejtfalintegritás-stresszt 54 μ M kongóvörössel, oxidatív stresszt 0,4 mM *tBOOH*-val, 9 mM H_2O_2 -dal, 0,096 mM MSB-vel és 1,5 mM diamiddal, továbbá nehézfémstresszt 0,1 mM $CdCl_2$ -dal váltottunk ki. A tenyészeteket 25 °C-on 5 és 10 napon keresztül inkubáltuk. Eredményként azt kaptuk 5 nap inkubáció után, hogy kongóvörös és MSB stresszorokkal kiegészített táptalajon maradt el a kontroll növekedése a mutánsokétól; az utóbbinál is csak a *'c gfdB2* mutáns esetében volt szignifikáns a különbség (**9. ábra, 5. kiegészítő ábra A-D**). Azt tapasztaltuk, hogy szignifikánsan nagyobb volt a mutánsok stressz toleranciája kongóvörös, *tBOOH*, H_2O_2 , MSB és $CdCl_2$ jelenlétében 10 napos korban. A legjelentősebb különbséget 0,4 mM *tBOOH* mellett figyeltük meg, ahol a *gfdB* gén jelenléte teljesen helyreállította a stresszmentes körülmények között (minimál táptalaj 2 M szorbittal kiegészítve) bemutatott fenotípust (**10. ábra, 6. kiegészítő ábra A-D**).



9. ábra A kontroll (*A. glaucus*) és a 'c *gfdB1* és 'c *gfdB2* mutáns törzsek stresszérzékenységeinek vizsgálata 2M szorbittal kiegészített minimál táptalajon. A friss spórákat (10^5) pont inokuláltuk a táptalajra, majd 25 °C-on, 5 napon keresztül inkubáltuk a tenyészeteket.



10. ábra A kontroll (*A. glaucus*) és a 'c *gfdB1* és 'c *gfdB2* mutáns törzsek stresszérzékenységeinek vizsgálata 2M szorbittal kiegészített minimál táptalajon. A friss spórákat (10^5) pont inokuláltuk a táptalajra, majd 25 °C-on, 10 napon keresztül inkubáltuk a tenyészeteket.

Megvizsgáltuk a törzsek stresszérzékenységet ugyanezen stressz generáló ágensekkel 1 M NaCl-dal kiegészített minimál táptalajon 10 napos inkubációt követően (7. kiegészítő ábra A-E). Azt az eredményt kaptuk, hogy egyik esetben sem volt szignifikáns különbség a kontroll és a *gfdB* transzgén törzsek növekedésében.

3.3 Az *A. nidulans* THS30.3 és a $\Delta gfdB$ törzs RS tartalmának, néhány antioxidáns enzim aktivitásának és mikotoxin termelésének a vizsgálata

Az *A. nidulans* THS30.3 (kontroll) és $\Delta gfdB$ törzsének rázatott tenyészeit 20 órán át növesztettük, ezt követően 0,4 mM *t*BOOH-val kezeltük, majd a 10. órában a tenyészetekből mintát vettünk RS és antioxidáns enzimaktivitás mérésekhez, valamint a 24. órában a szterigmatocisztin termelés és poliol tartalom mérésekhez.

Azt az eredményt kaptuk, hogy az RS termelés stresszmentes körülmények között négyszer olyan nagy volt a $\Delta gfdB$ törzsben, mint a kontrollban, viszont *t*BOOH jelenlétében mindkét törzsben jelentősen növekedett az RS tartalom (4. táblázat).

Az antioxidáns enzimaktivitás méréseknél azt figyeltük meg, hogy *t*BOOH kezelés nélkül a *gfdB* gén deléciója növelte a specifikus GR aktivitást, míg a specifikus GPx és kataláz aktivitások csökkentek. Az oxidatív stressz generáló *t*BOOH jelenlétében a specifikus GR aktivitás nagyobb volt a gendelációs törzsben, ezzel ellentétben a specifikus GPx, kataláz és SOD aktivitások jelentősen csökkentek, ez utóbbi körülbelül háromszor kisebb volt a mutánsban, mint a kontrollban (4. táblázat).

A szterigmatocisztin termelés vizsgálatánál azt tapasztaltuk, hogy a *gfdB* gendelációs törzs esetében szignifikánsan nagyobb volt, mint a kontroll törzsben stresszmentes körülmények között. A mikotoxin termelés változását megvizsgáltuk *t*BOOH-val kezelt tenyészetekben is és arra jutottunk, hogy mindkét törzsben csökkent a metabolittermelés, viszont a mutáns törzsben így is kétszer olyan nagy maradt, mint a kontrollban (4. táblázat).

4. táblázat Az *A. nidulans* THS30.3 (kontroll) és a $\Delta gfdB$ törzs élettani tulajdonságainak vizsgálata.

Törzsek és kezelések	Szárastömeg (DCM) ^a (g/l)			Szterigmatocisztin termelés (mg/g DCM)	RS ^b termelés (mmol kg ⁻¹ DCM)	Glutation reduktáz (mkat/kg protein)	Glutation peroxidáz (mkat/kg protein)	Kataláz (kat/kg protein)	Szuperoxid dizmutáz (mkat/kg protein)	Poliol tartalom (μmol/g DCM)
	0 h	10 h	24 h	24 h	10 h	10 h	10 h	10 h	10 h	24 h
THS30.3	1,6 ± 0,2	3,6 ± 0,03	4,3 ± 0,1	0,33 ± 0,05	0,25 ± 0,03	8,7 ± 1,8	16,4 ± 4,3	1,3 ± 0,4	82 ± 9	251 ± 91 ^c 429 ± 115 ^d
THS30.3 + 0,4 mM tBOOH	16 ± 0,3	1,6 ± 0,5 ##	4,9 ± 0,4 #	0,07 ± 0,01 ###	3,2 ± 0,7 ##	8,1 ± 2,4	12,5 ± 3,4	2,8 ± 0,3	174 ± 66 ##	434 ± 16 ^d
$\Delta gfdB$	1,74 ± 0,09	3,5 ± 0,5	4,9 ± 0,5	0,57 ± 0,04 **	1,0 ± 0,1 ***	18,2 ± 3,1 ***	12,3 ± 0,5 *	0,5 ± 0,1 ***	96 ± 42	273 ± 12 ^c 632 ± 50 ^{d,*}
$\Delta gfdB$ + 0,4mM tBOOH	1,8 ± 0,1	1,8 ± 0,3 ##	4,9 ± 0,2	0,14 ± 0,08 ##	8,0 ± 0,9 ** ###	13,9 ± 1,5 *** #	8,1 ± 1,8 * ###	1,2 ± 0,2 ***	62 ± 12 **	812 ± 99 ^{d,*##}

A kontroll (THS30.3) és a $\Delta gfdB$ törzs közötti szignifikáns eltéréseket 0,4 mM tBOOH jelenlétében a Student-féle t-teszttel ellenőriztük (# p<5 %, ## p<1 % és ### p<0,1 %).

* A kontroll (THS30.3) és a $\Delta gfdB$ törzs közötti szignifikáns eltéréseket stresszmentes körülmények között a Student-féle t-teszttel ellenőriztük (* p<5 %, ** p<1 % és *** p<0,1 %).

^a DCM – szárastömeg „dry cell mass”

^b RS – minden intracelluláris oxidáns, amely reagálva a 2',7'-diklórfloreszcein diacetáttal 2',7'-diklórfloreszceint (DCF) hoz létre (Halliwell és Gutteridge, 2007)

^c eritrit

^d mannit

3.4 A THS30.3 és a $\Delta gfdB$ törzs poliol tartalmának vizsgálata

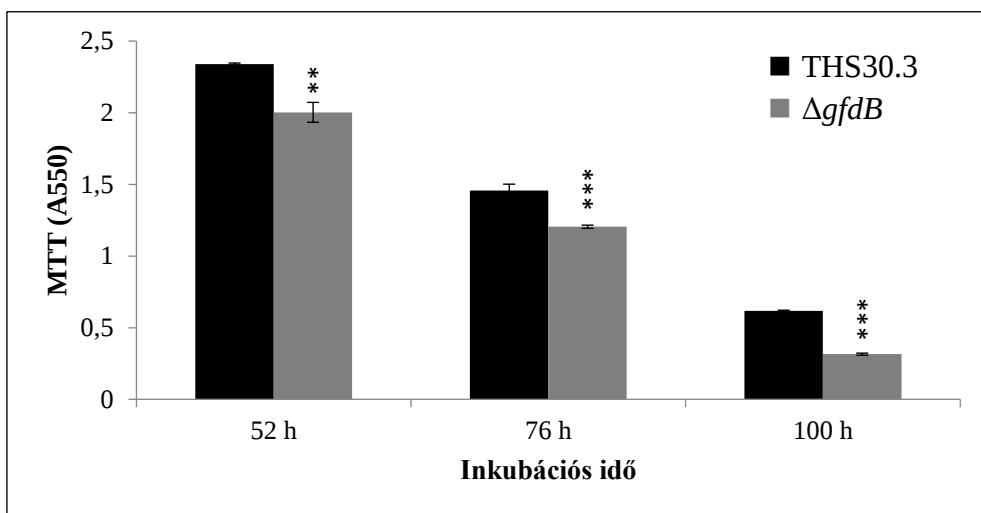
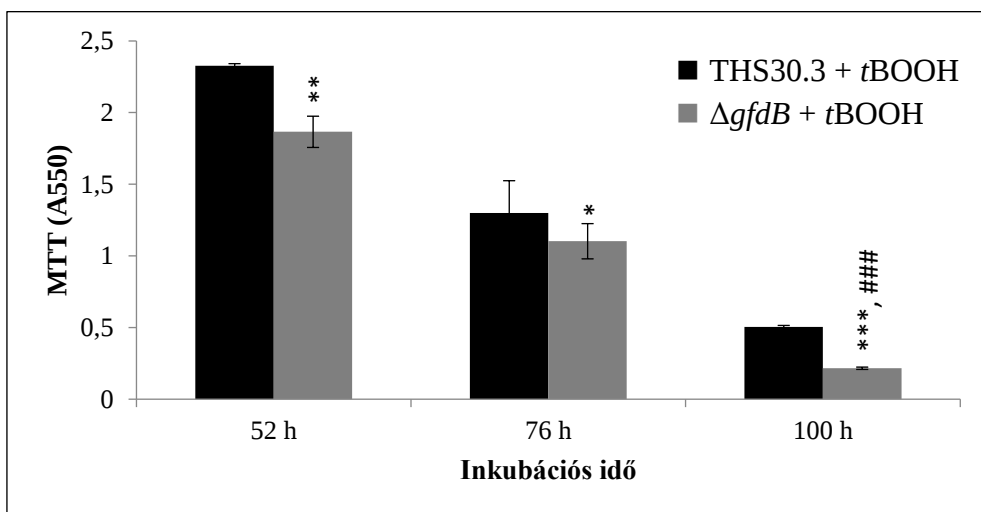
Megvizsgáltuk az *A. nidulans* törzsek poliol termelését stresszmentes körülmények között és 0,4 mM *t*BOOH-val kezelt tenyészetekben is. A liofilizált micéliumokból HPLC mérések segítségével kationcserélő oszlopon határoztuk meg a poliol tartalmat. A mannit koncentráció szignifikánsan nagyobb volt a minimál táptalajon tenyésztett $\Delta gfdB$ törzsben, mint a kontrollban, míg *t*BOOH kezelés hatására a mutánsban tovább nőtt a mannit koncentráció, a kontrollban viszont nem változott (**4. táblázat**). Elmondhatjuk tehát, hogy az oxidatív stressz nem volt hatással a mannit termelésre a kontroll törzsben. Ezzel ellentétben az eritrit termelést teljesen gátolta a *t*BOOH kezelés mind a kontroll, mind a mutáns törzsben (**4. táblázat**). Továbbá ilyen körülmények között nem volt detektálható glicerín sem a kontroll, sem pedig a géndeléciós mutáns rázatott tenészeiben.

A poliol tartalmat ^1H és ^{13}C NMR spektroszkópiával is meghatároztuk, és a kapott eredményekkel alátámasztottuk a HPLC mérés eredményeit, illetve az irodalmi adatokat, miszerint az *A. nidulans* rázatott kultúrái kizárólag eritrit és mannit polioloikat termeltek stresszmentes körülmények között (Witteveen és mtsai., 1990). Továbbá az oxidatív stresszrel kezelt tenyészetekben nem folyt eritrit termelés (**8. kiegészítő ábra A-B**).

3.5. A sejtek életképességének és az apoptotikus sejthalálnak a vizsgálata

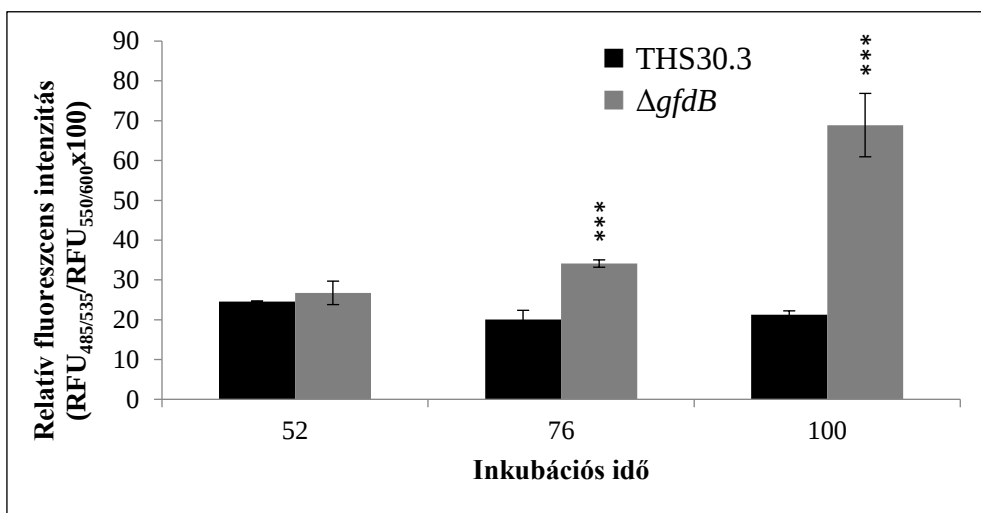
A THS30.3 és $\Delta gfdB$ törzs folyékony tenészeinek életképesség vizsgálatát az MTT redukciós teszttel végeztük. A géndeléciós mutáns életképessége lényegesen csökkent a kontroll törzshöz képest mind *t*BOOH kezelés hatására, mind anélkül 52, 76 és 100 órás inkubációs idő után is (**11. ábra**).

A sejtek apoptózisát a JC-1 fluoreszcens festékkel mértük és a $\Delta gfdB$ törzsben körülbelül háromszor nagyobb volt az apoptotikus ráta 100 órás inkubáció után, stresszmentes körülmények között. Míg *tBOOH* kezelés hatására már korábban, 52 órás inkubáció után volt nagyobb az géndeléciós törzs apoptotikus rátája, mint a kontrollé (**12. ábra**).

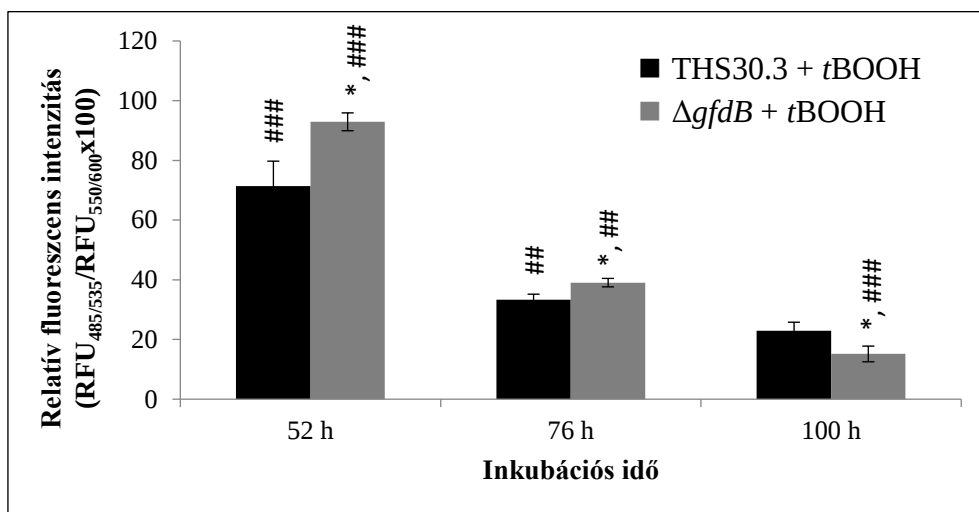
A**B**

11. ábra Az ábrán az *A. nidulans* THS30.3 (kontroll) és a $\Delta gfdB$ törzs MTT redukáló aktivitása látható stresszmentes körülmények között (**A ábra**) és 0,4 mM *tBOOH* jelenlétében (**B ábra**). A sejtek specifikus MTT redukáló aktivitását 550 nm-en (A_{550}) mértük spektrofotometriásan, amely három független mérés átlagából származik. A „*” jelölés a mutáns kontroll törzstől való szignifikáns eltérését (Student - féle t teszt; * $p < 5\%$, ** $p < 1\%$, *** $p < 0,1\%$), a „#” jelölés pedig a kezeltlen és a kezelt törzsek közötti eltérést mutatja (# $p < 5\%$, ## $p < 1\%$, ### $p < 0,1\%$).

A



B



12. ábra Az ábrán az *A. nidulans* THS30.3 (kontroll) és a $\Delta gfdB$ törzs JC-1 fluoreszcens szignál intenzitása látható stresszmentes körülmények között (**A ábra**) és 0,4 mM *tBOOH* jelenlétében (**B ábra**). A relatív fluoreszcens intenzitást (RFU) a zöld és a piros fluoreszcencia maximumai közötti arányok összehasonlításával számítottuk ki: $RFU_{485/535}/RFU_{550/600} \times 100$. A diagramon 3 független mérés átlaga szerepel. A „*” jelölés a mutáns kontroll törzstől való szignifikáns eltérést (Student - féle t teszt; * $p < 5\%$, ** $p < 1\%$, *** $p < 0,1\%$), a „#” jelölés pedig a kezeltlen és a kezelt törzsek közötti eltérést mutatja (# $p < 5\%$, ## $p < 1\%$, ### $p < 0,1\%$).

4. Eredmények megbeszélése

Elkészítettük az *A. nidulans* fonalas gomba *gfdB* géndeléciós mutánsát (KA1-4) és megvizsgáltuk ozmotikus stresszt, oxidatív stresszt, sejtfalintegritás-stresszt és nehézfém stresszt okozó szerek jelenlétében, felületi tenyészetekben 37 °C-on, 5 napos inkubációt követően. A *gfdB* gén deléciója jelentős oxidatívstressz-érzékenységet eredményezett *tBOOH*, H_2O_2 és diamid jelenlétében (7. ábra, 3. táblázat, 5. táblázat). Ezek alapján elmondhatjuk, hogy a *gfdB* génnek nem az ozmotikus stressz elleni védelemben van szerepe, mint a *gfdA* génnek, hanem más környezeti stresszhatások, első helyen az oxidatív stressz kivédésében. Hasonló eredményeket kaptak Zhang és munkatársai, akik megvizsgálták a glicerín-3-foszfát dehidrogenáz ortológ géneket (*gfdA*, *gfdB*) az *A. fumigatus*-ban. Arra jutottak, hogy a *gfdA* gén elengedhetetlen a gomba növekedéséhez glükózt tartalmazó táptalajon normál körülmények és anaerob körülmények között. A *gfdA* gént viszont funkcionálisan nem helyettesítheti a *gfdB* gén, továbbá a *gfdB* génnek nincs szerepe az ozmotikus stressz elleni védelemben, csakúgy, mint az *A. nidulans*-ban (Zhang és mtsai., 2018).

A felületi kultúrák stresszvizsgálatainkban 37 °C-on azt találtuk még, hogy a $\Delta gfdB$ mutánsok érzékenyek voltak a sejtfalintegritás-stresszt generáló kongóvörösre is (7. ábra, 3. táblázat, 5. táblázat). Az *A. nidulans* $\Delta gfdA$ mutáns is érzékenynek bizonyult a sejtfal dezintegrációját okozó kalkofluor fehérre, továbbá a hifák növekedése is megváltozott; a hifaelágazások megduzzadtak és rövid hifaelágazások jelentek meg (Fillinger és mtsai., 2001). A $\Delta gfdA$ mutáns törzs gyengén növekedett különböző szénforrásokat tartalmazó táptalajokon. Amikor glicerint használtak szénforrásként, a mutáns gombatörzs növekedése nem maradt el a kontrollétól. Az összes szénforráson helyreállítható volt az eredeti fenotípus 1 M NaCl ozmotikus stabilizátorral

(Fillinger és mtsai., 2001). Elvégeztük mi is ezt a kísérletet különböző szénforrásokon 1 M NaCl-dal, illetve 2 M szorbittal kiegészített táptalajon, de nem tapasztaltunk különbséget a kontroll és a mutánsok növekedésében. Azaz a *ΔgfdB* törzs észlelt fenotípusai nem voltak ozmolitokkal remediálhatók.

5. táblázat Az *A. nidulans ΔgfdA* (Fillinger és mtsai., 2001) és *ΔgfdB* törzs fenotípusainak az összehasonlítása.

Törzsek	<i>ΔgfdA</i>	<i>ΔgfdB</i>
Oxidatívstressz-érzékenység	nincs adat	érzékeny (<i>t</i> BOOH, H ₂ O ₂ , diamid)
Sejtfalintegritásstressz-érzékenység	érzékeny (kalkofluor fehér)	érzékeny (kongóvörös)
Fenotípus helyreállása ozmotikus stabilizátor jelenlétében	1 M NaCl	–
Életképesség	nincs adat	csökkent
Apoptózis	nincs adat	növekedett
Poliol tartalom	glicerin	mannit, eritrit (stressz nélkül) mannit (<i>t</i> BOOH kezelésre)
Szterigmatocisztin termelés	nincs adat	növekedett

Felületi kultúrák kísérleteink alapján a *ΔgfdB* törzs jelentős oxidatívstressz-érzékenységet mutatott, így elmondhatjuk, hogy a *gfdB* gén ebben a fajban az oxidatív stressz elleni védelemben játszik szerepet. Ezek alapján megvizsgáltuk a mutáns törzsben az RS tartalom változását folyékony kultúrában stresszmentes körülménynek között és 0,4 mM *t*BOOH-val kezelt tenyészetekben is. Kezelés nélkül is négyszer olyan nagy volt az RS tartalom a mutánsban a kontrollhoz képest, viszont kezelés hatására mindkét törzsben jelentősen megnövekedett az RS szint; a géndeléciós törzsben nyolcszor olyan nagy volt, mint *t*BOOH nélkül. Mivel ilyen jelentősen megnövekedett a szabad gyökök és reaktív oxigén gyökök szintje a mutánsban, így meghatároztuk néhány antioxidáns enzim specifikus aktivitását is folyékony kultúrában. A megnövekedett specifikus GR aktivitások feltehetően a nagy RS szintek

semlegesítésére irányultak. Ezzel ellentétben a specifikus GPx és a kataláz enzimaktivitások oxidatív stresszor jelenlétében és anélkül is csökkentek a mutáns törzsben, ami önmagában eredményezhette az RS koncentrációk növekedését, másrészt valószínűleg emiatt még a megnövekedett specifikus GR aktivitás sem volt elegendő ahhoz, hogy helyreállítsa a redox egyensúly felborulását a $\Delta gfdB$ törzsben (**4. táblázat**).

Korábban leírták, hogy fonalas gombákban összefüggés van az oxidatív stresszválasz és a szekunder metabolit (mikotoxin) termelés között (Hong és mtsai., 2013; Leiter és mtsai., 2016). Továbbá számos tanulmányban bebizonyosodott, hogy az RS szint változása befolyásolja a *tBOOH* stresszor által indukált mikotoxin bioszintézist és lipid peroxidációt (Jayashree és Subramanyam, 2000; Reverberi és mtsai., 2008; Roze és mtsai., 2013; Yin és mtsai., 2013). Ezek alapján megvizsgáltuk a szterigmatocisztin termelés változását is, és azt tapasztaltuk, hogy a *gfdB* gén delécioja növelte a mikotoxin termelést folyékony kultúrában stresszmentes körülmények között és oxidatív stressz kezelés hatására is (**4. táblázat**, **5. táblázat**), mely megfigyelésünk összhangban van az eddigi irodalmi eredményekkel.

Tanulmányoztuk a *gfdB* géndeléciozás törzs folyékony tenyészetének az életképességét és a programozott sejthalálát. A mutáns törzs életképessége szignifikánsan csökkent a THS30.3 kontroll törzséhez képest 0,4 mM *tBOOH* jelenlétében és nélküle is (**11. ábra**, **5. táblázat**). Ehhez hasonló eredményeket kaptunk, amikor a sejtek apoptózist vizsgáltuk, ahol már 52 óra korban nagyobb volt a sejtek apoptotikus rátája a *gfdB* gén hiányában (**12. ábra**, **5. táblázat**). Megfigyelték az összefüggést fonalas gombákban az RS nagy intracelluláris akkumulációja és a sejtek apoptózisa között (Leiter és mtsai., 2016; Gonçalves és mtsai., 2017). Ezt a megfigyelést mi is alátámasztottuk a kísérleteinkben; a szabad gyökök és reaktív oxigén gyökök nagy akkumulációja maga után vonta a JC-1 fluoreszcens festékkel mért nagy

apoptotikus rátát. A $\Delta gfdB$ törzs sejtjeiben mért csökkent életképesség és nagy apoptotikus ráta arra utal, hogy a *gfdB* génnek szerepe van a sejtek életképességének fenntartásában és az apoptózis késleltetésében.

