

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



Martin Veselý

Role sekundárních metabolitů v patogenezi hub

Secondary metabolites in fungal pathogenesis

Bakalářská práce

Školitel: Mgr. Adéla Čmoková

Praha 2022

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Mníšku pod Brdy, 27. 07. 2022

.....
Martin Veselý

Poděkování

Rád bych tímto poděkoval mé školitelce Mgr. Adéle Čmokové za nekonečnou kopu trpělivosti, dobré vůle a času stráveného nad připomínkami a kontrolou mé práce. Bez jejího vedení by tato práce nemohla vzniknout.

Zároveň chci moc poděkovat mé rodině a především mým rodičům, kteří mě po celou dobu mého studia bezmezně podporovali. Především ale chci poděkovat své mamince, která mi velice pomohla s korekturou této práce po jazykové stránce.

Také bych chtěl poděkovat lidem, kteří se na této práci přímo nepodíleli, ale bez jejich zásahu v mém životě bych se nemohl ocitnout na cestě, která vedla k sepsání této práce. Jsou jimi RNDr. Štěpánka Máchová, Mgr. Ondřej Bílý, Věra Hanousková a Mgr. Helena Buchtová.

Speciální poděkování patří Kateřině Olše Fliegerové, RNDr., CSc., která mě jako první nadchla pro studium hub a vědeckou dráhu obecně.

Abstrakt

Schopnost houbových patogenů vyvolat infekci a později přežít v hostiteli je závislá faktorech virulence často na bázi primárních metabolitů (hydrofobiny, proteázy, fosfolipázy, katalázy a další). Infekce se však také účastní celá řada patogenem produkováných sekundárních metabolitů, jejichž role během infekce je ale často upozaděována.

První část této bakalářské práce je věnována tématu vztahu hostitel-patogen a obeznámením čtenáře s některými základními, obecně uznávanými virulentními faktory hub. Ve druhé části jsou popsány známé role sekundárních metabolitů v jednotlivých částech průběhu infekce. Pro úspěšnou infekci si patogen v první fázi vytváří vhodné stanoviště na tkáních hostitele pro růst pomocí produkce antimikrobiálních látek (...). V dalších fázích potom zabraňuje fagocytóze svých spor hostitelem (melaniny). Samotná infekce je často podmíněna poškozením tkání hostitele což je umožněno například produkcí cytotoxických látek (xanthomegnin, riboflavin) a regulací/modulací odpovědi imunitního systému hostitele (gliotoxin, pseurotin). V neposlední řadě mezi faktory virulence řadíme i ty které umožňují dlouhodobému přežívání v hostiteli (siderofory).

Houbové patogeny poikilotermních živočichů často nejsou primárními patogeny a produkce zmíněných sekundárních metabolitů často není výsledkem selekce těchto metabolitů na patogenní způsob života. Jejich role během života sekundárního patogena a jeho nepatogenních příbuzných v přirozeném prostředí je diskutována v závěru práce.

V této práci se tak podařilo shrnout několik látek sekundárního metabolismu které hrají významnou roli v infekci hostitele. Práce tak poukázala na důležitost věnovat pozornost také těmto látkám jak z ekologického hlediska, tak pro vývoj nových terapeutik.

Klíčová slova: sekundární metabolity, patogenezé, houby, faktory virulence, melanin, riboflavin, gliotoxin, pseurotin A, siderofory, xanthomegnin

Abstract

The ability of fungal pathogens to induce infection and later survive in its host is dependent on virulence factors. Often these factors are based on primary metabolites (hydrophobins, proteases, phospholipases, catalases etc.). Nonetheless many pathogen produced secondary metabolites are also involved in the infection process. Their true role during infection used to be rather undervalued.

First part of this bachelor degree thesis aims to describe host-pathogen relation and afterwards introduce reader with some basic, commonly accepted virulence factors of fungi. In the second part of this thesis known roles of secondary metabolites are described in each stages of progressing infection. In the first stage a pathogen needs to create a suitable habitat on host tissues to ensure growth. This is in part done by antimicrobial substances (...). In later stages pathogen prevents phagocytosis of its spores by host (melanins). Successful infection is often accompanied with host tissue damage that is induced by production of cytotoxic substances (xanthomegnin, riboflavin) and immunoregulation of host immune system (gliotoxin, pseurotin). Last but not least there are virulence factors that ensure prolonged survival in host (siderophores).

Fungal pathogens of poikilotherm animals are mostly not primary pathogens and thus production of mentioned secondary metabolites is often not the result of selection to pathogenic lifestyle. Their role during secondary pathogen life cycle and other non-pathogenic related species in their natural habitat is discussed at the conclusion of this thesis.

This thesis brings a summary of some secondary metabolites which play an important role in the infection process within the host organism. This thesis also points to the importance of described substances from ecological perspective and for future new therapeutic approaches.

Key words: secondary metabolites, pathogenesis, fungus, virulence factors, melanin, riboflavin, gliotoxin, pseurotin A, siderophores, xanthomegnin

Obsah

1. Úvod	1
2. Patogenita, virulence a virulentní faktory	2
2.1. Obecné faktory virulence patogenních hub	4
2.1.1. Termotolerance a růst při fyziologickém pH	4
2.1.2. Složení buněčné stěny	4
2.1.3. Extracelulární proteiny a enzymy	4
3. Sekundární metabolity jako faktor virulence	5
3.1. Sekundární metabolity vytvářející patogenu prostor	5
3.2. Sekundární metabolity chránící houbu před efekty fagocytózy	7
3.2.1. Melaniny	8
3.2.1.1. DOPA-melanin	9
3.2.1.2. DHN-melanin	10
3.3. Cytotoxické sekundární metabolity	11
3.3.1. Xanthomegnin	11
3.3.2. Riboflavin	12
3.3.3. Gliotoxin - cytotoxické účinky	13
3.4. Imunomodulační sekundární metabolity	14
3.4.1. Gliotoxin - imunomodulační účinky	15
3.4.2. Pseurotin A	17
3.5. Esenciální sekundární metabolity pro růst v hostiteli	18
3.5.1. Siderofory	18
4. Diskuze a závěr	20
5. Zdroje:	23

Seznam použitých zkratek

Zkratka	Anglický název	Český název
PRR	pattern recognition receptors	pattern recognition receptory
PKS	polyketide synthase	polyketid syntetáza
NRPS	nonribosomal peptide synthetase	neribozomální peptid syntetáza
ROS	reactive oxygen species	reaktivní formy kyslíku
WNS	white-nose syndrome	syndrom bílého nosu
NET	neutrophil extracellular trap	neutrofilní extracelulární past
HPLC	high-performance liquid chromatography	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
DOPA	dihydroxyphenylalanine	dihydroxyfenylalanin
DHN	dihydroxynaphthalene	dihydroxynaftalen
FAD	flavin adenine dinucleotide	flavinadenindinukleotid
TNF-α	tumor necrosis factor α	faktor nádorové nekrózy α
IL	interleukin	interleukiny
NF-κB	nuclear factor kappa B	nukleární faktor kappa B
LUBAC	linear ubiquitin chain assembly complex	-
DTT	dithiothreitol	dithiotreitol
SNP	single-nucleotide polymorphism	jednonukleotidový polymorfismus

1. Úvod

Z asi 99 000 známých druhů hub je asi jen 400 patogenních pro člověka [1–3]. Většina těchto druhů vytváří vcelku neškodné mykózy, které nejsou život ohrožující. Z těchto 400ti má jen několik desítek druhů schopnost vytvářet i systematické mykózy, které mají až 80% úmrtnost [4–6].

I tak infekce houbovými patogeny zabije ročně odhadem kolem 1,6 milionů lidí [7], což je asi o 100 000 více, než kolik ročně zabije infekce tuberkulózou [8]. Houbové patogeny ale neohrožují pouze lidské životy, ale také mohou mít zničující charakter na zvířecí společenstva. Jako příklad lze uvést rychle se šířící a pro místní společenstva naprosto devastující *Batrachochytrium dendrobatidis*, která napadá kůži obojživelníků a má značnou mortalitu u postižených druhů [9–11]. Dalším příkladem také může být *Pseudogymnoascus destructans*, který způsobuje chorobu známou jako white-nose syndrome (syndrom bílého nosu), jež má za následek vysokou mortalitu naivních populací netopýrů především v Severní Americe [12].

Patogeny při infekci používají celou řadu různých virulentních faktorů. Může se jednat o různé enzymy a také různé sekundární metabolity. Důležitost sekundárních metabolitů byla dlouhou dobu spíše přehlížena, ale v poslední době se tento přístup mění kvůli novým poznatkům na poli sekundárních metabolitů při infekci. Sekundární metabolity hub je velmi pestrá skupina látek, které obecně nejsou nezbytné pro život organismu, který je produkuje, ale poskytují svému producentovi určitou selekční výhodu, která se může ukázat být nezbytná při infekci [13,14]. Menší počet studií se ale věnuje vlivu sekundárních metabolitů při patogenezi, jejich produkci, účinku a roli na průběh infekce.

Se zvyšujícím se počtem mykotických infekcí každý rok a stále se zvětšujícím počtem vhodných hostitelů, kterými pro systémové mykózy (které vytvářejí největší podíl smrtí) jsou nejčastěji pacienti s oslabeným imunitním systémem, roste také tlak na účinnější a cílenější metody pro boj s těmito infekcemi [15,16]. Sekundární metabolity mohou být jednou ze skupin, která pro tento cíl může být velmi přínosná.

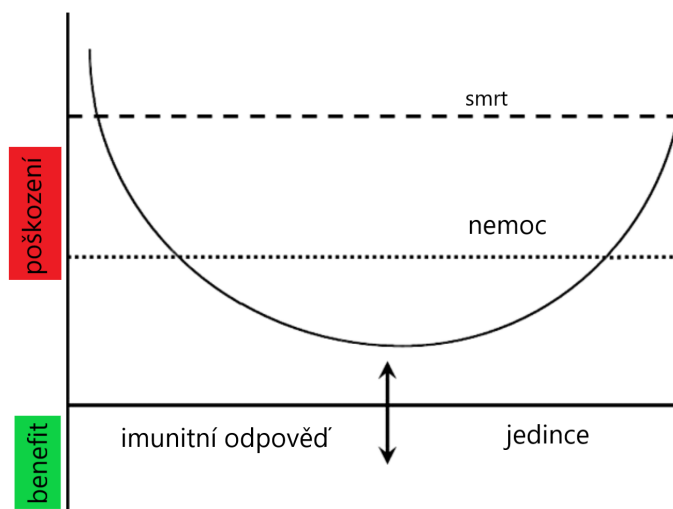
V této bakalářské práci se pokusím vytvořit stručný přehled sekundárních metabolitů, které se prokazatelně účastní patogeneze u hub. Budou vysvětleny mechanismy působení, účinky na organismus a příklady producentů. V průběhu práce bude také vysvětlováno, k jakému původnímu účelu mohl daný metabolit sloužit s ohledem na to, že některé patogenní druhy v této bakalářské lze označit za oportunistické patogeny, které mají své přirozené prostředí v půdě.

V závěru budou předloženy otázky, které je nutné ještě ohledně role sekundárních metabolitů při patogenezi zodpovědět. Zároveň také budou nastíněny konkrétní možnosti využití patogenních sekundárních metabolitů ve zdravotnictví.

2. Patogenita, virulence a virulentní faktory

Definice patogenity, virulence a faktoru virulence je složitá, jelikož neexistuje jednotná shoda, co přesně tyto termíny znamenají [17].

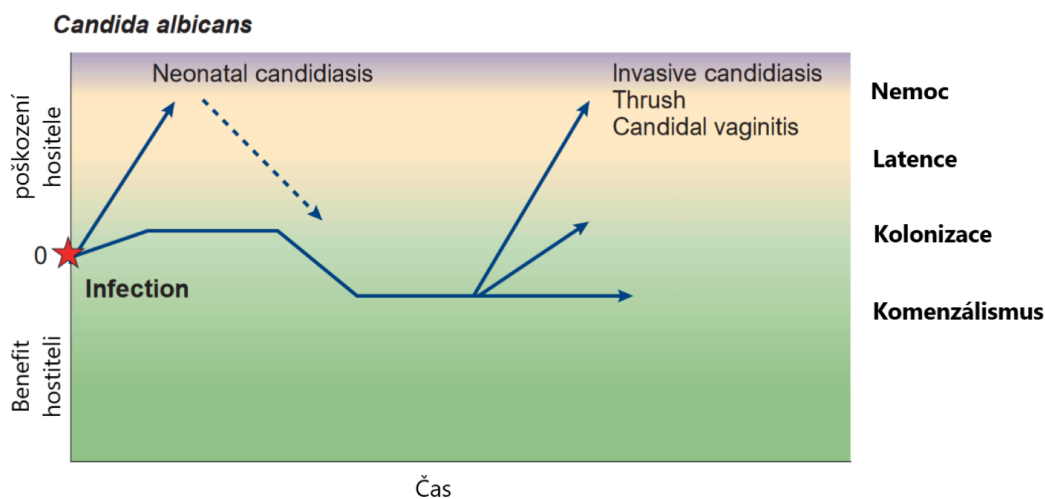
Historicky se jako patogen označoval jakýkoliv organismus, který je schopen tvořit látky (virulentní faktory), které mají schopnost virulence. Tato, do velké míry zastaralá, definice naráží na své limity a to hlavně kvůli novým poznatkům o tom, že jsou již známé velmi příbuzné mikroorganismy, které produkují stejné virulentní faktory a přesto k žádné patogenitě u nich nedochází [17,18]. Zároveň tato definice zcela přehlíží oportunistické patogeny [17,18].



Obrázek 1: Ukázka modelu poškození-odezva [17] - upraveno

Novější model poškození-odezva z roku 1999 (Obrázek č. 1) většinu těchto nedostatků odstraňuje. Přichází s teorií, kdy “patogeneze je výsledek interakce mezi dvěma entitami, hostitelem a mikrobem”, “relevantní výsledek interakce host-mikrob v konkrétním hostiteli je poškození hostitele” a “poškození není statický údaj a může se měnit v závislosti na míry imunitní odpovědi nebo času”. Příklad takového systému můžeme vidět na obrázku č. 1, kdy interakce host-mikrob je reprezentováno parabolou a největší poškození hostiteli leží na obou koncích spektra. Tedy pokud organismus zareaguje příliš slabě, nebo kdy imunita reaguje příliš silně a její samotná aktivita způsobuje škody organismu a může vést například až k cytokinové bouři, což je život ohrožující stav způsobený přehnaným výlevem cytokinů z makrofágů a rozvratem funkce imunitního systému [17,19].

Tento novější model definuje patogena jako mikroorganismus, který má schopnost činit hostiteli určité škody. Virulence je naopak kapacita mikroorganismu činit poškození hostiteli. Virulentní faktory jsou mikrobiální komponenty, které mají schopnost poškozovat hostitele [20]. Nespornou výhodou tohoto systému je uvědomění si, že patogenita i virulence není statický proces, ale proces, který se může v průběhu času vyvíjet v závislosti na podmínkách [20].



Obrázek 2: vývoj interakce v čase dle modelu poškození–odezva [20] - upraveno

Příkladem tohoto modelu může být houba *Candida albicans* a vývoj infekce v čase (Obrázek č. 2) [20]. Tento patogen je za normálních okolností hojně se vyskytujícím komenzálem v ústní dutině a gastrointestinálním traktu [21]. *C.albicans* ovšem dokáže vytvářet choroby, jakými jsou orální kandidóza, vulvovaginální kandidózu a ve vzácnějších případech také systémovou kandidózu, která může vyústit až ve smrt [22]. V klasické literatuře by byl takový patogen označen za komenzála a oportunistického patogena. V tomto modelu by byla *C. albicans* označena za patogena druhé třídy, Patogen druhé třídy je takový patogen, který působí poškození kvůli slabé imunitní odpovědi nebo nastalým podmínkám, které jsou odlišné od normálního stavu (například poškozením tkáně) [4].

Tento koncept je důležitý pro zbytek této práce, jelikož některé virulentní faktory se vyskytují i u nepatogenních druhů. Infekce je totiž výsledkem všech virulentních faktorů (přírodně se vyskytujících atributů patogena), ale především imunitní odpovědi postiženého člověka [4]. Infekce není statický děj, ale naopak se jedná o děj, který je vysoce dynamický v čase [20].

