

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei
Thesis of PhD dissertation

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

**Characterization of *Aspergillus nidulans var. roseus* ATCC 58397,
investigation its echinocandin B and sterigmatocystin production**

Tóth Viktória

Témavezető/Supervisor: Dr. Emri Tamás



DEBRECENI EGYETEM
Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola
Debrecen
2012

1. Bevezetés

Az elmúlt évtizedekben a különböző típusú, főleg invazív mikózisok száma, jelentősen megemelkedett az AIDS fertőzöttek, hematológiai rosszindulatú daganatos betegségekben szenvedők, kemoterápiás kezelés alatt álló, illetve transzplantáción átesettek és más immunszuppresszált betegek között. A fertőzések háttérében gyakran az alkalmazott antifungális szerekkel szemben kialakuló rezisztencia áll, de az intravénás eszközök elterjedése, immunszuppresszív terápia alkalmazása, a széles spektrumú antibiotikumokkal történő kezelések gyakoriságának növekedése szintén hozzájárult a gombás infekciók számának növekedéséhez. Ezen immunhiányos betegek a legtöbb esetben *Candida*, *Aspergillus*, *Cryptococcus* és más oportunist gombákkal fertőzöttek (Georgopapadakou 1998; Carrillo-Munoz és munkatársai 2006; Rüping és munkatársai 2008). Jelenleg a gombafertőzések közel 90 %-áért *Candida* törzsek a felelősek (Kontoyiannis és Lewis 2002; Masouka 2004). 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 aspergillozisok 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 szerekekkel szembeni rezisztencia ma még viszonylag ritka, hiszen egy új termékcsaládról van szó, a rezisztens törzsek száma a közeljövőben várhatóan növekedni fog, így célul tűztük ki, az *A. nidulans* var. *roseus* ECB-vel szembeni rezisztenciájának megismerését. 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 célul tűztük ki az alábbi vizsgálatok elvégzését:

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, β -tubulin és γ -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.

4. A sejtfal összetételének, a sejtfal szintézisében résztvevő gének transzkripciójának, a β -1,3-glükán szintáz specifikus aktivitásának, valamint a Na-dodecil-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 tenyészetek transzkriptomának összehasonlítása.

7. A gombák sejtfal homeosztázisát befolyásoló néhány antifungális anyag – a sejtfallszintézist 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 β -1,3-glükánáz (Szilágyi és munkatársai 2012) – közötti kölcsönhatás vizsgálata.

2. Módszerek

A kísérleteinkben az alábbi törzseket használtuk fel.

Név	Genotípus
<i>Aspergillus nidulans</i> törzsek	
FGSC A4	Glasgow wild-type (vad típus)
FGSC A33	<i>biA1, pyroA4, veA1</i>
FGSC A851	<i>yA2, _argB::trpC, veA1, trpC801</i>
FGSC A146	<i>pabaA1, acrA1, phenA2, pyroA4, lysB5, sB3, nicB8, riboB2, chaA1</i>
FGSC A773	<i>pyrG89, wA3, pyroA4</i>
<i>creA</i> -null mutáns	<i>pabaA1, yA1, ΔcreA::argB, argB2, riboB2, veA1</i>
HZS 120	<i>pabaA1, riboB2, veA1</i>
Egyéb <i>Aspergillus</i> törzsek	
<i>A. fumigatus</i> FGSC 1100 (AF 293)	Vad típus
<i>A. nidulans</i> var. <i>roseus</i>	Vad típus
ATCC 58397 (NRRL 11440)	Vad típus
<i>A. rugulosus</i> (<i>Emericella rugulosa</i>)	Vad típus
CBS 133.60	Vad típus
<i>A. rugulosus</i> (<i>Emericella rugulosa</i>)	Vad típus
CBS 171.71	Vad típus
Egyéb törzsek	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> S288C (YSC1060)	Vad típus
<i>Candida albicans</i> ATCC 14053	Vad típus
<i>Bacillus subtilis</i> BS-1	Vad típus

Az *A. nidulans* törzseket és az *A. fumigatus* törzset, glükózt tartalmazó minimál tápagon (MN) (pH 6,5; Baratt és munkatársai 1965), az *A. nidulans* var. *roseus* és az *A. rugulosus* törzseket komplex (PM) tápagon, míg a *B. subtilis* törzset Bouillon, a *C. albicans* és a *S. cerevisiae* törzseket Sabouraud tápagon tartottuk fenn.

Az *Aspergillus* törzsek növekedését különböző szén- és nitrogénforrást tartalmazó (10 g/L glükózt, fruktózt, szorbitolt, xilózt, maltózt, laktózt, szacharózt, keményítőt, glicerolt, nitrogénforrásként 75 mmol/L NaNO₃-ot, (NH₄)₂SO₄-ot, Na-Glu-ot, vagy 1 w/v % kazeinpeptont, szójapeptont, vagy élesztőkivonatot tartalmazott) Barratt-féle minimál-nitrát tápagar (MN) felületén vizsgáltuk.

A szekunder metabolit termelés vizsgálatához a Boeck és Kastner (1981) által leírt tápleves általunk módosított változatát használtuk (GNL), melynek 100 ml-ét 100 millió friss spórával oltottuk be és 24, illetve 37 °C-on, 300 rpm fordulatszámon rázattuk 6 napig. A tápleves 10 g/L glükózt, 10 g/L szójapeptont, 4,5 g/L Na₂HPO₄ 12H₂O, 1 g/L ZnSO₄ 7H₂O, 5,5 g/L MgSO₄ 7H₂O, 0,1 g/L FeSO₄ 7H₂O és 7,5 v/v % napraforgóolajat (pH 5,5) tartalmazott.

A transzkriptom (qRT-PCR, illetve microarray), valamint a sejtfalösszetétel és a specifikus β-1,3-glükán szintáz aktivitás vizsgálatához 100 ml komplex glükózos táplevest (KGL) 100 millió friss spórával oltottunk be és 24 °C-on, illetve 37 °C-on 300 rpm fordulatszámon rázattuk 24, 45, illetve 53 óráig. A KGL tápleves az MN tápleves 40 g/L glükózt, 10 g/L élesztőkivonatot és 2,9 g/L (NH₄)₂SO₄-ot tartalmazó változata volt.

