#### **DE TTK**



1949

## Az Aspergillus nidulans var. roseus ATCC 58397 törzs jellemzése, echinocandin B és szterigmatocisztin termelésének vizsgálata

Egyetemi doktori (PhD) értekezés

### Tóth Viktória

Témavezető: Dr. Emri Tamás egyetemi docens

DEBRECENI EGYETEM Természettudományi Doktori Tanács Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola Debrecen 2012 Ezen értekezést a Debreceni Egyetem Természettudományi Doktori Tanács Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola Biológia Programja keretében készítettem a Debreceni Egyetem természettudományi doktori (PhD) fokozatának elnyerése céljából.

Debrecen, 2012. október 25.

Tóth Viktória

-----

Tanúsítom, hogy Tóth Viktória doktorjelölt 2008-2011. között a fent megnevezett Doktori Iskola Biológia programjának keretében irányításommal végezte munkáját. Az értekezésben foglalt eredményekhez a jelölt önálló alkotó tevékenységével meghatározóan hozzájárult. Az értekezés elfogadását javaslom.

Debrecen, 2012. október 25.

Dr. Emri Tamás

#### Az Aspergillus nidulans var. roseus ATCC 58397 törzs jellemzése, echinocandin B és szterigmatocisztin termelésének vizsgálata

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében a Biológia tudományágban

Írta: Tóth Viktória okleveles biológus/biotechnológus

## Készült a Debreceni Egyetem Juhász-Nagy Pál doktori iskolája (Biológia programja) keretében

Témavezető: Dr. Emri Tamás

#### A doktori szigorlati bizottság:

elnök:	Prof. Dr. Borbély György	
tagok:	Dr. Szabó Judit	
	Dr. Kakuk Annamária	
ما ما معد مع	iserlet időrentis, 2012 máine 16	

A doktori szigorlat időpontja: 2012. május 16.

Az értekezés bírálói:

Dr	 	
Dr	 	
Dr	 	

#### A bírálóbizottság:

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

Az értekezés védésének időpontja: 2012.

## Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	1
2. Irodalmi áttekintés	4
2.1. Aspergillus nidulans és az Aspergillus nidulans varietas roseus	4
2.2. Polifázikus taxonómia	7
2.3. A gombák sejtfalának szerkezete	9
2.4. Az echinocandinok	16
2.5. Az echinocandinok hatásmechanizmusa; az echinocandin rezisztencia	
molekuláris háttere	20
2.6. Paradox-effektus vagy "Eagle-effektus"	25
3. Eredmények	28
3.1. Az A. nidulans var. roseus ATCC 58397 törzs polifázikus jellemzése	28
3.1.1. A növekedés hőmérséklet, szén- és nitrogénforrás függésének vizsgo	álata
	28
3.1.2. A szekunder metabolit termelés vizsgálata	30
3.1.3. Szekvencia vizsgálatok	34
3.1.4. Keresztezési vizsgálatok	38
3.2. Az A. nidulans var. roseus ATCC 58397 törzs echinocandin	
rezisztenciájának vizsgálata	41
3.2.1. Az A. nidulans var. roseus ATCC 58397 echinocandin érzékenysége	ének
meghatározása	41
3.2.2. A sejtfal homeosztázis változásainak vizsgálata	45
3.3. A tápközeg összetételének hatása az A. nidulans var. roseus szekunder	
metabolit termelésére	52
3.3.1. A tápközeg összetételének hatása az A. nidulans var. roseus	
szterigmatocisztin termelésére	52
3.3.2. A napraforgóolaj echinocandin B termelésre gyakorolt hatásának	
vizsgálata	57
3.4. A tenyésztési hőmérséklet hatása az A. nidulans var. roseus anyagcseréj	ére 59
3.5. Természetes eredetű antifungális anyagok kölcsönhatásának vizsgálata.	66
4. Eredmények megbeszélése	70
4.1. Az A. nidulans var. roseus ATCC 58397 törzs polifázikus jellemzése	70
4.2. Az A. nidulans var. roseus ATCC 58397 törzs echinocandin	
rezisztenciájának vizsgálata	73
4.3. A tápközeg összetételének hatása az A. nidulans var. roseus szekunder	
metabolit termelésére	75
4.4. A tenyésztési hőmérséklet hatása az A. nidulans var. roseus anyagcseréj	ére 78
4.5. Természetes eredetű antifungális anyagok kölcsönhatásának vizsgálata	82
5. Anyagok és módszerek	86
5.1. A vizsgált törzsek, törzsfenntartás	86
5.2. Az Aspergillus törzsek tenyésztése	88
5.2.1. A növekedés vizsgálata felületi kultúrákban	88
5.2.2. Az Aspergillus törzsek tenyésztése süllyesztett kultúrákban	88
5.2.3. A tápleves összetételének optimalizálása	89
5.2.4. Az Aspergillus törzsek keresztezése	89

5.3. Antifungális szerekkel szembeni érzékenység vizsgálata	.90
5.3.1. Az Aspergillus törzsek ECB és CAS érzékenységének meghatározása	.90
5.3.2. SDS hatásának vizsgálata	.91
5.3.3. A napraforgóolaj és paraffinolaj hatásának tesztelése makrodillúciós	
módszerrel	.91
5.3.4. Az ECB, PAF és a ChiB, EngA közötti interakció vizsgálata	.92
5.3.5. Paradox-effektus vizsgálata	.92
5.4. Analitikai vizsgálatok	.93
5.4.1. A növekedés mérése süllyesztett kultúrában	.93
5.4.2. A glükóz koncentráció mérése	.93
5.4.3. A fermentlé antifungális és antibakteriális aktivitásának meghatározás	sa
	.93
5.4.4. Vékonyréteg kromatográfiás (VRK) vizsgálatok	.94
5.5. Enzimaktivitás mérések	.95
5.5.1. A specifikus β-1,3-glükán szintáz aktivitás mérés	.95
5.5.2. A specifikus nitrát-reduktáz, kataláz és glutation reduktáz aktivitás	
mérése	.96
5.5.3. Az oxidált és redukált glutation mennyiségének meghatározása	.96
5.5.4. A sejtek peroxid tartalmának mérése	.97
5.6. A sejtfal összetételének meghatározása	.97
5.7. Parciális DNS szekvenciák meghatározása	.99
5.8. Génexpresszió vizsgálata qRT-PCR segítségével1	01
5.9. Microarray vizsgálatok	.04
5.10. Statisztikai módszerek1	.05
5.11. Felhasznált vegyszerek1	.05
6. Összefoglalás1	.06
7. Summary1	12
8. Irodalomjegyzék1	17
9. Köszönetnyilvánítás	35
10. Tudományos közlemények jegyzéke1	36

#### 1. Bevezetés

Az elmúlt évtizedekben a különböző típusú, főleg invazív mikózisok száma, jelentősen megemelkedett az AIDS fertőzöttek, hematológiai rosszindulatú daganatos betegségben szenvedők, kemoterápiás kezelés alatt álló, illetve transzplantáción átesettek és más immunszupresszált betegek között. A fertőzések hátterében gyakran az alkalmazott antifungális szerekkel szemben kialakuló rezisztencia áll, de az intravénás eszközök elterjedése, immunszuppresszív terápiák spektrumú alkalmazása. a széles antibiotikumokkal történő kezelések gyakoriságának növekedése szintén hozzájárult a gombás infekciók számának növekedéséhez. Ezen immunhiányos betegek a legtöbb esetben Candida, Aspergillus, Cryptococcus és más opportunista gombákkal fertőzöttek (Georgopapadakou 1998; Carillo-Munoz és munkatársai 2006; Rüping és munkatársai 2008). Jelenleg a gombafertőzések közel 90 %-áért Candida törzsek a felelősek (Kontoyiannis és Lewis 2002; Masouka 2004), míg De Rosa és munkatársai (2009) megfigyelései alapján a candidiasis után az aspergillozis a második leggyakoribb gombás fertőzés. Nem meglepő módon, az egészségügy részéről folyamatos és egyre növekvő igény jelentkezik új típusú antifungális szerek kifejlesztésére és előállítására.

Az Aspergillus nidulans var. roseus ATCC 58397 echinocandin B (ECB) termelése révén egy ipari jelentőségű fonalas Ascomycota gomba. Az echinocandinokat az 1970-es években fedezték fel. Jelenleg a legkeresettebb antifungális hatóanyagok közé tartoznak, mivel széles spektrumúak, alacsony toxicitásúak és felhasználhatóak azol-rezisztens *Candida* fertőzések esetén is. Gyakran használják a *Candida* fajok által okozott betegségek (pl. oesophagealis candidiasis, invasive candidiasis és candidemia) kezelésére, sőt az echinocandinok csoportjába tartozó pneumocandin B0-ból létrehozott caspofungint sikeresen alkalmazzák a gyógyászatban aspergillosisok gyógyítására is (Gregory és munkatársai 2007). Az *A. nidulans* var. roseus ATCC 58397 törzs egyes tulajdonságait tekintve átmenetet képez az *Aspergillus nidulans (Emericella*  nidulans) és az Aspergillus rugulosus (Emericella rugulosa) fajok között (Hodges és munkatársai 1994; Klich és munkatársai 2001) és hasonlóan a többi Aspergillus "varietas"-hoz taxonómiai státusza nincs megnyugtatóan tisztázva (Geiser és munkatársai 2007; Peterson 2008). Vizsgálatainkban ezért a polifázikus taxonómia (Colwell 1970) alapelveit követve megpróbáltuk tisztázni a törzs taxonómiai hátterét. Bár az echinocandin típusú antifungális szerekkel szembeni rezisztencia ma még viszonylag ritka, hiszen egy új termékcsaládról van szó, a rezisztens törzsek száma a közeljövőben várhatóan növekedni fog. Vizsgálataink egyik célja ezért az A. nidulans var. roseus ECB-vel szembeni rezisztenciájának megismerése volt. Ezen eredmények hozzásegíthetnek az Aspergillus törzsek echinocandin rezisztenciájának megértéséhez, a rezisztens törzsek elleni hatékony védekezés kidolgozásához és elterjedésük megakadályozásához. A termelő törzs echinocandin hatóanyagokkal szemben mutatott rezisztenciájának megértése gyakorlati szempontból is jelentős lehet, hiszen értékes információkat szolgáltathat jól termelő ipari törzsek kifejlesztéséhez is. Vizsgálataink harmadik részében az ECB képződésének fiziológiai hátterét tanulmányoztuk és igyekeztünk olyan adatokat gyűjteni az A. nidulans var. roseus szekunder metabolit termelésével kapcsolatban melyek a későbbiek során felhasználhatóak lesznek a törzs, illetve a fermentációs technika ipari fejlesztésében is.

A fentiek alapján az alábbi kísérletek elvégzését terveztük:

1. Az *A. nidulans* var. *roseus* ATCC 58397 törzs növekedésének, szénforrás hasznosító képességének és szekunder metabolit termelésének összehasonlítása az *A. nidulans* és az *A. rugulosus* fajok törzseivel.

2. Az *A. nidulans* var. *roseus* ATCC 58397 törzs kalmodulin,  $\beta$ -tubulin és  $\gamma$ -aktin génjének részleges szekvenálása, a szekvencia adatok filogenetikai elemzése. Az *A. nidulans* var. *roseus* ATCC 58397 törzs *A. nidulans* törzsekkel történő szexuális/paraszexuális keresztezhetőségének vizsgálata.

3. Az *A. nidulans* var. *roseus* ATCC 58397 törzs ECB és caspofungin (CAS) érzékenységének meghatározása és összehasonlítása az ECB-t nem termelő *A. nidulans* FGSC A4 törzsével.

2

4. A sejtfal összetételének, a sejtfal szintézisében résztvevő gének transzkripciójának, a  $\beta$ -1,3-glükán szintáz specifikus aktivitásának, valamint a Nadodecil-szulfát (SDS) növekedés gátló hatásának vizsgálata ECB jelenlétében és hiányában az *A. nidulans* var. *roseus* ATCC 58397 és az *A. nidulans* FGSC A4 törzsek esetében.

5. Az ECB és az ECB mellett képződő legfontosabb melléktermék a szterigmatocisztin (ST) (Hodges és munkatársai 1994) képződését befolyásoló fermentációs paraméterek vizsgálata; a nitrogénforrás és a napraforgóolaj szekunder metabolit termelésre gyakorolt hatásának vizsgálata.

6. Az *A. nidulans* var. *roseus* ATCC 58397 ECB termelő és ECB nem termelő tenyészetei transzkriptomának összehasonlítása.

7. A gombák sejtfal homeosztázisát befolyásoló néhány antifungális anyag – a sejtfalszintézist gátló ECB (Walker és munkatársai 2010), a *Penicillium chrysogenum* kis moltömegű antifungális fehérjéje (PAF, Hegedűs és munkatársai 2011), valamint az *A. nidulans* eredetű extracelluláris ChiB kitináz és EngA  $\beta$ -1,3-glükanáz (Szilágyi és munkatársai 2012) – közötti kölcsönhatás vizsgálata.

#### 2. Irodalmi áttekintés

#### 2.1. Aspergillus nidulans és az Aspergillus nidulans varietas roseus

Az A. nidulans (Emericella nidulans) az Ascomycota törzs, Plectomycetes osztály, Eurotiales rendjének Trichocomaceae családjába tartozik. Jelenleg az Aspergillus nemzetségbe több, mint 250 fajt sorolnak és az újonnan azonosított fajok száma napjainkban is emelkedik (Geiser és munkatársai 2008). Az Aspergillus nemzetségbe tartozó fajok monofiletikus eredetűek (Geiser és munkatársai 2008) és szekvencia adatok alapján (kalmodulin, RNS polimeráz 2 és rRNS) számos alnemzetségbe (subgenus) és ezen belül fajcsoportba (sectio) sorolhatóak: Aspergillus (Aspergillus és Restricti fajcsoport), Fumigati (Fumigati, Clavati és Cervini fajcsoport), Circumdati (Circumdati, Nigri, Flavi és Cremei fajcsoport), Candidi (Candidi fajcsoport), Terrei (Terrei és Flavipedes), Nidulantes (Nidulantes, Usti és Sparsi fajcsoport), Warcupi (Warcupi és Zonati fajcsoport) és Ornati (Ornati fajcsoport) (Masayuki és Katsuya 2010). Így, az A. nidulans a Nidulantes alnemzetségen belül a Nidulantes sectio tagja és közeli rokona - többek között - az E. rugulosa, E. quadrilineata, E. striata és E. echinulata fajoknak.

Az A. nidulans szaprofita gomba, az egész világon elterjed, többnyire a talajban, illetve növényi maradványokon fordul elő. A takarmányozásra szánt széna, illetve az alomként használt szalma jellemző faja (Anzai és munkatársai 2000). Gyengén patogén faj, emberi körömről, másodlagos fertőzésekből is izolálták már, sőt Bridges-Good szindrómában szenvedő betegeknél bizonyítottan tüdő aspergillozist is okozhat (Fasatiová 1984; Segal és munkatársai 1998). Lovaknál a légzsák ("guttural pouch") gombás fertőzésének egyik leggyakoribb kórokozója (Anzai és munkatársai 2000).

Sima és bársonyos felületű, a termelt konídiumoknak köszönhetően sötétzöldes színezetű, egyenletes szélű telepeire mérsékelten gyors növekedés jellemző (szobahőmérsékleten a telepek átmérője a 10. napon 3,5-4,0 cm közötti). A biszeriát típusú konidiofórok barnás színezetűek. A klesztotéciumok vörös színűek,

falukat Hülle-sejtek borítják. Az aszkospórák lila színűek és sima falúak (Gugnani 2003).

Az *A. nidulans* ideális modellorganizmus. Szexuális és paraszexuális életciklusa laboratóriumi körülmények között is jól indukálható, teljes genom szekvenciája ismert, számos adatbázis, génkönyvtár, vektor, illetve mutáns segíti a vele való munkát, sőt *A. nidulans*ra kidolgozott DNS chip-ek is elérhetőek. Penicillin és szterigmatocisztin termelése révén felhasználható a β-laktám típusú antibiotikumok (Brakhage 1998), valamint a mikotoxinok (Shimizu és Keller 2001) képződésének tanulmányozásában, de emberi örökletes metabolikus betegségek, pl. I-es típusú örökletes tyrosinaemia, alkaptonuria molekuláris biológiai hátterének felderítésére is sikerrel alkalmazták (Fernandez-Canon és Penalva 1995).

Az A. nidulans var. roseus ATCC 58397 törzset (NRRL 11440) Boeck és Kastner (1981) gyapottermő földek (Greenfield, Indiana) talajából izolálták, olyan területen végzett földmérések alkalmával, ahol az aflatoxin jelenléte krónikus probléma volt. Telepei világos zöldessárga színezetűek a pigmentált konidiumoknak köszönhetően. A telepek alakja konvex, kezdetben bársonyos, némileg pelyhes megjelenésű, azonban idővel a telep szélei fogazottá, kissé karéjossá válnak, továbbá a pigmentáció változása miatt a telep zónás hatást kelt (1. ábra). Növekedése szobahőmérsékleten meglehetősen lassú (a telepek átmérője a 21. napon csupán 3,5 cm). A biszeriát típusú konidiofórok világos barna színűek. A telep szélein szétszórtan, a közepe fele pedig kisebb csoportokban feketés bordó színezetű kleisztotéciumok figyelhetők meg, melyek falát Hülle-sejtek borítják. A lila színű aszkospóráik vastag falúak és felszínük sima.

Egyes tulajdonságait tekintve *A. nidulans* var. *roseus* átmenetet képez az *A. nidulans* és az *A. rugulosus* között: az *A. nidulans*hoz hasonlóan simafalú aszkospórákat termel, de növekedése *A. rugulosus*ra jellemző módon lassú szobahőmérsékleten (1-2. ábra). Szekunder metabolit spektruma alapján szintén sokkal jobban hasonlít az *A. rugulosus*hoz, mint az *A. nidulans*hoz (Hodges és munkatársai 1994; Klich és munkatársai 2001). Az *Aspergillus* nemzetségen belül számos "alfaj" ismert, többek között az *A. niger* var. *taxi*, *A. nidulans* var. *dentatus*,

*A. fumigatus* var. *fumigatus*, *A. fumigatus* var. *ellipticus*, *A. fumigatus* var. *albus* (Dhanwant és Sandhu 1963; Wang és munkatársai 2000; Zhao és munkatársai 2009), ezek az *A. nidulans* var. *roseus*hoz hasonlóan átmenetet képeznek ismert fajok között, rendszertani státuszuk nincs megnyugtatóan tisztázva és így hivatalosan elfogadott nevük sincs (Geiser és munkatársai 2007; Peterson 2008).

Az A. nidulans var. roseus gyakorlati jelentőségét az általa termelt antifungális hatású echinocandin B-nek (ECB) köszönheti, ami az anidulafungin, valamint a cilofungin néven forgalmazott félszintetikus antifungális hatóanyagok alapanyaga. Az ECB mellett, az aflatoxinnal kémiailag rokon teratogén, mutagén és karcinogén hatású mikotoxin, a szterigmatocisztin (ST) termelése jellemzi a törzset, mely jelenléte komoly gondot okoz az ECB ipari előállításánál is (Huang és munkatársai 1990; Hodges és munkatársai 1994).



1. ábra Az A. nidulans var. roseus ATCC 58397 (A, C) és az A. nidulans FGSC A4 (B, D) telep morfológiája minimál tápagaron. A fotók a tenyésztés 6. napján készültek. Az A és B tenyészetek 24 °C-on, míg a C és D tenyészetek 37 °C-on voltak inkubálva.



2. ábra Az Aspergillus nidulans (A) és az Aspergillus rugulosus (B) aszkospóráinak scanning elektronmikroszkópos képe. (forrás: Klich és munkatársai 2001)

#### 2.2. Polifázikus taxonómia

A gombák rendszerezésekor leggyakrabban a morfológiai (fenotipusos), a filogenetikai és egyes esetekben a biológiai fajfogalmat használják (Mayden 1997; Taylor és munkatársai 2000). A morfológiai fajfogalom (Hey 2001; Tibayrenc 2006) elsősorban a gombák mikro- és makromorfológiai bélyegein, illetve növekedésük jellemzésén alapul. Aspergillusok esetében a gyakran vizsgált bélyegek közül említést érdemel a spórák mérete, alakja, színe, a konidiofórok mérete, felépítése, pigmentáltsága, a kleisztotéciumok és aszkospórák felépítése, valamint a növekedés hőmérséklet-függése. Az Aspergillus fajok többségét ezen fajfogalom alapján írták le és rendszerezték évtizedekkel ezelőtt (Raper és Fennell 1965). A morfológiai fajfogalom alkalmazásának hátrányai közül kiemelendő, hogy nem követi (minden esetben) a fajok filogenetikai kapcsolatát (azaz mesterséges rendszer) és az átmeneti tulajdonságokat mutató izolátumok esetében a végeredmény nagymértékben függ attól, hogy mely tulajdonságot, milyen súllyal veszik figyelembe. A biológiai fajfogalom azon populációkat tekinti egy fajhoz tartozónak, melyek egymással természetes körülmények között szexuális úton szaporodni, kereszteződni képesek és a keletkezett utódok életképesek és fertilisek (Dobzhansky 1937; Wilson 1992). Gombák esetében ez a megközelítés elsősorban azon heterotallikus fajoknál

alkalmazható, melyek életciklusa során az ivaros szaporodás dominál. Az Aspergillusok esetében az Emericella heterothallica és a Neosartorya fennelliae, mint heterotallikus fajok leírásánál használták ezen fajfogalmat (Raper és Fennell 1965; Kwon-Chung és Kim 1974). A filogenetikai fajfogalom alapján a faj azon populációik csoportja melyek azonos és egyedi fejlődéstörténeten osztoznak. A törzsek közötti rokonsági kapcsolatokat szekvencia adatok alapján határozzák meg (Taylor és munkatársai 2000). E szekvencia adatok nem csak a vizsgált izolátumok filogenetikai kapcsolatának feltárására és ezen keresztül taxonomizálására használhatóak, de lehetővé teszik gyors és egyszerű identifikálásukat is. A vizsgált DNS markereknek sok kritériumnak kell (kellene) megfelelniük: A DNS szakasz ortológjainak jelen kell lennie a vizsgált taxon minden egyedében és megfelelő mértékű variábilitást kell mutatnia, hogy fajok közötti különbségek kimutatására is alkalmas legyen. Szintén előnyös, ha PCR-ben univerzálisan használható primer párok segítségével bármely vizsgált izolátumból könnyen felszaporíthatóak. Sokszor előnyt jelent az is, ha csak egy kópiában vannak jelen a genomban (Hebert és munkatársai 2003; Geiser és munkatársai 2007). Gombák esetében gyakran használt markerek az intergenic transcribed spacer (ITS) szekvenciák, a parciális kalmodulin,  $\beta$ -tubulin,  $\gamma$ -aktin, mitokondriális citokróm C oxidáz 1, 70 kDa hősokk fehérje, transzlációs iniciációs faktor 2, transzlációs elongációs faktor 1a génszekvenciák, valamint a piruvát kináz, piruvát karboxiláz, RNS polimeráz II gének parciális szekvenciái is (Summerell és munkatársai 2003; Geiser és munkatársai 2007; Peterson 2008; Samson és Varga 2009). Általános szabály, hogy legalább kettő, de sokszor akár 3-4 gént is vizsgálnak párhuzamosan (Geiser és munkatársai 2007; Peterson 2008). Az Aspergillusok esetében az ITS szekvenciák mellett a parciális kalmodulin és/vagy a β-tubulin szekvenciák vizsgálata a legelterjedtebb. Az ITS szekvenciák az egyes sectio-k közötti különbségek, míg a kalmodulin és β-tubulin szekvenciák a fajok közötti különbségek kimutatására is alkalmasak (White és munkatársai 1990; Bruns és munkatársai 1991; Bruns 2001; Geiser és munkatársai 2007).

A polifázikus taxonómia kifejezést Colwell (1970) használta először 1970ben. Colwell (1970) összesen 86 baktérium izolátumot, köztük 30 *Vibrio cholerae*, 35 V. parahaemolyticus és 21 további Pseudomonas, Spirillum, Achromobacter, Arthrobacter és tengeri Vibrio törzset vizsgált meg. Tesztelte valamennyi izolátum morfológiai, fiziológiai és biokémiai tulajdonságát és ezeket összegezve meglepően eredményesen tudta taxonomizálni a törzseket. Colwell munkája nyomán a polifázikus taxonómia alapelve, hogy többféle taxonómiai módszert ötvözve próbálja meghatározni a vizsgált izolátumok rendszertani státuszát (Vandemma és munkatársai 1996; Rossello-Mora R 2003; Uilenberg és Goff 2006). Ma már a klasszikus morfológiai és fiziológiai bélyegek mellett, a szekvencia adatokat és különösen a gombák esetében a szekunder metabolit spektrumot (Samson és munkatársai 2007) használják fel a törzsek taxonomiai státuszának tisztázására (Uilenberg és Goff 2006; Samson és Varga 2009).

#### 2.3. A gombák sejtfalának szerkezete

A gomba sejtfal egy multifunkcionális és igen komplex struktúra. Biztosítja a sejt mechanikai szilárdságát, segít fenntartani a sejt alakját és integritását, védelmet nyújt az ozmózisnyomással szemben. Egyfajta védőgátként funkcionálva megakadályozza számos hidrolitikus és toxikus molekula bejutását a sejtekbe, ugyanakkor, mint dinamikus struktúra lehetővé teszi a sejtek alakjának, morfológiájának megváltozását, megtartja a sejt megfelelő plaszticitását és lehetővé teszi a sejtek interakcióját a környezetével és biztosítja a biotikus, illetve abiotikus felületekhez történő adhézióját (Latgé 2007; de Groot és munkatársai 2009). Nem meglepő módon a gombasejtfal struktúrájában történő változások jelentős hatással vannak a gomba növekedésére és gyakran a sejtek lízisét, halálát okozzák (Bowman és Free 2006). A gombasejtfal felépítése, összetétele, a komponensek egymáshoz viszonyított aránya fajtól, életciklustól és akár a tenyésztési körülményektől függően igen eltérő lehet (Bowman és Free 2006). A gombasejtfal legfontosabb összetevői a kitin, a  $\beta$ -glükánok, az  $\alpha$ -glükánok és a sejtfal fehérjék.

A gombák sejtfalának kitin komponense β-1,4 kötésekkel összekapcsolódó N-acetil-D-glükózamin molekulákból felépülő, hosszú lineáris homopolimer. Általában a glükánokhoz képest csak kisebb mennyiségben fordul elő a sejtfalban, de alapvetően meghatározza annak szilárdságát (Bowman és Free 2006). Az Ascomycota élesztők (pl. *Saccharomyces cerevisiae*) sejtfalának szárazanyag tartalmát csupán 1-2 % kitin alkotja (Klis 1994; Klis és munkatársai 2002), ezzel szemben a fonalas Ascomycoták sejtfalában 10-20 % között változik a kitin részaránya (De Nobel és munkatársai 2000; Bartnicki-Garcia 1968). A Zygomycota fajok sejtfala (pl. *Mucor rouxii*) a kitin mellett jelentős mennyiségű kitozánt (Dglükózamin egységekből,  $\beta$ -1,4-kötéssel felépülő polimer) is tartalmaz, amely a sejtfal szárazanyag tartalmának akár 30 %-át is kiteheti (Arcidiacono és Kaplan 1992). A kitin elemek hidrogén-kötésekkel stabilizált mikrofibrillumokká rendeződve a plazmamembránhoz közel helyezkednek el az élesztők és a fonalas gombák sejtfalában egyaránt (3. ábra).



3. ábra A gombák sejtfalfelépítésének egyszerűsített vázlata. Az ábra a sejtfal komponensek térbeli elrendeződését szemlélteti; az egyes komponensek aránya fajtól függően változhat (forrás: Gow és munkatársai 2012).

A gombák sejtfalának fő alkotóelemei a glükánok. Az Ascomycota élesztők esetében a sejtfal szárazanyag tartalmának 80-90 %-át, a fonalas Ascomycoták esetében 50-60 %-át adják. A glükánok zömét (65-90 %) a  $\beta$ -1,3-glükánok teszik ki, a maradékot egyéb glükánok, többek között  $\beta$ -1,6-,  $\beta$ -1,3/1,4-,  $\alpha$ -1,3, illetve  $\alpha$ -1,4 kötéssel kapcsolódó glükánok keveréke alkotja (Bernard és Latgé 2001; Klis és munkatársai 2001; Grun és munkatásai 2005). A legtöbb gomba esetében az elágazó  $\beta$ -1,3-glükánok (az elágazások  $\beta$ -1,6-kötésekkel jönnek létre) alakítják ki a sejtfal

alapvázát. Nem redukáló végükhöz  $\beta$ -1,4 kötéssel kapcsolódnak a kitin elemek de kovalens kapcsolatban vannak a mannoproteinek oligoszacharid oldalláncaival és a  $\beta$ -1,3/1,4-, illetve  $\beta$ -1,6-glükánokkal is (2. ábra; Fontaine és munkatársai 2000; Latgé 2007). A  $\beta$ -1,6-glükán polimerek a  $\beta$ -1,3-glükánoknál sokkal rövidebbek. Egyfajta ragasztóként működve kovalens keresztkötéseket alakítanak ki a sejtfal többi komponensével, a  $\beta$ -1,3-glükánokkal, a kitinnel és a mannoproteinek oligoszacharid oldalláncaival (Kollar és munkatársai 1997). A *S. cerevisiae* vegetatív sejtjeiben a  $\beta$ -1,6-glükánok a sejtfalpoliszacharidok mintegy 12 %-át alkotják (Lesage és Bussey 2006). A legújabb tanulmányok alapján ugyanakkor egyes fonalas gombák sejtfala, többek között a *Neurospora crassa* és az *A. fumigatus* törzseké, nem tartalmaz  $\beta$ -1,6-glükán alkotóelemet (Bowman és Free 2006), más fajok esetében (pl. *A. niger* és *Fusarium oxysporium*) viszont megtalálható e sejtfal poliszacharid (Brul és munkatársai 1997).

A sejtfal poliszacharid vázát fehérjék hálózata szövi át (3. ábra). A fehérjék az Ascomycota fonalas gombák sejtfal szárazanyag tartalmának 20-30 %-át teszik ki, míg a *S. cerevisiae* és *C. albicans* (Ascomycota élesztők) sejtfalának szárazanyag tartalmában ez az arány magasabb, 30-50 % között változik (Fleet 1991; Brown és Catley 1992; Bowman és Free 2006). A legtöbb sejtfalfehérje N- és O-oligoszacharid oldalláncokkal is rendelkezik. Ezen oligoszacharid láncok fajtól függően igen eltérő szerkezetűek. A *Neurospora crassa* és az *A. fumigatus* törzsek sejtfalára a mannózból és galaktózból felépülő galaktomannán struktúrák jelenléte jellemző (Nakajima és munkatársai I, II, 1984; Latgé és munkatársai 1994), míg a *S. cerevisiae* és *C. albicans* sejtfalában nagy mannóz-tartalmú mannoproteinek figyelhetőek meg (Fleet 1991; Brown és Catley 1992). A fehérjék a sejtfal plazmamembránhoz való kapcsolódását is biztosítják (Bowman és Free 2006). A sejtfalproteinek szerkezetűk alapján az alábbi csoportba sorolhatóak (de Groot és munkatársai 2009):

1. GPI-horgonnyal rendelkező sejtfal fehérjék (a GPI-horgonyuk révén a plazmamembránhoz kapcsolódnak, míg oligoszacharid oldalláncaik glikozidos kötéssel a sejtfal poliszaccharidokkal vannak kovalens kapcsolatban).

2. Pir fehérjék (proteins with internal repeats; ezen sejtfal fehérjék észter kötéssel kapcsolódnak a  $\beta$ -1,3-glükán hidroxil-csoportjaihoz és enyhe lúgos kezeléssel eltávolíthatóak a sejtfalból) (Ecker és munkatársai 2006).

3. Pir szekvenciát nem tartalmazó, a sejtfalból enyhe lúgos kezeléssel kimosható fehérjék.

4. Diszulfid kötött sejtfalfehérjék.

5. Hidrofobinok (ciszteinben gazdag fehérjék, melyek a sejtfal hidrofób felszínének kialakításához szükségesek; igen jellemzőek a konidiumok, spórák és léghifák sejtfalára (Wösten 2001).

Fonalas gombákban az intenzív sejtfal szintézis elsősorban (de nem kizárólagosan; Read 2011) a hifacsúcsokban történik, míg az élesztők esetében a sejt teljes felületén egyenletesen folyik. A sejtfal szintézis során az endoplazmatikus retikulum (ER) hálózatos rendszeréről, illetve a Golgi-apparátusról lefűződő vezikulumok meghatározó szerepet játszanak, mivel ezek szállítják a sejtfal építőelemeit és számos, a sejtfalszintézishez nélkülözhetetlen enzimet a plazmamembránhoz (Bowman és Free 2006).

A kitin szintéziséért felelős kitin szintázok a plazmamembránban helyezkednek el. E fehérje komplexek kapcsolják össze (UDP felszabadulás közben) az UDP-N-acetilglükózamin (aktivált) monomereket poli-N-acetilglükózaminná, azaz kitinné. A kitin lánc, növekedésével párhuzamosan az extracelluláris térbe kerül. Itt alakulnak ki a keresztkötések a többi sejtfal polimerrel és itt rendeződnek a kitin láncok a plazmamembránnal párhuzamosan futó mikrofibrillumokká (Bowman és Free 2006). A *S. cerevisiae* genomjában három kitin szintáz gént azonosítottak (Chs1, Chs2, Chs3) (Roncero 2002). A Chs3p kitin-szintáz felelős a teljes kitin tartalom körülbelül 80-90%-nak a szintéziséért, beleértve a sarj sejtek leválásakor kialakuló kitin gyűrűt is (Valdivieso és munkatársai 1991; Bulawa 1992). A Chs2p az osztódó élesztő sejtek primer szeptumában lévő kitin szintéziséért felelős, míg a Chs1p feladata a citokinézis után a sejtfal kitin polimereinek helyreállítása (Shaw és munkatársai 1991; Silverman és munkatársai 1988). Az *A. nidulans* fonalas gomba genomjában nyolc kitin-szintázt kódoló gén (*chsA-chsD*, *chsF*, *chsG*, *csmA*, *csmB*) található, melyek közül négy gén funkcióját vizsgálták. A chsA gén inaktiválása kis mértékben ugyan, de csökkenti a sejtek konidiumképzését (Chinomiya és munkatársai 2005; Culp és munkatársai 2000). A AchsB mutánsok sűrűn elágazó hifákból álló, kisméretű kolóniákat képeznek, ami a ChsB vegetatív növekedésben betöltött jelentőségére utal (Borgia és munkatársai 1996). A CsmA és CsmB kitin szintázok N-terminális végükön miozin motor-szerű doméneket tartalmaznak. Ezen motor fehérjék az aktin szálakhoz kötődnek, ezáltal közvetlen kapcsolat alakul ki az aktin citoszkeleton és a sejtfalszintézis között. A csmA vagy csmB deléciós mutánsok "intrahifális hifákat" (intrahyphal hypha) képeznek, melyek általában az öregebb hifákon alakulnak ki. Ezek a jellegzetes léggömbökre emlékeztető morfológiájú hifa elemek a szeptumokból alakulnak ki a szeptum pórusainak záródását követően (Jedd és Chua 2000), így feltételezhető, hogy a CsmA és a CsmB a szeptumok kitin tartalmának szintézisért felelősek. A csmB deléciója az "intrahifális hifák" képződése mellett konidiofórok differenciációjának zavarát is okozta. A csmA és csmB gének jelentőségére utal, hogy együttes deléciójuk letális hatású (Takeshita és munkatársai 2005, 2006; Horiuchi 2009).

A  $\beta$ -1,3-glükán polimerek szintézisét, a kitin szintézishez hasonlóan, egy a plazmamembránhoz kötött enzim komplex, a  $\beta$ -1,3-glükán-szintáz komplex végzi, amely a citoplazmában képződő UDP-glükóz molekulákat (aktivált monomerek) kapcsolja össze  $\beta$ -1,3 kötéssel az UDP felszabadulása közben. A szintetizálódó  $\beta$ -1,3-glükán láncok a membránon keresztül az extracelluláris térbe továbbítódnak, feltehetőleg itt alakulnak ki ( $\beta$ -1,6-transzglükozidázok segítségével) az oldalelágazások és azok a kötések is, melyek a többi sejtfalalkotóval való kapcsolatot biztosítják (Fontaine és munkatársai 1997; 2000; Douglas 2001, Bowman és Free 2006). A *S. cerevisiae* esetében a  $\beta$ -1,3-glükán-szintáz két katalitikus alegységből (FKS1 és FKS2) és egy szabályozó fehérjéből (Rho1) áll. Az *fks1*, vagy az *fks2* alegységek inaktiválása az élesztő sejtek lassú növekedést és a sejtfalstruktúra megváltozását eredményezi. A két alegység egyidejű deléciója letális hatású (Qadota és munkatársai 1996; Douglas és munkatársai 1994; Mazur és munkatársai 1995). Az *A. nidulans* genomja, hasonlóan a többi ismert *Aspergillus* 

genomhoz csak egyetlen  $\beta$ -1,3-glükán szintáz katalitikus alegységet kódoló gént (*fks1/fksA*) tartalmaz (Bernard és Latgé 2001).

A *S. cerevisae*  $\beta$ -1,6-glükán szintézisről keveset tudunk. Nem ismert, hogy a fehérjék N- és O-glikozidos oldalláncaihoz hasonló módon az ER-ban és/vagy a Golgi-ban szintetizálódnak, vagy a  $\beta$ -1,3-glükánokhoz és kitinhez hasonlóan a sejt felszínén történik a szintézisük (Lesage és Bussey 2006).

A *S. cerevisiae* sejtfalából hiányzik az  $\alpha$ -1,3-glükán sejtfal polimer (de Groot és munkatársai 2009). Az  $\alpha$ -1,3-glükán szintézisben az *A. nidulans* esetben 2 (*agsA, agsB*) gén vesz részt, melyek az  $\alpha$ -1,3-glükán szintáz komplex feltételezett katalitikus alegységeit kódolják (Borgia és Dodge 1992; Fujioka és munkatársai 2007; de Groot és munkatársai 2009). Az *ags1* és *ags2* gének delécója *A. fumigatus* esetében megváltozott hifa morfológiát és csökkent konidiációt eredményezett, azonban csak az *ags1* mutációja okozott 50 %-os  $\alpha$ -1,3-glükán csökkenést a vizsgált törzs sejtfalában (Beauvais és munkatársai 2001, 2005).

A sejtfalalkotó fehérjék szintézise a klasszikus módon, a durvafelszínű endoplazmatikus retikulum (ER) felszínén történik mind az élesztő, mind a fonalas gombák sejtfalában. Az N- és O-oligoszaccharid oldalláncok, valamint a GPI-horgony az ER lumenben alakul ki, majd a Golgi-apparátusban az oligoszaccharid oldalláncok tovább módosulnak.

gombák Α sejtfalszintézisének szabályozása magába foglalja а sejtfalszintézis intenzitásának a sejtciklussal való összehangolását és a sejtfal sérülések kijavítását is. Ehhez szükség van a sejtfal szintézisben résztvevő enzimek lokalizációjának szabályozására (pl. polarizált seitfal szintézis) és а sejtfalszintézisben érintett részfolyamatok (pl. kitin szintézis, β-1,3-glükán szintézis) aktivitásának összehangolására is. E szabályozási folyamatok nagyrészt nem ismertek. A legtöbb információ a S. cerevisiae sejtfalintegritás útvonaláról ("Cell Wall Integrity Pathway" - CWIP) áll rendelkezésre (4. ábra). Ezen MAP kináz útvonal feladata a sejtfalszintézis sejtciklus-függő szabályozása és a sejtfalszintézis intenzitásának fokozása a sejtfalat károsító körülmények között (Gustin és munkatársai 1998; Heinisch és munkatársai 1999; Jung és Levin 1999; Levin 2005). A CWI jelátviteli útvonal ortológ génjei az *A. nidulans* esetében is ismertek, de a sejtfalszintézis szabályozásában más, eddig még nem azonosított jelátviteli útvonalak is részt vesznek. A CWI útvonal elsősorban csak az  $\alpha$ -1,3-glükán szintézisét (*agsA*, *agsB*) befolyásolja (Fujioka és munkatársai 2007; Machida és munkatársai 2005).



#### 4. ábra A S. cerevisiae sejtfalintegritás útvonala

Az útvonal stressz-függő aktiválást - többek között - a Wsc1-3, a Mid2 és az Mtl1 transzmembrán fehérjék végzik, melyek extracelluláris doménjei a sejtfalhoz kapcsolódnak, így a sejtfal sérülései, a sejtfal szerkezetének megváltozása aktiválja őket. E receptorok a Rom1/2p guanozin nukleotid cserélő fehérjék (GEF) aktiválásával a Rho1p kis G proteint hozzák működésbe, ami a protein kináz C-n (Pkc1p) keresztül elindítja a MAP kináz kaszkádot, de aktiválja a β-1,3-glükán szintáz komplexet, a polariszómát alkotó Bni1p formin fehérjét, az exocitózist szabályozó "exocyst" fehérje komplex egyik komponensét a Sec3p-t és az Skn7 transzkripciós faktort is. A MAP kináz kaszkádot a Bck1p MAPKKK, az Mkk1-2p MAPKK és a Mpk1p MAPK alkotja. Az aktivált Mpk1p a sejtmagba jutva aktiválja az Rlm1p transzkripciós faktort és az SBF komplexet, melyek a különböző sejtfal szintetizáló gének szabályozásában vesznek részt. Az SBF a sejtciklus-függő sejtfalszintézisért felelős és biztosítja a sarjsejt képződéséhez szükséges sejtfalszintézis indukálódását a sejtciklus G1 fázisában, míg az Rlm1p a stresszfüggő (a sejtfal sérülései által kiváltott) sejtfalszintézist szabályozza. (forrás: Levin 2005)

#### 2.4. Az echinocandinok

Az echinocandinok, olyan sejtfalat károsító lipopeptidek, amelyek a  $\beta$ -1,3glükán szintáz gátlásán keresztül fejtik ki hatásukat. Az antifungális szerek ezen csoportját az 1970-es években fedezték fel. Az echinocandinok közé ma már több mint 20 természetes eredetű molekula tartozik, melyek közül a legismertebbek az echinocandin B (*A. rugulosus*), az aculeacin A $\gamma$  (*A. aculeatus*), sporiofungin A (*Aspergillus sp.*), a mulundocandin (*Aspergillus sydowi*), valamint a pneumocandin B0 (*Glarea lozoyensis, Zalerion arboricola*) (Bryskier 2005) (5. ábra). További, szintén a  $\beta$ -1,3-glükán bioszintézist gátló, az echinocandinokkal rokon antimikotikumok közül említést érdemel a papulacandin A-E (*Papularia sphaerosperma*), a saricandin, furanocandin, fusacandin A (*Fusarium sambucinum*), a chaetiacandin (*Monochaetia dimorphospora*), az enfumafungin (*Hormonema ssp.*), valamint az arundifungin (*Arthrinium arundinis*) (Bryskier 2005; Denning 2002, 2003; Perlin 2007; Onishi és munkatársai 2000).

