

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei
Thesis of PhD dissertation

***Az *Aspergillus nidulans* autolitikus enzimtermelésének
vizsgálata***

Autolytic enzyme production in *Aspergillus nidulans*

Szilágyi-Bónizs Melinda

Témavezető/Supervisor: Dr. Emri Tamás



DEBRECENI EGYETEM
Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola
Debrecen, 2012

1. Bevezetés

Az elmúlt évtizedekben a mikroszkópikus gombák az élettani kutatások középpontjába kerültek. Ez nem meglepő, figyelembe véve, hogy a gombák széleskörű biotechnológiai alkalmazása miatt élettani folyamataik alaposabb megértése hasznos információkkal szolgálhat a biotechnológiai vállalatok számára. Másfelől ezen kutatások új antifungális szerek, stratégiák kifejlesztéséhez vezethetnek el, amelyek alkalmasak lehetnek az egészségügyben a humán mikózisok leküzdésére, illetve a mezőgazdaságban a növénypatogén gombák okozta hatalmas termékvesztés mérséklésére.

A gombák akár a természetben, akár a fermentációs iparban gyakran szembesülnek az éhezés jelenségével, amely sejt degradációhoz, sejthalálhoz és autolízishez vezethet. Az autolízis egy olyan természetes sejtpusztulási folyamat, amely során hidrolitikus enzimek (pl. kitinázok, glükánázok, proteinázok, RNázok, DNázok) indukálódnak, intenzív vakuolizációt, a sejtorganellek lebomlását, a hifák kiürülését és a sejtfal degradálódását eredményezve (White és munkatársai 2002). A természetben kedvezőtlen körülmények között az autolízis a tenyésztet anyagainak újrahasznosításán keresztül a fonalas gombák túlélésében lehet fontos (Gordon és Lilly 1995).

Feltételezhető jelentőségük ellenére az eddig azonosított, az autolitikus sejtfal degradációban szerepet játszó enzimek száma igen csekély. Az *Aspergillus nidulans*, mint gyakran alkalmazott modellszervezet autolizáló tenyésztetéből eddig csupán két, a kitin lebontásában közreműködő enzimet, a ChiB kitinázt és a NagA N-acetil-β-D-glükózaminidázt kódoló gének autolízis alatti indukcióját és a ChiB autolízisben betöltött központi jelentőségét igazolták (Pusztahelyi és munkatársai 2006; Pócsi és

munkatársai 2009; Shin és munkatársai 2009). Hasonló a helyzet a proteináz aktivitású enzimek terén is: a vizsgált – PrtA (alkalikus szerin proteináz; Katz és munkatársai 1994) és PrtB (savas aszpartát proteináz; vanKuyk és munkatársai 2000) – proteinázokat kódoló gének közül a *prtA* autolízis alatti indukálódását mutatták ki, így feltételezhető, hogy az autolízis jelenségét kísért magas extracelluláris proteináz aktivitás egy részéért e gén terméke tehető felelőssé (Emri és munkatársai 2008).

Az autolízisre vonatkozó hiányos ismereteinkre való tekintettel célul tűztük ki az *A. nidulans* szénéhezéssel indukált autolizáló tenyészeiben termelődő enzimek megismerését, valamint a szénéhezésre adott transzkripció szintű változások feltérképezését.

Célkitűzéseink között az alábbi vizsgálatok szerepeltek:

- 1) Az *A. nidulans* szénforrás éhezéssel indukált autolizáló tenyészeiben termelődő extracelluláris β -glükánáz aktivitású enzimek azonosítása, élettani jelentőségük, szabályozásuk megismerése.
- 2) Az *A. nidulans* szénforrás éhezéssel indukált autolizáló tenyészeiben termelődő extracelluláris proteináz aktivitású enzimek azonosítása, élettani jelentőségük, szabályozásuk megismerése.
- 3) Az autolízis alatt termelődő extracelluláris enzimek a sejtfal lebontásán túlmutató jelentőségének megismerése.
- 4) A szénéhezés hatására indukciót vagy repressziót mutató gének azonosítása és ezen keresztül a szénéhezés, valamint az autolízis jelenségét kísérő fiziológiai változások alaposabb feltérképezése microarray vizsgálat segítségével.

2. Módszerek

A kísérleteinkben az alábbi törzseket használtuk fel:

Név	Genotípus
<i>Aspergillus nidulans</i>	
FGSC26	<i>biA1</i>
FGSC744	<i>pabaA; yA2; fluG1</i>
FGSC1079	<i>biA; pabaA; pyroA; ΔbrlA; veA+</i>
FGSC1035	<i>yA2; fadA^{G203R}</i>
FGSC242	<i>biA1; pacC5</i>
RMdgB03	<i>paba1; yA2; ΔargB::trpC; ΔganB::argB⁺; trpC801 ; veA+</i>
<i>creA</i> nullmutáns	<i>ΔcreA, pabaA1, yA1; riboB2</i>
tNJ11	<i>biA1; argB2; metG1; argB⁺</i>
tNJ12	<i>biA1; argB2; ΔchiB::argB⁺; metG1</i>
tNJ36	<i>pyrG89; AfupyrG⁺; pyroA4; veA⁺;</i>
tNJ33.3	<i>pyrG89; ΔengA::AfupyrG⁺; pyroA4; veA⁺</i>
tNJ34.8	<i>pyrG89; ΔengA::AfupyrG⁺; pyroA4; ΔchiB::AnpyroA⁺; veA⁺</i>
tNJ76.7	<i>pyrG89; ΔpepJ::AfupyrG⁺; pyroA4; veA⁺</i>
tNJ77.16	<i>pyrG89; ΔprtA::AfupyrG⁺; pyroA4; veA⁺</i>
tNJ78.4	<i>pyrG89; ΔpepJ::AfupyrG⁺; pyroA4; ΔprtA::AnipyroA⁺; veA⁺</i>
<i>Aspergillus rugulosus</i>	vad típus
CBS171.71	
<i>Aspergillus niger</i> VG1	vad típus
<i>Aspergillus fumigatus</i>	vad típus
FGSC1100 (AF293)	
<i>Penicillium nalgiovense</i>	vad típus
NCAIM F-001333	
<i>Penicillium chrysogenum</i>	kevés penicillint termelő ipari törzs
NCAIM 00237	
<i>Trichoderma atroviride</i>	vad típus
T122	
<i>Fusarium oxysporum</i>	vad típus
VG5	

Az *A. nidulans* törzseket, glükózt tartalmazó minimál tápagon tartottuk fenn (pH 6,5; Barratt és munkatársai 1965). Rázott kultúrákhoz ezen tápagon agarmentes változatát használtuk. A tápközegekben szénforrásként 10 g/l glükóz, 10 g/l Na-acetát, és/vagy 5 g/l élesztőkivonat volt jelen, vagy nem tartalmaztak szénforrást. Nem átmosott rázatott tenyészetek esetében a

glükózt és élesztőkivonatot tartalmazó tápleves 100 ml-ét 50 millió spórával oltottuk be és a tenyészeteket rázóinkubátorban (37 °C, 220 rpm) rázattuk 144 órán keresztül. Átmosott tenyészeteknél a 20 órás, előbb említett módon oltott tenyészeteket leszűrtük, majd 100 ml friss táplevesben szuszpendáltuk fel és rázattuk (37 °C, 220 rpm) további 124 órán át. A tápközeg pH-jának extracelluláris proteináz termelésre gyakorolt hatását 2 l-es fermentorban (Biostat B-plus; Sartorius) vizsgáltuk.