Houbové patogeny můžeme také dále rozdělit na superficiální (kam také patří houby ze skupiny dermatofyta) a oportunní patogeny. Superficiální houby jsou spíše obligatorními a specializovanými patogeny člověka a nebo jiných zvířat (zoonotické infekce) [23–25]. Přírodně se tyto superficiální infekce vyskytují především na kůži nebo na keratinových derivátech kůže [23]. Oportunističtí patogeni se vyskytují převážně u hostitelů s oslabenou imunitní odpovědí (např. po transplantaci, transplantaci kostní dřeně, AIDS, neoplastická choroba, imunosupresivní terapie a další [4,26–29]) a mohou vyústit až v systémovou infekci a smrt hostitele [4]. V poslední době se ukazuje jasný trend ve zvyšování počtu oportunistických houbových infekcí i druhů, které je způsobují [4].

2.1. Obecné faktory virulence patogenních hub

2.1.1. Termotolerance a růst při fyziologickém pH

Aby se mohla houba stát patogenem na homoiotermním hostiteli, je nejdříve nutné, aby mohla růst při fyziologické teplotě hostitelského organismu 37°C. V případě infekce uvnitř organismu se jako dalším obecným faktorem udává schopnost růst při fyziologickém pH kolem 7,4 [30–32].

Někteří autoři poukazují na nepoměr mezi počtem známých houbových patogenů homoiotermních živočichů a poikilotermních živočichů. Zatímco u poikilotermních živočichů (například členovců) vidíme obrovské variace a množství houbových infekcí, u homoiotermních živočichů se s takovým počtem rozhodně neseťkáváme [33,34]. Jedním z důvodů může být právě i restriktivnější podmínky pro přežití patogenu právě kvůli stálé teplotě [35].

2.1.2. Složení buněčné stěny

Buněčná stěna je vysoce komplexní struktura s mnoha vrstvami, které mají jako primární úkol chránit houbu před vnějšími vlivy prostředí. Tyto vrstvy se liší svým složením i komplexností. Nejpočetnější složkou buněčné stěny je 1,3-b-D-glucan, které se vyskytují u většiny druhů hub. Další významnou složkou buněčné stěny je chitin [36,37]. Obě tyto složky jsou natolik asociované s patogeny, že při kontaktu s buňkami vrozené a adaptivní imunity stimulují silnou zánětlivou odezvu díky vazbě na pattern recognition receptory (PRR) imunitních buněk [38,39]. Z těchto důvodů jsou nejčastěji tyto složky skryty pod dalšími vrstvami buněčné stěny, které mají za úkol maskovat, a tím pádem tlumit případnou imunitní reakci organismu. Mezi takové složky patří například RodA hydrofobiny na konidiích rodu *Aspergillus* [40], dále také α -1,3-glukan u *Histoplasma capsulatum* [41], mannoproteiny u *C. albicans* [42], a v neposlední řadě také DHN-melanin opět například u rodu *Aspergillus* (sekundární metabolit, jehož účinky budou rozebrány v pozdějších kapitolách) [43].

Mezi další důležité komponenty buněčné stěny patří také adheziny. Tyto molekuly mají jako primární funkci se přichytit na povrch hostitele. Houby dokáží vytvářet velkou škálu adhezínů a díky tomu mohou přisednout na velké množství povrchů (například extracelulární matrix, membrána hostitelských buněk) [44].

2.1.3. Extracelulární proteiny a enzymy

Jako další faktor virulence rozhodně patří schopnost vytvářet extracelulární enzymy a proteiny, které přímo, či nepřímo ovlivňují prostředí kolem houby.

Proteázy jsou hydrolytické enzymy štěpící jiné proteiny. Dobře prostudované jsou například aspartylóvé proteázy (Sap), které se vyskytují u *C. albicans* [45,46]. Tyto proteázy mají potvrzené

degradační schopnosti mnoha různých lidských proteinů, například keratinu [47], albuminu [48], hemoglobinu, kolagenu, mucinu [49] a sekretorní imunoglobulinu A (sIgA) [46].

Fosfolipázy jsou enzymy, které mají společný základní substrát - fosfolipid. Existují ve více typech a jejich přítomnost je důležitá například při infekci *C. Albicans* a *A. fumigatus* [50,51].

Dalším důležitým enzymem pro virulenci jsou katalázy. Jsou důležité jako mechanismus vyrovnávání se s ROS. Štěpí totiž peroxid vodíku na vodu a plynný kyslík [52].

3. Sekundární metabolity jako faktor virulence

Jako sekundární metabolity se souhrnně označuje velká skupina látek s nízkou molekulární hmotností, které jsou odvozeny od látek primárních drah. Ve většině případů mají tyto látky určitou fyziologickou aktivitu, která ale nepodmiňuje přežití daného organismu [13,14]. Chemickým složením jsou sekundární metabolity neskutečně pestré skupina, a proto není možné přesně určit jednotící chemickou strukturu. Mezi časté struktury ovšem patří fenylový kruh [14,14,53,54].

Množství organismů, které produkují sekundární metabolity je obrovské [55]. K jedním z velkých producentů také patří půdní bakterie a houby [56]. Je více než jasné, že bakterie i houby jsou vystavované v půdě extracelulárním signálům. V půdě dochází k velmi silné kompetici jak o zdroje, tak o životní prostor. Jedním z hlavních důvodů, proč sekundární metabolity vytvářet je ten, že mohou mít vcelku neblahé účinky na sousední organismy [57]. Je obecně přijímáno, že hlavním důvodem tvorby sekundárních metabolitů je chemická signalizace, inhibice růstu kompetitorů a bránění si své niky [14].

Byť jsou sekundární metabolity intenzivně studovány, tak o tom, jestli a jak se sekundární metabolity podílejí na virulenci, víme bohužel spíše málo. V předchozích kapitolách byly vysvětlovány základní faktory virulence hub. Záměrně byla vynechána kapitola o sekundárních metabolitech. Účinky a funkce sekundárních metabolitů při patogenezi budou podrobně probrány v následujících kapitolách.

3.1. Sekundární metabolity vytvářející patogenu prostor

Houby (a další mikroorganismy) jsou již po téměř století známé svojí schopností tvořit látky, které dokáží velice účinně inhibovat růst bakterií a dalších mikroorganismů - mají antimikrobiální účinky [58]. Antimikrobiální látky jsou jedním z nejkoumanějších sekundárních metabolitů hub a jejich objevený počet s časem pouze narůstá. Většina dnes známých antimikrobiálních látek je ovšem produkována spíše saprotrofními druhy a druhy, které nejsou ve vztahu k živočichům patogenní. Existují ovšem i výjimky, které budou v následujících odstavcích podrobněji popsány.

Houby při disperzi svých propagulí (spor) používají velké množství různých vektorů. Mezi nejdůležitější patří šíření skrze vzduch. Některé studie tvrdí, že koncentrace spor na metr krychlový

vzduchu může dosáhnout i hodnoty 10^9 , tyto hodnoty jse ovšem vyskytují za velmi extrémních okolností [40]. Střídmější studie mluví o koncentraci kolem 10^3 - 10^4 spor na metr krychlový [59]. I tak se ovšem jedná o vcelku vysoké číslo, ze kterého vyplývá, že spory hub jsou v prostředí všudypřítomné a kompetice o prostor je proto obrovská.

Spóra po dosednutí na povrch (například pokožku, nebo epitel dýchací soustavy) začne za určitých podmínek klíčit a růst do okolí. Všechny tyto povrchy jsou ovšem kolonizované jinými organismy a je nutné si vytvořit svůj vlastní životní prostor - rozvíjet svoji niku. K tomu slouží již zmiňované antimikrobiální látky [60].

Až v celku nedávné době vyšlo najevo, že dermatofytní houba *Trichophyton erinacei*, běžný patogen evropských ježků (*Erinaceus europaeus*), je schopna produkovat antibiotikum benzylpenicillin (někdy také označován jako penicillin G). Vedle produkce tohoto antibiotika bylo také objeveno, že u napadených ježků se také vyskytuje rezistentní bakterie na penicillin G *Staphylococcus aureus* [61–63].

Obecně přijímaný mechanismus působení penicillinu je takový, že jeho struktura je dosti podobná s molekulou D-Ala–D-Ala, která slouží k prodlužování řetězce mureinu. Murein je jedním ze základních stavebních bloků bakteriální buněčné stěny. Zařazením molekuly penicilinu vzniká nestabilní řetězec, který má v konečném důsledku za následek lýzy bakteriální buňky [64,65]. Tento obecně přijímaný model nemusí ale zcela specificky platit pro Penicillin G. Podle jedné studie u penicillinu G dochází u některých bakterií k zastavení produkce RNA a jejich metabolické aktivity, nikoliv však k lýzy bakteriální buňky samotné [66].

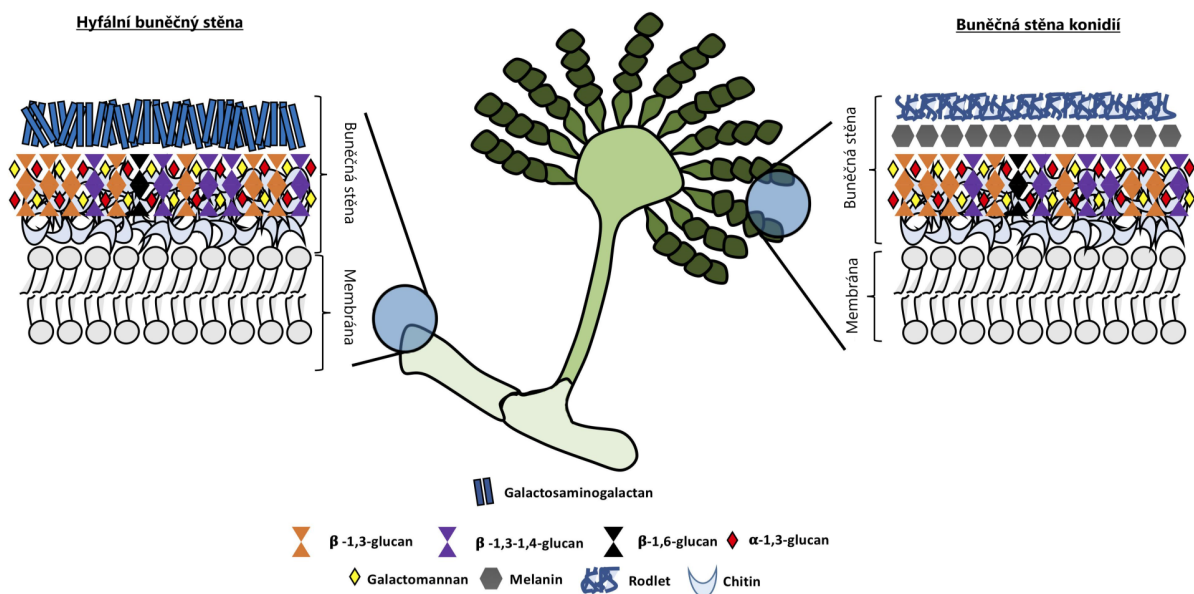
Společně s penicillinem G byl u *T. erinacei* nalezen také další sekundární metabolit 6-(5-hydroxy-n-valeramido)-penicillanic acid (označen jako KPN). KPN, společně s penicillinem G, patří do skupiny sekundárních metabolitů penicillinového charakteru. Vzniká deaminací a dekarboxylací penicillinu N. Je proto představitelné, že i KPN bude mít antibiotické účinky. O těchto účincích neexistují ovšem žádné studie v dostupné literatuře. [63,67]

Ve starší literatuře jsou dokumentovány případy dalších druhů dermatofytních hub, které produkují penicillin. Jsou jimi například druhy *Epidermophyton floccosum* [68] a *T. mentagrophytes* [69].

Další zdokumentovaná antimikrobiální látka, která je produkována patogenní houbou je kyselina helvellová. Tato kyselina se používá i ve zdravotnictví jako antibiotikum [70]. Toto antibiotikum steroidní povahy je mimo jiné produkováno patogenním druhem *Aspergillus fumigatus* [71]. Na rozdíl od dermatofytních hub, které infikují především dermální deriváty (kůže, nehty...) je *A. fumigatus* vnitřní oportunistický patogen způsobující invazivní aspergilózy, jež mohou ve vysokém procentu případů vést až ke smrti. Rozvinutí takto vážné formy je ale nejčastěji podmíněno oslabením imunitního systému jinou závažnou chorobou [72]. Samotná kyselina helvellová má experimentálně potvrzené antimikrobiální účinky vůči grampozitivní bakteriím, byť přesný mechanismus ještě není zcela pochopen [73]. Kromě těchto účinků se ale objevují důkazy i o dalších účincích, které možná

mohou mít významnější efekt právě při samotné patogenezí ve vnitřním prostředí hostitele. Dalšími účinky jsou: inhibice archeálního (a pravděpodobně také eukaryotního) elongačního faktoru 2 (EEF2) - esenciální pro translaci na ribozomech [74], změna permeability membrány a vyvolání vylití elektrolytů [75], inhibice oxidace LDL metabolismu u makrofágů [76]. Je třeba ovšem zmínit, že veškeré tyto další efekty nejsou v publikacích dokumentovány přímo u *A. fumigatus*, ale u dalších hub, které tento sekundární metabolit produkují a v některých případech pouze efekt samotné látky, bez účasti houby samotné. Není ani známo, jestli vůbec *A. fumigatus* vytváří helvellovou kyselinu v takovém množství, aby měla výše popsané fyziologické účinky na hostitelský organismus.

3.2. Sekundární metabolity chráníci houbu před efekty fagocytózy



Obrázek 3: zjednodušená stavba buněčné stěny [36] - upraveno

K úspěšnému šíření houbových spor je nutné zajistit jejich co možná nejlepší ochranu proti vnějším vlivům prostředí. Spory jsou proto chráněny mnoha vrstvami o různých složeních (Obrázek č. 3), které tuto protekci zajišťují. Nejsvrchnější vrstva bývá obalena hydrofobinovými (rodlet) proteiny. Tato vrstva zajišťuje hydrofobicitu spory, adhezi na povrch, a zároveň slouží jako inertní povrch, na který buňky imunitního systému nereagují [36,40,77,78]. Rodlet vrstva ovšem mizí po začátku klíčení spory a obnažuje velmi důležitý sekundární metabolit a jeden z hlavních faktorů virulence - melanin.

3.2.1. Melaniny

Melaniny jsou velmi rozšířená skupina pigmentů napříč všemi říšemi. Jejich indolová a fenolová polymerová struktura způsobuje mimo jiné pohlcování většiny spektra viditelného záření, a tím udává i barvu samotného pigmentu, tedy tmavou [79]. Kromě viditelného světla absorbují melaniny také UV záření a část ionizujícího záření [79]. Zároveň mají melaniny redoxní potenciál a chelatační potenciál, jsou stabilní i při vyšší teplotě, jsou odolné vůči koncentrovaným kyselinám a v neposlední řadě obsahují stabilní volné radikály [79–83]. Všechny tyto vlastnosti z melaninu dělají ideální štít proti vnějším vlivům prostředí.

Kvůli výše zmíněným vlastnostem není překvapení, že velká většina hub syntetizuje melanin na povrchu svých spor pro jejich ochranu proti vnějším vlivům. Výjimkou nejsou ani patogenní druhy. Syntéza byla potvrzena například u těchto druhů: *Rhizopus oryzae* [84], *Malassezia Furfur* [85], *M.pachydermatis* [86] *Microsporium gypseum* [87], *T. rubrum* [87], *Cryptococcus neoformans* [83], *C. gattii* [88], *Pneumocystis carinii* [89], *Penicillium marneffeii* [90], *Paracoccidioides brasiliensis* [91], *H. capsulatum* [92], *Blastomyces dermatitidis* [93], *C. albicans* [94] a *A. fumigatus* [95].

Produkce melaninu se někdy nemusí omezovat pouze na spory. Někdy je melanin syntetizován i do buněčných stěn hyf. Tento fenomén byl mimo jiné potvrzen u některých dermatofytních hub v pokusech *in vitro*. Mezi takovými byly například *T. rubrum*, *M. gypseum*, *E. floccosum* a *T. mentagrophytes*. Dle autorů produkce melaninu korelovala s přítomností enzymu lakázy. Izolovaný enzym z druhu *T. mentagrophytes* vykazoval vysokou sekvenční homologii s ostatními studovanými dermatofyty, ale spíše menší s lakázou izolovanou z oportunního patogenu *C. neoformans* [87]. Je proto možné, že lakáza u *C. neoformans* může vytvářet zcela jiný typ melaninu, než je tomu u dermatofytních hub. Autoři článku upozorňují, že z dostupných dat není možné vyvodit, zda produkce melaninu na hyfách má význam při patogenezi dermatofytních hub. K podobným výsledkům došla i studie na jiné dermatofytní houbě *Sporothrix brasiliensis* ve které se podařilo vyizolovat dva morfotypy stejného druhu. Tmavý morfotyp vykazující jasnou produkci melaninů a světlý morfotyp, u kterého byla potvrzena produkce melaninu, ale ve značně sníženém množství oproti tmavému morfotypu. Oba morfotypy vykazovaly podobné růstové schopnosti, v případě testu virulence na myším modelu se ovšem ukázalo, že světlý morfotyp způsoboval dokonce horší průběh onemocnění, než morfotyp tmavý (s větší produkcí melaninu)[96]. U oportunistických houbových patogenů a systémových infekcí je role melaninu daleko lépe pochopena a také prozkoumána. Z pohledu těchto typů patogenů a infekcí je jasné, že melanin je velmi účinný a všestranný virulentní faktor, který ovlivňuje nemalé množství drah a mechanismů hostitele [97,98]. Tyto efekty budou podrobněji popsány v následujících podkapitolách.