A ST termelés csökkentését a GNL tápleves összetételének optimalizálásával végeztük el. A tápleves ECB termelés szempontjából optimális Tyr, glükóz és napraforgóolaj tartalmát RSM (response surface methodology) eljárással határoztuk meg (Lee és Chen 1997) Box-Bechnken kísérleti elrendezést felhasználva. A mérési 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.

Az *Aspergillus* törzsek keresztezését az *A. nidulans* var. *roseus* ATCC 58397, az *A. rugulosus* CBS 171.71 és CBS 133.60 törzsekből MN tápagar felületén, UV mutagenézist követően létrehozott 5-fluoroorotsav rezisztens, uracil/uridin auxotróf mutánsokat használtuk fel, melyeket a Pontecorvo és munkatársai (1953) által leírt klasszikus eljárás követve kereszteztünk különböző *A. nidulans* auxotróf törzsekkel.

A törzsek antifungális szerekkel szembeni érzékenységét agardiffúziós (Galgóczy és munkatársai 2005) és mikrodilúciós módszerrel (Arikan 2001) vizsgáltuk. Az agardiffúziós módszer esetében a törzsek érzékenységét, illetve a paradox-effektus jelenségét az MN tápagar felületébe fűrt lyukakba cseppentett ECB körül kialakult gátlási zóna átmérőjével és alakjával jellemeztük. A mikrodilúciós módszer esetében 96-lyukú steril mikrotiter lemezeket használtunk fel. A lyukak 0,5 w/v % élesztőkivonattal kiegészített Barratt-féle nitrátos táplevest (YMN), illetve CAS-t, vagy ECB-t tartalmazott. Az ECB, illetve CAS érzékenységet a mikropelletes növekedést kiváltó legkisebb koncentrációval (MEC) jellemeztük.

Az SDS hatását, illetve a természetes eredetű antifungális anyagok (ECB, PAF, ChiB, EngA) közötti interakciót szintén, a korábban ismertett agardiffúziós és mikrodilúciós módszerrel határoztuk meg. Az agardiffúziós módszernél az ECB és az SDS közötti interakcióra a kinőtt micéliumtömeg vastagsága utalt. A mikrodilúciós módszer esetében a tenyészetek növekedését az optikai denzitás (OD 620) változásával, míg az ECB és az SDS, továbbá a természetes eredetű anyagok közötti interakciót az Abbott-formula segítségével (Moreno és munkatársai 2003) jellemeztük.

A napraforgóolaj és a paraffinolaj az ECB antifungális hatását befolyásoló tulajdonságát a tenyészetek növekedésével (MN tápleves napraforgóolajjal vagy paraffinolajjal, illetve ECB-vel kiegészítve) jellemeztük.

A sülyesztett kultúrák növekedését a szárazanyag tartalom (DCM) (Pusztahelyi és munkatársai 1997) változásával, illetve az MTT teszttel (Lee és munkatársai 1999) követtük nyomon.

A tápközeg glükóz tartalmának meghatározása a Leary és munkatársai (1992) által leírt „rate assay” eljárás segítségével történt.

A ST mennyiségének meghatározását és a szekunder metabolit spektrum vizsgálatát vékonyréteg kromatográfiával határoztuk meg (Klich és munkatársai 2001).

Az X-press segítségével feltárt micéliumok specifikus β -1,3-glükán szintáz aktivitást fluoreszcens eljárás segítségével mértük meg (Shedletzky és munkatársai 1997). Az enzim ECB-vel való gátolhatóságának meghatározása érdekében a méréseket ECB (0-100 $\mu\text{g/ml}$) jelenlétében is elvégeztük. Az enzim ECB-vel szemben mutatott érzékenységet az 50 %-os gátlást okozó ECB koncentrációval ($\text{IC}_{50,\text{ECB}}$) jellemeztük.

A specifikus nitrát reduktáz (Bruinenberg és munkatársai 1983), kataláz (Roggenkamp és munkatársai 1974) és glutation reduktáz (Pinto és munkatársai 1985) aktivitások meghatározása „rate assay” eljárás segítségével történt az X-press-el feltárt és centrifugált mintákból.

A sejtek peroxid tartalmának mérése 2',7'-diklorofluoreszcin diacetát segítségével fluorimetriás módszerrel történt (Royall és Ischiropoulos 1993), míg a sejtek oxidált (GSSG) és redukált (GSH) glutation tartalmát egy „rate assay” eljárás (Anderson 1985) felhasználásával detektáltuk. A mérés

mindkét esetben az 5-szulfoszalicilsvval feltárt és centrifugált mintákból történt.

A sejtfal összetételét Stevens és munkatársai (2006) által leírt protokollt követve határoztuk meg.

A DNS izolálása liofilizált micéliumból történt a Genomic DNA Purification Kit K0512 (Fermentas) felhasználásával. A parciális DNS szekvenciákat PCR segítségével szaporítottuk fel. A minták szekvenálása ABI Big Dye Terminator 3.1 Kit segítségével egy automata DNS kapilláris szekvenátorral történt. A megszekvenált 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 (Tamura és munkatársai 2007).

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

A microarray vizsgálat során az *A. nidulans* var. *roseus* ATCC 58397 törzs 24 és 37 °C-os tenyészeiből származó totál RNS mintákat (KGL tápleves; 53 h) hasonlítottuk össze. A minták jelölését, hibridizálását és az array leolvasását a Kromat Kft. végezte.