Az echinocandinok nagy molekula tömegű - átlagosan 1200 kDa nagyságú vízoldékony ciklikus hexapeptidek, melyekhez egy zsírsavlánc kapcsolódik a (dihidroxi)-ornitin α-amino-csoportján keresztül. A gyűrű a dihidroxi-ornitin δamino csoportján keresztül záródik. A hexapeptid gyűrű fehérjealkotó aminosavak (pl. szerin, treonin) mellett, hidroxilezett és/vagy metilezett prolint és homotirozint is tartalmazhat. Egy-egy faj rendszerint többféle echinocandin változatot is termel, melyek az aminosavak hidroxil-csoportjaink számában térnek el egymástól (Kurtz és Rex 2001; Bryskier 2005). A hexapeptid gyűrűhöz kapcsolódó zsírsavlánc felépítése és konformációja jelentősen befolyásolja a molekula antifungális és hemolitikus aktivitását (Mikamo és munkatársai 2000).



5.ábra: Néhány természetes echinocandin szerkezete (forrás: www.chemicalbook.com; www.chemblink.com; www.sigmaaldrich.com)

Az A. nidulans var. roseus ECB bioszintéziséért az ecd génklaszter felelős. Az ecdA gén egy NRPS-t (nem riboszómális peptid szintázt) kódol. Az EcdA NRPS 6 modulból épül fel (mindegyik modul egy kondenzációs (C), egy adenilációs (A) és egy tiolációs (T) domaint tartalmaz) és egy extra tiolációs domainnel (T<sub>0</sub>) kezdődik, illetve egy extra kondenzációs domainnel (C<sub>T</sub>) fejeződik be, azaz T<sub>0</sub>-CAT<sub>(Orn)</sub>-CAT<sub>(Thr)</sub>-CAT<sub>(Pro)</sub>-CAT<sub>(L-homotirozin)</sub>-CAT<sub>(Thr)</sub>-CAT<sub>(L-metil-prolin)</sub>-C<sub>T</sub> szerkezetű.

A bioszintézis útvonal első lépése a lipo-iniciáció. Ebben az *ecdI* által kódolt acil-AMP ligáz vesz részt, ami a linolsavat a  $T_0$  domainre jutattja, majd azt az első kondenzációs domain kapcsolja az Orn-hez. Ezt követi a többi aminosav (Thr, Pro, L-homotirozin, Thr és L-metil-prolin) beéítése az alapvázba. A hexapaptid lánc gyűrűvé zárását a  $C_T$  domain végzi. Az aminosavak hidroxilezése feltehetőleg csak ezt követően zajlik le. Nem zárható ki természetesen, hogy az NRPS már eleve hidroxilezett aminosavakat használ szubsztrátként. Az aminosavak hidroxilezséért

vastartalmú  $\alpha$ -ketoglutarát-függő dioxigenázok és citokróm P450-függő oxigenázok lehetnek felelősek, melyek génjeit (nagyrészt) az *ecd* génklaszter (*ecdG-H*, *K*) tartalmazza.

Az ECB szintéziséhez szükséges linolsav, Thr, Pro és Orn a primer anyagcsere metabolitjai. Az L-homotirozin szintéziséért a *hty* génklaszter felelős, amely az *ecd* génklaszterrel egy kromoszómán található. E génklaszter 6 gént kódol. E gének felelősek 4-hidroxi-fenil-piruvát homotirozinná való alakításáért (htyA-D) és a homotirozin az alapváz bioszintézise előtt vagy után bekövetkező hidroxilezéséért (htyE-F) is. A L-metil-prolin feltehetőleg a Leu oxidálásával és ciklizációjával alakul ki. Az oxidációért egy vastartalmú, α-ketoglutarát-függő oxigenáz lehet felelős. Ennek génjét akár az ecd és hty génklaszter is kódolhatja. A ciklizációért felelős pirrolin-5-karboxilát reduktáz viszont biztosan nem része sem az ecd, sem a hty génklaszternek (Cacho és munkatársai 2012).

A természetes echinocandinokat magas toxicitás jellemzi, ezért a gyógyászatban félszintetikus változataikat használják (Bryskier 2005). Az első félszintetikus echinocandin az 1980-ban a bevezetésre került, az A. rugulosus által termelt echinocandin B-ből előállított cilofungin volt. Erős nefrotoxikus hatása miatt a szer alkalmazását később megszüntették. Jelenleg kereskedelmi forgalomban 3 félszintetikus lipopeptid származék, a caspofungin (2001), a micafungin (2005) és az anidulafungin (2006) kapható, melyeket a pneumocandin B0 (caspofungin), echinocandin B (anidulafungin) és a Coleophoma empedra által termelt FR901370 hexapeptid (micafungin) alapanyagokból állítanak elő (Carver 2004; Murdoch és Plosker 2004; Cancidas PI 2005) (6. ábra). Ezen félszintetikus származékokat a zsírsavlánc cseréjével (anidulfungin), a hexapeptid gyűrű módosításával (caspofungin), illetve a zsírsavlánc cseréjével és a hexapeptid gyűrű módosításával (micafungin) hozták létre. A természetes echinocandinok eredeti zsírsavláncát biokonverziós úton, az Actinoplanes utahensis hidrolázával hasítják le, majd a kapott biológiailag inaktív hexapeptidet kémiai úton (a megfelelő sav-halogenid, illetve észterek felhasználásával) acilezik (Debono és munkatársai 1989).



6. ábra Néhány félszintetikus echinocandin szerkezete (forrás: Chen és munkatársai 2011).

A félszintetikus echinocandin származékok gyógyászati felhasználásának előnye, hogy széles spektrumúak, felhasználhatóak azol-rezisztens *Candida* törzsek okozta fertőzések kezelésére, hosszú felezési idővel rendelkeznek, így elegendő naponta egyszer alkalmazni őket, toxicitásuk minimális, gyógyszer interakciók, keresztreakciók (pl. az amphotericin B-vel vagy az azolokkal) kialakulásának esélye szintén kicsi (Betts és munkatársai 2009; Pappas és munkatársai 2004). Az echinocandinok jól alkalmazhatóak a *Candida* fajok, különösen a *Candida albicans* és a *C. parapsilopsis* által pl. kórházi katétereken kialakuló biofilm képződésnek megakadályozására, de gátolják a *Candida* fajok megtapadását az epitheliális sejteken is (Bachmann és munkatársai 2002; Soustre és munkatársai 2004). Hátrányaik között meg kell említeni, hogy embriotoxikusak lehetnek. Alkalmazásuk alatt a máj működésében kisebb zavarok alakulhatnak ki, ezért a májelégtelenségben

szenvedő betegeknél csak csökkentett dózisban alkalmazhatóak. Az echinocandin készítmények orális felszívódása kedvezőtlen, ezért csak parenterálisan/intravénásan adagolhatóak (Chen és munkatársai 2011). Meningitisz, illetve a szemet érintő fertőzések leküzdésére nem alkalmasak, mert nagy molekulasúlyuk és a fehérjékhez való erős kötődésük miatt minimális a penetrációjuk a szem területén és a cerebrospinális folyadékba (Denning 2003; Chandrasekar és Sobel 2006; Vazquez és Sobel 2006). Továbbá mellékhatásként láz, hányinger, hányás, fejfájás, hasmenés, érhártyagyulladás, viszketés, bőrkiütések, vérszegénység jelentkezhet. (Gregory és munkatársai 2007; Denning 2003).

# 2.5. Az echinocandinok hatásmechanizmusa; az echinocandin rezisztencia molekuláris háttere

Az echinocandinok hatásmechanizmusának lényege, hogy nem kompetitív módon gátolják a β-1,3-glükán szintáz működését. Minthogy a β-1,3-glükán a gomba sejtfal egyik fontos szilárdító összetevője, ezért a mennyiségének csökkenése csökkenti a sejt ozmotikus stabilitását, ami végül a sejt líziséhez, pusztulásához vezet (Pfaller és munkatársai 1989; Chandrasekar és Sobel 2006; Wiederhold és Lewis 2007). Fontos megjegyezni, hogy az állati sejtek nem tartalmaznak  $\beta$ -1,3glükán-t, így őket az echinocandinok közvetlenül nem károsítják (Kurtz és Douglas 1997; Stone és munkatársai 2002; Klein és Li 1999; Deresinski és Stevens 2003; Carver 2004; Stevens és munkatársai 2006). Az echinocandinok a β-1,3-glükán szintáz katalitikus alegységéhez kötődve fejtik ki nem kompetitív gátló hatásukat. Nem egyértelmű, hogy a kötődés az alegység extracelluláris vagy intracelluláris felszínéhez történik-e (Douglas és munkatársai 1997; Odds és munkatársai 2003; Chen és munkatársai 2011, Walker és munkatársai 2010), bár Paderu és munkatársai (2004) kimutatták, hogy a caspofungin nagy affinitású facilitált diffúziós transzporterek segítségével bejut Candida törzsek sejtjeibe és а e transzportrendszerek működésének zavara hozzájárulhat a caspofungin rezisztencia kialakulásához, ami a caspofungin intracelluláris kötödését valószínűsíti.

MIC Az echinocandinok hatásának erősségét а (minimális gátlókoncentráció), illetve MFC (minimális fungicid koncentráció) mellett a MEC értékekkel jellemzik. A MEC (minimális effektív koncentráció) az a legkisebb koncentráció, ami már "jelentősen gátolja" a gomba növekedését. Fonalas gombák esetében MEC közeli koncentrációk esetén jellegzetes morfológiájú duzzadt, rövid, tömpe, összecsomósodott, sűrűn elágazó hifák (mikropelletek) figyelhetők meg a mikroszkópos felvételeken (Kurtz és munkatársai 1994; Arikan és munkatársai 2001; Espinel-Ingroff 2003; Imhof és munkatársai 2003; Odds és munkatársai 2004; Zaas és Alexander 2005; Kim és munkatársai 2007). Az echinocandinok antifungális hatása nagymértékben függ a gomba sejtfalának felépítésétől. A Zygomycoták sejtfala nem tartalmaz  $\beta$ -1,3-glükánt, így az echinocandinok hatástalanok e fajokkal szemben. Szintén hatástalanok a Fusarium, Trischosporon, Rhodotorula fajokkal, valamint a Cryptococcus neoformans, Neurospora crassa, és a Magnaporthe grisea törzsekkel szemben is, noha a sejtfaluk tartalmaz  $\beta$ -1,3-glükánt (Denning 2003; Maligie és Selitrennikoff 2005). A legtöbb élesztőre, beleértve sok humánpatogén Candida fajt is, az echinocandinok fungicid hatást fejtenek ki (Bartizal és munkatársai 1997). A micafungin MFC értéke a C. glabrata esetében 0,01-0,3 µg/ml, az anidulafungin MFC értéke 0,12-2 µg/ml, míg a caspofungin MFC értéke 0,5-8 µg/ml között változik. Az echinocandinok MFC értéke C. parapsilosis és C. guilermondii esetében átlagosan 4-8 µg/ml (Espinel-Ingroff 2003), míg a Candida albicans esetében a caspofungin MFC értéke 0,18-8 µg/ml, a micafungin MFC értéke ≤0,01-4 µg/ml, míg az anidulafungin MFC értéke 0,03-4 µg/ml (Espinel-Ingroff 2003). Az echinocandinok szintén fungicid hatásúak a Histoplasma capsulatum, Blastomyces dermatitidis, a Paracoccidioides braziliensis, Coccidioides immitis, Scedosporium sp, Paecilomyces variotii fajok esetében is. Ezen fajoknál - a Candidákhoz hasonlóan - a sejtfal fő szilárdító komponense a ß-1,3-glükán (Eschenauer és munkatársai 2007; Denning 2003). Az Aspergillus (A. fumigatus, A. flavus, A.terreus) és a Pneumocystis carinii törzsek sejtfalában a  $\beta$ -1,3-glükán mellett jelentős mennyiségű kitin is található. Feltehetőleg ezzel függ össze, hogy e törzsek esetében az echinocandinok csak fungisztatikus hatásúak (Bowman és munkatársai 2002, Douglas 2006; Bryskier 2005). A β-1,3-glükán nagyrészt az apikálisan növekvő hifacsúcsokban szintetizálódik, így ez az a hely, ahol az echinocandinok kifejtik hatásukat (Douglas 2006) jellegzetes duzzadt-végű, rövid, sűrűn elágazó hifák képződését (mikropelletes morfológia) eredményezve (Arikan és munkatársai 2001, Espinel-Ingroff 2003, Imhof és munkatársai 2003; Kurtz és munkatársai 1994; Odds és munkatársai 2004). Az MEC értékek az *Aspergillusok* esetében nagyon hasonlóak: a caspofungin MEC értékek az *A. fumigatus* és az *A. flavus* esetében  $\leq 0,015-0,25$  mg/L, az *A. terreus* esetében 0,03-0,125 mg/L, míg az *A. nigernél* 0,06-0,25 mg/L. A micafungin és az anidulafungin MEC értékek az említett törzsek esetében azonos  $\leq 0,015$  (Martos és munkatársai 2010).

Rezisztencia echinocandinokkal szemben is kialakulhat (Walker és munkatársai 2010). A rezisztencia lehetséges okai között szerepel a  $\beta$ -1,3-glükán szintáz túltermelődése, az echinocandinokra kevésbé érzékeny  $\beta$ -1,3-glükán szintáz változatok megjelenése, a sejtfal kitin tartalmának növekedése, a sejtfal permeábilitásának és/vagy az echinocandin transzporterek működésének megváltozása is.

Az echinocandin rezisztencia molekuláris háttere a *Candida* törzsek esetében széles körben tanulmányozott. Minthogy a *Candida* törzsek *in vitro* mérhető echinocandin toleranciája (MFC/MIC érték) és az adott törzs által okozott fertőzés echinocandinok segítségével történő kezelésének eredményessége közötti kapcsolat még nem teljesen tisztázott (Mora-Duarte és munkatársai 2002), ezért a megnövekedett MIC (MFC) értékkel jellemezhető törzseket sok esetben nem a klasszikus "rezisztens törzs", hanem "csökkent érzékenységet mutató törzs" kifejezéssel illetik (Stone és munkatársai 2002).

Irodalmi adatok alapján ismert, hogy a *Candida* törzsek rezisztenciájának (csökkent érzékenységének) kialakulásában kulcsfontosságú szerepet tölt be az *fks1* gén, amely a  $\beta$ -1,3-glükán szintáz katalitikus alegységét kódolja (Walker és munkatársai 2010; Perlin 2007, Douglas 2007). A Park és munkatársai (2005) által vizsgált *C. albicans* törzsek *fks1* génje két "hot-spot" régiót ("forró-régió") tartalmaz (641-649 és 1345-1365), melyekben igen gyakran jelentkezett pontmutáció a rezisztens törzsekben. Ezen pontmutációk által okozott aminosav szubsztitúcióknak

köszönhető a β-1,3-glükán szintáz komplex echinocandinokkal szembeni rezisztenciája és ezen keresztül a törzs megnövekedett MIC értéke (Balashov és munkatársai 2006; Perlin 2007; Niimi és munkatársai 2010; Pfeiffer és munkatársai 2010). A leggyakoribb aminosav szubsztitúciók közé tartozik a 645-ös pozíciójú Ser kicserélődése Phe-ra, Pro-ra, vagy Tyr-ra (Park és munkatársai 2005; Balashov és munkatársai 2006; Perlin 2007). A Candida parapsilosis törzsben a 660-as pozíciójú Ala-Pro csere eredményezett csökkent caspofungin érzékenységet és hasonló aminosav szubsztitúciókat figyeltek meg a C. parapsilosis törzzsel rokon C. metapsilosis és C. orthopsilosis esetében is (Garcia-Effron és munkatársai 2008). Az echinocandin rezisztenciát mutató C. guilliermondii izolátum esetében 642-es pozicióban történő Met→Leu szubsztitúció okozta a csökkent érzékenységet (Perlin 2007). Azon fajokban, ahol az FKS2 vesz részt, a növekedés alatt a β-1,3-glükán szintézisben, a rezisztenciáért felelős mutációk, e fehérje génjében alakulnak ki. Costa-de-Oliveira és munkatársai (2011) kimutatták, hogy a C. glabrata fks2 génjében, a 663-as pozíciójú Ser→Pro szubsztitúció, valamint a 659-es pozíciójú Phe deléciója, szignifikánsan csökkentette a törzs echinocandin érzékenységét.

A *C. albicans* törzsek csökkent echinocandin érzékenysége kapcsolatba hozható a RER1, a CDR2 efflux pumpa túltermelődésével, valamint a törzsek megnövekedett kitin szintézisével is (Perlin 2007; Cota és munkatársai 2008, Schuetzer-Muehlbauer és munkatársai 2003). A RER1 (regulator of *e*chinocandin *r*esistance) egy gombákra jellemző Zn(2)Cys(6) típusú transzkripciós faktort kódol. *C. albicans*ban a RER1 túltermelődése micafungin és echinocandin B rezisztenciát okozott, de nem befolyásolta a törzs más antifungális szerekkel szembeni érzékenységét és nem volt hatással az *fks1* és az efflux-pumpákat kódoló gének átírására, valamint a sejtfalszintézist befolyásoló protein-kináz C képződésére sem (Ketko és munkatársai 2006). A CDR2 egy ABC transzporter, amely feltehetőleg részt vesz a sejtekbe bejutó echinocandinok eltávolításában. Túltermeltetése megnövekedett echinocandin toleranciát okozott a vizsgált *C. albicans* törzsekben (Schuetzer-Muehlbauer és munkatársai 2003). Az echinocandinok jelenléte (a  $\beta$ -1,3glükán szintáz gátlása) a *C. albicans* törzsekben a kitin szintézis növekedését eredményezte (Walker és munkatársai 2008). Stevens és munkatársai (2006) a *C*. *albicans* izolátumok esetében megfigyelték, hogy caspofungin kezelést követően csökkent a sejtfal  $\beta$ -1,3-glükán és  $\beta$ -1,6-glükán tartalma, ugyanakkor a kitin mennyisége a hatszorosára növekedett. A kitin szintézis növekedésében a protein-kináz C, a Ca<sup>2+</sup>-kalcineurin és a HOG szignál útvonalak egyaránt közreműködnek (Munro és munkatársai 2007). Nem meglepő módon a protein-kináz C és Ca<sup>2+</sup>-kalcineurin útvonalak aktiválása – pl. calcofluor white, illetve Ca<sup>2+</sup> hozzáadásával – megnövekedett kitin szintézishez és csökkent caspofungin érzékenységhez vezetett (Walker és munkatársai 2008).

A fonalas gombák echinocandin rezisztenciája, beleértve az *Aspergillus* fajokat is, kevésbé tanulmányozott terület. Irodalmi adatok alapján ismert, hogy a *Neurospora crassa, Fusarium verticilloides, F. solani, F. graminearum* és a *Magnaporthe grisea* primer rezisztenciával rendelkező gomba fajok esetében az *fks1* génben található egy pontmutáció, amely a 641-es pozíciójú Phe Tyr-ra történő cseréjét okozza és feltehetőleg ez lehet a felelős ezen fajok rezisztenciájáért (Ha és munkatársai 2006; Katiyar és munkatársai 2006).

Az A. fumigatus esetében Gardiner és munkatársai (2005) kimutatták, hogy az fks1 gén 678-as aminosavát érintő mutációval (Ser→Tyr csere) csökkenteni lehet echinocandinokkal szembeni érzékenységét. Ugyanakkor а gomba а laboratóriumban szelektált, illetve klinikai mintákból izolált echinocandin rezisztenciát mutató A. fumigatus törzsek esetében nem detektáltak mutációt az fks1 génben és az FKS1 túltermelődése is csak egyetlen izolátum esetében volt megfigyelhető (Gardiner és munkatársai 2005; Arendrup és munkatársai 2008, 2009). A fentiek alapján feltételezhető, hogy az Aspergillusok echinocandin rezisztenciája eltér a Candida törzseknél tapasztaltaktól és nem kötődik szorosan az fks1 génhez (Walker és munkatársai 2010; Howard és Arendrup 2011). A Candida fajokhoz hasonlóan, az echinocandin kezelés az A. fumigatus esetében is növelte a sejtfal kitin-tartalmát, továbbá a kitin szintézis vagy a sejtfal integritási útvonalak gátlása az echinocandinokkal szembeni fokozott érzékenységet eredményezett (Fortwendel és munkatársai 2009; Walker és munkatársai 2010).

Reinoso-Martin és munkatársai (2003) kimutatták, hogy az *ecm33* gén inaktiválása az *A. fumigatus* törzsben a sejtfal kitin és  $\alpha$ -1,3-glükán tartalmának

növekedését okozza. Nem meglepő módon az *ecm33* génben sérült mutánsok rezisztensebbek a sejtfalkárosító szerekkel (pl. Kongó-vörös és caspofungin) szemben, mint a kontroll törzs (Romano és munkatársai 2006). A *Candida* fajok esetében ugyanakkor nem találtak egyértelmű kapcsolatot az *ecm33* gén aktivitása és az echinocandin rezisztencia között (Martinez-Lopez és munkatársai 2004; 2006).

#### 2.6. Paradox-effektus vagy "Eagle-effektus"

1948-ban Eagle Musselman β-laktám antibiotikumok és a Streptococcusokra, továbbá Staphylococcus aureus, S. albus, *Diplococcus* pneumoniae és a Reiter treponoma törzsekre kifejtett hatásának vizsgálatakor szokatlan jelenségről számoltak be, amelyet "Eagle-effektusként" neveztek el. Azt tapasztalták, hogy a penicillin koncentrációjának az optimális szint fölé történő emelésekor, a várt nagyobb letális hatással ellentétben, a szer hatékonysága csökkent. A maximális letális hatást csak egy viszonylag szűk koncentráció tartományban tudták megfigyelni. Hall és munkatársai (1988) cilofunginnal Candida törzseken végzett vizsgálataikban szintén megfigyelték az antifungális aktivitás ellentmondásos (paradox) gyengülését magas echinocandin koncentrációk esetén. A jelenséget "Paradox-effektusnak" nevezték el. Általánosságban Paradox-effektusról (Eagle-effektus) akkor beszélünk, ha egy antimikrobiális anyag koncentrációjának a növelésekor hatásának erőssége csökkenést mutat (Wiederhold 2009). Stevens és munkatársai (2004) a Candida fajok caspofunginnal történő in vitro kezelése során a paradox-effektus négy fázisát különböztették meg (7. ábra):

1. fázis (szubinhibítorikus fázis): Az antifungális hatás a caspofungin koncentrációjával párhuzamosan változik a MIC eléréséig.

2. fázis: A caspofungin koncentráció növelésével arányosan erős növekedésgátlás figyelhető meg a MIC érték feletti tartományban.

3. fázis: A capofungin antifungális aktivitása csökken az antifungális szer koncentrációjának további növelésével.

25

4. fázis: A caspofungin koncentrációját tovább növelve az antifungális hatás ismét a koncentrációval arányosan növekszik.



7. ábra A paradox-effektus fázisai *in vitro* caspofungin kezelés hatására egy *Candida albicans* törzsben (forrás: Wiederhold 2009).

E 4 fázis az *A. fumigatus* esetében szintén megfigyelhető (Antachopoulos és munkatársai 2008). A paradox-effektus jelenségét *in vivo* állatkísérletekben is megpróbálták kimutatni, de a kapott eredmények ellentmondóak (Chen és munkatársai 2011). Petraitiene és munkatársai (2002) azt tapasztalták, hogy az 1 mg/kg/nap caspofunginnal történő kezelés hatásosabb a 3, illetve 6 mg/kg/nap caspofungin dózissal szemben nyúlban kialakított invazív tüdő aszpergillózis esetén. A kórszövettani vizsgálatok ugyanakkor kimutatták, hogy a 6 mg/kg/nap caspofungin dózissal kezelt állatok esetében volt a legmagasabb fokú a hifa sejtfalának károsodása. Clemons és munkatársai (2006) *C. albicanssal* fertőzött egerek esetében azt tapasztalták, hogy a 0,5 mg/kg feletti caspofungin dózis tartományban a kezelés hatékonysága csökkent a koncentráció növelésével, azonban eredményeiket nem tudták megbízhatóan reprodukálni.

Az echinocandinok paradox módon történő aktivitásbeli gyengülésének háttere nem ismert. Stevens és munkatársai 2005-ben leírták, hogy a paradoxeffektus nem áll kapcsolatban sem FKS1 mutációjával, sem a  $\beta$ -1,3-glükán szintáz komplex echinocandin érzékenységének módosulásával, sem pedig  $\beta$ -1,3-glükán szintáz aktivitás növekedésével. Feltételezések szerint a stressz válasz útvonalak, mint pl. a sejtfal integritási útvonalak vagy a Ca<sup>2+</sup>-kalcineurin útvonal fontos szabályozó szerepet töltenek be a paradox-effektus kialakulásában. Feltételezhető, hogy az antifungális szer által kiváltott sejtfalkárosodás indukálja ezen útvonalakat, ami a sejtfalszintézis aktivizálódásához és így többek között a sejtfal kitintartalmának növekedéséhez vezet csökkentve a sejtek echinocandin érzékenységét (Stevens és munkatársai 2006; Wiederhold és munkatársai 2005, 2007; Chamilos és munkatársai 2007). Ezt a feltételezést jól alátámasztja az a tény, hogy a paradox effektus elsősorban azon fajokra, törzsekre jellemző, ahol az echinocandin kezelés hatékonyan képes növelni a sejtfal kitin tartalmát (Perlin 2007; Walker és munkatársai 2010).

#### 3. Eredmények

#### 3.1. Az A. nidulans var. roseus ATCC 58397 törzs polifázikus jellemzése

3.1.1. A növekedés hőmérséklet, szén- és nitrogénforrás függésének vizsgálata

Az A. nidulans var. roseus ATCC 58937 törzs növekedését különböző szénforrásokat tartalmazó MN tápagarokon teszteltük. Vizsgálataink alapján az A. nidulans var. roseus törzs növekedése 37 °C-on nem tér el lényegesen az A. nidulans FGSC A4, A. rugulosus CBS 133.60 és CBS 171.71 törzsekétől (8. ábra). Az inkubációs hőmérséklet 24 °C-ra csökkentése azonban lényeges változást hozott: Bár mind a négy törzs lassabban nőtt 24 °C-on, mint 37 °C-on, az A. nidulans var. roseus és az A. rugulosus törzsek növekedése jelentősen elmaradt az A. nidulans növekedéséhez képest (8. ábra).

Az előző kísérletekben használt nitrogénforrás (40 mmol/L NaNO<sub>3</sub>) lecserélése 75 mmol/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-ra, Na-glutamát-ra, illetve 1 w/v % peptonra, kazeinpeptonra, szójapeptonra, illetve élesztőkivonatra egyik törzs esetében sem befolyásolta szignifikánsan a növekedés sebességét glükóz, illetve keményítő szénforrás jelenlétében. A mért telepátmérők érdemben nem tértek el a 8. ábrán bemutatott értékektől sem 24, sem 37 °C-on.

Süllyesztett kultúrában, rázott lombikos körülmények között szintén megvizsgáltuk a törzs növekedését szénforrásként glükózt és napraforgóolajat tartalmazó GNL táplevesben. Azért választottuk vizsgálatainkhoz ezt a tápközeget, mert irodalmi adatok alapján (Boeck és Kastner 1981; Schwartz és munkatársai 1993) e tápközeg eredményesen használható az ECB előállítására, így lehetőségünk nyílt a törzs növekedésének jellemzésére "ipari körülmények" között is. Amint az a 9. ábrán látható, az *A. nidulans* var. *roseus* és az *A. rugulosus* törzsek sokkal lassabban hasznosították a tápközegben jelenlévő glükózt, mint az *A. nidulans*. A glükóz elfogyást követően azonban mindhárom törzs növekedése gyorsabb volt, mint az *A. nidulans* (9. ábra).



8. ábra Az A. nidulans var. roseus ATCC 58397 (vörös), az A. rugulosus CBS 133.60 (sárga), az A. rugulosus CBS 171.71 (zöld) és az A. nidulans FGSC A4 (kék) törzsek növekedése különböző szénforrásokat (1 w/v %) tartalmazó MN tápagar felszínén. A tenyészetek 5 napon át lettek inkubálva 37 (A), illetve 24 °C-on (B). Az ábrán a telepátmérők átlaga és szórása van feltüntetve. Az adatokat három párhuzamos mérésből határoztuk meg.



9. ábra Az A. nidulans var. roseus ATCC 58397 (vörös), az A. rugulosus CBS 133.60 (sárga), CBS 171.71 (zöld) és az A. nidulans FGSC A4 (kék) törzsek növekedése (DCM; folytonos vonal) és glükóz hasznosítása (szaggatott vonal) szénforrásként glükózt és napraforgóolajat tartalmazó folyékony GNL tápközegben 24 °C-on. A törzsek viselkedése 37 °C-on érdemben nem tért el egymástól. A biomasszában megfigyelhető változásokat MTT teszttel is nyomonkövettük; a kapott eredmények a DCM méréssel lényegében megegyeztek.

Az ábrán három független mérés átlagát tüntettük fel. A szórás értéke egyik pont esetében sem haladta meg a 12 %-ot.

#### 3.1.2. A szekunder metabolit termelés vizsgálata

A szekunder metabolitok képződését szénforrásként glükózt és napraforgóolajat tartalmazó folyékony GNL tápközegben vizsgáltuk. Agardiffúziós vizsgálatok segítségével jól mérhető antifungális és antibakteriális aktivitást detektáltunk az *A. nidulans* var. *roseus* és az *A. rugulosus* törzsek 24 °C-on tenyésztett kultúrái esetében, míg az *A. nidulans* fermentleve csak antibakteriális aktivitást mutatott (10. ábra; 1. táblázat). Ha a tenyésztést 37 °C-on végeztük, mind a négy törzs esetében csak antibakteriális aktivitást tapasztaltunk. Az antibakterális aktivitás minden esetben maradéktalanul megszüntethető volt  $\beta$ -laktamáz kezeléssel (10. ábra; 1. táblázat).

	Szterigmatocisztin		Antifungális aktivitás		β-laktamáz érzékeny antibakteriális	
					aktivitás	
	24 °C	37 °C	24 °C	37 °C	24 °C	37 °C
A. nidulans FGSC A4	$15\pm5$	< 5	nincs	nincs	van	van
A. nidulans var. roseus	$45 \pm 5$	< 5	van	nincs	van	van
ATCC 58397						
A. rugulosa CBS 171.71	< 5	< 5	van	nincs	van	van
A. rugulosa CBS 133.60	< 5	< 5	van	nincs	van	van

1. táblázat Az A. nidulans FGSC A4, az A. nidulans var. roseus ATCC 58397, az A. rugulosus CBS 171.71 és az A. rugulosus CBS 133.60 törzsek szekunder metabolit termelése. A törzseket glükózt és napraforgóolajat tartalmazó folyékony GNL táplevesben tenyészettük 24, illetve 37 °C-on 6 napig. A szekunder metabolitok képződését vékonyréteg kromatográfiával és agardiffúziós módszerrel követtük nyomon az Anyagok és módszerek fejezetben leírtak alapján.



10. ábra Az A. nidulans var. roseus ATCC 58397 és az A. nidulans FGSC A4 törzsek fermentlevének antifungális (A) és antibakteriális (B) aktivitásának vizsgálata.

Az A ábrán a lyukak az A. *nidulans* var. *roseus* 2 napos (1), 4 napos (2) és 6 napos (3), valamint az A. *nidulans* 6 napos (4) tenyészetének fermentlevét tartalmazták. A B ábra esetében a lyukak az A. *nidulans* 4 napos (1), 6 napos (2), valamint az A. *nidulans* var. *roseus* 4 napos (3) és 6 napos (4) tenyészetének fermentlevével lettek feltöltve. Az 5. lyuk a 6 napos A. *nidulans* var. *roseus* tenyészetből származó és  $\beta$ -laktamázzal kezelt fermentlevét tartalmazta.

A vizsgálatokhoz 24 °C-on tenyésztett kultúrák sejtmentes fermentleveit használtuk fel. Az antifungális aktivitást *Candida albicans*, az antibakteriális aktivitást *Bacillus subtilis* segítségével teszteltük.
Vékonyréteg kromatográfiás vizsgálataink jelentős eltéréseket mutattak a tesztelt törzsek szekunder metabolit spektrumában. Az *A. nidulans* és az *A. nidulans* var. *roseus* törzsek 24 °C-on lényegesen többféle szekunder metabolitot termeltek, mint 37 °C-on (12. ábra). A vizsgált *A. rugulosus* törzsek szekunder metabolit termelésének ugyanakkor inkább a 37 °C volt előnyösebb (12. B ábra). ST képződése mind a négy törzs esetében kimutatható volt mind 24, mind 37 °C-on (12. ábra, 1. táblázat). A legtöbb ST-t az *A. nidulans* var. *roseus* termelte (11. ábra; 12. ábra, 1. táblázat). Az *A. nidulans* var. *roseus* ST és ECB termelésének időbeli változását az 11. ábrán mutatom be. A 24 °C-on történő tenyésztés alatt az *A. nidulans* FGSC A4 törzsre - hasonlóan a többi megvizsgált *A. nidulans* törzshöz (*A. nidulans* cre*A* null mutáns, *A. nidulans* FGSC A146) - egy UV fényben zölden fluoreszkáló termék ( $R_f = 0,21$ ) képződése volt jellemző, amit az *A. rugulosus* és az *A. nidulans* var. *roseus* törzsek esetében egy kéken fluoreszkáló és nagyobb mobilitású ( $R_f = 0,27$ ) termék helyettesített (12. ábra).



11. ábra Az A. nidulans var. roseus ATCC 58397 tenyészetek ECB ( $\Box$ ) és ST ( $\blacktriangle$ ), valamint az A. nidulans FGSC A4 tenyészetek ST ( $\bigstar$ ) tartalmának időbeli változása A törzseket glükózt és napraforgóolajat tartalmazó GNL táplevesben tenyésztettük 24 °C-on. Az ábrán három független mérés átlagát tüntettük fel. A szórás értéke egyik pont esetében sem haladta meg a 15 %-ot. Az ECB mennyiségét agardiffúzió, az ST mennyiségét vékonyréteg kromatográfia segítségével határoztuk meg.



ATCC 58397 CBS 171.71 CBS 133.60 FGSC A4

12. ábra Az A. nidulans FGSC A4, az A. nidulans var. roseus ATCC 58397, az A. rugulosus CBS 171.71 és CBS 133.60 törzsek szekunder metabolit spektruma vékonyréteg kromatográfiás módszerrel detektálva. A vizsgálathoz 24 °C-on (A), illetve 37 °C-on (B) tenyésztett 6 napos kultúrákból származó fermentlevet használtunk. A sávokat, AlCl<sub>3</sub>-os festést követően UV fénnyel ( $\lambda$  = 265 nm) megvilágítva tettük láthatóvá.

A 13. ábra a növekedés és a szekunder metabolit termelés hőmérsékletfüggésének kapcsolatát szemléltetik. Az *A. nidulans*t és az *A. nidulans* var. *roseus*t eltérő viselkedés jellemzi: Amíg 37 °C-on az *A. nidulans* és az *A. nidulans* var. *roseus*t örzsek hasonlóan gyorsan nőttek és számottevő antibiózis nem volt megfigyelhető közöttük (13.A ábra), addig 24 °C-on az *A. nidulans* gyors növekedését a lassabban növő *A. nidulans* var. *roseus* törzs antifungális hatóanyag termelése (ECB) révén próbálta gátolni (13.B ábra).



13. ábra Az Aspergillus nidulans var. roseus ATCC 58397 (jobb oldali törzs) és az A. nidulans FGSC A4 (bal oldali törzs) eltérő kompetíciós stratégiája 37 °C-on (A) és 24 °C-on (B) történő inkubálás alatt komplex PM tápagar felületén.

#### 3.1.3. Szekvencia vizsgálatok

Az Aspergillusok esetében gyakran használt szekvenciák közül a kalmodulin,  $\beta$ -tubulin,  $\gamma$ -aktin gének parciális szekvenciáit és az ITS szekvenciákat határoztuk meg. A szekvenciák a GeneBank adatbázisban (GenBank Nucleotide Sequence Database; www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/) az alábbi azonosítószámokon érhetők el: HQ222835-39. Az ITS szekvenciák esetében nem találtunk eltérést az *A. nidulans* var. *roseus*, az *A. rugulosus* és az *A. nidulans* között. Ráadásul a kapott szekvencia megtalálható volt - többek között - az *Emericella quadrilineata, E. dentata, E. cleistominuta, E. rugulosa, A. caespitosus* fajok egyes törzseiben is (GenBank Nucleotide Sequence Database; www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/). Az *A. nidulans* var. *roseus* parciális kalmodulin és  $\beta$ -tubulin génszekvenciáit szintén a

GenBank adatbázisban található szekvencia adatokkal hasonlítottuk össze. Minthogy az *A. rugulosus*  $\gamma$ -aktin génjének szekvenciája nem található meg egyik adatbázisban sem, így e szekvenciát az *A. rugulosus* CBS 133.60 és CBS 171.71 törzsek esetében is meghatároztuk (GeneBank azonosítószám: JF706703-04). Eredményeink alapján az *A. nidulans* var. *roseus* ATCC 58397 törzs parciális  $\beta$ -tubulin, kalmodulin és  $\gamma$ aktin szekvenciái közelebb álltak az *A. rugulosus* törzsekéhez, mint az *A. nidulans*éhoz (2. táblázat). Ezt mutatják a filogenetikai vizsgálatok eredményei is (14.A és 14.B ábra). A  $\gamma$ -aktin gén esetében filogenetikai vizsgálatot nem végeztünk, ugyanis ehhez túl kevés *Aspergillus* faj szekvencia adatai találhatóak meg a GeneBank adatbázisban.

	A. nidulans var. roseus ATCC 58397			
	kalmodulin	β-tubulin	γ-aktin	
A. nidulans FGSC A4	435 (96 %); 8; 453	436 (94 %); 5; 467	278 (93 %); 5; 299	
A. rugulosus NRRL 206	419 (98 %); 3; 427	457 (99 %); 0; 462	-	
A. rugulosus CBS 133.60	-	-	333 (100 %); 0; 333	
A. rugulosus CBS 171.71	-	-	300 (99 %); 0; 303	

<sup>2.</sup> táblázat *A. nidulans* var. *roseus* ATCC 58397 törzs parciális kalmodulin,  $\beta$ -tubulin és  $\gamma$ -aktin szekvenciájának összehasonlítása az *A. nidulans* FGSC A4, valamint három *A. rugulosus* törzs szekvencia adataival.

A táblázatban az azonos nukleotidok száma és százaléka, a "gap"-ek száma és a megszekvenált szakasz hossza van megadva. A szekvenciák összehasonlításához a Nucleotid Blast programot (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) használtuk. Az *A. nidulans* FGSC A4 és *A. rugulosus* NRRL 206 törzsek szekvencia adatai a GenBank adatbázisból (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/) származtak, a többi szekvenciát saját magunk határoztuk meg





14.A ábra A parciális β-tubulin szekvencia adatok alapján szerkesztett filogenetikai törzsfa az *A. nidulans* és az *A. rugulosus (E. rugulosa)* törzsekkel közel rokon fajok szekvenciái alapján. Az analízist a MEGA4 szoftverrel végeztük a Neighbor-Joining módszert felhasználva (Tamura és munkatársai 2007). Az elágazásoknál látható számok az elágazás valószínűségét jelölik %-ban megadva, melyeket 500 ismétlésben elvégzett bootstrap analízis alapján határoztunk meg. Az evolúciós távolságokat a Maximum Composite Likelihood módszer segítségével állapítottuk meg.





14.B ábra A parciális kalmodulin szekvencia adatok alapján szerkesztett filogenetikai törzsfa az *A. nidulans* és az *A. rugulosus* (*E. rugulosa*) törzsekkel közel rokon fajok szekvenciái alapján. Az analízist a MEGA4 szoftverrel végeztük a Neighbor-Joining módszert felhasználva (Tamura és munkatársai 2007). Az elágazásoknál látható számok az elágazás valószínűségét jelölik %-ban megadva, melyeket 500 ismétlésben elvégzett bootstrap analízis alapján határoztunk meg. Az evolúciós távolságokat a Maximum Composite Likelihood módszer segítségével állapítottuk meg.

### 3.1.4. Keresztezési vizsgálatok

Direkt szelekciós technikával 5-fluoroorotsav (5-FOA) rezisztens, uracil/uridin auxotróf (*pyrG*, orotidin-monofoszfát dekarboxiláz) mutánsokat izoláltunk az *A. nidulans* var. *roseus* ATCC 58397, az *A. rugulosus* CBS 133.60 és CBS 171.71 törzsekből kiindulva. A létrehozott *A. nidulans* var. *roseus* mutánsok közül a VT15-ös számú mutánst választottuk a további kísérletekhez. A VT15 törzs uracil/uridin auxotrófiája nem volt komplementálható az *A. nidulans* FGSC A773 (*pyrG89, wA3, pyroA4*) mutánssal. A keresztezési kísérlet alatt heterokarionos hifák képződését nem tapasztaltuk piridoxint is tartalmazó minimál MN tápagaron (15. ábra), ami alátámasztja azon feltételezésünket, hogy a VT15 törzs a *pyrG* génben hordoz mutációt.