Melaninů existuje velké množství typů a kvůli problémům s jejich studováním (vycházejících z jejich chemických vlastností) je také problém melaniny charakterizovat chemickým vzorcem [99].

U hub se nejčastěji setkáváme se třemi typy melaninu . Eumelanin (častěji označován jako DOPA-melanin), DHN-melanin a pyomelanin.

3.2.1.1. DOPA-melanin

Eumelanin (dále označován již jen jako DOPA-melanin) je typ melaninu, jejímž hlavním prekurzorem je molekula L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA), který je odvozen od aminokyseliny tyrosinu [100]. DOPA-melanin je syntetizován ve specializovaných liposomálních váčcích za pomoci enzymu lakázy. Váčky s DOPA-melaninem jsou deponovány na vnější straně buněčné stěny a ukotveny za pomoci chitinózní sítě [101].

C. neoformans je jednou z mála patogenních hub, u kterého byla zatím prokázána produkce pouze DOPA-melaninu a je tedy ideálním modelovým organismem ke studiu, jaké dopady syntéza DOPA-melaninu na organismus má. Oproti dermatofytním houbám, kde nejsou přesvědčivé důkazy o důležitosti produkce melaninu při patogenezi, je produkce DOPA-melaninu u *C. neoformans* významným faktorem virulence. Mutantní kmeny a kmeny s cíleně vypnutými geny pro syntézu DOPA-melaninu vykazují značně sníženou virulenci oproti *wild type* kmenům s normální produkcí DOPA-melaninu [102,103]. Syntéza DOPA-melaninu není stejná za všech podmínek. Ke zvýšení produkce DOPA-melaninu dochází až za stresových podmínek nedostatku živin (regulace pomocí dostupnosti glukózy) [98,104]. Kromě stresových podmínek je také zapotřebí vhodný substrát v prostředí. Tyto okolnosti nastávají například právě v hostitelském organismu, kdy *C. neoformans* dokáže použít mimo jiné jako substrát katecholaminové neurotransmitery (dopamin, norepinephrin, epinephrin) a přetvořit je na DOPA-melanin [105], jehož účinky jsou mimo jiné imunoregulační, cytotoxické a proti inflamatorní. Není proto divu, že závažné infekce houbou *C. neoformans* končí v asi 20% případů meningoencephalitidou [106].

Studie dokazují, že DOPA-melanin působí jako účinné činidlo, které zabraňuje, či minimálně snižuje úspěšnost fagocytózy DOPA-melaninem pokrytých spor alveolárními makrofágy [107,108]. Zabránění zahájení procesu fagocytózy může být způsobem vlivem samotného melaninu, a nebo pravděpodobněji kooperativním efektem náboje kapsidy a melaninu v buněčné stěně [108,109]. DOPA-melanin má ale důležitou funkci v případě, že spora bude fagocytována. DOPA-melanin funguje totiž jako pohlcovač volných radikálů, které se generují při fagocytóze ve fagozomu makrofágů s cílem zničit fagocytovanou částici (v tomto případě sporu *C. neoformans*) a zastavuje tak tzv. oxidační vzplanutí makrofágů [108]. O tom, jestli se DOPA-melanin podílí na přežití spory ve fagozomu ještě dalším - aktivním způsobem, není zcela jasné [110].

DOPA-melanin má také nepříznivý vliv na případnou lékařskou terapii. Ukázalo se totiž, že díky přítomnosti melaninu je *C. neoformans* rezistentní na některé antifungální činidla, jmenovitě amphotericin B a caspofungin [111].

3.2.1.2. DHN-melanin

Zkratka DHN-melanin vychází z posledního známého intermediátu, který se objevuje při syntéze tohoto typu melaninu [112], 1,8-dihydroxynaftalen [113]. Přesná chemická struktura finálního produktu této melaninové dráhy je ale stále neznámá [114,115].

Mezi známé patogenní producenty patří například: *Sporothrix schenckii* [116,117], *Fonsecaea pedrosoi* [118], *Exophiala dermatitidis* [123][121], *A. fumigatus* [120], *B. dermatitidis* [93], *Talaromyces marneffeii* [121,122],

Z dostupné literatury vyplývá, že DHN-melanin se syntetizuje pouze v konidiích [123–126]. U ostatních dobře prozkoumaných typů melaninů (pyomelanin a L-DOPA melanin) byla produkce těchto pigmentů zaznamenána i v hyfálních stádiích [87,127]. Z tohoto důvodu je výskyt DHN-melaninu důležitý pouze v samotném začátku infekce a pravděpodobně se neuplatňuje dále při růstu samotné houby v hostitelském organismu [97,115].

DHN-melanin je jeden z rozhodujících virulentních faktorů začátku infekce. Kmeny *A. fumigatus* s poškozeným/vypnutým genem pksP produkují bílé konidie bez známek přítomnosti DHN-melaninu [128,129]. Takto defektní konidie mají značně sníženou virulenci a jsou snadněji rozpoznávány alveolárními makrofágy [128,129]. Společně s lepším rozpoznáním se také ukazuje, že mutantní linie bez DHN-melaninového pigmentu je mnohem méně odolná vůči acidifikaci ve fagolyzozomech makrofágů. Fagocytované *wild type* konidie účinně inhibují proces acidifikace vzniklého fagolyzozomu v makrofágu, a tím značně zvyšují šanci přežití fagocytované konidie [123].

DHN-melanin má ale překvapivě naprosto opačný účinek na plicní epiteliální buňky. Na rozdíl od makrofágů, kde pksP mutanti jsou snadněji a účinněji rozpoznávány, tak u epiteliálních buněk byl pozorován efekt opačný [130]. V tomto případě byla větší míra fagocytózy epiteliálními buňkami pozorována právě u *wild type* konidií s DHN-melaninem [130]. Podobně jako u makrofágů dochází i u epiteliálních buněk k inhibici procesu acidifikace fagolyzozomu, díky čemuž může konidie přežít v relativně “neutrálním” prostředí (u makrofágů je toto pH 6 [123], u epiteliálních buněk nebylo toto číslo empiricky změřeno [130]) [130]. Navíc u fagolyzozomů epiteliálních buněk dochází k velkým morfologickým přestavbám a také spojování několika fagolyzozomů s konidiami do jednoho velkého fagolyzozomu [130]. Bylo také potvrzeno, že takto fagocytované konidie jsou schopny přežít v epiteliálních buňkách přes 24 hodin a že také narušují přirozenou apoptózu buněk [130]. Přítomnost DHN-melaninu na konidiích, jejich fagocytace a dlouhodobé přežívání může být jako jeden důležitý faktor úspěšného začátku aspergilóзовé infekce - tedy nalezení dobré niky pro další růst [130,131]. Jako spekulativním důvodem tohoto fenoménu autoři uvádějí rozdílnou receptorovou výbavu makrofágů a epiteliálních buněk [130].

U myeloidních buněčných linií (kam se řadí například také makrofágy [132]) byl nalezen specifický receptor pro DHN-melanin (MelLec receptor), který rozpoznává naftalen-diolovou

jednotku DHN-melaninu [133]. Jedinci se SNP mutací tohoto receptoru mají značně zvýšenou šanci vzniku systémové aspergilózy.

Nově se také ukazuje, že DHN-melanin na konidiích má i funkci imunoregulační. U pksP mutantů odpovídá hostitelský organismus značně silněji a důrazněji [134]. Pozorované hodnoty vylitých cytokinů jsou u *wild type* nižší, ovšem stále dostatečné pro správnou signalizaci a likvidaci konidií. Příčinou této snížené hodnoty vylitých cytokinů je právě přítomnost DHN-melaninu v buněčné stěně konidie, jež musí inhibovat určité prozánětlivé odpovědi [134]. Problém proto může nastat spíše až u imunosuprimovaných jedinců, kdy vylučované hodnoty nemusí být dostatečné pro správnou funkci imunitní odpovědi [134].

3.3. Cytotoxické sekundární metabolity

Cytotoxické látky jsou takové látky, které způsobují poškození buněk. Efekt takových látek může být například zpomalení/zastavení proliferace postižených buněk, apoptóza poškozené buňky a nebo nekróza [135]. U hub se setkáváme s označením mykotoxiny. Jsou to látky, které v nízkých koncentracích mají cytotoxický efekt na buňky obratlovců. Mezi nejznámější mykotoxiny patří například aflatoxiny, ochratoxiny, fumisininy, patuliny a další [136].

Tato kapitola mykotoxiny vynechá a to z důvodu, že mykotoxiny jsou nejčastěji produkovány na zdrojích potravy (například špatně uskladněné obilí) a nejedná se tedy o přímý virulentní faktor konkrétního patogenu, který je produkován v místě infekce. Z tohoto důvodu se tato práce zaměří na cytotoxické látky, které jsou prokazatelně produkovány při infekcích dermatofytních hub (například riboflavin, xanthomegnin) a systémových patogenů (například gliotoxin).

3.3.1. Xanthomegnin

Xanthomegnin je látka naftochinonového charakteru, která díky své komplexní struktuře láme světlo a vytváří žluto-oranžovo-červené zbarvení (dle pH média) u produkujících kolonií hub [137,138]. Xanthomegnin má tedy vlastnosti pigmentu, ale zároveň má i cytotoxický efekt na hostitelské buňky.

Tento sekundární metabolit (dle dostupné literatury) vytváří například tyto houby: *P. viridicatum* [139], *A. melleus* [140], *A. sulphureus* [140], *T. megnini* [138], *T. violaceum* [141] a *M. cookei* [142]. Je nutné zdůraznit, že největší výzkum xanthomegninu byl prováděn v 60. 70. a 80. letech minulého století, a proto seznam hub produkujících xanthomegnin nutně nemusí odpovídat skutečnému.

Xanthomegnin má při orálním pozření (například skrz krmivo nebo potraviny) projevy spojené s abnormalitami na ledvinách a játrech. Patologickými příznaky byla žloutenka, ztráta barvy u ledvin, a nekrotické folikuly u jater. Nekrotické zánětlivé léze byly také pozorované u žlučových cest a žlučníku [143]. Tyto příznaky jsou pravděpodobně spojené s uncoupling aktivitou xanthomegninu

na mitochondrie [142]. Při procesu neregulovaného uncouplingu dochází k neregulovanému přesunu protonů skrz vnitřní a vnější mitochondriální membránu. Takové prostupování má nebezpečí především v tvorbě ROS (reactive oxygen species) a obecně destabilizace funkce mitochondrie a poškození DNA mitochondrie [144]. Autoři uvádějí, že tento efekt je s největší pravděpodobností zapříčinen hydroxy-fenolovou skupinou ve struktuře naftochinonové stavební jednotky molekuly xanthomegninu [142]. Schopnost xanthomegninu být mutanogenním činidlem potvrzuje také jiná studie, která se zaměřila na indukci DNA reparačního systému buněk hepatocytů po vystavení xanthomegninem. Test ukázal, že po vystavení buněk xanthomegninem skutečně došlo ke zvýšení aktivity reparačních systémů buňky, z čehož autoři usuzovali, že xanthomegnin může být mutanogen [145].

Mezi houby produkující xanthomegnin je také významná dermatofytní houba *T. rubrum* [146]. Původní informace z roku 1965 o produkci xanthomegninu touto houbou byly opět potvrzeny ve studii z roku 2000, jež se ovšem zaměřila na více sesbíraných vzorků *T. rubrum* z různých částí lidského těla [146,147]. Z celkem 12ti odebraných vzorků se u každého potvrdila produkce xanthomegninu. deset vzorků bylo odebráno z nehtů, dva z kožních infekcí. K potvrzení přítomnosti xanthomegninu byla použita metoda HPLC a ukázala v průměru spíše větší množství produkovaného xanthomegninu ve vzorcích odebraných z nehtů [147]. Autoři spekulují, že produkce xanthomegninu může u *Trichoptyton rubrum* být jedním z faktorů virulence. Zároveň ale poukazují na další možnost, tedy že houba vytváří xanthomegnin primárně jako ochranu proti jiným organismům v místě infekce, jako například agresivním parazitickým bakteriím z rodu *Pseudomonas*. Toto tvrzení staví na předpokladu, že xanthomegnin bude mít podobné vlastnosti, jako jiné naftochinony, tedy narušení respiračního mechanismu bakterií a produkce ROS [147,148].

3.3.2. Riboflavin

Riboflavin, známější spíše jako vitamin B2, je esenciální látka, která se zapojuje do metabolismu lipidů, buněčné respirace, redoxní bilance a metabolizace xenobiotik a léčiv. Riboflavin je totiž výborný akceptor a donor elektronů, a proto je používán v mnoha oxidačně-redukčních reakcích [149]. Aktivovaný riboflavin je součástí mnoha proteinů a látek, jmenovitě například FAD [149,150]. Deficience v příjmu riboflavinu vedou ke vzniku fyziologických příznaků, naopak nadměrné množství je za normálních okolností odstraňováno z těla skrz moč [149]. Riboflavin je u obratlovců získáván pouze z potravy, geny nutné pro syntézu se totiž u obratlovců nevyskytují. Riboflavin ale dokáží syntetizovat *de novo* protista, rostliny a například také houby [151,152].

Jako pozoruhodným faktorem virulence se riboflavin jeví u parazitické houby *Pseudogymnoascus destructans*, původce WNS (white-nose syndrome), tedy potenciálně smrtelné choroby u naivních hibernujících populací netopýrů, převážně ze Severní Ameriky [12,153,154]. Bylo objeveno, že *P. destructans* vytváří v místě infekce velké množství riboflavinu, který se akumuluje

v okolních buňkách. Za normálních okolností by si postižená tkáň dokázala s nadměrným obsahem riboflavinu poradit buď přeměnou na jiné molekuly (již například zmiňovaný FAD a další), nebo převodem do krve a vypuzením z těla skrz moč. Hibernující netopýr se ale nachází v hypometabolickém stavu, v němž jsou některé fyziologické odpovědi na stres zpomaleny, nebo zcela zastaveny [155]. Zvýšená koncentrace riboflavinu vede k oxidativnímu stresu postižených buněk, ztráty membránového potenciálu u mitochondrií a nekróze poškozené tkáně [156]. Nakažený netopýr musí vydávat větší množství zdrojů na boj s infekcí a opravu poškozené tkáně, což vede ke zrychlenému výdaji naakumulovaných tukových zásob a ke smrti z důvodu vyhladovění před ukončením hibernační periody [156]. V případě, že netopýr postupující infekci přežije do konce hibernační periody a zvládne vylétnout ze zimoviště, tak může dojít k dalšímu, ještě zvýšenému oxidačnímu stresu kvůli vystavení riboflavinu slunečnímu záření [156,157]. Poškozená tkáň reaguje silnou zánětlivou odpovědí a patologií poškozených míst (převážně křídel) [156]. Takto zjižená tkáň je sice ve většině případů slučitelná se životem, ale dle zjištění nedochází k jejímu obnovení, což může vést ke snížené fitness postiženého jedince, nebo dokonce smrti kvůli nedostatečné schopnosti se krmit [158].

Teorie, že riboflavin je produkován v tak velkých množstvích jako redukční činidlo pro siderofory (další faktor virulence, který je podrobně probrán v dalších kapitolách) [159] se nepotvrdila, jelikož maximální produkce sideroforů byla dosažena v šestém týdnu infekce, ale riboflavin byl kumulován lineárně dále (pozorování končí ve 12. týdnu) [156].

Syntéza riboflavinu se ale jeví jako důležitým virulentním faktorem u více patogenních hub [160,161], nicméně již s méně cytotoxickým účinkem na tkáň. Z tohoto důvodu se k tématu riboflavinu v této bakalářské práci krátce vrátím v kapitole o sideroforech, které hrají zásadní roli v získávání železa z hostitelské buňky/tkáně [159].