3. Új tudományos eredmények

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

Vizsgálataink alapján az *A. nidulans* var. *roseus* ATCC 58397 törzs nem tartozik az *A. nidulans* fajba, sokkal inkább az *A. rugulosus* törzsekkel mutat közeli rokonságot. Erre utalnak az alábbi kísérletek eredményei:

Az *A. nidulans* var. *roseus* törzs növekedése felületi tenyészetekben 24 °C-on - hasonlóan a vizsgált *A. rugulosus* törzsekhez – lényegesen elmaradt *A. nidulans*tól a vizsgált valamennyi szénforrás esetében. Süllyesztett kultúrában, szénforrásként glükózt és napraforgóolajat tartalmazó GNL táplevesben az *A. nidulans* var. *roseus* és az *A. rugulosus* törzsek (a glükóz elfogyását követően) gyorsabb növekedést mutattak, mint az *A. nidulans*.

Bár a vizsgált törzsek szekunder metabolit spektruma igen eltérő volt az *A. nidulans* var. *roseus* 24 °C-on megfigyelhető ECB és egy vékonyréteg kromatográfiával jól detektálható, UV fényben kéken fluoreszkáló termék ($R_f = 0,27$) képzése révén az *A. rugulosus* törzsekhez hasonlított inkább.

A parciális β -tubulin, kalmodulin és γ -aktin szekvenciák alapján az *A. nidulans* var. *roseus* egyértelműen az *A. rugulosus* és nem az *A. nidulans* fajhoz állt közelebb.

Az *A. nidulans* var. *roseus* és *A. rugulosus* általunk létrehozott uracil/uridin auxotróf mutánsai heterokarionos hifákat tudtak képezni az *A. nidulans* mutánsokkal. A kísérletek során - egyes esetekben - steril kleisztotéciumok, illetve „hibrid” konídiumok is kialakultak. A „hibrid” konídiumok kis száma, a belőlük kinőtt telepek lassú növekedése és pigmentációs zavarai, valamint az a megfigyelés, hogy a keresztezett törzsek

kromoszómái csak meghatározott kombinációban jelentek meg a hibridekben szintén arra utalt, hogy az *A. nidulans* var. *roseus* - az *A. rugulosus*hoz hasonlóan - nem áll szoros rokonságban az *A. nidulans*szal.

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

Az *A. nidulans* var. *roseus* (ECB-t nem termelő körülmények között; 37 °C) lényegesen érzékenyebbnek bizonyult ECB-vel és CAS-nal szemben, mint az ECB-t nem termelő *A. nidulans*. A két törzs β -1,3-glükán szintázának ECB-vel való gátolhatósága ($IC_{50,ECB}$) érdemben nem tért el egymástól, de ECB-t nem termelő körülmények között az *A. nidulans* var. *roseus* esetében kisebb specifikus β -1,3-glükán szintáz aktivitásokat mértünk.

Az *A. nidulans* var. *roseus* *A. nidulans*énál nagyobb echinocandin érzékenysége nem csak a csírázó konidiumok, hanem a már kinőtt tenyészetek esetében is megfigyelhető volt. A tápagarba fűrt lyukba cseppentett ECB hatására kialakuló gátlási zóna az *A. nidulans* var. *roseus* esetében a paradox effektus meglétére utaló növekedési mintázatot okozott. Az ECB a lyuktól távol is kifejtette növekedés gátló hatását, de a törzs növekedése a lyuk közelében is folytatódott. Hasonló jelenséget az *A. nidulans* esetében csak akkor tapasztaltunk, ha a törzset már eleve ECB-t tartalmazó tápagarra oltottuk le.

ECB termelő körülmények között (24 °C) az *A. nidulans* var. *roseus* sejtfaala szignifikánsan több kitint tartalmazott, mint 37 °C-on. A sejtfaal kitin tartalmának növekedését a sejtfaal β -1,3-glükán tartalmának csökkenése kísérte miközben az α -glükán tartalom lényegesen nem változott. 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. A qRT-PCR-es vizsgálataink során az *A. nidulans* var. *roseus*ban számos kitin szintézishez köthető gén (az *A. nidulans chsA*, *chsB*, *csmB*, AN8710 génjeinek ortológjai) indukálódott ECB jelenlétében 37 °C-on és/vagy 24 °C-on. Az *A. nidulans* FGSC A4 törzs esetében a tenyésztési hőmérséklet változtatása nem okozott szignifikáns változást a vizsgált kitin szintézisben résztvevő génekben, azonban a 37 °C-on történő ECB kezelés hatására a *chsB* és a *csmA* kitin-szintázok indukálódását figyeltük meg. Sem a tenyésztési hőmérséklet, sem az ECB kezelés hatására nem történt változás a β -1,3-glükán szintáz katalitikus alegységének relatív expressziójában (*fksA*) egyik törzs esetében sem, noha ECB termelő körülmények között a β -1,3-glükán szintáz aktivitások növekedését detektáltuk az *A. nidulans* var. *roseus* esetében.

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

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

Az élesztőkivonat adagolása növelte, a szójapepton elhagyása azonban jelentősen csökkentette a törzs ST termelését s csökkentette az ECB termelést is. A tesztelt aminosavak, mint szójapepont helyettesítő

nitrogénforrások közül az ECB felépítésében is résztvevő Pro, Thr és Orn elegeye, illetve a Tye és a Phe bizonyultak a legelőnyösebbnek. Az ECB kihozatal további javítása érdekében a Response Surface Methodology (RSM) módszer segítségével optimalizáltuk a tápleves összetételét. Az illesztett függvényeknek 24,9 g/L glükóz, 11,6 g/L Tyr és 60,8 ml/L napraforgóolaj értékeknél volt maximuma. Ezen kiindulási koncentrációk esetén a fermentáció 6. napján 219 ± 15 $\mu\text{g/g}$ ECB értéket mértünk. Az eredeti táplevesben az ECB mennyisége 231 ± 17 $\mu\text{g/g}$ volt, azaz az ECB termelés még így is valamelyest elmaradt az eredeti értékekhez képest, ugyanakkor a fermentlevek ST tartalmában jelentős csökkenés mutatkozott: 45 ± 5 $\mu\text{g/g}$ (kontoll) és $6,5 \pm 2$ $\mu\text{g/g}$ (optimalizált).