Munkánk során megvizsgáltuk a $\Delta gfdB$ törzs poliol tartalmát stresszmentes körülmények között 44 órás rázatott tenyészetekben és mannit, illetve eritrit cukoralkoholokat detektáltunk (**4. táblázat, 5. táblázat, 8. kiegészítő ábra A-B**). A *gfdB* gén deléciója hatással volt a mannit termelésre; szignifikánsan nagyobb volt a mutáns törzsben a kontrolléhoz viszonyítva, viszont az eritrit termelésre nem volt hatással a géndeléció. Fillinger és munkatársai (2001) is megfigyelték a poliol termelést a $\Delta gfdA$ törzsben és stresszmentes körülmények között 4,5-szer kisebb volt a mutánsban, mint a kontrollban. 1 M NaCl-dal való kezelést követően viszont mintegy húszszor nagyobb glicerintartalmat mértek a $\Delta gfdA$ és a kontroll törzs 24 órás tenyészeiben (**5. táblázat**). Egy korábbi tanulmányban megfigyelték, hogy az *A. nidulans* kései exponenciális fázisú rázatott tenyészeiben nincs glicerintermelés stresszmentes körülmények között (Beever és Laracy, 1986). Ezzel az irodalmi adattal összhangban, mi sem detektáltuk a $\Delta gfdB$ és a THS30.3 törzs kezeletlen 44 órás tenyészeiben glicerint.

Az *A. nidulans* törzsek poliol tartalmát megvizsgáltuk 0,4 mM *t*BOOH kezelés után is. Meglepő módon azt tapasztaltuk, hogy nem volt eritrittermelés sem a kontroll, sem pedig a mutáns törzsben (**4. táblázat, 5. táblázat**). Ez feltehetően azzal magyarázható, hogy a redukáló NADPH igény növekszik, amely a citoplazmában zajló pentóz-foszfát útvonal terméke (Varecza és mtsai., 2006), és amely útvonal az eritrit prekurzorának, az eritróz-4-foszfátnak is a forrása (Rzechonek és mtsai., 2018). Ez a megfigyelés azzal magyarázható, hogy a $\Delta gfdB$ törzsben megnövekedett specifikus GR aktivitást mértünk, hiszen az eukariótákban a GR enzim NADPH-t használ az oxidált glutation visszaredukálásához oxidatív stressz esetében (Emri és mtsai., 1997; Pócsi és

mtsai., 2004). Továbbá azt is megfigyeltük, hogy a *tBOOH* kezelés eredményeként a mannit termelés szignifikánsan növekedett a *ΔgfdB* mutánsban, míg a kontroll törzsben változatlan maradt (**4. táblázat, 5. táblázat**). Ez azért lehet, mert a redox egyensúly felborulásának helyreállításához a géndeléciós törzsnek nagyobb szüksége van valamilyen poliolra, mint a kontrollnak.

Számos tanulmányban megfigyelték, hogy oxidatív stressz alatt glicerinnel helyett mannit termelődik a sejtekben. Az *A. niger* fonalas gomba oxidatív stressznek kitett tenyészetében, a konídiumokban a mannit akkumulációját detektálták (Ruijter és mtsai., 2003). Chaturvedi és munkatársai szintén tanulmányozták, hogy a humánpatogén *Cryptococcus neoformans* oxidatív stressznek kitett tenyészetei is mannitot termelnek a gazdasejt inváziója alatt (Chaturvedi és mtsai., 1996). Továbbá a növénypatogén *Alternaria alternata* esetében is igazolták, hogy mannit termelődik a növények ezen gombával való fertőzésekor, valamint a növényi védelmi válaszokra reagálva (Jennings és mtsai., 1998). Ezek alapján elmondható, hogy a mannitnak fontos szerepe van a fonalas gombák oxidatív stressz elleni védelmi rendszerében. Korábbi kutatásokban igazolták, hogy a mannit gyökfogó molekulaként eliminálja a reaktív részecskéket (Smirnoff és Cumbes, 1989; Chaturvedi és mtsai., 1997; Hema és mtsai., 2014). Ezzel magyarázható, hogy a *gfdB* géndeléciós törzsben stresszmentes körülmények között is növekedett a mannit tartalom, mivel az RS szint is magas volt.

Ezzel ellentétben a glicerinnel inkább az ozmotikus stressznek kitett sejtekben van védő szerepe. Shen és munkatársai tanulmányozták, hogy vajon a mannit és a szorbit helyettesítheti-e a glicerint ozmotikus stressz alatt? A *S. cerevisiae* élesztő *gpd1Δgpd2Δ* duplamutánsában a mannit-1-foszfát dehidrogenáz, illetve a szorbit-6-foszfát dehidrogenáz gének heterológ

expressziója sem tudta teljesen pótolni a glicerín hiányát ozmotikus stressz alatt (Shen és mtsai., 1999).

Kutatásunkba bevontunk egy ozmofil fajt, az *A. glaucus* is, mivel ebben a fajban hiányzik a *gfdB* gén. Beépítettük tehát a *gfdB* gént az *A. glaucus* genomjába és felületi kultúrák kísérleteket végeztünk; megvizsgáltuk a fenotípusukat 25 °C-on, 5 és 10 napos inkubációt követően 2 M szorbit mellett. Továbbá az *A. glaucus* fonalas gomba nem képes 37 °C-on növekedni. Mivel 25 °C-on hosszabb tenyésztési idő szükséges, 5 nap eltelte után még csak a 'c *gfdB2* törzs kongóvörössel és MSB-vel kezelt tenyészetek telepátmérőiben láthattunk különbséget (**9. ábra, 5. kiegészítő ábra A-D**). Majd 10 napos tenyésztés után azt tapasztaltuk, hogy a *gfdB* gén inzerciója szignifikánsan nagyobb oxidatív (*t*BOOH, MSB, H₂O₂), sejtfalintegritás- (kongóvörös) és nehézfém- (CdCl₂) stresszel szembeni toleranciát eredményezett (**10. ábra, 6. kiegészítő ábra A-D**). Az *A. glaucus* kontroll törzs nagy CdCl₂ érzékenysége azzal magyarázható, hogy nem található a genomjában Pca1-típusú Cd(II) transzporter (de Vries és mtsai., 2017; Bakti és mtsai., 2018; Kurucz és mtsai., 2018). A *gfdB* gén beville viszont javított ezen faj nehézfém stressztoleranciáján. A leglátványosabb fenotípust 0,4 mM *t*BOOH mellett mutatták a transzgén törzsek, hiszen itt a *gfdB* gén teljesen visszaállította a kontroll törzs stresszmentes kultúrában észlelt fenotípusát (**10. ábra, 6. kiegészítő ábra A-D**). Ebből arra következtethetünk, hogy a *gfdB* gén élettani szerepe hasonló lehet a különböző *Aspergillus* fajokban.

Megvizsgáltuk ugyanilyen körülmények között (25 °C, 10 nap, minimál táptalaj) az *A. nidulans* Δ *gfdB* törzs stresszérzékenységet is ugyanezen stresszorokkal. Hasonló eredményeket kaptunk, hiszen a *gfdB* gén delécioja növelte a gomba stresszérzékenységet oxidatív, sejtfalintegritás és nehézfém stresszorok jelenlétében is (**8. ábra, 4. kiegészítő ábra A-C**).

Az *A. glaucus* törzsek stresszérzékenységet 1 M NaCl jelenlétében is megvizsgáltuk 10 napos inkubációt követően. Nem detektáltunk szignifikáns különbséget a kontroll és a mutánsok növekedésében (**7. kiegészítő ábra A-E**). Ez feltehetően azért van, mert az *A. glaucus* gomba stresszmentes körülmények között is lassabban nő NaCl jelenlétében, mint szorbit mellett. Tehát valószínű, hogy a NaCl gátolhatja a gomba különböző stressztípusokhoz való alkalmazkodását (Orosz és mtsai., 2018).

Munkánk alapján elmondhatjuk, hogy a *gfdB* gén akkor is megtartotta az oxidatív stressz, a sejtfalintegritás-stressz és a nehézfém stressz elleni védelemben betöltött szerepét, amikor bevittük az *A. glaucus* fonalas gomba genomjába. Ezt bizonyítja az is, hogy az *A. nidulans*ban jelentős stresszérzékenységet okozott a *gfdB* gén delécioja. Továbbá, a *gfdB* gén megtartotta a funkcióját még azután is, hogy transzformáltuk egy másik *Aspergillus* fajba. Az evolúció folyamán a *gfd* glicerín-3-foszfát dehidrogenázt kódoló gén a duplikáció után szubfunkcionalizáción (a paralógokban megoszlik az eredeti gén funkciója) és/vagy neofunkcionalizáción (az egyik paralóg megtartja az eredeti gén funkcióját, a másik új funkciót kap) ment keresztül, és a két génnek (*gfdA*, *gfdB*) eltérő funkciója alakult ki. A gombákban gyakran előfordulnak olyan gének, amelyeknek két izoformájuk alakult ki a génduplikáció révén (Papp és mtsai., 2003; Emri és mtsai., 2018), ezekben az esetekben szintén megfigyelhető a szubfunkcionalizáció és a neofunkcionalizáció. Erre példa a *Candida albicans* sarjadzóélesztő protein kináz A génjei, a *TPK1* és a *TPK2* gének (Giacometti és mtsai., 2009, 2011), továbbá a *S. cerevisiae* élesztő TOR kináz génjei, a *TOR1* és a *TOR2* (Weisman, 2004), valamint az *A. nidulans* mitogén aktivált protein kináz

génjei, a *hogA/sakA* és az *mpkC* gének (Pereira Silva és mtsai., 2017; Garrido-Bazán és mtsai., 2018).

Munkánk kezdetekor azt a hipotézist fogalmaztuk meg, hogy a *gfdB* gén hiánya miatt alakulhatott ki az *A. glaucus* és az *A. wentii* ozmofilitása. Ezt a feltételezésünket az Orosz és munkatársai (2018) által elvégzett stresszkísérletek (ozmofilitás fenotípusos megnyilvánulása), illetve Miskei Márton filogenetikai vizsgálatainak (*gfdB* gén hiánya a két ozmofil fajban) az eredményeire alapoztuk. Elméletünket megerősítette a Fillinger és munkatársai (2001) által elkészített *gfdA* géndeléciós mutáns, mely ozmolitokkal remediálható fenotípust mutatott, valamint a *gfdB* gén up-regulációja NaCl expozíció mellett (Balázs és mtsai., 2010).

Eredményeink számos új információt tártak fel a glicerín-3-foszfát dehidrogenázt kódoló génekről *Aspergillus* fajokban. Adataink alapján elmondhatjuk, hogy az *A. nidulans*ban a *gfdB* gén szerepe az oxidatív, nehézfém- és sejtfalintegritás-stresszel szembeni toleranciában, a sejtek életképességének fenntartásában és az apoptózis késleltetésében nyilvánult meg. Ezen glicerín metabolikus enzim deléciója feltehetőleg azért eredményezett mannit túltermelést közvetett módon, mert az idősebb tenyészetekre jellemzőbb a mannit akkumulálása, míg a fiatalabb tenyészetek inkább glicerint halmoznak fel. Beever és Laracy (1986) sem detektáltak glicerint az *A. nidulans* kései exponenciális fázisú folyékony tenyészeiben stresszmentes körülmények között. Továbbá számos tanulmány kimutatta, hogy a mannitnak kiemelkedő szerepe van az oxidatív stresszel szembeni védelemben (Chaturvedi és mtsai., 1996; Jennings és mtsai., 1998; Ruijter és mtsai., 2003).

A *gfdB* gén beépítése az *A. glaucus* gombába növelte az oxidatív-, a sejtfalintegritás- és a nehézfémstressz-toleranciát, de nem volt hatással az ozmofilitásra. A Balázs és munkatársai (2010) által elvégzett génexpressziós

vizsgálatokban egyik *gfd* gén sem reagált oxidatív stresszre, viszont ozmotikus stresszre a *gfdB* gén up-regulációját figyelték meg. Az általunk elkészített *A. nidulans* *gfdB* géndeléciós mutánsok a várttal ellentétes fenotípust mutattak, feltehetőleg azért, mert ozmotikus stressz esetén a *gfdA* a fő védőelem, így nem indukálódik tovább NaCl expozíció hatására. A *gfdA* delécióját nem képes a *gfdB* up-regulációja sem kompenzálni ozmotikus stressz esetén. Viszont a *gfdB* gén delécióját a *gfdA* képes ellensúlyozni ozmotikus stressz esetében. Egy korábbi tanulmány szerint egy génnek kiemelt szerepe lehet a stresszvédelemben, attól függetlenül, hogy nem reagál oxidatív stressznek kitett környezetben, hiszen egyetlen oxidatív stresszor sem reprezentálja az általános oxidatív stresszt. Az oxidatív stressz elleni védelemben fontos szerepe van többek között a transzkripciónak, a fehérjeforgalomnak, valamint a vakuoláris funkcióknak is (Thorpe és mtsai., 2004).

Ahhoz, hogy eredményeinket megerősítsük, a jövőben további glicerín-3-foszfát dehidrogenáz paralóg génpárok vizsgálata szükséges különböző fajokban, hiszen a stressz védelmi szabályozás sokkal komplexebb ezen géneken keresztül, mint azt várnánk. Ezek alapján tervezzük az *A. wentii* ozmofil fonalas gomba *gfdB* transzgén törzseinek az előállítását is és az elkészült mutánsok fiziológiai vizsgálatát (de Vries és mtsai., 2017; Orosz és mtsai., 2018).

5. Anyagok és módszerek

5.1 A vizsgálatainkhoz felhasznált törzsek és a mutánsok elkészítése

A kísérleteinkben az alábbi törzseket használtuk fel:

1. *A. nidulans* THS30.3 (*pyrG89*, *AfupyrG*⁺; *pyroA*⁺; *veA*⁺)
2. *A. nidulans* rJMP1.59 (*pyrG89*, *pyroA4*; *veA*⁺)
3. *A. nidulans* rRAW16 (*pyrG89*, *yA2*; *veA*⁺)
4. *A. nidulans* $\Delta gfdB$ (*pyrG89*; $\Delta gfdB::AfupyrG$ ⁺; *pyroA*⁺; *veA*⁺) mutánsok (KA1-4, melyekkel stresszérzékenység vizsgálatokat végeztünk, a többi kísérlethez a KA1 mutánst választottuk, mivel átlagos stressz érzékenységi fenotípusokat mutatott)
5. *A. glaucus* (*Eurotium herbariorum*) CBS 516.65
6. *A. glaucus* 'c *gfdB* mutánsok
7. *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404

Az *A. glaucus* CBS 516.65 törzset Prof. Dr. Ronald de Vries (Westerdijk Fungal Diversity Institute, Utrecht, The Netherlands), az *A. tumefaciens* LBA4404 törzset és a pAg-H3 plazmidot pedig Prof. Dr. Molnár István (The School of Plant Sciences, College of Agriculture and Life Sciences, The University of Arizona, Tucson, USA) bocsátották a rendelkezésünkre.

5.1.1 Az *A. nidulans* *gfdB* géndeléciós mutánsok elkészítése a Double-Joint PCR módszerrel

A *gfdB* (glicerín-3-foszfát dehidrogenáz, locus ID: AN6792) gén delécióját a Double-Joint PCR módszerrel hajtottuk végre (Yu és mtsai., 2004; Leiter és mtsai., 2016). Az első lépésben a géndeléciós kazetta három részegységének az amplifikálása történt meg. PCR reakcióval felszaporítottuk a deletálni kívánt géntől upstream (5'-flanking régió) és downstream (3'-flanking régió) elhelyezkedő szekvenciákat, illetve a szelekciós marker gént, amely komplementálja a recipiens törzs auxotrófiáját. Marker génnek az *A. fumigatus* *pyrG* génjét használtuk.

A következő primerpárokat használtuk fel:

1. *gfdB* gén 5'-flanking régió:

Forward: 5'-CTCTCAGATGAGATTGATAAATTTATTAAGTCA-3'

Reverse: 5'-**GCTTTGGCCTGTATCATGACTTCA**

CTGCCAGGTTGTTTGTGGTGCCTTGCCATAATG-3'

2. *gfdB* gén 3'-flanking régió:

Forward: 5'-**ATCGACCGAACCTAGGTAGGGTA**

GTGATGCAGGTACATGCGTACTCTTGCGCG-3'

Reverse: 5'-GCTTCACCTGAGGCTCTGCCGACGGAGTCG-3'

3. *AfupyrG* szelekciós marker

Forward: 5'-TGAAGTCATGATACAGGCCAAAGC-3'

Reverse: 5'-ATCGACCGAACCTAGGTAGGGTA-3'

4. *gfdB* gén nested

Forward: 5'-CGAGGCTGGATTGGTGTAAAGTGATTACAGAGT-3'

Reverse: 5'-GCACGCAACTCCCACCTGACCTTGTCGAAATCA-3'

A második lépésben történt meg a három szakasz fúziója ebben a sorrendben: 5'-flanking régió – marker gén – 3'-flanking régió. Ehhez olyan kiméra primereket használtunk, amelyek a szomszédos kazetta-elemekkel történő összeszerelést biztosították. A harmadik lépésben pedig a nested primerekkel a teljes deléciós kazettát amplifikáltuk. Ezt követően az *A. nidulans* rJMP1.59 törzs protoplasztjait (a sejtfalat a Vinoflow FCE enzimmel emésztettük) transzformáltuk 6 µg tisztított PCR termékkel (deléciós kazetta) (Szewczyk és mtsai., 2006). A sikeres transzformálást az uracil, uridin prototróf törzsek megjelenése jelezte, melyet Southern blot segítségével ellenőriztünk. A sikeres deléciós törzseknél a megmaradt piridoxin auxotrófiát az *A. nidulans* rRAW16 (*pyrG89*, *yA2*; *veA*⁺) keresztezéssel szüntettük meg (Leiter és mtsai., 2016), majd Southern blot hibridizációval ellenőriztük a géncserét a prototróf törzsekben is.

5.1.2 Az *A. glaucus* *gfdB* transzgén törzsek elkészítése *Agrobacterium*-indukált transzformálással

Az *A. glaucus* *Agrobacterium*-indukált transzformálásához a pAg-H3 plazmidot használtuk. A *gfdB* gént a feltételezett promóter és terminátor szekvenciájával együtt klónoztuk a pAg-H3 plazmid SmaI-AwrII helyére, ezt követően transzformáltuk az *A. tumefaciens* sejtekbe elektroporációval. Az *A. tumefaciens*-indukált transzformálást Kozák és munkatársai 2018-as munkája alapján végeztük el, kisebb módosításokkal. Az *A. glaucus* CBS 516.65 törzset 6 napig spóráztattuk 0,5 M NaCl-dal kiegészített malátás táptalajon 25 °C-on, majd az összegyűjtött micéliumot 5 ml desztillált vízben szuszpendáltunk fel és 2×10^7 spórát 50 ml mesterséges tengervízbe oltottunk 500 ml-es Erlenmeyer lombikba, amelyet 28 °C-on, 48 órán át rázattunk 180 rpm-en. Ezután a tenyészetet centrifugáltuk (2000 g, 5 perc, RT), leöntöttük a felülúszót és 50 ml friss mesterséges tengervízbe vettük fel, majd további 24

órán keresztül rázattuk 180 rpm-en, 28 °C-on. Újra centrifugáltuk (2000 g, 5 perc, RT), majd 40 ml desztillált vízben mostuk és beoltottuk IM (Indukciós médium, Michielse és munkatársai 2005) folyékony táptalajba (100 mg/ml nedves biomassa IM-be oltva), amelyet 200 µM acetosziringonnal egészítettünk ki, majd 8 órán át 28 °C-on rázattuk 180 rpm-en.

Az *A. tumefaciens* tenyésztése Kozák és munkatársai (2018) leírása alapján történt. Az *A. glaucus* tenyészet 100 µl-ét 75 µl *A. tumefaciens* tenyészettel – amely hordozta a *gfdB*-pAg-H3 plazmidot – együtt 200 µM acetosziringont tartalmazó IM szilárd tápagarra szélesztettük (Michielse és mtsai., 2005) és 6 napig, 28 °C-on inkubáltuk. Ahhoz, hogy kiválogassuk a transzformánsokat és gátoljuk az *A. tumefaciens* növekedését, a táptalajok tetejére topagart öntöttünk (az IM topagar 0,5 M NaCl-ot tartalmazott és 200 µg/ml higromicinnel, illetve 600 µg/ml cefotaximmal egészítettük ki), majd a Petri csészéket 10 napon keresztül inkubáltuk 28 °C-on. Azokat a higromicin-rezisztens telepeket, amelyek kinőttek a táptalajok felszínén, 200 µg/ml higromicint és 600 µg/ml cefotaximot tartalmazó malátás táptalajra oltottuk át és 7 napig növesztettük 28 °C-on. Végül a kinőtt telepeket még négyszer átoltottuk ugyanilyen összetételű tápagarra (Kozák és mtsai., 2018).

5.2 A vizsgált *Aspergillus* gombatörzsek tenyésztése

5.2.1 Felületi tenyészetek

Az *A. nidulans* törzseket 6 napon keresztül szilárd Barratt-féle minimál táptalajon (Barratt és mtsai., 1965) spóráztattuk 37 °C-on, és a 6. napon összegyűjtöttük a spórákat a stresszkísérletekhez. Az *A. glaucus* törzsek tenyésztése 0,5 M NaCl-ot tartalmazó malátás táptalajon történt 25 °C-on 6 napon keresztül (de Vries és mtsai., 2017; Orosz és mtsai., 2018).

5.2.2 Rázott tenyészetek

Az *A. nidulans* törzseket 100 ml minimál táplevest tartalmazó 500 ml-es Erlenmeyer lombikokban növesztettük fel. A tápoldat 100 ml-ébe 1×10^8 spórát oltottunk be és a törzseket 220 rpm-mel rázattuk 37 °C-on. Az oxidatív stresszt generáló 0,4 mM tBOOH-val a kései exponenciális növekedési fázisban (20 óra) kezeltük a tenyészeteket, majd 10 és 24 órás stressznek való kitettséget követően vettünk mintát a tenyészetekből (Yin és mtsai., 2013).

5.2.3 Alkalmazott táptalajok

Az alkalmazott táptalajok komponensei vízben (dH₂O) voltak feloldva.

A minimál táptalaj összetétele:

20 g/l agar

10 g/l glükóz

5 v/v % 20x NSS oldat

0,1 v/v % nyomelem oldat

pH 6,5

A malátás táptalaj a következő komponensekből állt:

30 g/l maláta kivonat

15 g/l agar

5 g/l mikológiai pepton

pH 6,0

A 20x NSS (nitrátos sóoldat „nitrate salt solution”) oldat összetétele a következő volt:

6 g/l NaNO₃

1,5 g/l KH₂PO₄

0,5 g/l MgSO₄·4H₂O

0,5 g/l KCl

A spóramosó folyadék összetevői:

9 g/l NaCl

100 µl/l Tween 80

A nyomelem oldat az alábbi komponensekből tevődött össze:

50 g/l EDTA
22 g/l $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
11 g/l H_3BO_3
5 g/l $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
5 g/l $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
1,6 g/l $\text{CoSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
1,6 g/l $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
1,1 g/l $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$

A mesterséges tengervíz alkotóelemei a következők voltak:

24,5 g/l NaCl
20 g/l maltóz
20 g/l mannit
10 g/l glükóz
10 g/l nátrium-glutamát
6 g/l élesztő kivonat
4,98 g/l MgCl_2
3,92 g/l Na_2SO_4
0,91 g/l CaCl_2
0,664 g/l KCl
0,5 g/l KH_2PO_4
0,3 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
0,192 g/l NaHCO_3
0,096 g/l KBr
0,026 g/l H_3BO_3

Az IM (Indukciós médium) összetevői:

40 ml/l 1,0 M MES (pH 5,5)
20 ml/l MN puffer (30 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 15 g/l NaCl)
10 ml/l v/v % glicerín
10 ml/l 20w/v % glükóz
10 ml/l 0,01 w/v % FeSO_4
5 ml/l nyomelem oldat (0,1 g/l $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,1 g/l $\text{CuSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,1 g/l H_3BO_3 , 0,1 g/l $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,1 g/l $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
2,5 ml/l 20 w/v % NH_4NO_3
1 ml/l 1 w/v % $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
0,8 ml/l K puffer (1,25 M K_2HPO_4 , 1,25 M KH_2PO_4 , pH 4,8)

5.3 A vizsgált *Aspergillus* gombatörzsek genotípusának ellenőrzése

5.3.1 Southern blot hibridizáció

Az *A. nidulans* kontroll és a *gfdB* géndeléciós mutáns törzsek genomai DNS-ét NdeI restrikciós endonukleázzal hasítottuk, ezt követően elválasztottuk 1 %-os agaróz gélen. A gél 20 percig depurináló oldatban (20 ml/l 37 % HCl vízben oldva), majd 20 percig denaturáló oldatban (20 g/l NaOH, 87,6 g/l NaCl vízben oldva), ezt követően pedig 20 percig neutralizáló oldatban (121,14 g/l Tris, 37,224 g/l EDTA, 87,6 g/l NaCl vízben oldva, pH 8,0) rázattuk. A DNS-t ezután Immobilon-Ny+ (Millipore) membránra transzferáltuk 1 órán át, vákuum blottoló segítségével. A transzfer közben 10x SSC oldattal tartottuk nedvesen a membránt. A membránon a DNS-t 80 °C-os, 20 percen át tartó szárítással és UV-sugárzással rögzítettük. Ezután a prehibridizációs oldat (10 g/l 1 % BSA, 500 ml/l 1 M Na₂HPO₄, 350 ml/l 20 % SDS, 2 ml/l 0,5 M EDTA, 150 ml/l víz) 6 ml-éhez 60 µl hering sperma DNS-t adtunk, melyet előzőleg 5 percig forraltunk, majd az oldatot és a membránt hibridizációs csőbe helyeztük. A prehibridizációt három órán át végeztük 50 °C-on. A próba alapjaként szolgáló fragmentet (*gfdB* gén upstream régió) PCR segítségével amplifikáltuk. A jelölést DIG DNA Labeling and Detection kittel (Roche) végeztük a gyártó utasításai szerint. A hibridizáció folyamán a jelölt próbát 10 percig forraltuk, majd hűtöttük, ezután hozzáadtuk a prehibridizációs oldatot tartalmazó membránhoz. A hibridizációt a próbával a cső állandó forgatása mellett végeztük egy éjszakán keresztül, 50 °C-on. Ezután mosó oldattal (40 ml/l 1 M Na₂HPO₄, 50 ml/l 20 % SDS, 2 ml/l 0,5 M EDTA) mostuk a membránt kétszer 20 percig, 55 °C-on. A Southern blot előhívását a DIG DNA Labeling and detection kittel (Roche) végeztük el a gyártó által leírt módon.