A nem *A. nidulans* törzsek tenyésztéséhez malátás tápagart alkalmaztunk, melynek összetétele a következő volt: 10 g/l malátakivonat, 20 g/l glükóz, 5 g/l élesztőkivonat és 20 g/l agar.

A tenyészetek szárazanyag tartalmának mérésekor 5 ml tenyészetből származó micéliumot desztillált vízzel mostunk, majd súlyállandóságig szárítottuk (Pusztahelyi és munkatársai 1997).

Az életképesség vizsgálatok alkalmával az 5 ml tenyészetből származó micéliumot friss tápközegbe helyeztük, majd 15 óra inkubálás után leszűrtük. Az életképesség jellemzésére a száraztömeg növekedését használtuk fel (Molnár és munkatársai 2006).

Az antifungális hatás vizsgálatát glükózmentes minimál tápközegbe átmosott tenyészetekből származó, liofilezéssel töményített és dializált fermentlevekkel végeztük. Az antifungális hatás tesztelése mikrodilúciós módszerrel, 96 lyukú plate felhasználásával történt.

Az enzimek fermentléből való tisztítását $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -os kicsapást és dializálást követően kromatofókuszálassal kiviteleztük (Binod és munkatársai 2005). Az SDS poliakrilamid gélelektroforézist 12,5 %-os gélben végeztük (LeBlanc és Cochrane 1987). A gélből kivágott fehérje azonosítása MALDI-

TOF MS analízis segítségével történt (Pusztahelyi és munkatársai 2006). A MALDI-TOF MS vizsgálatokat Dr. Darula Zsuzsa (SZBK, Szeged) végezte.

Az enzimek (proteináz, β -1,3-glükánáz, β -glükozidáz, kitináz) aktivitását fotometriásan határoztuk meg (Tomarelli és munkatársai 1949; Fontaine és munkatársai 1997; Emri és munkatársai 2004). Az EngA és PepJ pH- és hőmérséklet függésének tesztelésekor az aktivitásmérést különböző pH-jú pufferekben (pH 3,5-10,5), ill. különböző hőmérsékleteken (5-95°C) végeztük el. A pH-függő stabilitás vizsgálatok különböző pH-jú pufferekben (pH 3,5-10,5; 24 h; 37°C), a hőmérsékletfüggő stabilitás vizsgálatok pedig különböző hőmérsékleteken (35-95°C; 15 perc) inkubáltuk elő az enzimpreparátumokat.

A sejtek szuperoxid és peroxid tartalmának mérése dihidroetidin, ill. 2',7'-diklorofluoreszcin diacetát felhasználásával fluorimetriás módszerrel történt (Carter és munkatársai 1994; Royall és Ischiropoulos 1993).

A tápközeg glükóz tartalmának meghatározásához a Leary és munkatársai (1992) által kidolgozott "rate assay" eljárást alkalmaztuk.

A micélium szterigmatocisztin tartalmát vékonyréteg kromatográfias módszerrel határoztuk meg (Klich és munkatársai 2001).

Az RNS izolálása a liofilizált micéliumból TRISOL reagenssel történt (Chomczynski és munkatársai 1993). Az RT-PCR reakciókat Brilliant® II SYBR® Green QRT-PCR Master Mix kittel (Stratagene) végeztük el, a gyártó ajánlása szerint.

A microarray vizsgálat során egy növekvő és egy szénéhező tenyészet transzkripció mintázatát hasonlítottuk össze egy Agilent array segítségével. Az RNS izolálása a fent említett módon történt, a microarray vizsgálat kivitelezése során a hibridizáció és leolvasás lépéseket a Kromat Kft.

végezte. A LOESS normalizáláson átesett adatokat használtuk fel a további vizsgálatainkban. Az indukció ($\log_2 R < -2$), ill. a represszió ($\log_2 R > 2$) mértékéről a \log_2 arányok adtak felvilágosítást. 99 gén transzkripcióját RT-PCR segítségével is ellenőriztük.

3. Új tudományos eredmények

3.1 Extracelluláris glükánázok vizsgálata az *Aspergillus nidulans* szénforrás éhezéssel indukált autolizáló tenyészetekben

Sikerült megtisztítanunk egy β -1,3-endoglükánáz aktivitású enzimet az *A. nidulans* FGSC26 törzsének glükózmentes minimál tápközegbe átmosott tenyészetének fermentlevéből. A MALDI-TOF vizsgálatok alapján a tisztított fehérje az *engA* gén (locus ID: AN0472.3; de Groot és munkatársai 2009) termékének bizonyult, amely szekvencia adatok alapján egy 95,2 kDa méretű β -1,3-endoglükánáz kódol.

Az EngA fehérje részleges jellemzésekor kapott tulajdonságai a következők: molekulaméret 91 ± 3 kDa; izoelektromos pont pH 7,05; pH optimum pH 6,5, de pH 3,5-10,5 között is aktív volt; hőmérséklet optimum 45-65 °C; az enzim a pH 5,5-8,5 tartományban, ill. 55 °C-ig stabilnak bizonyult.

A *engA* deléciós törzsek vizsgálatakor azt tapasztaltuk, hogy az *engA* hiányában a szárazanyag tartalom kisebb mértékben csökkent, mint a kontroll törzs esetében és a $\Delta engA$ tenyészetek hosszú ideig megőrizték pelletes morfológiájukat szénéhező körülmények között. A fentiek alapján az EngA meghatározó jelentőségű az autolitikus fenotípus kialakításában.

A $\Delta engA$ törzset az extracelluláris enzimmintázat megváltozása jellemezte (csökkent az extracelluláris β -1,3-glükánáz mellett a kitináz, proteináz és β -glükozidáz aktivitás). Hasonló eredményt kaptunk a $\Delta chiB$ és $\Delta engA \Delta chiB$ törzsek esetében is. Vizsgálataink alapján e jelenség mögött transzkripcionális változások állhattak. Eredményeink arra utalnak, hogy a

sejtfalbontó enzimek termelődése komplex – egymás jelenlététől is függő – szabályozás alatt áll.

A szénéhező tenyészetek extracelluláris β -1,3-glükánáz és β -glükozidáz termelésének szabályozásában a FluG-Br1A konidigenezist indukáló jelátviteli útvonal központi jelentőségűnek bizonyult. Ugyanakkor a FadA és GanB heterotrimer útvonalak, valamint a *creA* karbon katabolit represszor mutációjára csak az extracelluláris β -glükozidáz termelés bizonyult érzékenynek.

3.2 Extracelluláris proteinázok vizsgálata az *Aspergillus nidulans* szénforrás éhezéssel indukált autolizáló tenyészeiben

Megtisztítottunk egy proteináz aktivitású enzimet az *A. nidulans* FGSC26 törzs glükózmentes minimál tápközegbe átmosott tenyészetének fermentlevéből. A MALDI-TOF vizsgálat alapján a tisztított fehérje a *pepJ* gén (locus ID: AN7962.3; Katz és munkatársai 2008) terméke, mely gén egy deuterolizin típusú, 37 kDa méretű metalloproteinázt kódol a szekvencia adatok alapján.

A PepJ fehérje részleges jellemzésekor kapott paraméterei a következők: molekulaméret 19 kDa; izoelektromos pont 8,6; pH optimum pH 5,5, de pH 3,5-10,5 aktív volt és stabilnak is mutatkozott; hőmérséklet optimum 65 °C, mely hőmérsékletig stabilnak is bizonyult.