15. ábra Az A. nidulans var. roseus VT15 ( $pyrG^{-}$ ) mutáns törzs keresztezése az A. nidulans FGSC A773 ( $pyrG^{-}$ ) (A) és az A. nidulans FGSC A146 ( $pyrG^{+}$ ) (B) törzzsel, valamint az A. nidulans var. roseus VT15 törzs és az A. nidulans creA-null mutáns keresztezésével létrehozott prototróf telepek minimál MN táptalaj felületén (C).

Ha a keresztezési vizsgálatokat az A. nidulans FGSC A851 (yA2, *dargB::trpC*, veA1, trpC801), HZS120 (pabaA1, riboB2, veA1), FGSC A33 (biA1, pyroA4, veA1), FGSC A146 (pabaA1, acrA1, phenA2, pyroA4, lysB5, sB3, nicB8, riboB2, chaA1) és a creA-null (pabaA1, yA1, \DeltacreA::argB, argB2, riboB2, veA1) mutánsokkal végeztük stabil heterokarionos tenyészetek jöttek létre. A creA-null mutánssal, illetve az FGSC A773 törzzsel történő keresztezés esetében, 2-3 hónapos inkubációt is kleisztotéciumok képződését sikerült megfigyelnünk. követően. А kleisztotéciumok minden esetben sterilek voltak, azaz nem tartalmaztak aszkospórákat. Az A. rugulosus törzsekből létrehozott 5-FOA (5-fluoroorotsav) rezisztens, uracil/uridin auxotróf (pyrG) mutánsok szintén komplementálhatóak voltak a törzsgyűjteményi A. nidulans törzsekkel, azaz stabil heterokarionos hifákat képeztek az FGSC A146, HZS 120 és a creA-null mutánsokkal (de az FGSC A773 törzzsel nem); kleisztotéciumok képződését azonban egy esetben sem figyeltük meg.

Bár a szexuális ciklus nem eredményezett aszkospórákat, a paraszexuális ciklus számos "hibrid" törzs izolálását tette lehetővé. A VT15 és a *creA*-null keresztezésével keletkezett utódtelepeket (15.A ábra) eltérő tulajdonságaik alapján 3 csoportra osztottuk:

1. A VT15 szülői törzsre emlékeztető, uracil/uridin auxotróf telepek. A telepek zöld színűek az általuk termelt zöld színű konidiumok miatt. A keresztezésektől függően az izolált utódtelepek 95-100 %-a ebbe a csoportba tartozott.

2. A *creA*-null szülői törzsre emlékeztető, sárga színű konidiumokat termelő, *p*-aminobenzoesav és riboflavin auxotróf telepek. Az izolált utódtelepek 0-3 %-a tartozott ebbe a csoportba.

3. Prototróf telepek, melyek az utódtelepek 0-2 %-át alkották. Az általuk termelt konidiumok pigmentáltságától függően a telepek színe fehér (5 %), zöld (4 %), sárga (0,5%), illetve barna (90,5 %) volt. A barna színű telepek csak kevés (fehérszínű) konidiumot termeltek; a telep színét ebben az esetben az öregedő hifák barnulása (melanin termelése) okozta. A prototróf telepek prototrófiájukat 10 egymást követő komplex tápközegben történő átoltás után is megőrizték.

A prototróf telepek nem csak színükben, de szekunder metabolit termelésükben is eltértek egymástól és a szülői törzsektől (16. ábra).



16. ábra Az A. *nidulans creA*-null mutáns (1) és az A. *nidulans* var. *roseus* VT15 törzs (2) keresztezésével létrehozott prototróf törzsek (3-8) szekunder metabolit spektruma

A törzseket szénforrásként glükózt és napraforgóolajat tartalmazó folyékony GNL táplevesben tenyésztettük 6 napon át 24 °C-on. A vékonyrétegen megfuttatott fermentlevek szekunder metabolit tartalmát AlCl<sub>3</sub>-os festést követően UV fénnyel ( $\lambda = 254$  nm) megvilágítva tettük láthatóvá.

A VT15 és a minden kromoszómáján auxotrófia marker gént hordozó *A*. *nidulans* FGSC A146 törzs keresztezésekor kapott utódtelepeket szintén 3 csoportra osztottuk:

A VT15 szülői törzsre emlékeztető, uracil/uridin auxotróf zöld telepek (90-100%).

2. Az FGSC A146 szülői törzsre emlékeztető, zölden pigmentált, *p*-aminobenzoesav, riboflavin, Lys, Trp, Phe és piridoxin auxotrófiát mutató, valamint akraflavinra érzékeny telepek (0-5 %).

3. Részlegesen prototróffá vált, zöld színű telepek (0-5 %). Valamennyi kolóniára ugyanaz a fenotípus volt jellemző. Az FGSC A146 törzshöz hasonlóan *p*-aminobenzoesav és riboflavin auxotrófok, akraflavin érzékenyek, valamint uracil/uridin prototrófok voltak, de elveszítették Lys, Trp, Phe és piridoxin

auxotrófiájukat. E hibrid törzsek echinocandin B-t nem termeltek és növekedésük igen lassú volt. A telepek átmérője a tenyésztés 5. napján, glükózt tartalmazó minimál tápközegben, 8-10 mm között változott függetlenül a tenyésztési hőmérséklettől (24, illetve 37 °C). Fenotípusukat 10, komplex YMN táptalajra történő átoltás után is megőrizték.

A hibrid törzsek közül 10 törzs esetében meghatároztuk a parciális  $\beta$ tubulin, kalmodulin és  $\gamma$ -aktin szekvenciákat. Valamennyi esetben a kapott szekvencia megegyezett az *A. nidulans* FGSC A4 törzs szekvenciájával. A fentiekhez hasonló eredményt kaptunk akkor is, ha a keresztezést a VT15 törzs helyett az *A. rugulusos* törzsekből létrehozott uracil/uridin auxotróf mutánsokkal végeztük el. Azaz, a creA-null mutánssal történő keresztezés esetében sikerült fehér, zöld, sárga, illetve barna színű prototróf telepeket izolálni, míg az FGSC A146 törzs esetében szintén kaptunk részlegesen prototróf hibrideket, melyek mindegyike kizárólag csak *p*-aminobenzoesav és riboflavin auxotrófiát mutatott.

# 3.2. Az A. nidulans var. roseus ATCC 58397 törzs echinocandin rezisztenciájának vizsgálata

# 3.2.1. Az A. nidulans var. roseus ATCC 58397 echinocandin érzékenységének meghatározása

Vizsgálataink alapján az *A. nidulans* var. *roseus* lényegesen érzékenyebbnek bizonyult ECB-vel és caspofunginnal szemben, mint az ECB-t nem termelő *A. nidulans* (3. táblázat, 17-18. ábra). Az *A. rugulosus* CBS 133.60 és CBS 171.71 törzsek MEC<sub>caspofungin</sub> értéke - az *A. nidulans* var. *roseus*nál tapasztaltakhoz hasonlóan - 1 µg/ml volt. Az *A. nidulans* var. *roseus* nagyobb echinocandin érzékenysége együtt járt a tenyészetek alacsonyabb specifikus  $\beta$ -1,3-glükán szintáz aktivitásával (3. táblázat). A tenyésztési hőmérséklet 37 °C-ról 24 °C-ra való csökkentése az *A. nidulans* var. *roseus* esetében szignifikánsan megnövelte a specifikus  $\beta$ -1,3-glükán szintáz aktivitásokat; hasonló változást az *A. nidulans*nál nem tapasztaltunk (3. táblázat). A két törzs  $\beta$ -1,3-glükán szintázának ECB-vel való gátolhatósága (IC<sub>50</sub>) érdemben nem tért el egymástól (3. táblázat).

	MEC <sub>ECB</sub> <sup>a</sup>	MEC <sub>CAS</sub> <sup>a</sup>	IC <sub>50</sub> <sup>b</sup>	β-1,3-glüka aktivi	án szintáz itás <sup>b</sup>
	(µg/ml)	(µg/ml)	(ng/ml)	(nmol/(min * 37 °C	mg fehérje)) 24 °C
A. nidulans FGSC A4	2,5	5	4,8 ± 0,2	3,5 ± 0,4	3,8 ± 0,4
A. nidulans var. roseus ATCC 58397	0,5	1	5,1 ± 0,2	$2,0 \pm 0,3^{c,d}$	3,1 ± 0,4 <sup>c</sup>

3. táblázat: Az A. nidulans FGSC A4 és az A. nidulans var. roseus ATCC 58397 ECB és caspofungin (CAS) érzékenységének vizsgálata

a – A MEC és MIC értéket mikrodilluciós módszerrel határoztuk meg. Az elvégzett
3 független mérés azonos eredményt adott a tenyésztési hőmérséklettől függetlenül.
A MIC értékek minden esetben magasabbak voltak, mint 200 μg/ml.

b – A táblázatban szereplő átlag és szórás értékek 3 független kísérlet adataiból lettek meghatározva. A  $\beta$ -1,3-glükán szintáz IC<sub>50</sub> értékét ECB segítségével mértük meg 37, illetve 24 °C-on inkubált tenyészetekből származó minták felhasználásával. A tenyésztési hőmérséklet nem befolyásolta az IC<sub>50</sub> értékét. A táblázatban a 37 °C-on inkubált tenyészetekből vett minták adatai vannak feltüntetve.

c – A jelölt specifikus enzimaktivitási értékek szignifikánsan alacsonyabbak (Student-féle t-teszt, p < 5 %) az A. *nidulans* esetében mért értékeknél.

d - A jelölt specifikus enzimaktivitási érték szignifikánsan alacsonyabbak (Student-féle t-teszt, p < 5 %) a 37 °C-on mért értékeknél.



17. ábra Az A. *nidulans* var. *roseus* ATCC 58397 (A) és az A. *nidulans* FGSC A4 (B) ECB érzékenységének vizsgálata agardiffúziós módszerrel MN tápagaron. Az A és B fotón a baloldali lyukak az ECB feloldásához használt metanolt (40μl), a jobboldali lyukak 15 mg/ml ECB törzsoldat 40 μl-ét tartalmazták. A tenyészeteket a leoltást követően 3 napig inkubáltuk 37 °C-on. A 24 °C-on végzett vizsgálatok során hasonló eltérést tapasztaltunk a két törzs között.



18. ábra Az A. nidulans var. roseus ATCC 58397 és az A. nidulans FGSC A4 ECB érzékenységének vizsgálata mikrodillúciós módszerrel. A vizsgálatokat 96 lyukú mikrotiter lemezen végeztük. Az egyes lyukak 90 μl 0,5 w/v % élesztőkivonattal kiegészített Barratt-féle nitrátos YMN táplevest, 5 μl metanolos CAS, vagy ECB oldatot (végkoncentráció: 0-200 μg/ml), valamint 1000 db konídiumot tartalmaztak. A mikrotiter lemezeket 24 °C, illetve 37 °C-on 3 napig inkubáltuk, majd mikroszkóp segítségével vizsgáltuk a mikropelletek képződését.

Az A. nidulans var. roseus A. nidulansénál nagyobb echinocandin érzékenysége nem csak a csírázó konidiumok, hanem a már kinőtt tenyészetek esetében is megfigyelhető volt. Amint az a 19. ábrán is látható a tápagarba fúrt lyukba cseppentett ECB az A. nidulans var. roseus esetében a lyuktól lényegesen távolabb is kifejtette hatását, míg az A. nidulans növekedését csak a lyuk közelében gátolta. Amint az a fotókon (19. ábra) is látható az ECB kezelés hatására az A. nidulans var. roseus tenyészetek széle "kiegyenesedett"; azaz az ECB a lyuktól nagyobb távolságban (kis ECB koncentrációnál) is gátolta a gomba növekedését, de a tenyészet növekedése a lyuk közelében (nagy ECB koncentrációnál) is folytatódott (19. ábra). Hasonló jelenséget az A. nidulans esetében csak akkor tapasztaltunk, ha a törzset már eleve ECB-t tartalmazó tápagarra oltottuk le (20. ábra).



19. ábra Az ECB hatása az *A. nidulans* var. *roseus* ATCC 58397 (A, B) és az *A. nidulans* FGSC A4 (C, D) tenyészetek növekedésére

A bal oldali lyukak 40 µl metanolt, a jobb oldali lyukak 30 mg/ml (A, C), illetve 60 mg/ml (B, D) koncentrációjú metanolos ECB oldat 40 µl-ét tartalmazták. A fekete vonalak az ECB kezelés elvégzésekor (a leoltást követő 3. nap) lemért telepátmérőt jelölik. A tenyészeteket a kezelést követően további 3 napig inkubáltuk 37 °C-on.



20. ábra Az A. nidulans FGSC A4 ECB érzékenysége 25 µg/ml ECB-t tartalmazó MN tápagar felületén

A bal oldali lyuk 40 µl metanolt, a jobb oldali lyuk 40 µl 30 mg/ml koncentrációjú metanolos ECB oldatot tartalmazott. A fekete vonal az ECB kezelés elvégzésekor (a leoltást követő 3. nap) lemért telepátmérőt jelöli. A tenyészeteket a kezelést követően további 3 napig inkubáltuk 37 °C-on.

#### 3.2.2. A sejtfal homeosztázis változásainak vizsgálata

qRT-PCR segítségével megvizsgáltuk az A. nidulans és az A. nidulans var. roseus sejtfal bioszintézisében érintett néhány génjének relatív transzkripcióját. E kísérletekben a 24 °C-on (az ECB képződését lehetővé tévő hőmérséklet) és a 37 °Con (az ECB képződését gátló hőmérséklet) inkubált, valamint a 37 °C-on inkubált, de ECB-vel kezelt tenyészetek adatait hasonlítottuk össze. Az A. nidulans var. roseusban számos kitin szintáz gén, így az ANID\_07032 kitin-szintáz (chsA), az ANID 02523 kitin szintáz (chsB) és az ANID 08710 kitin szintáz regulátor ortológia indukálódott 24 °C-on és ECB jelenlétében 37 °C-on. Az ANID 06317 kitin szintáz (csmB) ortológja csak 24 °C-on indukálódott, amíg az ANID\_06318 kitin szintáz (csmA), az ANID\_04367 kitin szintáz és az ANID\_01069 kitin szintáz regulátor ortológjának transzkripciójában szignifikáns változás nem volt megfigyelhető. Sem a tenyésztési hőmérséklet, sem az ECB kezelés hatására nem történt változás a  $\beta$ -1,3-glükán szintáz katalitikus alegységének relatív expressziójában (fksA) (4. táblázat). Az A. nidulans FGSC A4 törzs esetében a tenyésztési hőmérséklet változtatása nem okozott szignifikáns változást az fksA gén expressziójában, azonban a 37 °C-on történő ECB kezelés hatására a chsB és a csmA kitin-szintázok indukciója volt megfigyelhető (5. táblázat).

Annak érdekében, hogy ellenőrizzük, hogy az *A. nidulans* FGSC A4 törzs genom szekvenciája alapján tervezett primer párok az *A. nidulans* var. *roseus* esetében is a megfelelő ortológ gént ismerik fel, megszekvenáltattuk a primer párok által felszaporított DNS-t és a kapott szekvenciákat összehasonlítottuk az *A. nidulans* FGSC A4 törzs a GeneBank adatbázisban (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/) szereplő adataival. Az *A. nidulans* var. *roseus* és az *A. nidulans* szekvencia adatai minden esetben nagyfokú egyezést mutattak (6. táblázat).

A transzkripciós szintű változások jó egyezést mutattak a sejtfal összetételének változásával. Az *A. nidulans* var. *roseus* sejtfala szignifikánsan több kitint tartalmazott 24 °C-on, mint 37 °C-on (7. táblázat). A sejtfal kitin tartalmának növekedését a sejtfal  $\beta$ -1,3-glükán tartalmának csökkenése kísérte miközben az  $\alpha$ -

glükán tartalom lényegesen nem változott (7. táblázat). Az *A. nidulans* esetében a tenyésztési hőmérséklet nem befolyásolta érdemben a sejtfal összetételét; a mért adatok igen hasonlóak voltak az *A. nidulans* var. *roseus* esetében, 37 °C-on mért értékekhez (7. táblázat).

	A. nidulans var. roseus ATCC 58397			
gén <sup>a</sup>	24 °C	37 °C	37 °C + ECB	
	Relatív	v transzkripció	$(\Delta CP)^{b}$	
AN7032 kitin szintáz (chsA)	$5,1 \pm 0,8^{c}$	$7,6 \pm 0,8$	$6,4 \pm 0,7^{c}$	
AN2523 kitin szintáz (chsB)	$0,2\pm0,7^{c}$	$1,7\pm0,9$	$0,8\pm0,7^{\mathrm{c}}$	
AN6318 kitin szintáz (csmA)	2,6 ± 1	$2,3 \pm 0,7$	$2,8 \pm 0,8$	
AN6317 kitin szintáz (csmB)	$3,3 \pm 0,8^{c}$	$4,\!6\pm0,\!7$	$4,7\pm0,7$	
AN4367 kitin szintáz	$10{,}6\pm0{,}9$	$10,\!8\pm0,\!9$	$10{,}9\pm0{,}9$	
AN8710 kitin szintáz regulátor	$3,5 \pm 0,8^{c}$	6,6 ± 1	$3,6 \pm 1^{c}$	
AN10696 kitin szintáz regulátor	4,9 ± 1	$6,3 \pm 0,9$	$6,2 \pm 0,8$	
AN3729 β-1,3-glükán szintáz katalitikus alegysége ( <i>fks1</i> )	4,5 ± 0,8	4,6 ± 0,7	4,5 ± 0,7	

4. táblázat Az A. nidulans var. roseus ATCC 58397 törzs sejtfal bioszintézisben érintett néhány génjének relatív transzkripciója. A 37 °C-on végzett ECB kezelés (350 mg/L végkoncentráció) a mintavétel (45h) előtt 8 órával történt.

a – A táblázatban az *A. nidulans* genomjában megtalálható ortológok lókuszszámát és nevét tüntettük fel.

b – A relatív transzkripció mértékét a  $\Delta CP$  módszerrel számoltam ki:  $\Delta CP = CP_{gén}$ -CP<sub>referencia</sub>, ahol CP a PCR termék akkumulálódásához szükséges ciklusszám a vizsgált gén (gén), illetve a "housekeeping" gén (referencia) esetében. A "housekeeping" gén az eEF-3 elongációs faktor (AN6700) volt. A  $\Delta CP$  érték csökkenése utal a gén indukciójára. A táblázatban 4 független mérés átlagát és szórását tüntettük fel.

c - szignifikáns eltérés (Student-féle t-teszt, p < 5 %) a 37 °C-on tenyésztett ECB-vel nem kezelt kultúrákhoz képest

	A. 1	nidulans FGSC	C A4
gén	24 °C	37 °C	37 °C + ECB
	Relatív	v transzkripció	$(\Delta CP)^{a}$
AN7032 kitin szintáz (chsA)	$7,2 \pm 1$	$8,1\pm1$	$7,5 \pm 1$
AN2523 kitin szintáz (chsB)	$-0,4 \pm 0,8$	$-0,2 \pm 0,9$	$-1,4+0,8^{b}$
AN6318 kitin szintáz (csmA)	$\textbf{-0,5}\pm0,9$	-0,4 $\pm$ 0,8	$-1,2 \pm 0,8^{b}$
AN6317 kitin szintáz (csmB)	3,2 ± 1	3,6 ± 1	$3,5 \pm 0,8$
AN4367 kitin szintáz	$6,1\pm0,7$	$6,3 \pm 0,8$	6,3 ± 0,8
AN8710 kitin szintáz regulátor	6,3 ± 1	$6{,}9\pm0{,}7$	$\textbf{6,5} \pm \textbf{0,7}$
AN10696 kitin szintáz regulátor	$2,7\pm0,8$	$3,7\pm0,9$	$3,7\pm0,9$
AN3729 β-1,3-glükán szintáz katalitikus alegysége ( <i>fks1</i> )	-0,6 ± 0,8	$0,2 \pm 0,8$	$-0,6 \pm 0,9$

5. táblázat Az A. *nidulans* FGSC A4 törzs sejtfal bioszintézisben érintett néhány génjének relatív transzkripciója. A 37 °C-on végzett ECB kezelés (350 mg/L végkoncentráció) a mintavétel (45h) előtt 8 órával történt.

a – A relatív transzkripció mértékét a  $\Delta CP$  módszerrel számoltam ki:  $\Delta CP = CP_{gén}$ -CP<sub>referencia</sub>, ahol CP a PCR termék akkumulálódásához szükséges ciklusszám a vizsgált gén (gén), illetve a "housekeeping" gén (referencia) esetében. A "housekeeping" gén az eEF-3 elongációs faktor (AN6700) volt. A  $\Delta CP$  érték csökkenése utal a gén indukciójára. A táblázatban 4 független mérés átlagát és szórását tüntettük fel.

b - szignifikáns eltérés (Student-féle t-teszt, p < 5 %) a 37 °C-on tenyésztett ECB-vel nem kezelt kultúrákhoz képest

A gén azonosítója <sup>a</sup>	A gén neve <sup>a</sup>	GeneBank azonosító szám <sup>b</sup>	A feltételezett A. nidulans ortológokkal való egyezés mértéke <sup>c</sup>
AN6700	transzkripciós elongációs faktor, eEF-3	JN862796	254 (97%); 0; 262
AN7032	Kitin-szintáz, <i>chsA</i>	JN862788	270 (100%); 0; 270
AN2523	Kitin-szintáz, <i>chsB</i>	JN862808	257 (96%); 0; 269
AN6318	kitin-szintáz, <i>csmA</i>	JN862789	193 (96%), 0; 202
AN6317	kitin-szintáz, <i>csmB</i>	JN862790	235 (95%), 0; 247
AN4367	kitin-szintáz	JN862791	203 (98%); 0; 207
AN8710	kitin-szintáz regulátor	JN862792	240 (96%); 0; 250
AN10696	kitin-szintáz regulátor	JN862793	192 (94%); 0; 205
ANID_03729	β-1,3-glükán- szintáz katalitikus alegysége, <i>fksA</i>	JN862794	201 (99%); 0; 202

6. táblázat Az *A. nidulans* var. *roseus* ATCC 58397 megszekvenált génjeinek összehasonlítása a feltételezett *A. nidulans* FGSC A4 ortológ gének szekvenciáival a – A táblázatban az *A. nidulans* genomjában megtalálható ortológok lókuszszámát és nevét tüntettük fel.

b – Az A. nidulans var. roseus szekvenciák a táblázatban feltüntetett GeneBank azonosítószám alatt érhetők el.

c –A táblázatban az azonos nukleotidok számát és arányát (%-ban), a gap-ek számát és a megszekvenált szakasz hosszát adtuk meg.

törzs és tenvésztési hőmérséklet	<b>α</b> -glükán <sup>a</sup>	$\beta$ -glükán <sup>a</sup>	kitin <sup>a</sup>
iongs es tenyesgiest nomensektet	(w/w %)	(w/w %)	(w/w %)
A. nidulans FGSC A4 37 °C	$44 \pm 5$	$19\pm3$	$36\pm5$
A. nidulans FGSC A4 24 °C	$44 \pm 6$	$18\pm3$	$35\pm5$
A. nidulans var. roseus ATCC 58397 37 °C	$48\pm7$	$17\pm3$	$31\pm 6$
A. nidulans var. roseus ATCC 58397 24 °C	$48\pm7$	$6\pm 2^{b,c}$	$45\pm5^{b,c}$

7. táblázat Az A. nidulans var. roseus ATCC 58397 és az A. nidulans FGSC A4 sejtfal összetételének vizsgálata 24 °C-on és 37 °C-on 2. napig inkubált KGL folyékony tenyészetekből származó mintákból

a – A törzsek kitin,  $\alpha$ -glükán és  $\beta$ -glükán tartalmát tisztított és liofilizált sejtfal mintákból Stevens és munkatársai (2006) által leírt protokollt felhasználva határoztuk meg és tömegszázalékban adtuk meg. A táblázatban 5 független mérés átlagát és szórását tüntettük fel.

b – Szignifikáns eltérés a 24 °C-on és a 37 °C-on tenyésztett kultúrák között (Student-féle t-teszt; p<5%).

c – Szignifikáns eltérés a két törzs között (Student-féle t-teszt; p<5%).

Annak érdekében, hogy igazoljuk, hogy a 24 °C-on történő tenyésztés alatt nem szelektálódnak ki echinocandin rezisztens *A. nidulans* var. *roseus* mutánsok, az *A. nidulans* var. *roseus* ATCC 58397 törzs szélesztését követően 10 telepet izoláltunk. A telepek egyik felét 24, a másik felét 37 °C-on tartottuk fenn, majd 5 átoltást követően megvizsgáltuk viselkedésüket 24, illetve 37 °C-on. A kapott adatok alapján az izolátumok echinocandin érzékenysége, sejtfalának kitin tartalma, specifikus  $\beta$ -1,3-glükán szintáz aktivitása és a  $\beta$ -1,3-glükán szintáz ECB érzékenysége nem tért el érdemben egymástól, illetve a korábban tapasztaltaktól (8. táblázat).

Az izolátum száma	Tenyésztési hőmérséklet <sup>a</sup> (°C)	MEC <sub>ECB</sub> <sup>b</sup> (µg/ml)	IC <sub>50,ECB</sub> <sup>b</sup> (ng/ml)	β-1,3-glükán s [nmol/(min <sup>*</sup> 37°C	zintáz aktivitás *mg fehérje)] 24 °C	kitin ta (w/v 37 °C	artalom w %) 24 °C
1.	24 °C	0,5	5,3	1,8	2,5	32	43
2.	24 °C	0,5	5,5	1,8	3,1	36	45
3.	24 °C	0,5	5,5	2,3	3,3	30	48
4.	24 °C	0,5	5,0	2,2	3,2	29	50
5.	24 °C	0,5	5,0	2,1	2,6	35	43
	Átlag ± S.D.:		5,3 ± 0,3	$2,0 \pm 0,2$	$2,9 \pm 0,4^{c}$	$32 \pm 3$	$45 \pm 4^{c}$
6.	37 °C	0,5	5,1	1,6	2,7	28	47
7.	37 °C	0,5	4,7	1,9	3,0	37	48
8.	37 °C	0,5	5,3	2,4	3,3	32	45
9.	37 °C	0,5	5,4	2,7	3,1	34	41
10.	37 °C	0,5	5,3	2,0	2,8	37	50
	Átlag ± S.D.:		5,1 ± 0,3	$2,1 \pm 0,4$	$3,0 \pm 0,2^{c}$	$34 \pm 4$	$46 \pm 4^{c}$

8. táblázat A 24 °C-on és a 37 °C-on előtenyészetett A. nidulans var. roseus izolátumok echinocandin B érzékenységének összehasonlítása

a - Az 1-5 izolátumot 5 átoltáson keresztül 24 °C-on, a 6-10 izolátumot 5 átoltáson keresztül 37 °C-on tenyésztettük a kísérlet elvégzése előtt.

b - A tenyésztési hőmérséklet a MEC és IC<sub>50,ECB</sub> értékeket nem befolyásolta ezért csak a 37 °C-on kapott adatok szerepelnek a táblázatban.

c – Mind a specifikus  $\beta$ -1,3-glükán szintáz aktivitás értékek, mind a sejtfal kitin tartalma szignifikánsan magasabb volt a 24 °C-on tenyésztett kultúrák esetében, szemben a 37 °C-on tenyésztettekkel (Student-féle t-teszt; p < 5 %).

Agardiffúziós, illetve mikrotiter lemezen végzett vizsgálatainkban az SDS és az ECB koncentrációfüggő módon hol erősítették (szinergizmus), hol pedig gyengítették (antagonizmus) egymás antifungális hatását (21. ábra; 9. táblázat). Az *A. nidulans* esetében ugyanazon koncentráció tartományban végzett vizsgálataink során nem volt kimutatható szinergista, vagy antagonista hatás a két szer között (9. táblázat).

A. nidulans var. roseus ATCC 58397 <sup>a</sup>					
	Іо	Ie	IR	Hatás <sup>b</sup>	
ECB (2,5 µg/ml) SDS (50 µg/ml)	94,6	60,2	1,57	Szinergista	
ECB (2,5 µg/ml) SDS (60 µg/ml)	49,5	79,6	0,61	Additív	
ECB (10 $\mu$ g/ml) SDS (50 $\mu$ g/ml)	73,1	86,4	0,85	Additív	
ECB (10 $\mu$ g/ml) SDS (60 $\mu$ g/ml)	44,1	93,0	0,47	Antagonista	
Növekedés <sup>c</sup> (%) 44,1 (ECB 2,5 $\mu$ g	/ml) 15,1 (	ECB 10 µg	/ml) 90,2 (	(SDS 50 µg/ml)	
46,3 (SDS 60 µg/ml)					

A. nidulans FGSC A4					
	Io	Ie	IR	Hatás	
ECB (2,5 µg/ml) SDS (50 µg/ml)	66,7	57,1	1,17	Additív	
ECB (2,5 $\mu$ g/ml) SDS (60 $\mu$ g/ml)	70,2	72,4	0.97	Additív	
ECB (10 µg/ml) SDS (50 µg/ml)	76,5	83,3	0,92	Additív	
ECB (10 µg/ml) SDS (60 µg/ml)	79,1	89,3	0,88	Additív	
Növekedés (%) 62,2 (ECB 2,5 µg/ml) 24,2 (ECB 10 µg/ml) 68,9 (SDS 50 µg/ml) 44,3 (SDS 60 µg/ml)					

9. táblázat Az SDS kezelés hatása az ECB antifungális aktivitására

a - táblázat három független mérés átlagait tartalmazza, a szórás minden adat esetében kisebb volt, mint az átlag 12 %-a.

b - Az ECB-SDS közötti interakciót az IR interakciós értékkel jellemeztem, melyet az Abbott formulát felhasználva határoztuk meg. Az IR > 1,5 szinergista, az 1,5  $\ge$  IR  $\ge$  0,5 additív, míg az IR < 0,5 antagonista hatásra utal. Az Io a két szer együttes jelenlétében mért, míg az Ie a két szer együttes jelenlétében várható (a külön-külön mért növekedési gátlások alapján számolt) százalékos növekedési gátlás (Moreno és munkatársai 2003).

c – A táblázatban szereplő növekedési adatok a zárójelben feltüntetett hatóanyag jelenlétében mért relatív növekedést mutatják.



21. ábra Az SDS hatása az A. nidulans var. roseus ATCC 58397 törzs ECB érzékenységére MN tápagar felületén.

A bal oldali lyukak 20 mg/ml koncentrációjú metanolos ECB oldat 40 µl-ét, a jobb oldali lyukak 2,5 mg/ml (A), illetve 6,25 mg/ml (B) koncentrációjú vizes SDS oldatok 40 µl-ét tartalmazták. A kezelést követően 37 °C-on 3 napig inkubáltuk a tenyészeteket. A nyilak a szinergista (A) és az antagonista (B) hatást jelzik.

## 3.3. A tápközeg összetételének hatása az A. nidulans var. roseus szekunder metabolit termelésére

## 3.3.1. A tápközeg összetételének hatása az A. nidulans var. roseus szterigmatocisztin termelésére

Vizsgálataink célja az volt, hogy a tápközeg összetételének alkalmas megváltoztatásával csökkentsük a törzs ST termelését anélkül, hogy lényegesen befolyásolnák az ECB képződését. Az elvégzett kísérletek alapján az élesztőkivonat adagolása növelte, a szójapepton elhagyása azonban jelentősen csökkentette a törzs ST termelését (10. táblázat). Minthogy a szójapepton elhagyása kedvezőtlenül befolyásolta a termelt ECB mennyiségét is (10. táblázat), a szójapeptont megpróbáltuk valamilyen más szerves nitrogénforrással helyettesíteni. A tesztelt aminosavak és peptonok közül az ECB felépítésében is résztvevő Pro, Thr és Orn elegye, illetve a Phe s a Tyr bizonyultak a legelőnyösebbnek, de az ECB termelés még így is elmaradt a kontroll tenyészetben mért értékektől (10. táblázat). Az ECB kihozatal javítása érdekében megpróbáltuk optimalizálni a tápleves összetételét.

	ECB (µg/g)	ST (µg/g)
kontroll tápleves (GNL)	$231 \pm 17$	$45\pm5$
GNO 10 g/L élesztőkivonattal kiegészítve	$308\pm21$	$50\pm 6$
GNO szójapepton nélkül	$96\pm11$	< 5
GNO szójapepton helyett 10 g/L kazeinpepton	$226\pm15$	$39\pm 6$
GNO szójapepton helyett 15 g/L Arg	$85\pm11$	< 5
GNO szójapepton helyett 15 g/L Met	$79\pm12$	< 5
GNO szójapepton helyett 15 g/L Glu	$81\pm15$	< 5
GNO szójapeptonhelyett 5-5 g/L Orn, Pro és Thr	$155\pm17$	$15\pm3$
GNO szójapepton helyett 15 g/L Tyr	$178 \pm 19$	< 5
GNO szójapepton helyett 15 g/L Phe	$176\pm16$	< 5

Kísérleteinkhez a Tyr-t választottuk nitrogénforrásnak; az optimalizálás a Response Surface Methodology (RSM) módszer segítségével történt.

10. Táblázat Az A. *nidulans* var. *roseus* ATCC 58397 törzs ECB és ST termelése különböző nitrogénforrások jelenlétében.

A törzset szénforrásként glükózt és napraforgóolajat tartalmazó (szójapeptonos) táplevesben tenyésztettük 24 °C-on, 6 napon át. A képződött ECB és ST mennyiségét agardiffúziós módszerrel, illetve vékonyréteg kromatográfia segítségével határoztuk meg. A táblázat három független mérés átlagait és azok szórását tartalmazza.

Előkísérleteink alapján a Tyr, a glükóz és a napraforgóolaj koncentrációja is befolyásolta a szekunder metabolitok képződését. A tápleves további összetevői, a Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 12H<sub>2</sub>O, ZnSO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, FeSO<sub>4</sub> H<sub>2</sub>O érdemben azonban nem befolyásolták azt. A vizsgálatokat Box-Bechnken típusú kísérleti elrendezést használva az 5-35 g/L glükóz, 11-25 g/L Tyr és 10-130 ml/L napraforgóolaj koncentráció tartományban végeztük (11. táblázat).

	Glükóz	Tyr	Napraforgóolaj	<b>ECB</b> <sup>a</sup>
	(g/L)	(g/L)	(ml/L)	( <b>mm</b> )
1.	5	18	10	23,7 ± 1
2.	35	18	10	$26,1\pm2$
3.	5	18	130	19,4 ± 1
4.	35	18	130	$23,0\pm2$
5.	5	11	70	$18,\!2\pm2$
6.	35	11	70	$21,1\pm2$
7.	5	25	70	$22,\!8\pm1$
8.	35	25	70	$22,\!8\pm2$
9.	20	11	10	$18{,}8\pm1$
10.	20	11	130	$16,0\pm 1$
11.	20	25	10	$20{,}4\pm1$
12.	20	25	130	$19,\!4\pm2$
13.	20	18	70	$28,7\pm3$
13.	20	18	70	$28,7\pm3$
13.	20	18	70	28,7 ±1

11. táblázat Az *A. nidulans var. roseus* ATCC 58397 ECB termelésének optimalizálására használt Box-Bechnken típusú kísérleti elrendezés. A táblázatban a kiindulási glükóz, Tyr és napraforgóolaj koncentráció értékek, valamint a 6 napos tenyészetek által termelt ECB mennyisége van feltüntetve.

a - A fermentlevek ECB tartalmát agardiffúziós módszerrel 3 független mérésből határoztuk meg. A táblázatban a 3 mérés átlaga és szórása szerepel. Az ECB mennyiségét a gátlási zóna átmérőjével jellemeztük.

Az RSM kísérletekből származó adatokra az R 2.3.1 statisztikai program segítségével egy 3 változós másodfokú polinomot illesztettünk. A polinom együtthatóinak értékét, a hozzájuk tartozó becsült standard hiba értékekkel és t-értékekkel, valamint az illesztés jóságát jellemző determinációs koefficienst ( $R^2$ ), továbbá az F próba adatait az 12. táblázatban foglaltuk össze.

a koefficiens	a koefficiens	Becsült standard	
jele	értéke	hiba érték	t-érték
b0	28,67	0,48	59,87
b1 (glükóz)	1,11	0,29	3,79
b2 (napraforgóolaj)	-1,4	0,29	-4,78
b3 (tirozin)	1,41	0,29	4,82
b12	0,3	0,41	0,72
b13	-0,73	0,41	-1,75
b23	0,45	0,41	1,085
b11	-1,52	0,43	-3,52
b22	-4,1	0,43	-9,49
b33	-5,92	0,43	-13,72
Reziduális hiba: 0.829	$94 (5 \text{ FG}); \text{R}^2 = 0$	0,958	
F-próba: 36,49 (9 és 5	5 FG), $p = 0,000$	494	

12. táblázat: A 11. táblázatban szereplő kísérleti adatokra illesztett háromváltozós másodfokú polinom statisztikai adatai. A táblázatban feltüntetett értékek az R 2.3.1 (The R Development Core Team; www.r-project.org) statisztikai program segítségével lettek meghatározva.

Az illesztett függvényeknek 24,9 g/L glükóz, 11,6 g/L Tyr és 60,8 ml/L napraforgóolaj értékeknél van maximuma (22. ábra). Ezen kiindulási koncentrációk esetén a fermentáció 6. napján 219  $\pm$  15 µg/g ECB értéket mértünk. Az eredeti GNL táplevesben az ECB mennyisége 231  $\pm$  17 µg/g volt, azaz az ECB termelés még így is valamelyest elmaradt az eredeti értékekhez képest, ugyanakkor a fermentlevek ST tartalmában jelentős különbség volt: 45  $\pm$  5 µg/g (kontoll) és 6,5  $\pm$  2 µg/g (optimalizált).



22. ábra Az 11. táblázatban szereplő adatokra illesztett másodfokú polinom által meghatározott állapotfelületek.

#### 3.3.2. A napraforgóolaj echinocandin B termelésre gyakorolt hatásának vizsgálata

Várakozásainknak megfelelően a napraforgóolajat nem tartalmazó tenyészetekben jelentősen csökkent a termelt ECB mennyisége, ami együtt járt a tenyészetek lúgosodásával és a növekedés idő előtti leállásával (23. ábra).



23. ábra Az A. nidulans var. roseus tenyészetek ECB termelése (A), növekedése (DCM) (B) és pH-ja (C) napraforgóolajat tartalmazó (zöld), napraforgóolaj nélküli (kék), valamint napraforgóolaj helyett keményítőt,  $CaCl_2$ -t és  $(NH_4)_2SO_4$ -ot tartalmazó (narancssárga) GNL táplevesben. Az A ábrán három független mérés átlagát és szórás tüntettük fel; a mintavétel a tenyésztés 6. napján történt. A B és C ábrákon három független mérés átlagai vannak ábrázolva. A szórás egyik pont esetében sem haladta meg a 15 %-ot.

	napraforgóolaj nélkül	napraforgóolaj jelenlétében	paraffinolaj jelenlétében
0 µg/ml ECB	++	++	++
5 μg/ml ECB	+	++	++
10 µg/ml ECB	+/-	+	++
20 µg/ml ECB	++	++	++
40 µg/ml ECB	-	+	++
80 µg/ml ECB	-	+	++

13. táblázat A napraforgóolaj és a paraffinolaj hatása az ECB antifungális aktivitására MN táplevesben.

A vizsgálatokban az *A. nidulans* var. *roseus* ATCC 58397 törzset különböző mennyiségű ECB-t (0-80 µg/ml) tartalmazó Barratt féle minimál-nitrát tápközegben tenyésztettük 37 °C-on. A tápleveseket a kísérlettől függően 75 ml/L napraforgóvagy paraffinolajjal egészítettük ki.

A tenyészetek növekedését a kinőtt micélium mennyiségével jellemeztük.

"++" - az ECB-t nem tartalmazó, kontroll tenyészetekhez hasonló intenzitású növekedés

"+" – a kontroll tenyészetekétől lényegesen gyengébb növekedés

"+/-" - minimális növekedés

"-" – teljes növekedés gátlás

Ammónium-szulfát és keményítő adagolásával ez utóbbi két változás megelőzhető volt, ami kedvezően befolyásolta az ECB termelését is (23. ábra).

A 37 °C-on (ECB-t nem termelő körülmények között) végzett vizsgálataink alapján a napraforgóolaj képes volt mérsékelni a tápközeghez adott ECB antifungális aktivitását (13. táblázat). Hasonló hatást paraffinolaj adagolásával is el lehetett érni (13. táblázat). Érdemes megemlíteni, hogy ha a szénforrásként glükózt és napraforgóolajat tartalmazó komplex tápközegben a napraforgóolajat paraffinolajra cseréltük le, a termelt ECB mennyisége (87 ± 16 µg/g) elmaradt a napraforgóolaj jelenlétében mért értékekhez (231 ± 17 µg/g) képest a tenyésztés 6. napján. (Paraffinolaj, illetve napraforgóolaj hiányában 76 ± 16 µg/g ECB termelődését detektáltuk.)

#### 3.4. A tenyésztési hőmérséklet hatása az A. nidulans var. roseus anyagcseréjére

Annak érdekében, hogy többet megtudjunk az ECB termelést alapvetően meghatározó tenyésztési hőmérséklet (Boeck és Kastner 1981) az *A. nidulans* var. *roseus* fiziológiájára gyakorolt hatásáról DNS chip kísérletet végeztünk, amit 57 gén qRT-PCR-es vizsgálatával egészítettünk ki. A qRT-PCR és a microarray segítségével meghatározott adatok között szoros korrelációt kaptunk ( $R^2 = 0,7405$ ; 24. ábra).



24. ábra A microarray adatok alapján számolt normalizált  $\log_2 R$  és a qRT-PCR alapján kalkulált  $\Delta\Delta CP$  adatok közötti (lineáris) korreláció vizsgálata.

Ezeket a kísérleteket glükózos táplevesben (KGL) végeztük, ugyanis a napraforgóolaj jelenléte megakadályozta a jó minőségű RNS izolálását. A mintavétel a tenyésztés 3. napján (53 h) történt. A mintavétel időpontjában a tenyészetek néhány jellemző tulajdonságát az 14. táblázatban foglaltam össze.