3.3.3. Gliotoxin - cytotoxické účinky

Gliotoxin (zkráceně GT) je mykotoxin patřící do větší rodiny tzv. epipolythiodioxopiperazinů, která se mimo jiné vyznačuje obsahem disulfidické vazby [162,163]. Tato disulfidická vazba je důvodem vysoké toxicity pro zasažené buňky. Gliotoxin je syntetizován pomocí NRPS. Cluster pro syntézu gliotoxinu obsahuje 13 genů (u *A. fumigatus*) [164]. Jeden z těchto genů - GliT, zajišťuje vlastní rezistenci na tento sekundární metabolit [165].

Hlavní výzkum o tvorbě, regulaci a afektech gliotoxinu pochází ze studií oportunistického systémového patogena *A. fumigatus*. Gliotoxin je ale produkován i dalšími houbami, například *Trichoderma virens* [166], *A. chevalieri* [167], *P. cinerascens* [168] a dalších.

Gliotoxin má kromě cytotoxického účinku také imunomodulační účinky [169], které se nejvíce projevují především v začátku průběhu infekce a budou podrobněji probrány v následující kapitole. V pozdějších fázích systémové infekce patogenem *A. fumigatus*, tedy ve chvíli, kdy je houba

v aktivní růstové fázi a prochází plicemi pomocí hyfálních výběžků [170], se uplatňuje kromě imunomodulačního účinku i silný apoptotický efekt gliotoxinu na buňky hostitele [171–173].

Cytotoxické účinky gliotoxinu mají jiný mechanismus, než ty, které způsobují imunomodulaci. Gliotoxin interaguje s jinými buněčnými dráhami a zdá se, že k navedení buňky na apoptotickou smrt nepotřebuje ani proniknout do buňky. Překvapivá sekvence dějů vedoucí k apoptóze buňky, které jsou způsobeny čistě vazbou gliotoxinu na plazmatické membrány epitelálních buněk, vedoucí ke ztrátě adheze s extracelulární matrix, aktivaci Bak apoptotické dráhy a apoptózy takto zasažené buňky [174]. Buňka, která nemá adhezi s okolní tkání, páchá buněčnou sebevraždu dějem anoikise. Anoikise je zcela přirozeně se objevující regulovaná cesta buněčné smrti (tedy apoptotická cesta), která se hojně využívá u například epitelálních buněk [175]. Gliotoxin indukuje nově objevenou dráhu anoikise pomocí vazby na cysteinové zbytky na α a β řetězci integrinu [176]. Integrin se vyskytuje na buněčné plazmatické membráně a funguje jako “lepidlo” mezi extracelulární matrix a buňkou. Jsou také důležitým signálem pro přežívání buňky [177]. Působením gliotoxinu dochází k uvolnění buňky z extracelulární matrix, vylitím cytochromu c z mitochondrií a apoptózou takto zasažené buňky [173,174,176].

Nespecifická cytotoxická dráha gliotoxinu je způsobena cyklováním mezi oxidovanou a redukovanou formou disulfidické vazby po přijetí gliotoxinu buňkou do cytoplazmy. Toto cyklování má za následek tvorbu ROS, které způsobují poškození struktur a molekul v okolí (proteinů, primárních/sekundárních metabolitů buňky, RNA i DNA) [178,179]. Překvapivě je tento efekt umocněn přítomností redukčních činidel jako je DTT a glutathionu, které za normálních okolností fungují jako ochrana před ROS [178]. Gliotoxin se dostává do buňky v oxidovaném stavu. Po vstupu do buňky dochází k redukcí díky přirozeně se vyskytujícím redukčním činidlům v buňce (zmiňované DTT a glutathion). Za přítomnosti kyslíku se ovšem redukovaná forma GT mění opět na oxidovanou. Při této reakci se spotřebovává kyslík a jako vedlejší produkt vzniká peroxid vodíku a kyslíkové radikály. Oxidovaná forma je ale opět rychle redukována redukčními činidly, čímž se vytváří cyklus tvorby ROS. Osud buňky je tedy závislý na množství redukčních činidel, především glutathionu [180,181]. Z tohoto důvodu je pro *Aspergillus* nesmírně důležitý gen *GliT*, jež kóduje enzym, který udržuje gliotoxin v redukované formě a zabraňuje opětovné reoxidaci a vzniku ROS [165].

Cytotoxické účinky gliotoxinu jsou viditelné už i při nízké dávce kolem 375 až 1500 ng/mL [182]. Objem produkovaného gliotoxinu ale v průměru dosahuje v místě infekce koncentrací kolem 4000 ng/mL [183].

3.4. Imunomodulační sekundární metabolity

Pro jakýkoliv patogen je velmi důležité se pokud možno vyhnout přímé konfrontaci s imunitním systémem hostitele [184]. V této bakalářské práci již byly probrány některé sekundární

metabolity (například melaniny [130]) a jiné molekuly (například hydrofobiny [40]), které do určité míry chrání spory před fagocytózou některými konkrétními typy imunitních buněk.

V následujících kapitolách budou rozebrány látky, které modulují imunitní odpověď a umožňují tak průběh infekce.

3.4.1. Gliotoxin - imunomodulační účinky

Gliotoxin se tak jeví jako velmi všestranný imunomodulační agens, který ovlivňuje jak buňky vrozené, tak adaptivní imunity [139]. Kromě cytotoxických účinků má gliotoxin také velmi důležité imunomodulační účinky. Gliotoxin ovlivňuje plno imunitních buněčných typů, mezi nimi jsou například cytotoxické T lymfocyty [185], paměťové B lymfocyty [179], makrofágy (alveolární i bronchiální) [186], monocyty a neutrofilů [187].

Studie prokazují, že gliotoxin nemá pouze lokální účinky v místě infekce patogenem (viz například předchozí kapitola gliotoxin - cytotoxické účinky), ale že způsobuje také apoptózu v některých dalších orgánech. Kromě apoptózy jaterní tkáně dochází také k apoptóze v primárních a sekundárních lymfatických orgánech, jmenovitě slezina, brzlík a mezenterické lymfatické uzliny [188]. Společně s tím byl u imunosuprimovaných myši pozorován také efekt opožděné maturace B lymfocytů [188] a problémy s indukci aloreaktivních (aktivních) forem T lymfocytů, které poté řídí boj s infekcí [171]. B lymfocyty se neúčastní boje s patogenem přímo, ale jsou důležité pro boj s jinými infekcemi [188]. Nakažený hostitel proto může být více náchylný na jiné choroby. T lymfocyty na druhou stranu hrají naprosto klíčovou roli v boji proti patogenu. Původní studie proto předpokládaly, že gliotoxin neúčinkuje přímo na T lymfocyty (jelikož jejich počet a rychlost maturace bylo po vystavení gliotoxinu nezměněná [188]), ale spíše že T lymfocyty nedostávají potřebné signály od buněk vrozeného imunitního systému [171].

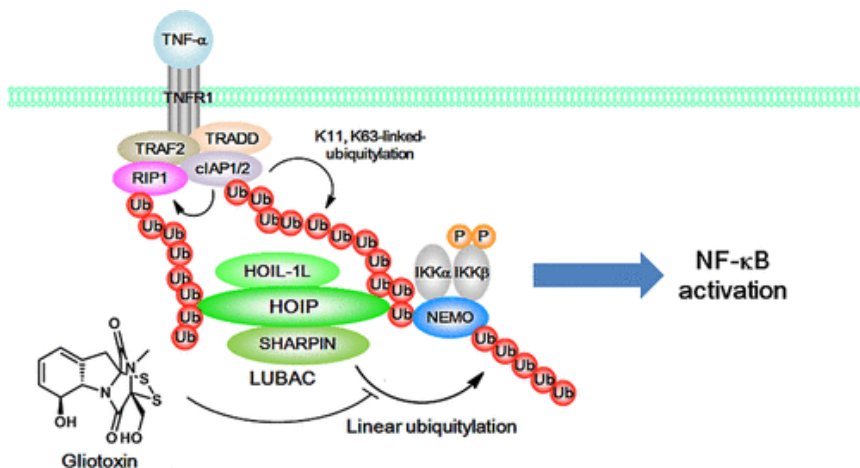
Jak se v pozdějších studiích ukázalo, tak gliotoxin skutečně mění signalizaci postižených buněk vrozeného i adaptivního imunitního systému, a tím mění i celou imunitní odpověď [189].

S gliotoxinem se do kontaktu jako první dostávají alveolární makrofágy. Kromě nespecifických efektů gliotoxinu, které mohou vést k apoptóze makrofágu se ukazuje, že existují i proteiny, se kterými si specificky váže gliotoxin a mění jejich strukturu, a v důsledku ovlivňuje fyziologické dráhy buňky. Mezi takové patří například snížení produkce fosfolipidu [190]. Fosfolipid $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$ se nachází na plazmatické membráně a jeho přítomnost je zapotřebí u makrofágů ke správné fagocytóze větších částic [191]. Snížením produkce tohoto fosfolipidu dochází k tvorbě nestabilních membránových výběžků makrofágů a narušují správné dokončení fagocytózy [190].

V pozdějších fázích infekce je hyfální síť již příliš velká na fagocytózu. V takové fázi infekce přechází hlavní úkol boje s patogenem na neutrofilů, které dokáží s takovými obrovskými strukturami bojovat pomocí NETózy [192]. Jedná o proces, při kterém neutrofil dekondukuje jaderný chromatin, nasedá na něj velké množství proteinů a váček do struktury podobné pavučině. Takto transformovaný

chromatin je posléze vypuštěn ven z buňky. Tyto pavučinové NET struktury mají za úkol chytit a zastavit postup rostoucího patogenu (kupříkladu houbové hyfy). Od tohoto také pochází název neutrofilní extracelulární past (anglicky trap) - NET [193]. K aktivaci NETózy je nutný enzym NADPH oxidáza [194]. Gliotoxin ovšem zabraňuje správné sestavení tohoto enzymu inhibicí fosforylace proteinu p47^{phax}, čímž snižuje tvorbu NET a zároveň snižuje tvorbu ROS, která jsou primárním produktem tohoto enzymu [194–196]. O významu NETózy v boji proti *A. fumigatus* se stále vedou určité spory. Novější studie totiž naznačují, že se efekt NETózy je proti houbovým patogenům nadhodnocený [197]. Ani tato skutečnost ale nemění nic na faktu, že inhibicí NADPH oxidázy má za následek minimálně menší počet ROS v okolí hyfy [195].

Dalším ovlivněným proteinem po vystavení působení gliotoxinu je nukleární faktor kappa B (NF-κB) [198]. Tento transkripční faktor je důležitý pro započítí, regulaci a ukončení zánětlivé odpovědi [199]. Transkripční faktor NF-κB ovlivňuje velké množství genů a jeho aktivace je řízena především externími stimuly, jakými jsou například cytokiny TNF-α (tumor necrosis factor alfa) a IL-1 (interleukin 1), které tvoří buňky vrozené imunity v místě infekce [199]. Gliotoxin má podle více studií schopnost snížit tvorbu některých cytokinů u makrofágů. Má se jednat například o zmiňovaný TNF-α [200], IL-1 [186,200], IL-6 [182], IL-10 [182] a další. Hlavním mechanismem této snížené produkce (v některých případech naopak nadprodukce [182]) těchto cytokinů by měla být právě inhibice NF-κB gliotoxinem [198]. Zároveň také u neutrofilů dochází k navození apoptózy po vystavení gliotoxinu [169]. Tento efekt by opět měl být spojen s inhibicí NF-κB [169]. Gliotoxin může také nepřímo ovlivnit aktivaci B a T lymfocytů, jejichž proliferace je závislá na cytokinech z inhibovaného NF-κB [198].



Obrázek 4: LUBAC komplex v interakci s gliotoxinem [201]

Gliotoxin se také nekompetitivně váže na 20S proteazom [202]. Tento komplex je zodpovědný za degradaci proteinů [203]. Gliotoxin se na proteazom váže nekovalentně a pravděpodobně způsobuje konformační změnu, která zabrání degradaci určitých proteinů [202]. Konformační změna po navázání by totiž neměla být natolik velká, aby zcela zabránila funkci proteazomu [202]. Autoři této studie podle svých zjištění predikovali, že toto je hlavní důvod inhibice

NF- κ B [202], ale novější studie ukázalo, že tento efekt má na svědomí inhibice enzymatické činnosti LUBAC komplexu gliotoxinem [201]. LUBAC komplex (Obrázek č. 4) je jedním z mnoha komplexů, které jsou nezbytné pro správné složení a aktivaci NF- κ B [201]. Inhibicí LUBAC nedojde k ubikvitinaci NEMO proteinu [201,204]. Bez ubikvitinace NEMO nedochází k aktivaci NF- κ B a nastartování odpovídající imunitní odpovědi [201].

Účinky gliotoxinu na buňky imunitního systému jsou značně sofistikované a rozsáhlé na to, že primárním výskyt rodu *Aspergillus* jsou převážně půdy [169,182,186,191,198,200,202,205]. Jedno z vysvětlení může být, že gliotoxin se vyvinul primárně jako ochrana proti amébám žijících v půdě [206]. Améby totiž obývají podobné prostředí jako například rod *Aspergillus*, a proto je pravděpodobné, že si vytvořily mechanismy, kterými se proti útokům améb brání [207,208]. Pokusy s amébou *Dictyostelium discoideum* a *A. Fumigatus* odhalily, že i malé dávky gliotoxinu (0,3 μ g/ml) mají vliv na *D. discoideum* [209]. Prvotním projevem gliotoxinu při nízkých koncentracích je hrudkování postižené améby a při zvýšených koncentracích dochází k lýze celé buňky [209]. Koncentrace gliotoxinu, při které docházelo k hrudkování améby (0,3 μ g/ml) [209] je až pozoruhodně blízká pozorovaným koncentracím gliotoxinu, které ovlivňují funkci makrofágů (od 0,375 μ g/ml) [182]. Další pokusy potvrzují velkou míru podobnosti interakce améb a makrofágů i objevujících se strategií, jak se například vyhnout fagocytóze spor (tento proces se ale nezdá být závislý na gliotoxinu) [208]. Gliotoxin nejspíš tedy primárně vznikl jako obrana proti amébám, ale podobnost améb a buněk imunitního systému umožnila rozšíření niky rodu *Aspergillus*, jakožto oportunistického patogena člověka [208–210].

3.4.2. Pseurotin A

Pseurotin A je látky ergot-alkaloidní povahy, která byla původně vyizolována z *Pseudoeurotium ovalis* [211]. Kromě této nepatogenní houby jej ale produkuje například i patogenní houby *A. fumigatus* [212,213]. Aktivace produkce pseurotinu A u *A. fumigatus* je nejspíš způsobená navozením hypoxického stavu v hostiteli [214], který má za následek odblokování specifických transkripčních faktorů a produkce pseurotinu A [215].

Pseurotin A vykazuje antimikrobiální účinky [216]. Jak moc je tento účinek výhodný při infekci ale bohužel není známo. Důležitějším efektem pseurotinu A je, že zamezuje produkci Imunoglobulin E v B lymfocytech [217]. Tato specifická interakce s B lymfocyty má za následek imunosupresi postiženého jedince [217]. Přesný molekulární základ této interakce bohužel není znám.

Pseurotin A má ovšem také účinky na makrofágy v místě infekce [218]. Interakce makrofágu a pseurotinu A vyústila ve sníženou proliferaci postiženého makrofágu, ovšem narozdíl od gliotoxinu pseurotin A nevykazuje cytotoxické účinky [218]. Kromě zpomalení proliferace makrofágu docházelo také k modulaci produkovaných cytokinů a to sníženou produkcí prozánětlivých IL-6. Zároveň také docházelo ke snížení produkce iNOS (indukovatelná syntáza oxidu dusnatého) [218]. Výsledným

produktem iNOS komplexu je oxid dusnatý (NO), bioaktivní molekula, která se používá pro signalizaci [219,220] a při zvýšeném množství funguje také jako cytotoxický agens [221]. Obě tyto složky se účastní zánětlivé odpovědi a tudíž vlivem pseurotinu A se intenzita zánětlivé odpovědi snižuje [218].

3.5. Esenciální sekundární metabolity pro růst v hostiteli

3.5.1. Siderofory

Železo je esenciální prvek pro jakoukoliv buňku [222]. Schopnost železa přecházet mezi dvojmocnou (redukovanou) formou Fe^{2+} a trojmocnou (oxidovanou) formou Fe^{3+} zapříčiňuje jeho využití jak při katalytických reakcích, tak ve strukturní biologii [222]. V aerobním prostředí se železo vyskytuje nejčastěji v nerozpustné oxidované formě, což snižuje dostupnost pro organismy [223]. U hub se vyvinuly čtyři hlavní cesty získávání železa [224], pro tuto práci je ale nejdůležitější pouze jedna - sideroforová [222,225].