A $\Delta pepJ$, $\Delta prtA$ és $\Delta pepJ\Delta prtA$ mutánsok esetében nem tapasztaltunk számottevő változást a szárazanyag tartalom csökkenésében, azonban jelentősen alacsonyabb extracelluláris proteináz aktivitásokat mértünk. Tehát

a PrtA és a PepJ szerepe a sejtfal degradáció folyamatában és így az autolitikus fenotípus kialakításában nem mondható jelentősnek.

A szénéhező tenyészetek extracelluláris proteináz termelésének szabályozásában a FluG-BrlA útvonal szintén meghatározónak mutatkozott. A FadA és GanB heterotrimer útvonalak mutációi ugyanakkor csak kisebb hatással bírtak.

A tenyészetek extracelluláris proteináz termelése erősen függött a szénforrás éhezés indukálásának módjától. A kontroll törzstől eltérően a *creA* nullmutáns, a *ΔbrlA* és a *ΔprtA* törzsek esetében az extracelluláris proteináz termelés kifejezettebb volt nem átmosott körülmények között. A jelenség mögött valószínűsíthetően a stacioner fázis – melynek kimaradása jellemzi az átmosott tenyészeteket - megléte állhatott. Ezen növekedési szakasz meghatározó lehet az extracelluláris proteináz termelés szabályozásában.

A lúgos pH – amely az ammónia képződése miatt jellemző az autolizáló tenyészetekre - kifejezetten kedvezett az extracelluláris proteinázok képződésének, amely hatás a *prtA* és *pepJ* gének transzkripciójában is megmutatkozott. Ezen hatás részben – a *prtA* transzkripciójának befolyásolásával - a PacC, pH szabályozási útvonalban központi szerepet betöltő transzkripciós faktoron keresztül valósulhatott meg.

3.3 Az autolízis alatt termelődő extracelluláris enzimek a sejtfal lebontásán túlmutató jelentőségének vizsgálata

Az antifungális hatás tesztelésekor az *A. nidulans* FGSC26 törzsének szénéhező tenyészetéből származó töményített fermentleve gátolta számos gombafaj (*A. rugulosus*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *P. nalgiovense*, *P.*

chrysogenum, *T. artroviridae*, *F. oxysporum*) és a saját csírázását/növekedését is. A *fluG1* mutáns, ill. az *engA* és/vagy *chiB* génnek hiányában e hatás csökkenését tapasztaltuk. Az EngA és a ChiB – a PepJ-vel ellentétben – önmagában is antifungális hatást fejtett ki, tehát a tapasztalt hatás hátterében – nagyrészt - ezen enzimek állhattak.

A $\Delta engA\Delta chiB$ kettős mutáns törzs életképessége lassabban csökkent a kései autolitikus fázisban, mely jelenség magyarázatául szolgálhat ezen enzimek a termelő törzsre kifejtett antifungális hatása. Felületi kultúrákban az EngA és a ChiB képződése csökkentette a konídiumtermelés képességét. Azonban ha glükóz helyett más szénforrást alkalmaztunk (Na-acetát és/vagy élesztőkivonat), a kontroll törzs gyorsabb növekedésre volt képes, mint a $\Delta engA\Delta chiB$ kettős mutáns törzs. Emellett a kontroll törzs hatékonyabban volt képes gátolni az *A. niger* növekedését. Ezen folyamatban az EngA és ChiB közvetve - a vegetatív növekedés elősegítésével - vehettek részt.

3.4 A szénéhezés hatására indukálódó és represszálódó gének azonosítása microarray vizsgálat segítségével

A szénforrás éhezés korai szakaszában komplex transzkripciós szintű változásokat figyeltünk meg. Összesen 1676 gén transzkripciójában tapasztaltunk változást, 816 represszálódott és 860 indukálódott. A szénéhezés hatására a microarray adatok alapján valószínűsíthető változások közül az alábbiakat szeretném kiemelni:

1) A megfigyelt transzkripciós szintű változások alapján a glükóz aerob lebontásához köthető folyamatok – glikolízis, pentóz-foszfát út, citrát kör,

légzés - intenzitása csökkent. A szénhidrátokat bontó hidrolázok mintázatában erős változás következett be.

2) A lipid-anyagcserében a szintézis-lebontás egyensúlya a lebontás irányába mozdult el, számos lipáz aktivitású enzimet kódoló gén indukálódott.

3) A nitrát hasznosításához köthető gének represszálódtak. Az aminosav, nukleotid anyagcserében a hangsúly a lebontó folyamatokra helyeződött át, amit nukleázok és proteinázok képződése kísért.

4) A sejtfal anyagcserében részt vevő gének közül számos hidrolitikus enzimet kódoló gén indukálódott (kitin, β -glükán és α -glükán hidrolízis), a sejtfalalkotók szintéziséért felelős gének ugyanakkor represszálódtak.

5) A konidiogenezis iniciálásáért (is) felelős *brlA* indukálódása mellett több hidrofobint kódoló gén is indukciót mutatott.

6) A redox homeosztázisban szerepet játszó gének (antioxidáns enzimek, glutation metabolizmus) aktivitásában erős változás következett be.

7) Autofágiában közreműködő gének indukálódtak, azonban az apoptózisban szerepet játszó fehérjéket kódoló gének indukálódása nem volt jellemző a szénéhezés korai szakaszában.

8) A szénéhezés hatására csak kevés, a fehérje szintézishez (transzkripció, transláció, folding, poszttranszlációs módosítások, intracelluláris szállítás) köthető gén represszálódtak, sőt számos ilyen funkciójú gén indukálódott. Az „Unfolded Protein Response” aktiválódását jelzi több ezen útvonalban részt vevő fehérjét kódoló gén indukálódása.

9) Szekunder metabolitok képződésében érintett gének indukciója mellett antifungális fehérjéket és antibakteriális enzimeket kódoló gének is indukálódtak. Melanin szintézisben érintett gének indukciója ugyancsak megfigyelhető volt.

4. Összefoglalás

A szénéhezés hatására számos fiziológiai, morfológiai és transzkripcionális változás következett be. Eredményeink megerősítik, hogy a megfigyelt fiziológiai változások mögött aktív fehérjeszintézis és nem valamilyen passzív folyamat áll. A környezeti stressz hatására a fehérjék foldingjában bekövetkező zavar az „Unfolded Protein Response” aktiválódását indukálta.

A reaktív oxigén gyökök akkumulálódása az antioxidáns enzimmintázatban bekövetkező változásokhoz vezetett. A glutation lebontását célzó folyamatok szintén indukálódtak.

A sejtfal homeosztázisban a szintetikus folyamatok represszációja mellett, a sejtfal lebontását végző enzimeket kódoló gének indukálódtak, ami végső soron az autolitikus fenotípus kialakulásához vezetett. Ezen enzimek közül az EngA β -1,3-endoglükánázt sikerült megtisztítanunk, és bizonyítottuk, hogy a ChiB kitináz mellett meghatározó szerepet tölt be az autolízisben.

A környezetben esetlegesen jelen lévő tápanyagok lebontását célzó folyamatok előtérbe kerülését jelzi számos extracelluláris hidrolázt (nukleáz, lipáz, glikozil hidroláz) kódoló gén indukálódása. Több extracelluláris proteinázt kódoló gén is indukálódott, melyek termékei közül a PepJ-t sikerült megtisztítanunk és kimutattuk, hogy sem a PepJ, sem a PrtA nem rendelkezik meghatározó szereppel az autolitikus fenotípus kialakításában. A N-tartalmú szerves vegyületek szénéhezés alatti lebontására utalt az ammónia képződése és a pH folyamatos emelkedése is, ami, vizsgálataink alapján kifejezetten kedvezett az extracelluláris proteinázok képződésének. Az EngA

és PepJ lúgos pH-n mutatott aktivitása azt jelzi, hogy e fehérjék aktivitásukat képesek megőrizni a pH folyamatos emelkedése ellenére is.