A napraforgóolajat nem tartalmazó tenyészetekben jelentősen csökkent a termelt ECB mennyisége, ami együtt járt a tenyészetek lúgosodásával és a növekedés idő előtti leállásával. Ammónium-szulfát és keményítő adagolásával ez utóbbi két változás megelőzhető volt, ami kedvezően befolyásolta az ECB termelését is. A 37 °C-on (ECB-t nem termelő körülmények között) végzett vizsgálataink alapján a napraforgóolaj képes volt mérsékelni a tápközeghez adott ECB antifungális aktivitását. Hasonló hatást paraffinolaj adagolásával is el lehetett érni, azonban ezen olaj jelenlétében a termelt ECB mennyisége (87 ± 16 $\mu\text{g/g}$) elmaradt a napraforgóolaj jelenlétében mért értékektől (231 ± 17 $\mu\text{g/g}$).

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

A microarray és a qRT-PCR mérésekből származó adatok között szoros korrelációt találtunk ($R^2 = 0,74$) ami azt jelzi, hogy az *A. nidulans* genom szekvenciája alapján tervezett DNS chip eredményesen használható az *A. nidulans* var. *roseus* vizsgálatára is. A kapott adatok és a levont következtetések független módszerrel történő ellenőrzése természetesen ebben az esetben különösen fontos.

A microarray kísérletekből származó normalizált adatok alapján számolt $\log_2 R$ értékek ismeretében a hőmérséklet 37 °C-ról 24 °C-ra való csökkentése 400 gén aktivitását csökkentette, míg 139 gén aktivitását növelte számottevő mértékben. Ezen gének microarray adatai és az elvégzett qRT-PCR-es és fiziológiai vizsgálatok alapján az alábbi változások valószínűsíthetőek a tenyészetben a tenyésztési hőmérséklet 24 °C-ra való csökkentése után:

1. 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 deacetyláz 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.

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

3. 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, ami a sejtek specifikus nitrát reduktáz aktivitásának növekedésével járt együtt.

4. A fehérjeszintézis intenzitásának csökkenésre utal számos a transzkripcióhoz, translációhoz, poszttranszlációs módosításokhoz kapcsolódó gén repressziója.

5. 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. E változásokkal párhuzamosan megnövekedett a sejtek glutation tartalma és specifikus kataláz aktivitása, ugyanakkor csökkent az intracelluláris peroxidok mennyisége.

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

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 β -1,3-glükánáza (EngA) – közötti kölcsönhatások összefoglalásaként megállapítottuk, hogy a ChiB kitináz és az EngA β -1,3-glükánáz felerősítette (szinergista hatás) az ECB antifungális hatását az általunk tesztelt *A. fumigatus*, *A. nidulans* var. *roseus*, a *S.*

cerevisiae és a *C. albicans* esetében egyaránt. Ugyanakkor a ChiB és az EngA nem mutatott sem szinergizmust, sem antagonizmust a PAF-fal. Vizsgálataink alapján a PAF (5, illetve 65 µg/ml) nem befolyásolta a *S. cerevisiae* és a *C. 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 *Aspergillusok* esetében egyes koncentráció tartományokban.

4. Összefoglalás

Vizsgálataink alapján - összhangban Klich és munkatársai (2001) eredményeivel - az *A. nidulans* var. *roseus* ATCC 58397 törzs sima falú askospórái ellenére (Klich és munkatársai 2001) sem tartozik az *A. nidulans* fajba, sokkal inkább az *A. rugulosus* törzsekkel mutat közeli rokonságot. Erre utalt a kalmodulin, β -tubulin és γ -aktin gének parciális szekvenciája, növekedésének/szénforrás hasznosításának hőmérséklet függése és szekunder metabolit termelése is. Gyakorlati szempontból ez azt is jelenti, hogy az *A. nidulans*-ról a szakirodalomban összegyűlt nagy mennyiségű információ csak igen kritikusan általánosítható az *A. nidulans* var. *roseus* esetében. A DNS szekvenciák között tapasztalt nagyfokú hasonlóság alapján nem meglepő azonban, hogy az *A. nidulans* genom szekvenciája sikeresen felhasználható az *A. nidulans* var. *roseus*-sal 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 CAS-nal szemben, mint az echinocandinokat nem termelő *A. nidulans*. 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. Elképzeléseink szerint a törzs nem termelő körülmények között mutatott fokozott ECB érzékenysége (ami legalább részben az alacsony β -1,3-glükán szintáz aktivitásokkal magyarázható) az ECB rezisztencia gyors indukálódását segíthette. A rezisztencia kialakulásában fontos szerepet játszhatott a kitin szintézis aktiválódása és ezáltal a sejtfa kitin tartalmának növekedése, a specifikus β -1,3-glükán szintáz aktivitások emelkedése és a vegetatív növekedés jelentős lassulása is. A sejtfafehérjék szintézisében bekövetkező változások arra utalnak, hogy ECB termelő körülmények között nemcsak a sejtfa 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, 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 sejtfaiban melyek, növelhetik a gomba érzékenységét egyes sejtfa stresszorokkal

szemben. Erre utal az ECB és az SDS antifungális hatása között meghatározott koncentráció tartományokban megfigyelt szinergista kölcsönhatás 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) sejtfa 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. nidulans*-hoz hasonló gyors növekedés és az ECB termelés hiánya jellemzi, addig 24 °C-on (a legtöbb szénforrás esetében) a növekedése lényegesen elmarad az *A. nidulans*-étól, amit intenzív ECB termelés kísért. Vizsgálataink alapján a tenyésztési hőmérséklet csökkentése jelentős transzkripció szinten is detektálható változást idézett elő a törzsben. Ezen változások egy része a növekedés intenzitásának csökkenésével 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 translációhoz és a fehérjék posztranszlációs módosításához köthető gén aktivitása is. Szintén represszálódtak a sziderofórok szintéziséhez és transzportjához szükséges gének, 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 transzkripció és fiziológiai vizsgálatok alapján, ECB termelő körülmények között nőtt a nitrát redukció intenzitása, nőtt a tenyészetek specifikus kataláz aktivitása, 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 ± 5 $\mu\text{g/g}$ -ról $6,5 \pm 2$ $\mu\text{g/g}$ -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. 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 linsav 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. 2) Mérsékelte a tenyészetek microarray és qRT-PCR adatok alapján jóslott 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 fentiekén túl csökkentette a termelt ECB antifungális hatását a termelő törzsre nézve.