Siderofory jsou chelatační molekuly, které mají za úkol získávat železa za pomoci jejich vysoké afinity vůči tomuto prvku [226]. Nejedná se o jednu specifickou látku, nýbrž o celou řadu látek řazených do více skupin s podobnými schopnostmi - vyvazovat železo [227]. Siderofory dokáží efektivně získat železo, které se vyskytuje buď volně v okolí, nebo je vázané v proteinech. Mezi takové proteiny patří mimo jiné laktoferin [228] a transferin [229] - hlavní proteiny uskladňující a přepravující železo v lidském těle [224]. Houbové patogeny se v hostiteli setkávají s prostředím, které je mimořádně chudé na železo (udávají se hodnoty kolem 10^{-18} M [230]) a při spuštění imunitní odpovědi se dostupnost železa ještě dále snižuje [231]. Při tak nízkých koncentracích jsou ostatní systémy získávání železa neúčinné, a tak se zapíná vysokoafinitní sideroforová dráha [232]. Sideroforová dráha získávání železa se ale nevyskytuje univerzálně u všech hub [224,233]. Mezi druhy, které ale tuto dráhu mají, patří například i tyto patogenní zástupci: *A. fumigatus* [225], *A. nidulans* [234] a *Rhizopus microsporus* [235].

Siderofory jsou pro některé výše zmíněné druhy naprosto zásadní virulentní faktory. Při vymazání genu SidA (kódující enzym pro první krok tvorby sideroforů) u druhu *A. fumigatus* došlo dokonce k naprosté ztrátě virulentní schopnosti [225]. Byla pozorována snížená schopnost růstu, snížená míra konidiogeneze, snížená odolnost vůči oxidativnímu stresu a snížený vnitrobuněčný přenos železa [225,236].

Transport sideroforu obohaceného o “ukradené” železo zpět do hyfy je zprostředkováno skrz transportér SIT [227]. SIT transportér se ale vyskytuje také u hub, které žádné vlastní siderofory nevytváří [237]. Takovéto houby využívají siderofory, které produkují jiné organismy a pomocí SIT je tyto siderofory akorát vychytávají [237]. Efektivně tak “kradou kradené železo”. Pro takové siderofory se používá označení xenosiderofory [224]. Důvodů pro tahovou strategii může být několik.

Asi nejpravděpodobnější možností je, že využití xenosideroforů je určitá forma uspořené energie a zvýšení šance ukořistění železa v půdě [224]. Ukazuje se ale také, že i xenosiderofory jsou důležitým faktorem virulence. Například u patogenní houby *C. albicans* vymazáním genu pro SIT došlo ke snížení virulence [237]. Byla pozorována zhoršená schopnost penetrovat keratinocyty a oproti kontrole (s funkčním SIT transportérem) také obecně menší poškození buněk [237]. Podobné výsledky se objevují také u dalších patogenních hub. Jmenovitě například *C. neoformans* [238,239].

V kapitole o riboflavinu bylo zmíněno, že se jedná o esenciální virulentní faktor u více druhů hub. Riboflavin se jeví jako esenciální sekundární metabolit u *H. capsulatum* [240] a také *A. fumigatus* [152]. U *A. fumigatus* je zároveň prokázáno, že riboflavin hraje nezastupitelnou roli při tvorbě sideroforů (pravděpodobně jako kofaktor pro SidA) [152]. Delecí genů pro syntézu riboflavinu a udržování nízké koncentrace tohoto sekundární metabolitu na minimálním médiu s nedostatkem železa ukázala na masivní snížení tvorby sideroforů (u některých typů dokonce o 96%) [152]. *A. fumigatus* s deletovanými geny pro syntézu riboflavinu se stává zcela avirulentní [152]. Jako jedním z faktorů této změny virulence uvádějí autoři právě zamezení tvorby zmiňovaných sideroforů [152]. Virulence byla opět obnovena po přesunutí houby s deletovaným genem pro tvorbu riboflavinu na médium s dostatkem železa. V takovém případě totiž houba není limitována nedostatkem železa a tvorba sideroforů není nutná, tedy delecce genu se neprojeví (v tak velkém měřítku) [152].

4. Diskuze a závěr

V průběhu této bakalářské práce byly popsány sekundární metabolity, které se v průběhu patogeneze uplatňují jako virulentní faktory. První důležitou rolí sekundárních metabolitů může být vytvoření a udržení si niky pomocí produkce antimikrobiálních látek. Tento efekt je názorně viditelný například u *T. erinacei* a produkce penicillinu G [63]. Otázkou ovšem zůstává, jak moc tyto antimikrobiální látky přispívají při samotné invazi patogena v tkáních hostitele (myšleno efekty na tkáň). Zde probírané antimikrobiální látky mají většinou specifický efekt na určitou komponentu prokaryotní stěny [66,73]. Nebylo by ale ani překvapivé, kdyby měli také skrytý efekt na eukaryotické buňky hostitele. V případě kyseliny helvellové jsou takové účinky známé, nicméně chybí přesvědčivý důkaz, že stejné účinky se objevují ve tkáních *in vivo*.

Další důležitou rolí sekundárního metabolitu může být zajištění ochrany před fyzikálními vlivy (sluneční záření, UV, stabilita při vyšších teplotách, odolnost vůči koncentrovaným kyselinám atd...). Tuto funkci mohou přebírat různé typy melaninů. Vedle tohoto primárního účelu se ale také ukazuje, že melaniny mohou být také velmi efektivní virulentní faktory, které chrání houby (ale především spory) před efekty fagocytózy. Samotné studium melaninů je ale dosti náročný proces kvůli jejich chemickým vlastnostem, které značně znesnadňují přesné určení jejich struktury [241]. Z tohoto důvodu se přichází s typizací melaninů na základě obecných vlastností (např. DHN-like melanin nebo DOPA-like melanin), jelikož přesná struktura zatím zůstává skryta. Zároveň se objevují práce, které naznačují, že virulentními faktory nemusí být samotné melaniny, ale spíše enzymy, které je vytváří - lakázy [104,242,243]. Odpovědi na tyto otázky stále chybějí a to (opět) především z důvodu neznámé výsledné chemické struktury produkovaných melaninů. Novější technologie by snad ale tento problém mohli brzy vyřešit a dát definitivní odpověď, co je pravým virulentním faktorem.

Cytotoxické účinky sekundárních metabolitů hub jsou známé již po dlouhou dobu. Některé patogenní houby vytvářejí tyto látky i v místě infekce. Jsou jimi například xanthomegnin, riboflavin a gliotoxin. Zatímco u xanthomegninu je míra přispění k patogenezi spíše otázkou [244,245], u gliotoxinu je jeho důležitá role a cytotoxický efekt potvrzen mnoha studiemi. Mechanismus působení riboflavinu při infekci *P. destructans* byl popsán celkem nedávno a pomohl vysvětlit jednu z možných příčin závažné choroby, jakou je white-nose syndrome [156]. Stále ale zůstávají otázky ohledně různých obranných mechanismů populací netopýrů z Evropy a z Ameriky. *P. destructans* napadá obě populace, ale zdá se, že jen u té americké způsobuje vysokou úmrtnost [156,246]. Nadprodukce riboflavinu je tak pouze z jedním faktorů způsobující patogenezi, nikoliv ale definitivním. Je také možné, že Evropské populace našli mechanismus, jak si z tohoto symbiotického vztahu vytvořit vztah spíše mutualistický skrze specifické interakce s *P. destructans*. Teoreticky je výhodné se při hibernaci nechat osídlit relativně agresivní, zato pro netopýra dobře kontrolovatelnou houbou, než tento prostor nechat otevřený pro jiné patogenní druhy. Benefitem může být také samotná

nadprodukce esenciálního vitamínu B2 (riboflavinu), který si netopýr sám nedokáže vyrobit. Infekce by mohla zajistit stabilní a dlouhotrvající přísun esenciálního vitamínu a díky tomu pomoci netopýrům přežít dlouhé období hibernace. Dlouhodobě izolovaná Americká populace netopýrů by tento mechanismus interakce nemělo a to by mohl být jedním z důvodů tak vysoké úmrtnosti.

Některé sekundární metabolity nemají nutně pouze jeden typ účinku (např. cytotoxický), ale více účinků najednou. To je případ gliotoxinu, který má jak cytotoxické, tak i imunomodulační účinky. Z pohledu průběhu úspěšné infekce je imunomodulační účinek ten důležitější, jelikož umožňuje dlouhodobé přežití v hostiteli. Díky disulfidickému můstku je gliotoxin nesmírně všestrannou látkou schopnou interakce s mnoha systémy jak epiteliálního, tak imunitního. Proteazom [202], NF- κ B [198], NADPH oxidáza [196], integriny [176] a mnohé další molekuly a systémy jsou tímto sekundárním metabolitem ovlivněny. Gliotoxin vznikl pravděpodobně jako ochrana před mikroorganismy v půdě (konkrétně améby) a pouze čistou náhodou funguje jako výborný virulentní faktor proti imunitnímu systému hostitele.

U systémových mykotických infekcí je problém, že díky (relativně) nízkému výskytu tak závažných stavů nemůže být dostatečně silný selekční tlak na vznik takto sofistikovaných virulentních faktorů (melaniny, gliotoxin) pro tyto účely. Mnohem pravděpodobnější tedy je, že tyto systémové mykózy vznikají čistou náhodou díky virulentním faktorům, které jsou ale určeny na boj proti mikroorganismům, které se vyskytují v přirozeném prostředí těchto hub - nejčastěji v půdě. Toto nahrává teorii o environmentální virulentní školce [247,248]. Tato teorie vysvětluje vývoj virulentních faktorů jako konvergentní evoluci proti amébám a ostatním mikroorganismům v přirozeném prostředí patogenních hub. Stejný selekční tlak vedl k podobným mechanismům, jak se s těmito mikroorganismy vypořádat. Zároveň tak ale otevírají dveře pro možnost patogeneze, která ale není primárním cílem houby, nýbrž vedlejším produktem environmentální patogenní školky [248].

Popsáním sekundárních metabolitů, jejich klasifikací a zkoumáním jejich účinků, struktury a exprese můžeme vytvořit mnohem lepší lékařské terapie, které mohou dramaticky snížit úmrtnost na houbové patogeny. To samé ale můžeme dělat i pro mykotické infekce u jiných zvířat. Například po objevení působení riboflavinu při infekci *P. destructans* již ta samá studie nabízela možnost lepšího a efektivnějšího boje proti této rychle se šířící nákaze. Ta by spočívala v cíleném umlčení a nebo utlumení biosyntetických drah riboflavinu a tím zamezení jeho produkce [156].

Zde probírané sekundární metabolity je jen malý průřez celkovou známostí, ale i skrytou diverzitou. Podle genomových studií a prediktivního hledání clusterů sekundárních metabolitů (pomocí metody SMURF) bylo zjištěno, že genom *A. fumigatus* ukrývá asi 30 clusterů sekundárních metabolitů [249]. Ještě o pár let dříve bylo ale známo pouze 26 clusterů [250]. Tento trend pouze potvrzuje, že téma sekundárních metabolitů rozhodně ještě není vyčerpáno. Některé z nich mohou být důležitými virulentními faktory při infekci, ale k jejich zapnutí jejich produkce dochází pouze ve velmi specifických podmínkách, které například *in vitro* neumíme napodobit a v *in vivo* nejsme schopni zatím vyizolovat.

V některých případech není produkce virulentních sekundárních metabolitů nutně na škodu. Ve zdravotnictví se setkáváme s velkým problémem správného a dostatečně rychlého rozpoznání houbové infekce, což má často za následek přechod do systémové formy infekce, kdy je léčba již značně komplikovaná. Jakožto velmi zajímavou možností přesné a vcelku rychlé detekce infekce mohou být siderofory, přesněji příjem sideroforů houbovým patogenem [251]. Radioaktivním označením *in vitro* vytvořených sideroforů a vstříknutím do pacienta se docílí specifické kumulaci těchto sideroforů v přítomném patogenu, jelikož pouze patogen má specifické transportéry pro tyto siderofory. Tato kumulace se dá velmi dobře vyobrazit pomocí PET skenu. Testy na zvířecích modelech vypadají velmi dobře, a v budoucnu by se tedy mohlo jednat o velmi účinný a zcela bezpečný nástroj vizualizace infekce [251].

Někdy naopak je výhodné virulentní faktor použít v naprosto odlišné situaci. Pseurotin A je imunomodulační sekundární metabolit, který ale oproti gliotoxinu nevykazuje zjevnou cytotoxicitu [218,252]. Proto by v budoucnu mohlo být jedním z využití léčba alergických reakcí a dlouhodobá terapie CD4 a B lymfocytových onemocnění. Slibně také vypadají výsledky nasazení pseurotinu A jako léku proti revmatoidní artritidě a osteoporóze [253,254].

Zkoumání sekundárních metabolitů i z těchto důvodů může přinést ještě mnoho překvapivých zjištění, z nichž některé mohou mít značný dopad ať už na zdravotnictví, či průmysl, kde se sekundární metabolity hub hojně aktivně využívají [255,256].

5. Zdroje:

1. **Köhler JR, Casadevall A and Perfect J** (2015) The Spectrum of Fungi That Infects Humans. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* **5**, a019273.
2. **Woolhouse MEJ, Dye C, Taylor LH, et al.** (2001) Risk factors for human disease emergence. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* **356**, 983–989.
3. **Blackwell M** (2011) The Fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species? *American Journal of Botany* **98**, 426–438.
4. **Pfaller MA and Diekema DJ** (2004) Rare and Emerging Opportunistic Fungal Pathogens: Concern for Resistance beyond *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Clinical Microbiology* **42**, 4419–4431.
5. **Maschmeyer G, Haas A and Cornely OA** (2007) Invasive Aspergillosis. *Drugs* **67**, 1567–1601.
6. **Meyers JD** (1990) Fungal infections in bone marrow transplant patients. *Seminars in Oncology* **17**, 10–13.
7. **Bongomin F, Gago S, Oladele RO, et al.** (2017) Global and Multi-National Prevalence of Fungal Diseases—Estimate Precision. *Journal of Fungi* **3**, 57.
8. Global tuberculosis report 2021.
<https://www.who.int/publications-detail-redirect/9789240037021> Accessed May 2, 2022.
9. **Skerratt LF, Berger L, Speare R, et al.** (2007) Spread of Chytridiomycosis Has Caused the Rapid Global Decline and Extinction of Frogs. *EcoHealth* **4**, 125.
10. **Lips KR, Brem F, Brenes R, et al.** (2006) Emerging infectious disease and the loss of biodiversity in a Neotropical amphibian community. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**, 3165–3170.
11. **Retallick RWR, McCallum H and Speare R** (2004) Endemic Infection of the Amphibian Chytrid Fungus in a Frog Community Post-Decline. *PLOS Biology* **2**, e351.
12. **Bleher DS, Hicks AC, Behr M, et al.** (2009) Bat White-Nose Syndrome: An Emerging Fungal Pathogen? *Science* **323**, 227–227.
13. **Bennett JW and Bentley R** (1989) What's in a Name?—Microbial Secondary Metabolism. In Neidleman, S. L. (ed.), *Advances in Applied Microbiology*, Academic Press, Vol. 34, pp. 1–28.
14. **Brakhage AA** (2013) Regulation of fungal secondary metabolism. *Nature Reviews Microbiology* **11**, 21–32.
15. **Nucci M and Marr KA** (2005) Emerging Fungal Diseases. *Clinical Infectious Diseases* **41**, 521–526.
16. **Richardson M and Lass-Flörl C** (2008) Changing epidemiology of systemic fungal infections. *Clinical Microbiology and Infection* **14**, 5–24.
17. **Casadevall A and Pirofski L** (2009) Virulence factors and their mechanisms of action: the view from a damage–response framework. *Journal of Water and Health* **7**, S2–S18.
18. **Knowles SL, Mead ME, Silva LP, et al.** (2020) Gliotoxin, a known virulence factor in the major human pathogen *Aspergillus fumigatus*, is also biosynthesized by its nonpathogenic relative *Aspergillus fischeri*. *MBio* **11**, e03361-19.
19. **Fajgenbaum DC and June CH** (2020) Cytokine Storm. *New England Journal of Medicine* **383**, 2255–2273.
20. **Casadevall A and Pirofski L** (2003) The damage-response framework of microbial pathogenesis. *Nature Reviews Microbiology* **1**, 17–24.
21. **Moran GP, Coleman DC and Sullivan DJ** (2011) *Candida albicans* versus *Candida dubliniensis*: Why Is *C. albicans* More Pathogenic? *International Journal of Microbiology* **2012**, e205921.
22. **Calderone RA and Clancy CJ** (2012) *Candida and candidiasis*; ASM Press, Washington, DC, 2012.
23. **Martinez-Rossi NM, Peres NTA and Rossi A** (2008) Antifungal Resistance Mechanisms in Dermatophytes. *Mycopathologia* **166**, 369.