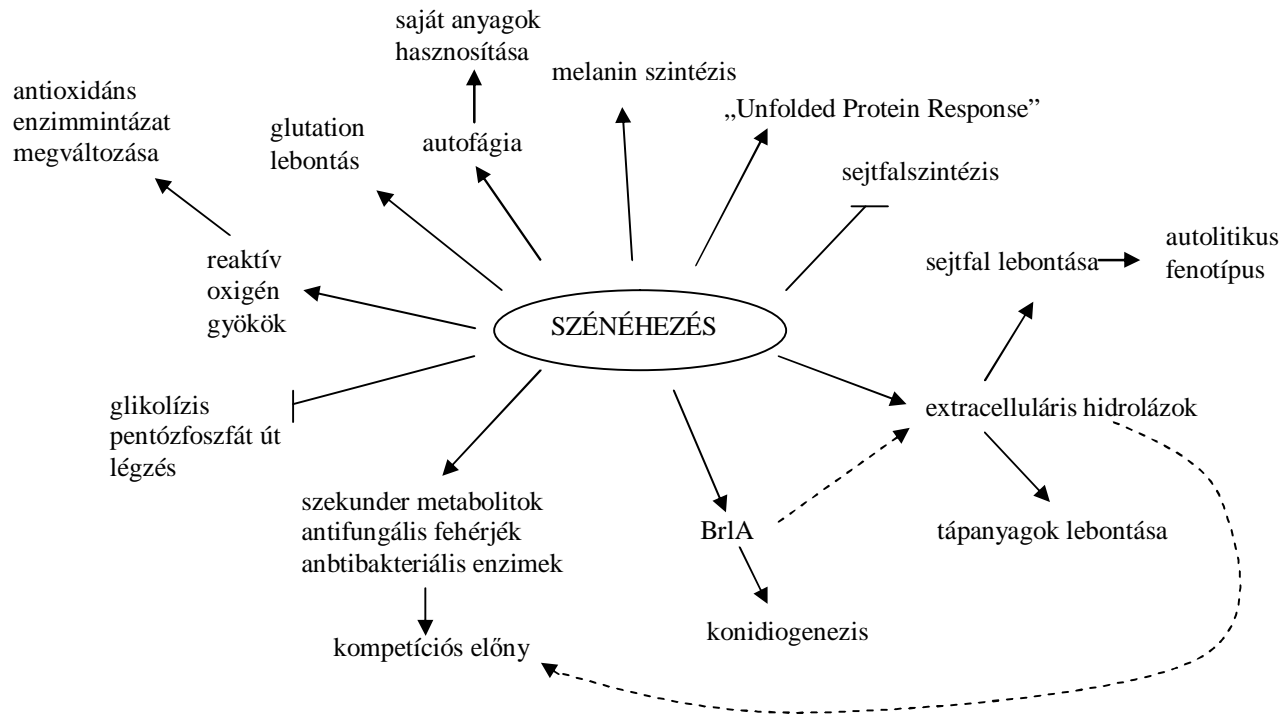
A BrlA transzkripció faktor indukálódásával párhuzamosan a konidiogenezis is aktiválódott szénéhezés hatására. Azonban a FluG-BrlA útvonal jelentősnek bizonyult az extracelluláris hidrolázok szabályozásában is, tehát a BrlA a konidiogenezis indukálása mellett az autolízis indukálásában is szerepet tölthet be szénéhező körülmények között.

A sejtfalbontó hidrolázok termelődése nem kedvezett a konídiumok képződésének, azonban gyorsabb növekedést tett lehetővé, amely kedvezőleg hatott a telep kompetíciós képességére. A megfigyelt szekunder metabolitokat, antifungális fehérjéket és bakteriális sejtfalbontó hidrolázokat kódoló gének indukálódása szintén arra utal, hogy a gomba hatást gyakorol a környezetében előforduló mikroorganizmusokra.

A szénéhezés korai szakaszában megfigyelhető autofágiás folyamatok arra engednek következtetni, hogy valószínűsíthetően az autofágia biztosíthatja a sejtek aktív lebontásával a tápanyagok felszabadítását és a tenyészet hosszú távú fennmaradását a szénéhezés korai szakaszában.

Kimutattuk, hogy a sejtfalbontó enzimek jelentős antifungális hatással rendelkeznek, azonban ezek feladata feltehetőleg a már elpusztult sejtek falának lebontása lehet. Az intenzív melanin szintézissel az élő sejtek védekezhetnek ezen enzimek káros hatásával szemben a korai szénéhező tenyészetekben.

Ezen folyamatok együttesen járulhatnak hozzá a telep szénéhezés alatti túléléséhez.



A szénéhezés hatására megfigyelhető változások összefoglalása.

5. Introduction

Microscopic fungi are in the center of interest nowadays. It is not surprising since fungi are widely applied in biotechnology therefore understanding their physiology can be useful for biotechnological companies. On the other hand these researches can lead to the development of new antifungal drugs or strategies, which can be used either in healthcare for treating fungal diseases or in agriculture for reducing produce loss caused by phytopathogenic fungi.

Nutrient starvation is a common stress both in the Nature and in the industry. It often causes cellular degradation, cell death and autolysis. Autolysis can be defined as a natural process of self digestion of aged hyphal cultures, occurring as a result of hydrolase (*e.g.* chitinase, glucanase, proteinase, RNase, DNase) activity causing vacuolization and disruption of organelle and cell wall structures (White *et al.* 2002). By recycling nutrients within a culture during unfavorable circumstances, autolysis helps to prolong survival of fungi in Nature (Gordon and Lilly 1995).

Despite their possible significance only few autolytic enzymes have been identified so far. Induction of *chiB* chitinase and *nagA* N-acetyl- β -glucosaminidase genes, both participating in chitin degradation, were detected in autolytic cultures of the model organism *A. nidulans*. Moreover, ChiB proved to be essential in the autolytic process itself (Pusztahelyi *et al.* 2006; Pócsi *et al.* 2009; Shin *et al.* 2009). Two proteinase genes, *prtA* (encoding an alkalic serine proteinase; Katz *et al.* 1994) and *prtB* (encoding an acidic aspartic proteinase; vanKuyk *et al.* 2000) were also studied and *prtA* proved to be active during autolysis (Emri *et al.* 2008).

Our aims were to gain insights into the physiological events and signaling of carbon starvation stress response and to identify and functionally characterize hydrolytic enzymes produced by autolytic cultures of *A. nidulans*.

In more details:

- 1) We isolated and characterized an extracellular β -glucanase from the fermentation broth of autolytic cultures, we studied its regulation as well as its involvement in the autolytic process.
- 2) We also isolated and characterized an extracellular proteinase from the fermentation broth of autolytic cultures, we studied its regulation as well as its involvement in the autolytic process.
- 3) We studied further properties (antifungal effect, and effect on conidia formation, growth, viability) of extracellular hydrolases produced during carbon starvation.
- 4) We performed a DNA microarray analyses in order to determine changes in the transcriptome caused by carbon starvation.

