

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei
Thesis of PhD dissertation

**A γ -GLUTAMIL TRANSZPEPTIDÁZ FIZIOLÓGIAI
SZEREPÉNEK VIZSGÁLATA AZ *ASPERGILLUS NIDULANS*
FONALAS GOMBÁBAN**

**AN INVESTIGATION OF THE PHYSIOLOGICAL ROLE OF
 γ -GLUTAMYL TRANSPEPTIDASE IN THE FILAMENTOUS
FUNGUS *ASPERGILLUS NIDULANS***

Spitzmüller Zsolt

Témavezető/Supervisor: Dr. Emri Tamás



DEBRECENI EGYETEM
Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola

Debrecen, 2016.

1. Bevezetés és célkitűzések

A szénstressz, azaz a szénforrás éhezés (a szénforrás minősége és mennyisége nem elegendő a növekedés fenntartásához) és a szénforrás limitáció (a szénforrás minősége és/vagy mennyisége csak lassú növekedést tesz lehetővé) az egyik leggyakoribb stressz a természetben (Winderickx és munkatársai 2003, McArthur 2006). A szén stresszválasz fiziológiájának megismerése nem csak a mikroorganizmusok természetes élőhelyükhöz való alkalmazkodásának jobb megértését teszi lehetővé, de segíthet megérteni a humánfertőzések kialakulását (Dagenais és Keller 2009), a mikotoxin termelés szabályozását (Jiao és munkatársai 2008, Bouras és Strelkov 2010) és a mikrobák ipari fermentációk alatt mutatott viselkedését (Glazer és Nikaido 2007) is. A Debreceni Egyetem Biotechnológiai és Mikrobiológiai Tanszékén hosszú ideje folynak kutatások fonalas gombák szénéhező tenyészetével kapcsolatban (Pusztahelyi és munkatársai 1997, Sámi és munkatársai 2001, Emri és munkatársai 2008, Szilágyi és munkatársai 2013). E vizsgálatok egyik érdekes megfigyelése, hogy szénéhezés hatására, mind a *Penicillium chrysogenum*, mind az *Aspergillus nidulans* tenyészetekben megnő a γ -glutamil transzpeptidáz

(γ GT) enzim aktivitása. Mindez együtt jár a tenyészetek glutation (GSH) tartalmának csökkenésével és a reaktív oxigénformák (ROS) mennyiségének a növekedésével (Sámi és munkatársai 2001, Emri és munkatársai 2004). A γ GT-t, a GSH lebontásának kulcsfontosságú enzimeként tartják számon (Penninckx és Elskens 1993), így jogosnak tűnik az a feltételezés, hogy szénéhező körülmények között a sejtek a megnövekedett γ GT segítségével lebontják és energiaforrásként hasznosítják GSH raktáraikat, ami egy idő után a ROS akkumulálódásához vezet. Az irodalmi adatok ellenben óvatosságra intenek. Sok élőlényben a γ GT nem vesz részt a (citoszolikus) GSH lebontásában (Kumar és munkatársai 2003, Ohkama-Ohtsu és munkatársai 2008, Kumar és munkatársai 2012). Tervezett vizsgálataink célja az *A. nidulans*, mint modell organizmus γ GT-ának jobb megismerése, lehetséges fiziológiai szerepének feltérképezése volt szénéhező tenyészetekben. Célul tűztük ki továbbá a GSH tartalom csökkenésért felelős gének/enzimek azonosítását és a γ GT e folyamatban betöltött szerepének tisztázását.

Célkitűzésünk megvalósítása érdekében az alábbi vizsgálatok elvégzését terveztük:

- 1) Az *A. nidulans* γ GT aktivitásáért felelős gén azonosítása. Az *Aspergillus* Genome Database (www.aspgd.org) adatbázis segítségével a potenciális γ GT gének kigyűjtése, majd az adott génhez tartozó deléciós törzsek γ GT aktivitásának tesztelése.
- 2) A sejtek γ GT termelését befolyásoló körülmények azonosítása. A szénéhezés és a szénforrás limitáció hatásának vizsgálata a tenyészetek γ GT aktivitására és a potenciális γ GT gének transzkripciójára vad típusú, valamint a nitrogén és szén anyagcserében fontos *meaB* (Wong és munkatársai 2007) és *creA* (Shroff és munkatársai 1997) géneket tekintve inaktív törzsekben.
- 3) A γ GT aktív szekretálódásának alátámasztása. *Aspergillus* fajok ismert, vagy feltételezett γ GT génjeinek bioinformatikai elemzése különös tekintettel a szignálszekvencia meglétére, illetve hiányára. Szénforrás éhező és szénforrás limitált *A. nidulans* tenyészetek fermentlevei γ GT aktivitásának vizsgálata. Szénforrás limitált (növekvő, de nem autolizáló) *A. nidulans* tenyészetek szekretomának tanulmányozása.
- 4) A γ GT néhány enzimológiai paraméterének meghatározása. A γ GT izolálása a fermentléből. A γ GT preparátum pH és hőmérséklet optimumának meghatározása, valamint hidroláz és

transzferáz aktivitásának mérése különböző szubsztrátok jelenlétében.

5) A γ GT potenciális fiziológiai szerepének feltérképezése. A γ GT-t kódoló génben deletált *A. nidulans* törzsek fiziológiai vizsgálata a növekedés, a proteáz termelés, a reaktív részecskék (RS) képződésének, valamint a konidium és kleisztotécium képzés detektálásán keresztül. A tenyészetek GSH tartalmának és γ GT aktivitásának vizsgálata vad típusú és a γ GT-t kódoló génben sérült törzsekben.

2. Anyagok és módszerek

A kísérleteinkben az 1. táblázatban szereplő *A. nidulans* törzseket használtuk.

Törzs	Genotípus
rJMP1.59	<i>pyrG89; pyroA4; veA⁺</i>
tNJ190-1	<i>pyrG89, ΔAN10444::Aspergillus fumigatus pyrG⁺, pyroA4, veA⁺</i>
tNJ190-2	<i>pyrG89, ΔAN10444::A. fumigatus pyrG⁺, pyroA4, veA⁺</i>
tNJ190-3	<i>pyrG89, ΔAN10444::A. fumigatus pyrG⁺, pyroA4, veA⁺</i>
tNJ188-1	<i>pyrG89, ΔAN5658::A. fumigatus pyrG⁺, pyroA4, veA⁺</i>
tNJ188-2	<i>pyrG89, ΔAN5658::A. fumigatus pyrG⁺, pyroA4, veA⁺</i>
tNJ188-3	<i>pyrG89, ΔAN5658::A. fumigatus pyrG⁺, pyroA4, veA⁺</i>
tNJ151-1	<i>PyrG89, ΔAN10444::A. fumigatus pyrG⁺, 3/4pyroA4::AN10444:pyroA⁺, veA⁺</i>
tNJ151-2	<i>pyrG89, ΔAN10444::A. fumigatus pyrG⁺, 3/4pyroA4::AN10444:pyroA⁺, veA⁺</i>
tNJ189-1	<i>pyrG89, ΔAN5658::A. fumigatus pyrG⁺, 3/4pyroA4::AN5658:pyroA⁺, veA⁺</i>
tNJ189-2	<i>pyrG89, ΔAN5658::A. fumigatus pyrG⁺, 3/4pyroA4::AN5658:pyroA⁺, veA⁺</i>
tNJ36	<i>pyrG89, pyrG89::A. fumigatus pyrG⁺, pyroA4, veA⁺</i>
JMK1	<i>pabaA1, riboB, yA1, ΔcreA, veA1</i>
FGSC A24	<i>sC12, veA1</i>
FGSC A26	<i>biA1, veA1</i>
FGSC A41	<i>biA1, sB3, veA1</i>
FGSC A451	<i>pabaA1, meaB6, cnxH3, sC12, veA1</i>
FGSC A553	<i>biA1, cnxH3, veA1</i>

1. Táblázat

A törzseket nitrátos minimál tápagon tartottuk fenn (Barratt és munkatársai 1965) és nitrátos minimál tápagon történt a konidiogenezis és a kleisztotéciumok képződésének

vizsgálata is (Kawasaki és munkatársai 2002, Hagiwara és munkatársai 2007).