	37 °C	24 °C
növekedés <sup>a</sup> (g/(L * nap))	$9 \pm 1$	$5,6 \pm 0,8*$
szárazanyag tartalom (g/L)	$20\pm3$	$14 \pm 2^*$
glükóz fogyás <sup>a</sup> (g/(L * nap))	$17 \pm 2*$	$10 \pm 1^*$
glükóz tartalom (g/L)	$14 \pm 2$	$18 \pm 3$
pH	$5,5\pm0,2$	$4,9\pm0,1*$
ECB (µg/g)	-	$78 \pm 9^*$
peroxid tartalom (pmol/mg DCM)	$0,9\pm0,2$	$0,5 \pm 0,1*$
GSH (mmol/kg DCM)	$1,8 \pm 0,2$	$4,9 \pm 0,4*$
GSSG (mmol/kg DCM)	$0,\!12\pm0,\!01$	$0,21 \pm 0,02*$
GSH/GSSG	$15 \pm 2$	$24 \pm 4^*$
a sejtfal kitin tartalma (w/w %)	$31\pm 6$	$45 \pm 5^*$
kataláz aktivitás (kat/kg protein)	$0,1\pm0,03$	$0,9\pm0,09*$
glutation reduktáz aktivitás (mkat/kg protein)	$0,8\pm0,1$	$2,2 \pm 0,5*$
nitrát reduktáz aktivitás (mkat/kg protein)	$0,\!2\pm0,\!04$	$0,\!4\pm0,\!07*$

14. táblázat A 24 °C-on, illetve 37 °C-on inkubált *A. nidulans* var. *roseus* tenyészetek néhány jellegzetes tulajdonsága a microarray vizsgálat időpontjában. A törzset KGL táplevesben tenyésztettük, a mintavétel az 53-adik órában történt. A táblázat 4 független mérésből számolt átlagokat és azok szórását tartalmazza. A kétféle tenyésztési hőmérsékleten mért érték közötti szignifikáns eltérést (Student-féle t-teszt, n = 4, p < 5 %) \*-gal jelöltük.

a – A növekedés és a glükóz fogyás sebessége a 30 órás tenyészetekre lettek kiszámítva.

A microarray kísérletekből származó normalizált adatok alapján számolt log<sub>2</sub> R értékek ismeretében a hőmérséklet 37 °C-ról 24 °C-ra való csökkentése 400 gén aktivitását csökkentette, míg 139 gén aktivitását növelte számottevő mértékben (15. táblázat). Ezen gének microarray adatai és az elvégzett qRT-PCR-es vizsgálatok alapján az alábbi változások valószínűsíthetőek a tenyészetben a tenyésztési hőmérséklet 24 °C-ra való csökkentése után (15-16. táblázatok):

1. A szénhidrát anyagcserében bekövetkező kisebb változásra utal néhány glükóz/hexóz transzportert kódoló, illetve a glükóz aerob lebontásában érintett gén

repressziója. Ezzel párhuzamosan néhány poliszacharid (köztük a glikogén) szintézisben érintett gén és a glikogén raktárak mobilizásáért felelős (AN1015 ortológ feltételezett glikogén foszforiláz) gén indukálódott.

2. A korábbi vizsgálatokhoz képest kevés, a sejtfal szintézisben érintett gén aktivitásában tapasztaltunk nagyarányú változást. Ezek alapján a kitin szénforrásként történő hasznosításában érintett feltételezett N-acetil-glükózamin-6-foszfát deacetiláz és glükózamin-6-foszfát izomeráz gének (AN1428 és AN1418 ortológok), valamint egy pepszin-típusú sejtfal proteáz gén (AN8102 ortológ) represszálódott, míg a kitin szintézisben közreműködő *chiA* kitináz ortológja és egy GPI-horgonnyal rendelkező sejtfal fehérje gén (AN5357) ortológja indukálódott.

3. A lipid anyagcserében a szintézis-lebontás egyensúlya a szintézis felé tolódott el.

4. Számos, az aminosavak, nukleotidok szintézisében érintett gén aktivitása csökkent (kivételt képez az AN1734 ortológ feltételezett 3-dehidroshikimát dehidratázt kódoló gén, amely a qRT-PCR-es adatok alapján is indukálódott), míg meglepő módon a nitrát redukcióban érintett gének aktivitása nőtt.

5. A fehérjeszintézis intenzitásának csökkenésre utal számos a transzkripcióhoz, transzlációhoz, poszttranszlációs módosításokhoz kapcsolódó gén repressziója.

6. Számos hőstressz fehérjét kódoló gén represszálódott, néhány a glutation és tioredoxin anyagcserében érintett, illetve DNS repairben közreműködő génekkel együtt; míg három katalázt kódoló gén is indukálódott.

7. A vas anyagcserében érintett gének közül 12 represszálódott és egy sem indukálódott.

8. Számos jelátviteli fehérje génjének aktivitása csökkent és csak kettőé emelkedett meg.

A gén funkciója	37 °C-on aktívabb gének száma	24 °C-on aktívabb gének száma
szénhidrát anyagcsere	15	10
glikolízis, pentóz-foszfát út,	6	1
citrát kör, légzés és a hozzá		
kapcsolódó folyamatok	1	4
glukoneogenezis, szacharid	1	4
folyamatok		
hidrolázok szacharid lebontás	0	2
Transzport	6	1
Egyéb	2	2
	_	-
sejtfal homeosztázis	5	2
sejttal szintezis	0	
Egyáb	4	0
Egyeo	1	1
lipid anyagcsere	6	5
lipid (zsírsav, foszfolipid,	0	5
szteroid) szintézis		
lipid (zsírsav, foszfolipid,	5	0
szteroid) lebontás	1	0
Transzport	1	0
nitrogén anyagcsere	37	7
aminosav, nukleotid szintézis	21	1
aminosav, nukleotid	7	0
szintézis/lebontás	_	
aminosav, nukleotid lebontás	7	1
nitrat redukcio	0	3
Transzport	1	1
Transzport	1	1
fehérje szintézis	39	1
transzkripció, transzláció és a	31	0
hozzá kapcsolódó folyamatok		
folding, poszttranszlációs	8	1
vaitozasok, trafficking		
stressz-fehérjék	21	6
hőstressz fehérjék	11	0
tioredoxin és glutation	7	0
anyagcsere		

Kataláz DNS repair Egyéb	0 3 0	3 0 3
vas anyagcsere	12	0
sziderofór transzport	6	0
Szabályozás	30	2
transzkripciós faktor Egyéb	21	1
Lgyco		1
szekunder anyagcsere	4	3
poliketid szintézis	4	2
nem riboszómális peptid szintézis	0	1
egyéb funkciójú gének	126	34
ismeretlen funkciójú gének	105	69
Összesen	400	139

15. táblázat A microarray kísérletekben indukálódott és represszálódott gének funkció szerinti csoportosítása.

	A gén funkciója	ΔΔCΡ	log <sub>2</sub> R
	szénhidrát anyagcsere		
AN3639	feltételezett alfa-ketosav dehidrogenáz	$-2,05 \pm 0,9*$	-2,07
AN5634	AcuD, izocitrát liáz (1)	$-3,85 \pm 1,1*$	-2,81
AN2314	feltételezett α-1,4-glükán "branching" enzim	$5,15 \pm 0,9*$	2,57
AN1015	feltételezett glikogén foszforiláz	$5,90 \pm 1,4*$	2,76
AN2584	feltételezett hexóz transzporter	$0,80 \pm 1$	-2,69
AN2585	feltételezett MFS monoszacharid transzporter	$-1,60 \pm 1,2$	-2,49
AN4148	feltételezett cukor transzporter	$\textbf{-1,}90 \pm 1, \textbf{5}$	-3,36
	seitfal homeosztázis		
AN1418	feltételezett glükózamin-6-foszfát izomeráz	$-3,70 \pm 1,4^{*}$	-3,92
	feltételezett N-acetil-glükózamin-6-foszfát		
AN1428	deacetiláz	$-5,15 \pm 1,5*$	-3,05
	PepAc, feltételezett pepszin-típusú aszpartát		
AN8102	sejtfal proteáz	$-4,10 \pm 1,2^{*}$	-3,50
AN5357	feltételezett sejtfal fehérje	$6,65 \pm 1,3*$	3,52
AN8241	ChiA, kitináz (2)	$7{,}30\pm0{,}9*$	4,43

	FksA, a β-1,3-glükán szintáz komplex		
AN3729	katalitikus alegysége (3)	$0,10 \pm 1$	-0,15
	1		
AN10471	Ilpia anyagesere	2 50 + 1 2*	4 17
AN10471	feltételezett 2 hidroviacil CoA dehidrogenáz	$-3,30 \pm 1,2^{\circ}$	-4,1/
AIN4934	PkiC, feltételezett zsírsav szintáz béta	$-2,00 \pm 1,4^{+1}$	-2,11
AN3381	alegység	$2,70 \pm 1,5*$	2,07
AN11161	feltételezett foszfatidilszerin dekarboxiláz	$4,75 \pm 1,1*$	3,39
AN6792	GfdB, glicerol-3-foszfát dehidrogenáz	$3,40 \pm 1*$	2,96
A N10550	dehidrogenéz	$2.60 \pm 0.0*$	2 25
AIN10339	demorogenaz	$5,00 \pm 0,9^{*}$	2,55
	nitrogén anyagcsere		
AN4401	feltételezett aszparagin szintáz	$-2,25 \pm 1,2*$	-3,01
AN4159	GlnA, feltételezett glutamin szintáz (4)	$-2,00 \pm 1,3^*$	-2,33
AN1734	feltételezett 3-dehidrosikimát dehidrogenáz	$2,60 \pm 1,4*$	2,69
AN1007	NiiA, nitrit reduktáz (5)	$5{,}50 \pm 1{,}4{*}$	2,22
	fehérieszintézis		
AN6450	feltételezett 60S riboszóma fehérie	$0.85 \pm 1$	-3.06
AN4219	feltételezett RNS polimeráz III alegység	$-2.00 \pm 1.3*$	-2.00
AN7479	feltételezett asznaraginil-tRNS szintáz	$-4.80 \pm 1.5$	-2,60
AN11125	feltételezett glici-tRNS szintáz	$-2.95 \pm 1.6^{*}$	-2.23
1111123	FKBP5 feltételezett peptidil-prolil cisz-	$2,95 \pm 1,0$	2,25
AN10489	transz izomeráz (6)	-1.75 + 1.4*	-2.20
11110105	Cyp7 feltételezett peptidil-prolil cisz-transz	1,70 = 1,1	2,20
AN4583	izomeráz	$-1.60 \pm 0.9^{*}$	-3.36
	feltételezett COPII vezikulum membrán	_,	-,
AN2738	fehérje	$0,\!05 \pm 1,\!4$	-2,11
AN9397	HacA transzkripciós faktor (7)	$0,\!95\pm1,\!7$	-0,61
	strong folgen at at		
AN3581	Stress Jolyamaiok TryP_tioredoxin reduktéz (8)	$1.80 \pm 1.1*$	2 03
AN8602	$Pry \Lambda$ poroviradovin (8)	$-1,80 \pm 1,1^{\circ}$	-2,95
AN3150	foltátolozott gamma glutamil cisztain ligáz	$0.90 \pm 1.2$ 0.10 ± 1.4	-2,05
AN0330	CatB kataláz B (0)	$0,10 \pm 1,4$ 2.05 ± 1.2*	-2,45
AN9627	Cath, Rataláz $\mathbf{D}(\mathbf{y})$	$2,03 \pm 1,2^{*}$	4,01 5,62
AN8037	CalA, Kalalaz A (10)	$4,00 \pm 1,8^{*}$	3,03
AIN0333	feltátalozott USD60 fabária	$2,13 \pm 1,3^{*}$	4,07
AINOU89	feltátalozott HSD00 feltária (11)	$-2,00 \pm 1,2^{*}$	-2,0/
AINO209	feltátelezett HSD20 feltária (11)	$-1, 1 \pm 1^{*}$	-3,21
AN5120	feltátelezett USD70 feltária (11)	$-1,00 \pm 1^{*}$	-3,13
ANJ129	renerelezen HSP/0 lenerje (11)	$-2,00 \pm 0,9^{*}$	-2,30

	vas anyagcsere		
	MirB, feltételezett ferri-sziderofor		
AN8365	transzporter	$-2,05 \pm 1,2*$	-4,12
	feltételezett acil-CoA szintáz (ferrikrocin		
AN0609	szintézis)	$-1,70 \pm 0,9*$	-4,93
	szabályozás		
	GprE, feltételezett G-protein kapcsolt		
AN9199	receptor (12)	$-1,40 \pm 0,8*$	-2,32
AN4238	SchA, szerin/treonin protein kináz (13)	$-4,65 \pm 1,6^{*}$	-2,23
AN1812	JilbA, transzkripciós faktor (14)	$-2,15 \pm 1,3*$	-2,29
AN3675	CpcA transzkripciós faktor (15)	$-0,20 \pm 1,5$	-2,18
	egyéb		
AN5046	anisin (16)	$0,\!20 \pm 1,\!4$	-0,23
AN7820	AflR, transzkripciós faktor (17)	$-0,10 \pm 1,5$	0,14
AN11510	feltételezett atezin	$0,\!80 \pm 1,\!6$	-0,26

16. táblázat A qRT-PCR-rel ellenőrzött gének relatív transzkripciójának különbsége ( $\Delta\Delta$ CP: a relatív transzkripció értékek { $\Delta$ CP} különbsége a 37 és a 24 °C-on inkubált minták esetében) és log<sub>2</sub> R értékei.

A pozitív értékek a 24 °C-on történő indukcióra, a negatívak a 24 °C-on történő represszióra utalnak. A  $\Delta\Delta$ CP értékek esetében 4 párhuzamos mérés alapján számolt átlagértékek és azok szórása van feltüntetve. A \*-gal jelölt értékek esetében a különbség sziginifikánsan eltér (Student-féle t-teszt; n=3, p < 5 %) a nullától.

Ballance és Turner (1986); 2. Yamazaki és munkatársai (2008); 3. Kelly és munkatársai (1996); 4. Schinko és munkatársai (2010); 5. Johnstone és munkatársai (1990); 6. Pemberton (2006); 7. Saloheimo (2003); 8. Thön és munkatársai (2007);
9. Kawasaki és munkatársai (1997); 10. Navarro és munkatársai (1996); 11. Freitas és munkatársai (2011); 12. Han és munkatársai (2004); 13. Fillinger és munkatársai (2002); 14. Strittmatter és munkatársai (2001); 15. Hoffmann és munkatársai (2001);
16. Eigentler és munkatársai (2011); 17. Yu és munkatársai (1996b)

A táblázatban az *A. nidulans* genomjában megtalálható ortológok lókuszszámát és nevét tüntettük fel.

### 3.5. Természetes eredetű antifungális anyagok kölcsönhatásának vizsgálata

A természetben is előforduló antifungális hatású anyagok – ECB, a *Penicillium chrysogenum* antifungális fehérjéje (PAF), valamint az *A. nidulans* extracelluláris kitináza (ChiB) és  $\beta$ -1,3-glükanáza (EngA) – közötti lehetséges kölcsönhatásokat mikrotiter lemezen vizsgáltuk. Az eredményeket a 17-19. táblázatokban foglaltuk össze. A kapott adatoknak megfelelően a ChiB kitináz és az EngA  $\beta$ -1,3-glükanáz felerősítette (szinergista hatás) az ECB antifungális hatását a tesztelt fonalas gombák és élesztők esetében egyaránt (17. táblázat). Ugyanakkor a ChiB és az EngA nem mutatott sem szinergizmust, sem antagonizmust a PAF-fal (18. táblázat). Vizsgálataink alapján - a várakozásoknak megfelelően (Hegedűs és munkatársai 2011) - a PAF (5, illetve 65 µg/ml) nem befolyásolta a *Saccharomyces cerevisiae* és a *Candida albicans* növekedését és nem volt hatással az ECB (3-30 µg/ml), a ChiB (0,6 U/ml), illetve az EngA (12 U/ml) antifungális aktivitására sem. Ezzel ellentétben az ECB és a PAF között antagonista hatást mutattunk ki a tesztelt *Aspergillus*ok esetében egyes koncentráció tartományokban (19. táblázat).

A. nidulans FGSC A4 EngA + ECB <sup>a</sup>					
	Io	Ie	IR	Hatás <sup>b</sup>	
EngA (12 U/ml) ECB (6 µg/ml)	75,1	66,3	1,13	Additív	
EngA (12 U/ml) ECB (10 µg/ml)	80,6	84,4	0,96	Additív	
Növekedés (%) <sup>c</sup> : 64,1 (EngA 12 U/ml)	52,5 (EC	B 6 μg/m	l) 24,4 (E	CB 10 µg/ml)	
A. nidulans var. roseus	ATCC	58397 En	gA + ECl	B	
	Io	Ie	IR	Hatás	
EngA (12 U/ml) ECB (1 µg/ml)	86,6	32,2	2,27	Szinergista	
EngA (12 U/ml) ECB (3 µg/ml)	96,1	82,5	1,17	Additív	
Növekedés (%): 88,1 (EngA 12 U/ml) 70,2 (ECB 1 µg/ml) 19,9 (ECB 3 µg/ml)					
A. fumigatus FG	SC 1100	EngA + 1	ECB		
Io Ie IR Hatás					
EngA (12 U/ml) ECB (3 µg/ml)	77,6	48,3	1,61	Szinergista	
EngA (12 U/ml) ECB (6 µg/ml)	97,3	80,0	1,22	Additív	
Növekedés (%): 82,5 (EngA 12 U/ml) 62,2 (ECB 3 µg/ml) 24,2 (ECB 6 µg/ml)					

S. cerevisiae S288C EngA + ECB					
	Io	Ie	IR	Hatás	
EngA (12 U/ml) ECB (0,15 µg/ml)	86,8	51,9	1,67	Szinergista	
EngA (12 U/ml) ECB (0,3 µg/ml)	90,9	57,6	1,58	Szinergista	
Növekedés (%): 65,4 (EngA 12 U/ml) 7	73,6 (ECI	B 0,15 μg	/ml) 64,9	(ECB 0,3 µg/ml)	
C. albicans ATC	C 14053	EngA +	ECB		
	Io	Ie	IR	Hatás	
EngA (12 U/ml) ECB (0,15 µg/ml)	86,7	71,2	1,59	Szinergista	
EngA (12 U/ml) ECB (0,3 µg/ml)	89,3	75,6	1,53	Szinergista	
Növekedés (%): 63,1 (EngA 12 U/ml) 7	72,3 (ECI	B 0,15 μg	/ml) 66,3	(ECB 0,3 µg/ml)	
A. nidulans FG	GSC A4 (	ChiB + E	СВ		
	Io	Ie	IR	Hatás	
ChiB (0,6 U/ml) ECB (6 µg/ml)	74,3	73,2	1,02	Additív	
ChiB (0,6 U/ml) ECB (10 µg/ml)	82,2	87,5	0,94	Additív	
Növekedés (%): 51,1 (ChiB 0,6 U/ml) 5	52,5 (ECI	B 6 μg/m	l) 24,4 (E	CB 10 µg/ml)	
A. nidulans var. roseu	s ATCC	58397 C	hiB + EC	В	
	Io	Ie	IR	Hatás	
ChiB (0,6 U/ml) ECB (1 µg/ml)	92,6	29,8	1,91	Szinergista	
ChiB (0,6 U/ml) ECB (3 µg/ml)	96,9	85,4	1,13	Additív	
Növekedés (%): 73,4 (ChiB 0,6 U/ml) 70,2 (ECB 1 µg/ml) 19,9 (ECB 3 µg/ml)					
A. fumigatus FGSC 1100 ChiB + ECB					
	Io	Ie	IR	Hatás	
ChiB (0,6 U/ml) ECB (3 µg/ml)	93,3	59,7	1,56	Szinergista	
ChiB (0,6 U/ml) ECB (6 µg/ml)	97,3	84,4	1,15	Additív	
Növekedés (%): 64,3 (ChiB 0,6 U/ml) 6	52,2 (ECI	B 3 μg/m	l) 24,2 (E	CB 6 µg/ml)	
S. cerevisiae S	5288C C	hiB + EC	B		
	Io	Ie	IR	Hatás	
ChiB (0,6 U/ml) ECB (0,15 µg/ml)	29.8	34.3	0.87	Additív	
ChiB (0,6 U/ml) ECB (0,3 µg/ml)	65.7	42.0	1.56	Szinergista	
Növekedés (%): 89,3 (ChiB 0,6 U/ml) 73,6 (ECB 0,15 µg/ml) 64,9 (ECB 0,3 µg/ml)					
C. albicans ATCC 14053 ChiB + ECB					
	Io	Ie	IR	Hatás	
ChiB (0.6 U/ml) ECB (0,15 µg/ml)	61,2	57,3	1,42	Additív	
ChiB (0.6 U/ml) ECB (0,3 µg/ml)	77,4	63,9	1,61	Szinergista	
Növekedés (%): 78,7 (ChiB 0,6 U/ml) 72,3 (ECB 0,15 µg/ml) 66,3 (ECB 0,3 µg/ml)					

17. táblázat A sejtfalbontó enzimek (ChiB, EngA) hatása az ECB antifungális aktivitására

a – A táblázat három független mérés átlagait tartalmazza, a szórás minden adat esetében kisebb volt, mint az átlag 15 %-a.

b - Az antifungális hatású szerek közötti interakciót az IR interakciós értékkel jellemeztem, melyet az Abbott formulát felhasználva határoztuk meg. Az IR > 1,5 szinergista, az 1,5  $\ge$  IR  $\ge$  0,5 additív, míg az IR < 0,5 antagonista hatásra utal. Az Io
a két komponens együttes jelenlétében mért, míg az Ie a két szer együttes jelenlétében várható (a külön-külön mért növekedési gátlások alapján számolt) százalékos növekedési gátlás (Moreno és munkatársai 2003).

c- A táblázatban szereplő növekedési adatok a zárójelben feltüntetett hatóanyag jelenlétében mért relatív növekedést mutatják.

A. nidulans FGSC A4 EngA + PAF <sup>a</sup>				
	Io	Ie	IR	Hatás <sup>b</sup>
EngA (12 U/ml) PAF (5 µg/ml)	48,2	60,8	0,79	Additív
EngA (12 U/ml) PAF (65 µg/ml)	50,3	83,1	0,60	Additív
Növekedés <sup>c</sup> (%): 64,1 (EngA 12 U/ml) (	51,1 (PA	.F 5 μg/	ml) 26,3	(PAF 65 µg/ml)
A. nidulans var. roseus A	A. nidulans var. roseus ATCC 58397 EngA + PAF			
	Io	Ie	IR	Hatás
EngA (12 U/ml) PAF (5 µg/ml)	24,3	32,7	0,74	Additív
EngA (12 U/ml) PAF (65 µg/ml)	62,1	87,0	0,71	Additív
Növekedés (%): 88,1 (EngA 12 U/ml) 76,4 (PAF 5 µg/ml) 14,8 (PAF 65 µg/ml)				(PAF 65 µg/ml)
A. fumigatus FGSC 1100 EngA + PAF				
	Io	Ie	IR	Hatás
EngA (12 U/ml) PAF (5 µg/ml)	41,2	57,4	0,72	Additív
EngA (12 U/ml) PAF (65 µg/ml)	55,5	69,3	0,79	Additív
Növekedés (%): 82,5 (EngA 12 U/ml) 5	51,6 (PA	F 5 μg/ı	nl) 36,6	(PAF 65 µg/ml)
A. nidulans FGSC A4 ChiB + PAF				
	Io	Ie	IR	Hatás
ChiB (0,6 U/ml) PAF (5 µg/ml)	59,1	68,8	0,86	Additív
ChiB (0,6 U/ml) PAF (65 µg/ml)	64,5	86,6	0,74	Additív
Növekedés (%): 51,1 (ChiB 0,6 U/ml) 61,1 (PAF 5 µg/ml) 26,3 (PAF 65 µg/ml)				
A. nidulans var. roseus ATCC 58397 ChiB + PAF				
	Io	Ie	IR	Hatás
ChiB (0,6 U/ml) PAF (5 µg/ml)	30,9	43,9	0,70	Additív
ChiB (0,6 U/ml) PAF (65 µg/ml)	65,4	89,1	0,73	Additív
Növekedés (%): 73,4 (ChiB 0,6 U/ml) 76,4 (PAF 5 µg/ml) 14,8 (PAF 65 µg/ml)				
A. fumigatus FGSC 1100 ChiB + PAF				
	Io	Ie	IR	Hatás
ChiB (0,6 U/ml) PAF (5 µg/ml)	48,8	66,8	0,73	Additív
ChiB (0,6 U/ml) PAF (65 µg/ml)	52,3	76,5	0,68	Additív
Növekedés (%): 64,3 (ChiB 0,6 U/ml) 51,6 (PAF 5 µg/ml) 36,6 (PAF 65 µg/ml)				

18. táblázat A PAF hatása a sejtfalbontó enzimek (ChiB, EngA) antifungális aktivitására

a – A táblázat három független mérés átlagait tartalmazza, a szórás minden adat esetében kisebb volt, mint az átlag 15 %-a.

b - Az antifungális hatású szerek közötti interakciót az IR interakciós értékkel jellemeztük, melyet az Abbott formulát felhasználva határoztuk meg. Az IR > 1,5 szinergista, az 1,5  $\ge$  IR  $\ge$  0,5 additív, míg az IR < 0,5 antagonista hatásra utal. Az Io

a két szer együttes jelenlétében mért, míg az Ie a két szer együttes jelenlétében várható (a külön-külön mért növekedési gátlások alapján számolt) százalékos növekedési gátlás (Moreno és munkatársai 2003).

c – A táblázatban szereplő növekedési adatok a zárójelben feltüntetett hatóanyag jelenlétében mért relatív növekedést mutatják.

A. nidulans FGSC A4 PAF + ECB <sup>a</sup>				
	Io	Ie	IR	Hatás <sup>b</sup>
PAF (5 µg/ml) ECB (3 µg/ml)		46,2	0,27	Antagonista
PAF (5 $\mu$ g/ml) ECB (6 $\mu$ g/ml)		67,9	0,32	Antagonista
PAF (65 $\mu$ g/ml) ECB (10 $\mu$ g/ml)		93,6	0,46	Antagonista
Növekedés <sup>c</sup> (%): 61,1 (PAF 5 µg/ml) 26,3 (PAF 65 µg/ml) 88,1 (ECB 3 µg/ml) 52				ECB 3 µg/ml) 52,5
(ECB 6 µg/ml) 24,4 (ECB 10 µg/ml)				
A. nidulans var. roseus ATCC 58397 PAF + ECB				
	Io	Ie	IR	Hatás
PAF (5 µg/ml) ECB (1 µg/ml)	34,6	46,4	0,75	Additív
PAF (5 $\mu$ g/ml) ECB (3 $\mu$ g/ml)	52,6	84,8	0,62	Additív
PAF (65 μg/ml) ECB (2 μg/ml)		90,3	0,49	Antagonista
Növekedés (%): 76,4 (PAF 5 µg/ml) 14,8 (PAF 65 µg/ml) 70,2 (ECB 1 µg/ml) 19,9				
(ECB 3 µg/ml) 55,1 (ECB 2 µg/ml)				
A. fumigatus FGSC 1100 PAF + ECB				
	Io	Ie	IR	Hatás
PAF (5 µg/ml) ECB (1 µg/ml)	51,5	78,5	0,9	Additív
PAF (5 $\mu$ g/ml) ECB (3 $\mu$ g/ml)	55,2	93,8	0,81	Additív
PAF (65 μg/ml) ECB (0,5 μg/ml)	23,5	65,2	0,36	Antagonista
Növekedés (%): 51,6 (PAF 5 µg/ml) 36,6 (PAF 65 µg/ml) 82,6 (ECB 1 µg/ml) 62,2				
(ECB 3 µg/ml) 95,1 (ECB 0,5 µg/ml)				

19 . táblázat A PAF hatása az ECB antifungális aktivitására

a – A táblázat három független mérés átlagait tartalmazza, a szórás minden adat esetében kisebb volt, mint az átlag 15 %-a.

b - Az antifungális hatású szerek közötti interakciót az IR interakciós értékkel jellemeztem, melyet az Abbott formulát felhasználva határoztuk meg. Az IR > 1,5 szinergista, az 1,5  $\ge$  IR  $\ge$  0,5 additív, míg az IR < 0,5 antagonista hatásra utal. Az Io a két szer együttes jelenlétében mért, míg az Ie a két szer együttes jelenlétében várható (a külön-külön mért növekedési gátlások alapján számolt) százalékos növekedési gátlás (Moreno és munkatársai 2003).

c – A táblázatban szereplő növekedési adatok a zárójelben feltüntetett hatóanyag jelenlétében mért relatív növekedést mutatják.

# 4. Eredmények megbeszélése

#### 4.1. Az A. nidulans var. roseus ATCC 58397 törzs polifázikus jellemzése

Az A. nidulans var. roseus ATCC 58397 törzs néhány tulajdonságát tekintve átmenetet képez az A. nidulans és az A. rugulosus fajok között. Az A. nidulans és az A. rugulosus törzsek közötti legfőbb mikromorfológiai különbség az aszkospórák sejtfalának eltérő szerkezete: az A. nidulans aszkospóráinak fala sima, míg az A. rugulosus aszkospóráinak fala redőzött (2. ábra). Az ATCC 58397 törzs esetében az aszkospórák fala sima (Boeck és Kastner 1981; Klich és munkatársai 2001). A törzset elsősorban e tulajdonsága alapján sorolták az A. nidulans fajba. Szobahőmérsékleten mutatott szokatlanul lassú növekedése és ECB termelése ugyanakkor az A. rugulosus fajhoz teszi hasonlóvá (Boeck és Kastner 1981; Klich és munkatársai 2001). Saját vizsgálataink alapján az A. nidulans var. roseus 24 °C-on mutatott növekedése - a tesztelt A. rugulosus törzsekhez hasonlóan - valamennyi vizsgált szénforráson lényegesen elmaradt az A. nidulans-étól, noha 37 °C-on számottevő növekedésbeli különbség nem volt a törzsek között (8. ábra). Meglepő módon rázott lombikos kísérletekben, napraforgóolajat tartalmazó GNL táplevesben, az A. nidulans var. roseus 24 °C-on is legalább ugyan olyan jól, sőt inkább gyorsabban növekedett, mint az A. nidulans (9. ábra). Érdemes azonban kihangsúlyozni, hogy az A. nidulans var. roseus viselkedése e tekintetben is hasonlóságot mutatott a vizsgált A. rugulosus törzsekével (9. ábra).

A gombák által termelt szekunder metabolitok vizsgálata gyakran használt eljárás taxonomiai problémák megoldására, noha a megfigyelt spektrum nagyban függ a tenyésztés körülményeitől *Aspergillus* fajok esetében is (Klich és munkatársai 2001). Frisvad (1985) vizsgálataiban kimutatta, hogy megfelelő tenyésztési körülmények között az *A. nidulans* és az *A. rugulosus* szekunder metabolit spektruma akár teljesen meg is egyezhet. Klich és munkatársai (2001) ugyanakkor arra hívták fel a figyelmet, hogy mindkét faj esetben igen nagy a fajon belüli variabilitás. Éppen ezért sok szerző szerint a szekunder metabolit spektrum vizsgálata (önmagában) csak korlátozott mértékben alkalmas a fajok közötti különbségek kimutatására (Geiser és munkatársai 1998). Saját vizsgálatainkban a kontrollként használt két *A. rugulosus* törzs között jelentős eltéréseket detektáltunk (12. ábra) összhangban Klich és munkatársai (2001) megállapításaival. A 24 °C-os inkubáció alatt termelt antifungális aktivitás (ECB) (1. táblázat, 10-11. ábra) és egy a vékonyréteg kromatográfiás eljárással is megbízhatóan detektálható komponens jelenléte (12. ábra) alapján azonban az *A. nidulans* var. *roseus* szekunder metabolit termelését tekintve is inkább hasonlított az *A. rugulosus*, mint az *A. nidulans* fajéhoz.

vizsgálatokat Α klasszikus taxonómiai molekuláris markerek meghatározásával egészítettük ki. A DNS szekvenciák tanulmányozásához olyan marker géneket választottunk, melyeket rutinszerűen használnak a gombák és különösen az Aspergillusok rendszerezésére és melyek alkalmasak akár önmagukban is a fajok elkülönítésére. Választásunk a kalmodulin és β-tubulin génekre esett, melyek intronjaiknak köszönhetően igen variábilisak, így közelrokon fajok elkülönítésére is alkalmasak (Henry és munkatársai 2000; Geiser és munkatársai 2007; Peterson 2008). Vizsgálatainkat egy az Aspergillusok esetében ritkábban tanulmányozott sok intronos gén, a γ-aktin vizsgálatával egészítettük ki és elvégeztük az ITS szekvenciák meghatározását is, noha ezen szekvenciák Aspergillusok esetében inkább csak a sectiok elkülönítésre alkalmasak (Bruns 2001). A parciális kalmodulin és β-tubulin szekvenciák filogenetikai vizsgálata (14. ábra) egyértelműen igazolta, hogy - a fenotipikus eredményeinkkel és a γ-aktin szekvencia adatokkal (2. táblázat) összhangban - az A. nidulans var. roseus törzs nem az A. nidulans fajhoz tartozik és igen szoros rokonságban áll az A. rugulosus fajjal.

Keresztezési kísérleteinkben az Aspergillusokra is jellemző paraszexuális ciklust kihasználva sikerült hibrid telepeket létrehozni az A. nidulans, valamint az A. nidulans var. roseus, illetve az A. nidulans és az A. rugulosus általunk létrehozott mutánsai között. A hibrid kolóniák többségére jellemző csökkent konidium képzés és növekedés, valamint az a tény, hogy az A. nidulans FGSC A146 törzzsel való keresztezés esetén csak egyféle fenotípusú hibrid kolóniák keletkeztek, arra utal, hogy az A. nidulans és az A. rugulosus (A. nidulans var. roseus) genom nem teljesen

kompatibilis egymással. Irodalmi adatok alapján tudjuk, hogy Kevei és Peberdy (1979, 1984), hasonlóan Bradshaw és munkatársaihoz (1983) protoplaszt fúziós technikával stabil heterokarionos tenyészeteket, sőt allodiploidokat és hibrideket is létre tudott hozni az A. nidulans és A. rugulosus törzsek felhasználásával. A legtöbb hibrid az ő esetükben is csökkent konidiogenezist és gyenge növekedést mutatott (Kevei és Peberdy 1979, 1984). Bradshow és munkatársai (1983) szintén protoplasztfúziós technikával azt is kimutatták, hogy az A. rugulosus feltehetőleg 10 kromoszómával rendelkezik, szemben az A. nidulans 8 kromoszómájával, így az A. nidulans egy-egy kromoszómája gyakran csak egynél több A. rugulosus kromoszómával volt funkcionálisan helvettesíthető a protoplasztfúziós kísérletekben. Az A. nidulansban a riboflavin auxotrófiát okozó riboB2 mutáció, a Trp auxotrófiát okozó *nicB8* mutáció, valamint a  $\beta$ -tubulin gén a VIII. kromoszómán található. Az A. nidulans var. roseus VT15 x A. nidulans FGSC A146 keresztezésből származó hibridek mindegyike riboflavin auxotróf volt és az A. nidulansra jellemző β-tubulin szekvenciát hordozták (mint az FGSC A146 törzs), de Trp prototrófiát mutattak (mint a VT15 törzs). Ez legkönnyebben úgy magyarázható, ha feltételezzük, hogy az A. nidulans var. roseus esetében a nicB gén nem ugyanazon a kromoszómán van, mint a *riboB* és a  $\beta$ -tubulin gén, így az A. *nidulans* VIII-as kromoszómáján lévő nicB-t érintő mutációt az A. nidulans var. roseus egy másik kromoszómája komplementálta. Azaz, az A. nidulans var. roseus kromoszómái, hasonlóan az A. rugulosuséihez, nem teljesen egyenértékűek az A. nidulans kromoszómákkal. Bár a keresztezési vizsgálatok is megerősítik, hogy az A. nidulans var. roseus viselkedése igen hasonló az A. rugulosus törzsek viselkedéséhez és eltér az A. nidulansétól, az A. nidulans és az A. rugulosus, illetve az A. nidulans és az A. nidulans var. roseus közötti sikeres paraszexuális hibridizáció felveti annak lehetőségét, hogy egyes szokatlan viselkedésű Aspergillus törzsek (köztük az A. nidulans var. roseus is) fajok közötti kereszteződés segítségével tettek szert rendhagyó tulajdonságaikra.

# 4.2. Az *A. nidulans* var. *roseus* ATCC 58397 törzs echinocandin rezisztenciájának vizsgálata

Az A. nidulans var. roseus, mint ECB termelő törzs szükségszerűen rezisztens (valamilyen mértékig) a saját maga által termelt antifungális szerrel szemben. ECB rezisztenciájának megismerése hozzásegíthet a humánpatogén *Aspergillus* fajok szerzett echinocandin rezisztenciájának megértéséhez és ezen keresztül a rezisztencia kialakulásának megelőzéséhez, illetve a rezisztens törzsek okozta fertőzések hatékony terápiájához is. Az A. nidulans var. roseust eredményesen használják az iparban az anidulafungin alapanyagának az ECB-nek az előállítására (Murdoch és Plosker 2004). A törzs ECB rezisztenciájának megismerése így nem csak egészségügyi szempontból lehet érdekes, de az ipari törzsfejlesztéshez is hasznos információkat szolgáltathat, hiszen az intenzív ECB termelés feltétele, hogy a termelő törzs képes legyen elviselni a megnövekedett ECB koncentrációt is.

Vizsgálataink alapján az *A. nidulans* var. *roseus* nem rendelkezett konstitutív echinocandin rezisztenciával; ECB nem termelő körülmények között kifejezetten érzékenynek mutatkozott ECB-vel és CAS-nal, mint félszintetikus echinocandinnal szemben (3. táblázat, 17-18. ábra). Sőt, érzékenysége nagyobbnak bizonyult, mint az ECB termelésre nem képes *A. nidulans*é (3. táblázat, 17-18. ábra). Tekintettel arra, hogy az echinocandinok β-1,3-glükán szintáz inhibitorok, az *A. nidulans* var. *roseus*nak az *A. nidulans*nál nagyobb echinocandin érzékenysége összhangban van az *A. nidulans*énál alacsonyabb specifikus β-1,3-glükán szintáz aktivitásával (3. táblázat). Az *A. nidulans* var. *roseus* echinocandin toleranciája ECB adagolásával indukálhatónak bizonyult ECB-t nem termelő körülmények között is (19. ábra). Az indukálódó rezisztenciának köszönhetően felületi kultúrákban egy jellegzetes formájú gátlási zóna alakult ki (19. ábra). E gátlási mintázat párhuzamba állítható az *A. fumigatus*nál megfigyelt paradox-effektussal (Antachopoulos és munkatársai 2008). A tenyészetekbe fúrt lyukba cseppentett ECB, a lyuktól távol (kis koncentrációban) is kifejtette növekedésgátló hatását, ugyanakkor a gomba növekedése nagyobb ECB koncentrációk esetén (a lyukhoz közel) sem állt le létrehozva a jellegzetes, egyenes lefutású mintázatot (19. ábra).

Az élesztők szerzett echinocandin rezisztenciája esetében gyakran megfigyeltekkel ellentétben (Walker és munkatársai 2010) az A. nidulans var. roseus indukálható rezisztenciája nincs kapcsolatban a β-1,3-glükán szintáz aktivitások echinocadinnal történő gátolhatóságának megváltozásával (3. és 8. táblázatok). A megfigyelt indukálható rezisztencia hátterében az alábbi folyamatok állhattak: 1. Indukálódó kitin szintézis. Erre utal, hogy ECB jelenlétében, illetve ECB termelő körülmények között több, a kitin szintézisben résztvevő gén is indukálódott (4. táblázat) illetve, hogy ECB termelő körülmények között a hifákban valóban ki is mutatható a megnövekedett kitin tartalom (7. táblázat). Az echinocandin kezelés hatására indukálódó kitin szintézis a C. albicans (Walker és munkatársai 2008) és az Aspergillus fumigatus (Fortwendel és munkatársai 2009; Walker és munkatársai 2010) esetében szintén megfigyelhető. 2. Megnövekedett specifikus  $\beta$ -1,3-glükán szintáz aktivitás. Hasonló jelenséget többek között egy echinocandinokkal szemben rezisztensé vált klinikai A. fumigatus törzs esetében írtak le (Arendrup és munkatársai 2008; 2009). 3. Lassú növekedés. Minthogy az echinocandinok a sejtfal szintézisét gátolják, de a már megszintetizált sejtfalat nem károsítják, az ECB termelő körülmények között tapasztalható lassú növekedés (8. ábra, 14. táblázat) valószínűleg szintén segítette a gomba ECB rezisztenciájának kialakulását. Érdemes megemlíteni, hogy a növekedés és az ECB termelés kapcsolata "kölcsönös". Amellett, hogy a lassú növekedés segítheti az ECB tolerancia kialakulását, a termelt ECB antifungális hatása révén ellensúlyozza a lassú növekedésből adódó gyengébb kompetíciós képesség hátrányos következményeit (13. ábra).