6. Materials and methods

Strains used in this study are listed in the following table:

Name	Genotype
<i>Aspergillus nidulans</i>	
FGSC26	<i>biA1</i>
FGSC744	<i>pabaA</i> ; <i>yA2</i> ; <i>fluG1</i>
FGSC1079	<i>biA</i> ; <i>pabaA</i> ; <i>pyroA</i> ; Δ <i>brlA</i> ; <i>veA</i> ⁺
FGSC1035	<i>yA2</i> ; <i>fad</i> ^{G203R}
FGSC242	<i>biA1</i> ; <i>pacC5</i>
RMdgB03	<i>paba1</i> ; <i>yA2</i> ; Δ <i>argB</i> :: <i>trpC</i> ; Δ <i>ganB</i> :: <i>argB</i> ⁺ ; <i>trpC801</i> ; <i>veA</i> ⁺
<i>creA</i> null mutant	Δ <i>creA</i> , <i>pabaA1</i> , <i>yA1</i> ; <i>riboB2</i>
tNJ11	<i>biA1</i> ; <i>argB2</i> ; <i>metG1</i> ; <i>argB</i> ⁺
tNJ12	<i>biA1</i> ; <i>argB2</i> ; Δ <i>chiB</i> :: <i>argB</i> ⁺ ; <i>metG1</i>
tNJ36	<i>pyrG89</i> ; <i>AfupyrG</i> ⁺ ; <i>pyroA4</i> ; <i>veA</i> ⁺ ;
tNJ33.3	<i>pyrG89</i> ; Δ <i>engA</i> :: <i>AfupyrG</i> ⁺ ; <i>pyroA4</i> ; <i>veA</i> ⁺
tNJ34.8	<i>pyrG89</i> ; Δ <i>engA</i> :: <i>AfupyrG</i> ⁺ ; <i>pyroA4</i> ; Δ <i>chiB</i> :: <i>AnpyroA</i> ⁺ ; <i>veA</i> ⁺
tNJ76.7	<i>pyrG89</i> ; Δ <i>pepJ</i> :: <i>AfupyrG</i> ⁺ ; <i>pyroA4</i> ; <i>veA</i> ⁺
tNJ77.16	<i>pyrG89</i> ; Δ <i>prtA</i> :: <i>AfupyrG</i> ⁺ ; <i>pyroA4</i> ; <i>veA</i> ⁺
tNJ78.4	<i>pyrG89</i> ; Δ <i>pepJ</i> :: <i>AfupyrG</i> ⁺ ; <i>pyroA4</i> ; Δ <i>prtA</i> :: <i>AnipyroA</i> ⁺ ; <i>veA</i> ⁺
<i>Aspergillus rugulosus</i> CBS171.71	wild type
<i>Aspergillus niger</i> VG1	wild type
<i>Aspergillus fumigatus</i> FGSC1100 (AF293)	wild type
<i>Penicillium nalgiovense</i> NCAIM F-001333	wild type
<i>Penicillium chrysogenum</i> NCAIM 00237	low penicillin producer industrial strain
<i>Trichoderma atroviride</i> T122	wild type
<i>Fusarium oxysporum</i> VG5	wild type

A. nidulans strains were maintained on a minimal nitrate medium containing glucose as carbon source (pH 6.5; Barratt *et al.* 1965). All the other strains were cultured on complex medium containing 20 g/l glucose, 10

g/l malt extract, 5 g/l yeast extract and 20 g/l agar. For surface culture experiments minimal nitrate medium was used but in some cases (10 g/l) glucose was replaced by (10 g/l) Na-acetate and/or (5 g/l) yeast extract.

Minimal nitrate medium, without agar, was used for submerged cultivations. In case of “non-washed” cultures, 100 ml medium containing glucose and yeast extract as carbon sources was inoculated with 5×10^7 spores and was incubated for 144 hours (37 °C, 220 rpm). In case of “washed” cultures mycelia from 20 h old above mentioned cultures were separated, washed and transferred into fresh medium (glucose free medium, glucose or yeast extract containing medium) and were further incubated for 124 hours. The pH dependence of extracellular proteinase formation was studied in a 2 l bioreactor (Biostat B-plus, Sartorius).

For determining dry cell mass, mycelia from 5 ml cultures were separated, washed and dried (Pusztahelyi *et al.* 1997).

For detecting the viability of mycelia, 5 ml cultures were separated and placed into fresh medium. After a 15-hour-long incubation, cultures were filtered and the viability of the cultures was characterized by the increase in dry cell mass (Molnár *et al.* 2006).

The antifungal activity of lyophilized and dialyzed fermentation broths originated from carbon starving cultures was tested in 96-well microtiter plates using a microdilution method.

Extracellular hydrolases were purified by $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ precipitation and chromatofocusing (Binod *et al.* 2005). SDS-PAGE was performed on 12.5 % gels (LeBlanc and Cochrane 1987). The purified protein was identified by MALDI-TOF MS analysis (Pusztahelyi *et al.* 2006). The MALDI-TOF MS analysis was performed by Dr. Zsuzsa Darula (SZBK, Szeged).

The proteinase, β -1,3-glucanase, β -glucosidase and chitinase activities were characterized photometrically (Tomarelli *et al.* 1949; Fontaine *et al.* 1997; Emri *et al.* 2004). For determining the pH and temperature optima of the purified EngA and PepJ hydrolases, enzyme activities were measured at wide pH (pH 3.5-10.5) and temperature ranges (5-95 °C). To study the pH and temperature dependent stabilities of EngA and PepJ, enzyme samples were pre-incubated at selected pH values (pH 3.5-10.5; for 24 h at 37 °C) and at different temperatures (35-95 °C; for 15 min).

Intracellular peroxide and superoxide levels were characterized by using 2',7'-dichlorofluorescein diacetate and dihydroethidium, respectively (Carter *et al.* 1994; Royall and Ischiropoulos 1993).

Glucose content of the fermentation broth was determined by the “rate-assay” method according to Leary *et al.* 1992.

Sterigmatocystin content was determined by thin layer chromatography (Klich *et al.* 2001).

Total RNA was isolated from lyophilized mycelia using TRISOL reagent (Chomczynski *et al.* 1993). RT-PCR experiments were carried out by using Brilliant® II SYBR® Green QRT-PCR Master Mix kit (Stratagene).

In the microarray experiment the transcriptomes of a growing and a carbon starving culture were compared using a custom designed Agilent array. Total RNA was isolated as described above and the microarray experiment (hybridization, scanning and reading) was carried out by the Kromat Ltd. (Budapest, Hungary). LOESS normalized data were used for further analysis. The log₂ Ratios showed the extent of gene induction (log₂ R < -2) and repression (log₂ R > 2). Transcription of 99 genes was checked by RT-PCR.

7. Results and discussion

7.1 Investigation of extracellular β -glucanases in the autolytic cultures of *Aspergillus nidulans*

We purified and identified an extracellular β -1,3-endoglucanase from the carbon starving culture of *A. nidulans* FGSC26. The purified enzyme was identified by MALDI-TOF. The enzyme proved to be the product of the *engA* gene (locus ID: AN0472.3; de Groot *et al.* 2009) that encodes a β -1,3-endoglucanase with a molecular mass 95.2 kDa according to sequence data.

The studied enzymatic properties of EngA are as follows: molecular mass was 91 ± 3 kDa; isoelectric point was at pH 7.05; pH optimum was 6.5, but it was active between pH 3.5-10.5; temperature optimum was between 45-65 °C; the enzyme was stable between pH 5.5-8.5 and at temperature lower than 55 °C.

EngA had a significant role in autolysis: In the absence of the *engA* gene product the rate of the dry cell mass declination reduced significantly and the $\Delta engA$ strain preserved its pelleted morphology even in the late autolytic period.