5.3.2 Kópiaszám meghatározás

Genomi DNS izolálás *A. glaucus*ból

A genomi DNS izolálás a mesterséges tengervízben felnevesztett tenyészetek micéliumaiból történt. A gombamicéliumot zsugorított üvegszűrőn szűrtük át, majd mostuk desztillált vízzel, ezt követően a hifát üvegyöngy segítségével feltártuk, és ehhez 500 µl lízis puffert adtunk hozzá. A lízis puffer összetevői a következők voltak: 50 ml/l 1 M Tris-HCl (pH 7,5), 100 ml/l 0,5 M EDTA (pH 8,0), 33 ml/l 10% SDS. Ezután a mintákat 65 °C-on 15 percig – közben 5 percenként vortexelve –, majd jégen 5 percig inkubáltuk, ezt követően 100 µl 8 M K-acetát oldatot adtunk hozzájuk és 13000 rpm-en centrifugáltuk 4 °C-on 15 percig. A felülúszót átmértük Eppendorf csövekbe és hozzámértünk 300 µl izopropanolt. Ennek hatására a DNS kicsapódott, amit centrifugálással gyűjtöttünk be 13000 rpm-en 4 °C-on 15 percen keresztül. A pelleteket 1000 µl -20 °C-ra lehűtött 70 %-os etanollal mostuk, ezután centrifugáltuk 13000 rpm-en 4 °C-on 5 percig. Végül a pelletokról leöntöttük a felülúszót és a genomi DNS-t nukleázmentes vízben szuszpendáltuk, majd NanoDrop segítségével meghatároztuk a tisztaságát, illetve a koncentrációját is.

A kópiaszám meghatározásához az ismert koncentrációjú *A. glaucus* transzgén törzsek genomi DNS-éből hígítási sort készítettünk. Egy kópiás referenciagénként az *Aspg1_0039306* (*A. nidulans* γ-glutamilszteinszintetáz ortológ) gént használtuk. A qPCR reakcióhoz a hígítási sor a következő volt: 320 ng, 160 ng, 80 ng, 40 ng, 20 ng, 10 ng DNS tartalom 7 µl térfogatra vonatkoztatva. A 96 well plate egy reakciójához 7 µl adott koncentrációju genomi DNS-t, 10 µl Fast SYBR® Green master mixet (Applied Biosystems by Life Technologies), 0,4 µl forward primert, 0,4 µl reverse primert és 2,2 µl nukleázmentes vizet adtunk. Minden koncentrációra

minden primer párral három párhuzamos mérést végeztünk a LightCycler®480 készüléken (Roche). A qPCR lépési a következők voltak:

1. 95 °C 2 perc
 2. 95 °C 5 másodperc
 - 51 °C 10 másodperc
 - 65 °C 20 másodperc
 3. 95 °C 15 másodperc
 - 51 °C 15 másodperc
 - 95 °C folyamatos
 4. 37 °C 1 másodperc
- } 40x

A kópiaszám vizsgálathoz az alábbi primerpárokat használtuk fel:

1. AN6792 (*gfdB*)

Forward: 5'-TGAAAGGCACACGGGGTAAT-3'

Reverse: 5'- AGGTTGAGCAGCGGAAAGAG-3'

2. *Aspgl1_0039306* (AN3150; γ -glutamilcisztein-szintetáz ortológ)

Forward: 5'- ATGGGCTGGACTAACTGGGT-3'

Reverse: 5'- GACGGCGACAACGAGGTATT-3'

A *gfdB* gén kópiaszámát az alábbiak szerint határoztuk meg (Herrera és mtsai., 2009) :

A genomi DNS koncentrációk logaritmusát a C_T értékek függvényében ábráztuk, majd a kapott adatsorra lineáris trendvonalat illesztettünk, így megkaptuk a regressziós egyenes (standard görbe) egyenletét és determinációs együtthatóját (R^2):

$$C_T = m (\log \text{ mennyiség}) + b$$

$$y = mx + b$$

Mivel a kapott standard görbe esetében az $R^2 > 0,98$, így kiszámítható a teljes kópiaszám, melyet az abszolút kvantifikáció módszerének segítségével határoztunk meg a következő összefüggés alapján:

$$\text{teljes } gfdB \text{ kópiaszám} = 10^{(LC_T - b)/m}$$

Ahol a C_T jelöli azt a ciklust, ahol a PCR reakcióban a mért fluoreszcencia átlépte a küszöbértéket, b a hígítási sor C_T értékei alapján kapott kétismeretlenes egyenlet y tengelyének metszéspontja, m a meredeksége. A gén kópiaszámát ezt követően az alábbi egyenlet alapján számítottuk ki:

$$\text{gfdB kópiaszám per genom} = (\text{teljes } gfdB \text{ kópiaszám}) / (\text{teljes } Aspgl1_0039306 \text{ kópiaszám})$$

5.4 A vizsgált *Aspergillus* gombatörzsekkel végzett stresszkísérletek

A vizsgált *A. nidulans* törzseket Barratt-féle minimál tápagaron tenyésztettük 37, illetve 25 °C-on, 6 napon keresztül. Az *A. glaucus* törzseket 25 °C-on spóráztattuk 0,5 M NaCl-dal kiegészített malátás táptalajon 6 napig. Ezután összegyűjtöttük a spórákat és 1×10^5 számú friss spórát különböző stresszt generáló szereket tartalmazó minimál táptalajra, illetve az *A. glaucus* esetében 2 M szorbittal, valamint 1 M NaCl-dal kiegészített minimál táptalajra pont inokuláltuk (Balázs és mtsai., 2010; de Vries és mtsai., 2017; Orosz és mtsai., 2018). Az alkalmazott stressz ágensek és koncentrációik a következők voltak:

- hiperozmotikus stressz: 2 M szorbit, 1 M NaCl
- oxidatív stressz: 0,4 és 0,8 mM *t*BOOH, 6 és 9 mM H₂O₂, 1,5 és 2 mM diamid, 0,096 és 0,19 mM MSB
- sejtfalintegritás-stressz: 54 µM kongóvörös
- nehézfémstressz: 0,1 és 0,3 mM CdCl₂

A felületi kultúrákat 5 napon át inkubáltuk 37 °C-on (*A. nidulans*), illetve 5 és 10 napon át 25 °C-on (*A. glaucus*, *A. nidulans*), majd az 5. és a 10. napon

lemértük az átmérőjüket, ezzel jellemezve a stresszérzékenységüket. Relatív növekedési adatokat számoltunk százalékban kifejezve, a vad típusához, illetve a kezeletlen törzsekhez viszonyítva.

5.5 Az *A. nidulans* THS30.3 és $\Delta gfdB$ törzs életképességének és a sejtek apoptózisának a vizsgálata

Az életképesség tesztet Gun Lee és munkatársai által leírt módszer módosított változatával hajtottuk végre. 0,5 ml tenyészetéhez 0,5 ml friss tápoldatot, valamint 10 mg/ml-es MTT (metiltiazoltetrazolium bromid) oldatot adtunk hozzá és 4 órán keresztül rázattuk 220 rpm-en, 37 °C-on. Ezután 0,3 ml savas SDS oldatot (200 g/l SDS 20 mmol/l HCl-ban) pipettáztunk hozzá és rázattuk 220 rpm fordulatszámon, 20 órán át, 37 °C-on. Ezt követően centrifugáltuk a mintákat 10000 g fordulatszámon, szobahőmérsékleten 5 percig. A minták felülúszóját 550 nm-en mért abszorbanciájával jellemeztük, mellyel megadtuk az élő sejtek által redukált MTT mennyiségét (Gun Lee és mtsai., 1999).

A mitokondriális membránpotenciál tanulmányozásához JC-1 fluoreszcens festéket (1-[(1,3-dietil)-(5,6-diklór)-benzoimidazólium]-3-[(1,3-dietil)-(5,6-diklór)-benzoimidazol]-prop-1-én-jodid) használtunk a gyártó leírásának megfelelően (JC-1 Mitochondrial Membrane Potential Detection kit, Biotium). A JC-1 festék monomer állapotban gerjesztésre zöld színű, az egészséges mitokondriumokban akkumulálódva viszont piros jelet ad. Azokban az apoptotikus sejtekben, amelyekben csökkent membránpotenciállal rendelkező mitokondriumok vannak jelen, kizárólag zöld szín figyelhető meg, az ép sejtekben viszont a piros szín is látható.

5.6 Az *A. nidulans* THS30.3 és $\Delta gfdB$ törzs poliol tartalmának a vizsgálata

Az *A. nidulans* törzsek által termelt poliol tartalom meghatározását liofilizálással előkészített mintákkal végeztük el HPLC módszerrel. A mérések Dr. Gyémánt Gyöngyi egyetemi docens és munkatársai (Debreceni Egyetem, Természettudományi és Technológiai Kar, Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék) jóvoltából készültek el.

A THS30.3 és a $\Delta gfdB$ törzs liofilizált tenyészeiből 20 mg-ot szuszpendáltak 1000 μ l vízben. Ezt követően centrifugálták és 0,2 μ m-es fecskendőszűrőn szűrték, majd 10 μ l mintát injektáltak a kationcserélő oszlopra (Aminex HPX-87H, 5 μ m, 4,6 * 150 mm) 1 ml/perc áramlási sebességű gradiens elúciót alkalmazva. Az elválasztáshoz alkalmazott eluens 5 mM H₂SO₄ volt. A diódasoros detektálás (Diode Array Detector, DAD) folyamán 191 nm-es hullámhosszat alkalmaztak (Huber és Bonn, 1995). A megfelelő standardekre való kalibrálást követően a csúcsterületeken alapuló kvantitatív méréseket végeztek.

Az *A. nidulans* törzsek által termelt poliolokat NMR-alapú metabolomikával is meghatároztuk Witteveen és munkatársai leírásának módosításával. A liofilizált micéliumot 0,1 M 35 (w/w) % deutérium-kloridban vettük fel, majd jégen hűtöttük és alaposan vortexeltük. Ezt követően 4 °C-on, 10 percig, 13000 rpm-en centrifugáltuk. A felülúszót K₂CO₃-tal neutralizáltuk, újra centrifugáltuk (4 °C, 10 perc, 13000 rpm) és a felülúszót használtuk fel az NMR mérésekhez. A méréseket Prof. Dr. Kövér Katalin egyetemi tanár és munkatársai (Debreceni Egyetem, Természettudományi és Technológiai Kar, Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék) végezték el. A poliolokat ¹H és ¹³C NMR spektroszkópiával azonosították (Witteveen és mtsai., 1990). A

méréseket 298 K-en Bruker Avance II és Avance NEO spektrométeren végezték 500 és 700 MHz frekvencián.

5.7 Az *A. nidulans* THS30.3 és $\Delta gfdB$ törzs RS tartalmának, antioxidáns enzimtermelésének és mikotoxin termelésének a vizsgálata

A sejtek RS tartalmának tanulmányozásánál a kontroll és a mutáns törzs tenyészetéhez hozzáadtunk 10 $\mu\text{mol/l}$ -es végkoncentrációban 2',7'-diklórfluorescein diacetátot (Halliwell és Gutteridge, 2007). A 2',7'-diklórfluorescein (DCF) – mely egy óra alatt képződött – koncentrációját a feltárt mintákból DCF-fel készült kalibráló sor segítségével határoztuk meg fluorimetriás módszerrel ($\lambda_{\text{ext,DCF}} = 502 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em,DCF}} = 523 \text{ nm}$) (Emri és mtsai., 1997). A sejteket 1 ml 5 w/v %-os 5'-szulfoszalicilsav oldatban vettük fel, ezt követően a minták tárolása -20°C -on történt. A sejtfaltörmeléket a mérés előtt 20 percig, 4°C -on inkubáltuk, majd centrifugáltuk (10 perc, 10000 g, 4°C) és a felülúszót használtuk a további munkához. A mintákban mért DCF tartalmat a sejtek száraztömegére vonatkoztattuk és mmol/kg DCM dimenzióban határoztuk meg.

Az antioxidáns enzimaktivitás mérésekhez a törzsek tenyészetét (15 ml) zsugorított üvegszűrőn szűrtük át, a szűrt micéliumot pedig desztillált vízzel mostuk, majd jéghideg 0,1 M-os nátrium-foszfát pufferben (pH 7,5) vettük fel és a szuszpenziót -20°C -on fagyasztottuk meg. Ezután a mintákat 0,5 mm-es üveggyöngyök segítségével tártuk fel 5000 rpm-en, 30 másodperc alatt, majd centrifugáltuk (Emri és mtsai., 1997). A minták glutation reduktáz (GR) (Pinto és mtsai., 1984), glutation peroxidáz (GPx) (Chiu és mtsai., 1976), kataláz (Roggenkamp és mtsai., 1974) és szuperoxid dizmutáz (SOD) (Oberley és

Spitz, 1984) aktivitását határoztuk meg. Az enzimek reakcióelegyének végtérfogata 1 ml volt a következő komponensekkel:

- Glutation reduktáz: 0,1 mol/l nátrium-foszfát pufferben (pH 7,6) vettünk fel 0,1 mmol/l NADPH-t, 1,5 mmol/l oxidált glutationt (GSSG) és 10 v/v % mintát. A NADPH fogyás sebességét fotometriásan mértük $\lambda = 340$ nm-en (Pinto és mtsai., 1984).

- Glutation peroxidáz: TRIS-HCL-EDTA pufferben (50 mM TRIS/HCL, 0,091 mM EDTA, pH 7,6) 1 mmol/l kumán-hidroperoxidot, 1 mmol/l NADPH-t, 1 mmol/l redukált glutationt és 440 U/l GR-t oldottunk fel. A U, „unit” (egység) az egy perc alatt létrejött 1 μ mol reakcióterméket adja meg. A GPx aktivitásának meghatározásakor az 1 perc alatt 1 μ mol GSSG-t redukáló enzim mennyiség az 1U. A reakció színváltozását 1 percre mértük $\lambda = 340$ nm-en (Chiu és mtsai., 1976).

- Kataláz: 20 mmol/l Hepes pufferhez (pH 7,6) 0,1 mmol/l H_2O_2 -t és 1 v/v % mintát adtunk hozzá. A kataláz aktivitását 1 percre mértük $\lambda = 240$ nm-en a H_2O_2 mennyiségének csökkenésével (Roggenkamp és mtsai., 1974).

- Szuperoxid dizmutáz: 50 mmol/l kálium-foszfát puffer (pH 7,8) 1,4 mmol/l nitrokék tetrazolium kloridot (NBT, „nitro-blue tetrazolium chloride”) és 0,2 mmol/l xantint tartalmazott. A reakciót a kálium-foszfát pufferben feloldott 10 U/l xantin oxidáz hozzáadásával indítottuk el és 1 percre mértük a reakcióelegy abszorbancia változását $\lambda = 560$ nm-en. A SOD aktivitásának meghatározásakor az 1 perc alatt 1 μ mol xantint karbamiddá átalakító enzim mennyiség az 1U (Oberley és Spitz, 1984).

Bradford reagenst (Bradford, 1976) használtunk a minták fehérje tartalmának a meghatározásához. Az enzimaktivitásokat mkat/kg (a kataláz esetében kat/kg fehérje) dimenzióban adtuk meg a minták fehérjetartalmának megfelelően.

A szterigmatocisztin mennyiségének meghatározásához a micéliumból liofilezést követően 20 mg-ot kimértünk, majd a szterigmatocisztint 500 µl 70 v/v %-os acetone oldat segítségével extraháltuk. Centrifugálás után a felülúszó 25 µl-et szilikagél vékonyrétegre vittük fel. A futtatószer összetétele a következő volt: 80 v/v % toluol, 10 v/v % etil-acetát, 10 v/v % jégecet. Előhívóként 96 v/v %-os etanolban feloldott AlCl_3 -ot (10 g/l) használtunk és a szterigmatocisztint az $\text{UV}_{254 \text{ nm}}$ fényben zöld színt mutató csíkok jelezték (Klich és mtsai., 2001). A szterigmatocisztin mennyiségét standard sor segítségével határoztuk meg és a micélium szárazanyag tartalmára vonatkoztattuk.

5.8 Transzkripció vizsgálatok

5.8.1 RNS izolálás *A. glaucus*ból

Az *A. glaucus* törzseket 6 napig spóráztattuk, majd 1×10^5 spórát leoltottunk 2 M szorbittal kiegészített, illetve 2 M szorbittal + 0,4 mM *t*BOOH-val kiegészített celofános minimál táptalaj felszínére. A tenyészeteket 4 napig inkubáltuk 25 °C-on, majd liofilizáltuk az összegyűjtött micéliumokat. A liofilizált micéliumokhoz TRIzol reagenst (Invitrogen) adtunk, majd RNS-t izoláltunk Chomczynski munkája alapján (Chomczynski, 1993). Az RNS mintákból DNáz (Fermentas) kezelés után RT-PCR méréseket végeztünk. Az RNS minták tisztaságának és koncentrációjának a meghatározása spektrofotometriásan ($\lambda = 280/260 \text{ nm}$) történt. Az RNS minták minőségének ellenőrzését denaturáló agaróz gélelektroforézissel végeztük. Az agaróz gél összetevői a következők voltak: 10 g/l agaróz, 10 % (v/v) 10x MOPS-EDTA oldat, 0,002 % (v/v) etídium-bromid (10 mg/ml) és 5 % (v/v) formaldehid. A 7,5 µg-nyi RNS mintákat 5 µl etilén-diamin-tetraecetsavat (25 mmol/l) és 10 g/l SDS-t (nátrium-dodecil-szulfát) tartalmazó oldat, valamint 25 µl mintafelvívő puffer („RNA loading buffer”, Invitrogen) elegyében inkubáltuk

68 °C-on, 10 percig. A 10x MOPS-EDTA oldat a következő komponenseket tartalmazta: 200 mmol/l MOPS, 50 mmol/l nárium-acetát, 10 mmol/l EDTA (pH 7,0).

5.8.2 Génexpresszió vizsgálata RT-qPCR módszerrel

Az RT-qPCR reakciókat a gyártó által leírt protokoll alapján QuantiTech™ SYBR® GREEN RT-qPCR kit (Qiagen) segítségével végeztük el. Az egyes reakcióelegyek az alábbiakat tartalmazták: 400 ng totál RNS, 2,5 mmol/l Mg^{2+} , 0,5 μ mol/l génspecifikus primer. Az RT-qPCR a következő lépésekből állt:

1. reverz transzkripció: 50 °C, 30 perc
2. reverz transzkriptáz denaturáció: 95 °C, 15 perc
3. DNS denaturáció: 94 °C, 15 másodperc
4. primer hibridizáció: T_m -(5-8) °C, 30 másodperc
5. lánchosszabbítás (extenzió): 72 °C, 30 másodperc
6. a ciklus megismétlése a DNS denaturációtól (3. lépés) 40 alkalommal

Az RT-qPCR vizsgálatainkhoz az alábbi primerpárokat használtuk fel:

1. AN6792 (*gfdB*)

Forward: 5'-GCCAGTATCCTCGTCTTCAACC-3'

Reverse: 5'-TGTCGTCTCGCATAGTCTTTTCG-3'

2. *Aspgl1_0030273* (*Afu3g08160*; *tif1* ortológ)

Forward: 5'-CTACCCTCCCCTACGATG-3'

Reverse: 5'-GATGACTGCCTGTGTGATG-3'

A relatív expressziós szintet a Δ módszer segítségével határoztuk meg:

$\Delta CP = CP_{\text{vizsgált gén}} - CP_{\text{referencia gén}}$, ahol ΔCP a relatív expressziós szintet jelenti, és a CP azt a ciklusszámot fejezi ki, amely a PCR termék akkumulálódásához szükséges a vizsgált génnek és a referencia gén tanulmányozásában. Referenciagénként az *A. fumigatus* *tif1* gén ortológját (*Aspgl1_0030273*) használtuk.

5.9 Statisztikai vizsgálatok

A disszertációmban minden kísérlet esetében 3-6 független mérés átlagát és annak szórását tüntettük fel. Az átlagértékek közötti eltérések kimutatására a Student-féle t-próbát használtuk és a különbséget kizárólag a $p < 5\%$ valószínűség esetén fogadtuk el szignifikánsnak.

5.10 Felhasznált vegyszerek

A kísérleteinkben felhasznált vegyszerek, – amennyiben azt a disszertációban másképpen nem jelöltem – a Sigma-Aldrich Kft. és a WVR Kft. analitikai tisztaságú termékei voltak.

6. Összefoglalás

Az *A. nidulans* fonalas gombában a glicerín-3-foszfát dehidrogenáz génnek két paralóg izoformája létezik: a *gfdA* és a *gfdB* gének (de Vries és mtsai., 2017). A Tanszékünkön végzett korábbi stresszérzékenységi kísérletek alapján két faj, az *A. glaucus* és az *A. wentii* – melyekben csak az *A. nidulans* *gfdA* gén ortológja található meg – ozmofilitást mutattak 2 M szorbit mellett (Orosz és mtsai., 2018). Továbbá megfigyelték a *gfdB* gén up-regulációját NaCl expozíció jelenlétében (Balázs és mtsai., 2010). A *gfdA* génnek már jellemezték a funkcióját Fillinger és munkatársai (2001), és azt találták, hogy a $\Delta gfdA$ mutáns fenotípusai ozmotikusan helyreállíthatók voltak. Ezek alapján szeretnénk volna feltárni a másik paralógnak, a *gfdB* génnek az élettani szerepét, ezért elkészítettük az *A. nidulans* fonalas gombában a $\Delta gfdB$ mutánt. Megfigyeléseink közül az alábbiak voltak a legfontosabbak:

- A $\Delta gfdB$ mutáns 37 °C-on, 5 napos inkubálást követően jelentős oxidatívstressz-érzékenységet mutatott *t*BOOH, H₂O₂, valamint diamid jelenlétében, továbbá érzékenynek bizonyult kongóvörösre, mely festék sejtfalintegritás-stresszt okoz.
- Hasonló kísérletet végeztünk 25 °C-on, és 10 napos tenyészetekben is megfigyeltük a géndeléciós törzs fenotípusának változását és szignifikáns különbségeket tapasztaltunk oxidatív (*t*BOOH, H₂O₂, MSB), sejtfalintegritás- (kongóvörös) és nehézfémstresszt okozó ágensek (CdCl₂) jelenlétében.
- A gén deléciójával növekedett a szabad gyökök és reaktív oxigén gyökök koncentrációja stresszmentes körülmények között, valamint az oxidatív stresszt előidéző *t*BOOH-val kezelt tenyészetekben is.
- Ebből adódóan megvizsgáltuk néhány antioxidáns enzim aktivitását is. A specifikus GR aktivitás nagyobb volt a géndeléciós törzsben kezeléssel és anélkül is. A specifikus GPx és kataláz aktivitás pedig szignifikánsan csökkent

a mutáns törzsben, feltehetően azért, mert a specifikus GR aktivitás önmagában nem volt elegendő a redox egyensúly helyreállításához. Megfigyeltük még a specifikus SOD aktivitás alakulását, mely szintén szignifikánsan csökkent a *tBOOH* kezelés hatására, ezáltal eliminálva a szabad gyököket és reaktív oxigén gyököket.

- A *gfdB* gén hiánya a mikotoxin termelést is megzavarta. A mutáns törzsben szignifikánsan nagyobb szterigmatocisztin tartalmat mértünk, mint a THS30.3 kontrollban. Amikor oxidatív stressz érte a tenyészeteket, akkor csökkent a szterigmatocisztin termelés mindkét törzsben, de még így is kétszer olyan nagy volt a mutánsban, mint a kontrollban.

- Emellett a $\Delta gfdB$ törzs poliol tartalmának az alakulását is megfigyeltük. Stresszmentes körülmények között a mannit termelés szignifikánsan nagyobb volt, mint a kontrollban, ezzel szemben az eritrit tartalmak hasonlóan alakultak mindkét törzsben. Amikor *tBOOH*-val kezeltük a gombatörzseket, akkor sem a kontrollban, sem a géndeléciós törzsben nem volt kimutatható mennyiségben eritrit, továbbá a $\Delta gfdB$ törzsben jelentősen növekedett a mannit koncentráció, de a THS30.3 törzsben változatlan maradt.

- A törzs életképességének a csökkenését figyeltük meg mind a kezelés nélküli, mind a *tBOOH*-val kezelt tenyészetekben, ezzel ellentétben a sejtek apoptózisa viszont növekedett. *tBOOH* hozzáadásával már 52 óras korban szignifikáns különbséget figyeltünk meg a törzsek növekedésében.

A doktori munkám további céljával tűztük ki a *gfdB* gén beépítését a 2 M szorbit mellett jelentős ozmofilitást mutató *A. glaucus* fonalas gomba genomjába. Az elkészített transzgén törzsekkel a legfontosabb eredményeink a következők voltak:

- A *gfdB* gén inzerciója jelentős stressztoleranciát eredményezett az oxidatív stresszt generáló *tBOOH*, MSB és H_2O_2 jelenlétében, ezen túlmenően megnövekedett toleranciát figyeltük meg a sejtfalintegritás-stresszt kiváltó

kongóvörössel szemben, és emellett nehézfémstressz-toleranciát is megfigyeltünk a mutáns törzsek esetében CdCl_2 mellett 10 napos inkubációt követően, 2 M szorbittal kiegészített táptalajokon.

- A transzgen törzsek stresszérzékenységében nem volt jelentős különbség, amikor szorbit helyett 1 M NaCl-ot adtunk a táptalajhoz, mivel NaCl-ot tartalmazó táptalajon stresszmentes körülmények között is lassabban növekszik az *A. glaucus* gomba.

Eredményeink alapján elmondható, hogy az *A. nidulans* fonalas gombában a *gfdB* génnek nem az ozmotikus stressz elleni védelemben van szerepe, – mint a *gfdA* génnek – ahogy azt korábban feltételeztük (Fillinger és mtsai., 2001; de Vries és mtsai., 2017) sokkal inkább az oxidatív és sejtfalintegritás-stressz elleni védelmi rendszerben. Továbbá szerepe van még ebben a fajban a sejtek életképességének a fenntartásában, illetve az apoptózis késleltetésében.

A dolgozatomban felállított hipotézisünk szerint ezen glicerinn metabolikus enzim deléciója feltehetőleg azért eredményezett mannit túltermelést ebben a gendelációs törzsben, mert az idősebb tenyészetek inkább mannitot akkumulálnak glicerinn helyett, továbbá a mannit gyökfogóként is funkcionálhat, valamint oxidatív stressz esetén több fajban átveszi a glicerinn szerepét (Smirnoff és Cumbes, 1989; Chaturvedi és mtsai., 1996, 1997; Jennings és mtsai., 1998; Ruijter és mtsai., 2003; Hema és mtsai., 2014).