Az ECB rezisztencia kialakulását legalább részben maga az ECB (illetve az általa kiváltott sejtfalkárosodás) indukálhatta. Erre utal, hogy ECB rezisztencia ECB nem termelő körülmények között is kialakult ECB kezelés hatására (19. ábra) illetve, hogy az ECB kezelés ECB nem termelő körülmények között is indukált több kitin szintézisben is résztvevő gént (4. táblázat). A sejtfal stressz kiváltására gyakran használt SDS és az ECB között megfigyelt antagonista hatás (9. táblázat, 21. ábra)

szintén arra utal, hogy a sejtfal stressz válasz indukálódása segítheti az ECB elleni védekezést, ahogy azt a C. albicans és az A. fumigatus esetben is leírták (Walker és munkatársai 2008, Fortwendel és munkatársai 2009). Az ECB és az SDS meghatározott koncentráció tartományban azonban szinergista hatást is mutatott (9. táblázat, 21. ábra), azaz az ECB (SDS) által indukált változások növelték a sejtek SDS-sel (ECB-vel) szemben mutatott érzékenységét. Ez egyben megmagyarázhatja azt is, hogy miért nem alakult ki konstitutív echinocandin rezisztencia az A. nidulans var. roseusban. A konstitutív rezisztencia ECB nem termelő körülmények között hátrányos lehet a gomba számára, mert fokozhatja egyes sejtfal stresszorokkal szintén ECB szembeni érzékenységét. Feltehetőleg az rezisztencia indukálhatóságával függ össze, hogy ECB nem termelő körülmények között az A. *nidulans* var. *roseus*ban alacsony  $\beta$ -1,3-glükán szintáz aktivitás volt mérhető. A kis aktivitásnak köszönhetően az ECB már igen kis koncentrációban is képes lehet megzavarni a sejtfal homeosztázist, így a rezisztencia kialakulásáért felelős folyamatok még jóval a nagy volumenű ECB szintézis megindulása előtt indukálódhatnak. Érdemes megemlíteni, hogy ha az A. nidulanst már eleve ECB tartalmú tápagaron tenyésztjük, azaz gátoljuk a  $\beta$ -1,3-glükán szintáz aktivitásának egy részét nem induktív mennyiségű (5. táblázat) ECB-vel, akkor az ECB adagolás ugyanúgy kiváltja a paradox-effektusra, azaz az ECB rezisztencia indukálódására utaló egyenes lefutású gátlási zóna kialakulását, mint ami az A. nidulans var. roseus esetben is megfigyelhető volt. Azaz, az ECB rezisztencia indukálódását valóban segítheti a β-1,3-glükán szintáz alacsony aktivitása.

# 4.3. A tápközeg összetételének hatása az A. nidulans var. roseus szekunder metabolit termelésére

A ST, mint teratogén, mutagén és karcinogén hatású mikotoxin az ECB egyik legfontosabb szennyezője, amely komoly gondot okoz az ECB tisztításánál és a visszamaradt szennyvíz kezelésénél is. A ST képződésének megakadályozására két lehetőség kínálkozik: 1) A ST szintézisben érintett valamelyik gén inaktiválása (klasszikus, vagy irányított mutagenezissel). 2) A tenyésztési körülmények alkalmas

megválasztása. Az előbbire példa Hodges és munkatársai (1994) munkája, akik random mutagenezis és szelekció segítségével izoláltak egy ST-t nem termelő A. nidulans var. roseus mutánst és egyben igazolták, hogy a ST szintézis megszüntetése nem befolyásolja érdemben az ECB képződését. A tápközeg összetételének és általában a tenyésztési körülményeknek a gombák szekunder metabolit spektrumát befolyásoló tulajdonsága közismert jelenség. Számos irodalmi adat áll rendelkezésre a ST és a vele rokon aflatoxinok képződésének szabályozásáról, noha ezek esetenként ellentmondásosak. Több szerző is leírta az aflatoxin képződés glükózzal és más megfelelően jó szénforrással történő indukálhatóságát (Wiseman és Buchanan 1987, Abdollahi és Buchanan 1981), ugyanakkor Szilágyi és munkatársai (2012) azt tapasztalták, hogy az A. nidulans ST termelését a szénéhezés indukálta. A magas (28 °C feletti) tenyésztési hőmérséklet és a savas pH (pH 4-7), mind a ST, mind az aflatoxinok képződésének kedvez (Keller és munkatársai 1997, Feng és Leonard 1998). Feng és Leonard (1998) megfigyelései alapján az ammónia gátolta, míg a nitrát serkentette a ST termelést az A. nidulans tenyészetekben akár peptonnal együtt, akár egyedüli nitrogén forrásként használták őket. Az aflatoxinok esetében azonban ellentétes hatást figyelték meg (Bennett és munkatársai 1979, Kachholz és Demain 1983). Keller és munkatársai (1997) kimutatták, hogy a nitrogén-forrás szabályozó szerepe elhanyagolható a pH hatása mellett és valószínűleg a nitrogén-forrás is - legalább részben - a pH-n keresztül befolyásolja az A. nidulans ST termelését.

Tekintettel arra, hogy az optimális ECB termelés szempontjából az alacsony (24 °C) tenyésztési hőmérséklet és a gyengén savas pH (pH 5,5) alapvetően fontos (Boeck és Kastner 1981), e két paramétert nem változtattuk meg. Helyette a tápközeg szén- és nitrogén-forrás összetételét próbáltuk módosítani annak érdekében, hogy mérsékeljük a termelt ST mennyiségét. A napraforgóolaj jelenléte nélkülözhetetlennek bizonyult a nagy volumenű ECB képződéshez (23. ábra). A napraforgóolaj jelenléte - azon túl, hogy a belőle felszabaduló linolsav közvetlenül beépülhet az ECB-be - több ok miatt is előnyös lehetett: 1) Biztosította a tenyészet (és így az ECB-termelő biomassza) lassú növekedését a glükóz gyors elfogyását követően (11. és 23. ábra). 2) Gátolta a tenyészet lúgosodását (23. ábra). Ez utóbbi

hatás feltehetőleg részben a trigliceridből felszabaduló zsírsavaknak köszönhető, részben annak, hogy a növekedés biztosításával megakadályozta a szénéhezésre adott stresszválasz és ennek keretében az ammóniatermelés indukálódását (Emri és munkatársai 2004). 3) Csökkentette a termelt ECB antifungális hatását a termelő törzsre nézve (13. táblázat). Az ECB, lipofil jellegéből adódóan beoldódhatott a napraforgóolaj micellákba, ezáltal csökkenhetett a tápközeg vizes fázisának hatóanyagtartalma, de nem zárható ki az a lehetősg sem, hogy a napraforgóolaj a sejtfalhoz tapadva megváltoztatta annak ECB-vel szembeni permeábilitását. A napraforgóolajhoz hasonlóan viselkedett a parafinolaj is (13. táblázat), ami kizárja annak lehetőségét, hogy a napraforgóolaj, mint tápanyag a gomba anyagcseréjét befolyásolva változtatta meg ECB érzékenysgét.

Megfigyeléseink alapján a táplevesben lévő nitrogén-forrás jelentősen befolyásolta a ST termelést, igaz hatással volt az ECB termelésre is (10. táblázat). A szójapepton drasztikusan csökkentette a termelt ST mennyiségét, de kedvezőtlenül befolyásolta fermentlevek ECB tartalmát is. A szójapepton mentes táptalajhoz adott Orm, Pro, Thr, illetve a Tyr és Phe egyaránt serkentették az ECB képződését, és nem növelték meg lényegesen a termelt ST mennyiségét (10. táblázat). Az Orn, Pro, Thr ECB termelést fokozó hatása nem meglepő (Petersen és munkatársai 2001), hiszen részt vesznek az ECB alapvázának kialakításában. A legújabb vizsgálatok alapján (Cacho és munkatársai 2012) az ECB-t alkotó homotirozin 4-hidroxi-fenilpiruvátból szintetizálódik, ami a Tyr és a Phe átalakításával is könnyen létrehozható, így az ECB termelésre gyakorolt kedvező hatásuk szintén nem meglepő. Minthogy a szójapepton Tyr-nal történő helyettesítésekor mértük a legtöbb ECB-t, ezért a továbbiakban Tyr-os tápleves összetételének optimalizálását tűztük ki célul. Minthogy előkísérleteinkben a glükózon, napraforgóolajon és Tyr-on kívül a tápleves egyéb összetevői nem befolyásolják érdemben sem a ST, sem az ECB kihozatalt e három komponens optimális kiindulási koncentrációját határoztuk meg RSM (response surface methodolgy) segítségével (11. és 12. táblázatok). Az ECB termelés szempontjából optimális kiindulási koncentrációknál (24,9 g/L glükóz, 11,6 g/L Tyr és 60,8 ml/L napraforgóolaj) (22. ábra) a termelt ECB mennyisége csak kis mértékben maradt el a szójapeptonon mért értékekhez képest (231  $\pm$  17 µg/g ECB helyett 219 ± 15 µg/g ECB-t mértünk). Ugyanakkor, a fermentlevek ST tartalma jelentősen különbözött egymástól: 45 ± 5 µg/g ST helyett csak 6,5 ± 2 µg/g ST-t tartalmaztak.

# 4.4. A tenyésztési hőmérséklet hatása az A. nidulans var. roseus anyagcseréjére

Vizsgálataink alapján az A. nidulans var. roseus ATCC 58397 izolátum nem tartozik az A. nidulans fajba, sokkal inkább az A. rugulosussal mutat rokonságot (4.1 fejezet; 14. ábra). A. nidulans var. roseus és az A. nidulans DNS szekvenciája (legalábbis a megszekvenált DNS szakaszok esetében; 2. és 6. táblázatok) igen nagy hasonlóságot mutatott egymással. Ennek köszönhetően az A. nidulans FGSC A4 törzs genom szekvenciája (Aspergillus Comparative Database: www.broadinstitute.org) igen jól használhatónak bizonyult az A. nidulans var. roseus esetében. Az A. nidulans FGSC A4 törzs genom szekvenciája alapján tervezett több mint 50 primer pár közül (22. táblázat) összesen kettő olyan volt (AN1006 és AN10576), amely az A. nidulans esetében működött, de az A. nidulans var. roseus mintáknál nem adott detektálható jelet. Ezek után nem meglepő módon a microarray kísérletből származó adataink (amelyhez az A. nidulans FGSC A4 törzs genom szekvenciája alapján tervezett DNS chip-et és az A. nidulans var. roseusból származó mintákat használtunk) jó egyezést mutattak a qRT-PCR eredményekkel (24. ábra). A lineáris regressziós koefficiens 0,74 volt. Egy korábbi vizsgálatban ugyanezen DNS chip felhasználásával, de az A. nidulansból származó minták esetében hasonlóan nagy regressziós koefficienst ( $R^2 = 0.60$ ) kaptunk a gRT-PCRrel ellenőrzött 99 gén adatai és a microarray adatok között (Szilágyi és munkatársai 2012). A fentiek alapján az A. nidulans genom szekvenciája alapján tervezett DNS chip felhasználható az A. nidulans var. roseus és feltehetőleg más közeli rokon fajok transzkriptomának vizsgálatára is. Természetesen az adatok kiértékelésénél figyelembe kell venni, hogy az A. nidulans var. roseus genomja számos olyan gént is tartalmazhat, ami nincs jelen az A. nidulans genomban illetve, hogy bizonyos gének a szekvencia különbségek miatt nem adnak jelet a chip-en, vagy nem várt keresztreakciót eredményeznek. Éppen ezért még komolyabban kell venni azt az általános gyakorlatot, hogy a microarray adatokból levont következtetéseket valamilyen független módszerrel (pl. qRT-PCR, fiziológiai vizsgálatok) is ellenőrizni kell.

Az elvégzett microarray, qRT-PCR és fiziológiai vizsgálatok alapján a tenyésztési hőmérséklet 37 °C-ról 24 °C-ra való csökkentése az alábbi változásokat okozta a gombában:

1. Bár a sejtfal fontos szerepet játszik az ECB rezisztencia kialakításában (3.2 fejezet), meglepően kevés, a sejtfal homeosztázishoz köthető gén aktivitása változott meg 24 °C-on, azaz ECB termelő körülmények között (15-16. táblázat). Ez azért is meglepő, mert korábbi vizsgálatainkban több, a kitin szintézisben résztvevő gén indukálódását is megfigyeltük qRT-PCR segítségével ezen a hőmérsékleten (4. táblázat). Az ellentmondás hátterében feltehetőleg a mintavétel eltérő időpontja áll. A 3.2 fejezetben bemutatott kísérleteknél annak érdekében, hogy megvizsgálhassuk a gomba által termelt ECB, mint stresszor hatását a sejtfalszintézisre, a mintákat azon legfiatalabb tenyészetekből vettük (45 h), melyekből már kimutatható volt az ECB jelenléte. A microarray vizsgálatoknál viszont arra törekedtünk, hogy egy intenzív ECB termelést mutató tenyészetet hasonlíthassunk össze egy ECB-t nem termelő tenyészettel, így a mintavétel később történt (53 h). Érdemes megjegyezni, hogy a S. cerevisiaevel végzett microarray vizsgálatok alapján nagyarányú génaktivitás változások elsősorban a stresszválasz korai szakaszában figyelhetők meg. Az ekkor tapasztalt "hiperindukciók" és "hiperrepressziók" pár órán belül lecsengenek, és a génaktivitások visszatérnek a kiindulási értékhez közeli szintre (Gasch 2003). Elképzelhető, hogy hasonló jelenséggel magyarázható a sejtfalszintézisben érintett gének viselkedése is.

Bár a microarray vizsgálatainkban kitin szintázokat kódoló gének indukcióját nem figyeltük meg, a *chiA* indukciója (amely gén egy az újonnan szintetizálódó kitin láncok sejtfalba épülését segítő kitinázt kódol; Kelly és munkatársai 1996) és a kitin monomerek lebontását végző, feltételezett glükózamin-6-foszfát izomerázt és N-acetil-glükózamin-6-foszfát deacetilázt kódoló gének repressziója továbbra is arra utal, hogy a kitin anyagcserében a kitin szintézise a kedvezményezett folyamat. Az AN5357 ortológ (feltételezett sejtfalfehérjét kódoló) gén indukciója és az AN8102 ortológ (feltételezett pepszin-típusú aszpartát sejtfal proteázt kódoló) gén repressziója ugyanakkor arra utal, hogy ECB termelő körülmények között nem csak a sejtfal poliszacharid (7. táblázat), de fehérje tartalma is jelentősen megváltozott.

2. A tenyészetek növekedésének sebessége számottevően csökkent (14. táblázat), összhangban a felületi kultúrákban tapasztaltakkal (8. ábra). A növekedés intenzitásának visszaesése együtt járt számos, a fehérje szintézisben (aminosav és nukleotid szintézis, transzkripció, transzláció, poszttranszlációs módosítások) résztvevő gén repressziójával (15-16. táblázatok). Az érintett 60 génből 9 esetében végeztünk qRT-PCR-es vizsgálatot és 7 esetben a microarray adatokhoz hasonló eredményt kaptunk (16. táblázat). A szénhidrát anyagcserében ugyanakkor markáns változást nem tapasztaltunk (15-16. táblázatok), noha a glükóz hasznosítás sebességének csökkenése jól detektálható volt (14. táblázat). Érdemes megemlíteni, hogy szénéhező tenyészetekben – ahol szénforrás hiányában teljes mértékben leállt a növekedés – a glükóz aerob lebontásában résztvevő folyamatok (glikolízis, citrát kör, légzés) szintén represszálódtak, amit az aminosavak és nukleotidok lebontásában résztvevő gének indukciója és a szintézisükért felelős gének repressziója kísért (Szilágyi és munkatársai 2012). A mi esetünkben hasonló változások nem voltak megfigyelhetőek, a tenyészetek továbbra is a tápközegben lévő glükózt használhatták szén- és energia forrásként. A fehérjeszintézishez köthető gének represszálódása a növekedés jelentős lassulásával járó kisebb de novo fehérje szintézis igénynek lehetett a következménye.

Bár sok, az aminosavak, illetve nukleotidok szintézisében érintett gén represszálódott, a nitrát redukcióért felelős gének aktivitása növekedett (15. táblázat). A *niiA* ortológ, feltételezett nitrit reduktáz gén indukcióját qRT-PCR-rel is igazoltuk (16. táblázat) és enzimaktivitás méréssel demonstráltuk a nitrát reduktáz aktivitások növekedését is (14. táblázat). Az intenzív nitrát redukció jelzi, hogy a nitrát egy ideális, a pH-t nem befolyásoló nitrogénforrás lehet az ECB fermentáció alatt. A nitrát redukció indukálódásának fiziológiai jelentősége nem ismert, de előnyösen befolyásolhatja a nitrogén tartalmú molekulák (pl. kitin, ECB-t alkotó

aminosavak) szintézisét. A 24 °C-on történő tenyésztés az aminosavak szintéziséhez köthető gének közül egyedül az AN1734 ortológot indukálta. E gén feltételezett terméke (3-dehidrosikimát dehidrogenáz) a Tyr, és a Phe, azaz az ECB termelést leginkább növelő aminosavak (10. táblázat) szintézisében vesz részt.

3. Feltehetőleg szintén a növekedés lassulásával lehet kapcsolatban, hogy a vas anyagcseréhez köthető gének egy része represszálódott (15. táblázat). A 12 sziderofór szintézisben és transzportban résztvevő gén közül kettő represszióját qRT-PCR-rel is ellenőriztük (16. táblázat). A vas anyagcsere represszálódása gyakorlati szempontból azért lehet jelentős, mert Petersen és munkatársai (2003) kimutatták, hogy az echinocandinok szintézise során, az aminosavak hidroxilezése vas igényes folyamat. Az aminosavak hidroxilezését befolyásoló hatások nem csak a termelt echinocandinok mennyiségét, de az egyes echinocandin analógok arányát is befolyásolja (Petersen és munkatársai 2001). Ez azt is jelenti, hogy ha az *A. nidulans* var. *roseus*ban sokszorosára kívánjuk növelni az ECB szintézis intenzitását, akkor az ehhez szükséges vas biztosítására is hangsúlyosan oda kell figyelni.

Potenciális gyógyszer és élelmiszeripari jelentőségükből adódóan (Pócsi és munkatársai 2008) a gomba eredetű sziderofórok előállítása a jövőben egy ígéretes terület lehet. Amennyiben az *A. nidulans* var. *roseus* esetében tapasztaltak általánosíthatóak más *Aspergillus*, illetve *Penicillium* fajokra akkor ez azt jelenti, hogy ha növekedő tenyészetek segítségével állítjuk elő a sziderofórokat, nem elég a növekedés feltételeit biztosítani, de ügyelni kell arra is, hogy a növekedési ráta kellően nagy legyen. Ez különösen akkor jelenthet problémát, ha a sziderofór tartalmú sajtokat, szalámikat, mint funkcionális élelmiszereket kívánunk előállításara (Tóth és munkatársai 2009, Emri és munkatársai 2012). Amennyiben szénéhező tenyészeteket a gyors növekedés és a szénéhezés között, azaz kerülni kell a lassan hasznosuló szénforrások (pl. poliszacharidok, laktóz, pepton) használatát. Nem meglepő módon a sziderofórok előállításához használt táplevesek általában glükóz szénforrást és valamilyen egyszerű szerves nitrogénforrást (pl.

aminosav) tartalmaznak (Huschka és munkatársai 1985, Tóth és munkatársai 2009, Emri és munkatársai 2012).

4. A tenyészetek hőmérsékletének csökkentése a lipid anyagcsere (zsírsav, triglicerid, szteroid szintézis/lebontás) egyensúlyát a szintézis irányába tolta le, azaz 5, a lipid szintézishez köthető gén indukálódott, míg 5 a lipid lebontásért felelős gén represszálódott (15. táblázat). E 10 gén közül hatnak a transzkripcióját qRT-PCR-rel is megvizsgáltuk és a microarray adatokhoz hasonló eredményt kaptunk (16. táblázat). Az echinocandin termelő tenyészetek lipid anyagcserjének jelentőségre utal, hogy a napraforgóolaj adagolása előnyösen befolyásolta a termelt ECB mennyiségét (23. ábra) valamint, hogy a napraforgóolaj volt az egyetlen olyan szénforrás, amely jelenlétében, 24 °C-on, az *A. nidulans* var. *roseus* növekedése gyorsabb volt, mint az *A. nidulans* (9. ábra).

5. A stressz folyamatokhoz köthető gének repressziója összhangban van a hőmérséklet és a növekedés intenzitásának csökkenésével (15-16. táblázat). A három kataláz gén qRT-PCR-rel (16. táblázat) és aktivitásméréssel (14. táblázat) is megerősített indukciójának magyarázata azonban további vizsgálatokat igényel. A megnövekedett kataláz aktivitások együtt jártak a sejtek glutation tartalmának és glutation reduktáz aktivitásának növekedésével (14. táblázat) és összeségében e folyamatok lehettek felelősek azért, hogy az intracelluláris peroxid koncentráció kisebb volt ECB termelő körülmények között (14. táblázat). A glutation koncentráció növekedését lassú növekedést mutató (laktóz szénforráson tenyésztett) *P. chrysogenum* kultúrák esetében is megfigyelték (Emri és munkatársai 1998), míg a peroxidáz, kataláz aktivitások növekedése a kései exponenciális, stacioner fázisban szintén ismert jelenség (Sámi és munkatársai 2001, Emri és munkatársai 2004).

### 4.5. Természetes eredetű antifungális anyagok kölcsönhatásának vizsgálata

A gombák sokféle biológiailag aktív anyagot termelnek, melyek jelentős hatást gyakorolnak a környezetükben élő mikroorganizmusok és más élőlények (pl. fungivor állatok; Kempken és Rohlfs 2010) aktivitására. Ezen molekulák közé tartoznak (többek között) a különböző szekunder metabolitok (pl. antibiotikumok, antimikotikumok, mikotoxinok, alkaloidok) (Keller és munkatársai 2005), extracelluláris enzimek (pl. kitinázok,  $\beta$ -1,3-glukanázok, a peptidoglükán sejtfalat bontó enzimek, proteinázok) (Sharma és munkatársai 2011) és más fehérjék (pl. defenzin-szerű kis antifungális fehérjék) (Galgóczy és munkatársai 2011). E molekulák gyakorlati jelentősége kiemelkedő, hiszen gyakran használják őket, illetve származékaikat a humán terápiában, az állatgyógyászatban, a növényi kártevők elleni védekezésben, sőt felhasználják őket az élelmiszerek és a takarmányok tartósítására is (Keller és munkatársai 2005; Galgóczy és munkatársai 2011; Sharma és munkatársai 2011). Egy-egy gomba rendszerint többféle biológiailag aktív molekulát is termel egy időben, melyek befolyásolhatják egymás aktivitását. A hatóanyagok között fellépő esetleges interakciók felhasználásukat is alapvetően meghatározzák. Vizsgálatainkban négy különböző, fonalas gombák által termelt, a sejtfal homeosztázist (potencionálisan) befolyásoló antifungális molekula hatása közötti interakciót teszteltük. Ezek a hatóanyagok az alábbiak voltak:

- Az *A. nidulans* var. *roseus* által termelt ECB (Sucher és munkatársai 2009), melynek hatásmechanizmusáról a 2.5 fejezetben írtam.

- A *Penicillium chrysogenum* által termelt defenzin-szerű, kis molekulatömegű antifungális fehérje a PAF (Hegedűs és munkatársai 2011). A PAF gátolja a poláris növekedést és apopózist indukál az arra fogékony fonalas gombákban (Hegedűs és munkatársai 2011), de egyes vizsgálatok szerint befolyásolhatja a sejtfalszintézist szabályozó, sejtfal integritás útvonal működését is (Binder és munkatársainak 2010).

- Az A. nidulans által termelt ChiB kitináz és az EngA  $\beta$ -1,3-glükanáz a gomba sejtfalat hatékonyan bontó hidrolitikus enzimek, melyek aktivitásukból adódóan jelentős antifungális hatással is rendelkeznek (Szilágyi és munkatársai 2012).

Vizsgálataink alapján a ChiB és az EngA hidrolázok szinergista hatást mutattak az ECB-vel mind az élesztők, mind a fonalas gombák esetében (17. táblázat). Az ECB és az EngA  $\beta$ -1,3-endoglükanáz közötti szinergista hatás jó összhangban van azzal a ténnyel, hogy az EngA a sejtfal  $\beta$ -1,3-glükán összetevőjét

83

hidrolizálja, míg az ECB megakadályozza a károsodott sejtfal kijavítását az új  $\beta$ -1,3glükán láncok képződésének gátlásán keresztül (Sucher és munkatársai 2009). Az ECB és a ChiB kitináz között megfigyelt szinergista hatás alátámasztja azon korábbi megfigyeléseinket (3.2.2 fejezet) és irodalmi adatokat (Walker és munkatársai 2010), amely szerint a gombák részben a kitin bioszintézis fokozásával védekeznek az echinocandinok antifungális hatásával szemben. Nem meglepő módon az echinocandinok és a kitinszintézist gátló anyagok (pl. Nikkomycin) között szintén megfigyeltek szinergizmust kombinált alkalmazásuk esetén (el-Sherbeini és Clemas 1995; Ganesan és munkatársai 2004). Feltehetőleg nem véletlen az sem, hogy az ECB-t a növekedő és nem a szénéhező A. nidulans var. roseus tenyészetek termelik, hiszen a szénéhezés alatt képződő extracelluláris kitinázok és β-1,3-glükanázok (Szilágyi és munkatársai 2012) jelentősen megnövelhetnék a gomba érzékenységét a saját maga által termelt ECB-vel szemben. Az ECB és a sejtfal hidrolázok hatásában megfigyelt szinergizmus alátámasztja azon feltételezésünket, miszerint az A. nidulans var. roseus érzékenysége ECB termelő körülmények között megnövekedhet a különböző sejtfal stresszorokkal szemben (pl. hidrolitikus enzimek, felületaktív anyagok, kevertetés, ozmotikus koncentráció változása). A lassú növekedés mellett ez lehet a másik magyarázata annak, hogy miért nem alakult ki konstitutív ECB rezisztencia (és konstitutív ECB termelés) ebben a törzsben.

Az A. giganteus által termelt defenzin-szerű antifungális fehérje (AFP) esetében jelentős kitinkötő aktivitást mutattak ki (Hagen és munkatársai 2007). Feltehetőleg ezzel (is) magyarázható, hogy az AFP gátolja a kitin bioszintézisét és indukálja a sejtfal integritás útvonal működését az érzékeny törzsekben (Hagen és munkatársai 2007). Az AFP hatásával ellentétben, a PAF antifungális fehérjének nincs kitinkötő tulajdonsága és nem indukálja a sejtfal szintézist sem (Hegedüs és munkatársai 2011). Ezek alapján nem volt meglepő, hogy a ChiB, illetve az EngA egyike sem mutatott szinergista, vagy antagonista hatást a PAF-al a tesztelt fonalas gombákban (18. táblázat). Érdekes módon az ECB és a PAF esetében - az alkalmazott koncentrációtól függően - antagonista hatást figyeltünk meg a tesztelt fonalas gombák esetében (19. táblázat). Ez arra utal, hogy a PAF valamilyen - feltehetőleg közvetett - módon mégis csak befolyásolhatja a sejtfal homeosztázist.

Ezt sugallja Binder és munkatársainak (2010) megfigyelése is, miszerint a PAF a sejtfal integritás útvonalon keresztül megzavarja az aktin citoszkeleton működését és ezáltal akadályozza a sejtfal normális kitin eloszlásának kialakulását, de nincs hatással a sejtfal szintézisében résztvevő enzimek aktivitására. A PAF és az ECB között megfigyelt interakció gyakorlati szempontból is érdekes lehet: A tapasztalt antagonista hatás alapján a PAF-ot - jövőbeli terápiás felhasználása esetén - nem célszerű echinocandinokkal együtt alkalmazni. Ouedraogo és munkatársai (2011) vizsgálataikkal igazolták, hogy bár az élesztők rezisztensek a defenzin-szerű antifungális fehérjékkel szemben (Galgóczy és munkatársai 2011) (az A. niger által termelt ANAFP antifungális fehérje az egyetlen kivétel; Lee és munkatársai 1999), bizonyos mutációk képesek érzékennyé tenni az élesztő sejteket ezen molekulákra. Ez egyben azt is jelenti, hogy bár az élesztők rezisztensek a PAF-fal szemben (Hegedűs és munkatársai 2011) bizonyos antifungális anyagok jelenlétében e rezisztencia megszűnhet, illetve módosulhat. Vizsgálatainkban a PAF (5 és 65 µg/ml) a várakozásoknak megfelelően (Hegedűs és munkatársai 2011) nem befolyásolta szignifikánsan sem a Saccharomyces cerevisiae, sem a Candida albicans növekedését. Ugyanakkor sem az ECB-vel (3-30 µg/ml), sem ChiB-vel (0,6 U/ml), sem az EngA-val (12 U/ml) nem sikerült az élesztő sejtek PAF rezisztenciáját mérsékelnünk és a PAF sem változtatta meg a két élesztő faj ezen molekulákkal szemben mutatott érzékenységét. E megfigyelés szintén arra utalhat, hogy a PAF hatása és a sejtfal homeosztázis között csak viszonylag gyenge és közvetett kapcsolat van.

# 5. Anyagok és módszerek

### 5.1. A vizsgált törzsek, törzsfenntartás

A munkánk során felhasznált törzseket a 20. táblázatban tüntettem fel. Az A. *nidulans* és az A. *fumigatus* törzset minimál-nitrát tápagaron (Barratt és munkatársai 1965) tartottuk fenn. A minimál-nitrát tápagar (MN) 10 g/L glükózt, 5 v/v % nitrátos törzsoldatot, 0,1 v/v % nyomelem oldatot és 20 g/L agart tartalmazott; a pH-ja 6,5 volt. A nitrátos törzsoldat összetétele a következő volt: 6 g/L NaNO<sub>3</sub>, 1,5 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5 g/L MgSO<sub>4</sub> 4H<sub>2</sub>O, 0,5 g/L KCl. A nyomelem oldat az alábbi összetevőket tartalmazta: 22 g/L ZnSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, 11 g/L H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 5 g/L MnCl<sub>2</sub> 4H<sub>2</sub>O, 5 g/L FeSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, 1,6 g/L CoSO<sub>4</sub> 5H<sub>2</sub>O, 1,6 g/L CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O, 1,1 g/L (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub> 4H<sub>2</sub>O és 50 g/L Na<sub>2</sub>EDTA. A fenti tápagar szükség szerint 25 µg/L biotint, 200 µg/L 4-aminobenzoesavat (paba), 20 µg/L riboflavint, 200 µg/L piridoxint, 200 mg/L Met-t, 200 mg/L Arg-t, 200 mg/L Lys-t, 200 mg/L Phe-t, 2,5 g/L Trp-t, 1,2 g/L uracilt, 1,12 g/L uridint is tartalmazott.

Az A. nidulans var. roseus ATCC 58397, az A. rugulosus CBS 171.71 és CBS 133.60 törzseket komplex tápagaron tartottuk fenn. A komplex tápagar (PM) 1 g/L peptont, 20 g/L malátakivonatot, 20 g/L glükózt és 25 g/L agart tartalmazott; a pH-ja 7,0 volt.

A *Bacillus subtilis* BS-1 törzset Bouillon tápagaron tenyésztettük. A Bouillon tápagar (BOU) 16 g/L bouillont és 20 g/L agart tartalmazott, a tápközeg pH-ja 6,5 volt. A *C. albicans* ATCC 14053 és a *Saccharomyces cerevisiae* S288C törzseket Sabouraud tápagaron (SAB) tartottuk fenn, amely 20 g/L glükózt, 10 g/L mikológiai peptont, 20 g/L agart tartalmazott és a pH-ja 6,5 volt.

Az A. nidulans törzseket, valamint az A. fumigatus törzset 1 héten át 37 °Con, az A. nidulans var. roseus és az A. rugulosus törzseket 1 héten át szobahőmérsékleten inkubáltuk, majd a kinőtt és bespórázott micéliumot 4 °C-on tároltuk. A S. cerevisiae törzset 1 héten át szobahőmérsékleten, a B. subtilis és a C. albicans törzseket 2 napig 32 °C-on inkubáltuk, majd a kinőtt tenyészetet 4 °C-on tároltuk. Kísérleteinkhez (ha csak másképp nem jelöltem) az 1 hétnél nem tovább tárolt tenyészetek, illetve azok spóráit használtuk fel.

Név	Genotípus	Törzsek eredete
Aspergillus nidulans törzsek		
FGSC A4	Glasgow wild-type (vad típus)	FGSC <sup>a</sup>
FGSC A33	biA1, pyroA4, veA1	FGSC
FGSC A851	yA2, _argB::trpC, veA1,	FGSC
	trpC801	
FGSC A146	pabaA1, acrA1,	FGSC
	phenA2,pyroA4,lysB5, sB3,	
	nicB8, riboB2, chaA1	
FGSC A773	pyrG89, wA3, pyroA4	FGSC
creA-null mutáns	$pabaA1, yA1, \Delta creA::argB,$	J.M. Kelly (University
	argB2, riboB2, veA1	of Adelaide, Ausztrália)
HZS 120	pabaA1, riboB2, veA1	Dr. Hamari Zsuzsanna
		(Szegedi Egyetem)
Egyéb <i>Aspergillus</i> törzsek		
A. fumigatus FGSC 1100	Vad típus	FGSC
(AF 293)		
A. nidulans var. roseus	Vad típus	A TCC <sup>b</sup>
ATCC 58397 (NRRL 11440)		AICC
A. rugulosus (Emericella	Vad típus	CBS <sup>c</sup>
rugulosa) CBS 133.60		CDS
A. rugulosus (Emericella	Vad típus	CBS
rugulosa) CBS 171.71		CDS
Egyéb törzsek		
Saccharomyces cerevisiae	Vad típus	O D'
S288C (YSC1060)		Open Biosystems
Candida albicans ATCC 14053	Vad típus	ATCC
Bacillus subtilis BS-1	Vad típus	Tanszéki
		törzsgyűjtemény

20. táblázat A felhasznált törzsek genotípusa és eredete

a - Fungal Genetics Stock Center (University of Kansas Medical Center, USA)

b - American Type Culture Collection (Manassas, Virginia, USA)

c - Fungal Biodiversity Centre (Utrecht, The Netherlands)

# 5.2. Az Aspergillus törzsek tenyésztése

#### 5.2.1. A növekedés vizsgálata felületi kultúrákban

Az Aspergillus törzsek növekedését különböző szén- és nitrogénforrást tartalmazó tápagarok segítségével vizsgáltuk. A tápagar összetétele megegyezett a Barratt-féle minimál nitrátos (MN) tápagar összetételével, de szénforrásként 10 g/L glükózt, fruktózt, szorbitolt, xilózt, maltózt, laktóz, szacharózt, keményítőt, glicerolt, nitrogénforrásként 75 mmol/L NaNO<sub>3</sub>-ot, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-ot, Na-Glu-ot, vagy 1 w/v % kazeinpeptont, szójapeptont, vagy élesztőkivonatot tartalmazott. A tápagarokat frissen bespórázott tenyészetekből származó konidiumokkal oltottuk le fogpiszkáló segítségével 3-3 párhuzamosban, majd 5 napig 24, illetve 37 °C–on inkubáltuk. A törzsek növekedését az 5 napos tenyészetek telepátmérőjével jellemeztük.

#### 5.2.2. Az Aspergillus törzsek tenyésztése süllyesztett kultúrákban

A szekunder metabolit termelés vizsgálatához glükózt és napraforgóolajat is tartalmazó táplevest (GNL) használtunk. A tápleves a Boeck és Kastner (1981) által leírt tápleves egy változata volt, amely 10 g/L glükózt, 10 g/L szójapeptont, 4,5 g/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 12H<sub>2</sub>O, 1 g/L ZnSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, 5,5 g/L MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O. 0,1 g/L FeSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O és 7,5 v/v % napraforgóolajat (pH 5,5) tartalmazott. Egyes kísérletekben e táplevest módosítottuk 10 g/L élesztőkivonat, 10 g/L kazeinpepton, 75 ml/L paraffinolaj, 10 g/L keményítő, 2,8 g/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, valamint különféle 11-25 g/L aminosav (Phe, Tyr, Arg, Met, Glu, Orn, Pro, Thr) hozzáadásával és/vagy a glükóz, szójapepton, illetve napraforgóolaj elhagyásával.

A transzkriptom (qRT-PCR, illetve microarray), valamint a sejtfalösszetétel és a specifikus  $\beta$ -1,3-glükán szintáz aktivitás vizsgálatához komplex glükózos táplevest (KGL) használtunk, amely összetétele a következő volt: 40 g/L glükóz, 10 g/L élesztőkivonat, 2,9 g/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 5 v/v % nitrátos törzsoldat és 0,1 v/v % nyomelem oldat (pH 5,5).

A táplevesek 100 ml-t mindkét esetben 100 millió friss spórával oltottunk be és 24, illetve 37 °C-on, 300 rpm fordulatszámon rázattuk 1, 2, illetve 6 napig.

# 5.2.3. A tápleves összetételének optimalizálása

A kísérletekhez csak kevés ST képződését lehetővé tévő, módosított GNL táplevest (GNTL) használtunk. A módosítás lényege, hogy a tápleves szójapepton helyett Tyr-t tartalmazott. A GNTL tápleves ECB termelés szempontjából optimális Tyr, glükóz és napraforgóolaj tartalmát RSM (response surface methodology) eljárással határoztuk meg (Lee és Chen 1997). Az eljárás lényege, hogy az előkísérletek alapján kiválasztott Tyr (11-25 g/L), glükóz (5-35 g/L) és napraforgóolaj (10-130 ml/L) koncentráció tartományban, Box-Behnken kísérleti elrendezést felhasználva, több ponton lemérjük a tenyészetek ECB termelését és a kapott adatokra illesztett háromváltozós függvény lokális maximumhelyét határozzuk meg. (Ha a maximum hely nem a vizsgált tartományba esik, akkor a függvény meredekségét figyelembe véve másik Tyr, glükóz, napraforgóolaj koncentráció tartományokat kell megvizsgálni). A jelen munkában egy-egy mérési ponthoz (adott Tyr, glükóz, napraforgóolaj koncentrációhoz) tartozó ECB termelést három független vizsgálatból határoztuk meg. A kapott pontokra egy háromváltozós másodfokú polinomot illesztettünk az R 2.3.1 (The R Development Core Team; http://www.r-project.org/) statisztikai program segítségével és e függvény lokális maximumát számoltuk ki.

# 5.2.4. Az Aspergillus törzsek keresztezése

Az A. nidulans var. roseus ATCC 58397, az A. rugulosus CBS 171.71 és CBS 133.60 törzsekből a konidiumok UV mutagenezisét követően 5-fluoroorotsav rezisztens, uracil/uridin auxotróf mutánsokat izoláltunk (Osherov és munkatársai 2001). A mutánsok izolálásához 5 mmol/L uracilt, 10 mmol/L uridint és 1,5 g/L 5fluoroorotsavat tartalmazó Barratt-féle nitrátos tápagar (MN) felszínre 10<sup>6</sup> db spórát szélesztettünk, majd 265 nm hullámhosszú UV fénnyel 100 másodpercig besugároztuk. (Az alkalmazott kísérleti körülmények között ez a besugárzás 50 %os sejtpusztulást okozott.) A mutagenezist követően a tenyészeteket 37 °C-on 5 napig inkubáltuk sötétben. A kinőtt telepeket uracil/uridin auxotrofiájuk ellenőrzését követően használtuk fel a keresztezési kísérletekhez. Az uracil/uridin auxotrófiát mutató, a fenti módon izolált *A. nidulans* var. *roseus* VT15 és *A. rugulosus* VT1 törzseket *A. nidulans* auxotróf törzsekkel kereszteztük a Pontecorvo és munkatársai által leírt (1953) klasszikus keresztezési protokollt felhasználva. Az eljárás lényege, hogy 1 ml komplex táplevest (YMN) (0,5 v/w % élesztőkivonattal és a szükséges vitaminokkal és aminosavakkal kiegészített Barratt-féle nitrátos tápleves) a keresztezendő két törzs spóráival beoltottunk, 1 napig 37 °C-on inkubáltuk, majd a kinőtt kevert micéliumot Barrattféle nitrátos táptalajra (MN) helyeztük át. A táptalaj vitaminokat és aminosavakat sem tartalmazott, így a törzsek csak akkor tudtak növekedni rajta, ha hifáik fuzionáltak (heterokarionos hifák) és így a két törzs komplementálni tudta egymás auxotrófiáját. A heterokarionos tenyészeteket 37 °C-on 1 hétig, majd a Petri-csészék szigetelőszalaggal történő lezárását követően további 1-3 hónapig inkubáltuk. Az így kapott tenyészetekről kleisztotéciumokat és konidiumokat is izoláltunk.

# 5.3. Antifungális szerekkel szembeni érzékenység vizsgálata

# 5.3.1. Az Aspergillus törzsek ECB és CAS érzékenységének meghatározása

A törzsek ECB érzékenységét agardiffúziós és mikrodilúciós módszerrel vizsgáltuk. Az agardiffúziós módszer esetében (Galgóczy és munkatársai 2005) 100  $\mu$ l, 10<sup>6</sup> spórát tartalmazó szuszpenziót szélesztettünk ki a Barratt-féle nitrátos tápagar (MN) felületére, majd közvetlenül a szélesztés után, az agarba 0,5 cm átmérőjű lyukakat fúrtunk, melyekbe 15 mg/ml ECB-t tartalmazó törzsoldatból 40  $\mu$ l metanolos oldatot csepegtettünk. A tenyészeteket 37 illetve 24 °C-on inkubáltuk 3 napig. A törzsek érzékenységét a lyukak körül kialakuló gátlási zóna átmérőjével jellemeztük.

A mikrodilúciós módszer (Arikan 2001) segítségével a törzsek CAS és ECB érzékenységét is meghatároztuk. A vizsgálatokat 96-lyukú steril mikrotiter lemezekben végeztük el. Az egyes lyukak 0,5 w/v % élesztőkivonattal kiegészített Barratt-féle nitrátos táplevest (YMN), 0-200 µg/ml CAS-t, vagy ECB-t, valamint 1000 db konídiumot tartalmaztak 100 µl végtérfogatban. A mikrotiter lemezeket 24, illetve 37 °C-on 3 napig inkubáltuk, majd mikroszkóp segítségével vizsgáltuk a mikropelletek képződését. Az ECB, illetve CAS érzékenységet a mikropelletes növekedést kiváltó legkisebb koncentrációval (MEC) jellemeztük.