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. A PAF és a ChiB kitináz, illetve az EngA β -1,3-glükánáz, mint sejtfalbontó hidrolázok között azonban nem tudunk interakciót kimutatni. 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. 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 érzékenységet.

5. Introduction

Fungal infections, especially invasive mycoses, have become an important health problem in the last decades as their incidence has dramatically increased among patients suffering from AIDS or hematological malignancies, transplant recipients and other immunosuppressed patients. Additional factors including treatment with broad-spectrum antibacterial drugs, surgical interventions, using indwelling catheters or prosthetic devices, parenteral nutrition or dialysis also increase the risk of mycoses. These immunocompromised patients are mainly infected by *Candida*, *Aspergillus*, *Cryptococcus* and other opportunistic fungal pathogens (Georgopapadakou 1998; Carillo-Munoz *et al.* 2006; Rüping *et al.* 2008). Nowadays *Candida* species are responsible for more than 90 % of fungal infections (Kontoyiannis and Lewis 2002; Masouka 2004) and De Rosa *et al.* (2009) reported that aspergillosis is the second most frequent fungal infection after candidiasis.

Aspergillus nidulans var. *roseus* ATCC 58397 is an industrially important filamentous Ascomycota strain owing to its production of the antifungal compound echinocandin B (ECB). The echinocandin type antimycotics were discovered in 1970s. These antifungal lipopeptides have broad-spectrum and low toxicity and they are highly efficient against azole resistant *Candida* strains. Semisynthetic derivatives are frequently used during treatment of different candidiasis (*e.g.* oesophagealis candidiasis, invasive candidiasis and candidemia) and caspofungin originated from pneumocandin B0 is efficiently applied against *Aspergillus* species (Gregory *et al.* 2007).

The taxonomical position of *A. nidulans* var. *roseus* ATCC 58397 - similarly to the other *Aspergillus* „varietas” – has been still questionable (Geiser *et al.* 2007; Peterson 2008). It represents an intermediate strain between *Aspergillus nidulans* (*Emericella nidulans*) and *Aspergillus rugulosus* (*Emericella rugulosa*) (Hodges *et al.* 1994; Klich *et al.* 2001). Using polyphasic taxonomy (Colwell 1970), we tried to elucidate the taxonomical status of this isolate in the first part of our work. Although echinocandin resistance is not a serious problem nowadays, the number of resistant strains is expected to increase in the near future. Therefore, in the next part of our research we tried to understand the nature of ECB resistance of the producer *A. nidulans* var. *roseus* strain. Finally, we investigated the physiological background of ECB formation to collect data for future improvement of the strain and fermentation technology.

The planned experiments were the followings:

1. Comparison of growth, carbon source utilization and secondary metabolite production of *A. nidulans* var. *roseus* ATCC 58397, *A. nidulans* and *A. rugulosus*.
2. Partial sequencing the calmodulin, β -tubulin and γ -actin genes from *A. nidulans* var. *roseus* ATCC 58397 and using these sequence data for phylogenetic analysis. Testing the possibility of sexual/parasexual crossing between *A. nidulans* and *A. nidulans* var. *roseus* strains.
3. Determination and comparison of ECB and CAS sensitivity of *A. nidulans* var. *roseus* ATCC 58397 and the ECB non producer *A. nidulans* FGSC A4 strains.
4. Investigation of cell wall composition, transcription of genes involved in cell wall biosynthesis, and specific β -1,3-glucan synthase activity as well as

the growth inhibitory effect of sodium-dodecil-sulfate (SDS) in the presence of ECB in both the *A. nidulans* var. *roseus* ATCC 58397 and *A. nidulans* FGSC A4 strains.

5. Investigation of fermentation parameters influencing ECB and sterigmatocystin (ST) production (Hodges *et al.* 1994); studying the effect of nitrogen sources and sunflower oil on secondary metabolite production.

6. Studying transcriptional differences between ECB producing and ECB non producing *A. nidulans* var. *roseus* ATCC 58397 cultures using DNA chip technology.

7. Investigation of pairwise interactions between naturally occurring antifungal agents – ECB (Walker *et al.* 2010), antifungal protein of *Penicillium chrysogenum* (PAF; Hegedüs *et al.* 2011) as well as ChiB chitinase and EngA β -1,3-glucanase originated from *A. nidulans* (Szilágyi *et al.* 2012) - influencing the cell wall homeostasis.

6. Materials and Methods

Strains used in this study are summarized in Table 1.

Strains	Genotype
<i>Aspergillus nidulans</i> strains	
FGSC A4	Glasgow wild-type (vad típus)
FGSC A33	<i>biA1, pyroA4, veA1</i>
FGSC A851	<i>yA2, _argB::trpC, veA1, trpC801</i>
FGSC A146	<i>pabaA1, acrA1, phenA2, pyroA4, lysB5, sB3, nicB8, riboB2, chaA1</i>
FGSC A773	<i>pyrG89, wA3, pyroA4</i>
<i>creA</i> -null mutáns	<i>pabaA1, yA1, ΔcreA::argB, argB2, riboB2, veA1</i>
HZS 120	<i>pabaA1, riboB2, veA1</i>
Other <i>Aspergillus</i> strains	
<i>A. fumigatus</i> FGSC 1100 (AF 293)	Wild type
<i>A. nidulans</i> var. <i>roseus</i>	Wild type
ATCC 58397 (NRRL 11440)	Wild type
<i>A. rugulosus</i> (<i>Emericella rugulosa</i>)	Wild type
CBS 133.60	Wild type
<i>A. rugulosus</i> (<i>Emericella rugulosa</i>)	Wild type
CBS 171.71	Wild type
Other strains	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> S288C (YSC1060)	Wild type
<i>Candida albicans</i> ATCC 14053	Wild type
<i>Bacillus subtilis</i> BS-1	Wild type

A. nidulans strains and *A. fumigatus* strains were maintained on Barratt's minimal-nitrate agar (MN) (Baratt *et al.* 1965), while the *A. nidulans* var. *roseus* strain and the *A. rugulosus* strains were maintained on malt dextrose agar (PM). For maintain of *B. subtilis* and yeasts bouillon and Sabouraud agar was used, respectively.