Az oxidatív stressztoleranciában betöltött funkcióját akkor is megtartotta a *gfdB* gén, amikor egy másik *Aspergillus* fajba, az *A. glaucus*ba transzformáltuk. Ezek alapján elmondhatjuk, hogy az *A. glaucus* jól ismert ozmofilitása nem magyarázható a *gfdB* gén evolúciós hiányával. Ezek a megfigyelések még további kutatásokat igényelnek, hiszen különböző izoenzimek védenek a különböző stresszfajták ellen, aminek a megértése nagyon jelentős, főleg az iparilag kiemelkedő jelentőségű gombafajokban. A

további kutatásokban fontos lenne feltárni, hogy más glicerín-3-foszfát dehidrogenáz paralóg génpároknak vajon milyen fiziológiai funkciói vannak a különböző *Aspergillus* fajokban. Távlati tervünk a szintén ozmofilitást mutató *A. wentii* fonalas gomba *gfdB* transzgén törzseinek az előállítására azért, hogy jobban megismerjük az ezen géneken keresztül működő stresszvédelmi szabályozást, és alátámasszuk az eddigi kutatási eredményeinket.

7. Summary

In the filamentous fungus *A. nidulans*, two paralogous isoforms of the glycerol-3-phosphate dehydrogenase gene exist: the genes *gfdA* and *gfdB* (de Vries *et al.*, 2017). Based on earlier stress sensitivity experiments performed in our Department, two species, *A. glaucus* and *A. wentii* – which contain only the orthologue of the *gfdA* gene of *A. nidulans* – have shown osmophilicity in the presence of 2 M sorbitol (Orosz és mtsai., 2018). Furthermore, the up-regulation of the *gfdB* gene was observed in the presence of NaCl exposure (Balázs és mtsai., 2010). The function of the *gfdA* gene has already been characterized by Fillinger *et al.* (2001); the phenotypes of the $\Delta gfdA$ mutant were found to be osmotically remediable. Based on these findings, we wanted to reveal the physiological role of the other paralogue, the *gfdB* gene, thus we constructed the $\Delta gfdB$ mutant in the filamentous fungus *A. nidulans*.

From our observations, the following were the most important ones:

- At 37 °C, after 5-day incubation, the $\Delta gfdB$ mutant showed significant sensitivity to oxidative stress in the presence of *t*BOOH, H₂O₂, as well as diamide, furthermore, it proved to be sensitive to Congo Red, a dye causing cell wall integrity stress.
- We conducted a similar experiment at 25 °C, and the phenotype change of the gene deletion strains was also observed in 10-day cultures, and significant differences were detected in the presence of oxidative stress agents (*t*BOOH, H₂O₂, MSB), a cell wall integrity stress agent (Congo Red), and a heavy metal stress agent (CdCl₂).
- As a result of the deletion of the gene, the concentration of reactive species increased under normal conditions, as well as in cultures treated with *t*BOOH, which causes oxidative stress.

- Therefore, we also analyzed the activity of some antioxidant enzymes. Specific GR activity was higher in the gene deletion strain, with and without treatment. In turn, specific GPx and catalase activities were reduced significantly in the mutant strain, presumably because specific GR activity on its own was insufficient to restore the redox balance. We also monitored the development of specific SOD activity, which was also decreased significantly due to the *tBOOH* treatment, thus eliminating reactive species.
- The absence of the *gfdB* gene also disturbed mycotoxin production. Significantly higher sterigmatocystin content was measured in the mutant strain than in the THS30.3 control. When the cultures were exposed to oxidative stress, sterigmatocystin production decreased in both strains, but it was still twice as high in the mutant compared to the control.
- In addition, the development of the polyol content of the $\Delta gfdB$ strain was also monitored. Under normal conditions, mannitol production was significantly higher compared to the control, whereas the development of erythritol contents was similar in both strains. As a result of *tBOOH* treatment of the fungal strains, there was no detectable amount of erythritol in either the control or the gene deletion strain. Furthermore, the mannitol concentration increased significantly in the $\Delta gfdB$ strain, but it remained unchanged in the THS30.3 strain.
- A reduction in the viability of the strains was observed in both the untreated cultures and those treated with *tBOOH*, whereas cell apoptosis increased. When adding *tBOOH*, a significant difference was observed between the growth of the strains already at the age of 52 hours.

We have set as an additional objective of my PhD work to introduce the *gfdB* gene into the genome of the filamentous fungus *A. glaucus*, which shows significant osmophilicity in the presence of 2 M sorbitol with the *gfdB* gene. Our

most important results with the transgenic strains constructed are the following:

- The insertion of the *gfdB* gene resulted in significant stress tolerance in the presence of *t*BOOH, MSB and H₂O₂, which generate oxidative stress, moreover, tolerance to Congo Red, which causes cell wall integrity stress, was observed, and furthermore, heavy metal stress tolerance was also observed in the case of the mutant strains in the presence of CdCl₂ following 10-day incubation, on media supplemented with 2 M sorbitol.
- There was no significant difference in the stress sensitivity of the transgenic strains when using 1 M NaCl instead of sorbitol as an osmotic stabilizer since the fungus *A. glaucus* grows slower on media containing NaCl under normal conditions as well.

Based on our results, it can be concluded that in the filamentous fungus *A. nidulans*, the *gfdB* gene does not play a role in protection against osmotic stress – as the *gfdA* gene – as we have hypothesized earlier (Fillinger *et al.*, 2001; de Vries *et al.*, 2017) but rather in the oxidative and cell wall integrity stress protection system. In this species, it plays an additional role in maintaining the viability of cells and delaying apoptosis.

According to the hypothesis set in my thesis, the deletion of this glycerol metabolic enzyme presumably induced mannitol overproduction in this gene deletion strain because older cultures accumulate mannitol rather than glycerol, furthermore, mannitol can also function as a free radical scavenger, and under oxidative stress, it can take over the role of glycerol in multiple species (Smirnoff és Cumbes, 1989; Chaturvedi és mtsai., 1996, 1997; Jennings és mtsai., 1998; Ruijter és mtsai., 2003; Hema és mtsai., 2014).

The *gfdB* gene maintained its function in oxidative stress tolerance even when transformed into another *Aspergillus* species, *A. glaucus*. Therefore, it can be stated that the well-known osmophilicity of *A. glaucus* cannot be

explained with the evolutionary lack of the *gfdB* gene. These observations require further research, as different isoenzymes provide protection against different types of stress, and understanding this is highly significant, especially in the case of fungus species that are of outstanding industrial importance. In further research, it would be important to explore what physiological functions other glycerol-3-phosphate dehydrogenase paralogue gene pairs have in different *Aspergillus* species. Our long-term plans include preparing the *gfdB* transgenic strains of the filamentous fungus *A. wentii*, which also exhibits osmophilicity, with the *gfdB* gene, in order to gain more insight into the regulation of stress protection via these genes, and support our research so far.

8. Irodalomjegyzék

- Adrover, M.À., Zi, Z., Duch, A., Schaber, J., González-Novo, A., Jimenez, J., és mtsai. (2011) Time-dependent quantitative multicomponent control of the G₁-S network by the stress-activated protein kinase Hog1 upon osmostress. *Sci Signal* **4**: ra63.
- Aguilar-Osorio, G., Vankuyk, P.A., Seiboth, B., Blom, D., Solomon, P.S., Vinck, A., és mtsai. (2010) Spatial and developmental differentiation of mannitol dehydrogenase and mannitol-1-phosphate dehydrogenase in *Aspergillus niger*. *Eukaryotic Cell* **9**: 1398–1402.
- Almagro, A., Prista, C., Benito, B., Loureiro-Dias, M.C., és Ramos, J. (2001) Cloning and expression of two genes coding for sodium pumps in the salt-tolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. *J Bacteriol* **183**: 3251–3255.
- Anand, J.C. és Brown, A.D. (1968) Growth Rate Patterns of the So-called Osmophilic and Non-osmophilic Yeasts in Solutions of Polyethylene Glycol. *Journal of General Microbiology* **52**: 205–212.
- André, L., Hemming, A., és Adler, L. (1991) Osmoregulation in *Saccharomyces cerevisiae*. Studies on the osmotic induction of glycerol production and glycerol-3-phosphate dehydrogenase (NAD⁺). *FEBS Lett* **286**: 13–17.
- Ansell, R., Granath, K., Hohmann, S., Thevelein, J.M., és Adler, L. (1997) The two isoenzymes for yeast NAD⁺-dependent glycerol 3-phosphate dehydrogenase encoded by *GPD1* and *GPD2* have distinct roles in osmoadaptation and redox regulation. *EMBO J* **16**: 2179–2187.
- Arst, H.N., Hondmann, D.H., és Visser, J. (1990) A translocation activating the cryptic nitrogen regulation gene *areB* inactivates a previously unidentified gene involved in glycerol utilisation in *Aspergillus nidulans*. *Mol Gen Genet* **223**: 134–137.
- Avery, S.V. (2001) Metal toxicity in yeasts and the role of oxidative stress. *Adv Appl Microbiol* **49**: 111–142.
- Bakker, B.M., Overkamp, K.M., van Maris AJ, null, Kötter, P., Luttik, M.A., van Dijken JP, null, és Pronk, J.T. (2001) Stoichiometry and compartmentation of NADH metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev* **25**: 15–37.
- Bakti, F., Sasse, C., Heinekamp, T., Pócsi, I., és Braus, G.H. (2018) Heavy Metal-Induced Expression of PcaA Provides Cadmium Tolerance to *Aspergillus fumigatus* and Supports Its Virulence in the Galleria mellonella Model. *Front Microbiol* **9**: 744.

- Balázs, A., Pócsi, Imre, Hamari, Z., Leiter, E., Emri, T., Miskei, M., és mtsai. (2010) AtfA bZIP-type transcription factor regulates oxidative and osmotic stress responses in *Aspergillus nidulans*. *Mol Genet Genomics* **283**: 289–303.
- Ballio, A., Divittorio, V., és Russi, S. (1964) The isolation of trehalose and polyols from the conidia of *Penicillium chrysogenum* Thom. *Arch Biochem Biophys* **107**: 177–183.
- Bañuelos, M.A., Sychrová, H., Bleykasten-Grosshans, C., Souciet, J.L., és Potier, S. (1998) The Nha1 antiporter of *Saccharomyces cerevisiae* mediates sodium and potassium efflux. *Microbiology (Reading, Engl)* **144 (Pt 10)**: 2749–2758.
- Barnes, S.E., Dola, T.P., Bennett, J.W., és Bhatnagar, D. (1994) Synthesis of sterigmatocystin on a chemically defined medium by species of *Aspergillus* and *Chaetomium*. *Mycopathologia* **125**: 173–178.
- Barratt, R.W., Johnson, G.B., és Ogata, W.N. (1965) Wild-type and mutant stocks of *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **52**: 233–246.
- Beese, S.E., Negishi, T., és Levin, D.E. (2009) Identification of positive regulators of the yeast fps1 glycerol channel. *PLoS Genet* **5**: e1000738.
- Beever, R.E. és Laracy, E.P. (1986) Osmotic adjustment in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *J Bacteriol* **168**: 1358–1365.
- Bellomo, G., Jewell, S.A., Thor, H., és Orrenius, S. (1982) Regulation of intracellular calcium compartmentation: studies with isolated hepatocytes and t-butyl hydroperoxide. *Proc Natl Acad Sci USA* **79**: 6842–6846.
- Bok, J.W., Noordermeer, D., Kale, S.P., és Keller, N.P. (2006) Secondary metabolic gene cluster silencing in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* **61**: 1636–1645.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248–254.
- Brakhage, A.A., Spröte, P., Al-Abdallah, Q., Gehrke, A., Plattner, H., és Tüncher, A. (2004) Regulation of penicillin biosynthesis in filamentous fungi. *Adv Biochem Eng Biotechnol* **88**: 45–90.
- Breuer, U. és Harms, H. (2006) *Debaryomyces hansenii*--an extremophilic yeast with biotechnological potential. *Yeast* **23**: 415–437.
- Brown, A.D. és Simpson, J.R. (1972) Water relations of sugar-tolerant yeasts: the role of intracellular polyols. *J Gen Microbiol* **72**: 589–591.
- Chaturvedi, V., Bartiss, A., és Wong, B. (1997) Expression of bacterial *mtlD* in *Saccharomyces cerevisiae* results in mannitol synthesis and protects a glycerol-defective mutant from high-salt and oxidative stress. *J Bacteriol* **179**: 157–162.

- Chaturvedi, V., Wong, B., és Newman, S.L. (1996) Oxidative killing of *Cryptococcus neoformans* by human neutrophils. Evidence that fungal mannitol protects by scavenging reactive oxygen intermediates. *J Immunol* **156**: 3836–3840.
- Chen, D., Toone, W.M., Mata, J., Lyne, R., Burns, G., Kivinen, K., és mtsai. (2003) Global transcriptional responses of fission yeast to environmental stress. *Mol Biol Cell* **14**: 214–229.
- Chiu, D.T., Stults, F.H., és Tappel, A.L. (1976) Purification and properties of rat lung soluble glutathione peroxidase. *Biochim Biophys Acta* **445**: 558–566.
- Chomczynski, P. (1993) A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *BioTechniques* **15**: 532–534, 536–537.
- Clotet, J. és Posas, F. (2007) Control of cell cycle in response to osmotic stress: lessons from yeast. *Meth Enzymol* **428**: 63–76.
- Clutterbuck, A.J. (1994) Linkage map and locus list. *Prog Ind Microbiol* **29**: 791–824.
- Cooke, R.C. (1969) Changes in soluble carbohydrates during sclerotium formation by *Sclerotinia sclerotiorum* and *S. trifoliorum*. *Transactions of the British Mycological Society* **53**: 77–86.
- Creaser, E.H., Porter, R.L., Britt, K.A., Pateman, J.A., és Doy, C.H. (1985) Purification and preliminary characterization of alcohol dehydrogenase from *Aspergillus nidulans*. *Biochem J* **225**: 449–454.
- David, H., Hofmann, G., Oliveira, A.P., Jarmer, H., és Nielsen, J. (2006) Metabolic network driven analysis of genome-wide transcription data from *Aspergillus nidulans*. *Genome Biol* **7**: R108.
- David, H., Özçelik, I.S., Hofmann, G., és Nielsen, J. (2008) Analysis of *Aspergillus nidulans* metabolism at the genome-scale. *BMC Genomics* **9**: 163.
- Dihazi, H., Kessler, R., és Eschrich, K. (2004) High osmolarity glycerol (HOG) pathway-induced phosphorylation and activation of 6-phosphofructo-2-kinase are essential for glycerol accumulation and yeast cell proliferation under hyperosmotic stress. *J Biol Chem* **279**: 23961–23968.
- Dulermo, T., Rasclé, C., Billon-Grand, G., Gout, E., Bligny, R., és Cotton, P. (2010) Novel insights into mannitol metabolism in the fungal plant pathogen *Botrytis cinerea*. *Biochemical Journal* **427**: 323–332.
- Duran, R., Cary, J.W., és Calvo, A.M. (2010) Role of the osmotic stress regulatory pathway in morphogenesis and secondary metabolism in filamentous fungi. *Toxins (Basel)* **2**: 367–381.

- Dušková, M., Ferreira, C., Lucas, C., és Sychrová, H. (2015) Two glycerol uptake systems contribute to the high osmotolerance of *Zygosaccharomyces rouxii*. *Mol Microbiol* **97**: 541–559.
- Emri, T., Antal, K., Riley, R., Karányi, Z., Miskei, M., Orosz, E., és mtsai. (2018) Duplications and losses of genes encoding known elements of the stress defence system of the *Aspergilli* contribute to the evolution of these filamentous fungi but do not directly influence their environmental stress tolerance. *Stud Mycol* **91**: 23–36.
- Emri, T., Pócsi, I., és Szentirmai, A. (1997) Glutathione metabolism and protection against oxidative stress caused by peroxides in *Penicillium chrysogenum*. *Free Radic Biol Med* **23**: 809–814.
- d’Enfert, C. és Fontaine, T. (1997) Molecular characterization of the *Aspergillus nidulans treA* gene encoding an acid trehalase required for growth on trehalose. *Mol Microbiol* **24**: 203–216.
- Escoté, X., Zapater, M., Clotet, J., és Posas, F. (2004) *Hog1* mediates cell-cycle arrest in G₁ phase by the dual targeting of Sic1. *Nat Cell Biol* **6**: 997–1002.
- Fassler, J.S. és West, A.H. (2010) Genetic and biochemical analysis of the SLN1 pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Meth Enzymol* **471**: 291–317.
- Ferrigno, P., Posas, F., Koepp, D., Saito, H., és Silver, P.A. (1998) Regulated nucleo/cytoplasmic exchange of HOG1 MAPK requires the importin beta homologs NMD5 and XPO1. *EMBO J* **17**: 5606–5614.
- Fillinger, S., Ruijter, G., Tamás, M.J., Visser, J., Thevelein, J.M., és d’Enfert, C. (2001) Molecular and physiological characterization of the NAD-dependent glycerol 3-phosphate dehydrogenase in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* **39**: 145–157.
- Fogarty, W.M. (1994) Enzymes of the Genus *Aspergillus*. In *Aspergillus*. Smith, J.E. (szerk). Boston, MA: Springer US, o. 177–218.
- Franzini, E., Sellak, H., Hakim, J., és Pasquier, C. (1994) Comparative sugar degradation by (OH)₂ produced by the iron-driven Fenton reaction and gamma radiolysis. *Arch Biochem Biophys* **309**: 261–265.
- Furukawa, K., Hoshi, Y., Maeda, T., Nakajima, T., és Abe, K. (2005) *Aspergillus nidulans* HOG pathway is activated only by two-component signalling pathway in response to osmotic stress. *Mol Microbiol* **56**: 1246–1261.
- Furukawa, K., Yoshimi, A., Furukawa, T., Hoshi, Y., Hagiwara, D., Sato, N., és mtsai. (2007) Novel reporter gene expression systems for monitoring activation of the *Aspergillus nidulans* HOG pathway. *Biosci Biotechnol Biochem* **71**: 1724–1730.
- Galagan, J.E., Calvo, S.E., Cuomo, C., Ma, L.-J., Wortman, J.R., Batzoglou, S., és mtsai. (2005) Sequencing of *Aspergillus nidulans* and

- comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae*. *Nature* **438**: 1105–1115.
- Garrido-Bazán, V., Jaimes-Arroyo, R., Sánchez, O., Lara-Rojas, F., és Aguirre, J. (2018) SakA and MpkC Stress MAPKs Show Opposite and Common Functions During Stress Responses and Development in *Aspergillus nidulans*. *Front Microbiol* **9**: 2518.
- Gasch, A.P. (2007) Comparative genomics of the environmental stress response in ascomycete fungi. *Yeast* **24**: 961–976.
- Geiser, D.M. és LoBuglio, K.F. (2001) The Monophyletic Plectomycetes: Ascosphaerales, Onygenales, Eurotiales. In *Systematics and Evolution*. McLaughlin, D.J., McLaughlin, E.G., és Lemke, P.A. (szerk). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, o. 201–219.
- Giacometti, R., Kronberg, F., Biondi, R.M., és Passeron, S. (2011) *Candida albicans* *Tpk1p* and *Tpk2p* isoforms differentially regulate pseudohyphal development, biofilm structure, cell aggregation and adhesins expression. *Yeast* **28**: 293–308.
- Giacometti, R., Kronberg, F., Biondi, R.M., és Passeron, S. (2009) Catalytic isoforms *Tpk1* and *Tpk2* of *Candida albicans* PKA have non-redundant roles in stress response and glycogen storage. *Yeast* **26**: 273–285.
- Gonçalves, A.P., Heller, J., Daskalov, A., Videira, A., és Glass, N.L. (2017) Regulated Forms of Cell Death in Fungi. *Front Microbiol* **8**: 1837.
- Greenley, T.L. és Davies, M.J. (1992) Detection of radicals produced by reaction of hydroperoxides with rat liver microsomal fractions. *Biochim Biophys Acta* **1116**: 192–203.
- Gun Lee, D., Shin, S.Y., Maeng, C.Y., Jin, Z.Z., Kim, K.L., és Hahm, K.S. (1999) Isolation and characterization of a novel antifungal peptide from *Aspergillus niger*. *Biochem Biophys Res Commun* **263**: 646–651.
- Gwynne, D.I., Buxton, F.P., Sibley, S., Davies, R.W., Lockington, R.A., Scazzocchio, C., és Sealy-Lewis, H.M. (1987) Comparison of the cis-acting control regions of two coordinately controlled genes involved in ethanol utilization in *Aspergillus nidulans*. *Gene* **51**: 205–216.
- Hagiwara, D., Asano, Y., Marui, J., Furukawa, K., Kanamaru, K., Kato, M., és mtsai. (2007) The SskA and SrrA response regulators are implicated in oxidative stress responses of hyphae and asexual spores in the phosphorelay signaling network of *Aspergillus nidulans*. *Biosci Biotechnol Biochem* **71**: 1003–1014.
- Halliwell, B. és Gutteridge, J.M. (1995) The definition and measurement of antioxidants in biological systems. *Free Radic Biol Med* **18**: 125–126.
- Halliwell, B. és Gutteridge, J.M.C. (2007) Free radicals in biology and medicine, 4th ed. Oxford ; New York: Oxford University Press.
- Han, K.-H. és Prade, R.A. (2002) Osmotic stress-coupled maintenance of polar growth in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* **43**: 1065–1078.

- He, X.-J., Mulford, K.E., és Fassler, J.S. (2009) Oxidative stress function of the *Saccharomyces cerevisiae* Skn7 receiver domain. *Eukaryotic Cell* **8**: 768–778.
- Hema, R., Vemanna, R.S., Sreeramulu, S., Reddy, C.P., Senthil-Kumar, M., és Udayakumar, M. (2014) Stable expression of *mtlD* gene imparts multiple stress tolerance in finger millet. *PLoS ONE* **9**: e99110.
- Herrera, M.L., Vallor, A.C., Gelfond, J.A., Patterson, T.F., és Wickes, B.L. (2009) Strain-dependent variation in 18S ribosomal DNA Copy numbers in *Aspergillus fumigatus*. *J Clin Microbiol* **47**: 1325–1332.
- Hocking, A.D. (1993) Responses of xerophilic fungi to changes in water activity. In *Stress tolerance of fungi*. Jennings, D.H. (szerk). New York: Marcel Dekker Inc., o. 233–243.
- Hohmann, S. (2002) Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**: 300–372.
- Hohmann, S., Krantz, M., és Nordlander, B. (2007) Yeast osmoregulation. *Meth Enzymol* **428**: 29–45.
- Hondmann, D.H., Busink, R., Witteveen, C.F., és Visser, J. (1991) Glycerol catabolism in *Aspergillus nidulans*. *J Gen Microbiol* **137**: 629–636.
- Hong, S.Y., Roze, L.V., Linz, J.E. (2013) Oxidative stress-related transcription factors in the regulation of secondary metabolism. *Toxins (Basel)* **5**: 683–702.
- Hortschansky, P., Eisendle, M., Al-Abdallah, Q., Schmidt, A.D., Bergmann, S., Thön, M., és mtsai. (2007) Interaction of HapX with the CCAAT-binding complex--a novel mechanism of gene regulation by iron. *EMBO J* **26**: 3157–3168.
- Höfgen, R., Kreft, O., Willmitzer, L., és Hesse, H. (2001) Manipulation of thiol contents in plants. *Amino Acids* **20**: 291–299.
- Huber, C.G. és Bonn, G.K. (1995) HPLC of Carbohydrates with Cation- and Anion-Exchange Silica and Resin-Based Stationary Phases. In *Journal of Chromatography Library*. Elsevier, o. 147–180.
- Hult, K. és Gatenbeck, S. (1978) Production of NADPH in the mannitol cycle and its relation to polyketide formation in *Alternaria alternata*. *Eur J Biochem* **88**: 607–612.
- Hult, K., Veide, A., és Gatenbeck, S. (1980) The distribution of the NADPH regenerating mannitol cycle among fungal species. *Arch Microbiol* **128**: 253–255.
- Hunter, G.D., Jones, I.G., és Sealy-Lewis, H.M. (1996) The cloning and sequencing of the *alcB* gene, coding for alcohol dehydrogenase II, in *Aspergillus nidulans*. *Curr Genet* **29**: 122–129.
- Jaimes-Arroyo, R., Lara-Rojas, F., Bayram, Ö., Valerius, O., Braus, G.H., és Aguirre, J. (2015) The SrkA Kinase Is Part of the SakA Mitogen-Activated Protein Kinase Interactome and Regulates Stress Responses

- and Development in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryotic Cell* **14**: 495–510.
- Jayashree, T. és Subramanyam, C. (2000) Oxidative stress as a prerequisite for aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. *Free Radic Biol Med* **29**: 981–985.
- Jennings, D.B., Ehrenshaft, M., Pharr, D.M., és Williamson, J.D. (1998) Roles for mannitol and mannitol dehydrogenase in active oxygen-mediated plant defense. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 15129–15133.
- Jennings, D.H. (1984) Polyol metabolism in fungi. *Adv Microb Physiol* **25**: 149–193.
- Jones, I.G. és Sealy-Lewis, H.M. (1990) Chromosomal mapping of an alcC disruption with respect to amdA in *Aspergillus nidulans*. *Curr Genet* **17**: 81–83.
- Joosten, M.H., Bergmans, C.J., Meulenhoff, E.J., Cornelissen, B.J., és De Wit, P.J. (1990) Purification and serological characterization of three basic 15-kilodalton pathogenesis-related proteins from tomato. *Plant Physiol* **94**: 585–591.
- Karácsony, Z., Gácsér, A., Vágvölgyi, Cs., Scazzocchio, C., Hamari, Zs. (2014) A dually located multi-HMG-box protein of *Aspergillus nidulans* has a crucial role in conidial and ascospore germination. *Molecular Microbiology*. **94**: 383-402.
- Kawasaki, L., Sánchez, O., Shiozaki, K., és Aguirre, J. (2002) SakA MAP kinase is involved in stress signal transduction, sexual development and spore viability in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* **45**: 1153–1163.
- Kelly, J.M., Drysdale, M.R., Sealy-Lewis, H.M., Jones, I.G., és Lockington, R.A. (1990) Alcohol dehydrogenase III in *Aspergillus nidulans* is anaerobically induced and post-transcriptionally regulated. *Mol Gen Genet* **222**: 323–328.
- Kjærboelling, I., Vesth, T., és Andersen, M.R. (2019) Resistance Gene-Directed Genome Mining of 50 *Aspergillus* Species. *mSystems* **4**..
- Kjærboelling, I., Vesth, T., Frisvad, J.C., Nybo, J.L., Theobald, S., Kildgaard, S., és mtsai. (2020) A comparative genomics study of 23 *Aspergillus* species from section Flavi. *Nat Commun* **11**: 1106.
- Klein, M., Swinnen, S., Thevelein, J.M., és Nevoigt, E. (2017) Glycerol metabolism and transport in yeast and fungi: established knowledge and ambiguities: Glycerol catabolism in yeast. *Environ Microbiol* **19**: 878–893.
- Klich, M., Mendoza, C., Mullaney, E., Keller, N., és Bennett, J.W. (2001) A new sterigmatocystin-producing *Emericella* variant from agricultural desert soils. *Syst Appl Microbiol* **24**: 131–138.
- Kowalczyk, J.E., Gruben, B.S., Battaglia, E., Wiebenga, A., Majoor, E., és de Vries, R.P. (2015) Genetic Interaction of *Aspergillus nidulans* galR,