A szénstressz hatásait sülylesztett tenyészetekben tanulmányoztuk. A kísérletekhez glükóz szénforrást is tartalmazó komplex (YGL) táplevesben felnövesztett gomba micéliumot használtunk. A micéliumot Barratt-féle minimál táplevesbe szuszpendáltuk fel és 37 °C-on 200 rpm-mel rázattuk tovább. A tápleves összetételét a kísérletektől függően módosítottuk. Az extracelluláris γ GT izolálásakor glükóz helyett laktózt tartalmazó táplevest használtunk. A γ GT képződésének tanulmányozásához és a mutáns törzsek vizsgálatához glükóz (szénforrás) mentes, illetve glükóz helyett laktózt tartalmazó tápleveseket alkalmaztunk, melyeket a kísérlettől függően kazein peptonnal, élesztőkivonattal, borjú szérum albuminnal (BSA), glicil-glicinnel (Gly-Gly), nátrium-glutamáttal (Na-Glu) vagy nátrium-glutaminnal (Na-Gln) egészítettünk ki. A glutation anyagcserében érintett gének transzkripciójának vizsgálatakor a tápleves szén- és/vagy nitrogénforrásként glükózt és NaNO_3 -ot, laktózt és NaNO_3 -ot, laktózt, élesztőkivonatot és NaNO_3 -ot, csak NaNO_3 -ot, élesztőkivonatot és NaNO_3 -ot, vagy csak glükózt tartalmazott.

Az intracelluláris és extracelluláris γ GT aktivitások mérése γ -glutamil-*p*-nitroanilid (γ GpN) mesterséges szubsztrát

segítségével, míg a proteináz aktivitásoké azokazein szubsztrát felhasználásával spektrofotometriás módszerrel történt (Tomarelli és munkatársai 1949, Emri és munkatársai 1997). A minták fehérjetartalmát Bradford-reagens felhasználásával határoztuk meg (Bradford 1976).

A sejtek reaktív részecske tartalmát diklórfluorescein diacetát segítségével fluorimetriásan detektáltuk (Halliwell és Gutteridge 2007). A micélium glutation (GSH) és oxidált glutation (GSSG) tartalmának méréséhez az Anderson (1985) által kidolgozott „rate assay” eljárást használtuk.

A liofilezett micéliumból az RNS-t TRISOL reagenssel (Invitrogen) izoláltuk a gyártó által javasolt protokoll alapján (Chomczynski 1993). Az RNS mintákat DNáz kezelést (Turbo DNA-free Kit; Life Technology) követően használtuk fel az RT-qPCR mérésekhez. Az RT-qPCR reakciókat QuantiTect™ SYBR® Green RT-qPCR kittel (Qiagen) végeztük el, a gyártó által megadott protokoll alapján. A relatív transzkripció mértékét az alábbi módszerrel számoltuk ki: $\Delta CP = CP_{\text{vizsgált gén}} - CP_{\text{referencia gén}}$, ahol ΔCP a relatív transzkripció és CP a PCR termék akkumulálódásához szükséges ciklusszám a vizsgált gén, illetve a referencia gén esetében.

Az extracelluláris γ GT tisztítására frakcionált $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -os kicsapást és DEAE-Sephadex anioncserés

kromatográfiát használtunk. A tisztított enzim aktivitásának hőmérsékletfüggését 25-75 °C tartományban, pH-függését pH 5-7 (kálium-foszfát puffer), pH 7-9 (Tris/HCl puffer) és pH 9-11 (Gly puffer) tartományokban teszteltük. Az enzim szubsztrátspecifitását Gln, GSH és GSSG, mint γ -glutamil donor, illetve Gly-Gly, ciszteinil-glicin (Cys-Gly), víz, hidroxil-amin és különféle aminosavak, mint γ -glutamil akceptor segítségével teszteltük. A reakció során képződő γ -Glu-Gly-Gly, illetve GSH azonosítása LC-ESI-MS/MS (High-performance liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry) módszerrel történt (Dr. Gonda Sándor és Dr. Kiss-Szikszai Attila; Debreceni Egyetem).

Az extracelluláris fehérjék 2D gélelektroforézisét Dr. Keserű Judit (Debreceni Egyetem) végezte el. A gélből kivágott minták azonosítása tripszines emésztést követően nanoHPLC-MS rendszer segítségével történt (Dr. Csősz Éva, Debreceni Egyetem).