The extracellular enzyme pattern changed markedly in the $\Delta engA$ strain. Besides of the reduced β -1,3-glucanase activity, the extracellular chitinase, proteinase and β -glucosidase activities also decreased. This phenomenon was also observed in case of the $\Delta chiB$ and $\Delta engA\Delta chiB$ strains as well. The reduced enzyme activities were accompanied with decreased transcription of the *prtA*, *pepJ* and *chiB* genes. It is suggested that production of cell wall degrading enzymes is under interdependent regulation.

FluG-BrlA pathway, which is important in the induction of asexual development, proved to be significant in the regulation of extracellular β -1,3-glucanase and β -glucosidase enzyme production. In contrast, mutations in the FadA and GanB heterotrimer G protein pathways or in the *creA* carbon catabolite repressor had effect only on the β -glucosidase enzyme production.

7.2 Investigation of extracellular proteinases in the autolytic cultures of *Aspergillus nidulans*

We purified and identified a new extracellular enzyme with proteinase activity from carbon starving culture of *A. nidulans* FGSC26. The protein was identified by MALDI-TOF and proved to be the product of the *pepJ* gene (locus ID: AN7962.3; Katz et al. 2008). According to the sequence data *pepJ* encodes a 37 kDa, deuterolysin type metalloproteinase.

The studied enzymatic properties of PepJ are as follows: molecular mass was 19 kDa; isoelectric point was at pH 8.6; pH optimum was at 5.5, but it was active and stable between pH 3.5-10.5; temperature optimum was at 65 °C, and it was stable up to this temperature.

Although in the $\Delta pepJ$, $\Delta prtA$ and $\Delta pepJ\Delta prtA$ mutant strains the extracellular proteinase production decreased markedly; these mutations had no effect on dry cell mass declination. Therefore, the role of the PrtA and PepJ proteinases in cell wall degradation and autolysis was not confirmed.

FluG-BrlA pathway played a central role in the regulation of the extracellular proteinase production of carbon starving cultures. However, the FadA and GanB heterotrimer signalings had only minor effects.

The extracellular proteinase formation was strongly dependent on how carbon starvation was induced. In contrast to the control strain, the *creA* null mutant as well as the $\Delta brlA$ and $\Delta prtA$ strains produced higher extracellular proteinase activities in non-washed cultures than in washed cultures. The presence of a short stationary phase in non-washed cultures could be responsible for this phenomenon. It is suggested that events of the stationary phase can be significant in the regulation of extracellular proteinase formation.

Alkalic pH, which is characteristic for carbon starving cultures due to the release of ammonia, proved to be beneficial to extracellular proteinase formation. This effect was also observable in the transcription of *prtA* and *pepJ*. Our results also suggest that the pH dependent regulation of extracellular proteinases has a PacC dependent manner through the induction of *prtA*.

7.3 Investigation of further properties of extracellular hydrolases

The lyophilized fermentation broth originated from carbon starving culture of *A. nidulans* FGSC26 strain had a strong inhibitory effect on the germination/hyphal extension of all species tested (*A. rugulosus*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *P. nalgiovensis*, *P. chrysogenum*, *T. artroviridae* and *F. oxysporum*) including the producer *A. nidulans* strain itself. The antifungal property of the fermentation broth was strongly reduced when it was originated from a loss-of-function *fluG* as well as $\Delta engA$ and/or $\Delta chiB$ mutant. In contrast to PepJ, purified EngA and ChiB alone had inhibitory

effect suggesting that these enzymes were responsible for the observed antifungal property of the fermentation broth.

The viability of the $\Delta engA\Delta chiB$ double mutant strain hardly decreased when it was compared to the control strain in late autolytic cultures. This phenomenon can be explained by the antifungal effect of EngA and ChiB. Although the double mutant produced more conidia on surface cultures, it grew significantly slower on medium containing Na-acetate and/or yeast extract as carbon source. Moreover, the control strain inhibited the growth of *A. niger* more effectively than the double mutant strain. It is likely that in this case EngA and ChiB had only an indirect effect on *A. niger*: they increased the growth and probably the secondary metabolite/antifungal protein production of *A. nidulans* resulting in a reduced growth of the competing species.

7.4 Identification of transcriptional changes in response to carbon starvation

Complex transcriptional changes were observed even in the early phase of carbon starvation. We experienced transcriptional changes in case of 1676 genes; 816 genes were repressed and 860 genes were induced. The most significant observations are as follows:

- 1) Genes connected to the utilization of glucose (glycolysis, pentose-phosphate pathway, citrate cycle, respiration) were down regulated. A markedly change was observed in the carbohydrate degrading enzyme pattern.

- 2) The balance between biosynthesis and degradation was shifted to degradation in lipid metabolism. Several genes encoding lipases were induced.
- 3) Genes involved in nitrate utilization were down regulated, while genes involved in the degradation of amino acids and nucleotides were up regulated. Several nucleases and proteinases were induced.
- 4) Genes encoding hydrolytic enzymes connected to cell wall degradation (chitin, β -glucan, α -glucan hydrolysis) were up regulated. Genes related to cell wall synthesis were down regulated.
- 5) Transcription factor *brlA* (responsible for conidiogenesis and cell wall hydrolysis) together with genes encoding hydrophobins were induced.
- 6) The activity of genes involved in redox homeostasis (antioxidant enzymes, glutathione metabolism) changed.
- 7) Genes involved in autophagy were up regulated but genes related to apoptosis were not induced in this early phase of carbon starvation.
- 8) Several genes contributing in protein synthesis (transcription, translation, folding, posttranslational modification, trafficking) were up regulated and only a few genes were repressed. Induction of the “Unfolded Protein Response” was also suggested by the induction of genes involved in this process.
- 9) Genes of the secondary metabolism as well as genes encoding antifungal and antibacterial proteins/enzymes were up regulated. Genes involved in melanin biosynthesis were induced as well.

8. Summary

Carbon starvation induced complex physiological, morphological and transcriptional changes. Our results confirm that these changes were rather due to active protein synthesis than passive processes. The environmental stress could disturb the protein folding processes that led to the induction of the “Unfolded Protein Response”.

Glutathione degrading processes were induced and the accumulation of reactive oxygen species caused changes in the antioxidant enzyme pattern.

In the cell wall homeostasis synthetic processes were repressed and enzymes involved in cell wall degradation were induced, which led to the autolytic phenotype. The EngA β -1,3-endoglucanase was purified and, as ChiB, EngA proved to be significant in the autolytic process.

Extracellular hydrolytic enzymes (nuclease, lipase, glycosyl hydrolase) were up regulated in response to carbon starvation. It is suggested that processes related to the degradation of nutrients found in surroundings became important during carbon starvation. The induction of several extracellular proteinase coding genes was also observed. Among these, PepJ was purified and our study showed that neither PepJ nor PrtA was important in the autolysis of *A. nidulans*. Degradation of N containing organic compounds was suggested by the release of ammonia that caused the elevation of pH. Alkalic pH proved to be beneficial to extracellular proteinase formation. EngA and PepJ showed activity at alkalic pH, which suggests that they can preserve their activity even at alkalic circumstances.