- xlnR and araR in Regulating D-Galactose and L-Arabinose Release and Catabolism Gene Expression. *PLoS ONE* **10**: e0143200.
- Kozák, L., Szilágyi, Z., Vágó, B., Kakuk, A., Tóth, L., Molnár, I., és Pócsi, I. (2018) Inactivation of the indole-diterpene biosynthetic gene cluster of *Claviceps paspali* by *Agrobacterium*-mediated gene replacement. *Appl Microbiol Biotechnol* **102**: 3255–3266.
- Kurucz, V., Kiss, B., Szigeti, Z.M., Nagy, G., Orosz, E., Hargitai, Z., és mtsai. (2018) Physiological background of the remarkably high Cd₂⁺ tolerance of the *Aspergillus fumigatus* Af293 strain. *J Basic Microbiol* **58**: 957–967.
- Lai, W., Li, C., Chen, H., és Shaik, S. (2012) Hydrogen-abstraction reactivity patterns from A to Y: the valence bond way. *Angew Chem Int Ed Engl* **51**: 5556–5578.
- Larsson, C. és Gustafsson, L. (1987) Glycerol production in relation to the ATP pool and heat production rate of the yeasts *Debaryomyces hansenii* and *Saccharomyces cerevisiae* during salt stress. *Arch Microbiol* **147**: 358–363.
- Leiter, É., Park, H.-S., Kwon, N.-J., Han, K.-H., Emri, T., Oláh, V., és mtsai. (2016) Characterization of the *aodA*, *dnmA*, *mnSOD* and *pimA* genes in *Aspergillus nidulans*. *Sci Rep* **6**: 20523.
- Lewis, D.H. és Smith, D.C. (1967) Sugar alcohols (polyols) in fungi and green plants. I. Distribution, physiology and metabolism. *New Phytol* **66**: 143–184.
- Luyten, K., Albertyn, J., Skibbe, W.F., Prior, B.A., Ramos, J., Thevelein, J.M., és Hohmann, S. (1995) Fps1, a yeast member of the MIP family of channel proteins, is a facilitator for glycerol uptake and efflux and is inactive under osmotic stress. *EMBO J* **14**: 1360–1371.
- Machida, M., Asai, K., Sano, M., Tanaka, T., Kumagai, T., Terai, G., és mtsai. (2005) Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae*. *Nature* **438**: 1157–1161.
- Maeda, T., Takekawa, M., és Saito, H. (1995) Activation of yeast PBS2 MAPKK by MAPKKKs or by binding of an SH3-containing osmosensor. *Science* **269**: 554–558.
- Maeda, T., Wurgler-Murphy, S.M., és Saito, H. (1994) A two-component system that regulates an osmosensing MAP kinase cascade in yeast. *Nature* **369**: 242–245.
- Mas, G., de Nadal, E., Dechant, R., Rodríguez de la Concepción, M.L., Logie, C., Jimeno-González, S., és mtsai. (2009) Recruitment of a chromatin remodelling complex by the Hog1 MAP kinase to stress genes. *EMBO J* **28**: 326–336.

- Mattam, A.J., Clomburg, J.M., Gonzalez, R., és Yazdani, S.S. (2013) Fermentation of glycerol and production of valuable chemical and biofuel molecules. *Biotechnol Lett* **35**: 831–842.
- McKnight, G.L., Kato, H., Upshall, A., Parker, M.D., Saari, G., és O'Hara, P.J. (1985) Identification and molecular analysis of a third *Aspergillus nidulans* alcohol dehydrogenase gene. *EMBO J* **4**: 2093–2099.
- Meena, M., Prasad, V., Zehra, A., Gupta, V.K., és Upadhyay, R.S. (2015) Mannitol metabolism during pathogenic fungal-host interactions under stressed conditions. *Front Microbiol* **6**: 1019.
- Michielse, C.B., Hooykaas, P.J.J., van den Hondel, C.A.M.J.J., és Ram, A.F.J. (2005) *Agrobacterium*-mediated transformation as a tool for functional genomics in fungi. *Curr Genet* **48**: 1–17.
- Miskei, M., Karányi, Z., és Pócsi, I. (2009) Annotation of stress-response proteins in the aspergilli. *Fungal Genet Biol* **46 Suppl 1**: S105–120.
- Mollapour, M. és Piper, P.W. (2007) Hog1 mitogen-activated protein kinase phosphorylation targets the yeast Fps1 aquaglyceroporin for endocytosis, thereby rendering cells resistant to acetic acid. *Mol Cell Biol* **27**: 6446–6456.
- Moore, D. és Devadatham, M.S. (1979) Sugar transport in *Coprinus cinereus*. *Biochim Biophys Acta* **550**: 515–526.
- Morgan, B.A., Banks, G.R., Toone, W.M., Raitt, D., Kuge, S., és Johnston, L.H. (1997) The Skn7 response regulator controls gene expression in the oxidative stress response of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* **16**: 1035–1044.
- de Nadal, E. és Posas, F. (2007) Regulation of gene expression in response to osmostress by the yeast stress-activated protein kinase Hog1. In *Stress-Activated Protein Kinases*. Topics in Current Genetics. Posas, F. és Nebreda, A.R. (szerk). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, o. 81–97.
- Nakagawa, C.W., Yamada, K., és Mutoh, N. (2000) Role of *Atf1* and *Pap1* in the induction of the catalase gene of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biochem* **127**: 233–238.
- Nguyen, T., Kim, T., Ta, H.M., Yeo, W.S., Choi, J., Mizar, P., és mtsai. (2019) Targeting Mannitol Metabolism as an Alternative Antimicrobial Strategy Based on the Structure-Function Study of Mannitol-1-Phosphate Dehydrogenase in *Staphylococcus aureus*. *mBio* **10**..
- Nierman, W.C., Pain, A., Anderson, M.J., Wortman, J.R., Kim, H.S., Arroyo, J., és mtsai. (2005) Genomic sequence of the pathogenic and allergenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. *Nature* **438**: 1151–1156.
- Nissen, T.L., Schulze, U., Nielsen, J., és Villadsen, J. (1997) Flux distributions in anaerobic, glucose-limited continuous cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology (Reading, Engl)* **143 (Pt 1)**: 203–218.

- Nobre, M.F. és Costa, M.S. da (1985) The accumulation of polyols by the yeast *Debaryomyces hansenii* in response to water stress. *Can J Microbiol* **31**: 1061–1064.
- Norbeck, J., Pählman, A.K., Akhtar, N., Blomberg, A., és Adler, L. (1996) Purification and characterization of two isoenzymes of DL-glycerol-3-phosphatase from *Saccharomyces cerevisiae*. Identification of the corresponding GPP1 and GPP2 genes and evidence for osmotic regulation of *Gpp2p* expression by the osmosensing mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *J Biol Chem* **271**: 13875–13881.
- Oberley, L.W. és Spitz, D.R. (1984) Assay of superoxide dismutase activity in tumor tissue. *Meth Enzymol* **105**: 457–464.
- Orosz, E., van de Wiele, N., Emri, T., Zhou, M., Robert, V., de Vries, R.P., és Pócsi, I. (2018) Fungal Stress Database (FSD)--a repository of fungal stress physiological data. *Database (Oxford)* **2018**: bay009
- Oura, E. (1977) Reaction Products of Yeast Fermentations. *Process Biochemistry* **12**: 19–21.
- Pahlman, A.K., Granath, K., Ansell, R., Hohmann, S., és Adler, L. (2001) The yeast glycerol 3-phosphatases *Gpp1p* and *Gpp2p* are required for glycerol biosynthesis and differentially involved in the cellular responses to osmotic, anaerobic, and oxidative stress. *J Biol Chem* **276**: 3555–3563.
- Pancaldi, S., Poli, F., Dall'Olio, G., és Vannini, G.L. (1984) Morphological anomalies induced by Congo red in *Aspergillus niger*. *Arch Microbiol* **137**: 185–187.
- Papp, B., Pál, C., és Hurst, L.D. (2003) Dosage sensitivity and the evolution of gene families in yeast. *Nature* **424**: 194–197.
- Pereira Silva, L., Alves de Castro, P., dos Reis, T.F., Paziani, M.H., Von Zeska Kress, M.R., Riaño-Pachón, D.M., és mtsai. (2017) Genome-wide transcriptome analysis of *Aspergillus fumigatus* exposed to osmotic stress reveals regulators of osmotic and cell wall stresses that are SakA^{HOG1} and MpkC dependent: Genome-wide transcriptome analysis of *Aspergillus fumigatus* exposed to osmotic stress reveals regulators of osmotic and cell wall stresses that are Sa. *Cellular Microbiology* **19**: e12681.
- Philips, J. és Herskowitz, I. (1997) Osmotic balance regulates cell fusion during mating in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* **138**: 961–974.
- Pinto, M.C., Mata, A.M., és Lopez-Barea, J. (1984) Reversible inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* glutathione reductase under reducing conditions. *Arch Biochem Biophys* **228**: 1–12.
- Pócsi, I., Miskei, M., Karányi, Z., Emri, T., Ayoubi, P., Pusztahelyi, T., és mtsai. (2005) Comparison of gene expression signatures of diamide,

- H₂O₂ and menadione exposed *Aspergillus nidulans* cultures--linking genome-wide transcriptional changes to cellular physiology. *BMC Genomics* **6**: 182.
- Pócsi, I., Prade, R.A., és Penninckx, M.J. (2004) Glutathione, altruistic metabolite in fungi. *Adv Microb Physiol* **49**: 1–76.
- Pontecorvo, G., Roper, J.A., Chemmons, L.M., Macdonald, K.D., Bufton, A.W. (1953) The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Adv Genet.* **5**:141–238.
- Posas, F. és Saito, H. (1997) Osmotic activation of the HOG MAPK pathway via Ste11p MAPKKK: scaffold role of Pbs2p MAPKK. *Science* **276**: 1702–1705.
- Proft, M. és Struhl, K. (2004) MAP kinase-mediated stress relief that precedes and regulates the timing of transcriptional induction. *Cell* **118**: 351–361.
- Ram, A.F.J. és Klis, F.M. (2006) Identification of fungal cell wall mutants using susceptibility assays based on Calcofluor white and Congo red. *Nat Protoc* **1**: 2253–2256.
- Ramirez, M.L., Chulze, S.N., és Magan, N. (2004) Impact of osmotic and matric water stress on germination, growth, mycelial water potentials and endogenous accumulation of sugars and sugar alcohols in *Fusarium graminearum*. *Mycologia* **96**: 470–478.
- Redkar, R.J., Locy, R.D., és Singh, N.K. (1995) Biosynthetic pathways of glycerol accumulation under salt stress in *Aspergillus nidulans*. *Exp Mycol* **19**: 241–246.
- Reverberi, M., Zjalic, S., Ricelli, A., Punelli, F., Camera, E., Fabbri, C., és mtsai. (2008) Modulation of antioxidant defense in *Aspergillus parasiticus* is involved in aflatoxin biosynthesis: a role for the *ApyapA* gene. *Eukaryotic Cell* **7**: 988–1000.
- Rodríguez-Navarro, A. (2000) Potassium transport in fungi and plants. *Biochim Biophys Acta* **1469**: 1–30.
- Roggenkamp, R., Sahm, H., és Wagner, F. (1974) Microbial assimilation of methanol induction and function of catalase in *Candida boidinii*. *FEBS Lett* **41**: 283–286.
- Roze, L.V., Hong, S.-Y., és Linz, J.E. (2013) Aflatoxin biosynthesis: current frontiers. *Annu Rev Food Sci Technol* **4**: 293–311.
- Ruijter, G.J.G., Bax, M., Patel, H., Flitter, S.J., van de Vondervoort, P.J.I., de Vries, R.P., és mtsai. (2003) Mannitol is required for stress tolerance in *Aspergillus niger* conidiospores. *Eukaryotic Cell* **2**: 690–698.
- Rush, G.F. és Alberts, D. (1986) tert.-Butyl hydroperoxide metabolism and stimulation of the pentose phosphate pathway in isolated rat hepatocytes. *Toxicol Appl Pharmacol* **85**: 324–331.

- Rzechonek, D.A., Dobrowolski, A., Rymowicz, W., és Mirończuk, A.M. (2018) Recent advances in biological production of erythritol. *Crit Rev Biotechnol* **38**: 620–633.
- Saito, H. és Posas, F. (2012) Response to hyperosmotic stress. *Genetics* **192**: 289–318.
- Samson, R.A., Visagie, C.M., Houburken, J., Hong, S.-B., Hubka, V., Klaassen, C.H.W., és mtsai. (2014) Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Stud Mycol* **78**: 141–173.
- Savoldi, M., Malavazi, I., Soriani, F.M., Capellaro, J.L., Kitamoto, K., da Silva Ferreira, M.E., és mtsai. (2008) Farnesol induces the transcriptional accumulation of the *Aspergillus nidulans* Apoptosis-Inducing Factor (AIF)-like mitochondrial oxidoreductase. *Mol Microbiol* **70**: 44–59.
- van Schaftingen, E. és van Laere, A.J. (1985) Glycerol formation after the breaking of dormancy of *Phycomyces blakesleeanus* spores. Role of an interconvertible glycerol-3-phosphatase. *Eur J Biochem* **148**: 399–404.
- Schuurink, R., Busink, R., Hondmann, D.H., Witteveen, C.F., és Visser, J. (1990) Purification and properties of NADP⁽⁺⁾-dependent glycerol dehydrogenases from *Aspergillus nidulans* and *A. niger*. *J Gen Microbiol* **136**: 1043–1050.
- Serrano, R. (1980) Effect of ATPase Inhibitors on the Proton Pump of Respiratory-Deficient Yeast. *Eur J Biochem* **105**: 419–424.
- Shen, B., Hohmann, S., Jensen, R.G., és Bohnert, a H. (1999) Roles of sugar alcohols in osmotic stress adaptation. Replacement of glycerol by mannitol and sorbitol in yeast. *Plant Physiol* **121**: 45–52.
- Shiozaki, K. és Russell, P. (1995) Counteractive roles of protein phosphatase 2C (PP2C) and a MAP kinase kinase homolog in the osmoregulation of fission yeast. *EMBO J* **14**: 492–502.
- Sies, H. (2017) Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress. *Redox Biol* **11**: 613–619.
- Smirnoff, N. és Cumbes, Q.J. (1989) Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry* **28**: 1057–1060.
- Solomon, P.S., Waters, O.D.C., Jörgens, C.I., Lowe, R.G.T., Rechberger, J., Trengove, R.D., és Oliver, R.P. (2006) Mannitol is required for asexual sporulation in the wheat pathogen *Stagonospora nodorum* (glume blotch). *Biochem J* **399**: 231–239.
- Solomon, P.S., Waters, O.D.C., és Oliver, R.P. (2007) Decoding the mannitol enigma in filamentous fungi. *Trends Microbiol* **15**: 257–262.
- Sutherland, F.C., Lages, F., Lucas, C., Luyten, K., Albertyn, J., Hohmann, S., és mtsai. (1997) Characteristics of Fps1-dependent and -independent glycerol transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **179**: 7790–7795.

- Suzuki, A., Kanamaru, K., Azuma, N., Kato, M., és Kobayashi, T. (2008) GFP-tagged expression analysis revealed that some histidine kinases of *Aspergillus nidulans* show temporally and spatially different expression during the life cycle. *Biosci Biotechnol Biochem* **72**: 428–434.
- Szewczyk, E., Nayak, T., Oakley, C.E., Edgerton, H., Xiong, Y., Taheri-Talesh, N., és mtsai. (2006) Fusion PCR and gene targeting in *Aspergillus nidulans*. *Nat Protoc* **1**: 3111–3120.
- Tamás, M.J., Luyten, K., Sutherland, F.C., Hernandez, A., Albertyn, J., Valadi, H., és mtsai. (1999) *Fps1p* controls the accumulation and release of the compatible solute glycerol in yeast osmoregulation. *Mol Microbiol* **31**: 1087–1104.
- Tamás, M.J., Rep, M., Thevelein, J.M., és Hohmann, S. (2000) Stimulation of the yeast high osmolarity glycerol (HOG) pathway: evidence for a signal generated by a change in turgor rather than by water stress. *FEBS Lett* **472**: 159–165.
- Tatebayashi, K., Takekawa, M., és Saito, H. (2003) A docking site determining specificity of Pbs2 MAPKK for Ssk2/Ssk22 MAPKKs in the yeast HOG pathway. *EMBO J* **22**: 3624–3634.
- Teige, M., Scheikl, E., Reiser, V., Ruis, H., és Ammerer, G. (2001) Rck2, a member of the calmodulin-protein kinase family, links protein synthesis to high osmolarity MAP kinase signaling in budding yeast. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 5625–5630.
- Thomé-Ortiz, P.E., Peña, A., és Ramírez, J. (1998) Monovalent cation fluxes and physiological changes of *Debaryomyces hansenii* grown at high concentrations of KCl and NaCl. *Yeast* **14**: 1355–1371.
- Thorpe, G.W., Fong, C.S., Alic, N., Higgins, V.J., és Dawes, I.W. (2004) Cells have distinct mechanisms to maintain protection against different reactive oxygen species: oxidative-stress-response genes. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 6564–6569.
- Thorsen, M., Di, Y., Tängemo, C., Morillas, M., Ahmadpour, D., Van der Does, C., és mtsai. (2006) The MAPK *Hog1p* modulates *Fps1p*-dependent arsenite uptake and tolerance in yeast. *Mol Biol Cell* **17**: 4400–4410.
- Toledano, M.B., Delaunay, A., Biteau, B., Spector, D., és Azevedo, D. (2003) Oxidative stress responses in yeast. In *Yeast Stress Responses*. Topics in Current Genetics. Hohmann, S. és Mager, W.H. (szerk). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, o. 241–303.
- Vandijken, J. és Scheffers, W. (1986) Redox balances in the metabolism of sugars by yeasts. *FEMS Microbiology Letters* **32**: 199–224.

- Varecza, Z., Emri, T., Pusztahelyi, T., és Pócsi, I. (2006) A novel aspect of NADPH production in ageing *Penicillium chrysogenum*. *Acta Biol Hung* **57**: 115–121.
- Vargas-Pérez, I., Sánchez, O., Kawasaki, L., Georgellis, D., és Aguirre, J. (2007) Response regulators SrrA and SskA are central components of a phosphorelay system involved in stress signal transduction and asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryotic Cell* **6**: 1570–1583.
- Véléz, H., Glassbrook, N.J., és Daub, M.E. (2007) Mannitol metabolism in the phytopathogenic fungus *Alternaria alternata*. *Fungal Genet Biol* **44**: 258–268.
- Ventosa, A., Nieto, J.J., és Oren, A. (1998) Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 504–544.
- Vesth, T.C., Nybo, J.L., Theobald, S., Frisvad, J.C., Larsen, T.O., Nielsen, K.F., és mtsai. (2018) Investigation of inter- and intraspecies variation through genome sequencing of *Aspergillus* section Nigri. *Nat Genet* **50**: 1688–1695.
- Visser, J., Van Rooijen, R., Dijkema, C., Swart, K., és Sealy-Lewis, H.M. (1988) Glycerol uptake mutants of the hyphal fungus *Aspergillus nidulans*. *J Gen Microbiol* **134**: 655–659.
- de Vries, R.P., Flitter, S.J., van de Vondervoort, P.J.I., Chaveroche, M.-K., Fontaine, T., Fillinger, S., és mtsai. (2003) Glycerol dehydrogenase, encoded by *gldB* is essential for osmotolerance in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* **49**: 131–141.
- de Vries, R.P., Riley, R., Wiebenga, A., Aguilar-Osorio, G., Amillis, S., Uchima, C.A., és mtsai. (2017) Comparative genomics reveals high biological diversity and specific adaptations in the industrially and medically important fungal genus *Aspergillus*. *Genome Biol* **18**: 28.
- Wang, Z.-L., Lu, J., és Feng, M.-G. (2012) Primary roles of two dehydrogenases in the mannitol metabolism and multi-stress tolerance of entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Environ Microbiol* **14**: 2139–2150.
- Waring, R.B., May, G.S., és Morris, N.R. (1989) Characterization of an inducible expression system in *Aspergillus nidulans* using *alcA* and tubulin-coding genes. *Gene* **79**: 119–130.
- Wartenberg, D., Vödisch, M., Kniemeyer, O., Albrecht-Eckardt, D., Scherlach, K., Winkler, R., és mtsai. (2012) Proteome analysis of the farnesol-induced stress response in *Aspergillus nidulans*--The role of a putative dehydrin. *J Proteomics* **75**: 4038–4049.
- Weisman, R. (2004) The fission yeast TOR proteins and the rapamycin response: an unexpected tale. *Curr Top Microbiol Immunol* **279**: 85–95.

- Witteveen, C.F. és Visser, J. (1995) Polyol pools in *Aspergillus niger*. *FEMS Microbiol Lett* **134**: 57–62.
- Witteveen, C.F., van de Vondervoort, P., Dijkema, C., Swart, K., és Visser, J. (1990) Characterization of a glycerol kinase mutant of *Aspergillus niger*. *J Gen Microbiol* **136**: 1299–1305.
- Wood, P.J. (1980) Specificity in the interaction of direct dyes with polysaccharides. *Carbohydrate Research* **85**: 271–287.
- Wortman, J.R., Gilsenan, J.M., Joardar, V., Deegan, J., Clutterbuck, J., Andersen, M.R., és mtsai. (2009) The 2008 update of the *Aspergillus nidulans* genome annotation: a community effort. *Fungal Genet Biol* **46 Suppl 1**: S2-13.
- Wyatt, T.T., van Leeuwen, M.R., Wösten, H. a. B., és Dijksterhuis, J. (2014) Mannitol is essential for the development of stress-resistant ascospores in *Neosartorya fischeri* (*Aspergillus fischeri*). *Fungal Genet Biol* **64**: 11–24.
- Yamada, K., Nakagawa, C.W., és Mutoh, N. (1999) *Schizosaccharomyces pombe* homologue of glutathione peroxidase, which does not contain selenocysteine, is induced by several stresses and works as an antioxidant. *Yeast* **15**: 1125–1132.
- Yancey, P.H., Clark, M.E., Hand, S.C., Bowlus, R.D., és Somero, G.N. (1982) Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science* **217**: 1214–1222.
- Yin, W.-B., Reinke, A.W., Szilágyi, M., Emri, T., Chiang, Y.-M., Keating, A.E., és mtsai. (2013) bZIP transcription factors affecting secondary metabolism, sexual development and stress responses in *Aspergillus nidulans*. *Microbiology (Reading, Engl)* **159**: 77–88.
- Yu, J.-H., Hamari, Z., Han, K.-H., Seo, J.-A., Reyes-Domínguez, Y., és Scazzocchio, C. (2004) Double-joint PCR: a PCR-based molecular tool for gene manipulations in filamentous fungi. *Fungal Genet Biol* **41**: 973–981.
- Zapater, M., Sohrmann, M., Peter, M., Posas, F., és de Nadal, E. (2007) Selective requirement for SAGA in *Hog1*-mediated gene expression depending on the severity of the external osmostress conditions. *Mol Cell Biol* **27**: 3900–3910.
- Zhang, C., Meng, X., Gu, H., Ma, Z., és Lu, L. (2018) Predicted Glycerol 3-Phosphate Dehydrogenase Homologs and the Glycerol Kinase *GlcA* Coordinately Adapt to Various Carbon Sources and Osmotic Stress in *Aspergillus fumigatus*. *G3 (Bethesda)* **8**: 2291–2299.

9. Köszönetnyilvánítás

Összinte köszönetemet szeretném kifejezni témavezetőmnek, Prof. Dr. Pócsi István tanszékvezető egyetemi tanárnak, hogy lehetővé tette, és szakmailag támogatta a doktori munkám elkészítését a Debreceni Egyetem Természettudományi Karának Molekuláris Biotechnológiai és Mikrobiológiai Tanszékén.

Ezúton is nagyon köszönöm Dr. Leiter Éva egyetemi docensnek a genetikai munkában nyújtott nélkülözhetetlen segítségét, továbbá hasznos szakmai tanácsait.

Köszönetemet szeretném kifejezni Dr. Emri Tamás egyetemi docensnek az RT-qPCR kísérletek kivitelezésében és kiértékelésében nyújtott segítségével és értékes szakmai tanácsaiért.

Szeretném megköszönni Prof. Dr. Molnár István professzor úrnak (The School of Plant Sciences, College of Agriculture and Life Sciences, The University of Arizona, Tucson, USA) az *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 törzs és a pAg-H3 plazmid, valamint Prof. Dr. Ronald de Vries professzor úrnak (Westerdijk Fungal Diversity Institute, Utrecht, The Netherlands) az *Aspergillus glaucus* CBS 516.65 törzs rendelkezésünkre bocsátását.

Köszönettel tartozom Prof. Dr. Kövér Katalin egyetemi tanárnak és munkatársainak (Debreceni Egyetem Természettudományi és Technológiai Kar Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék) az NMR mérésekben nyújtott segítségükért.