3. Eredmények és értékelésük

3.1 A γ GT-t kódoló gén azonosítása

Az *A. nidulans* genomjában két, potenciálisan γ GT-t kódoló gén található (Bello és Epstein 2013). A két gén közül a *ggtA* (AN10444) felelős a sejtekben mért nagy intra- és extracelluláris γ GT aktivitásokért. Erre utaltak az alábbiak:

- A *ggtA* gén deléciója kimutatási határ alá csökkentette a tenyészetek γ GT aktivitását.

- A komplementált törzsekben a γ GT aktivitások közel megegyeztek a kontroll törzsben mért értékekkel.

- A γ GT aktivitás változásai követték a *ggtA* gén relatív transzkripciójának változásait.

Tekintettel arra, hogy a $\Delta ggtA$ törzsekben gyakorlatilag nem tudtunk γ GT aktivitást kimutatni, így az is elmondható, hogy a *ggtA* lehet az egyetlen fiziológiai szempontból jelentős γ GT gén. Minthogy az AN5658 gén deléciója nem befolyásolta érdemben a γ GT aktivitásokat, így e gén terméke, biokémiai aktivitásának természete továbbra is kérdéses.

3.2 A GgtA szerepe az intracelluláris GSH anyagcserében

Eredeti várakozásainkkal ellentétben a *ggtA* hiánya érdemben nem befolyásolta a sejtek GSH tartalmát. A

szénstressz által indukált GSH tartalom csökkenés a *ΔggtA* törzsekben is ugyanolyan intenzitású volt, mint a kontroll törzsben és nem tapasztaltunk negatív korrelációt a *ggtA* gén relatív transzkripciója és a sejtek GSH tartalma között sem. Kísérleti adataink természetesen nem zárják ki annak lehetőségét, hogy a GgtA intracellulárisan bontja a GSH-t, csak felhívják a figyelmet arra, hogy a GgtA nem esszenciális a sejtek GSH tartalmának normál szinten tartásához, illetve az intracelluláris GSH gyors lebontásához. Megfigyeléseink összhangban vannak a szakirodalomban található adatokkal. A γ GT nem vesz részt a *S. cerevisiae* (Ganguli és munkatársai 2007), *A. thaliana* (Ohkama-Ohtsu és munkatársai 2008) és az emlős sejtek (Kumar és munkatársai 2012) citoszolikus GSH tartalmának csökkentésében. A *S. cerevisiae* és a *C. albicans* esetében (Kumar és munkatársai 2003; Ganguli és munkatársai 2007; Desai és munkatársai 2011; Kaur és munkatársai 2012) a DUG útvonal felelős az intracelluláris GSH lebontásáért. Az útvonalat alkotó három gén ortológjai az *A. nidulans* genomjában is megtalálhatóak. Az AN3459 a *dug1*, az AN1879 a *dug2*, míg az AN1092 a *dug3* ortológja. Kísérleteinkben az AN3459 és AN1092 gének relatív transzkripciója szoros negatív korrelációt mutatott a sejtek GSH tartalmával, míg az AN1879 relatív transzkripciója többé-

kevésbé konstansnak bizonyult. A transzkripció vizsgálatok alapján elképzelhető, hogy az *A. nidulans* esetében is a DUG útvonal biztosítja a sejtekben a GSH lebontását. Ezen hipotézis alátámasztására azonban további - pl. az érintett génekben sérült törzsek vizsgálatán alapuló - kísérletek szükségesek.

3.3 A GgtA extracelluláris lokalizációja

Vizsgálataink alapján a *ggtA* indukciója együtt járt az enzim extracelluláris térben való megjelenésével. Az *A. nidulans* esetében az enzim extracelluláris megjelenése azért érdekes, mert a *ggtA* gén nem tartalmaz klasszikus, a SignalP 4.1 programmal (Petersen és munkatársai 2011) kimutatható szignálszekvenciát, noha a szignálszekvencia megléte sok ortológ gén esetében azonosítható. Szignálszekvencia hiányában felmerül annak lehetősége is, hogy az enzim alapvetően csak intracellulárisan van jelen a sejtekben és szénéhezéskor a sejtek autolízise (szétesése) következtében kerül csak a tápközegbe. Ennek ellentmond azonban, hogy a GgtA termelés laktóz szénforrás esetében is indukálódik és a fehérje ilyenkor is megjelenik az extracelluláris térben, noha laktóz szénforráson az *A. nidulans* tenyészetek jól növekedtek és autolízis nem volt megfigyelhető. Ez utóbbit az is alátámasztja, hogy a fermentléből azonosított 6 fehérje (CelB,

CatB, GelA, AbnC, PepJ, SodA) mindegyike ismert szekretált fehérje volt (Holdom és munkatársai 1996; Emri és munkatársai 2009; Saykhedkar és munkatársai 2012).