# 5.3.2. SDS hatásának vizsgálata

A nátrium-dodecilszulfát (SDS) hatását a törzsek ECB érzékenységére szintén agardiffúziós és mikrodilúciós módszerekkel teszteltük. Az agardiffúziós módszer esetében a minimál-nitrát tápagar (MN) felületére 100 µl 10<sup>6</sup> spórát tartalmazó szuszpenziót szélesztettünk ki, majd a szélesztést követően a tápagarba két 0,5 cm átmérőjű lyukat fúrtunk egymástól 2,5 cm távolságba. Az egyik lyukba 2,5 mg/ml (A), illetve 6,25 mg/ml (B) koncentrációjú vizes SDS oldatok 40 µl-ét, a másik lyukba 20 mg/ml koncentrációjú metanolos ECB oldat 40 µl-ét cseppentettük és a tenyészeteket 37, illetve 24 °C-on inkubáltuk 3 napig. Az ECB és az SDS közötti interakcióra a kinőtt micéliumtömeg vastagsága utalt.

A mikrodilúciós módszer esetében az élesztőkivonattal kiegészített (YMN) minimál nitrát tápleves 2,5-10 µg/ml ECB-t és/vagy 50-60 µg/ml SDS-t tartalmazott. A tenyészetek növekedését az optikai denzitás változásával jellemeztük 620 nm-en (340 ATC microtiter plate reader; SLT Lab Instruments, Groeding, Ausztria). Az ECB és az SDS közötti interakciót (IR) az Abbott-formula segítségével jellemeztük: IR = Io/Ie. Ie = X+Y-[XY/100]), ahol az Ie a várható százalékos növekedésgátlás a két szer (ECB és SDS) együttes jelenlétében (feltételezve, hogy nem befolyásolják egymás hatását), az X és Y a mért százalékos növekedésgátlás ECB, illetve SDS jelenlétében, míg Io a mért növekedésgátlás a két szer együttes jelenlétében. Ha IR > 1,5 a két szer egymás hatását erősíti (szinergizmus), ha 1,5  $\geq$  IR  $\leq$  0,5 hatásuk additív és ha IR < 0,5 a két szer csökkenti egymás hatását (antagonizmus) (Moreno és munkatársai 2003).

# 5.3.3. A napraforgóolaj és paraffinolaj hatásának tesztelése makrodillúciós módszerrel

A vizsgálat során 20 ml minimál-nitrát MN táplevest 1,5 ml napraforgóolajjal vagy paraffinolajjal és 0-80 μg/ml ECB-vel egészítettünk ki. A

táplevest 20 millió spórával oltottuk be, majd 37 °C-on, 300 rpm fordulatszámon rázattuk 2 napig. A napraforgóolaj és a paraffinolaj az ECB antifungális hatását befolyásoló tulajdonságát a tenyészetek növekedésével jellemeztük.

# 5.3.4. Az ECB, PAF és a ChiB, EngA közötti interakció vizsgálata

Az ECB és PAF, az ECB és a ChiB kitináz, illetve EngA  $\beta$ -1,3-glükanáz, valamint a PAF és a ChiB, illetve EngA közötti interakciót az SDS és ECB közötti interakcióhoz hasonlóan vizsgáltuk. Az alkalmazott hatóanyag koncentrációk az alábbiak voltak: 5, illetve 65 µg/ml PAF, 0,15-10 mg/ml ECB 0,6 U/ml ChiB kitináz, illetve 12 U/ml EngA  $\beta$ -1,3-glükanáz. A mikrotiter lemez egyes lyukai ebben az esetben 1000 db konídiumot (*A. nidulans, A. nidulans* var. *roseus, A. fumigatus*), vagy vegetatív sejtet (*S. cerevisiae, C. albicans*) tartalmaztak. Az *A. nidulans* tisztított ChiB kitinázát és EngA  $\beta$ -1,3-glükanázát Szilágyi Melinda (Debreceni Egyetem), a tisztított PAF antifungális fehérjét Dr. Leiter Éva (Debreceni Egyetem) bocsátotta rendelkezésünkre.

# 5.3.5. Paradox-effektus vizsgálata

Az A. nidulans var. roseus és az A. nidulans törzseknél tapasztalt paradoxeffektus vizsgálata során a Barratt-féle minimál-nitrát (MN) tápagarra (Barratt és munkatársai, 1965), illetve komplex (PM) tápagarra kicseppentett szuszpenzió (10 µl) 10<sup>4</sup> spórát tartalmazott. A tenyészeteket 37 °C-on 3 napig inkubáltuk. A kinőtt telepek közelében az agarba 0,5 cm átmérőjű lyukat fúrtunk, melybe 30 mg/ml és 60 mg/ml ECB-t tartalmazó metanolos oldat 40 µl-ét cseppentettünk. Ezt követően a tenyészeteket tovább inkubáltuk 37 °C-on újabb 3 napig. Az A. nidulans érzékenységét 25 µg/ml ECB-t tartalmazó tápagarban is megvizsgáltuk, a fent leírtak szerint.

### 5.4. Analitikai vizsgálatok

#### 5.4.1. A növekedés mérése süllyesztett kultúrában

A süllyesztett kultúrák növekedését a szárazanyag tartalom (DCM) változásával jellemeztük, illetve az MTT tesztel követtük nyomon. A DCM meghatározásához 5 ml tenyészetet ismert tömegű szűrőpapíron, zsugorított üvegszűrőn átszűrtük, a kiszűrt micéliumot desztillált vízzel mostuk, majd szobahőmérsékleten súlyállandóságig (mintegy 3 nap) szárítottuk. A DCM értékeket g/L dimenzióban adtuk meg (Pusztahelyi és munkatársai, 1997).

Az MTT tesztet Lee és munkatársai által (1999) leírtak alapján végeztük el. A tenyészet 0,5 ml-éhez 2 ml friss táplevest, valamint 0,1 ml 10 mg/ml-es metiltiazoltetrazolium bromid (MTT) oldatot pipettáztunk és 4 órán át inkubáltuk 37 °C-on, 220 rpm fordulatszámon. Ezt követően 1 ml savas SDS oldatot (20 w/v % SDS 20 mmol/L HCl-ban oldva) adtunk hozzá és tovább inkubáltuk 20 órán át 37 °C-on, 220 rpm fordulatszámon. Az inkubálást követően a mintákat szobahőmérsékleten centrifugáltuk (10 perc 10000 G), majd az élő sejtek által redukált MTT mennyiségét a felülúszók 550 nm-en mért abszorbanciájával jellemeztük.

# 5.4.2. A glükóz koncentráció mérése

A tápközeg glükóz tartalmának meghatározása a Leary és munkatársai (1992) által leírt eljárás segítségével történt. A reakcióelegy 0,1 mol/L K-Na-foszfát puffert (pH=6,6), 4 kU/L glükóz-oxidázt, 1 kU/L peroxidázt, 0,76 mmol/L 4-aminoantipirint, 11 mmol/L fenolt és 3 v/v % mintát (zsugorított üvegszűrőn átszűrt fermentlé) tartalmazott. A keletkező színes termék képződésének sebességét ("rate assay") 500 nm-en detektáltuk. A glükóz mennyiségét kalibráló sor segítségével számítottuk ki és g/L dimenzióban adtuk meg.

# 5.4.3. A fermentlé antifungális és antibakteriális aktivitásának meghatározása

Az Aspergillus törzsek fermentlevének antibakteriális és antifungális aktivitását agardiffúziós módszer segítségével határoztuk meg. Az antibakteriális

aktivitás vizsgálatához *Bacillus subtilis* tesztorganizmust és bouillon tápagart (BOU) használtunk. A baktérium szélesztését követően a 25 ml tápagar közepébe 0,5 cm átmérőjű lyukat fúrtunk, melybe 40  $\mu$ l zsugorított üvegszűrőn átszűrt és centrifugálással (4 °C, 10 perc, 13000 G) továbbtisztított fermentlevet cseppentettünk, majd a tenyészetet 32 °C-on inkubáltuk 1 napig. A keletkezett gátlási gyűrű nagyságából, G-penicillinnel készített kalibráló sor felhasználásával, számoltuk ki a fermentlé antibakteriális aktivitását, melyet mg G-penicillin egyenérték/ml egységben adtunk meg. Az antibakteriális aktivitás  $\beta$ -laktamáz érzékenységét a fermentléhez adott 60 U/ml  $\beta$ -laktamáz segítségével teszteltük (Bok és Keller 2004). A  $\beta$ -laktám típusú antibiotikumok jelenlétére a  $\beta$ -laktamáz jelenlétében bekövetkező aktivitáscsökkenés utalt.

A fermentlé antifungális aktivitását (ECB tartalmát) *Candida albicans* tesztorganizmus segítségével Sabouraud tápagaron vizsgáltuk az antibakteriális aktivitás tesztelésénél leírt módon. A kalibráló sort ebben az esetben ECB felhasználásával készítettük.

# 5.4.4. Vékonyréteg kromatográfiás (VRK) vizsgálatok

A szterigmatocisztin (ST) mennyiségének meghatározásához és a szekunder metabolit spektrum vizsgálatához 1 ml (teljes, sejteket is tartalmazó) fermentlevet liofileztük, majd 1 ml 70 %-os aceton oldatban szuszpendáltuk fel. Centrifugálást (4 °C, 10 perc, 13000 G) követően a felülúszó 40 µl-ét Silica Gel 60 lemezre cseppentettük fel. A minta komponenseinek elválasztása az alábbi futtatószer segítségével történt: toluol: etilacetát: jégecet = 80:10:10 (Klich és munkatársai 2001). A sávokat 96 v/v %-os etanolban oldott 1 w/v % AlCl<sub>3</sub> oldattal való előhívást követően UV fény (265 nm) segítségével tettük láthatóvá. A ST mennyiségét kalibráló sor segítségével számítottuk ki és µg/g fermentlé dimenzióban adtuk meg.

# 5.5. Enzimaktivitás mérések

#### 5.5.1. A specifikus $\beta$ -1,3-glükán szintáz aktivitás mérés

A mérésekhez az A. nidulans var. roseus és az A. nidulans törzsek tenyészeteit (15 ml) zsugorított üvegszűrön (ROBU borosilicat 3.3) átszűrtük, a kiszűrt micéliumot desztillált vízzel mostuk, majd 15 ml 50 mmol/L Tris/HCl-t és 4 mmol/L EDTA-t (pH 7,5) tartalmazó pufferben szuszpendáltuk fel és a szuszpenziót -20 °C-on megfagyasztottuk. A fagyasztott mintákat X-press segítségével tártuk fel. A feltárást követően a sejtfaltörmeléket centrifugálással (4 °C, 10 perc, 13000 G) eltávolítottuk, majd a felülúszóból ultracentrifugálás (4 °C, 1 óra, 38000 rpm) segítségével izoláltuk a membránfrakciót. A pelletet 500 µl 33 v/v % glicerolt tartalmazó Tris-HCl/EDTA oldatban vettük fel és a minta β-1,3-glükán szintáz aktivitást fluoreszcens eljárás segítségével határoztuk meg (Shedletzky és munkatársai 1997). A reakció elegy 25 µl mintát és 50 µl reagenst tartalmazott. A méréshez használt reagens a fent leírt Tris-HCl/EDTA puffer felhasználásával készült és 10 mg/ml GTP-t, 100 mg/ml UDP-glükózt, 0,5 v/V % Brij-t és 6,6 v/v % glicerolt tartalmazott. A kontroll mérések esetében a reakcióelegy 3,5 mg/ml ECBvel is ki volt egészítve. Szobahőmérsékleten történő 1 h inkubációt követően a képződött glükán mennyiségét az alábbi módon detektáltuk: A reakcióelegyhez 10 µl 6 mol/L NaOH oldatot, majd 30 perc 80 °C-on történő inkubálást követően 210 µl A reagenst adtunk. Az A reagens 0,1 w/v % Anilin Blue oldatot, 1 mol/L HCl-t és 1 mol/L glicin puffert (pH 9,5) tartalmazott 40:21:59 arányban. 30 perc 50 °C-on történő inkubálás után 25 percig szobahőmérsékleten tároltuk a mikrotiter lemezeket. A képződött fluorescens terméket BioTek Synergy 4 Plate Reader segítségével detektáltuk ( $\lambda_{ext}$  = 400 nm;  $\lambda_{em}$  = 460 nm). A képződött  $\beta$ -1,3-glükán mennyiségt az ECB hiányában és az ECB jelenltben mért jel különbsgből számoltuk ki. A β-1,3-glükánba beépült glükóz mennyiségét laminarin felhasználásával készült kalibráló sor segítségével határoztuk meg és az enzimaktivitásokat nmol beépült glükóz/(min\*mg fehérje) dimenzióban adtuk meg. A minták fehérje tartalmát Bradford módszerével mértük meg (Bradford 1976).

Az enzim ECB-vel való gátolhatóságának meghatározása érdekében a méréseket ECB (0-100 µg/ml) jelenlétében is elvégeztük. Az enzim ECB-vel

szemben mutatott érzékenységét az 50 %-os gátlást okozó ECB koncentrációval  $(IC_{50,ECB})$  jellemeztük.

# 5.5.2. A specifikus nitrát-reduktáz, kataláz és glutation reduktáz aktivitás mérése

A mérés "rate assay" eljárás segítségével történt az X-presszel feltárt és centrifugált (4 °C, 10 perc, 13000 G) minták felhasználásával. Az egyes enzimeknél a reakcióelegyek végtérfogata 1 ml volt, és az alábbi komponenseket tartalmazták:

Nitrát reduktáz: 20 mmol/L Hepes (pH 7,6), 0,1 mmol/L NADPH, 0,3 mmol/L NaNO<sub>3</sub> és 10 v/v % minta. A NADPH fogyás sebességét 340 nm-en detektáltuk (Bruinenberg és munkatársai 1983)

Kataláz: 20 mmol/L Hepes (pH 7,6), 0,1 mmol/L  $H_2O_2$  és 1 v/v % minta. A  $H_2O_2$  koncentráció csökkenését 240 nm-en követtük nyomon (Roggenkamp és munkatársai 1974).

Glutation reduktáz: 0,1 mol/L Na-foszfát pufferben (pH=7,6) 0,1 mmol/L NADPH, 1,5 mmol/L oxidált glutation (GSSG) és 10 v/v % minta. A NADPH fogyás sebességét ebben az esetben is 340 nm-en detektáltuk (Pinto és munkatársai 1984).

Az enzimaktivitásokat a minták Bradford-módszer segítségével meghatározott (Bradford 1976) fehérjetartalmára vonatkoztattuk és mkat/kg protein (kataláz esetében kat/kg protein) dimenzióban adtuk meg.

# 5.5.3. Az oxidált és redukált glutation mennyiségének meghatározása

A sejtek oxidált glutation (GSSG) tartalmát az Anderson-féle (Anderson 1985) "rate assay" eljárás segítségével határoztuk meg. Ehhez 5 ml tenyészetből kiszűrt és desztillált vízzel mosott micéliumot 1 ml 5 w/v % 5-szulfoszalicilsav oldatban inkubáltunk (20 perc, 4 C), majd centrifugálást (10 perc, 4 c, 13000 G) követően a felülúszó redukált glutation (GSH) tartalmát 2-vinilpiridines kezeléssel (185 mmol/L, 1 óra, pH 6,0-7,0) reagáltattuk el. A méréshez használt reakcióelegy 115 mmol/L Na-foszfát pufferben (pH=7,5), 50 mmol/L EDTA-t, 0,6 mmol/L 5,5'-ditio-*bis*(2-nitrobenzoesav)-at (DTNB), 0,2 mmol/L NADPH-t, 1,5 kU/L glutation reduktázt (*Saccharomyces cerevisiae*) és 10 % (v/v) 2-vinilpiridinnel kezelt mintát

tartalmazott. A DTNB redukálódásának sebességét 412 nm-en detektáltuk. A GSSG mennyiségét GSSG felhasználásával készült és 2-vinilpiridint is tartalmazó kalibráló sor segítségével számoltuk ki. A GSH tartalom meghatározása a fent leírt módon történt, de ebben az esetben a minták teljes glutation (GSH+GSSG) tartalmát mértük meg (a 2-vinilpiridines kezelés elhagyásával és GSH-val készült kalibráló sor segítségével) és a GSSG tartalom ismeretében számoltuk ki a GSH mennyiségét. A minták GSH és GSSG tartalmát a minták szárazanyag tartalmára vonatkoztattuk és mmol/kg DCM dimenzióban adtuk meg.

### 5.5.4. A sejtek peroxid tartalmának mérése

A sejtek peroxid tartalmának méréséhez (Royall és Ischiropoulos; 1993) a tenyészetekhez 2',7'-diklorofluorescein diacetátot (Molecular Probes Europe BV, Leiden, Hollandia) adtunk 10  $\mu$ M-os végkoncentrációban és a sejtekben egy óra alatt képződő 2'.7'-dichlorofluorescein (DCF) koncentrációját határoztuk meg. A sejteket ebben az esetben is 5 w/v % 5-szulfoszalicilsav oldatban tártuk fel az előző fejezetben leírtaknak megfelelően. A felülúszók DCF koncentrációját Jasco 821-FP típusú spektrofluoriméterrel határoztuk meg ( $\lambda_{ext,DCF}$ =502 nm,  $\lambda_{em,DCF}$ =523 nm). A képződött DCF mennyiségét a sejtek szárazanyag tartalmára vonatkoztattuk és pmol/mg DCM dimenzióban adtuk meg.

# 5.6. A sejtfal összetételének meghatározása

A sejtfal összetételét Stevens és munkatársai (2006) által leírt protokollt követve határoztuk meg, a komplex glükózos táplevesben (KGL) felnövesztett tenyészetekből a 2. napon vett mintákat felhasználva. A mintákat zsugorított üvegszűrőn szűrtük le, a kiszűrt micéliumot desztillált vízzel mostuk, majd liofileztük. A liofilezett micéliumot üveggyöngyök segítségével tártuk fel. A sejtfaltörmeléket háromszor 1 ml desztillált vízzel mostuk, majd liofilezéssel szárítottuk. A sejtfalpreparátum α-glükán tartalmát NaOH oldattal hidrolizáltuk. Ehhez 20 mg sejtfalpreparátumot 0,5 ml 3 w/v %-os NaOH oldatban szuszpendáltunk fel és 75 °C-on 1 órán át inkubáltuk, majd az el nem hidrolizált sejtfalanyagokat centrifugálással (10 perc, 4°C, 13000 G) összegyűjtöttük. A hidrolízist még kétszer megismételtük és a kapott felülúszókat egyesítettük. A felülúszóhoz 2x térfogatú abszolút etanolt adtunk és -20 °C-on 1 órán át inkubáltuk. A kicsapódó  $\alpha$ -glükán hidrolizátumot centrifugálással (10 perc, 4°C, 13000 G) összegyűjtöttük és 0,1 ml desztillált vízben oldottuk vissza. Ezt az oldatot használtuk az  $\alpha$ -glükán tartalom meghatározására. A NaOH-os hidrolízis után megmaradt csapadékot 500 µl 100 mmol/L, majd 500 µl 10 mmol/L Tris-HCl pufferel (pH 7,5) mostuk és 100 µl 10 mmol/L Tris-HCl (pH 7,5) pufferben oldott 4 mg/ml töménységű litikáz enzimmel (a  $\beta$ -glükánok hidrolízise) emésztettük egy éjszakán át 37 °C-on. Az emésztést követően, a mintákat centrifugáltuk (10 perc, 4°C, 13000 G), a kapott felülúszót használtuk a  $\beta$ -glükán tartalom mérésére. A litikáz kezelés után kapott csapadékot 100 µl 6 mol/L HCl oldattal hidrolizáltuk tovább 95 °C-on 5 órán át (a kitin hidrolízise). Liofilezést követően a hidrolizátumot 0,2 ml desztillált vízben oldottuk fel. Ezt az oldatot használtuk a kitintartalom meghatározására.

Az  $\alpha$ - és  $\beta$ -glükántartalom meghatározása a megfelelő frakció hexóz tartalmának mérésén alapult. A mérés lényege, hogy 100 µl mintát 700 µl 5 w/v % bórsav és 23 v/v % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-at tartalmazó vizes oldat hozzáadása után 15 percig inkubáltunk szobahőmérsékleten. Ezt követően 0,1 ml 1 w/v %-os Trp oldatot adtunk hozzá és 20 percig inkubáltuk 95 °C-on, majd 5 percig jégen és végül 30 percig szobahőmérsékleten. A keletkezett színes termék koncentrációját 540 nm-en történő fotometrálással mértük meg. A minták glükán tartalmának kiszámításához glükóz segítségével készített kalibráló sort használtunk. A mg-ban meghatározott glükántartalmat a minták eredeti tömegére (20 mg) vonatkoztattuk és %-ban adtuk meg.

A kitintartalom mérése a megfelelő frakció glükózamin tartalmának meghatározásán alapult. A mérés lényege, hogy 100 µl mintát 25 µl 4 v/v %-os acetil-acetonos oldattal inkubáltuk előbb 90 °C-on 1 órán át, majd jégen 5 percig. Ezt követően 200 µl 96 v/v %-os etanol és 25 µl Elerlich-reagens (30 ml metanol:30 ml HCl:,6 g N,N- dimetil-paraaminobenzaldehid) hozzáadása után 20 percig inkubáltunk szobahőmérsékleten. A keletkezett színes termék mennyiségét 530 nmen történő fotometrálással határoztuk meg. A minták kitin tartalmának kiszámításához glükózaminnal készült kalibráló sort használtunk. A mg-ban meghatározott kitintartalmat szintén a minták eredeti tömegére (20 mg) vonatkoztattuk és %-ban adtuk meg.

# 5.7. Parciális DNS szekvenciák meghatározása

A DNS izolálásához a Barratt-féle minimál-nitrát táplevesben felnövesztett, 18 h-s tenyészetekből származó micéliumot használtuk. A zsugorított üvegszűrőn kiszűrt micéliumot desztillált vízzel mostuk, majd liofileztük. A genomi DNS-t a Genomic DNA Purification Kit K0512 (Fermentas) segítségével izoláltuk a gyártó ajánlása alapján.

A PCR-hez a 20. táblázatban szereplő primereket és annealing hőmérsékleteket használtuk.

A PCR-t 5u/µl 500U Taq DNS polimeráz (Fermentas) felhasználásával végeztük. Az 50 µl-es reakcióelegy 10 v/v % 10x Taq polimeráz puffert, 2 mmol/L MgCl<sub>2</sub>-ot, 0,2 µmol/L génspecifikus primer párt, 0,2 µmol/L dNTP mix-et és 2 U/50 µl Taq polimerázt tartalmazott.

A PCR reakció lépései a következők voltak:

- (1) Iniciáció, 95 °C, 5 min
- (2) Denaturáció, 95 °C, 45 sec
- (3) Annealing, a 21. táblázatban megadott hőmérséklet, 30 sec
- (4) Extenzió, 72 °C, 80 sec (a 2.→4. lépés 35 ciklusban ismételve)
- (5) Befejező extenzió, 72°C, 10 min

A PCR termékeket 1 %-os TAE agaróz gélen választottuk el. A TAE puffer összetétele a következő volt: 0,4 mol/L Tris, 0,01 mol/L EDTA és 0,2 mol/L ecetsav (pH 8,5). A sávokat Silica Bead DNA Extraction Kit K0513 (Fermentas) segítségével izoláltuk vissza a gélből a gyártó protokollját követve. A szekvenálás az ABI Big Dye Terminator 3.1 Kit felhasználásával egy automata DNS kapilláris

Gén neve, száma	Forward primer	Reverse primer	
Annealing hőmérséklet	-	-	
ITS I (55 °C) (1)	5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'	5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3'	
ITS II (55 °C) (1)	5'-GCATCGATGAAGAACGCAGC-3'	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	
Kalmodulin (52,3 °C) (2)	5'-CCGAGTACAAGGAGGCCTTC-3'	5'-CCGATAGAGGTCATAACGTGG-3'	
β-tubulin (56,4 °C) (3)	5'-GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC-3'	5'-ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC-3'	
γ-aktin (56,4 °C) (4)	5'-ATGTGCAAGGCCGGTTTGGC-3'	5'-TACGAGTCCTTCTGGCCCAT-3'	
AN6700 (53 °C)	5'-CTATTCCCGAGCAAGTTC-3'	5'-TGATGTTCCTGACGATGGC-3'	
AN7032 (53 °C)	5'-ACCAAACCGCAGAGAGC-3'	5'-TCCCGCCATACCTTGAAC-3'	
AN2523 (53 °C)	5'-TTGCGACAAGGACACATTGG-3'	5'-ACCGAAAGCGTTGAACAGC-3'	
AN6318 (55 °C)	5'-ATCGTCACTCCCCTCATTAC-3'	5'-TAGCACTACCTTCTTTCCCG-3'	
AN6317 (53 °C)	5'-TAGACGCTGGGACAAGTG-3'	5'-AAGTAACGCTGGGAGTGG-3'	
AN4367 (53 °C)	5'-GACTTCACGCTCCGCAATG-3'	5'-GAACACCAGGCAGACCAC-3'	
AN8710 (55 °C)	5'-ACAATCTCAGTCGCAGTCTC-3'	5'-CCATCTTCACCAGGCAAAG-3'	
AN10696 (55 °C)	5'-TGATTCCACCCATTCCTTCTC-3'	5'-TCCTCCTCTGCTCGTTTATTC-3'	
AN3729 (53 °C)	5'-CCACCACGATGACTACTAC-3'	5'-TACGACACCTGCGAAGAAG-3'	

21. táblázat A parciális DNS szekvenciák meghatározásához használt primerek szekvenciája és annealing hőmérséklete 1 - White és munkatársai 1994; 2 - Hong és munkatársai 2005; 3 - Glass és Donaldson 1995; 4 - Carbone és Kohn 1999 szekvenátorral történt (ABI PRISM3100-Avant a Debreceni Egyetem, ÁOK, Biokémiai Intézetében).

Az általunk szekvenált DNS szakaszok és a GeneBank adatbázisban (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/) szereplő szekvenciák összehasonlításához a Nucleotid Blast programot (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) használtuk. A szekvenciáink filogenetikei analízisét a MEGA4 szoftverrel végeztük a Neighbor-Joining módszert felhasználva (Tamura és munkatársai 2007), Dr. Miskei Márton (Debreceni Egyetem) segítségével. Az evolúciós távolságokat a Maximum Composite Likelihood módszer segítségével állapítottuk meg.

### 5.8. Génexpresszió vizsgálata qRT-PCR segítségével

Az RNS izolálásához az *A. nidulans* var. roseus ATCC 58397 és *A. nidulans* FGSC A4 törzsek 24 és 37 °C-os KGL táplevesben tenyésztett 45h-s mintákat használtuk fel. A törzsek 37 °C-on ECB-vel (350 mg/L) történő kezelése a mintavétel előtt 8 órával történt. A mintákat zsugorított üvegszűrőn átszűrtük, a micéliumot jéghideg dietil-pirokarbonáttal (DEPC) kezelt vízzel mostuk, majd liofileztük. Az RNS izolálása TRISOL reagens (Invitrogen, Lofer, Ausztria) segítségével, a gyártó ajánlása szerint (Chomczynski és munkatársai, 1993) történt. Az RNS mintákat DNázzal kezeltük (Fermentas), majd RNS tartalmukat spektrofotométerrel határoztuk meg 260 nm-en. Az RNS minták minőségét denaturáló agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük. Ehhez az 1 w/v %-os MOPS-EDTA agaróz gélt 5 v/v % formaldehiddel egészítettük ki és a mintákat (5 μl) előzetesen 2 μl 25 mmol/L EDTA-t és 10 g/L SDS-t tartalmazó oldattal inkubáltuk 10 percig 68 °C-on. A MOPS-EDTA puffer összetétele az alábbi volt: 200 mmol/L MOPS, 50 mmol/L f, 10 mmol/L EDTA ( pH 7,0).

Az qRT-PCR reakciókat QuantiTect<sup>™</sup> SYBR<sup>®</sup> Green RT-PCR kittel (Qiagen, Hilden, Németország) végeztük el, a gyártó által megadott protokoll alapján. Minden reakcióelegy 500 ng totál RNS-t, 2,5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>-ot és 0,5 µmol/L génspecifikus primer párt tartalmazott. Az qRT-PCR-hez használt primerpárok szekvenciáját és az alkalmazott annealing hőmérsékletet a 21. táblázat tartalmazza.

Az qRT-PCR reakció lépései a következők voltak:

(1) reverz transzkripció, 50 °C, 30 perc

(2) reverz transzkriptáz denaturáció, 95 °C, 15 perc

(3) DNS denaturáció, 94 °C, 15sec

(4) primer hibridizáció (annealing), a 22. táblázatban megadott hőmérséklet, 30 sec

(5) lánchosszabbítás (extenzió), 72 °C, 30 sec; a (3)-(5) lépések ismétlése 40 ciklus erejéig)

Gén száma,		
annaeling	"Forward" primer szekvenciája	"Reverse" primer szekvenciája
hőmérséklet		
AN6700 (52 °C)	5'-CTATTCCCGAGCAAGTTC-3'	5'-TGATGTTCCTGACGATGGC-3'
AN7032 (51 °C)	5'-ACCAAACCGCAGAGAGC-3'	5'-TCCCGCCATACCTTGAAC-3'
AN2523 (52 °C)	5'-TTGCGACAAGGACACATTGG-3'	5'-ACCGAAAGCGTTGAACAGC-3'
AN6318 (51 °C)	5'-ATCGTCACTCCCCTCATTAC-3'	5'-TAGCACTACCTTCTTTCCCG-3'
AN6317 (51 °C)	5'-TAGACGCTGGGACAAGTG-3'	5'-AAGTAACGCTGGGAGTGG-3'
AN4367 (51 °C)	5'-GACTTCACGCTCCGCAATG-3'	5'-GAACACCAGGCAGACCAC-3'
AN8710 (52 °C)	5'-ACAATCTCAGTCGCAGTCTC-3'	5'-CCATCTTCACCAGGCAAAG-3'
AN10696 (51 °C)	5'-TGATTCCACCCATTCCTTCTC-3'	5'-TCCTCCTCTGCTCGTTTATTC-3'
AN3729 (52 °C)	5'-CCACCACGATGACTACTAC-3'	5'-TACGACACCTGCGAAGAAG-3'
AN3639 (55 °C)	5'-TGCTGCTTTGGCTCTTGGTG -3'	5'-TGGGGACGGTATCATCTGC- 3'
AN5634 (55 °C)	5'-GGTGGTCTTACTGCTGTGATG-3'	5'-CAATGGTGGATGTGATGAGGG-3'
AN2584 (55 °C)	5'-TTTCCGTCTTCTTGTTCCCCG-3'	5'-TTATCCTGGTCGTCCTTGCTG-3'
AN2585 (55 °C)	5'-GTGGACTATGCGATGCTTACC-3'	5'-CGAGAACGGGAGGACAATGAC-3'
AN4148 (55 °C)	5'-CCCTAATGAAGTCGCCTGG-3'	5'-GGTCCTCGGTGAAAGTGAAC-3'
*AN2794 (55 °C)	5'-CTTGTTGCCTTCGCCAGTATG-3'	5'-GTTAATTGACCCCGCCTCG-3'
AN8102 (55 °C)	5'-ACGGCTCACGCTACAATGC-3'	5'-AGGTATCGCTTTCGCTGGG-3'
AN6089 (55 °C)	5'-CCTTCAGCAGCAGCGATTTG-3'	5'-TACCGTCACCAGCGAGTTC-3'
AN8269 (55 °C)	5'-TCCCGATGCCGAGAACAAG-3'	5'-GAAACCGACACCAAACTGACC-3'
AN5781 (55 °C)	5'-ATTCACCGACCCTCAAACCC-3'	5'-CGCTCAGATGCCCAGAACTTG-3'
AN5129 (55 °C)	5'-GTGGAGTTCAAGGGCGAGAC-3'	5'-ATAAGCAATGGCGGCAGCAG-3'
AN3581 (55 °C)	5'-TGGCAGAACGGTATCAGCG-3'	5'-GCGGACAAGCACGGTAACG-3'
AN8692 (55 °C)	5'-CTGGACTGAGGAGAAGGGC-3'	5'-GCAAGGACGGCAACAACATCG-3'
AN0609 (55 °C)	5'-GCGGGTTGGTGCGATTCTC-3'	5'-CGGATGCCTTTGGGTGTGG-3'

AN10471 (55 °C)	5'-GCAAGGGTAAACTGGGCAC-3'	5'-GATTCTGTCTCCGTCTGGGG-3'
AN4934 (55 °C)	5'-GTTCATTACCACGCCCGAC-3'	5'-CACAGCAAGCACACTCCTC-3'
AN4401 (55 °C)	5'-CGCCCTCACCTTCACTATTG-3'	5'-ATCTCGTCGCTACCCTCAC-3'
AN4159 (55 °C)	5'-TCTCGTTTCCTTCTCCACCGC-3'	5'-GCTCCTCGTTACCCTCACC-3'
AN6450 (55 °C)	5'-CACCACCGAGGAGGACTTTG-3'	5'-AGGCGTAGAGGAGATATGCTG-3'
AN4219 (55 °C)	5'-CCTTCGCCCAAGTATCCTC-3'	5'-TGTAGTCATCGGTTCGTCTGC-3'
AN7479 (55 °C)	5'-ACTCTCCTTCACGCCTTTCTG-3'	5'-TCTCCGCCTCCTCCTTTTC-3'
AN11125 (55 °C)	5'-CAGGTCTTTTGCGTGTCCGAG-3'	5'-CGTTCAGTCTTGGTGCTTCCG-3'
AN5357 (55 °C)	5'-ACGACGGTGGTTGCTAACG-3	5'-GTGGTAGGGGAAGGAGAAC-3'
AN8553 (55 °C)	5'-CACCAACAACGAGGCAATCC-3'	5'-GAAAAGCGAATGAACACGGGG-3'
AN4583 (55 °C)	5'-TTACCACCGTTCCCACTCC-3'	5'-GTCTGCTTGTCTGCGTTGTCG-3'
AN10489 (55 °C)	5'-CCCGTTGCTGTCTATGCTC-3'	5'-GCCTTCTCCTTATCGCTGG-3'
AN9199 (55 °C)	5'-AATGAACGGGGGGGGGGGGGGGG	5'-AGCAGGAGGTTGTAGATGAGC-3'
AN4238 (55 °C)	5'-CCAGACAATGAGGCGGAAAC-3'	5'-GGAGACGGGATGAGAAGTATG-3'
AN1812 (55 °C)	5'-ATCTCTCCCCATTCCTTCAGC-3'	5'-GTCGTCCGCCGTAGTTGTG-3'
AN3675 (55 °C)	5'-GAACCTACTGTCTCCTCCC-3'	5'-TGTCTCCCTGTCGCTCAAG-3'
AN8365 (55 °C)	5'-CGGTAGGGGTGCTGAAGATG-3'	5'-GATGATGGAGGACTGGAAGGC-3'
AN2314 (55 °C)	5'-GCCCTAAGAAACCCGAAAGC-3'	5'-ACTATGTGCCGTGTCAACCAG-3'
AN1015 (55 °C)	5'-GGAACAAAACCCAACAGAGGC-3'	5'-CCAGACCACCATTACCAAGG-3'
AN11161 (55 °C)	5'-GCTGTTTGTTTGCGACCCG-3'	5'-CGTATCCCTTGCCTTGACTC-3'
AN6792 (55 °C)	5'-ACCGTCCCTTCCGATTCTCC-3'	5'-AGCGTCACCTTCCCGTCTG-3'
AN10559 (55 °C)	5'-TATCCTAACAACCCTTCCCGC-3'	5'-AAATGCCGCTGCTGACACC-3'
AN3381 (55 °C)	5'-GCCTTCCTTGCTTCGTATTCC-3'	5'-GCCATCGTTGCCTTTGCTTC-3'
AN1734 (55 °C)	5'-TCTACCTCCATTCCTCTCC-3'	5'-TTTTCACTTCTGCGGCGGC-3'
AN1418 (52 °C)	5'-GCATTAGCGGTCAAGGAG-3'	5'-TGTTCACTGTCATCGGAGC-3'
AN1428 (52 °C)	5'-GCCCGAACAAGACTATTAGAC-3'	5'-GCGATGATGCCGTAGAATAAAC-3'
AN3150 (47 °C)	5'-AGGAGGGAGGTAGCAAAAG-3'	5'-CAGATGGAGGGTAATAAGGC-3'
AN2738 (52 °C)	5'-TACGAGGAAAGGGGTCTG-3'	5'-GGCAGGTAGGATGTTGAG-3'
AN8241 (53 °C)	5'-CGCAGAAGCCAAATCCAA-3'	5'-GAAGGCACCCCAAGAAAAGTC-3'
AN9339 (52 °C)	5'-CCGAGCCCGACAACACTTAC-3'	5'-GTTCAGCGACGACAATGACG-3'
AN1006 (52 °C)	5'-TATGTCGTCCCAAAACCCCG-3'	5'-TTATTCTTCGTCCGCCTCC-3'
AN1007 (52 °C)	5'-TCGTGATTGGAGAAGAGCC-3'	5'-CGGGTATTGAGGTAGTAGTC-3'
AN5046 (53 °C)	5'-CAATTCTCCGCCATCGTCC-3'	5'-GCACCAAAGATACCACCAAG-3'
AN7820 (51 °C)	5'-CAACACCGACGAATACGA-3'	5'-ACCGAGAGGAGTGACGATAG-3'
AN10576 (52 °C)	5'-ACTCTCTTCGGTGTTGGC-3'	5'-GGGCTCTATCTCGCTAATG-3'
AN11510 (51 °C)	5"-TCTGGGGTGCTGGCGATG-3'	5'-CCGTGGTAGGTTCCGTCC-3'
AN9397 (52 °C)	5'-AGACGAAGAATGTGGTGGC-3'	5'-ACGCTGAAGAAGGAACTGG-3'
AN8637 (52 °C)	5'-CAAACGCTCCGCCATCTA C-3'	5'-CTTGAGGTGCCCGAATGT C-3'

22. táblázat A qRT-PCR vizsgálatokban használt primerek szekvenciája és anealing hőmérséklete.
Az RT-PCR termékek homogenitásának megállapítása olvadáspont meghatározással és agaróz gélelektroforézissel (1 %-os TAE agaróz gél) történt.

A relatív transzkripció (RT) mértékét a  $\Delta$  módszerrel számoltuk ki. RT = CP<sub>gén</sub>-CP<sub>referencia</sub>, ahol CP a PCR termék akkumulálódásához szükséges ciklusszám a vizsgált gén (gén), illetve a "housekeeping" gén (referencia) esetében. A "housekeeping" gén az eEF-3 elongációs faktor (AN6700) volt. Az RT érték csökkenése a vizsgált gén indukciójára utal.

#### 5.9. Microarray vizsgálatok

A microarray vizsgálatainkban az A. nidulans var. roseus ATCC 58397 törzs 24 és 37 °C-os tenyészeteiből származó RNS mintákat (KGL tápleves; 53 h) hasonlítottuk össze. A mintákat három párhuzamos kísérletből izolált, azonos mennyiségű RNS-t tartalmazó preparátumok elegyítésével hoztuk létre. A DNS-chip elkészítését, hibridizációját és leolvasását a Kromat Kft (Agilent) végezte. A chip-et Dr. Miskei Márton és Karányi Zsolt (Debreceni Egyetem) tervezte az eArray szoftver (Agilent) segítségével az A. nidulans FGSC A4 törzs genomi szekvenciájának felhasználásával (design number: 031140). Egy lemez négy független mintához felhasználható blokkra volt osztva, melyek mindegyikére 44000 génspecifikus, 60-mer hosszúságú oligomert rögzítettek, mindegyiket 4-4 ismétlésben. A hibridizációhoz használt minták előkészítéséhez az Agilent One-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis protocol lett felhasználva. A minták tisztítása RNeasy mini spin oszlopokon (Qiagen) történt, minőségük ellenőrzése az Agilent Bioanalyzer 2100, mennyiségük meghatározása az ND-1000 NanoDrop Spectrophotometer segítségével történt. Minden blokkra 825 ng fragmentált cRNS lett hibridizálva (17 h, 65 °C, 10 rpm; Agilent hybridization oven). A detektálás az Agilent MicroArray Extraction software segítségével történt; a nyers adatok az Agilent Feature Extraction software segítségével lettek előnormalizálva. A kapott adatok LOESS normalizálását (intensity-dependent blockby-block normalization) Karányi Zsolt (Debreceni Egyetem) végezte. A normalizált adatokat használtuk a log<sub>2</sub> R értékek kiszámításához. (R = J24/J37, ahol J24 a 24 °C-

on, míg a J37 a 37 °C-on inkubált tenyészetből származó minta által adott jelintenzitás egy-egy konkrét gén esetében). Azon géneket, amelyeknél a jelintenzitás (J) egyik minta esetében sem érte el a 100 egységet kihagytuk a további elemzésekből. Azon géneket, melyeknél a  $\log_2 R < -2$ , 24 °C-on represszálódó, míg azon géneket, ahol a  $\log_2 R > 2$ , 24 °C-on indukálódó géneknek tekintettük. A gének által kódolt fehérjék adatait a Broad Institute honlapján hozzáférhető Aspergillus Comparative Database-ból (www.broadinstitute.org) gyűjtöttük ki. Ezen adatokat az *Aspergillus* Genome Database adatbázis (www.aspergillusgenome.org) adataival is egybevetettük és azon gének annotálását fogadtuk el helyesnek, ahol e két adatbázis adatai nem mondtak ellen egymásnak.

#### 5.10. Statisztikai módszerek

A statisztikai elemzésekhez 3-6 független mérés átlagát és azok szórását határoztuk meg. A szignifikancia vizsgálatokhoz a Student-féle t-tesztet használtuk. Csak a  $p \le 5\%$  valószínűségi szinteken jelentkező különbségeket tekintettük szignifikánsnak.

#### 5.11. Felhasznált vegyszerek

A kísérleteinkben felhasznált finomvegyszerek, ha másként nem jelöltem, a Sigma-Aldrich Kft. (Budapest, Magyarország) termékei voltak. Minden egyéb vegyszer analitikai minőségű volt és a WVR International Kft-től (Debrecen, Magyarország) került beszerzésre.