24. **Brunke S, Mogavero S, Kasper L, et al.** (2016) Virulence factors in fungal pathogens of man. *Current Opinion in Microbiology* **32**, 89–95.
25. **Kaushik N, Pujalte GGA and Reese ST** (2015) Superficial Fungal Infections. *Primary Care: Clinics in Office Practice* **42**, 501–516.
26. **Walsh TJ, Groll A, Hiemenz J, et al.** (2004) Infections due to emerging and uncommon medically important fungal pathogens. *Clinical Microbiology and Infection* **10**, 48–66.
27. **Hajjeh RA, Sofair AN, Harrison LH, et al.** (2004) Incidence of Bloodstream Infections Due to Candida Species and In Vitro Susceptibilities of Isolates Collected from 1998 to 2000 in a Population-Based Active Surveillance Program. *Journal of Clinical Microbiology* **42**, 1519–1527.
28. **Blumberg HM, Jarvis WR, Soucie JM, et al.** (2001) Risk Factors for Candidal Bloodstream Infections in Surgical Intensive Care Unit Patients: The NEMIS Prospective Multicenter Study. *Clinical Infectious Diseases* **33**, 177–186.
29. **Rees JR, Pinner RW, Hajjeh RA, et al.** (1998) The Epidemiological Features of Invasive Mycotic Infections in the San Francisco Bay Area, 1992–1993: Results of Population-Based Laboratory Active Surveillance. *Clinical Infectious Diseases* **27**, 1138–1147.
30. **Gauwerky K, Borelli C and Korting HC** (2009) Targeting virulence: A new paradigm for antifungals. *Drug Discovery Today* **14**, 214–222.
31. **Kurokawa CS, Sugizaki MF and Peraçoli MTS** (1998) Virulence Factors IN Fungi OF Systemic Mycoses. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* **40**, 125–136.
32. **Kwon-Chung KJ** (1979) Comparison of Isolates of *Sporothrix schenckii* Obtained from Fixed Cutaneous Lesions with Isolates from Other Types of Lesions. *The Journal of Infectious Diseases* **139**, 424–431.
33. **Humber RA** (2008) Evolution of entomopathogenicity in fungi. *Journal of Invertebrate Pathology* **98**, 262–266.
34. **Casadevall A** (2005) Fungal virulence, vertebrate endothermy, and dinosaur extinction: is there a connection? *Fungal Genetics and Biology* **42**, 98–106.
35. **Casadevall A** (2007) Determinants of virulence in the pathogenic fungi. *Fungal Biology Reviews* **21**, 130–132.
36. **Garcia-Rubio R, de Oliveira HC, Rivera J, et al.** (2020) The Fungal Cell Wall: Candida, Cryptococcus, and Aspergillus Species. *Frontiers in Microbiology* **10**, 2993.
37. **Mazur P, Morin N, Baginsky W, et al.** (1995) Differential expression and function of two homologous subunits of yeast 1,3-beta-D-glucan synthase. *Molecular and Cellular Biology* **15**, 5671–5681.
38. **Carmona EM, Kottom TJ, Hebrink DM, et al.** (2012) Glycosphingolipids Mediate Pneumocystis Cell Wall β -Glucan Activation of the IL-23/IL-17 Axis in Human Dendritic Cells. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* **47**, 50–59.
39. **Cuesta A, Esteban MA and Meseguer J** (2003) In vitro effect of chitin particles on the innate cellular immune system of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish & Shellfish Immunology* **15**, 1–11.
40. **Aimanianda V, Bayry J, Bozza S, et al.** (2009) Surface hydrophobin prevents immune recognition of airborne fungal spores. *Nature* **460**, 1117–1121.
41. **Rappleye CA, Eissenberg LG and Goldman WE** (2007) Histoplasma capsulatum α -(1,3)-glucan blocks innate immune recognition by the β -glucan receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 1366–1370.
42. **Wheeler RT, Kombe D, Agarwala SD, et al.** (2008) Dynamic, morphotype-specific Candida albicans beta-glucan exposure during infection and drug treatment. *PLoS pathogens* **4**, e1000227.
43. **Brakhage AA and Liebmann B** (2005) Aspergillus fumigatus conidial pigment and cAMP signal transduction: significance for virulence. *Medical Mycology* **43**, S75–S82.
44. **Tronchin G, Pihet M, Lopes-Bezerra LM, et al.** (2008) Adherence mechanisms in human pathogenic fungi. *Medical Mycology* **46**, 749–772.
45. **Schaller M, Bein M, Korting HC, et al.** (2003) The Secreted Aspartyl Proteinases Sap1 and Sap2 Cause Tissue Damage in an In Vitro Model of Vaginal Candidiasis Based on Reconstituted Human Vaginal Epithelium. *Infection and Immunity* **71**, 3227–3234.

46. **Naglik JR, Newport G, White TC, et al.** (1999) In Vivo Analysis of Secreted Aspartyl Proteinase Expression in Human Oral Candidiasis. *Infection and Immunity* **67**, 2482–2490.
47. **Negi M, Tsuboi R, Matsui T, et al.** (1984) Isolation and Characterization of Proteinase from *Candida albicans*: Substrate Specificity. *Journal of Investigative Dermatology* **83**, 32–36.
48. **Rüchel R, Uhlemann K and Böning B** (1983) Secretion of acid proteinases by different species of the genus *Candida*. *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene. 1. Abt. Originale. A, Medizinische Mikrobiologie, Infektionskrankheiten und Parasitologie* **255**, 537–548.
49. **Colina AR, Aumont F, Deslauriers N, et al.** (1996) Evidence for degradation of gastrointestinal mucin by *Candida albicans* secretory aspartyl proteinase. *Infection and Immunity* **64**, 4514–4519.
50. **Birch M, Robson G, Law D, et al.** (1996) Evidence of multiple extracellular phospholipase activities of *Aspergillus fumigatus*. *Infection and Immunity* **64**, 751–755.
51. **Mirbod F, Banno Y, Ghannoum MA, et al.** (1995) Purification and characterization of lysophospholipase-transacylase (h-LPTA) from a highly virulent strain of *Candida albicans*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* **1257**, 181–188.
52. **Hansberg W, Salas-Lizana R and Domínguez L** (2012) Fungal catalases: Function, phylogenetic origin and structure. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **525**, 170–180.
53. **Keller NP** (2019) Fungal secondary metabolism: regulation, function and drug discovery. *Nature Reviews Microbiology* **17**, 167–180.
54. **Keller NP, Turner G and Bennett JW** (2005) Fungal secondary metabolism — from biochemistry to genomics. *Nature Reviews Microbiology* **3**, 937–947.
55. **An Z** (2004) Handbook of Industrial Mycology. *Handbook of Industrial Mycology*; CRC Press, 2004.
56. **Brakhage AA and Schroeckh V** (2011) Fungal secondary metabolites – Strategies to activate silent gene clusters. *Fungal Genetics and Biology* **48**, 15–22.
57. **Dunny GM and Winans SC** (1999) Cell-cell signaling in bacteria. *Cell-cell signaling in bacteria*; ASM Press, Washington, D.C., 1999.
58. **Fleming A** (1929) On the Antibacterial Action of Cultures of a *Penicillium*, with Special Reference to their Use in the Isolation of *B. influenzae*. *British journal of experimental pathology* **10**, 226–236.
59. **Codina R, Fox RW, Lockey RF, et al.** (2008) Typical levels of airborne fungal spores in houses without obvious moisture problems during a rainy season in Florida, USA. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology* **18**, 156.
60. **Chadwick DJ and Whelan J** (2008) Secondary Metabolites: Their Function and Evolution. *Secondary Metabolites: Their Function and Evolution*; John Wiley & Sons, 2008.
61. **Smith JMB and Marples MJ** (1964) A Natural Reservoir of Penicillin-resistant Strains of *Staphylococcus aureus*. *Nature* **201**, 844–844.
62. **Dube F, Söderlund R, Lampinen Salomonsson M, et al.** (2021) Benzylpenicillin-producing *Trichophyton erinacei* and methicillin resistant *Staphylococcus aureus* carrying the *mecC* gene on European hedgehogs – A pilot-study. *BMC Microbiology* **21**, 212.
63. **Larsen J, Raisen CL, Ba X, et al.** (2022) Emergence of methicillin resistance predates the clinical use of antibiotics. *Nature* **602**, 135–141.
64. **Vollmer W and Bertsche U** (2008) Murein (peptidoglycan) structure, architecture and biosynthesis in *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1778**, 1714–1734.
65. **Tomasz A** (1979) The Mechanism of the Irreversible Antimicrobial Effects of Penicillins: How the Beta-Lactam Antibiotics Kill and Lyse Bacteria. *Annual Review of Microbiology* **33**, 113–137.
66. **McDowell TD and Reed KE** (1989) Mechanism of penicillin killing in the absence of bacterial lysis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **33**, 1680–1685.
67. **Fierro F, García-Estrada C, Castillo NI, et al.** (2006) Transcriptional and bioinformatic analysis of the 56.8kb DNA region amplified in tandem repeats containing the penicillin gene cluster in *Penicillium chrysogenum*. *Fungal Genetics and Biology* **43**, 618–629.
68. **Cole M** (1966) Formation of 6-Aminopenicillanic Acid, Penicillins, and Penicillin Acylase by

- Various Fungi. *Applied Microbiology* **14**, 98–104.
69. **Youssef N, Wyborn CHE, Holt G, et al.** Antibiotic Production by Dermatophyte Fungi. *Microbiology* **105**, 105–111.
 70. **Von Daehne W, Godtfredsen WO and Rasmussen PR** (1979) Structure-Activity Relationships in Fusidic Acid-Type Antibiotics. In Perlman, D. (ed.), *Advances in Applied Microbiology*, Academic Press, Vol. 25, pp. 95–146.
 71. **Waksman SA, Horning ES and Spencer EL** (1943) Two Antagonistic Fungi, *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus clavatus*, and Their Antibiotic Substances¹. *Journal of Bacteriology* **45**, 233–248.
 72. **Segal BH** (2009) Aspergillosis. *New England Journal of Medicine* **360**, 1870–1884.
 73. **Ratnaweera PB, Williams DE, de Silva ED, et al.** (2014) Helvolic acid, an antibacterial nortriterpenoid from a fungal endophyte, *Xylaria* sp. of orchid *Anoectochilus setaceus* endemic to Sri Lanka. *Mycology* **5**, 23–28.
 74. **De Vendittis E, de Paola B, Gogliettino MA, et al.** (2002) Fusidic and Helvolic Acid Inhibition of Elongation Factor 2 from the Archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Biochemistry* **41**, 14879–14884.
 75. **Sakthivel N, Amudha R and Muthukrishnan S** (2002) Production of phytotoxic metabolites by *Sarocladium oryzae*. *Mycological Research* **106**, 609–614.
 76. **Shinohara C, Hasumi K and Endo A** (1993) Inhibition of oxidized low-density lipoprotein metabolism in macrophage J774 by helvolic acid. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* **1167**, 303–306.
 77. **Grünbacher A, Throm T, Seidel C, et al.** (2014) Six Hydrophobins Are Involved in Hydrophobin Rodlet Formation in *Aspergillus nidulans* and Contribute to Hydrophobicity of the Spore Surface. *PLOS ONE* **9**, e94546.
 78. **Zhang S, Xia YX, Kim B, et al.** (2011) Two hydrophobins are involved in fungal spore coat rodlet layer assembly and each play distinct roles in surface interactions, development and pathogenesis in the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*. *Molecular Microbiology* **80**, 811–826.
 79. **Riley PA** (1997) Melanin. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **29**, 1235–1239.
 80. **Nicolaus RA, Piattelli M and Fattorusso E** (1964) The structure of melanins and melanogenesis—IV: On some natural melanins. *Tetrahedron* **20**, 1163–1172.
 81. **Butler MJ and Day AW** (1998) Fungal melanins: a review. *Canadian Journal of Microbiology* **44**, 1115–1136.
 82. **Nosanchuk JD and Casadevall A** (2006) Impact of Melanin on Microbial Virulence and Clinical Resistance to Antimicrobial Compounds. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **50**, 3519–3528.
 83. **DOERING TL, NOSANCHUK JD, ROBERTS WK, et al.** (1999) Melanin as a potential cryptococcal defence against microbicidal proteins. *Medical Mycology* **37**, 175–181.
 84. **Andrianaki AM, Kyrmizi I, Thanopoulou K, et al.** (2018) Iron restriction inside macrophages regulates pulmonary host defense against *Rhizopus* species. *Nature Communications* **9**, 3333.
 85. **Youngchim S, Nosanchuk JD, Pornsuwan S, et al.** (2013) The Role of L-DOPA on Melanization and Mycelial Production in *Malassezia Furfur*. *PLOS ONE* **8**, e63764.
 86. **Brilhante RSN, Rocha MG da, Guedes GM de M, et al.** (2018) *Malassezia pachydermatis* from animals: Planktonic and biofilm antifungal susceptibility and its virulence arsenal. *Veterinary Microbiology* **220**, 47–52.
 87. **Youngchim S, Pornsuwan S, Nosanchuk JD, et al.** (2011) Melanogenesis in dermatophyte species in vitro and during infection. *Microbiology* **157**, 2348–2356.
 88. **Kwon-Chung KJ, Fraser JA, Doering TL, et al.** (2014) *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*, the Etiologic Agents of Cryptococcosis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* **4**, a019760.
 89. **Icenhour CR, Kottom TJ and Limper AH** (2003) Evidence for a Melanin Cell Wall Component in *Pneumocystis carinii*. *Infection and Immunity* **71**, 5360–5363.
 90. **Liu D, Wei L, Guo T, et al.** (2014) Detection of DOPA-Melanin in the Dimorphic Fungal Pathogen *Penicillium marneffeii* and Its Effect on Macrophage Phagocytosis In Vitro. *PLOS*

- ONE* **9**, e92610.
91. **Gómez BL, Nosanchuk JD, Díez S, et al.** (2001) Detection of melanin-like pigments in the dimorphic fungal pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* in vitro and during infection. *Infection and Immunity* **69**, 5760–5767.
 92. **Nosanchuk JD, Gómez BL, Youngchim S, et al.** (2002) *Histoplasma capsulatum* Synthesizes Melanin-Like Pigments In Vitro and during Mammalian Infection. *Infection and Immunity* **70**, 5124–5131.
 93. **Nosanchuk JD, van Duin D, Mandal P, et al.** (2004) *Blastomyces dermatitidis* produces melanin in vitro and during infection. *FEMS Microbiology Letters* **239**, 187–193.
 94. **Morris-Jones R, Gomez BL, Díez S, et al.** (2005) Synthesis of Melanin Pigment by *Candida albicans* In Vitro and during Infection. *Infection and Immunity* **73**, 6147–6150.
 95. **Youngchim S, Morris-Jones R, Hay RJ, et al.** Production of melanin by *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Medical Microbiology* **53**, 175–181.
 96. **Oliveira MME, Almeida-Paes R, Corrêa-Moreira D, et al.** (2019) A case of sporotrichosis caused by different *Sporothrix brasiliensis* strains: mycological, molecular, and virulence analyses. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **114**.
 97. **Heinekamp T, Thywissen A, Macheleidt J, et al.** (2013) *Aspergillus fumigatus* melanins: interference with the host endocytosis pathway and impact on virulence. *Frontiers in Microbiology* **3**, 440.
 98. **Chaskes S, Edberg SC and Singer JM** (1981) A DL-DOPA drop test for the identification of *Cryptococcus neoformans*. *Mycopathologia* **74**, 143–148.
 99. **Enochs W s., Nilges M j. and Swartz H m.** (1993) A Standardized Test for the Identification and Characterization of Melanins Using Electron Paramagnetic Resonance (EPR) Spectroscopy. *Pigment Cell Research* **6**, 91–99.
 100. **Kwon-Chung KJ, Tom WK and Costa JL** (1983) Utilization of indole compounds by *Cryptococcus neoformans* to produce a melanin-like pigment. *Journal of Clinical Microbiology* **18**, 1419–1421.
 101. **Eisenman HC, Frases S, Nicola AM, et al.** (2009) Vesicle-associated melanization in *Cryptococcus neoformans*. *Microbiology* **155**, 3860–3867.
 102. **Salas SD, Bennett JE, Kwon-Chung KJ, et al.** (1996) Effect of the laccase gene CNLAC1, on virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Journal of Experimental Medicine* **184**, 377–386.
 103. **Kwon-Chung KJ, Polacheck I and Popkin TJ** (1982) Melanin-lacking mutants of *Cryptococcus neoformans* and their virulence for mice. *Journal of Bacteriology* **150**, 1414–1421.
 104. **Pukkila-Worley R, Gerrald QD, Kraus PR, et al.** (2005) Transcriptional Network of Multiple Capsule and Melanin Genes Governed by the *Cryptococcus neoformans* Cyclic AMP Cascade. *Eukaryotic Cell* **4**, 190–201.
 105. **Polacheck I, Hearing VJ and Kwon-Chung KJ** (1982) Biochemical studies of phenoloxidase and utilization of catecholamines in *Cryptococcus neoformans*. *Journal of Bacteriology* **150**, 1212–1220.
 106. **Dromer F, Mathoulin-Pélissier S, Launay O, et al.** (2007) Determinants of disease presentation and outcome during cryptococcosis: the CryptoA/D study. *PLoS medicine* **4**, e21.
 107. **Kozel TR** (1983) Dissociation of a hydrophobic surface from phagocytosis of encapsulated and non-encapsulated *cryptococcus neoformans*. *Infection and Immunity* **39**, 1214–1219.
 108. **Wang Y, Aisen P and Casadevall A** (1995) *Cryptococcus neoformans* melanin and virulence: mechanism of action. *Infection and Immunity* **63**, 3131–3136.
 109. **Walter H, Graham LL, Krob EJ, et al.** (1980) Correlation between phagocytic and membrane surface properties reflected by partitioning of human peripheral blood monocytes in two-polymer aqueous phases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **602**, 309–322.
 110. **Liu L, Tewari RP and Williamson PR** (1999) Laccase Protects *Cryptococcus neoformans* from Antifungal Activity of Alveolar Macrophages. *Infection and Immunity* **67**, 6034–6039.
 111. **van Duin D, Casadevall A and Nosanchuk JD** (2002) Melanization of *Cryptococcus neoformans* and *Histoplasma capsulatum* Reduces Their Susceptibilities to Amphotericin B and Caspofungin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **46**, 3394–3400.