The BrlA transcription factor and asexual development were induced in response to carbon starvation. Moreover the FluG-BrlA pathway played a

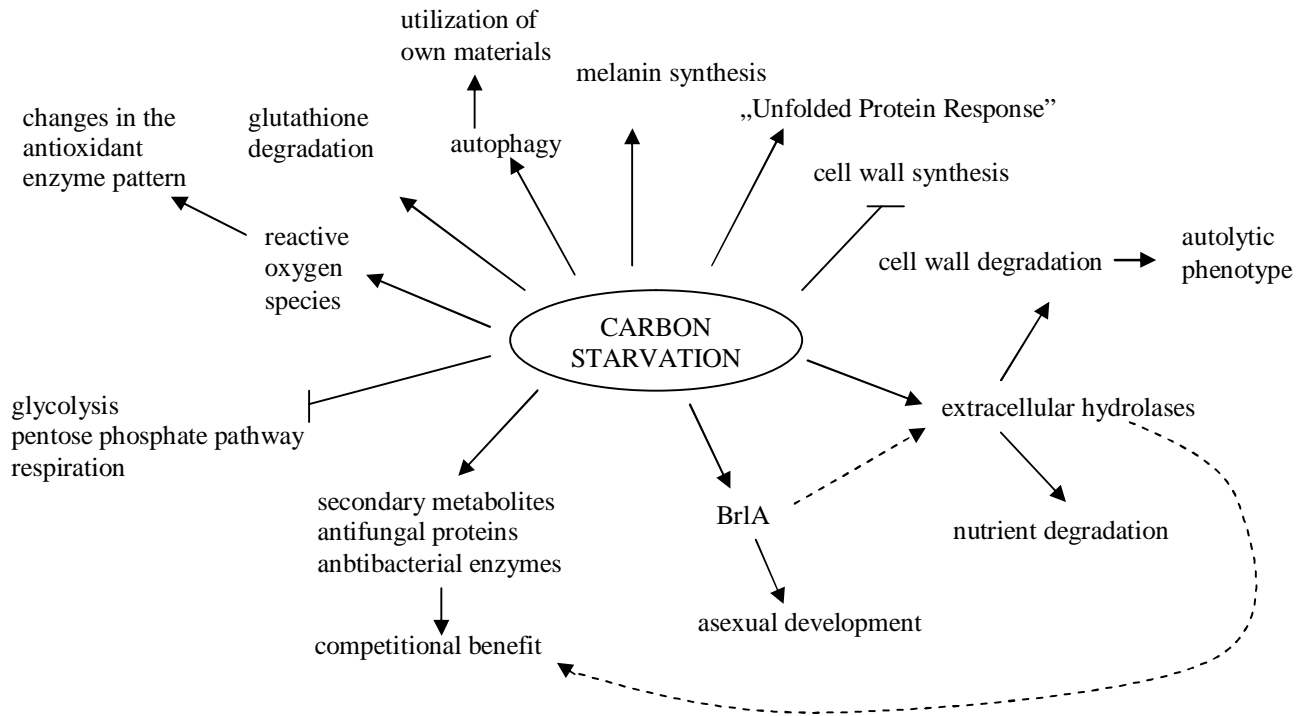
central role in the regulation of extracellular autolytic hydrolases. The significance of BrlA in induction of autolysis besides to asexual development is suggested.

The production of hydrolases involved in cell wall degradation was unfavorable to conidia formation on surface cultures. However, these enzymes promoted vegetative growth on weak carbon source and they were beneficial in a competitive environment. The induction of synthesis of secondary metabolites, antifungal proteins and bacterial cell wall degrading enzymes confirms the hypothesis that fungi have an effect on microorganisms situated in the surroundings.

Genes related to autophagy were induced as well. This process may provide long term survival for the culture by liberating nutrients through degradation of cells.

We demonstrated that cell wall degrading enzymes had a strong antifungal effect. It is also suggested that these enzymes degrade only the cell wall of dead cells. Intensive melanin synthesis may serve as a defense mechanism against the harmful effect of cell wall degrading enzymes in living cells.

These processes together contribute to the survival of the culture during carbon starving conditions.



Summary of observable changes in response to carbon starvation.

9. Irodalomjegyzék/ References

Barratt, R.W., Johnson, G.B., Ogata, W.N. (1965) Wild-type and mutant stocks of *Aspergillus nidulans*. *Genetics* 52, 233-246.

Binod, P., Pusztahelyi, T., Nagy, V., Sandhya, C., Szakacs G., Pócsi I., Pandey, A. (2005) Production and purification of extracellular chitinases from *Penicillium aculeatum* NRRL 2129 under solid-state fermentation. *Enzyme Microb Technol* 36, 880-887.

Carter, W.O, Narayanan, P.K. and Robinson J.P. (1994) Intracellular hydrogen peroxide and superoxide anion detection in endothelial cells. *J Leukoc Biol* 55, 253-258.

Chomczynski, P. (1993) A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Bio Techniques* 15, 532-536.

de Groot, P.W., Brandt, B.W., Horiuchi, H., Ram, A.F., de Koster, C.G., Klis, F.M. (2009) Comprehensive genomic analysis of cell wall genes in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Biol* 46 Suppl 1, 72-81.

Gordon, L.J., Lilly, W.W. (1995) Quantitative analysis of *Schizophyllum commune* metalloprotease ScPrB activity in SDS-gelatin page reveals differential mycelial localization of nitrogen limitation induced autolysis. *Curr Microbiol* 30, 337-343.

Emri, T., Molnár, Zs., Pusztahelyi, T., Pócsi, I. (2004) Physiological and morphological changes in autolysing *Aspergillus nidulans* cultures. *Folia Microbiol* 49, 277-284.

Emri, T., Molnár, Zs., Szilágyi, M., Pócsi, I. (2008) Regulation of autolysis in *Aspergillus nidulans*. *Appl Biochem Biotechnol* 151, 211-220.

Fontaine, T., Hartland, R. P., Beauvais, A., Diaquind, M., Latge, J-P. (1997) Purification and characterization of an endo-1,3- β -glucanase from *Aspergillus fumigatus*. *Eur J Biochem* 243, 315-321.

Katz, M.E., Rice, R.N., Cheetham, B.F. (1994) Isolation and characterization of an *Aspergillus nidulans* gene encoding an alkaline protease. *Gene* 150, 287–292.

Katz, M. E., Bernardo S. M., Cheetham B. F. (2008) The interaction of induction, repression and starvation in the regulation of extracellular proteases in *Aspergillus nidulans*: evidence for a role for CreA in the response to carbon starvation. *Curr Genet* 54, 47–55.

Klich, M., Mendoza, C., Mullaney, E., Keller, N., Bennett, J.W. (2001) A new sterigmatocystin producing *Emericella* variant from agricultural desert soils. *Syst Appl Microbiol* 24, 131-138.

Leary, N.O., Pembroke, A., Duggan, P.F. (1992) Improving accuracy of glucose oxidase procedure for glucose determinations on discrete analyzers. *Clin Chem*, 38, 298-302.

LeBlanc, G.A., Cochrane, B.J. (1987) Identification of multiple glutathione S-transferases from *Daphnia magna*. *Comp Biochem Physiol* 88B, 39-45.

Molnár, Zs., Emri, T., Zavaczki, E., Pusztahelyi, T., Pócsi, I. (2006) Effects of mutations in the GanB/RgsA G protein mediated signaling on the autolysis of *Aspergillus nidulans*. *J Basic Microbiol* 46, 495-503.

Pócsi, I., Leiter, É., Kwon, N.J., Shin, K.S., Pusztahelyi, T., Emri, T., Abuknesha, R., Price, R., Yu, J.H. (2009) ChiB production depends on FluG-BrlA asexual sporulation signaling in submerged cultures of *Aspergillus nidulans*. *J Appl Microbiol* 107, 514–523.