Growth properties of *Aspergillus* strains were studied on MN agar plates containing different kind of carbon- and nitrogen sources (10 g/L glucose, fructose, sorbitol, xylose, maltose, lactose, saccharose, starch or glycerol as well as 75 mmol/L NaNO₃, (NH₄)₂SO₄ or Na-Glu or 1 w/v % casein peptone, soybean peptone or yeast extract).

Secondary metabolite production was studied in modified complex medium (GNL) originally described by Boeck and Kastner (1981). The GNL medium contained 10 g/L glucose, 10 g/L soybean peptone, 4.5 g/L Na₂HPO₄ 12H₂O, 1 g/L ZnSO₄ 7H₂O, 5.5 g/L MgSO₄ 7H₂O, 0.1 g/L FeSO₄ 7H₂O and 7.5 v/v % sunflower oil (pH 5.5). For studying transcriptional changes (qRT-PCR and microarray experiments), cell wall composition and specific β-1,3-glucan synthase activities, MN broth containing 40 g/L glucose and supplemented with 10 g/L yeast extract and 2.9 g/L (NH₄)₂SO₄ was used. Aliquots (100 mL) of the culture media were inoculated with 100 million freshly grown conidia and were incubated at 24 or 37 °C with shaking at 300 rpm for 1, 2 or 6 days.

Optimal starting Tyr, glucose and sunflower oil concentration for high ECB and low ST production was determined by response surface methodology (RSM) (Lee and Chen 1997) using Box-Behnken experimental design. A full second-order polynomial model obtained by a multiple regression technique for the three factors using the R statistical software (The R Development Core Team; <http://www.r-project.org/>) was fitted to describe the response surface.

Uracil/Uridine auxotroph *A. nidulans* var. *roseus* and *A. rugulosus* mutants were isolated after UV mutagenesis by direct selection on 5-fluoroorotic acid containing agar plates. These auxotroph strains were

crossed with different *A. nidulans* strains following the classical protocol of Pontecorvo *et al.* (1953).

Echinocandin susceptibility of the strains was studied by both agar diffusion assay (Galgóczy *et al.* 2005) and microdilution method (Arikan *et al.* 2001). Pairwise interactions between naturally occurring antifungal agents (ECB, PAF, ChiB, EngA) were also tested by microdilution method. The observed interactions were characterized by the Abbott-formula (Moreno *et al.* 2003). The effect of sunflower and paraffin oil on ECB sensitivity was tested by measuring the growth ability of the fungus in MN broth also containing sunflower or paraffin oil and ECB at different concentration.

In submerged cultures the growth of the strains was quantified by detecting the changes in the dry cell mass (DCM) (Pusztahelyi *et al.* 1997) and by measuring the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reducing activity (Lee *et al.* 1999). Glucose content of the fermentation broth was measured by the rate assay of Leary *et al.* (1992). The amount of ST and other secondary metabolites were quantified with thin layer chromatography (Klich *et al.* 2001).

Specific β -1,3-glucan synthase activity of the cell free extracts prepared by X-pressing was measured with a microtiter-based fluorescence assay (Shedletzky *et al.* 1997). ECB sensitivity of the enzyme complex was characterized by the ECB concentration causing 50 % inhibition in the activity ($IC_{50,ECB}$). The specific nitrate reductase (Bruinenberg *et al.* 1983), catalase (Roggenkamp *et al.* 1974) and glutathione reductase (Pinto *et al.* 1984) activities were also determined from cell free samples prepared by X-pressing according to the protocols indicated in parenthesis. Intracellular peroxide concentrations were measured by a fluorimetric method using 2',7'-

dichlorofluorescein diacetate (Royall és Ischiropoulos 1993), while oxidized (GSSG) and reduced (GSH) glutathione content of the cells was determined by the rate assay of Anderson (1985). Cell wall composition was determined according to Stevens *et al.* (2006).

Genomic DNA was isolated from lyophilized mycelium using Genomic DNA Purification Kit K0512 (Fermentas) according to the instructions of the manufacturer. Partial DNA sequences were amplified by PRC and the PCR products were sequenced with an automated DNA capillary sequencer using the ABI Big Dye Terminator 3.1 Kit. The Nucleotide Blast program (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) was used to compare our sequences with the data of GeneBank database (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/). Phylogenetic analyses were conducted with the MEGA4 software (Tamura és munkatársai 2007).

Total RNA was isolated following the instructions of Chomczynski *et al.* (1993) with TRISOL reagent. The qRT-PCR reactions were performed with the Brilliant® II SYBR® Green QRT-PCR Master Mix kit (Stratagene).

Total RNA samples originated from *A. nidulans* var. *roseus* cultured at either 24 or 37 °C (KGL medium; 53 h) were compared. The labeling and hybridization of samples and the reading of the array was carried out by the Kromat Ltd.

7. New Scientific Results

7.1 Polyphasic characterization of *A. nidulans* var. *roseus* ATCC 58397

According to our experiments the *A. nidulans* var. *roseus* ATCC 58397 strain did not belong to the *A. nidulans* species, rather it showed close relationship with *A. rugulosus* strains. It was supported by the following results:

At 24 °C, the growth of *A. nidulans* var. *roseus* – similarly to *A. rugulosus* strains – was significantly slower than that of *A. nidulans* on surface cultures containing different carbon sources. In contrast, in submerged GNL cultures containing both glucose and sunflower oil as carbon sources, *A. nidulans* var. *roseus* as well as the *A. rugulosus* strains grew better than *A. nidulans* after all the glucose had been consumed.