112. **Bell AA and Wheeler MH** (1986) Biosynthesis and Functions of Fungal Melanins. *Annual Review of Phytopathology* **24**, 411–451.
113. **Langfelder K, Streibel M, Jahn B, et al.** (2003) Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi. *Fungal Genetics and Biology* **38**, 143–158.
114. **Raman NM and Ramasamy S** (2017) Genetic validation and spectroscopic detailing of DHN-melanin extracted from an environmental fungus. *Biochemistry and Biophysics Reports* **12**, 98–107.
115. **Toledo AV, Franco MEE, Yanil Lopez SM, et al.** (2017) Melanins in fungi: Types, localization and putative biological roles. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **99**, 2–6.
116. **Almeida-Paes R, Frases S, Fialho Monteiro PC, et al.** (2009) Growth conditions influence melanization of Brazilian clinical *Sporothrix schenckii* isolates. *Microbes and Infection* **11**, 554–562.
117. **Romero-Martinez R, Wheeler M, Guerrero-Plata A, et al.** (2000) Biosynthesis and functions of melanin in *Sporothrix schenckii*. *Infection and immunity* **68**, 3696–3703.
118. **Franzen AJ, de Souza W, Farina M, et al.** (1999) Morphometric and densitometric study of the biogenesis of electron-dense granules in *Fonsecaea pedrosoi*. *FEMS Microbiology Letters* **173**, 395–402.
119. **Taylor BE, Wheeler MH and Szaniszló PJ** (1987) Evidence for Pentaketide Melanin Biosynthesis in Dematiaceous Human Pathogenic Fungi. *Mycologia* **79**, 320–322.
120. **Tsai H-F, Fujii I, Watanabe A, et al.** (2001) Pentaketide Melanin Biosynthesis in *Aspergillus fumigatus* Requires Chain-length Shortening of a Heptaketide Precursor. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 29292–29298.
121. **Youngchim S, Hay RJ and Hamilton AJ** (2005) Melanization of *Penicillium marneffeii* in vitro and in vivo. *Microbiology* **151**, 291–299.
122. **Sapmak A, Boyce KJ, Andrianopoulos A, et al.** (2015) The pbrB Gene Encodes a Laccase Required for DHN-Melanin Synthesis in *Conidia* of *Talaromyces* (*Penicillium*) *marneffeii*. *PLOS ONE* **10**, e0122728.
123. **Thywißen A, Heinekamp T, Dahse H-M, et al.** (2011) Conidial Dihydroxynaphthalene Melanin of the Human Pathogenic Fungus *Aspergillus fumigatus* Interferes with the Host Endocytosis Pathway. *Frontiers in Microbiology* **2**, 96.
124. **Chamilos G and Carvalho A** (2020) *Aspergillus fumigatus* DHN-Melanin. In Latgé, J.-P. (ed.), *The Fungal Cell Wall: An Armour and a Weapon for Human Fungal Pathogens*, Current Topics in Microbiology and Immunology, Springer International Publishing, Cham, pp. 17–28.
125. **Langfelder K, Philippe B, Jahn B, et al.** (2001) Differential Expression of the *Aspergillus fumigatus* pksP Gene Detected In Vitro and In Vivo with Green Fluorescent Protein. *Infection and Immunity* **69**, 6411–6418.
126. **Tsai H-F, Chang YC, Washburn RG, et al.** (1998) The Developmentally Regulated alb1 Gene of *Aspergillus fumigatus*: Its Role in Modulation of Conidial Morphology and Virulence. *Journal of Bacteriology* **180**, 3031–3038.
127. **Schmaler-Ripcke J, Sugareva V, Gebhardt P, et al.** (2009) Production of Pyomelanin, a Second Type of Melanin, via the Tyrosine Degradation Pathway in *Aspergillus fumigatus*. *Applied and Environmental Microbiology* **75**, 493–503.
128. **Jahn B, Koch A, Schmidt A, et al.** (1997) Isolation and characterization of a pigmentless-conidium mutant of *Aspergillus fumigatus* with altered conidial surface and reduced virulence. *Infection and Immunity* **65**, 5110–5117.
129. **Jahn B, Langfelder K, Schneider U, et al.** (2002) PKSP-dependent reduction of phagolysosome fusion and intracellular kill of *Aspergillus fumigatus* conidia by human monocyte-derived macrophages. *Cellular Microbiology* **4**, 793–803.
130. **Amin S, Thywissen A, Heinekamp T, et al.** (2014) Melanin dependent survival of *Aspergillus fumigatus* conidia in lung epithelial cells. *International Journal of Medical Microbiology* **304**, 626–636.
131. **Paris S, Boisvieux-Ulrich E, Crestani B, et al.** (1997) Internalization of *Aspergillus fumigatus* conidia by epithelial and endothelial cells. *Infection and Immunity* **65**, 1510–1514.
132. **Kawamoto H and Minato N** (2004) Myeloid cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **36**, 1374–1379.

133. **Stappers MHT, Clark AE, Amanianda V, et al.** (2018) Recognition of DHN-melanin by a C-type lectin receptor is required for immunity to *Aspergillus*. *Nature* **555**, 382–386.
134. **Chai LYA, Netea MG, Sugui J, et al.** (2010) *Aspergillus fumigatus* Conidial Melanin Modulates Host Cytokine Response. *Immunobiology* **215**, 915–920.
135. **Reginald Davey EH** (2021) What is Cytotoxicity? What is Cytotoxicity? <https://www.news-medical.net/health/What-is-Cytotoxicity.aspx> Accessed March 28, 2022.
136. **Bennett JW and Klich M** (2003) Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews* **16**, 497–516.
137. **Fujii T, Nozawa Y and Ito Y** (1966) The Pigments of Dermatophytes I. 真菌と真菌症 **7**, 107–111.
138. **Day WC, Just G and Blank F** (1963) Metabolites of Pathogenic Fungi. II: The Isolation of Xanthomegnin from *Trichophyton Megnini Blanchard 1896***From the Departments of Bacteriology and Immunology and Chemistry, McGill University, Montreal, Canada. *Journal of Investigative Dermatology* **40**, 133–137.
139. **Stack ME, Eppley RM, Dreifuss PA, et al.** (1977) Isolation and identification of xanthomegnin, viomellein, rubrosulphin, and viopurpurin as metabolites of *penicillium viridicatum*. *Applied and Environmental Microbiology* **33**, 351–355.
140. **C. Durley R, MacMillan J, J. Simpson T, et al.** (1975) Fungal products. Part XIII. Xanthomegnin, viomellin, rubrosulphin, and viopurpurin, pigments from *Aspergillus sulphureus* and *Aspergillus melleus*. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1* **0**, 163–169.
141. **Ng AS, Just G and Blank F** (1969) Metabolites of pathogenic fungi. VII. On the structure and stereochemistry of xanthomegnin, vioxanthin, and viopurpurin, pigments from *Trichophyton violaceum*. *Canadian Journal of Chemistry* **47**, 1223–1227.
142. **Ito Y, Kawai K and Nozawa Y** (1973) Biochemical Studies of Pigments from the Pathogenic Fungus, *Microsporum cookei*. *The Journal of Biochemistry* **74**, 805–810.
143. **Carlton WW, Stack ME and Eppley RM** (1976) Hepatic alterations produced in mice by xanthomegnin and viomellein, metabolites of *Penicillium viridicatum*. *Toxicology and Applied Pharmacology* **38**, 455–459.
144. **Demine S, Renard P and Arnould T** (2019) Mitochondrial Uncoupling: A Key Controller of Biological Processes in Physiology and Diseases. *Cells* **8**, 795.
145. **Mori H, Kawai K, Ohbayashi F, et al.** (1983) Genotoxicity of quinone pigments from pathogenic fungi. *Mutation Research Letters* **122**, 29–34.
146. **Wirth JC, Beesley TE and Anand SR** (1965) The isolation of xanthomegnin from several strains of the dermatophyte, *Trichophyton rubrum*. *Phytochemistry* **4**, 505–509.
147. **Gupta AK, Ahmad I, Borst I, et al.** (2000) Detection of Xanthomegnin in Epidermal Materials Infected with *Trichophyton rubrum*. *Journal of Investigative Dermatology* **115**, 901–905.
148. **Haraguchi H, Yokoyama K, Oike S, et al.** (1997) Respiratory stimulation and generation of superoxide radicals in *Pseudomonas aeruginosa* by fungal naphthoquinones. *Archives of Microbiology* **167**, 6–10.
149. **Pinto JT and Zempleni J** (2016) Riboflavin. *Advances in Nutrition* **7**, 973–975.
150. **Zempleni J, Suttie JW, III JFG, et al.** (2013) Handbook of Vitamins. *Handbook of Vitamins*; CRC Press, 2013.
151. **Kato T and Park EY** (2012) Riboflavin production by *Ashbya gossypii*. *Biotechnology Letters* **34**, 611–618.
152. **Dietl A-M, Meir Z, Shadkchan Y, et al.** (2018) Riboflavin and pantothenic acid biosynthesis are crucial for iron homeostasis and virulence in the pathogenic mold *Aspergillus fumigatus*. *Virulence* **9**, 1036–1049.
153. **Lorch JM, Meteyer CU, Behr MJ, et al.** (2011) Experimental infection of bats with *Geomyces destructans* causes white-nose syndrome. *Nature* **480**, 376–378.
154. **Campbell LJ, Walsh DP, Blehert DS, et al.** (2019) LONG-TERM SURVIVAL OF PSEUDOGYMNOASCUS DESTRUCTANS AT ELEVATED TEMPERATURES. *Journal of Wildlife Diseases* **56**, 278–287.
155. **Xu Y, Shao C, Fedorov VB, et al.** (2013) Molecular signatures of mammalian hibernation: comparisons with alternative phenotypes. *BMC Genomics* **14**, 567.
156. **Fliieger M, Bandouchova H, Cerny J, et al.** (2016) Vitamin B2 as a virulence factor in *Pseudogymnoascus destructans* skin infection. *Scientific Reports* **6**, 33200.

157. **T. Wondrak G, K. Jacobson M and L. Jacobson E** (2006) Endogenous UVA-photosensitizers: mediators of skin photodamage and novel targets for skin photoprotection. *Photochemical & Photobiological Sciences* **5**, 215–237.
158. **Reichard JD and Kunz TH** (2009) White-nose syndrome inflicts lasting injuries to the wings of little brown myotis (*Myotis lucifugus*). *Acta Chiropterologica* **11**, 457–464.
159. **Crossley RA, Gaskin DJH, Holmes K, et al.** (2007) Riboflavin Biosynthesis Is Associated with Assimilatory Ferric Reduction and Iron Acquisition by *Campylobacter jejuni*. *Applied and Environmental Microbiology* **73**, 7819–7825.
160. **Ciesielska A, Kawa A, Kanarek K, et al.** (2021) Metabolomic analysis of *Trichophyton rubrum* and *Microsporum canis* during keratin degradation. *Scientific Reports* **11**, 3959.
161. **Demuyser L, Palmans I, Vandecruys P, et al.** (2020) Molecular Elucidation of Riboflavin Production and Regulation in *Candida albicans*, toward a Novel Antifungal Drug Target. *mSphere* **5**, e00714-20.
162. **Steyn P** (2012) The Biosynthesis of Mycotoxins: A study in secondary Metabolism. *The Biosynthesis of Mycotoxins: A study in secondary Metabolism*; Elsevier, 2012.
163. **Suhadolnik RJ and Chenoweth RG** (1958) Biosynthesis of Gliotoxin. I. ¹ Incorporation of Phenylalanine-1- and -2-C ¹⁴. *Journal of the American Chemical Society* **80**, 4391–4392.
164. **Gardiner DM and Howlett BJ** (2005) Bioinformatic and expression analysis of the putative gliotoxin biosynthetic gene cluster of *Aspergillus fumigatus*. *FEMS Microbiology Letters* **248**, 241–248.
165. **Schrettl M, Carberry S, Kavanagh K, et al.** (2010) Self-Protection against Gliotoxin—A Component of the Gliotoxin Biosynthetic Cluster, GliT, Completely Protects *Aspergillus fumigatus* Against Exogenous Gliotoxin. *PLOS Pathogens* **6**, e1000952.
166. **Vargas WA, Mukherjee PK, Laughlin D, et al.** (2014) Role of gliotoxin in the symbiotic and pathogenic interactions of *Trichoderma virens*. *Microbiology* **160**, 2319–2330.
167. **Wilkinson S and Spilsbury JF** (1965) Gliotoxin from *Aspergillus chevalieri* (Mangin) Thom et Church. *Nature* **206**, 619–619.
168. **Bracken A and Raistrick H** (1947) Studies in the biochemistry of micro-organisms. *Biochemical Journal* **41**, 569–575.
169. **Ward C, Chilvers ER, Lawson MF, et al.** (1999) NF-κB Activation Is a Critical Regulator of Human Granulocyte Apoptosis in Vitro*. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 4309–4318.
170. **Denning DW** (1998) Invasive Aspergillosis. *Clinical Infectious Diseases* **26**, 781–803.
171. **Müllbacher A and Eichner RD** (1984) Immunosuppression in vitro by a metabolite of a human pathogenic fungus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **81**, 3835–3837.
172. **Waring P, Eichner RD, Müllbacher A, et al.** (1988) Gliotoxin induces apoptosis in macrophages unrelated to its antiphagocytic properties. *The Journal of Biological Chemistry* **263**, 18493–18499.
173. **Pardo J, Urban C, Galvez EM, et al.** (2006) The mitochondrial protein Bak is pivotal for gliotoxin-induced apoptosis and a critical host factor of *Aspergillus fumigatus* virulence in mice. *Journal of Cell Biology* **174**, 509–519.
174. **Geissler A, Haun F, Frank DO, et al.** (2013) Apoptosis induced by the fungal pathogen gliotoxin requires a triple phosphorylation of Bim by JNK. *Cell Death & Differentiation* **20**, 1317–1329.
175. **Gilmore AP** (2005) Anoikis. *Cell Death & Differentiation* **12**, 1473–1477.
176. **Haun F, Neumann S, Peintner L, et al.** (2018) Identification of a novel anoikis signalling pathway using the fungal virulence factor gliotoxin. *Nature Communications* **9**, 3524.
177. **Giancotti FG and Ruoslahti E** (1999) Integrin Signaling. *Science* **285**, 1028–1033.
178. **Waring P, Sjaarda A and Lin QH** (1995) Gliotoxin inactivates alcohol dehydrogenase by either covalent modification or free radical damage mediated by redox cycling. *Biochemical Pharmacology* **49**, 1195–1201.
179. **Braithwaite AW, Eichner RD, Waring P, et al.** (1987) The immunomodulating agent gliotoxin causes genomic DNA fragmentation. *Molecular Immunology* **24**, 47–55.
180. **Bernardo PH, Brasch N, Chai CLL, et al.** (2003) A Novel Redox Mechanism for the Glutathione-dependent Reversible Uptake of a Fungal Toxin in Cells *. *Journal of Biological*