# 6. Összefoglalás

Az echinocandinokat, mint antifungális hatású szekunder metabolitokat az 1970-es években fedezték fel. Az echinocandinok közé ma már több mint 20 természetes eredetű molekula tartozik. Közös jellemzőjük, hogy kémiailag lipopeptidek és antifungális hatásukat a  $\beta$ -1,3-glükán szintáz gátlásán keresztül fejtik ki. Minthogy a természetes echinocandinokat magas toxicitás jellemzi, ezért a gyógyászatban félszintetikus változataikat használják (Bryskier 2005). Jelenleg kereskedelmi forgalomban 3 félszintetikus lipopeptid származék, a caspofungin, az anidulafungin és a micafungin kapható. E készítményeket sikeresen alkalmazzák a klinikumban invazív és egyéb terápiára nem jól reagáló, elsősorban *Candida* ritkábban *Aspergillus* fajok által okozott fertőzések leküzdésére.

Az általunk tanulmányozott A. nidulans var. roseus ATCC 58397 törzs az anidulafungin alapanyagául szolgáló echinocandin B (ECB) termelése révén egy nagy ipari jelentőséggel bíró fonalas gomba. Ezen sivatagi gyapottermő földek talajából származó izolátum taxonómiai státusza – sok más Aspergillus "varietas"hoz hasonlóan – nem kellően tisztázott (Geiser és munkatársai 2007; Peterson 2008). Így vizsgálataink első felében a polifázikus taxonómia (Colwell 1970) alapelveit követve klasszikus és molekuláris markerek segítségével megpróbáltuk a törzs rendszertani státuszát pontosítani. ECB termelése révén az A. nidulans var. roseus szükségszerűen rendelkezik bizonyos fokú ECB rezisztenciával, így alkalmas az echinocandin rezisztencia mechanizmusának tanulmányozására. Vizsgálataink második felében ezért megpróbáltuk megérteni a törzs rezisztenciájának természetét és a kapott adatokat összevetettük a Candida fajok és az A. fumigatus szerzett echinocandin rezisztenciájával kapcsolatban leírtakkal. Klasszikus fiziológiai, qRT-PCR és microarray vizsgálattal megpróbáltuk feltérképezni az A. nidulans var. roseus fiziológiai jellegzetességeit, különös tekintettel szekunder metabolit termelésére annak érdekében, hogy adatokat gyűjtsünk az ECB fermentáció optimalizásához és a törzs jövőbeni nemesítéséhez. Végül, többféle élesztő és fonalas gomba, mint tesztorganizmus felhasználásával tanulmányoztuk az ECB és más ismert, illetve potenciálisan sejtfal stresszt okozó antifungális anyag közötti kölcsönhatásokat. Reményeink szerint e vizsgálatok eredményei nem csak e molekulák gyakorlati felhasználásához, de hatásmechanizmusuk megismeréséhez is hasznos információkat szolgáltatnak.

Vizsgálataink alapján - összhangban Klich és munkatársai (2001) eredményeivel - az A. nidulans var. roseus ATCC 58397 törzs sima falú aszkospórái ellenére (Klich és munkatársai 2001) sem tartozik az A. nidulans fajba, sokkal inkább az A. rugulosus törzsekkel mutat közeli rokonságot. Erre utalt a kalmodulin,  $\beta$ -tubulin és  $\gamma$ -aktin gének parciális szekvenciája (14. ábra, 2. és 6. táblázatok), növekedésének/szénforrás hasznosításának hőmérséklet függése (8-9. ábra) és szekunder metabolit termelése (12. ábra, 1. táblázat) is. Gyakorlati szempontból ez azt is jelenti, hogy az A. nidulansról a szakirodalomban összegyűlt nagy mennyiségű információ csak igen kritikusan általánosítható az A. nidulans var. roseus esetében. A DNS szekvenciák között tapasztalt nagyfokú hasonlóság (14. ábra, 2. táblázat) alapján nem meglepő azonban, hogy az A. nidulans genom szekvenciája sikeresen felhasználható az A. nidulans var. roseussal kapcsolatos molekuláris biológiai vizsgálatoknál (pl. primerek tervezése, ortológ gének azonosítása, microarray vizsgálatok). Az A. nidulans és az A. rugulosus, illetve az A. nidulans és az A. nidulans var. roseus közötti sikeres paraszexuális hibridizáció ugyanakkor felveti annak lehetőségét, hogy egyes szokatlan tulajdonságú Aspergillus törzsek (köztük akár az A. nidulans var. roseus is) fajok közötti kereszteződés segítségével tettek szert rendhagyó tulajdonságaikra.

Az A. nidulans var. roseus echinocandin rezisztenciájának vizsgálata alapján elmondhatjuk, hogy a törzs nem rendelkezik konstitutív echinocandin rezisztenciával a saját maga által termelt ECB-vel szemben. Sőt, ECB nem termelő körülmények között kifejezetten érzékenyebbnek mutatkozott az ECB-vel és a CASnal szemben, mint az echinocandinokat nem termelő *A. nidulans* (3. táblázat, 17-18. ábra). A törzs ECB rezisztenciája ECB adagolással, illetve az ECB képződésének biztosításával (pl. a tenyésztési hőmérséklet 37-ről 24 °C-a való csökkentésével) indukálhatónak bizonyult. Feltehetőleg a rezisztencia indukálható jellegével magyarázható a törzs rendhagyó, a paradox-effektus (Eagle és Musselman 1948; Hall és munkatársai 1988) meglétére utaló viselkedése felületi kultúrákban ECB kezelést követően (19. ábra). Elképzeléseink szerint a törzs nem termelő körülmények között mutatott fokozott ECB érzékenysége (ami legalább részben az alacsony  $\beta$ -1,3-glükán szintáz aktivitásokkal magyarázható; 3. és 8. táblázatok) az ECB rezisztencia gyors indukálódását segíthette. A rezisztencia kialakulásában fontos szerepet játszhatott a kitin szintézis aktiválódása (4. táblázat) és ezáltal a sejtfal kitin tartalmának növekedése (7. táblázat), a specifikus  $\beta$ -1,3-glükán szintáz aktivitások emelkedése (3. és 8. táblázatok) és a vegetatív növekedés jelentős lassulása is (14. táblázat). A sejtfalfehérjék szintézisében bekövetkező változások (15-16. táblázatok) arra utalnak, hogy ECB termelő körülmények között nemcsak a sejtfal poliszacharid, de fehérje összetétele is megváltozott, ami szintén befolyásolhatta a törzs rezisztenciáját. A kitin szintézis echinocandinokkal történő indukálhatóságát Candida fajok és az A. fumigatus esetében is leírták már (Fortwendel és munkatársai 2009; Walker és munkatársai 2010). Minthogy az A. nidulans var. roseus echinocandin rezisztenciájának hátterében - szemben a Candida fajok szerzett rezisztenciájával - nem a β-1,3-glükán szintáz echinocandinokkal történő gátolhatóságának megváltozása állt (3. és 8. táblázatok), rezisztenciájának mechanizmusa inkább az A. fumigatus törzsek szerzett rezisztenciájával mutat hasonlóságot (Fortwendel és munkatársai 2009; Walker és munkatársai 2010). Az A. nidulans var. roseus ECB rezisztenciájának nem konstitutív jellege feltehetőleg azzal van kapcsolatban, hogy a rezisztencia kialakulása olyan változásokat idéz elő a sejtfalban melyek, növelhetik a gomba érzékenységét egyes sejtfal stresszorokkal szemben. Erre utal az ECB és az SDS antifungális hatása között meghatározott koncentráció tartományokban megfigyelt szinergista kölcsönhatás (21. ábra, 9. táblázat) is. Ez egyben azt is jelenti, hogy ha a törzs ECB toleranciáját meg kívánjuk növelni, hogy lehetővé tegyük még több ECB képződését az ipari fermentáció alatt, akkor a rezisztencia növekedésével párhuzamosan csökkenhet a sejtek vitalitása és (akár kémiai, akár mechanikai) sejtfal stresszel szemben mutatott toleranciája is.

Az A. nidulans var. roseus ECB termelését alapvetően meghatározza a tenyésztési hőmérséklet (Boeck és Kastner 1981). Addig, amíg 37 °C-on az A. nidulanséhoz hasonló gyors növekedés és az ECB termelés hiánya jellemzi, addig 24 °C-on (a legtöbb szénforrás esetében) a növekedése lényegesen elmarad az A.

nidulansétól, amit intenzív ECB termelés kísért (13. ábra). Vizsgálataink alapján a tenyésztési hőmérséklet csökkentése jelentős transzkripciós szinten is detektálható változást idézett elő a törzsben. Ezen változások egy része a növekedés intenzitásának csökkenésével (14. táblázat) állt összefüggésben: Számos olyan gén represszálódott, melyek közvetve, vagy közvetlenül a fehérje szintézisben vesznek részt, így represszálódott sok, az aminosav és nukleotid szintézishez, a transzkripcióhoz, a transzlációhoz és a fehérjék poszttranszlációs módosításához köthető gén aktivitása is (15-16. táblázatok). Szintén represszálódtak a sziderofórok szintéziséhez és transzportjához szükséges gének (15-16. táblázatok), azaz csökkent a vas felvétel lehetősége. Ez gyakorlati szempontból is érdekes lehet, hiszen az aminosavak hidroxilezéséhez és ezen keresztül a megfelelő mennyiségű és hidroxiláltságú echinocandin termeléséhez vasra van szükség. ECB túltermelő törzsek kifejlesztésénél így nagy hangsúlyt kell fektetni a folyamat vasigényének biztosítására is.

A megfigyelt transzkripciós és fiziológiai vizsgálatok alapján, ECB termelő körülmények között nőtt a nitrát redukció intenzitása (14-16. táblázat), nőtt a tenyészetek specifikus kataláz aktivitása (14-16. táblázatok), valamint a lipid anyagcsere (zsírsav, triglicerid, szteroid szintézis/lebontás) egyensúlya a szintézis irányába tolódott el. E folyamatok fiziológiai jelentőségének tisztázása azonban további vizsgálatokat igényel.

A kísérleteinkhez használt GNL tápleves összetevői közül a szójapepton jelenléte alapvetően meghatározta a termelt szterigmatocisztin (ST) mennyiségét. Optimalizációs vizsgálatainkban a szójapepton Tyr-nal történő helyettesítésével sikerült egy olyan tápközeget kialakítani, amelyben számottevően csökkent a termelt ST mennyisége ( $45 \pm 5 \mu g/g$ -ról  $6,5 \pm 2 \mu g/g$ -ra) anélkül, hogy ez a képződött ECB koncentrációját lényegesen csökkentette volna. A Tyr-hoz hasonlóan jó nitrogénforrásnak bizonyult a Phe és a Trp is, míg a tesztelt többi aminosav közül csak az ECB felépítésében résztvevő Orn, Pro és Thr együttes jelenléte volt előnyös (10. táblázat). Az Orn, Pro és Thr hatása nem meglepő és egybevág az irodalmi adatokkal is (Petersen és munkatársai 2001). Az aromás aminosavak ECB termelést segítő hatásának megértése azonban további vizsgálatokat igényel. Egy érdekes

egybeesés, hogy ECB termelő körülmények között bár számos az aminosav szintézisben résztvevő gén aktivitása csökkent, az AN1734 gén ortológjának transzkripciója növekedett (16. táblázat). E gén feltételezett terméke a 3-dehidrosikimát dehidrogenáz a Tyr és a Phe szintéziséhez szükséges.

Kísérleteinkben a napraforgóolaj jelenléte nélkülözhetetlennek bizonyult a hatékony ECB termeléshez. A napraforgóolaj jelenléte - azon túl, hogy a belőle felszabaduló linolsav közvetlenül beépülhet az ECB-be - több ok miatt is előnyös lehetett: 1) Biztosította a tenyészet (és így az ECB-termelő biomassza) lassú növekedését a glükóz gyors elfogyását követően (11. és 23. ábra). 2) Mérsékelte a tenyészetek microarray és qRT-PCR adatok alapján jósolt megnövekedett lipid szintézis igényét. 3) Gátolta a tenyészet lúgosodását (23. ábra). Ez utóbbi hatás feltehetőleg részben a trigliceridből felszabaduló zsírsavaknak köszönhető, részben annak, hogy a növekedés biztosításával megakadályozta az ammóniatermelés indukálódását (Emri és munkatársai 2004). 4) A fentieken túl csökkentette a termelt ECB antifungális hatását a termelő törzsre nézve (13. táblázat).

A gombák igen sok biológiailag aktív anyagot termelnek, melyek gyakorlati jelentősége sokrétű. Felhasználják őket, illetve származékaikat többek között a humán terápiában, illetve az állatgyógyászatban, vagy akár élelmiszerek és takarmányok tartósítására is (Keller és munkatársai 2005; Galgóczy és munkatársai 2011; Sharma és munkatársai 2011). Egy-egy gomba rendszerint többféle biológiailag aktív molekulát is termel egy időben, melyek befolyásolhatják egymás aktivitását. A hatóanyagok között fellépő esetleges interakciók felhasználásukat is alapvetően meghatározzák. Vizsgálatainkban négy különböző, fonalas gombák által termelt, a sejtfal homeosztázist (potencionálisan) befolyásoló antifungális molekula hatása közötti interakciót teszteltük. A kapott eredmények összefoglalásaként elmondható, hogy az ECB antagonista módon viselkedett a PAF-fal, azaz a P. chrysogenum által termelt antifungális fehérjével szemben a fonalas gombák esetében (19. táblázat). A PAF és a ChiB kitináz, illetve az EngA  $\beta$ -1,3-glükanáz, mint sejtfalbontó hidrolázok között azonban nem tudtunk interakciót kimutatni (18. táblázat). A PAF önmagában nem gátolta a C. albicans és a S. cerevisiae növekedését, ahogy az várható is volt (Hegedűs és munkatársai 2011), és nem befolyásolta az ECB, a ChiB és az EngA antifungális hatását sem az élesztők esetében. Mindezek alapján, Binder és munkatársainak (2010) eredményeivel összhangban, azt feltételezzük, hogy a PAF csak kis mértékben és feltehetőleg csak közvetett módon (pl. a frissen szintetizált kitin szálak sejtfalba épülésének megzavarásán keresztül; Binder és munkatársai 2010) befolyásolhatja a sejtfal homeosztázist. A sejtfalbontó hidrolázok ugyanakkor szinergista kölcsönhatást mutattak az ECB-vel mind az élesztők, mind a fonalas gombák esetében (17. táblázat). E hatás megerősíti azt az általános tapasztalatot, miszerint többféle, eltérő működésű sejtfalkárosító anyag kombinált alkalmazása megnöveli antifungális aktivitásuk hatékonyságát (el-Sherbeini és Clemas 1995; Ganesan és munkatársai 2004) és alátámasztja azon feltételezésünket, miszerint a konstitutív ECB rezisztencia nem előnyös az *A. nidulans* var. *roseus* számára, mert megnövelheti más sejtfal stresszorokkal szembeni érzékenységét.

## 7. Summary

Echinocandins as antimycotics were discovered in 1970s. Nowadays, more than 20 natural molecules belong to this group. They are lipopeptides and inhibit  $\beta$ -1,3-glucan synthase. Since natural echinocandins have high toxicity, their semisynthetic derivatives are used in medicine (Brysker 2005). Three semisynthetic echinocandins can be bought in trade market: caspofungin, anidulafingin and micafungin. These products are used successively in medicine against *Candida*, rarely *Aspergillus* infections.

A. nidulans var. roseus is an industrially important strain owing to its production of the antifungal compound echinocandin B (ECB), the base material of anidulafungin. The taxonomical position of this isolate derived from a desert cotton field soil sample - similarly to the other subspecies from the Aspergillus genus - still remains questionable (Geiser et al. 2007; Peterson 2008). Therefore, in the first half of our experiments we tried to define the taxonomical status of the strain using a combination of classical and molecular methods (polyphasic taxonomy; Colwell 1970). Due to its ECB production, A. nidulans var. roseus should possess resistance to echinocandins; therefore it can be used to study the mechanism of echinocandin resistance. In the second half of our experiments, we tried to understand the resistance of A. nidulans var. roseus and we compared the received data with those obtained from *Candida* species and *A. fumigatus* possessing acquired echinocandin resistance. In order to collect data for the optimization of the ECB fermentation process and for the strain improvement we studied the physiological properties of A. nidulans var. roseus using classical, qRT-PCR based and microarray techniques. Finally, we investigated the pair vise interactions between ECB and other antimycotics affecting (potentially) the cell wall homeostasis. We hope that these experiments provide data for the practical application of these drugs and for understanding their mode of action.

Similarly to Klich *et al.* (2001), we found that the *A. nidulans* var. *roseus* isolate does not belong to *A. nidulans* species, despite of its smooth-walled

ascospores (Klich *et al.* 2001), rather it shows close similarity to *A. rugulosus* strains. It was supported by the partial DNA sequence data of calmodulin,  $\beta$ -tubulin and  $\gamma$ -actin genes (Fig. 14; Table 2 and 6), the temperature dependence of its growth on different carbon sources (Fig. 8 and 9) and its secondary metabolite production (Fig. 12; Table 1). This information suggests that the physiological data available in the literature for *A. nidulans* can only be used very critically in case of *A. nidulans* var. *roseus*. Thanks to the high DNA sequence similarity observed between *A. nidulans* and *A. nidulans* var. *roseus* (Fig. 14; Table 2) the genome sequence data of *A. nidulans* var. *roseus* (e.g. primer design, identification of orthologue genes, microarray experiments). The possibility of parasexual hybridization between *A. nidulans* and *A. nidulans* (e.g. primer design, identification of orthologue genes, microarray experiments). The possibility of parasexual hybridization between *A. nidulans* and *A.* 

According to our results A. nidulans var. roseus did not possess inherited resistance to ECB. Under ECB non producing conditions, the tolerance of A. nidulans var. roseus against ECB or caspofungin was even lower than those of the echinocandin non-producer A. nidulans (Table 3, Fig. 17 and 18). The ECB resistance of A. nidulans var. roseus proved to be inducible among ECB non producing condition (37 °C) with ECB or by ensuring ECB production (e.g. by decreasing the culturing temperature from 37 °C to 24 °C). The unusual behavior of this strain observed in surface culture after ECB treatment can be explained with the paradoxical growth (Eagle and Musselman 1948; Hall et al. 1988) (Fig. 19) and it was most likely the consequence of the observed inducible resistance. We assume that the high ECB sensitivity of the strain observed among ECB non producing condition (which can be explained, at least partially, by its low specific  $\beta$ -1,3-glucan synthase activity; Table 3 and 8) helped the fast induction of ECB resistance. The ECB resistance of A. nidulans var. roseus can be explained with the induction of chitin biosynthesis (Table 4) and as a consequence the increases in the chitin content of the cell wall (Table 7), the increased  $\beta$ -1,3-glucan synthase activity (Table 3 and

8) as well as the reduced vegetative growth (Table 14). The observed changes in the transcription of certain cell wall protein genes (Table 15 and 16) suggests that not only the polysaccharide but also the protein composition of cell wall changed under ECB producing condition which may also influence the ECB resistance of A. nidulans var. roseus. Induction of chitin synthesis by echinocandins have been described in Candida species and A. fumigatus previously (Fortwendel et al. 2009; Walker et al. 2010). Similarly to the acquired echinocandin resistance of A. fumigatus (Fortwendel et al. 2009; Walker et al. 2010) the resistance of A. nidulans var. roseus was not related to the altered echinocandin sensitivity of  $\beta$ -1,3-glucan synthase. We assume that constitutive resistance is not beneficial for the fungus because any genetically 'imprinted' changes in the cell wall composition and structure may be helpful to resist a few given types of stress but may be disadvantageous in combating others. This is exemplified well by the interactions between SDS and ECB treatment where even synergistic effect was observed at certain ECB and SDS concentrations (Fig. 21; Table 9). It also suggests that if we want to increase the ECB tolerance of A. nidulans var. roseus in order to develop a strain producing more ECB, the higher ECB tolerance may be accompanied with less viability and less tolerance against mechanic or chemical cell wall stress.

ECB production of *A. nidulans* var. *roseus* is depends highly on the culturing temperature (Boeck and Kastner 1981). At 37 °C, *A. nidulans* var. *roseus* grew almost as fast as *A. nidulans* but did not produce any ECB, while at 24 °C its slow growth was accompanied with intensive ECB synthesis (Fig. 13). According to our experiments, the reduction of cultural temperature from 37 °C to 24 °C had significant effects on the physiology of the culture that could be detected on even transcription level. Some of these changes are in connection with the reduction of growth intensity (Table 14). Several genes involved (directly or indirectly) in the protein synthesis (amino acid and nucleotide synthesis, transcription, translation, posttranslational modifications) were repressed (Table 15-16). Genes necessary for the synthesis and transport of siderophores were also repressed (Table 15-16). This observation can be interesting from practical point of view as well, since iron is needed for the hydroxylation of amino acids, and therefore it is also necessary for

the production of well-hydroxylated echinocandins in adequate amount. Therefore supporting the iron uptake of ECB overproducer strains can be an important question during the improvement of the strain or the fermentation process. Under ECB producing conditions intensification of nitrate reduction (Table 14-16), increase in catalase activities (Table 14-16) as well as a shift towards synthesis in the balance of lipid metabolism was observed. Understanding the physiological significance of these changes needs further investigations.

According to our results soybean peptone, a component of GNL broth used for ECB production, proved to be important in supporting sterigmatocystin (ST) formation. By replacement of soybean peptone with Tyr and by optimization the composition of this medium we could markedly decrease the ST content of the fermentation broth (from  $45 \pm 5 \ \mu g/g$  to  $6.5 \pm 2 \ \mu g/g$ ) without significantly decreasing the amount of produced ECB. Similarly to Tyr, Phe, Trp and the mixture of Orn, Pro and Thr were also proved to be good nitrogen sources (Table 10). The beneficial effect of Orn, Pro and Thr as amino acids involved in ECB production is not surprising and in good accordance with the previous observations (Petersen *et al.* 2001). However, understanding the effect of aromatic amino acids on ECB production needs further investigations. An interesting coincidence is that although the activity of several genes involved in amino acid synthesis decreased under ECB producing circumstances, the transcription of the AN1734 orthologue increased. This gene encodes a putative 3-dehydro shikimate dehydrogenase which is involved in the biosynthesis of Tyr and Phe.

Sunflower oil proved to be necessary for efficient ECB production. Beside of the fact that linolenic acid released from sunflower oil could directly incorporate into ECB, presence of sunflower oil in the fermentation broth can be advantageous in many ways: 1) It ensured continuous growth of the culture (therefore the continuous increase in ECB producing biomass) after the quick depletion of glucose (Fig. 11 and 23). 2) It reduced the need of intensive lipid synthesis supposed by the basis of microarray and qRT-PCR data. 3) It prevented the alkalification of culture (Fig. 23) by releasing fatty during its extracellular hydrolysis and by inhibiting ammonia production of the cells (Emri *et al.* 2004). 4) In addition it reduced the antifungal effect of the produced ECB on the fungus (Table 13).

Fungi produce large amounts of biologically active compounds which have great practical significance. Many of these compounds are used in human therapy or in veterinary medicine and even for preserving foods and feeds (Keller *et al.* 2005; Galgóczy et al. 2011; Sharma et al. 2011). Fungi usually produce more than one type of these biologically active molecules which can interact with each other. These interactions determine their applications as well. We tested the pairwise interactions between four different antifungal molecules potentially affecting cell wall homeostasis. Summing up the results, ECB and PAF (antifungal protein produced by *Penicillium chrysogenum*) showed antagonistic effect on the tested filamentous fungi (Table 19). In contrast, we could not find any interaction between PAF and ChiB chitinase or EngA  $\beta$ -1,3-glucanase (the cell wall degrading hydrolases of A. nidulans) (Table 18). PAF alone did not inhibit the growth of C. albicans and S. cerevisiae as it was to be expected (Hegedűs et al. 2011); and it did not influenced the antifungal effect of ECB, ChiB and EngA on yeasts. All these data suggest - in accordance with the results of Binder et al. (2010) - that PAF can only influence cell wall homeostasis in an indirect way (for example by disturbing the deposition of newly synthesized chitin filaments into the cell wall; Binder et al. 2010). Cell wall degrading hydrolases showed synergist interaction with ECB in the cases of both yeasts and filamentous fungi (Table 17). This effect is in good accordance with previous findings showing that combined usage of different types of cell wall degrading compounds increases the efficiency of their antifungal activity (el-Sherbeini and Clemas 1995; Ganesan et al. 2004). These data also support our assumption that constitutive ECB resistance and production is not advantageous for A. nidulans var. roseus, since it can increase its sensitivity to other cell wall stressors.

# 8. Irodalomjegyzék

Abdollahi, A., Buchanan, R. L. (1981) Regulation of aflatoxin biosynthesis: Characterization of glucose as an apparent inducer of aflatoxin production. *J Food Sci* 46; 143-146

Anderson, M.E. (1985) Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. *Methods Enzymol* 113; 548-555

Antachopoulos, C., Meletiadis, J., Sein, T., Roilides, E., Walsh, T.J. (2008) Comparative in vitro pharmacodynamics of caspofungin, micafungin, and anidulafungin against germinated and nongerminated *Aspergillus* conidia. *Antimicrob Agents Chemother* 52; 321-328

Arcidiacono, S., Kaplan, D.L. (1992) Molecular weight distribution of chitosan isolated from *Mucor rouxii* under different culture and processing conditions. *Biotechnol Bioeng.* 39; 281-286

Arendrup, M.C., Perkhofer, S., Howard, S.J., Garcia-Effron, G., Vishukumar, A., Perlin, D., Lass-Florl, C. (2008) Establishing in vitro–in vivo correlations for *Aspergillus fumigatus*: the challenge of azoles versus echinocandins. *Antimicrob Agents Chemother* 52; 3504–3511

Arendrup, M.C., Garcia-Effron, G., Buzina, W., Mortensen, K.L., Reiter, N., Lundin, C., Jensen, H.E., Lass-Florl, C., Perlin, D.S., Bruun, B., (2009) Breakthrough *Aspergillus fumigatus* and *Candida albicans* double infection during caspofungin treatment: laboratory characteristics and implication for susceptibility testing. *Antimicrob Agents Chemother* 53; 1185–1193

Arikan, S., Lozano-Chiu, M., Paetznick, V., Rex, J.H., (2001) In vitro susceptibility testing methods for caspofungin against *Aspergillus* and *Fusarium* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 45; 327–330

Bachmann, S.P., VandeWalle, K., Ramage, G., Patterson, T.F., Wickes, B.L., et al., (2002b) *In vitro* activity of caspofungin against *Candida albicans* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 46; 3591–3596

Balashov, S.V., Park, S., Perlin, D.S. (2006) Assessing resistance to the echinocandin antifungal drug caspofungin in *Candida albicans* by profiling mutations in FKS1. *Antimicrob Agents Chemother* 50; 2058-63

Ballance, D.J., Turner, G. (1986) Gene cloning in *Aspergillus nidulans*: isolation of the isocitrate lyase gene (acuD). *Mol Gen Genet* 202; 271-275

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

Bartizal, K., Gill, C.J., Abruzzo, G.K., Flattery, A.M., Kong, L., Scott, P.M., Smith, J.G., Leighton, C.E., Bouffard, A., Dropinski, J.F., Balkovec, J. (1997) In vitro preclinical evaluation studies with the echinocandin antifungal MK-0991 (L-743,872). *Antimicrob Agents Chemother* 41; 2326-2332

Bartnicki-Garcia, S. (1968) Cell wall chemistry, morphogenesis and taxonomy of filamentous fungi. *Annu Rev Microbiol* 22; 97–108

Beauvais, A., Bruneau, J.M., Mol, P.C., Buitrago, M.J., Legrand, R., Latge, J.P., (2001) Glucan synthase complex of *Aspergillus fumigatus*. *J Bacteriol* 183; 2273–2279

Beauvais, A., Maubon, D., Park, S., Morelle, W., Tanguy, M., Huerre, M., Perlin, D.S., Latge, J.P. (2005) Two α(1–3) glucan synthases with different functions in *Aspergillus fumigatus*. *Appl Environ Microbiol* 71; 1531–1538

Bennett, J. W., Rubin, P. L., Lee, L. S., Chen, P. N. (1979) Influence of trace elements and nitrogen sources on versicolorin production by a mutant strain of *Aspergillus parasiticus*. *Mycopathologia* 69; 161-166

Bernard, M., Latgé, J.P. (2001) Aspergillus fumigatus cell wall: composition and biosynthesis. *Med Mycol* 39; 9–17

Betts, R.F., Nucci, M., Talwar, D., Gareca, M., Queiroz-Telles, F., Bedimo, R.J., Herbrecht, R., Ruiz-Palacios, G., Young, J.A., Baddley, J.W., Strohmaier, K.M., Tucker, K.A., Taylor, A.F., Kartsonis, N.A.; Caspofungin High-Dose Study Group. (2009) A Multicenter, doubleblind trial of a high-dose caspofungin treatment regimen versus a standard caspofungin treatment regimen for adult patients with invasive candidiasis. *Clin Infect Dis* 48; 1676-1684

Binder, U.; Oberparleiter, C.; Meyer, V., Marx, F. (2010) The antifungal protein PAF interferes with PKC/MPK and cAMP/PKA signalling of *Aspergills nidulans*. *Molecular Microbiology* 75; 294-307

Boeck L.D., Kastner, R.E. (1981) Method of producing the A-30912 antibiotics. U.S. Patent 4,288,549

Bok, J.W., Keller, N.P. (2004) LaeA, a Regulator of Secondary Metabolism in *Aspergillus* spp. *Eukaryotic Cell* 3; 527–535

Borgia, P.T., Iartchouk, N., Riggle, P.J., Winter, K.R., Koltin, Y., Bulawa, C.E. (1996) The chsB gene of *Aspergillus nidulans* is necessary for normal hyphal growth and development. *Fungal Genet Biol* 20; 193-203

Bowman, J.C., Hicks, P.S., Kurtz, M.B., Rosen, H., Schmatz, D.M., Liberator, P.A., Douglas, C.M., (2002) The antifungal echinocandin caspofungin acetate kills growing cells of *Aspergillus fumigatus* in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 46; 3001–3012

Bowman, S.M., Free, S.J. (2006) The structure and synthesis of the fungal cell wall. *Bioessays* 28; 799-808

Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 2; 248-254

Bradshaw R.E., Lee K.U., Peberdy J.F. (1983) Aspects of genetic interaction in hybrids of *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus rugulosus* obtained by protoplast fusion. J Gen Microbiol 129; 3525-3533

Brakhage, A.A. (1998) Molecular regulation of beta-lactam biosynthesis in filamentous fungi. *Microbiol Mol Biol Rev* 62; 547-585

Brown, J.A., Catley, B.J. (1992) Monitoring polysaccharide synthesis in *Candida albicans*. *Carbohydr Res* 227; 195–202

Bryskier, A. (2005) Antimicrobial Agents, Antibacterials and Antifungals; ASM Press;ISBN13: 9781555815929, ISBN10: 1555815928

Bruinenberg, P.M. Van Dijken, J.P., Scheffers, W.A. (1983) An Enzymatic analysis of NADPH production and consumption in *Candida utilis*. J Gen Microbiol 129; 965-971

Brul, S., King, A., van der Vaart, J.M., Chapman, J., Klis, F., Verrips, C.T. (1997) The incorporation of mannoproteins in the cell wall of *S. cerevisiae* and filamentous *Ascomycetes. Antonie Van Leeuwenhoek* 72; 229-237

Bruns, T.D., White, T.J., Taylor, J.W. (1991) Fungal molecular systematics. *Annual Review* of Ecology and Systematics 22; 525-564

Bruns, T.D. (2001). ITS Reality. Inoculum 52; 2-3

Bulawa, C.E. (1992) CSD2, CSD3, and CSD4, genes required for chitin synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*: the CSD2 gene product is related to chitin synthases and to developmentally regulated proteins in *Rhizobium* species and *Xenopus laevis*. *Mol Cell Biol* 12; 1764–1776

Cacho, R.A., Jiang, W., Chooi, Y.H., Walsh, C.T., Tang, Y. (2012) Identification and Characterization of the Echinocandin B Biosynthetic Gene Cluster from Emericella rugulosa NRRL 11440. *J Am Chem Soc* 134; 16781-16790

Cancidas, P.I. (2005) Cancidas package insert [online]. Rahway, NJ: Merck.Accessedon3January2006.URL:http://www.cancidas.com/cancidas/shared/documents /english/pi.pdf

Carrillo-Munoz, A.J., Giusiano, G., Ezkurra, P.A., Quindós, G. (2006) Antifungal agents: Mode of action in yeast cells. *Rev Esp Quimioterap* 19; 130-139

Carver, P.L. (2004) Micafungin. Ann Pharmacother 38; 1707-1721

Chamilos, G., Lewis, R.E., Albert, N., Kontoyiannis, D.P. (2007) Paradoxial effect of echinocandins across *Candida* species in vitro: evidence for echinocandin-specific and *Candida* species-related differences. *Antimicrob Agents Chemother* 51; 2257-2259

Chandrasekar, P.H., Sobel, J.D. (2006) Micafungin: a new echinocandin. *Clin Infect Dis* 42; 1171-1178

Chen, S.C., Slavin, M.A., Sorrell, T.C. (2011) Echinocandin antifungal drugs in fungal infections: a comparison. *Drugs* 71; 11-41

Chinomiya, M., Ohta, A., Horiuchi, H. (2005) Expression of asexual developmental regulator gene abaA is affected in the double mutants of class I and class II chitin synthase genes, chsC and chsA, of *Aspergillus nidulans*. *Curr Genet* 48, 171-183

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.

Clemons, K.V., Espiritu, M., Parmar, R., Stevens, D.A. (2006) Assessment of the paradoxical effect of caspofungin in therapy of candidiasis. *Antimicrob Agents Chemother* 50; 1293-1297

Colwell, R.R. (1970) Polyphasic taxonomy of the genus Vibrio: numerical taxonomy of Vibrio Cholerae, Vibrio parahaemolyticus and relazed Vibrio species. J Bacteriol 140; 410-433

Costa-de-Oliveira, S., Marcos Miranda, I., Silva, R.M., Pinto, E., Silva, A., Rocha, R., Amorim, A., Gonçalves, Rodrigues, A., Pina-Vaz, C. (2011) FKS2 mutations associated with decreased echinocandin susceptibility of *Candida glabrata* following anidulafungin therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 55; 1312-1314

Cota, J.M., Grabinski, J.L., Talbert, R.L., Burgess, D.S., Rogers, P.D., Edlind, T.D., Wiederhold, N.P. (2008) Increases in SLT2 expression and chitin content are associated with incomplete killing of *Candida glabrata* by caspofungin. *Antimicrob Agents Chemother* 52; 1144-1146

Culp, D.W., Dodge, C.L., Miao, Y., Li, L., Sag-Ozkal, D., Borgia, P.T. (2000) The chsA gene from *Aspergillus nidulans* is necessary for maximal conidiation. *FEMS Microbiol Lett* 182; 349-353

Debono, M., Abbott, B.J., Fukuda, D.S., Barnhart, M., Willard, K.E., Molloy, R.M., Michel, K.H., Turner, J.R., Butler, T.F., Hunt, A.H. (1989) Synthesis of new analogs of echinocandin B by enzymatic deacylation and chemical reacylation of the echinocandin B peptide: synthesis of the antifungal agent cilofungin (LY121019). *J Antibiot (Tokyo)* 42; 389-397

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; 72-81

De Rosa, F.G., Garazzino, S., Pasero, D., Di Perri, G., Ranieri, V.M. (2009) Invasive candidiasis and candidemia: new guidelines. *Minerva Anestesiol* 75; 453-458

Denning, D.W. (2003) Echinocandin antifungal drugs. Lancet 362; 1142-1151

De Nobel, J.G., Van Den Ende, H., Klis, F.M. (2000) Cell wall maintenance in fungi. *Trends Microbiol* 8, 344–345

Deresinski, S.C., Stevens, D.A. (2003) Caspofungin. Clin Infect Dis 36; 1445-1457

Dhanwant, K., Sandhu, R. S. (1963) A New Variety of Aspergillus nidulans. Mycologia, Vol. 55, pp. 297-299

Dobzhansky, T. (1937) Genetics and the Origin of Species. Irvington: Columbia University Press.

Douglas, C.M., Foor, F., Marrinan, J.A., Morin, N., Nielsen, J.B., Dahl, A.M., Mazur, P., Baginsky, W., Li, W., el-Sherbeini, M. (1994) The *Saccharomyces cerevisiae* FKS1 (ETG1) gene encodes an integral membrane protein which is a subunit of beta-1,3-D-glucan synthase. *Proc Natl Acad Sci USA* 91; 12907–12911

Douglas, C.M., D'Ippolito, J.A., Shei, G.J., Meinz, M., Onishi, J., Marrinan, J.A., Li, W., Abruzzo, G.K., Flattery, A., Bartizal, K., Mitchell, A., Kurtz, M.B., (1997) Identification of the FKS1 gene of *Candida albicans* as the essential target of 1,3-beta-D-glucan synthase inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* 41, 2471–2479

Douglas, C.M. (2001) Fungal beta-1,3-D-glucan synthesis. Med Mycol 39; 55-66

Douglas, C.M., (2006) Understanding the microbiology of the Aspergillus cell wall and the efficacy of caspofungin. *Med Mycol* 44; 95–99

Eagle, H., Musselman, A.D. (1948) The rate of bactericidal action of penicillin in vitro as a function of its concentration, and its paradoxically reduced activity at high concentrations against certain organisms. *J Exp Med* 88; 99-131

Ecker, M., Deutzmann, R., Lehle, L., Mrša, V., Tanner, W. (2006) PIR-proteins of *Saccharomyces cerevisiae* are attached to b-1,3-glucan by a new proteincarbohydrate linkage. *J Biol Chem* 281; 11523–11529

Eigentler, A., Pócsi, I., Marx, F. (2011) The anisin1 gene encodes a defensin-like protein and supports the fitness of *Aspergillus nidulans*. Arch Microbiol DOI 10.1007/s00203-011-0773-y.

El-Sherbeini, M., Clemas, J.A. (1995) Nikkomycin Z supersensitivity of an echinocandinresistant mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Antimicrob Agents Chemother* 39, 200-207

Emri, T., Pócsi, I., Szentirmai, A. (1998) Changes in the glutathione (GSH) metabolism of *Penicillium chrysogenum* grown on different nitrogen, sulphur and carbon sources. *Journal of Basic Microbiology* 38; 9-14

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

Emri, T., Tóth, V., Nagy, Cs.T., Nagy, G., Pócsi, I., Gyémánt, Gy., Antal, K., Balla, J., Balla, Gy., Román, Gy., Kovács, I., Pócsi, I. (2012) Towards high-siderophore - content foods - optimization of coprogen production in submerged cultures of *Penicillium nalgiovense*. (Közlésre benyújtva)

Espinel-Ingroff, A. (2003) Utility of mould susceptibility testing. *Curr Opin Infect Dis* 16, 527–532

Espinel-Ingroff, A. (2003) In vitro antifungal activities of anidulafungin and micafungin, licensed agents and the in vestigational triazole posaconazole as determined by NCCLS methods for 12,052 fungal isolates: review of the literature. *Rev Iberoam Micol* 20; 121-136

Fassatiová, O. (1984) Penészek és fonalasgombák az alkalmazott mikrobiológiában. Mezőgazdasági Kiadó, Budapest.

Feng, G. H., Leonard, T.J. (1998) Culture conditions control expression of the genes for aflatoxin and sterigmatocystin biosynthesis in *Aspergillus parasiticus* and *A. nidulans. Appl Environ Microbiol* 64; 2275–2277

Fernandez-Canon, J.M., Penalva, M.A. (1995) Molecular characterization of a gene encoding a homogentisate dioxygenase from *Aspergillus nidulans* and identification of its human and plant homologues. *J Biol Chem* 270; 21199-21205

Fillinger, S., Chaveroche, M.K., Shimizu, K., Keller, N., d'Enfert, C. (2002) cAMP and ras signalling independently control spore germination in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* 44; 1001-1016

Fleet, G.H. (1991) Cell walls. In: Rose, A.H., Harrison, J.S. (Eds); The Yeasts, Vol. 4., Organelles, 2nd edn. Academic, London, Press. p 199–278

Fontaine, T., Hartland, R.P., Diaquin, M., Simenel, C., Latge, J.P. (1997) Differential patterns of activity displayed by two exo-b-1,3-glucanases associated with the *Aspergillus fumigatus* cell wall. *J Bacteriol* 179; 3154–3163

Fontaine, T., Simenel, C., Dubreucq, G., Adam, O., Delepierre, M., Lemoine, J., Vorgias, C.E., Diaquin, M., Latge, J.P. (2000) Molecular organization of the alkali-insoluble fraction of *Aspergillus fumigatus* cell wall. *J Biol Chem* 275; 27594–27607

Fortwendel, J.R., Juvvadi, P.R., Pinchai, N., Perfect, B.Z., Alspaugh, J.A., Perfect, J.R., Steinbach, W.J. (2009) Differential effects of inhibiting chitin and 1,3-(beta)-Dglucan synthesis in ras and calcineurin mutants of *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemother* 53; 476–482

Freitas, J.S., Silva, E.M., Leal, J., Gras, D.E., Martinez-Rossi, N.M., Dos Santos, L.D., Palma, M.S., Rossi, A. (2011) Transcription of the Hsp30, Hsp70, and Hsp90 heat shock protein genes is modulated by the PalA protein in response to acid pH-sensing in the fungus *Aspergillus nidulans. Cell Stress Chaperones* 16; 565-572

Frisvad J.C. (1985) Secondary metabolites as an aid to Emericella classification. In Advances in Penicillium and Aspergillus systematics ed. Samson, R.A. and Pitt, J. pp. 437–444 New York: Plenum.