Érdemes megjegyezni, hogy az *A. nidulans* több ismert, extracellulárisan (is) jelenlévő fehérjéje esetében sem lehet klasszikus szignál szekvenciát kimutatni. Ilyen fehérje a ChiB kitináz és a SodA szuperoxid dizmutáz is (Holdom és munkatársai 1996; Erdei és munkatársai 2008; Saykhedkar és munkatársai 2012; Szilágyi és munkatársai 2012). Azaz, a szignálszekvencia (kimutatásának) hiánya nem feltétlenül jelenti azt, hogy a fehérje biztosan nem szekretálódik. Vizsgálataink alapján ugyanakkor a *ggtA* gén - a *chiB* és *sodA* génekkel ellentétben - rendelkezik egy „rejtett”, az N-terminálistól mintegy 50 aminosavra lévő szignálszekvenciával. Hasonló szignálszekvenciát találtunk az *A. oryzae ggtA* ortológ AO090023000537 génjében is. Ezen szokatlan szignálszekvencia magyarázata lehet annotálási hiba (a gén elejét tévesen azonosították), de az is elképzelhető, hogy ez a speciális szignálszekvencia biztosítja az enzim kettős (intra- és extracelluláris) termelődését.

3.4 A GgtA lehetséges fiziológiai jelentősége

Az extracelluláris γ GT-ok nagy része γ -glutamil vegyületek lebontásában és C-, N-, illetve S-forrásként történő hasznosításában működik közre. A részlegesen tisztított GgtA esetében azonban sem jelentős hidroláz, sem jelentős GSSG bontó aktivitást nem tudtunk kimutatni. Elképzelhető, hogy az *A. nidulans* GgtA esetében az enzim feladata nem a γ -glutamil vegyületek bontása, hanem a γ -glutamil vegyületek szintézise lehet. Érdeemes megjegyezni, hogy a GgtA kis hidroláz aktivitása biotechnológiai szempontból előnyös lehet, hiszen kedvezően befolyásolhatja ezen enzim felhasználását különféle γ -glutamil származékok gyártásában (Suzuki és munkatársai 2007).

Eredményeink egy része arra utal, hogy a GgtA képződése több ponton kapcsolódik a tenyészetek nitrogén anyagcseréjéhez és ezen belül is az aminosavak és peptidek hasznosításához:

- Az intenzív GgtA termelést a szénstressz indukálta, azaz olyankor termelődött az enzim, amikor az alternatív energiaforrások (pl. peptidek) hasznosítása különösen fontos lehet a gomba számára. Nem meglepő módon ezen tenyészetek sokféle proteázt is termelnek (Szilágyi és munkatársai 2013).

- A GgtA képződését aminosavak, peptidek és fehérjék jelenléte is felerősítette. E jelenség az extracelluláris proteáz termelés esetében szintén megfigyelhető volt (Szilágyi és munkatársai 2010).
- A GgtA termelődését a MeaB fehérje jelenléte jelentősen befolyásolta. A MeaB egy bZIP típusú transzkripció faktor, amely a nitrogén katabolit represszió szabályozásában működik közre (Wong és munkatársai 2007). Hiánya nem csak a GgtA, de az extracelluláris proteázok képződésére is hatással volt (Szilágyi és munkatársai 2010).
- A *ggtA* delécióna csökkentette a tenyészetek proteáz termelését és ezzel összefüggésben fékezte a tenyészetek növekedését laktóz szénforráson kazein pepton jelenlétében, illetve gátolta a kazein pepton RS termelődést csökkentő hatását.
- A *ggtA* delécióna gátolta a kleisztotéciumok érését. E megfigyelés szintén köthető a nitrogén anyagcseréhez, ugyanis az aminosavak jelenléte serkenti (Han és munkatársai 2001), míg az extracelluláris proteázok hiánya fékezi a kleisztotéciumok kialakulását (Emri Tamás szóbeli közlése, DE-TTK, Biotechnológiai és Mikrobiológiai Tanszék).