- Chemistry* **278**, 46549–46555.
181. **Gardiner DM, Waring P and Howlett B** (2005) The epipolythiodioxopiperazine (ETP) class of fungal toxins: distribution, mode of action, functions and biosynthesis. *Microbiology* **151**, 1021–1032.
 182. **Johannessen LN, Nilsen AM and Løvik M** (2005) The mycotoxins citrinin and gliotoxin differentially affect production of the pro-inflammatory cytokines tumour necrosis factor- α and interleukin-6, and the anti-inflammatory cytokine interleukin-10. *Clinical & Experimental Allergy* **35**, 782–789.
 183. **Lewis RE, Wiederhold NP, Chi J, et al.** (2005) Detection of Gliotoxin in Experimental and Human Aspergillosis. *Infection and Immunity* **73**, 635–637.
 184. **Thakur A, Mikkelsen H and Jungersen G** (2019) Intracellular Pathogens: Host Immunity and Microbial Persistence Strategies. *Journal of Immunology Research* **2019**, 1356540.
 185. **Eichner RD and Müllbacher A** (1984) Hypothesis: Fungal Toxins Are Involved in Aspergillosis and Aids. *Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science* **62**, 479–484.
 186. **Eichner RD, Al Salami M, Wood PR, et al.** (1986) The effect of gliotoxin upon macrophage function. *International Journal of Immunopharmacology* **8**, 789–797.
 187. **Arias M, Santiago L, Vidal-García M, et al.** (2018) Preparations for invasion: modulation of host lung immunity during pulmonary aspergillosis by gliotoxin and other fungal secondary metabolites. **9**, 2549.
 188. **Sutton P, Newcombe NR, Waring P, et al.** (1994) In vivo immunosuppressive activity of gliotoxin, a metabolite produced by human pathogenic fungi. *Infection and Immunity* **62**, 1192–1198.
 189. **Spikes S, Xu R, Nguyen CK, et al.** (2008) Gliotoxin Production in *Aspergillus fumigatus* Contributes to Host-Specific Differences in Virulence. *The Journal of Infectious Diseases* **197**, 479–486.
 190. **Schlam D, Canton J, Carreño M, et al.** (2016) Gliotoxin Suppresses Macrophage Immune Function by Subverting Phosphatidylinositol 3,4,5-Trisphosphate Homeostasis. *mBio* **7**, e02242.
 191. **Cox D, Tseng C-C, Bjekic G, et al.** (1999) A Requirement for Phosphatidylinositol 3-Kinase in Pseudopod Extension *. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 1240–1247.
 192. **Branzk N, Lubojemska A, Hardison SE, et al.** (2014) Neutrophils sense microbial size and selectively release neutrophil extracellular traps in response to large pathogens. *Nature immunology* **15**, 1017–1025.
 193. **Papayannopoulos V** (2018) Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. *Nature Reviews Immunology* **18**, 134–147.
 194. **Röhm M, Grimm MJ, D’Auria AC, et al.** (2014) NADPH oxidase promotes neutrophil extracellular trap formation in pulmonary aspergillosis. *Infection and Immunity* **82**, 1766–1777.
 195. **Yoshida LS, Abe S and Tsunawaki S** (2000) Fungal gliotoxin targets the onset of superoxide-generating NADPH oxidase of human neutrophils. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **268**, 716–723.
 196. **Tsunawaki S, Yoshida LS, Nishida S, et al.** (2004) Fungal metabolite gliotoxin inhibits assembly of the human respiratory burst NADPH oxidase. *Infection and Immunity* **72**, 3373–3382.
 197. **Gazendam RP, Hamme JL van, Tool ATJ, et al.** (2016) Human Neutrophils Use Different Mechanisms To Kill *Aspergillus fumigatus* Conidia and Hyphae: Evidence from Phagocyte Defects. *The Journal of Immunology* **196**, 1272–1283.
 198. **Pahl HL, Krauss B, Schulze-Osthoff K, et al.** (1996) The immunosuppressive fungal metabolite gliotoxin specifically inhibits transcription factor NF-kappaB. *The Journal of Experimental Medicine* **183**, 1829–1840.
 199. **Li Q and Verma IM** (2002) NF- κ B regulation in the immune system. *Nature Reviews Immunology* **2**, 725–734.
 200. **Herfarth H, Brand K, Rath HC, et al.** (2000) Nuclear factor- κ B activity and intestinal inflammation in dextran sulphate sodium (DSS)-induced colitis in mice is suppressed by gliotoxin. *Clinical and Experimental Immunology* **120**, 59–65.
 201. **Sakamoto H, Egashira S, Saito N, et al.** (2015) Gliotoxin Suppresses NF- κ B Activation by

- Selectively Inhibiting Linear Ubiquitin Chain Assembly Complex (LUBAC). *ACS Chemical Biology* **10**, 675–681.
202. **Kroll M, Arenzana-Seisdedos F, Bachelier F, et al.** (1999) The secondary fungal metabolite gliotoxin targets proteolytic activities of the proteasome. *Chemistry & Biology* **6**, 689–698.
 203. **Tanaka K** (2009) The proteasome: Overview of structure and functions. *Proceedings of the Japan Academy, Series B* **85**, 12–36.
 204. **Rahighi S, Ikeda F, Kawasaki M, et al.** (2009) Specific Recognition of Linear Ubiquitin Chains by NEMO Is Important for NF- κ B Activation. *Cell* **136**, 1098–1109.
 205. **Klich MA** (2002) Biogeography of Aspergillus species in soil and litter. *Mycologia* **94**, 21–27.
 206. **Seaton A and Robertson MD** (1989) Aspergillus, asthma, and amoebae. *The Lancet* **333**, 893–894.
 207. **Steenbergen JN, Shuman HA and Casadevall A** (2001) Cryptococcus neoformans interactions with amoebae suggest an explanation for its virulence and intracellular pathogenic strategy in macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **98**, 15245–15250.
 208. **Van Waeyenberghe L, Baré J, Pasmans F, et al.** (2013) Interaction of Aspergillus fumigatus conidia with Acanthamoeba castellanii parallels macrophage–fungus interactions. *Environmental Microbiology Reports* **5**, 819–824.
 209. **Hillmann F, Novohradská S, Mattern DJ, et al.** (2015) Virulence determinants of the human pathogenic fungus Aspergillus fumigatus protect against soil amoeba predation. *Environmental Microbiology* **17**, 2858–2869.
 210. **Casadevall A and Pirofski L** (2007) Accidental Virulence, Cryptic Pathogenesis, Martians, Lost Hosts, and the Pathogenicity of Environmental Microbes. *Eukaryotic Cell* **6**, 2169–2174.
 211. **Bloch P, Tamm C, Bollinger P, et al.** (1976) Pseurotin, a New Metabolite of Pseudeurotium ovalis STOLK Having an Unusual Hetero-Spirocyclic System. (Preliminary Communication). *Helvetica Chimica Acta* **59**, 133–137.
 212. **Martínez-Luis S, Cherigo L, Arnold E, et al.** (2012) Antiparasitic and Anticancer Constituents of the Endophytic Fungus Aspergillus sp. strain F1544. *Natural Product Communications* **7**, 1934578X1200700207.
 213. **Maiya S, Grundmann A, Li X, et al.** (2007) Identification of a Hybrid PKS/NRPS Required for Pseurotin A Biosynthesis in the Human Pathogen Aspergillus fumigatus. *ChemBioChem* **8**, 1736–1743.
 214. **Warn PA, Sharp A, Guinea J, et al.** (2004) Effect of hypoxic conditions on in vitro susceptibility testing of amphotericin B, itraconazole and micafungin against Aspergillus and Candida. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **53**, 743–749.
 215. **Vödisch M, Scherlach K, Winkler R, et al.** (2011) Analysis of the Aspergillus fumigatus Proteome Reveals Metabolic Changes and the Activation of the Pseurotin A Biosynthesis Gene Cluster in Response to Hypoxia. *Journal of Proteome Research* **10**, 2508–2524.
 216. **Mehedi MAU, Molla AH, Khondkar P, et al.** (2010) Pseurotin A: an antibacterial secondary metabolite from Aspergillus fumigatus. *Asian J Chem* **22**, 2611–2614.
 217. **Ishikawa M, Ninomiya T, Akabane H, et al.** (2009) Pseurotin A and its analogues as inhibitors of immunoglobulin E production. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **19**, 1457–1460.
 218. **Vasicek O, Rubanova D, Chytkova B, et al.** (2020) Natural pseurotins inhibit proliferation and inflammatory responses through the inactivation of STAT signaling pathways in macrophages. *Food and Chemical Toxicology* **141**, 111348.
 219. **Pozzoli G, Mancuso C, Mirtella A, et al.** (1994) Carbon monoxide as a novel neuroendocrine modulator: inhibition of stimulated corticotropin-releasing hormone release from acute rat hypothalamic explants. *Endocrinology* **135**, 2314–2317.
 220. **Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, et al.** (1987) Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **84**, 9265–9269.
 221. **Gross SS and Wolin MS** (1995) Nitric Oxide: Pathophysiological Mechanisms. *Annual Review of Physiology* **57**, 737–769.
 222. **Nevitt T and Thiele DJ** (2011) Host Iron Withholding Demands Siderophore Utilization for Candida glabrata to Survive Macrophage Killing. *PLOS Pathogens* **7**, e1001322.
 223. **Boukhalfa H and Crumbliss AL** (2002) Chemical aspects of siderophore mediated iron

- transport. *Biometals* **15**, 325–339.
224. **Haas H, Eisendle M and Turgeon BG** (2008) Siderophores in fungal physiology and virulence. *Annual Review of Phytopathology* **46**, 149–187.
 225. **Schrettl M, Bignell E, Kragl C, et al.** (2004) Siderophore Biosynthesis But Not Reductive Iron Assimilation Is Essential for *Aspergillus fumigatus* Virulence. *Journal of Experimental Medicine* **200**, 1213–1219.
 226. **Neilands JB** (1993) Siderophores. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **302**, 1–3.
 227. **Winkelmann G** (2001) Siderophore Transport in Fungi. *Microbial Transport Systems*, John Wiley & Sons, Ltd, pp. 463–480.
 228. **Jacobs A, White GP and Tait GP** (1977) Iron chelation in cell cultures by two conjugates of 2, 3 - dihydroxybenzoic acid (2, 3 - DHB). *Biochemical and Biophysical Research Communications* **74**, 1626–1630.
 229. **Rogers HJ** (1973) Iron-Binding Catechols and Virulence in *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* **7**, 445–456.
 230. **Bullen JJ, Rogers HJ and Griffiths E** (1978) Role of Iron in Bacterial Infection. In Arber, W., Henle, W., Hofschneider, P. H., et al. (eds.), *Current Topics in Microbiology and Immunology: Volume 80*, Current Topics in Microbiology and Immunology, Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 1–35.
 231. **Weinberg ED** (1975) Metal Starvation of Pathogens by Hosts. *BioScience* **25**, 314–318.
 232. Interaction of HapX with the CCAAT-binding complex—a novel mechanism of gene regulation by iron (2007). *The EMBO Journal* **26**, 3157–3168.
 233. **Sigel A and Sigel H** (1998) Metal Ions in Biological Systems. *Metal Ions in Biological Systems*; CRC Press, 1998.
 234. **Oberegger H, Schoeser M, Zadra I, et al.** (2001) SREA is involved in regulation of siderophore biosynthesis, utilization and uptake in *Aspergillus nidulans*. *Molecular Microbiology* **41**, 1077–1089.
 235. **De Locht M, Boelaert JR and Schneider Y-J** (1994) Iron uptake from ferrioxamine and from ferrirhizoferrin by germinating spores of *rhizopus microsporus*. *Biochemical Pharmacology* **47**, 1843–1850.
 236. **Schrettl M and Haas H** (2011) Iron homeostasis—Achilles’ heel of *Aspergillus fumigatus*? *Current Opinion in Microbiology* **14**, 400–405.
 237. **Heymann P, Gerads M, Schaller M, et al.** (2002) The Siderophore Iron Transporter of *Candida albicans* (Sit1p/Arn1p) Mediates Uptake of Ferrichrome-Type Siderophores and Is Required for Epithelial Invasion. *Infection and Immunity* **70**, 5246–5255.
 238. **Jung WH and Kronstad JW** (2008) Iron and fungal pathogenesis: a case study with *Cryptococcus neoformans*. *Cellular Microbiology* **10**, 277–284.
 239. **Jung WH, Sham A, White R, et al.** (2006) Iron Regulation of the Major Virulence Factors in the AIDS-Associated Pathogen *Cryptococcus neoformans*. *PLOS Biology* **4**, e410.
 240. **Garfoot AL, Zemska O and Rappleye CA** (2014) *Histoplasma capsulatum* depends on de novo vitamin biosynthesis for intraphagosomal proliferation. *Infection and Immunity* **82**, 393–404.
 241. **Pralea I-E, Moldovan R-C, Petrache A-M, et al.** (2019) From Extraction to Advanced Analytical Methods: The Challenges of Melanin Analysis. *International Journal of Molecular Sciences* **20**, 3943.
 242. **Park YD, Chen SH, Camacho E, et al.** (2020) Role of the *escrt* pathway in laccase trafficking and virulence of *cryptococcus neoformans*. *Infection and immunity* **88**, e00954.
 243. **Zhu X, Gibbons J, Garcia-Rivera J, et al.** (2001) Laccase of *Cryptococcus neoformans* is a cell wall-associated virulence factor. *Infection and Immunity* **69**, 5589–5596.
 244. **Gupta AK, Ahmad I, Borst I, et al.** (2000) Detection of Xanthomegnin in Epidermal Materials Infected with *Trichophyton rubrum*. *Journal of Investigative Dermatology* **115**, 901–905.
 245. **Ozdemir HG, Kandemir H, Çürük A, et al.** (2016) Infrequent Production of Xanthomegnin by Fungal Strains Recovered from Patients with Ocular Mycoses. *Mycopathologia* **181**, 241–246.
 246. **Zukal J, Bandouchova H, Brichta J, et al.** (2016) White-nose syndrome without borders: *Pseudogymnoascus destructans* infection tolerated in Europe and Palearctic Asia but not in

- North America. *Scientific Reports* **6**, 19829.
247. **Hube B** (2009) Fungal adaptation to the host environment. *Current Opinion in Microbiology* **12**, 347–349.
 248. **Bliska JB and Casadevall A** (2009) Intracellular pathogenic bacteria and fungi — a case of convergent evolution? *Nature Reviews Microbiology* **7**, 165–171.
 249. **Gauthier T, Wang X, Santos JSD, et al.** (2012) Trypacidin, a Spore-Borne Toxin from *Aspergillus fumigatus*, Is Cytotoxic to Lung Cells. *PLOS ONE* **7**, e29906.
 250. **Nierman WC, Pain A, Anderson MJ, et al.** (2005) Genomic sequence of the pathogenic and allergenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. *Nature* **438**, 1151–1156.
 251. **Petrik M, Zhai C, Haas H, et al.** (2017) Siderophores for molecular imaging applications. *Clinical and Translational Imaging* **5**, 15–27.
 252. **Rubanov D, Dadova P, Vasicek O, et al.** (2021) Pseurotin D Inhibits the Activation of Human Lymphocytes. *International Journal of Molecular Sciences* **22**, 1938.
 253. **Chen K, Qiu P, Yuan Y, et al.** (2019) Pseurotin A Inhibits Osteoclastogenesis and Prevents Ovariectomized-Induced Bone Loss by Suppressing Reactive Oxygen Species. *Theranostics* **9**, 1634–1650.
 254. **Chen T, Zhang B, Lin Y, et al.** (2019) Protective Effects of Prunasin A against the Differentiation of Osteoclasts and Destruction of Cartilage via the Receptor Activator of Nuclear Factor-Kappa-B Ligand/Mitogen-Activated Protein Kinase/Osteoprotegerin Pathway in a Rat Model of Arthritis. *Pharmacology* **104**, 216–225.
 255. **Frisvad JC, Møller LLH, Larsen TO, et al.** (2018) Safety of the fungal workhorses of industrial biotechnology: update on the mycotoxin and secondary metabolite potential of *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, and *Trichoderma reesei*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **102**, 9481–9515.
 256. **Choque E, El Rayess Y, Raynal J, et al.** (2015) Fungal naphtho- γ -pyrones—secondary metabolites of industrial interest. *Applied Microbiology and Biotechnology* **99**, 1081–1096.