Although the secondary metabolite production spectra of the strains were quite different, due to the production of ECB and the formation of a characteristic compound detected by TLC ($R_f = 0,27$) *A. nidulans* var. *roseus* resembled more to the two *A. rugulosus* strains tested than to *A. nidulans*.

The phylogenetic analyses of the partial β -tubulin, calmodulin and γ -actin sequences clearly demonstrated that *A. nidulans* var. *roseus* belongs to the species of *A. rugulosus* and not to *A. nidulans*.

The *A. nidulans* var. *roseus* uracil/uridine auxotroph strain - similarly to the tested *A. rugulosus* uracil/uridine auxotroph mutants - was able to form stable heterokaryotic hyphae with *A. nidulans* auxotroph mutants. In some experiments sterile cleistothecia and a few “hybrid” conidia were also developed. The majority of “hybrid” colonies grew slow, showed reduced/altered pigmentation. Distribution of genetic markers originated

from the parental strains in the hybrids suggested that some chromosomes of *A. nidulans* var. *roseus* (and *A. rugulosus*) could be substituted with only more than one chromosomes of *A. nidulans*.

7.2 Investigation of echinocandin resistance of *A. nidulans* var. *roseus*

Under ECB non-producing conditions (37 °C), the resistance of *A. nidulans* var. *roseus* against ECB or CAS was surprisingly low and was even lower than that of the echinocandin non-producer *A. nidulans*.

The IC_{50,ECB} value of β -1,3-glucan synthase complex originated from *A. nidulans* var. *roseus* was similar to that from *A. nidulans*, but the specific β -1,3-glucan synthase activity of *A. nidulans* var. *roseus* was significantly smaller than that of *A. nidulans*. The higher echinocandin sensitivity of *A. nidulans* var. *roseus* was observed not only with germinating conidia but with growing hyphae as well. The line-shaped inhibitory zone observed with *A. nidulans* var. *roseus* in these experiments could be the consequence of paradox effect and suggests the existence of an inducible echinocandin resistance in this strain. The inhibition zone observed with *A. nidulans* was ellipsoidal (no paradoxical growth was detected). Line-shaped inhibitory zone was observed with this species only when it was pre-cultured in the presence of ECB.

Cell wall of *A. nidulans* var. *roseus* contained significantly less β -1,3-glucan and more chitin at 24 °C (under ECB producing condition), than at 37 °C. Importantly, the cell wall composition of *A. nidulans* was not responsive to alterations in the incubation temperature; the measured data were similar to those detected with *A. nidulans* var. *roseus* at 37 °C. Several

chitin synthesis genes (orthologue of *chsA*, *chsB*, *csmA* and AN8710 of *A. nidulans*) were induced in *A. nidulans* var. *roseus* when it was cultured at 24 °C and/or when ECB was added to cultures growing at 37 °C.. In case of *A. nidulans*, the cultivation temperature had no significant effect on chitin synthesis genes but ECB treatment at 37 °C induced *chsB* and *csmA* both encodes chitin synthases. Neither the cultivation temperature nor ECB treatment affected the relative expression of β -1,3-glucan synthase catalytic subunit (*fksA*) in both strains, however specific β -1,3-glucan synthase activities were increased under ECB producing condition in *A. nidulans* var. *roseus*.

Both synergistic and antagonistic antifungal effect was observed between SDS and ECB on *A. nidulans* var. *roseus* in agar-well diffusion and microdilution assays In contrast, with *A. nidulans* only additive effect was detected in the same concentration ranges.

7.3 Effect of medium composition on the secondary metabolite production of *A. nidulans* var. *roseus*

Addition of yeast extract to GNL medium increased, while omission of soybean peptone decreased the ST and ECB production. Replacement of soybean peptone with certain amino acids – *e.g.* mixture of Pro, Thr and Orn, as well as Tyr or Phe – also decreased markedly the ST formation but caused only a smaller decrease in ECB yields. In order to increase ECB production the starting sunflower oil, Tyr and glucose concentrations of the soybean peptone free GNL medium were optimized by RSM. At the optimal values (24.9 g/L glucose, 11.6 g/L Tyr and 60.8 ml/L sunflower oil) 219 \pm 15 μ g/g

ECB and only 6.5 ± 2 $\mu\text{g/g}$ ST was detected at the 6th day. Using the standard GNL medium 231 ± 17 $\mu\text{g/g}$ ECB and 45 ± 5 $\mu\text{g/g}$ ST was produced.

Omission of sunflower oil decreased the ECB production, increased the pH and stopped the growth after glucose depletion. Addition of ammonium-sulfate and starch to the medium prevented the alkalification of the medium, supported the growth of fungus after glucose depletion and moderated the decrease in ECB yields. According to our experiment carried out at 37 °C (under ECB not producing condition), sunflower oil could reduce the antifungal effect of ECB added to the medium. Similar effect was observed, when paraffin oil was used instead of sunflower oil. Replacement of sunflower oil with paraffin oil in GNL medium decreased markedly the amount of produced ECB at 24 °C (from 231 ± 17 $\mu\text{g/g}$ to 87 ± 16 $\mu\text{g/g}$).

Omitting sunflower oil from the fermentation medium decreased markedly the amount of produced ECB and it was accompanied with the increase of pH and the inhibition of growth after glucose depletion. Addition of ammonium sulfate and starch to the medium prevented the alkalification, let the cultures grow after glucose depletion and moderated the decrease in the ECB yields. According to our experiments addition of either sunflower or paraffin oil to the medium decreased the antifungal activity of the added ECB on the fungus. It is worth mentioning that using paraffin oil instead of sunflower oil decreased significantly the ECB yields from 231 ± 17 $\mu\text{g/g}$ to 87 ± 16 $\mu\text{g/g}$.

7.4 Effect of culturing temperature on metabolism of *A. nidulans* var. *roseus*

The tight correlation ($R^2= 0.74$) found between the microarray and qRT-PCR data suggests that the DNA chip designed according to the *A. nidulans* genome can be successfully used to investigate the *A. nidulans* var. *roseus* transcriptom as well. Of course, justification of the obtained data and the drawn conclusions with independent methods is particularly important in this case.