Pusztahelyi T, Pócsi I, Kozma J, Szentirmai A (1997) Ageing of *Penicillium chrysogenum* cultures under carbon starvation I: morphological changes and secondary metabolite production. *Biotechnol Appl Biochem* 25, 81-86.

Pusztahelyi, T., Molnár, Zs., Emri T., Klement, É., Miskei, M., Kekégyártó, J., Balla, J., Pócsi, I. (2006) Comparative studies on differential expression of chitinolytic enzymes encoded by *chiA*, *chiB*, *chiC* and *nagA* genes in *Aspergillus nidulans*. *Folia Microbiol* 51, 547-554.

Shin, K.S., Kwon, N.J., Kim, Y.H., Park, H.S., Kwon, G.S., Yu, J.H. (2009) Differential roles of the ChiB chitinase in autolysis and cell death of *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot Cell* 8, 738-746.

Royall, J.A., Ischiropoulos, H. (1993) Evaluation of 2',7'-dichlorofluorescein and dihydrorhodamine 123 as fluorescent probes for intracellular H₂O₂ in cultured endothelial cells. *Arch Biochem Biophys* 302,348-355.

Tomarelli, R.M., Charney, J., Harding, M.L. (1949) The use of azoalbumin as a substrate in the colorimetric determination of peptic and tryptic activity. *J Lab Clin Med* 34, 428-433.

vanKuyk, P.A., Cheetham, B.F., Katz, M.E. (2000) Analysis of two *Aspergillus nidulans* genes encoding extracellular proteases. *Fungal Genet Biol* 29, 201-210.

White, S., McIntyre, M., Berry, D. R., McNeil, B. (2002). The autolysis of industrial filamentous fungi. *Crit Rev Biotechnol* 22, 1–14.

10. Publikációk/ Publications

Az értekezés alapjául szolgáló tudományos közlemények/ List of publications related to the subject of the dissertation

1) Emri, T., **Szilágyi, M.**, László, K., Hamvas, M., Pócsi, I. (2009) PepJ is a new extracellular proteinase of *Aspergillus nidulans*. *Folia Microbiologica* 54, 105-109. IF: 0,978

2) **Szilágyi, M.**, Kwon, N-J., Dorogi, Cs., Pócsi, I., Yu, J-H., Emri, T. (2010) The extracellular β -1,3-endoglucanase EngA is involved in autolysis of *Aspergillus nidulans*. *Journal of Applied Microbiology* 109, 1498-1508. IF: 2,365

3) **Szilágyi, M.**, Kwon, N-J, Bakti, F., M-Hamvas, M., Jámbrik, K., Park, H.S., Pócsi, I., Yu, J-H., Emri, T. (2011) Extracellular proteinase formation in carbon starving *Aspergillus nidulans* cultures – physiological function and regulation. *Journal of Basic Microbiology* 51, 625-634. IF: 1,395

4) **Szilágyi, M.**, Anton, F., Forgács, K., Yu, J-H., Pócsi, I., Emri, T. (2012) Antifungal activity of extracellular hydrolases produced by autolysing *Aspergillus nidulans* cultures. *Journal of Microbiology* közlésre elfogadva DOI 10.1007/s12275-012-2001-0 IF: 1,266

Az értekezés alapjául szolgáló, közlésre előkészített tudományos közlemények/ List of publications ready for submission related to the subject of the dissertation

1) **Szilágyi, M.**, Miskei, M., Karányi, Zs., Lenkey, B., Pócsi, I., Emri, T. (2012) Transcriptional changes induced by carbon starvation in *Aspergillus nidulans*. közlésre előkészítve

Egyéb közlemények/ Other publications

1) Emri, T., Molnár, Zs., **Szilágyi, M.**, Pócsi, I. (2008) Regulation of autolysis in *Aspergillus nidulans*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 151, 211-220. IF: 1,040

2) Emri, T., **Szilágyi, M.**, Justyák, A., Pócsi, I. (2008) Heterotrimeric G protein mediated regulation of proteinase production in *Aspergillus nidulans*. *ACTA Microbiologica et Immunologica Hungarica* 55, 111-117.

3) **Szilágyi, M.**, Pócsi, I., Forgács, K., Emri, T. (2010) MeaB dependent nutrition sensing regulates autolysis in carbon starving *Aspergillus nidulans* cultures. *Indian Journal of Microbiology* 50, 104-108. IF: 0,938

Az értekezés témakörében elhangzott előadások és poszterek/ Presentations and posters related to the subject of the dissertation

1) **Szilágyi, M.**, Kwon, N-J., Dorogi, Cs., Pócsi, I., Yu, J-H., Emri, T. (2010) Autolysis and extracellular glucanase production in *Aspergillus nidulans*. A Magyar Mikrobiológiai Társaság 2010. évi Naggyűlése, Keszthely.

2) Pócsi, I., Emri, T., Kwon, N-J., **Szilágyi, M.**, Bakti, F., Pusztahelyi, T., Park, H.S., Leiter, É., Yu, J-H (2011) Regulation of autolytic hydrolase production in *Aspergillus nidulans*. 26th Fungal Genetics Conference, Asilomar, USA.

3) **Szilágyi, M.**, Bakti, F., Anton, F., Dorogi, Cs., Pócsi, I., Emri, T. (2012) Autolytic hydrolases of *Aspergillus nidulans*. *Mikológiai közlemények Clusiana* 51, 33-35. V Hungarian Conference of Mycology, Budapest, Hungary.

4) Emri, T., **Szilágyi, M.**, Szarvas, V., Miskei, M., Karányi, Zs., Pócsi, I. (2012) Transcriptional changes induced by carbon starvation in *Aspergillus nidulans*. *Mikológiai közlemények Clusiana* 51, 31-32. V Hungarian Conference of Mycology, Budapest, Hungary.

Egyéb előadások, poszterek/ Other publications, posters

1) Emri, T., Molnár, Zs., **Szilágyi, M.**, Justyák, A., Pusztahelyi, T., Pócsi, I. (2007) Regulation of the extracellular chitinases and proteinases in autolysing *Aspergillus nidulans* cultures. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* 54, 28. 15th International Congress of the Hungarian Society for Microbiology, Budapest, Hungary.

- 2) Emri, T., Molnár, Zs., **Szilágyi, M.**, Pócsi, I. (2007) Regulation of autolysis in *Aspergillus nidulans*. NHBT-2007, Trivandrum, India.
- 3) **Szilágyi, M.**, Emri, T., Pócsi, I. (2008) MeaB dependent regulation of autolysis in *Aspergillus nidulans*. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* 55, 249. IV Hungarian Conference of Mycology, Debrecen, Hungary.
- 4) Emri, T., **Szilágyi, M.**, Justyák, A., Pócsi, I. (2008) Heterotrimeric G protein mediated regulation of proteinase production in *Aspergillus nidulans*. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* 55, 111-118. IV Hungarian Conference of Mycology, Debrecen, Hungary.
- 5) Emri, T., Tóth, V., Spicz Müller, Zs., Vasas, G., **Szilágyi, M.**, Pócsi, I. (2009) Glutathione metabolism of carbon starving *Aspergillus nidulans* cultures. *Acta Microbiologica and Immunologica Hungarica* 56, 143. 2nd Central European Forum for Microbiology, Keszthely, Hungary.
- 6) Tóth, V., Spitzmüller, Zs., Vasas, G., **Szilágyi, M.**, Pócsi, I., Emri, T. (2011) Production of glutaminase A by *Aspergillus nidulans*. A Magyar Mikrobiológiai Társaság 2011. évi Naggyűlése, Budapest.