Szeretném megköszönni Dr. Gyémánt Gyöngyi egyetemi docensnek és munkatársainak (Debreceni Egyetem Természettudományi és Technológiai

Kar Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék) a HPLC mérésekben nyújtott segítségüket.

Nagyon köszönöm Tóth Gáborné laboratóriumi asszisztens stresszvizsgálatokban nyújtott odaadó segítségét.

Ezúton is köszönöm Dr. Jakab Ágnes egyetemi adjunktus hasznos szakmai tanácsait, valamint Szabó Zsuzsa tudományos segédmunkatárs élettani kísérletekben nyújtott segítségét.

Köszönetemet szeretném kifejezni Szabó Ivett Gabriella, Molnár Anna, Magi Katalin Fruzsina, Katona Erik, Szabó Fruzsina, Gyarmati Eszter, Szatmári Enikő szakdolgozóknak kitartó és lelkes munkájukért.

Köszönöm továbbá a Molekuláris Biotechnológiai és Mikrobiológiai Tanszék valamennyi dolgozójának a szakmai segítséget és támogatást.

Hálásan köszönöm férjemnek, szüleimnek, testvéremnek és barátaimnak a végtelen türelmet és támogatást, amellyel munkámat segítették.

A doktori munkám elkészítését az EFOP-3.6.1-16-2016-00022 számú projekt támogatta. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósult meg.

Az értekezés alapjául szolgáló kutatást az Innovációs és Technológiai Minisztérium által meghirdetett Felsőoktatási Intézményi Kiválósági Program NKFIH-1150-6/2019 számon támogatta, a Debreceni Egyetem Biotechnológia tématerületi programja keretében.

Az értekezés a GINOP-2.3.3-15-2016-00004 számú projekt keretében, az Európai Unió támogatásával, az Európai Regionális Fejlesztési Alap társfinanszírozásával valósult meg.

10. Tudományos közlemények jegyzéke

Az értekezés alapjául szolgáló tudományos közlemények

1. **Király, A.**, Szabó, I. G., Emri, T., Leiter, É., Pócsi, I. (2020) Supplementation of *Aspergillus glaucus* with *gfdB* gene encoding a glycerol 3-phosphate dehydrogenase in *Aspergillus nidulans*. *Journal of Basic Microbiology*, közlésre elfogadva.
2. **Király, A.**, Hámori, Cs., Gyémánt, Gy., E. Kövér, K., Pócsi, I., Leiter, É. (2019) Characterization of *gfdB*, putatively encoding a glycerol 3-phosphate dehydrogenase in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Biology*, 1878-6146.

Egyéb közlemények

1. Bakti, F., **Király, A.**, Orosz, E., Miskei, M., Emri, T., Leiter, É., Pócsi, I. (2017). Study on the glutathione metabolism of the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Acta microbiologica et immunologica Hungarica*, 64(3), 255-272.

Az értekezés témakörében elhangzott előadások és poszterek

1. **Király, A.**, Hámori, Cs., Gyémánt, Gy., E. Kövér, K., Pócsi, I., Leiter, É. (2019) A glicerín-3-foszfát dehidrogenáz (*gfdB*) gén szerepe az *Aspergillus nidulans* és *Aspergillus glaucus* oxidatív stresszválaszában. V. Biotechnológia a Debreceni Egyetemen Tudományos Szimpózium, Debrecen.
2. **Király, A.**, Molnár, A., Bodnár, V., Hámori, Cs., Gyémánt, Gy., E. Kövér, K., Leiter, É., Pócsi, I. (2019) Glycerol 3-phosphate dehydrogenase *gfdB* in the oxidative stress defense of *Aspergillus nidulans*. III. International Symposium on Fungal Stress, Sao Paulo.
3. **Király, A.**, Molnár, A., Kocsis, B., Pócsi, I., Leiter, É. (2019) Funcional study on *gfdB*, putatively encoding a glycerol 3-phosphate dehydrogenase in *Aspergillus nidulans*. 30th Fungal Genetics Conference, Asilomar.
4. **Király, A.**, Molnár, A., Leiter, É., Pócsi, I. (2018) Characterization of glycerol 3-phosphate dehydrogenase gene deletion strain of *Aspergillus nidulans* filamentous fungus. III. Fiatal Biotechnológusok Országos Konferenciája, Budapest.

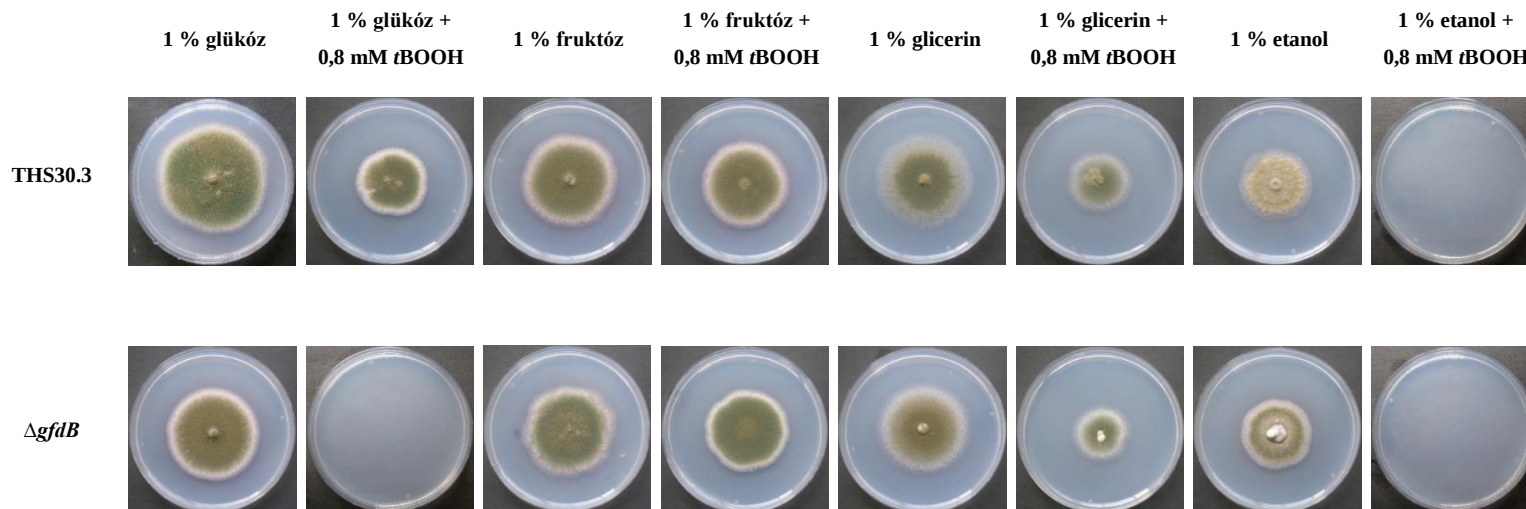
Egyéb előadások és poszterek

1. Bakti, F., **Király, A.**, Molnár, A., Leiter, É., Emri, T., Pócsi, I. (2015) Study on the glutathione metabolism in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. 17th International Congress of the Hungarian Society for Microbiology, Budapest.

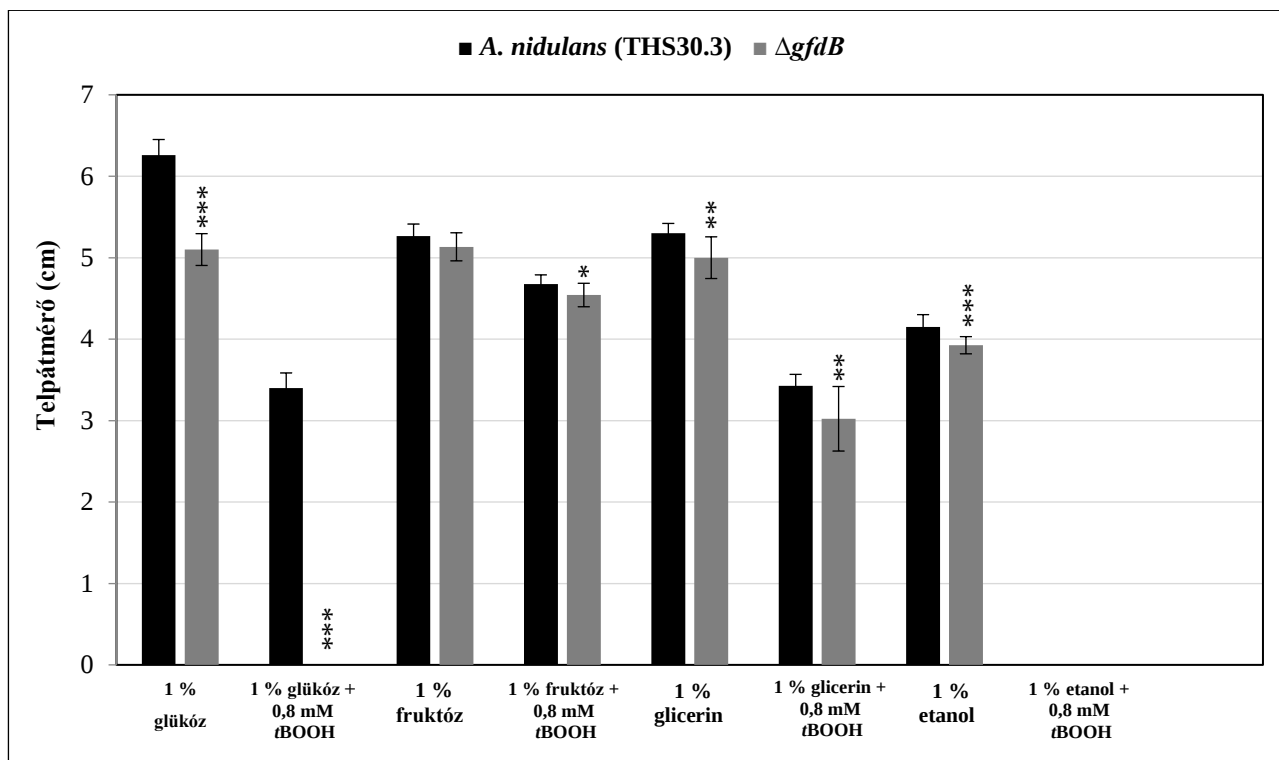
11. Függelék

1. kiegészítő ábra Az *A. nidulans* THS30.3 kontroll és a $\Delta gfdB$ mutáns törzs oxidatívstressz-érzékenységének vizsgálata különböző szénforrásokon (**A-D**). A törzseket 37 °C-on, 5 napon keresztül inkubáltuk. A következő ábrákon feltüntettük a szignifikáns eltéréseket a kontroll és a mutáns törzs telepátmérői között (**B**), a kontroll törzs telepátmérői között különböző szénforrásokon (**C**), illetve a mutáns törzs telepátmérői között eltérő szénforrásokon (**D**) 0,8 mM *t*BOOH jelenlétében és anélkül.

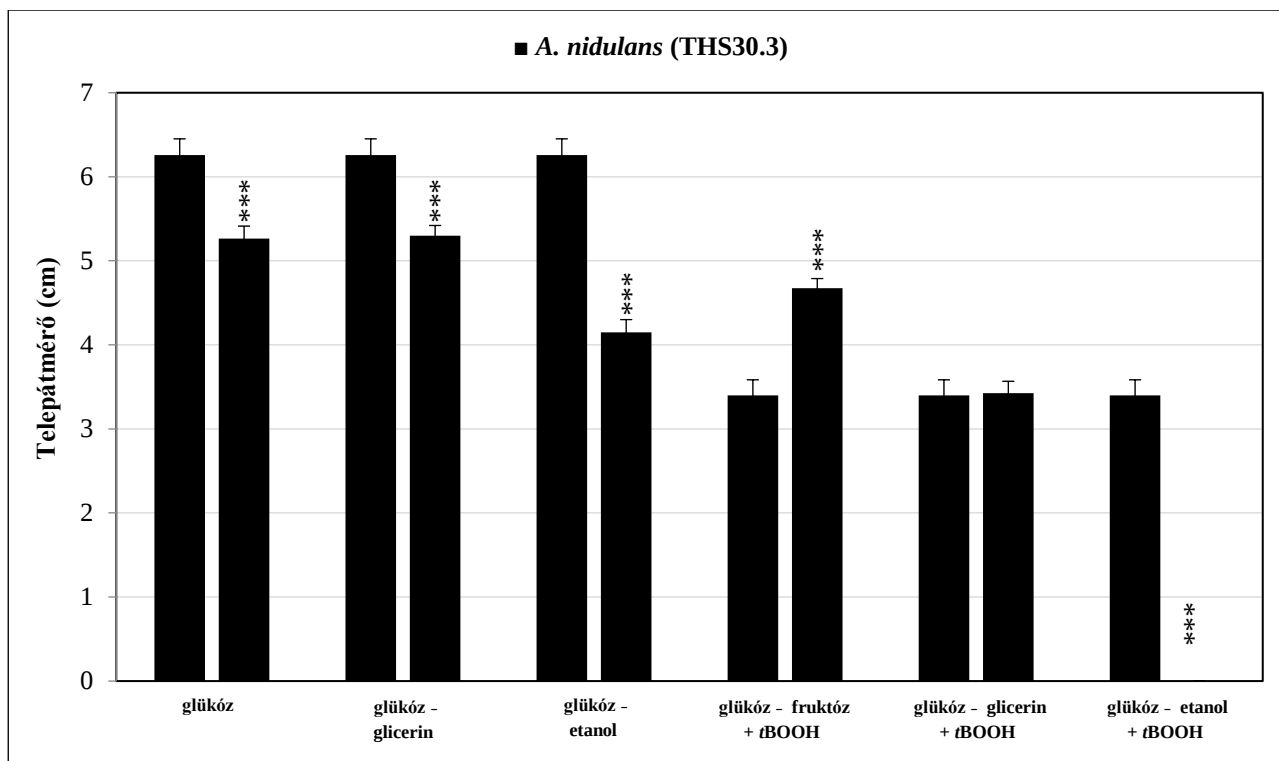
A

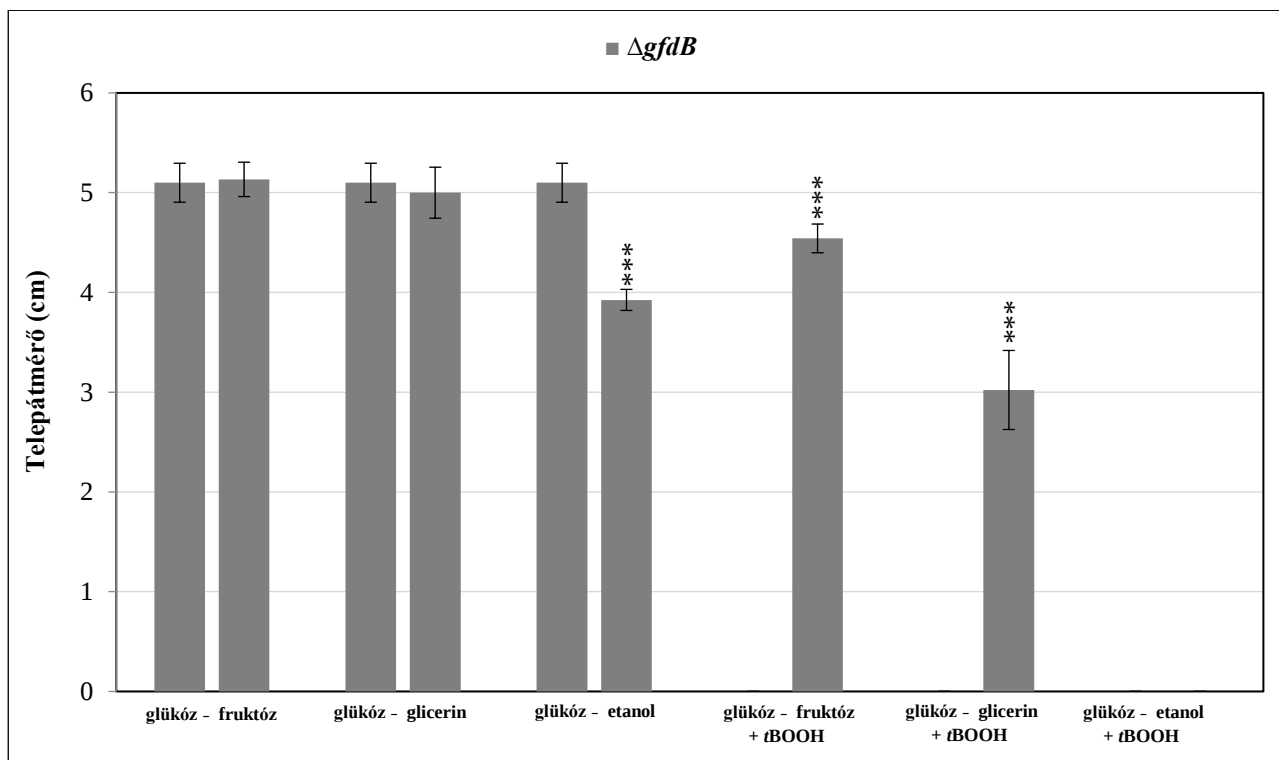


B

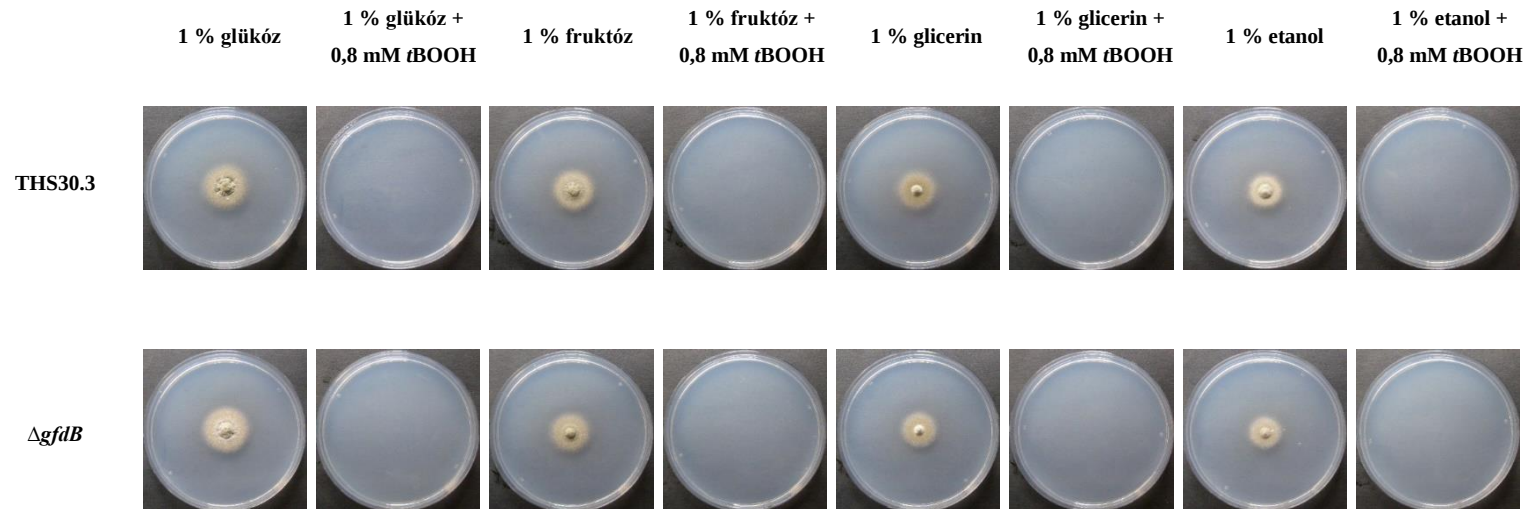


C

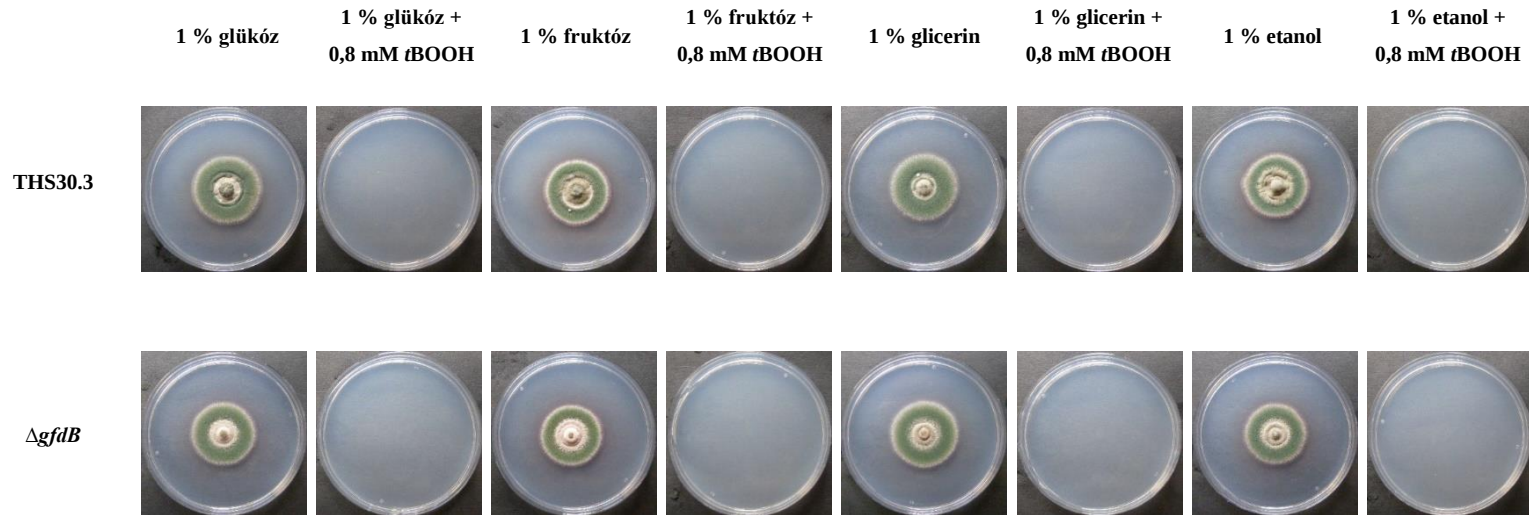


D

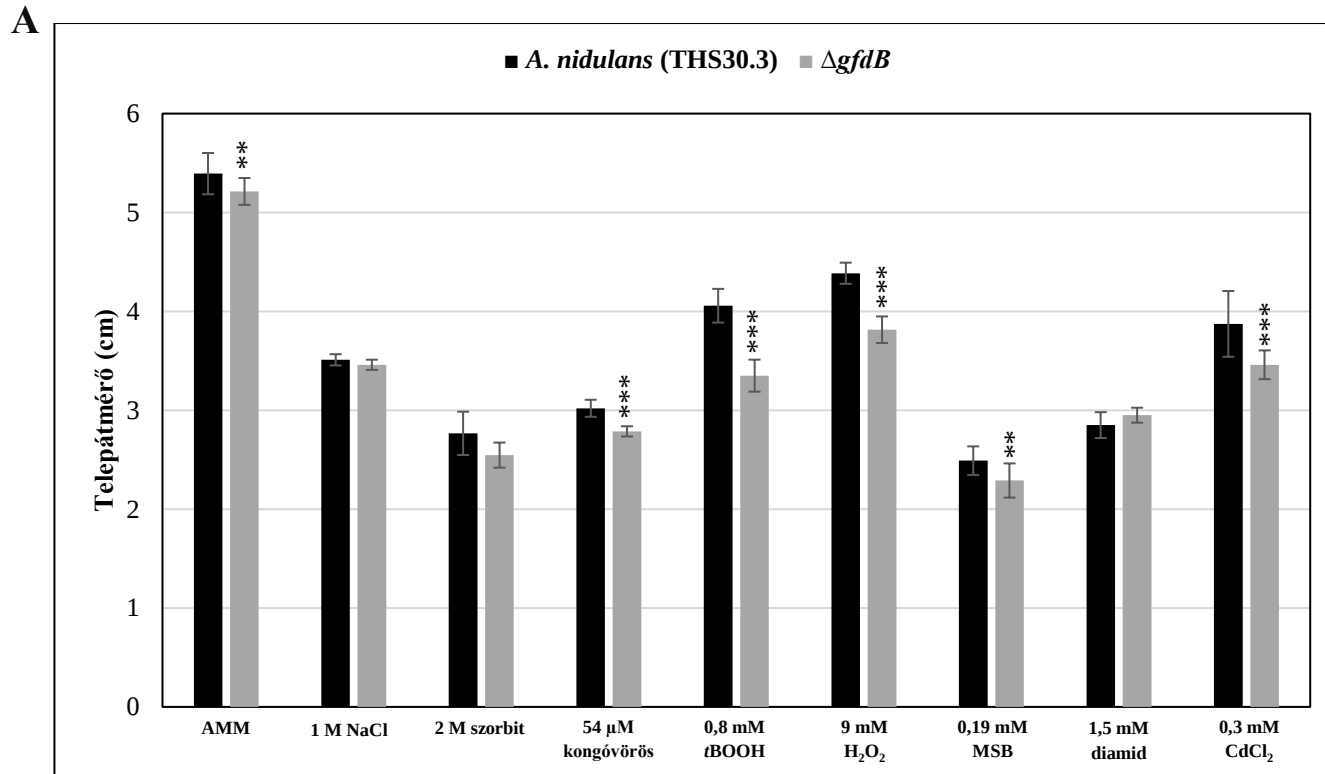
2. kiegészítő ábra Az *A. nidulans* THS30.3 kontroll és a $\Delta gfdB$ mutáns törzs oxidatívstressz-érzékenységének vizsgálata különböző szénforrásokon 1 M NaCl jelenlétében. A törzseket 37 °C-on, 5 napon keresztül inkubáltuk.