Fujioka, T., Mizutani, O., Furukawa, K., Sato, N., Yoshimi, A., Yamagata, Y., Nakajima, T., Abe, K. (2007) MpkA-Dependent and -independent cell wall integrity signaling in *Aspergillus nidulans. Eukaryot Cell* 6; 1497-1510

Galgóczy L, Papp T, Leiter É, Marx F, Pócsi I, Vágvölgyi C (2005) Sensitivity of different *Zygomycetes* to the *Penicillium chrysogenum* antifungal protein (PAF). *J Basic Microbiol* 45; 136-141

Ganesan, L.T., Manavathu, E.K., Cutright, J.L., Alangaden, G.J., Chandrasekar, P.H. (2004) In-vitro activity of nikkomycin Z alone and in combination with polyenes, triazoles or echinocandins against *Aspergillus fumigatus*. *Clin Microbiol Infect* 10; 961-966

Garcia-Effron, G., Katiyar, S.K., Park, S., Edlind, T.D., Perlin, D.S. (2008) A naturally occurring proline-to-alanine amino acid change in Fks1p in *Candida parapsilosis, Candida orthopsilosis,* and *Candida metapsilosis* accounts for reduced echinocandin susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother* 52; 2305-2312

Gardiner, R.E., Souteropoulos, P., Park, S., Perlin, D.S. (2005) Characterization of *Aspergillus fumigatus* mutants with reduced susceptibility to caspofungin. *Med Mycol* 43; 299–305

Gasch, A.P. (2003) The environmental stress response: a common yeast response to diverse environmental stresses. In: Topics in Current Genetics Vol. 1. Yeast Stress Responses, Edd.: Hohmann, S, Mager, W.H., pp. 11-70. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2003

Geiser, D.M., Jimenez-Gasco, M.D., Kang, S.C., Makalowska, I., Veeraraghavan, N., Ward, T.J, Zhang, N., Kuldau, G.A., O''Donnell, K. (2004). FUSARIUM–ID v. 1.0: A DNA sequence database for identifying *Fusarium*. *European Journal of Plant Pathology* 110; 473–479

Geiser, D.M., Klich, M.A., Frisvad, J.C., Peterson, S.W., Varga, J., Samson, R.A. (2007) The current status of species recognition and identification in *Aspergillus*. *Stud Mycol* 59; 1–10

Georgopapadakou, N.H. (1998) Antifungals: mechanism of action and resistance, established and novel drugs. *Curr Opin Microbiol* 1; 547-557

Glass NL, Donaldson GC (1995). Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Appl Environ Microb* 61; 1323–1330

Gow N. A. R., Frank L. van de Veerdonk, Alistair J. P. Brown, Mihai G. Netea (2012) *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. *Nature Reviews Microbiology* 10; 112-122

Gregory, E., Daryl, D., De, Pestel., Peggy, L.C. (2007) Comparasion of echinocandin antifungals. *Ther Clin Risk Manag* 3; 71-97

Grun, C.H., Hochstenbach, F., Humbel, B.M., Verkleij, A.J., Sietsma, J.H., Klis, F.M., Kamerling, J.P., Vliegenthart, J.F. (2005) The structure of cell wall a-glucan from fission yeast. *Glycobiology* 15; 245–257

Gun, L.D., Shin, S.Y., Maeng, C.Y., Jin, Z.Z., Kim, K.L., Hahm, K.S. (1999) Isolation and characterization of a novel antifungal peptide from *Aspergillus niger*. *Biochem Biophys Res Commun* 263; 646-651

Gugnani, H.C. (2003) Ecology and taxonomy of pathogenic Aspergilli. Frontiers in Bioscience 8; 346-357

Gustin, M.C., Albertyn, J., Alexander, M., Davenport, K. (1998) MAP kinase pathways in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* 62; 1264-300

Ha, Y.S., Covert, S.F., Momany, M. (2006) FsFKS1, the 1,3-beta-glucan synthase from the caspofungin-resistant fungus *Fusarium solani*. *Eukaryot Cell* 5; 1036–1042

Hagen, S., Marx, F., Ram, A.F., Meyer, V. (2007) The antifungal protein AFP from *Aspergillus giganteus* inhibits chitin synthesis in sensitive fungi. *Appl Environ Microbiol* 73; 2128-2134

Hall, G.S., Myles, C., Pratt, K.J., Washington, J.A. (1988) Cilofungin (LY121019), an antifungal agent with specific activity against *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. *Antimicrob. Agents Chemother* 32; 1331-1336

Han, K.H., Seo, J.A., Yu, J.H. (2004) A putative G protein-coupled receptor negatively controls sexual development in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* 51; 1333-1345

Hebert, P.D., Ratnasingham, S., deWaard, J.R. (2003) Barcoding animal life: cytochrome C oxidase subunit 1 divergences among closely related species. Proceedings of the Royal Society of London B: *Biological Sciences* 270; 96–99

Heinisch, J.J., Lorberg, A., Schmitz, H.P., Jacoby, J.J. (1999) The protein kinase C-mediated MAP kinase pathway involved in the maintenance of cellular integrity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* 32; 671-680

Hegedus, N., Leiter, E., Kovács, B., Tomori, V., Kwon, N. J., Emri, T., Marx, F., Batta, G., Csernoch, L., Haas, H., Yu, J. H., Pócsi, I. (2011) The small molecular mass antifungal protein of *Penicillium chrysogenum* - a mechanism of action oriented review. *J. Basic Microbiol* 51; 561-571

Henry T., Iwen P.C., Hinrichs S.H. (2000) Identification of *Aspergillus* species using internal transcribed spacer regions 1 and 2. *J Clin Microbiol* 38; 1510-1515

Hey, J. (2001) The mind of the species problem. Trends Ecol Evol 16; 326-329

Hodges, R. L., Hodges, D. W., Goggans, K., Xue, X., Skatrud, P., McGilvray, D. (1994) Genetic modifications of an echinocandin B-producing strain of *Aspergillus nidulans* to produce mutants blocked in sterigmatocystin biosynthesis. *J Ind Microbiol* 13; 372–381

Hoffmann, B., Valerius, O., Andermann, M., Braus, G.H. (2001) Transcriptional autoregulation and inhibition of mRNA translation of amino acid regulator gene cpcA of filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Mol Biol Cell* 12; 2846-2857

Hong SB, Go SJ, Shin HD, Frisvad JC, Samson RA (2005). Polyphasic taxonomy of *Aspergillus fumigatus* and related species. *Mycologia* 97; 1316–1329

Horiuchi, H. (2009) Functional diversity of chitin synthases of *Aspergillus nidulans* in hyphal growth, conidiophore development and septum formation. *Med Mycol* 47; 47-52

Howard, S.J., Arendrup, M.C. (2011) Acquired antifungal drug resistance in *Aspergillus fumigatus*: epidemiology and detection. *Med Mycol* 49; 90–95

Huang, A. F., Edwards, F., Bernard, E. M., Armstrong, D., Schmitt, J. H. (1990) In vitro activity of the new semi-synthetic polypeptide Cilofungin (LY121019) against *Aspergillus* and *Candida* species. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 9; 697-699

Huschka, H., Naegeli, H.U., Leuenberger-Ryf, H., Keller-Schierlein, W., Winkelmann, G. (1985) Evidence for a common siderophore transport system but different siderophore receptors in *Neurospora crassa. J. Bacteriol* 162; 715-721

Imhof, A., Balajee, S.A., Marr, K.A. (2003) New methods to assess susceptibilities of *Aspergillus* isolates to caspofungin. *J Clin Microbiol* 41; 5683–5688

Jedd, G., Chua, N.H. (2000) A new self-assembled peroxisomal vesicle required for efficient resealing of the plasma membrane. *Nature Cell Biol* 2; 226-231

Johnstone, I.L., McCabe, P.C., Greaves, P., Gurr, S.J., Cole, G.E., Brow, M.A., Unkles, S.E., Clutterbuck, A.J., Kinghorn, J.R., Innis, M.A. (1990) Isolation and characterisation of the crnA-niiA-niaD gene cluster for nitrate assimilation in *Aspergillus nidulans. Gene* 90; 181-192

Jung, U.S., Levin, D.E. (1999) Genome-wide analysis of gene expression regulated by the yeast cell wall integrity signalling pathway. *Mol Microbiol* 34; 1049-1057

Kachholz, T., Demain, A. L. (1983) Nitrate repression of averufin and aflatoxin biosynthesis. *J Nat. Prod* 46; 499-506

Katiyar, S., Pfaller, M., Edlind, T., (2006) *Candida albicans* and *Candida glabrata* clinical isolates exhibiting reduced echinocandin susceptibility. *Antimicrob. Agents Chemother* 50; 2892–2894

Kawasaki, L., Wysong, D., Diamond, R., Aguirre, J. (1997) Two divergent catalase genes are differentially regulated during Aspergillus nidulans development and oxidative stress. *J Bacteriol* 179; 3284-3292

Keller, N. P., Nesbitt, C., Sarr, B., Phillips, T.D., Burow, G.B. (1997) Ph regulation of sterigmatocystin and aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus* spp. *Phytopathology* 87; 643–648

Keller, N. P., Turner, G., Bennett, J. W. (2005) Fungal secondary metabolism - from biochemistry to genomics. *Nat Rev Microbiol* 3; 937-947

Kelly, R., Register, E., Hsu, M.J., Kurtz, M., Nielsen, J. (1996) Isolation of a gene involved in 1,3-beta-glucan synthesis in *Aspergillus nidulans* and purification of the corresponding protein. *J Bacteriol* 178; 4381-4391

Kempken, F., Rohlfs, M. (2010) Fungal secondary metabolite biosynthesis – a chemical defence strategy against antagonistic animals? *Fungal Ecol* 3; 107-114

Ketko, A.K., Sobel, J.D., Akins, R.A. (2006) Gene overexpression analysis of echinocandin resistance in *Candida albicans* (abstract M-1589). Abstract of the 45th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Washington, DC: American Society for Microbiology, December 16-19, 2005, 439.

Kevei F., Peberdy J.F. (1979) Induced segregation in interspecific hybrids of *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus rugulosus* obtained by protoplast fusion. *Mol Gen Genet* 170; 213-218

Kevei F., Peberdy J.F. (1984) Further studies on protoplast fusion and interspecific hybridization within the *Aspergillus nidulans* group. *J Gen Microbiol* 130; 2229-2236

Kim, R., Khachikian, D., Reboli, A.C. (2007) A comparative evaluation of properties and clinical efficacy of the echinocandins. *Expert Opin Pharmacother* 8; 1479-1492

Klein, L.K., Li, L. (1999) Design and preparation of cyclopeptamine antifungal agents. *Curr Pharm Des* 5; 57-71

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

Klis, F.M. (1994) Review: cell wall assembly in yeast. Yeast 10; 851-869

Klis, F.M., De Groot, P., Hellingwerf, K. (2001) Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans. Med Mycol* 39; 1–8

Klis, F.M., Mol, P., Hellingwerf, K., Brul, S. (2002) Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev* 26; 239–256

Kollar, R., Petrakova, E., Ashwell, G., Robbins, P.W., Cabib, E. (1995) Architecture of the yeast cell wall - the linkage between chitin and beta (1,3)-glucan. *J Biol Chem* 270; 1170–1178

Kontoyiannis, D.P.; Lewis, R.E. (2002) Antifungal drog resistance of pathogenic fungi. *Lancet* 359, 1135-1144

Kurtz, M.B., Heath, I.B., Marrinan, J., Dreikorn, S., Onishi, J., Douglas, C. (1994) Morphological effects of lipopeptides against *Aspergillus fumigatus* correlate with activities against (1,3)-beta-D-glucan synthase. *Antimicrob Agents Chemother* 38; 1480–1489

Kurtz, M.B., Douglas, C.M. (1997) Lipopeptide inhibitors of fungal glucan synthase. *J Med Vet Mycol* 35; 79-86

Kurtz, M.B., Rex, J.H. (2001) Glucan synthase inhibitors as antifungal agents. *Adv protein Chem* 56; 423-475

Kwon-Chung, K.J., Kim, S.J. (1974) A second heterothallic Aspergillus. *Mycologia* 66; 628-638.

Latgé, J.P., Kobayashi, H., Debeaupuis, J.P. (1994) Chemical and immunological characterization of the galactomannan secreted by *Aspergillus fumigatus*. *Infect Immun* 62; 5424–5433

Latgé, J.P. (2007) The cell wall: a carbohydrate armour for the fungal cell. *Mol Microbiol* 66; 279-290

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

Lee, D.G., Shin, S.Y., Maeng, C.Y., Jin, Z.Z., Kim, K.L., Hahm, K.S. (1999) Isolation and characterisation of a novel antifungal peptide from *Aspergillus niger*. *Biochem Biophys Res Comm* 263; 646-651

Lee, S.L., Chen, W.C. (1997) Optimization of medium composition for the production of glucosyltransferase by *Aspergillus niger* with response surface methodology. *Enzyme Microbial Technol* 21; 436-440

Lesage, G., Bussey, H. (2006) Cell wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* 70; 317-343

Levin, D.E. (2005) Cell wall integrity signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* 69; 262-291

Machida, M., Asai, K., Sano, M., Tanaka, T., Kumagai, T., Terai, G., Kusumoto, K., Arima, T., Akita, O., Kashiwagi, Y., Abe, K., Gomi, K., Horiuchi, H., Kitamoto, K., Kobayashi, T., Takeuchi, M., Denning, D.W., Galagan, J.E., Nierman, W.C., Yu, J., Archer, D.B., Bennett, J.W., Bhatnagar, D., Cleveland, T.E., Fedorova, N.D., Gotoh, O., Horikawa, H., Hosoyama, A., Ichinomiya, M., Igarashi, R., Iwashita, K., Juvvadi, P.R., Kato, M., Kato, Y., Kin, T., Kokubun, A., Maeda, H., Maeyama, N., Maruyama, J., Nagasaki, H., Nakajima, T., Oda, K., Okada, K., Paulsen, I., Sakamoto, K., Sawano, T., Takahashi, M., Takase, K., Terabayashi, Y., Wortman, J.R., Yamada, O., Yamagata, Y.,Anazawa, H., Hata, Y., Koide, Y., Komori, T., Koyama, Y., Minetoki, T., Suharnan, S., Tanaka, A., Isono, K., Kuhara, S., Ogasawara, N., Kikuchi, H. (2005) Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae*. *Nature* 438; 1157–1161

Maligie, M.A., Selitrennikoff, C.P. (2005) *Cryptococcus neoformans* resistance to echinocandins: (1,3)beta-glucan synthase activity is sensitive to echinocandins. *Antimicrob Agents Chemother* 49; 2851-2856

Martinez-Lopez, R., Monteoliva, L., Diez-Orejas, R., Nombela, C., Gil, C. (2004) The GPIanchored protein CaEcm33p is required for cell wall integrity, morphogenesis and virulence in *Candida albicans*. *Microbiology* 150; 3341–3354

Martinez-Lopez, R., Park, H., Myers, C.L., Gil, C., Filler, S.G. (2006) *Candida albicans* Ecm33p is important for normal cell wall architecture and interactions with host cells. *Eukaryot Cell* 5; 140–147

Martos, A.I, Romero, A., González, M.T., González, A., Serrano, C., Castro, C., Pemán, J., Cantón, E., Martín-Mazuelos, E. (2010) Evaluation of the Etest method for susceptibility testing of *Aspergillus spp.* and *Fusarium spp.* to three echinocandins. *Med Mycol* 48; 858-861

Masouka, J. (2004) Surface glycans of *Candida albicans* and other pathogenic fungi: physiological roles, clinical uses, and experimental challenges. *Clin Microbol Rev* 17; 281-310

Mayden, R.L. (1997) A hierarchy of species concepts: The denouement in the saga of the species problem. In: M. F. Claridge M.F., Dawah H.A., Wilson M.R. (eds). Species: The Units of Biodiversity. London: Chapman & Hall 381-424

Mazur, P., Morin, N., Baginsky, W., El-Sherbeini, M., Clemas, J.A., Nielsen, J.B., Foor, F. (1995) Differential expression and function of two homologous subunits of yeast  $\beta$ -1,3-D-glucan synthase. *Mol Cell Biol* 15; 5671–5681

Mikamo, H., Sato, Y., Tamaya, T. (2000) In vitro antifungal activity of FK463, a new watersoluble echinocandin-like lipopeptide. *J Antimicrob Chemother* 46; 485-487

Mora-Duarte, J., Betts, r., Rotstein, C., Colombo, A.L., Thompson-Moya, L., Smietana, J., Lupinacci, R., Sable, C., Kartsonis, N., Perfect, J. (2002) Comparison of caspofungin and amphotericin B for invasive candidiasis. *N Engl J Med* 347; 2020–2029

Moreno, A.B., del Pozo, A.M., Borja, M., San Segudo, B. (2003) Activity of the antifungal protein from *Aspergillus giganteus* against *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* 93; 1344–1353 Munro, C.A., Gow, N.A.R. (2001) Chitin synthesis in human pathogenic fungi. *Med Mycol* 39; 41–53

Munro, C.A., Selvaggini, S., de Bruijn, I., Walker, L., Lenardon, M.D., Gerssen, B., Milne, S., Brown, A.J., Gow, N.A. (2007) The PKC, HOG and Ca2+ signalling pathways coordinately regulate chitin synthesis in *Candida albicans*. *Mol Microbiol* 63; 1399–1413

Murdoch, D., Plosker, G.L. (2004) Anidulafungin. Drugs 64; 2249-2258

Murray, R.G.E., Brenner, D.J., Colwell, R.R., De Vos, P., Goodfellow, M., Grimont, P.A.D., Pfennig, N., Stackebrandt, E., Zavarzin, G.A. (1990) Report of the ad hoc committee on approaches to taxonomy within the *Proteobacteria*. *Int J Syst Bacteriol* 40; 213-215

Nakajima, T., Yoshida, M., Hiura, N., Matsuda, K. (1984) Structure of the cell wall proteogalactomannan from *Neurospora crassa*. I. Purification of the proteoheteroglycan and characterization of alkali-labile oligosaccharides. *J Biochem* 96; 1005–1011

Nakajima T, Yoshida M, Nakamura M, Hiura N, Matsuda K. (1984) Structure of the cell wall proteogalactomannan from *Neurospora crassa*. II. Structural analysis of the polysaccharide part. *J Biochem* 96; 1013–1020

Navarro, R.E., Stringer, M.A., Hansberg, W., Timberlake, W.E., Aguirre, J. (1996) catA, a new *Aspergillus nidulans* gene encoding a developmentally regulated catalase. *Curr Genet* 29; 352-359

Niimi, K., Monk, B.C., Hirai, A., Hatakenaka, K., Umeyama, T., Lamping, E., Maki, K., Tanabe, K., Kamimura, T., Ikeda, F., Uehara, Y., Kano, R., Hasegawa, A., Cannon, R.D., Niimi, M. (2010) Clinically significant micafungin resistance in *Candida albicans* involves modification of a glucan synthase catalytic subunit GSC1 (FKS1) allele followed by loss of heterozygosity. *J Antimicrob Chemother* 65; 842-852

Odds, F.C., Brown, A.J., Gow, N.A. (2003) Antifungal agents: mechanisms of action. *Trends Microbiol* 11; 272-279

Odds, F.C., Motyl, M., Andrade, R., Bille, J., Canton, E., Cuenca-Estrella, M., Davidson, A., Durussel, C., Ellis, D., Foraker, E., Fothergill, A.W., Ghannoum, M.A., Giacobbe, R.A., Gobernado, M., Handke, R., Laverdiere, M., Lee-Yang, W., Merz, W.G., Ostrosky-Zeichner, L., Peman, J., Perea, S., Perfect, J.R., Pfaller, M.A., Proia, L., Rex, J.H., Rinaldi, M.G., Rodriguez-Tudela, J.L., Schell, W.A., Shields, C., Sutton, D.A., Verweij, P.E., Warnock, D.W. (2004) Interlaboratory comparison of results of susceptibility testing with caspofungin against *Candida* and *Aspergillus* species. *J Clin Microbiol* 42; 3475–3482

Onishi, J., Meinz, M., Thompson, J., Curotto, J., Dreikorn, S., Rosenbach, M., Douglas, C., Abruzzo, G., Flattery, A., Kong, L., Cabello, A., Vicente, F., Pelaez, F., Diez, M.T., Martin, I., Bills, G., Giacobbe, R., Dombrowski, A., Schwartz, R., Morris, S., Harris, G., Tsipouras, A., Wilson, K., Kurtz, M.B. (2000) Discovery of novel antifungal (1,3)-beta-D-glucan synthase inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* 44; 368-377

Osherov N., Kontoyiannis D.P., Romans A., May G.S. (2001) Resistance to itraconazole in *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus fumigatus* is conferred by extra copies of the *A. nidulans* P-450 14alpha-demethylase gene, *pdmA. J Antimicrob Chemother* 48, 75-81

Ouedraogo, J.P., Hagen, S., Spielvogel, A., Engelhardt, S., Meyer, V. (2011) Survival strategies of yeast and filamentous fungi against the antifungal protein AFP. *J Biol Chem* 286; 13859-13868

Paderu, P., Park, S., Perlin, D.S. (2004) Caspofungin uptake is mediated by a high-affinity transporter in *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* 48; 3845-3849

Pappas, P.G., Rex, J.H., Sobel, J.D., Filler, S.G., Dismukes, W.E., Walsh, T.J., Edwards, J.E. (2004) Guidelines for treatment of candidiasis. *Clin Infect Dis* 38; 161-189

Park, S., Kelly, R., Kahn, J.N., Robles, J., Hsu, M.J., Register, E., Li, W., Vyas, V., Fan, H., Abruzzo, G., Flattery, A., Gill, C., Chrebet, G., Parent, S.A., Kurtz, M., Teppler, H., Douglas, C,M., Perlin, D.S. (2005) Specific substitutions in the echinocandin target Fks1p account for reduced susceptibility of rare laboratory and clinical *Candida* spp.isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 49; 3264-3273

Pemberton, T.J. (2006) Identification and comparative analysis of sixteen fungal peptidylprolyl cis/trans isomerase repertoires. *BMC Genomics* 7; 244

Perlin, D.S. (2007) Resistance to echinocandin-class antifungal drugs. *Drug Resist Updat* 10; 121-130

Petersen, L.A., Hughes, D.L., Hughes, R., DiMichele, L., Salmon, P., Connors, N. (2001) Effects of amino acid and trace element supplementation on pneumocandin production by *Glarea lozoyensis*: impact on titer, analogue levels, and the identification of new analogues of pneumocandin  $B_0$ . *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* Volume 26; 216-221

Petersen, L.A.,Olewinski, R., Salmon, P., Connors, N. (2003) Novel proline hydroxylase activities in the pneumocandin-producing fungus *Glarea lozoyensis* responsible for the formation of *trans* 3- and *trans* 4-hydroxyproline. *Applied Microbiology and Biotechnology* 62; 263-267

Peterson, S.W. (2008) Phylogenetic analysis of *Aspergillus* species using DNA sequences from four loci. *Mycologia* 100; 205–226

Petraitiene, R., Petraitis, V., Groll, A.H., Sein, T., Schaufele, R.L., Francesconi, A., Bacher. J., Avila, N.A., Walsh, T.J. (2002) Antifungal efficacy of caspofungin (MK-0991) in experimental pulmonary aspergillosis in persistently neutropenic rabbits: pharmacokinetics, drug disposition, and relationship to galactomannan antigenemia. *Antimicrob Agents Chemother* 46; 12-23

Pfaller, M., Riley, J., Koerner, T. (1989) Effect of cilofungin (LY121019) on carbohydrate and sterol composition of *Candida albicans. Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 8; 1067–1070

Pfeiffer C.D., Garcia-Effron G., Zaas A.K., Perfect, J.R., Perlin, D.S., Alexander, B.D. (2010) Breakthrough invasive candidiasis in patients on micafungin. *J Clin Microbiol* 48; 2373-2380

Pinto, M.C., Mata, A.M., Lopez-Barea, J. (1985) The redox interconversion mechanism of *Saccharomyces cerevisiae* glutathione reductase. *Eur J Biochem* 151; 275-281

Plaine, A., Walker, L., Da Costa, G., Mora-Montes, H.M., McKinnon, A., Gow, N.A., Gaillardin, C., Munro, C.A., Richard, M.L. (2008) Functional analysis of *Candida albicans* GPI-anchored proteins: roles in cell wall integrity and caspofungin sensitivity. *Fungal Genet Biol* 45; 1404–1414

Pócsi, I., Jeney, V., Kertai, P., Pócsi, I., Emri, T., Gyémánt, Gy., Fésüs, L., Balla, J., Balla, Gy. (2008) Fungal siderophores function as protective agents of LDL oxidation and are promising anti-atherosclerotic metabolites in functional food. *Molecular Nutritions and Food Research* 52; 1434-1447

Pontecorvo (1953) The genetics of Aspergillus nidulans. Advances in Genet 6; 141-238

Pusztahelyi T., Pócsi I., Kozma J., Szentirmai A. (1997) Ageing of *Penicillium chrysogenum* cultures under carbon starvation. I. Morphological changes and secondary metabolite production. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 25; 81-86

Qadota, H., Python, C.P., Inoue, S.B., Arisawa, M., Anraku, Y., Zheng, Y., Watanabe, T., Levin, D.E., Ohya, Y. (1996) Identification of yeast Rho1p GTPase as a regulatory subunit of 1,3-beta-glucan synthase. *Science* 272; 279-281

Raper, K.B., Fennell, D.I. (1965) The Genus Aspergillus. Baltimore, MD: Williams & Wilkins.

Reinoso-Martin, C., Schüller, C., Schuetzer-Muehlbauer, M., Kuchler, K. (2003) The yeast protein kinase C cell integrity pathway mediates tolerance to the antifungal drug caspofungin through activation of Slt2p mitogen-activated protein kinase signaling. *Eukaryot Cell* 2; 1200-1210

Roggenkamp, R.; Sahm, H.; Wagner, F. (1974) Microbial assimilation of methanol induction and function of catalase in *Candida boidinii. FEBS Lett.* 41; 283-286

Romano, J., Nimrod, G., Ben-Tal, N., Shadkchan, Y., Baruch, K., Sharon, H., Osherov, N. (2006) Disruption of the *Aspergillus fumigatus* ECM33 homologue results in rapid conidial germination, antifungal resistance and hypervirulence. *Microbiology* 152; 1919-1928

Roncero, C. (2002) The genetic complexity of chitin synthesis in fungi. *Curr Genet* 41; 367–378

Rossello-Mora, R. (2003) Opinion: the species problem, can we achieve a universal concept? *Syst Appl Microbiol* 26; 323-326

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

Rüping, M.J.G.D., Vehreschild, J.J., Cornely, O.A. (2008) Patients at high risk of invasive fungal infections-when at how to treat. *Drugs* 68; 1941-1962

Saloheimo, M., Valkonen, M., Penttilä, M. (2003) Activation mechanisms of the HAC1mediated unfolded protein response in filamentous fungi. *Mol Microbiol* 47; 1149-1161

Samson, R.A., Varga, J. (2009) What is a species in Aspergillus? Med Mycol 47; 13-20

Samson, R.A., Noonim, P., Meijer, M., Houbraken, J., Frisvad, J.C., Varga, J. (2007) Diagnostic tools to identify black *Aspergilli. Stud Mycol* 59, 129-146

Sámi, L., Emri, T., Pócsi, I. (2001) Autolysis and aging of *Penicillium chrysogenum* cultures under carbon starvation: III: glutathione metabolism and formation of reactive oxygen species. *Mycological Research* 105; 1246-1250

Schinko, T., Berger, H., Lee, W., Gallmetzer, A., Pirker, K., Pachlinger, R., Buchner, I., Reichenauer, T., Güldener, U., Strauss, J. (2010) Transcriptome analysis of nitrate assimilation in Aspergillus nidulans reveals connections to nitric oxide metabolism. *Mol Microbiol* 78; 720-738

Schmidt, A., Schmelzle, T., Hall, M. (2002) The RHO1-GAPs SAC7, BEM2, and BAG7 control distinct RHO1 functions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* 45; 1433–1441

Schuetzer-Muehlbauer, M., Willinger, B., Krapf, G., Enzinger, S., Presterl, E., Kuchler, K. (2003) The *Candida albicans* Cdr2p ATP-binding cassette (ABC) transporter confers resistance to caspofungin. *Mol Microbiol* 48; 225-235

Schwarz, P., Bretagne, S., Gantier, J.C., Garcia-Hermoso, D., Lortholary, O., Dromer, F., Dannaoui, E. (2006) Molecular identification of Zygomycetes from culture and experimentally infected tissues. *Journal of Clinical Microbiology* 44; 340–349

Schwartz, R.E., Liesch, J.M., White, R.F., Hensens, O.D., Joshua, H., Schmatz, D.M. (1993) Antibiotic cyclopeptide fermentation product. *US Patent* 5,202,309 Sharma, P., Kumar, P. V., Ramesh, R., Saravanan, K., Deep, S., Sharma, M., Mahesh, S., Dinesh, S. (2011) Biocontrol genes from *Trichoderma* species: A review. *Afr J Biotechnol* 10; 19898-19907

Shaw, J.A., Mol, P.C., Bowers, B., Silverman, S.J., Valdivieso, M.H., Durán, A., Cabib, E. (1991) The function of chitin synthases 2 and 3 in the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. *J Cell Biol* 114; 111–123

Shedletzky, E., Unger, C., Delmer, D.P. (1997) A Microtiter-based fluorescence assay for (1,3)- $\beta$ -glucan synthases. *Anal Biochem* 249; 88–93

Shimizu, K., Keller, N.P. (2001) Genetic involvement of a cAMP-dependent protein kinase in a G-protein signaling pathway regulating morphological and chemical transitions in *Aspergillus nidulans. Genetics* 157; 591-600

Silverman, S.J., Sburlati, A., Slater, M.L., Cabib, E. (1988) Chitin synthase 2 is essential for septum formation and cell division in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA* 85; 4735–4739

Soustre, J., Rodier, M.H., Imbert-Bouyer, S., Daniault, G., Imbert, C. (2004) Caspofungin modulates in vitro adherence of *Candida albicans* to plastic coated with extracellular matrix proteins. *J Antimicrob Chemother* 53; 522-525

Stevens, D.A., Espiritu, M., Parmar, R. (2004) Paradoxical effect of caspofungin: reduced activity against *Candida* albicans at high drug concentrations. *Antimicrob Agents Chemother* 48; 3407-3411

Stevens, D.A., White, T.C., Perlin, D.S., Selitrennikoff, C.P. (2005) Studies of the paradoxical effect of caspofungin at high drug concentrations. *Diagn Microbiol Infect Dis* 51; 173-178

Stevens, D.A., Ichinomiya, M., Koshi, Y., Horiuchi, H. (2006) Escape of *Candida* from caspofungin inhibition at concentrations above the MIC (paradoxical effect) accomplished by increased cell wall chitin; evidence for  $\beta$ -1,6-glucan synthesis inhibition by caspofungin. *Antimicrob Agents Chemother* 50; 3160-3161

Stone, E.A., Fung, H.B., Kirschenbaum, H.L. (2002) Caspofungin: an echinocandin antifungal agent. *Clin Ther* 24; 351-377

Strittmatter, A.W., Irniger, S., Braus, G.H. (2001) Induction of jlbA mRNA synthesis for a putative bZIP protein of Aspergillus nidulans by amino acid starvation. *Curr Genet* 39; 327-334

Sucher, A.J., Chahine, E.B., Balcer, H.E. (2009) Echinocandins: the newest class of antifungals. *Ann Pharmacother* 43; 1647-1657

Summerell, B.A., Salleh, B., Leslie, J.F. (2003) A utilitarian approach to *Fusarium* identification. *Plant Dis* 87; 117-128

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* DOI 10.1007/s12275-012-2001-0

Szilágyi, M. (2012) Az *Aspergillus nidulans* autolitikus enzimtermelésének vizsgálata. Egyetemi doktori (PhD) értekezés (Témavezető: Emri, T.) Debreceni Egyetem, Természettudományi Doktori Tanács, Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola, Debrecen.

Takeshita, N., Ohta, A., Horiuchi, H. (2005) CsmA, a class V chitin synthase with a myosin motor-like domain, is localized through direct interaction with the actin cytoskeleton in *Aspergillus nidulans. Mol Biol Cell* 16; 1961-1970

Takeshita, N., Yamashita, S., Ohta, A., Horiuchi, H., (2006) *Aspergillus nidulans* class V and VI chitin synthases CsmA and CsmB, each with a myosin motor-like domain, perform compensatory functions that are essential for hyphal tip growth. *Mol Microbiol* 59; 1380–1394

Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S. (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 24; 1596-1599

Taylor, J.W., Jacobson, D.J., Kroken, S., Kasuga, T., Geiser, D.M., Hibbett, D.S., Fisher, M.C. (2000) Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. *Fungal Genet Biol* 31; 21-32

Thön, M., Al-Abdallah, Q., Hortschansky, P., Brakhage, A.A. (2007) The thioredoxin system of the filamentous fungus Aspergillus nidulans: impact on development and oxidative stress response. *J Biol Chem* 282; 27259-27269

Tibayrenc, M. (2006) The species concept in parasites and other pathogens: a pragmatic approach? *Trends Parasitol* 22; 66-70

Tóth, V., Antal, K., Gyémánt, Gy., Miskei, M., Pócsi, I., Emri, T. (2009) Optimization of coprogen production in *Neurospora crassa. Acta Biologica Hungarica* 60; 321-328

Uilenberg, G., Goff, W. L. (2006) Polyphasic taxonomy. Ann N Y Acad Sci 1081; 492-497

Valdivieso, M.H., Mol, P.C., Shaw, J.A., Cabib, E., Duran, A. (1991) CAL1, a gene required for activity of chitin synthase 3 in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 114; 101–109

Vandemma, P., Pot, B., Gillis, M., De Vos, P., Kersters, K., Swings, J. (1996) Polyphasic taxonomy, a concensus approach to bacterial systematics. *Microbiol Rev* 60; 407-438

Vazquez, J.A., Sobel, J.A. (2006) Anidulafungin: a novel echinocandin. *Clin Infect Dis* 43; 215-222

Walker, L.A., Munro, C.A., de Bruijn, I., Lenardon, M.D., McKinnon, A., Gow, N.A. (2008) Stimulation of chitin synthesis rescues *Candida albicans* from echinocandins. PLoS Pathog 4, e1000040.

Walker, L.A., Gow, N.A.R., Munro, C.A. (2010) Fungal echinocandin resistance. *Fungal Genet Biol* 47; 117–126

Wang, L., Yokoyama, K., Miyaji, M., Nishimura, K. (2000) Mitochondrial cytochrome b gene analysis of *Aspergillus fumigatus* and related species. *J Clin Microbiol* 38; 1352-1358

Wiseman, D.W., Buchanan, R.L. (1987) Determination of glucose level needed to induce aflatoxin production in *Aspergillus parasiticus*. *Can J Microbiol* 33; 828-830

White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J. (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. pp.315-322, In: PCR protocols. A guide to methods and applications. Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J. (Eds.) Academic Press. Inc., New York.

Wiederhold, N.P., Kontoyiannis, D.P., Prince, R.A., Lewis, R.E. (2005) Attenuation of the activity of caspofungin at high concentrations against *Candida albicans*: possible role of cell wall integrity and calcineurin pathways. *Antimicrob Agents Chemother* 49; 5146-5148

Wiederhold. N.P., Lewis, I.I. J.S. (2007) The echinocandin micafungin: review of the pharmacology, spectrum of activity, clinical efficacy and safety. *Expert Opin Pharmacother* 8; 1155-1166

Wiederhold, N.P. (2009) Paradoxical echinocandin activity: a limited in vitro phenomenon? *Med Mycol* 47; 369-375

Wilson, E.O. (1992) The Diversity of Life. Cambridge: Harvard University Press

Wösten, H.A. (2001) Hydrophobins: multipurpose proteins. Annu Rev Microbiol 55; 625-646

Yamazaki, H., Tanaka, A., Kaneko, J., Ohta, A., Horiuchi, H. (2008) *Aspergillus nidulans* ChiA is a glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored chitinase specifically localized at polarized growth sites. *Fungal Genet Biol.* 45; 963-972

Yu, J.H., Butchko, R.A., Fernandes, M., Keller, N.P., Leonard, T.J., Adams, T.H. (1996b) Conservation of structure and function of the aflatoxin regulatory gene aflR from *Aspergillus nidulans* and *A. flavus. Curr Gene* 9; 549-555

Zaas, A.K., Alexander, B.D. (2005) Echinocandins: role in antifungal therapy. *Expert Opin Pharmacother* 6; 1657-1668

Zhao, K., Ping, W., Li, Q., Hao, S., Zhao, L., Gao, T., Zhou, D. (2009) *Aspergillus niger var. taxi*, a new species variant of taxol-producing fungus isolated from Taxus cuspidata in China. J Appl Microbiol 107; 1202-1207

## 9. Köszönetnyilvánítás

Szeretném köszönetemet kifejezni témavezetőmnek Dr. Emri Tamás egyetemi docensnek, lelkes témavezetéséért, odaadó segítségéért. Köszönettel tartozom Prof. Dr. Pócsi István tanszékvezető egyetemi tanárnak, aki lehetővé tette és értékes tanácsaival mindvégig támogatta munkámat a Mikrobiális Biotechnológiai és Sejtbiológiai tanszéken.

Köszönettel tartozom továbbá Dr. Miskei Mártonnak, a filogenetikai vizsgálatok elkészítéséért és Karányi Zsoltnak (Debreceni Egyetem) a microarray vizsgálat során a DNS chip tervezésében és az eredmények normalizálásában nyújtott segítségükért, illetve szeretném megköszönni Dr. Leiter Évának, hogy rendelkezésünkre bocsátotta a PAF antifungális fehérjét, valamint Dr. Szilágyi-Bónizs Melindának, aki az EngA és ChiB tisztíott hidrolázokat biztosította számunkra. Szeretném megköszönni a Mikrobiális Biotechnológiai és Sejtbiológiai Tanszék valamennyi dolgozójának segítségüket, végtelen türelmüket, illetve, hogy munkámat kellemes légkörben végezhettem.

Végül, de nem utolsó sorban szeretnék köszönetet mondani családomnak és barátaimnak doktori munkám alatt nyújtott támogatásukért, bíztatásukért.

## 10. Tudományos közlemények jegyzéke

#### Az értekezés alapjául szolgáló tudományos közlemények

1. Tóth, V., Nagy, Cs.T., Miskei, M., Pócsi, I., Emri, T. (2011) Polyphasic characterization of "*Aspergillus nidulans* var. *roseus*" ATCC 58397. *Folia Microbiol* 56; 381-388. IF: 0,977

2. Tóth, V., Nagy, Cs.T., Pócsi, I., Emri, T. (2012) The echinocandin B producer fungus *Aspergillus nidulans* var. *roseus* ATCC 58397 does not possess innate resistance against its lipopeptide antimycotic. *Appl Microbiol Biotechnol* 95; 113-122. IF: 3,28

#### Az értekezés alapjául szolgáló folyamatban lévő közlemények

**Tóth, V.**, Szilágyi, M., Anton, F., Leiter, É., Pócsi, I., Emri, T. (2012) Interactions between naturally occurring antifungal agents. *Acta Biol Hung* (közlésre benyújtva)

Emri, T., Majoros, L., **Tóth, V.,** Pócsi, I. (2013) Echinocandins: production and application. *Appl Microbiol Biotechnol* (közlésre előkészítve az újság szerkesztőjének felkérésére)

#### Egyéb közlemények

1. **Tóth, V.**, Antal, K., Gyémánt, Gy., Miskei, M., Pócsi, I., Emri, T. (2009) Optimization of coprogen production in *Neurospora crassa. Acta Biol Hung* 60; 321-328. IF: 0,793

Balázs, A., Pócsi, I., Hamari, Zs., Leiter, É., Emri, T., Miskei, M., Oláh, J., Tóth,
V., Hegedűs, N., Prade, R.A., Molnár, M., Pócsi, I. (2010) AtfA bZIP-type

transcription factor regulates oxidative and osmotic stress responses in *Aspergillus nidulans*. *Mol Genet Genomics* 283(3); 289-303. IF: 2,453

3. Emri, T., **Tóth, V.**, Nagy, Cs.T., Nagy, G., Pócsi, I., Gyémánt, Gy., Antal, K., Balla, J., Balla, Gy., Román, Gy., Kovács, I., Pócsi, I. (2012) Towards highsiderophore - content foods - optimization of coprogen production in submerged cultures of *Penicillium nalgiovense*. (Közlésre benyújtva)

## Az értekezés témakörében elhangzott előadások és poszterek

1. **Tóth, V.,** Nagy, Cs. T., Bordán, Zs., Pócsi, I. and Emri, T. (2010) Echinocandin sensitivity of *Aspergillus nidulans* var. *roseus*. Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica 58, 109-110 (Annual Meeting of the Hungarian Society for Microbiology, Keszthely)

2. **Tóth, V.,** Nagy, Cs. T., Bordán, Zs., Pócsi, I. and Emri, T. (2011) Induction of chitin synthesis during echinocandin B production in *Aspergillus nidulans* var. *roseus* ATCC 58397. Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica 58, 232-233 (16<sup>TH</sup> International Congress of the Hungarian Society for Microbiology, Budapest)

3. **Tóth, V.,** Nagy, Cs. T., Miskei, M. Pócsi, I. and Emri, T. (2011) Characterization of *"Aspergillus nidulans* var. *roseus*" ATCC 58397. Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica 58, 233 (16<sup>TH</sup> International Congress of the Hungarian Society for Microbiology, Budapest)

4. **Tóth, V.**, Nagy, Cs. T., Miskei, M., Pócsi, I., Emri, T. (2012) Characterization of *Aspergillus nidulans* var. *roseus* ATCC 58397. (V. Magyar Mikológiai Konferencia, Budapest)

### Egyéb előadások, poszterek

1. **Tóth, V**., Emri, T., Gyémánt, Gy. and Pócsi, I. (2008) Optimization of coprogen production in *Neurospora crassa*. Acta Microbiologica and Immunologica Hungarica 55, 255-256 (IV. Mikológiai Konferencia, Debrecen)

2. Emri, T., **Tóth, V.**, Spiczmüller, Zs., Vasas, G., Szilágyi, M. and 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)

3. **Tóth, V.,** Spitzmüller, Zs., Vasas, G., Szilágyi, M., Pócsi, I. and Emri, T. (2011) Production of glutaminase A by *Aspergillus nidulans*. Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica 58, 233-234 (16<sup>TH</sup> International Congress of the Hungarian Society for Microbiology, Budapest)

4. Kovács, B., Hegedűs, N., Tomori, V., Orosz, E., Bálint, M., **Tóth, V.,** Marx, F., Emri, T., Leiter, É., and Pócsi, I. (2011) The antifungal protein, PAF may involve int he programmed cell death of the producer *Penicillium chrysogenum* filamentous fungus. Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica 58, 170 (16<sup>TH</sup> International Congress of the Hungarian Society for Microbiology, Budapest)