According to the normalized \log_2 R values, after lowering the temperature from 37 °C to 24 °C 400 genes were down regulated and 139 genes were up regulated. Using these microarray data together with our physiological experiments and the qRT-PCR data of selected genes we assume the following changes after the temperature shift from 37 °C to 24 °C:

1. We found surprisingly few changes in the activity of cell wall synthesis genes compared to the previous studies. The putative N-acetyl-glucosamin-6-phosphate deacetylase and glucosamin-6-phosphate isomerase genes (orthologues of AN1428 and AN1418) which are involved in the degradation of chitin monomers and a pepsin-type cell wall proteinase gene (orthologue of AN8102) were repressed, while a *chiA* chitinase orthologue which participates in the synthesis of chitin and a GPI-anchor cell wall protein gene (orthologue of AN5357) were induced.

2. The balance between synthesis and degradation of lipid metabolism was shifted towards synthesis.

3. Several genes involved in amino acid and nucleotide synthesis (with the exception of the orthologue of AN1734, a putative 3-dehydroshikimate dehydrogenase) were down regulated. Genes involved in nitrate reduction

were up regulated which were accompanied with increased specific nitrate reductase activities.

4. Several genes involved in transcription, translation and posttranslational modifications were down regulated indicating the repression of protein synthesis.

5. Certain heat shock genes together with genes involved in glutathione and thioredoxin metabolism and DNA repair were repressed. Induction of three catalase genes was observed and it was accompanied with increased specific catalase activities, elevated glutathione content and decreased intracellular peroxide concentrations.

6. Among the genes contributing in iron metabolism 12 were down regulated and none of them was up regulated.

7.5 Investigation of pairwise interactions between naturally occurring antifungal agents

Testing the pairwise interactions between ECB, PAF, ChiB and EngA we found that that the ChiB chitinase and the EngA β -1,3-glucanase increased the antifungal effect of (showed synergism with) ECB on *A. fumigatus*, *A. nidulans* var. *roseus*, *S. cerevisiae* and *C. albicans*. On the other hand, these cell wall hydrolasing enzymes showed neither synergism, nor antagonism with PAF. According to our results, the PAF (5 or 65 μ g/ml) did not influence the growth of *S. cerevisiae* and *C. albicans* and it did not modified the antifungal activity of ECB (3-30 μ g/ml), ChiB (0,6 U/ml) and EngA (12 U/ml) on the tested yeasts. In contrast, ECB and PAF showed antagonism on the tested *Aspergillus* strains in certain concentration ranges.

8. Summary

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, β -tubulin and γ -actin genes, the temperature dependence of its growth on different carbon sources and its secondary metabolite production. 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* the genome sequence data of *A. nidulans* can be successfully used in molecular experiments with *A. nidulans* var. *roseus* (*e.g.* primer design, identification of orthologue genes, microarray experiments). The possibility of parasexual hybridization between *A. nidulans* and *A. rugulosus* as well as between *A. nidulans* and *A. nidulans* var. *roseus* raises the question if some of the taxonomically not fixed *Aspergillus* isolates, including *A. nidulans* var. *roseus*, are the consequence of gene exchanges during the parasexual hybridization of different closely related *Aspergillus* species.

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*. 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) 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 β -1,3-glucan synthase activity) helped the fast induction of ECB resistance. The ECB resistance of *A. nidulans* var. *roseus* can be explained with the induction of chitin biosynthesis and as a consequence the increases in the chitin content of the cell wall, the increased β -1,3-glucan synthase activity as well as the reduced vegetative growth. The observed changes in the transcription of certain cell wall protein genes 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 β -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. 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. 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. Several genes involved (directly or indirectly) in the protein synthesis (amino acid and nucleotide synthesis, transcription, translation, posttranslational modifications) were repressed. Genes necessary for the synthesis and transport of siderophores were also repressed. 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, increase in catalase activities 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 $45 \pm 5 \mu\text{g/g}$ to $6.5 \pm 2 \mu\text{g/g}$) 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. 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. 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 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.

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. In contrast, we could not find any interaction between PAF and ChiB chitinase or EngA β -1,3-glucanase (the cell wall degrading hydrolases of *A. nidulans*). 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 influence 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. 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.

9. Irodalomjegyzék

- Anderson, M.E. (1985) Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. *Methods Enzymol* 113; 548-555
- 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
- Barratt, R.W., Johnson, G.B., Ogata, W.N. (1965) Wild-type and mutant stocks of *Aspergillus nidulans*. *Genetics* 52; 233-246
- Binder, U.; Oberparleiter, C.; Meyer, V., Marx, F. (2010) The antifungal protein PAF interferes with PKC/MPK and cAMP/PKA signalling of *Aspergillus 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
- 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
- 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
- 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
- Colwell, R.R. (1970) Polyphasic taxonomy of the genus *Vibrio*: numerical taxonomy of *Vibrio Cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* and related *Vibrio* species. *J Bacteriol* 140; 410-433
- De Rosa, F.G., Garazzino, S., Pasero, D., Di Perri, G., Ranieri, V.M. (2009) Invasive candidiasis and candidemia: new guidelines. *Minerva Anesthesiol* 75; 453-458

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

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

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

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

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

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

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

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

Hegedűs, 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

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

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

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

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

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, 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

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

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

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

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 B₀. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 26; 216-221

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

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

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. *Biotechnol Appl Biochem* 25; 81-86

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

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

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

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

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

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 β -1,6-glucan synthesis inhibition by caspofungin. *Antimicrob Agents Chemother* 50; 3160-3161

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.

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

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

10. A jelölt tudományos tevékenységének 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

2. 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 high-siderophore - 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 (16TH 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 (16TH 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.**, Spicz Müller, 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 (16TH 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 in the programmed cell death of the producer *Penicillium chrysogenum* filamentous fungus. Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica 58, 170 (16TH International Congress of the Hungarian Society for Microbiology, Budapest)