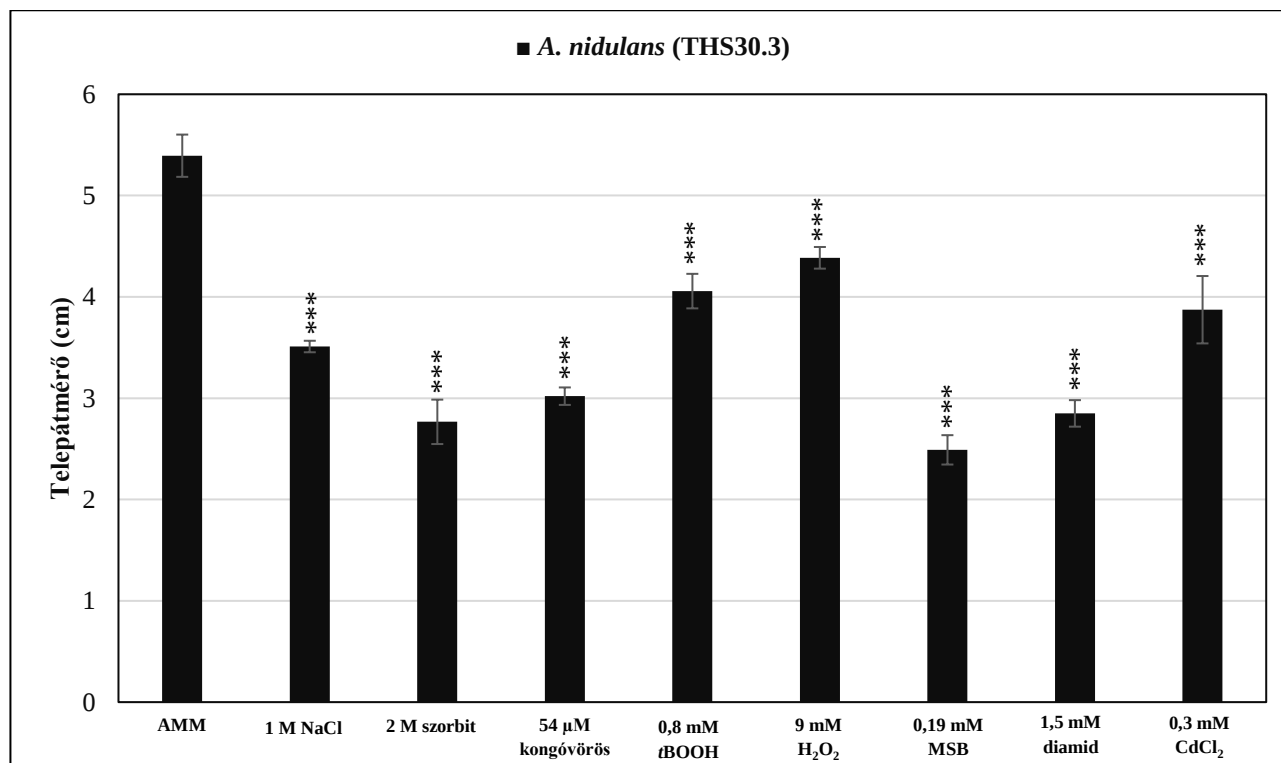


3. kiegészítő ábra Az *A. nidulans* THS30.3 kontroll és a $\Delta gfdB$ mutáns törzs oxidatívstressz-érzékenysége vizsgálatára különböző szénforrásokon 2 M szorbit jelenlétében. A törzseket 37 °C-on, 5 napon keresztül inkubáltuk.

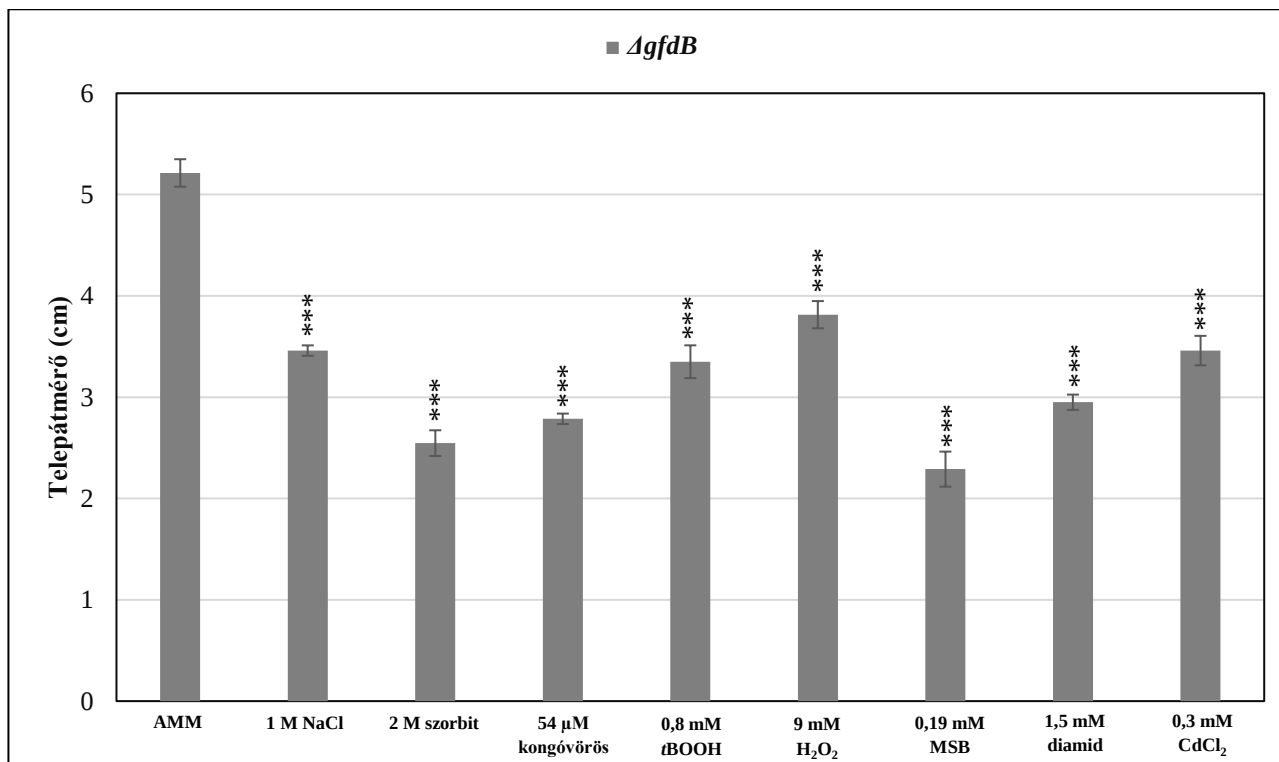


4. kiegészítő ábra A THS30.3 és a $\Delta gfdB$ törzs stresszérzékenysége a vizsgálata 25 °C-on, 10 napos inkubációt követően (A-C). A következő ábrákon feltüntettük a szignifikáns eltéréseket a kontroll és a mutáns törzs telepátmérői között (A), a kezeletlen és kezelt kontroll törzs telepátmérői között (B), illetve a kezeletlen és kezelt mutáns törzs telepátmérői között (C).

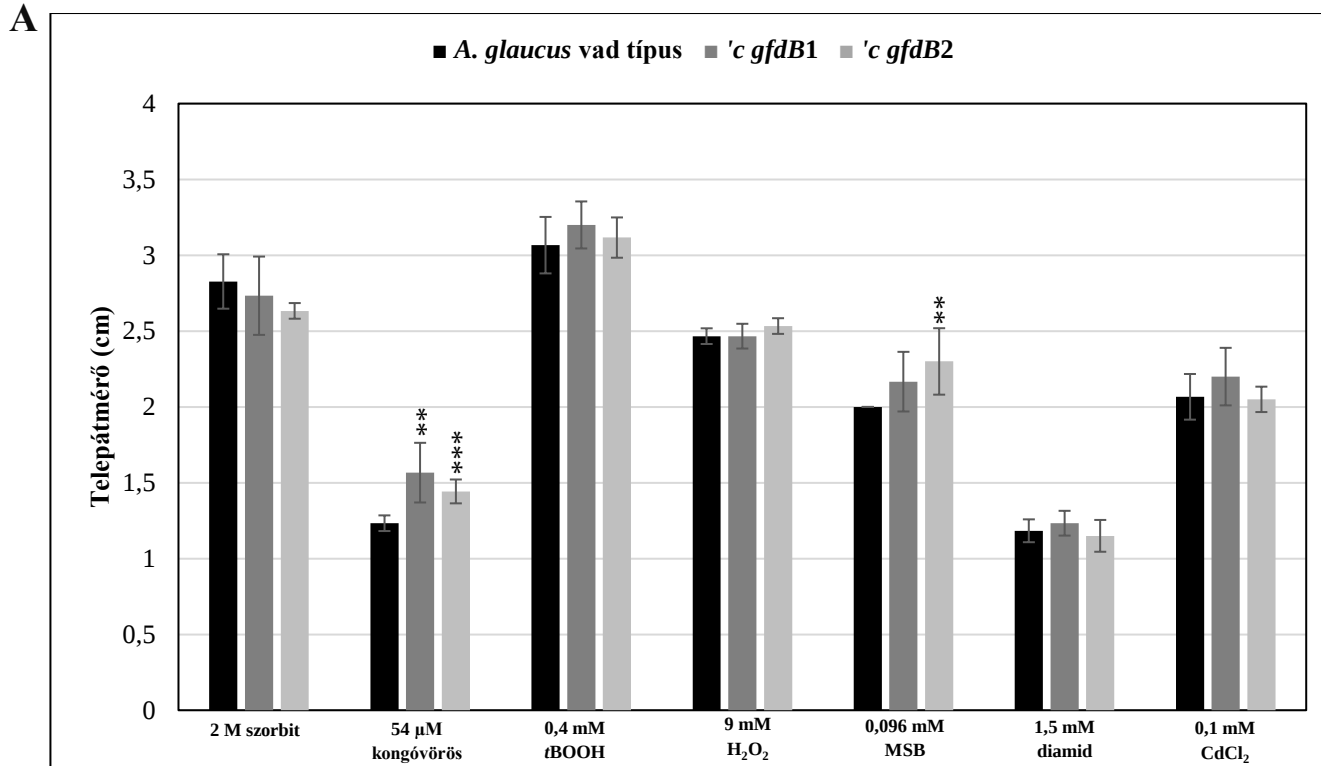


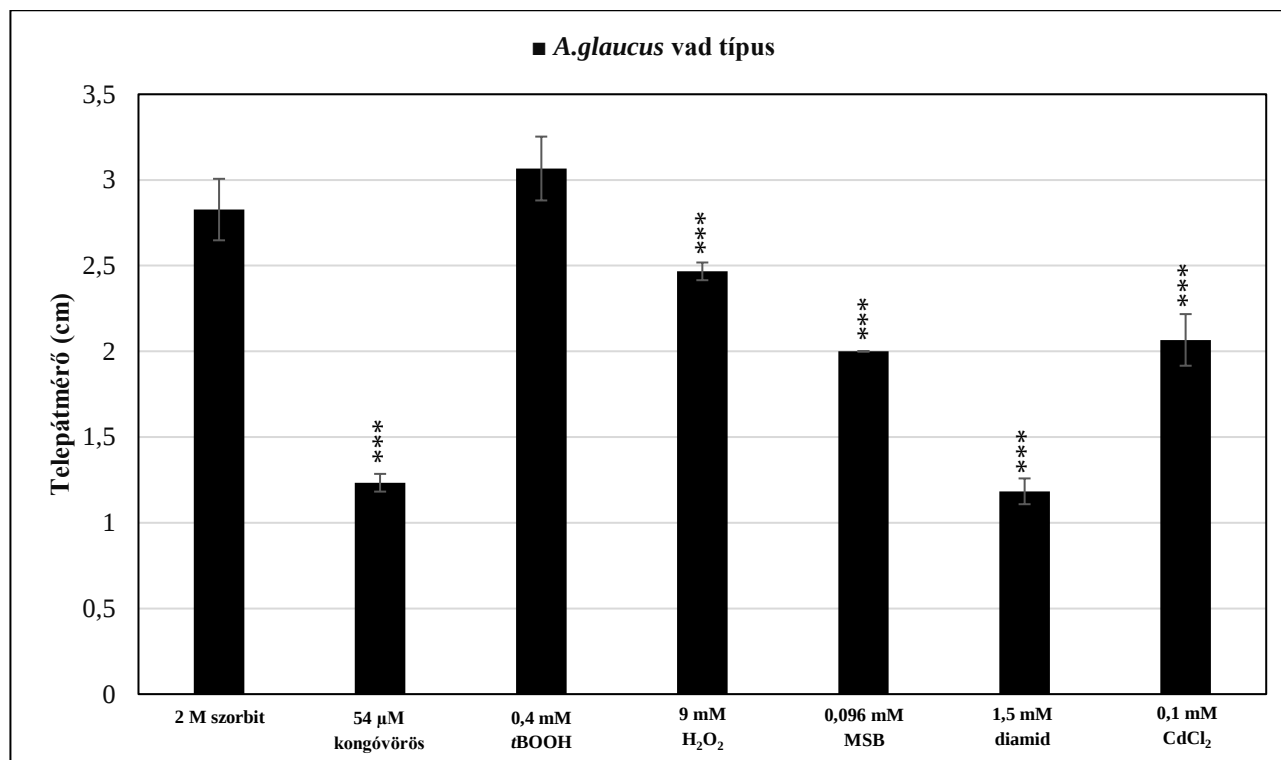
B

C

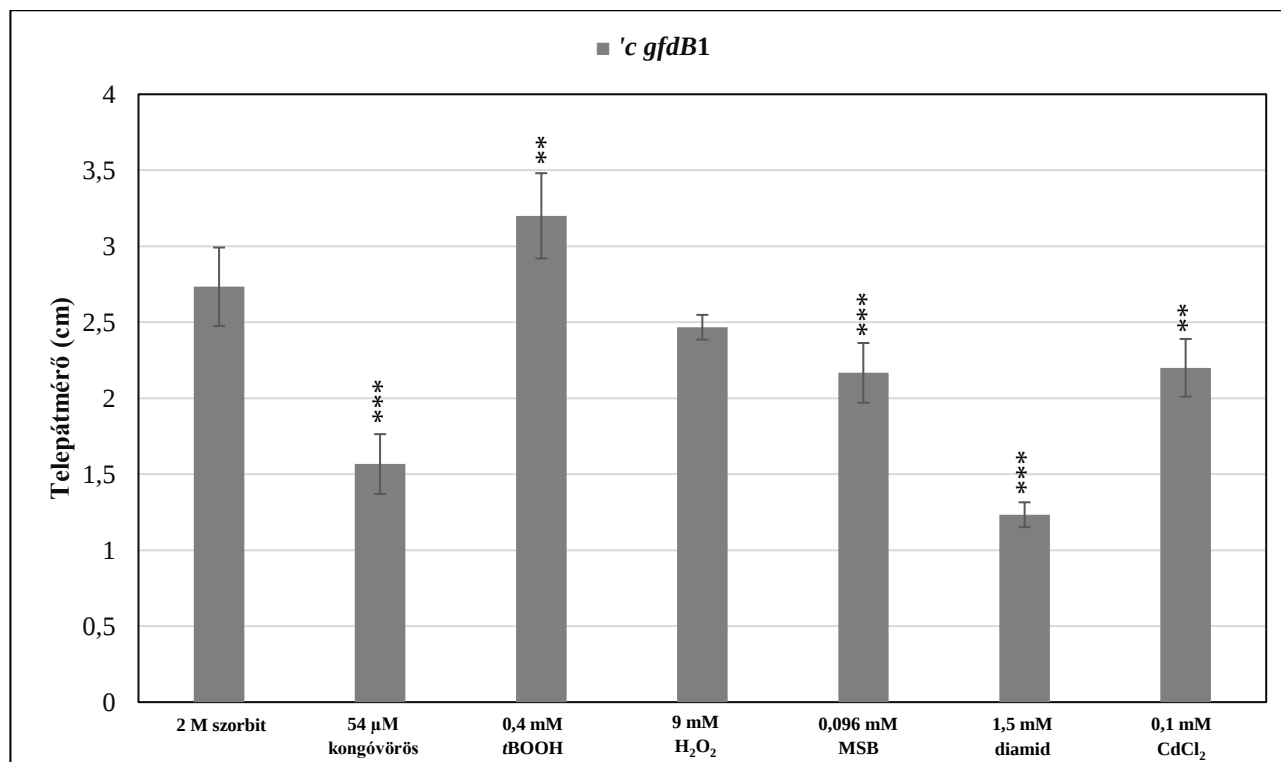


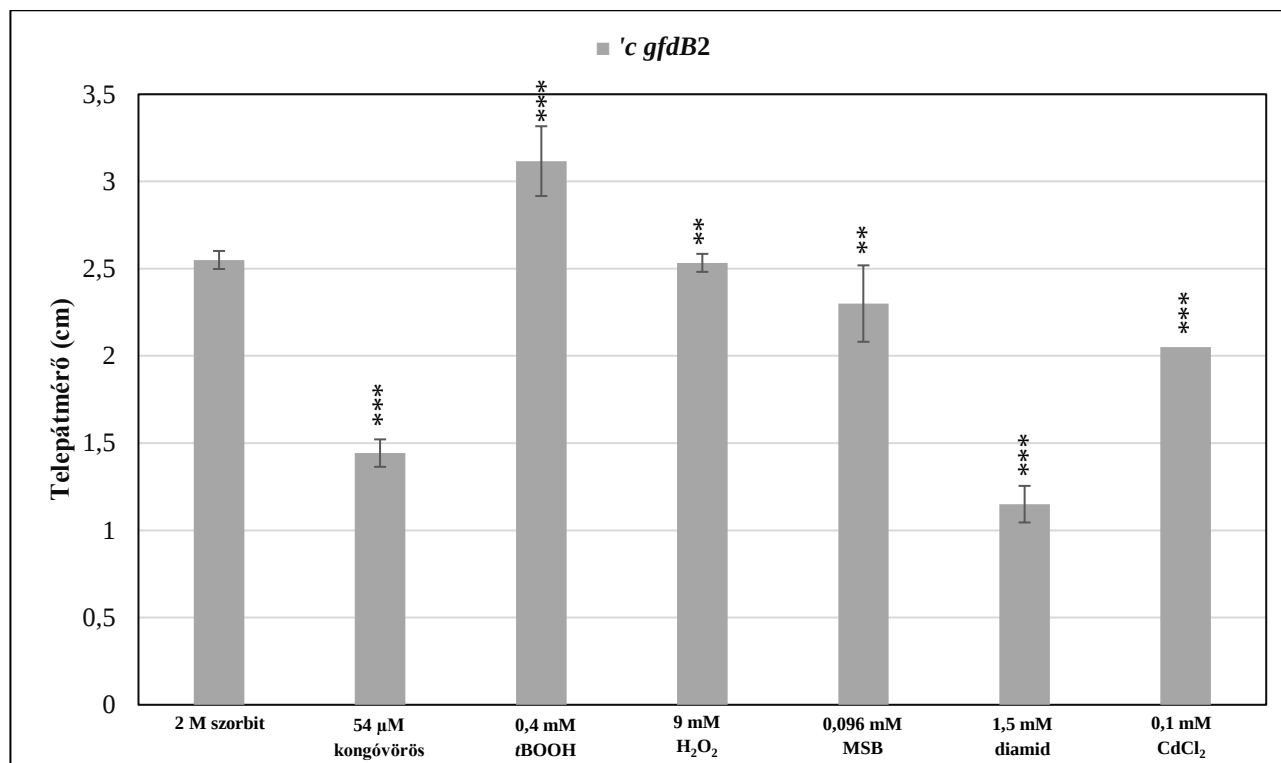
5. kiegészítő ábra Az *A. glaucus* kontroll, a '*c gfdB1*' és a '*c gfdB2*' törzsek stresszérzékenysége a vizsgálata 25 °C-on, 5 napos inkubációt követően (A-D). A következő ábrákon feltüntettük a szignifikáns eltéréseket a kontroll és a mutáns törzs telepátmérői között (A), a kezeletlen és kezelt kontroll törzs (B), a kezeletlen és kezelt '*c gfdB1*' törzs (C), valamint a kezeletlen és kezelt '*c gfdB2*' törzs telepátmérői között (D).



B

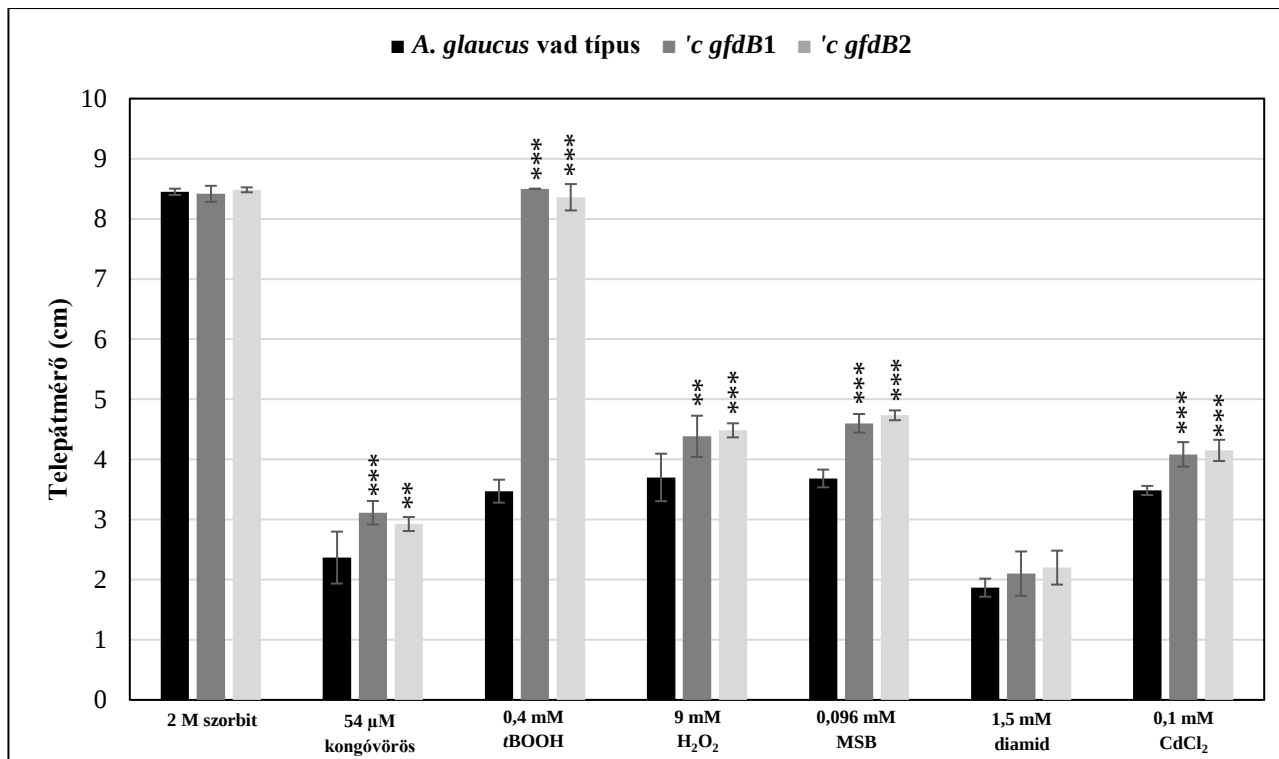
C

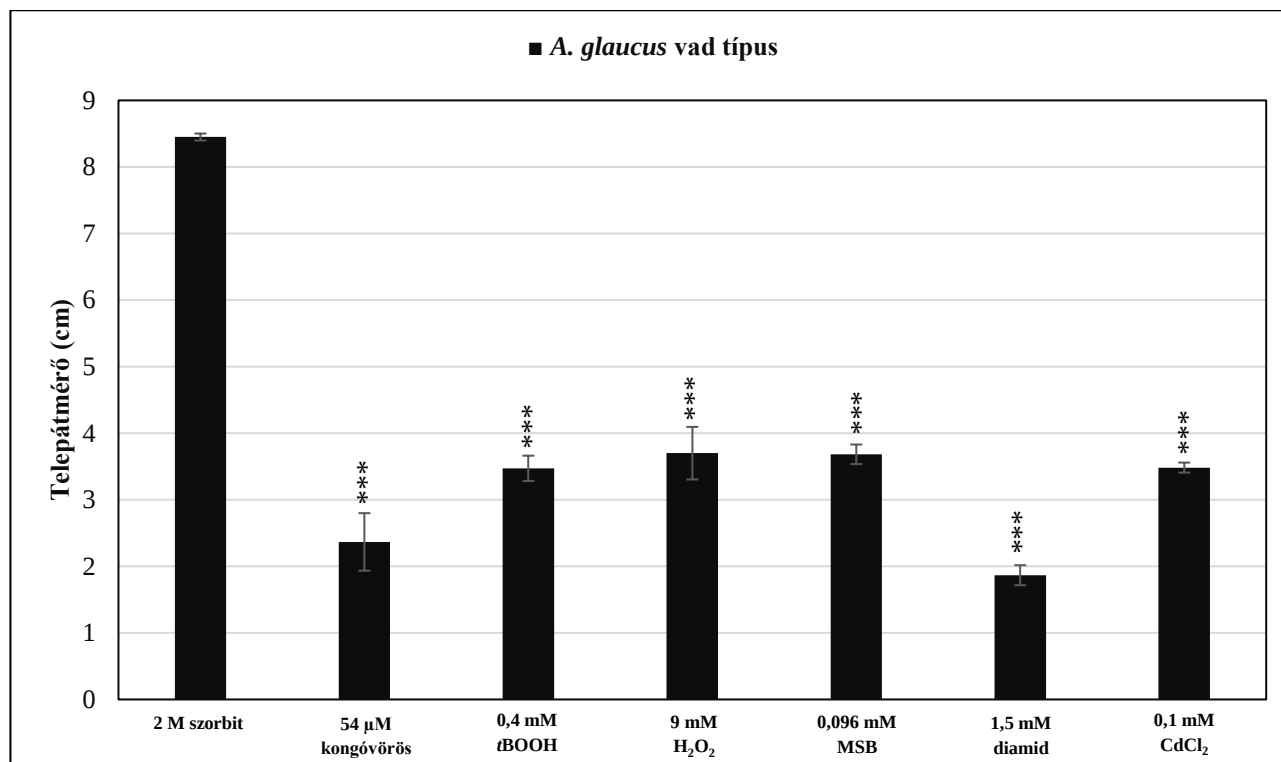


D

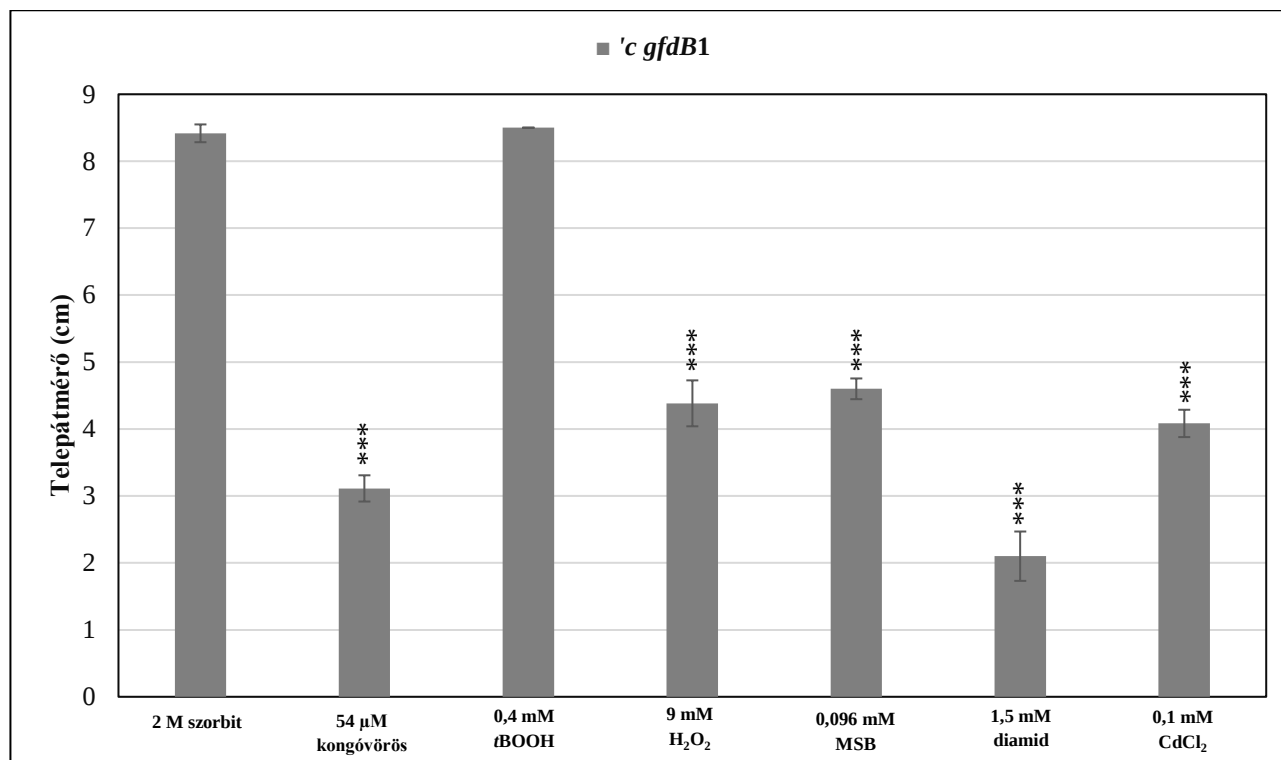
6. kiegészítő ábra Az *A. glaucus* kontroll, a '*c gfdB1*' és a '*c gfdB2*' törzsek stresszérzékenysége a vizsgálata 25 °C-on, 10 napos inkubációt követően (A-D). A következő ábrákon feltüntettük a szignifikáns eltéréseket a kontroll és a mutáns törzs telepátmérői között (A), a kezeletlen és kezelt kontroll törzs (B), a kezeletlen és kezelt '*c gfdB1*' törzs (C), valamint a kezeletlen és kezelt '*c gfdB2*' törzs telepátmérői között (D).

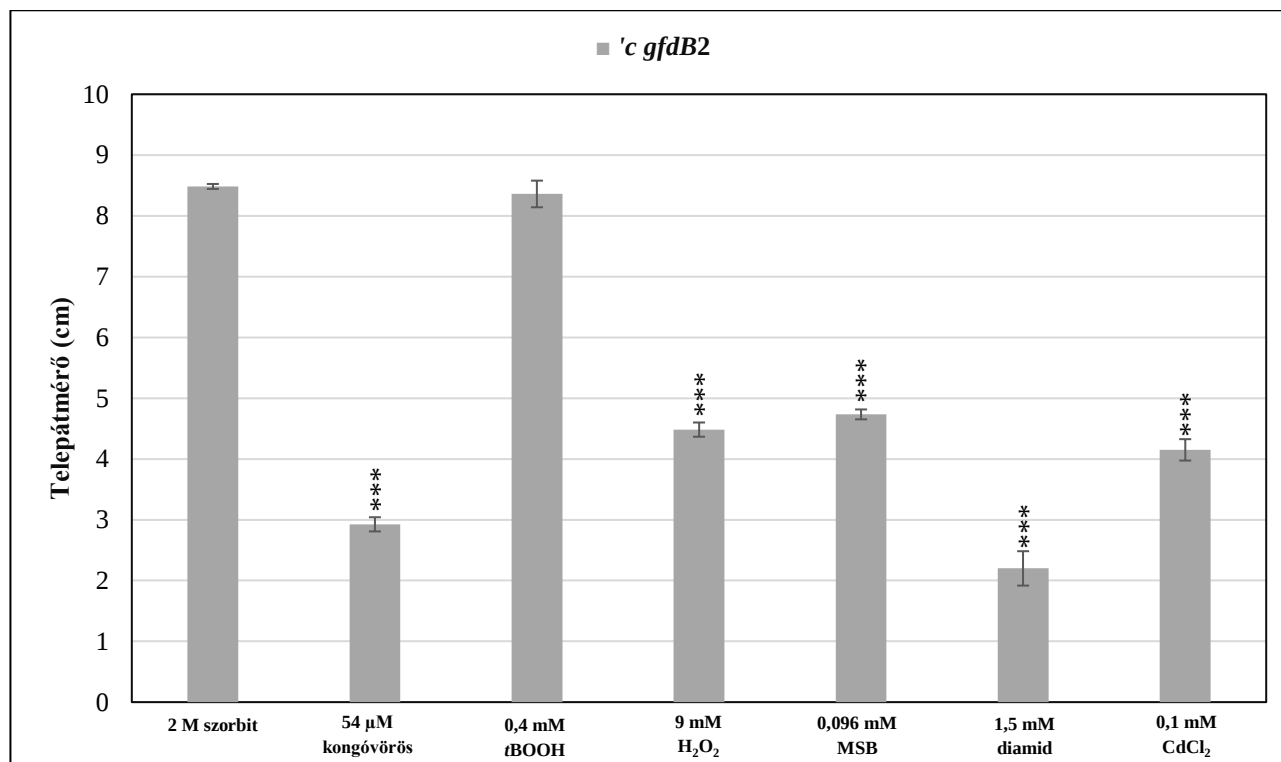
A



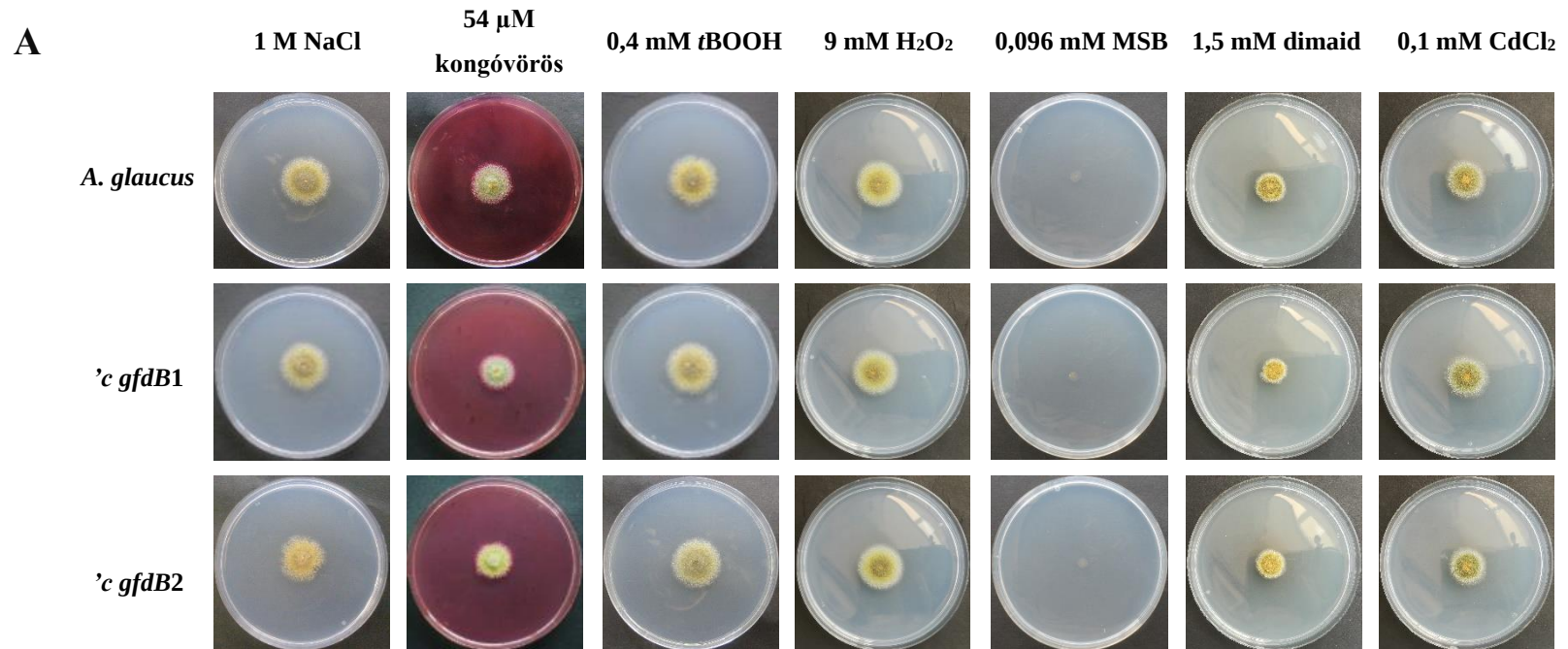
B

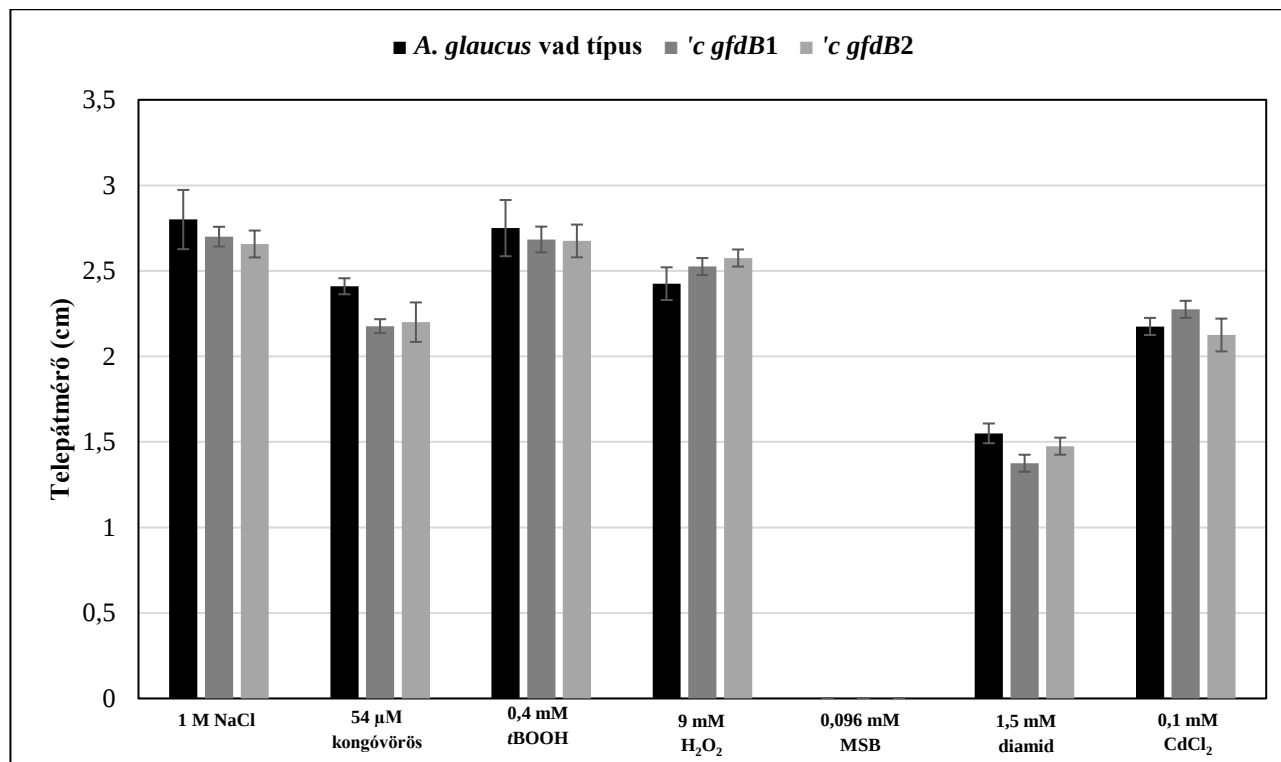
C



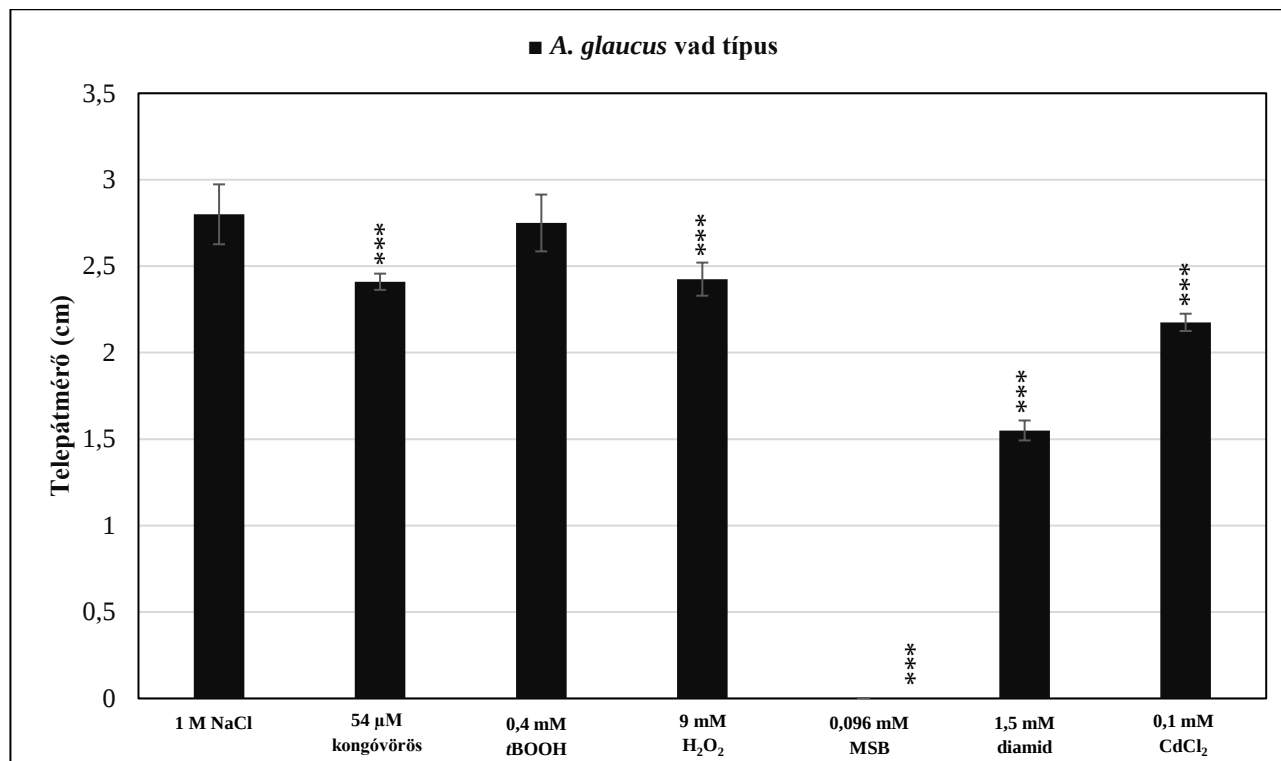
D

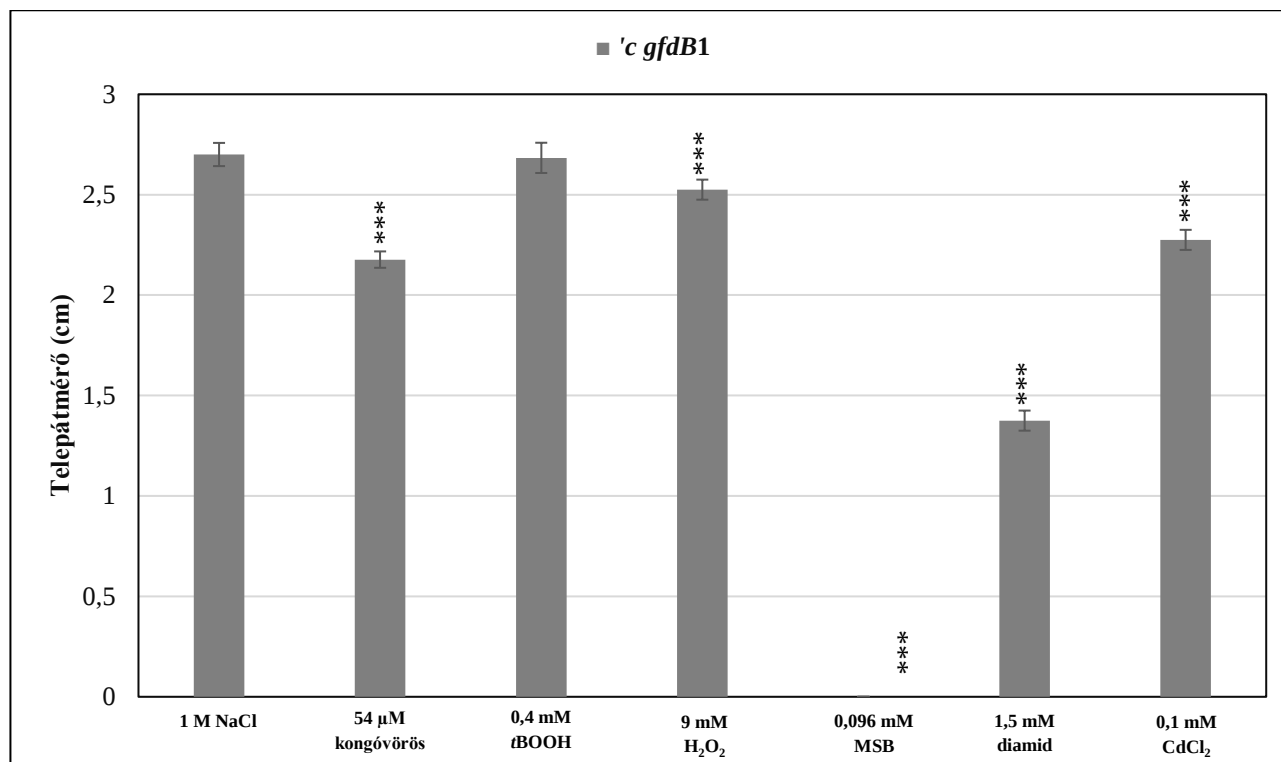
7. kiegészítő ábra Az *A. glaucus* kontroll, a '*c gfdB1*' és '*c gfdB2*' mutáns törzsek stresszérzékenységének vizsgálata 1 M NaCl-dal kiegészített minimál táptalajon (A-E). A következő ábrákon feltüntettük a szignifikáns eltéréseket a kontroll és a mutáns törzs telepátmérői között (A-B), a kezeletlen és kezelt kontroll törzs (C), a kezeletlen és kezelt '*c gfdB1*' törzs (D), valamint a kezeletlen és kezelt '*c gfdB2*' törzs telepátmérői között (E).

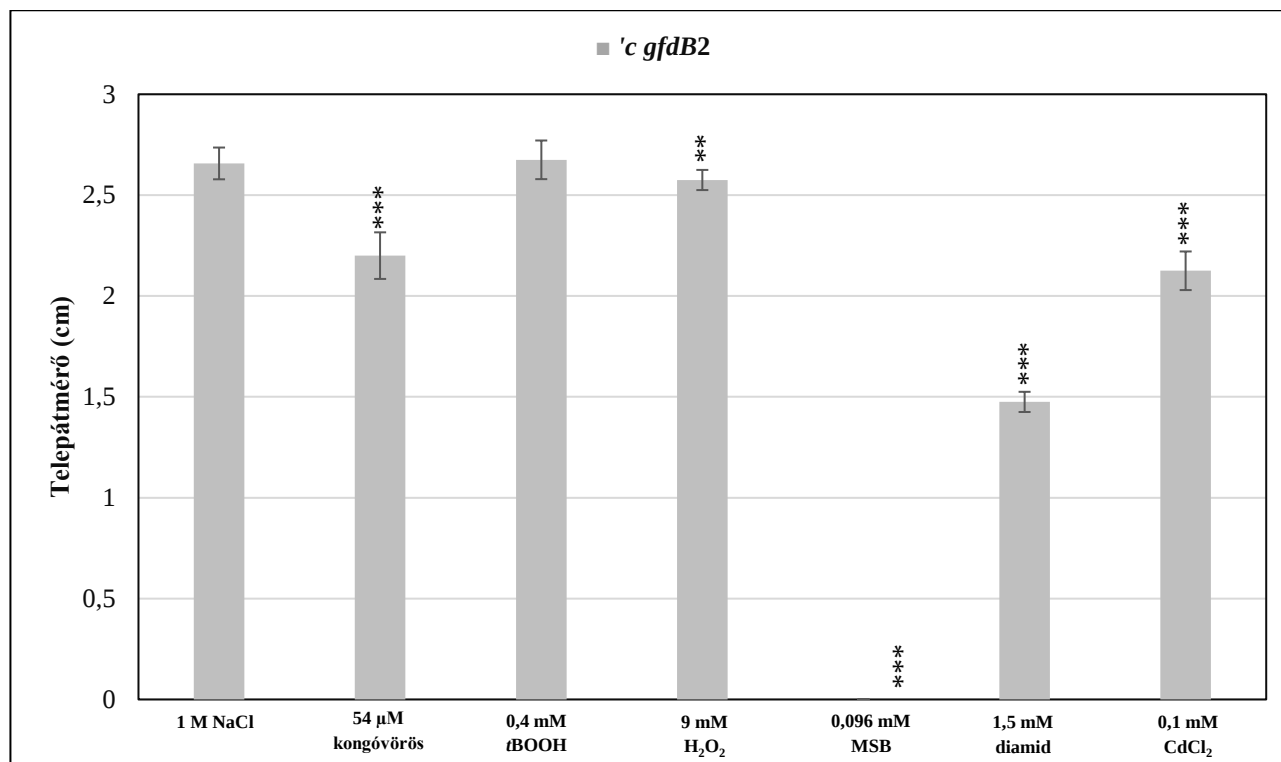


B

C

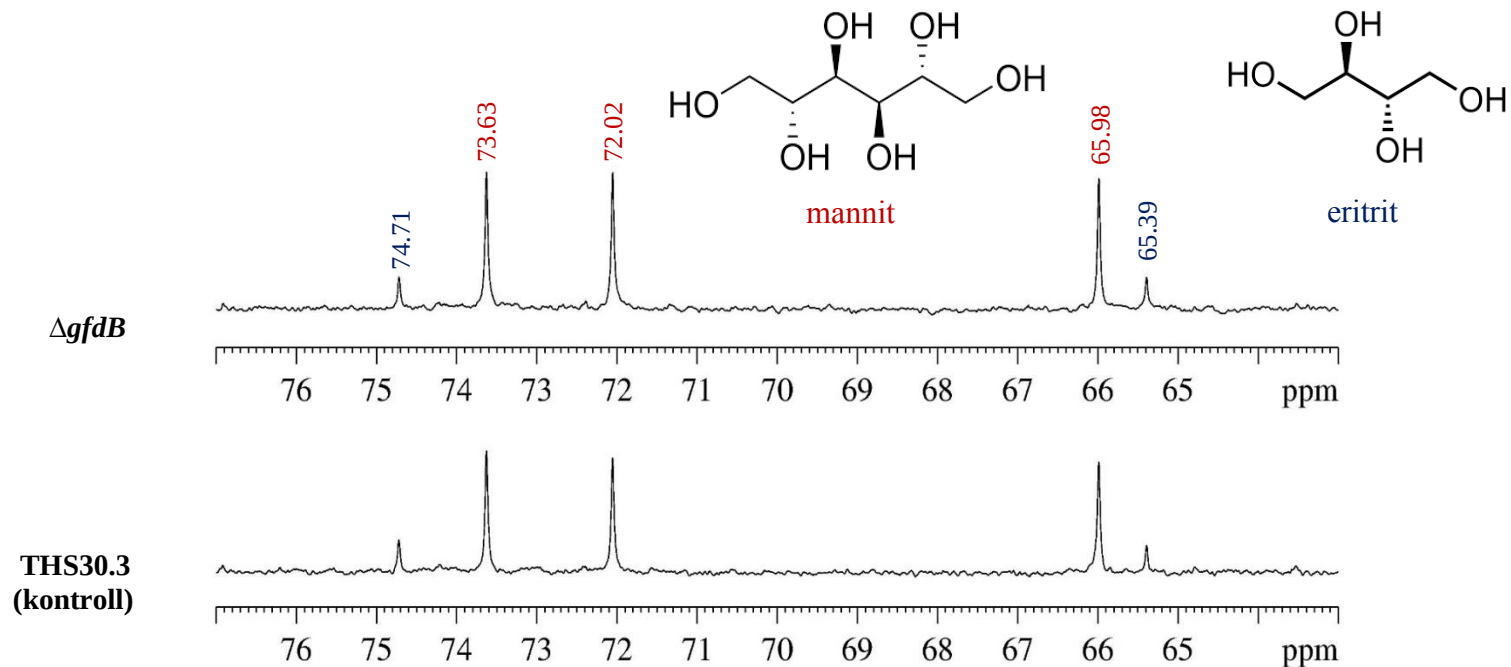


D

E

8. kiegészítő ábra A $\Delta gfdB$ és a THS30.3 kontroll törzs poliol tartalmának vizsgálata ^1H és ^{13}C NMR spektroszkópiával stresszmentes körülmények között (A) és 0,4 mM *t*BOOH jelenlétében (B).

A



B