A fentiek alapján feltételezzük, hogy a GgtA γ -glutamil vegyületek szintézisével segíti a tenyészetek peptid/aminosav

hasznosítását. A γ -glutamil vegyületek képződését a szénéhező tenyészetek lúgos - a GgtA pH optimumához közeli - pH-ja és az extracelluláris fehérjék és proteázok jelenléte miatti nagy aminosav/peptid (azaz γ -glutamil akceptor) koncentráció is segítheti (Emri és munkatársai 2004, 2008; Suzuki és munkatársai 2007). A γ -glutamil vegyületek képződése több ok miatt is hasznos lehet. Egyrészt a γ -glutamil vegyületek szabályozó feladatokat láthatnak el és végső soron a tenyészetek proteáz termelését befolyásolják a szubsztrát jelenlétének függvényében. A γ -glutamil vegyületek szabályozó szerepét Viña és munkatársai (1985) is leírták már. Vizsgálataikban azt tapasztalták, hogy a γ GT által termelt γ -glutamil-aminosavak serkentették a patkányok emlősejtjeinek aminosav felvételét. A γ -glutamil-aminosavak ugyanakkor számos előnyös tulajdonsággal rendelkeznek. A γ -glutamiláció növelheti oldékonyságukat (pl. a γ -glutamil-Cys 1000x jobban oldódik vizes közegben, mint maga a Cys; Hara és munkatársai 1992) és befolyásolhatja stabilitásukat is (pl. a γ -glutamil-Gln sokkal kevésbé hajlamos piroglutamát képzésére, mint a Gln; Suzuki és munkatársai 2007). Az említett példák is szemléltetik, hogy megfelelő körülmények között a γ -glutamil vegyületek képzése és az aminosavak, peptidek γ -glutamil

vegyületek formájában történő felvétele előnyös lehet a gomba számára. A γ -glutamil származékok ráadásul a fent említett előnyös tulajdonságaikat nagy proteáz/peptidáz aktivitás mellett is megőrzik, ugyanis a γ -glutamil csoport jelenléte védelmet biztosít ezen hidrolázokkal szemben (Hara és munkatársai 1992). Természetesen a fenti hipotézis tesztelése további vizsgálatokat igényel.

4. Összefoglalás

A szénstressz, azaz a szénforrás éhezés és a szénforrás limitáció az egyik leggyakoribb stresszhelyzet a természetben és ipari körülmények között egyaránt. Vizsgálataim középpontjában az *A. nidulans*, mint modell organizmus szénéhező, illetve szénforrás limitált tenyészetének tanulmányozása állt. E tenyészetek egyik jellegzetes tulajdonsága, hogy a hifák GSH tartalma folyamatosan csökken és néhány napon belül már a kiindulási érték 10 %-át sem éri el (Emri és munkatársai 2004, 2008). Hasonló jelenséget korábban a *P. chrysogenum* szénéhező tenyészeiben is megfigyeltek (Sámi és munkatársai 2001). A GSH tartalom csökkenése együtt járt a sejtek RS tartalmának emelkedésével és az oxidatív stressz által is szabályozott folyamatok (többek között az apoptózis és a szekunder anyagcsere) indukálódásával (Emri és munkatársai 2004, 2008). Minthogy a szénéhező tenyészetekben a γ GT termelés is indukálódik és a γ GT-t sokáig a legfontosabb GSH lebontó enzimnek tartották (Pócsi és munkatársai 2004), úgy gondoltuk, hogy a két jelenség (GSH tartalom csökkenés és a γ GT indukció) között ok okozati kapcsolat lehet. Vizsgálataim középpontjában az *A.*

nidulans γ GT-ának megismerése állt. Legfontosabb eredményeim az alábbiak:

- 1) A *ggtA* gén deléciója a kimutatási érték alá csökkentette a tenyészetek γ GT aktivitását, ami arra utal, hogy - legalább is az általunk vizsgált körülmények között - az AN10444 gén által kódol GgtA az egyetlen olyan fehérje, amely jelentős γ GT aktivitással rendelkezett.
- 2) A tenyészetek relatív *ggtA* transzkripció és specifikus γ GT aktivitás változásai alapján elmondható, hogy a szénéhezés mellett a szénforrás limitáció is indukálta a GgtA termelést. Az indukció mértéke peptidek adagolásával növelhető volt, de csak aktív *meaB* gén jelenlétében. E tekintetben a GgtA termelés hasonló volt az extracelluláris proteáz termeléshez.
- 3) A γ GT aktivitás nem csak a hifákból, de a fermentléből is jól detektálható volt. Noha a *ggtA* gén klasszikus szignál szekvenciát nem kódol, az enzim extracelluláris térben való megjelenése - nagy valószínűséggel - aktív szekréciónak és nem a sejtek autolitikus szétesésének volt a következménye.
- 4) Az extracelluláris térből frakcionált ammónium-szulfátos kicsapás és DEAE-Sephadex anioncserélő kromatográfia segítségével részlegesen kitisztított enzim pH optimuma pH 8,0-nak, hőmérséklet optimuma 45 °C-nak adódott. Az enzim

Michaelis-Menten kinetikát mutatott a γ GpNA szubsztrát esetében ($K_m = 0,2 \text{ mM}$) és aktivitása NaCl jelenlétében nem nőtt, hanem csökkent. A gyengén lúgos pH optimum arra utal, hogy az enzim a szénéhező tenyészetek gyengén lúgos fermentlevében is jól működik.

5) A tisztított enzim jelentős transzpeptidáz, de minimális hidroláz aktivitással rendelkezett. A Gly-Gly mellett a legjobb γ -glutamil akzeptornak a Glu bizonyult, míg a γ GpNA mellett a Gln-t és a GSH-t (kisebb mértékben a GSSG-t) is fel tudta használni, mint γ -glutamil donort.

6) A $\Delta ggtA$ törzzsel végzett vizsgálatok alapján a GgtA nem szükséges a sejtek GSH tartalmának csökkenéséhez szénstressz alatt. A GSH intracelluláris lebontásáért - feltételezhetően - inkább az elsőként a *S. cerevisiae*-ben leírt DUG útvonal (Kaur és munkatársai 2012; Kumar és munkatársai 2003) lehet felelős.

7) A GgtA és az extracelluláris proteáz termelésben megfigyelt hasonlóságok, a $\Delta ggtA$ törzs fenotípusa, valamint a GgtA gyenge hidroláz aktivitása alapján úgy gondoljuk, hogy az enzim elsődleges feladata nem a γ -glutamil vegyületek (beleértve a GSH-t és a GSSG-t is) lebontása, hanem ellenkezőleg a γ -glutamil vegyületek szintézise lehet. A

dolgozatban bemutatott hipotézisünk szerint a γ -glutamil vegyületek képződése a szénéhező és szénforrás limitált tenyészetek aminosav és peptid hasznosítását segíthetik elő. E hipotézis alátámasztása azonban még további vizsgálatokat igényel.

5. Tézisek

- 1) Az *A. nidulans* AN10444 génje egy γ GT aktivitású enzimet (GgtA) kódol. Ez az enzim felelős a tenyészetekben szénstressz alatt mért nagy intra- és extracelluláris γ GT aktivitásért.
- 2) A GgtA enzim képződését a szénstressz indukálja. Az indukciót aminosavak és peptidek jelenléte felerősíti, de csak aktív *meaB* gén jelenlétében.
- 3) A GgtA nem szükséges a sejtek GSH tartalmának szénstressz alatt bekövetkező csökkenéséhez.
- 4) A *ggtA* gén deléciója hatással van az extracelluláris peptidek hasznosítására és befolyásolja a tenyészetek ivaros szaporodását.
- 5) Az extracelluláris térből izolált enzim lúgos pH optimummal rendelkezik és hidroláz aktivitása elhanyagolható transzpeptidáz aktivitásához viszonyítva.
- 6) Az AN3459 (*dug1*) és AN1092 (*dug3*) gének relatív transzkripciója szoros negatív korrelációt mutat a sejtek GSH tartalmával, ami alapján elképzelhető, hogy az *A. nidulans* esetében is a DUG útvonal biztosítja a sejtekben a GSH lebontását.
- 7) Az AN5658 gén által kódolt fehérje - szénstressz alatt - nem befolyásolja érdemben a tenyészetek γ GT aktivitását.

6. Köszönetnyilvánítás

Szeretném köszönetemet kifejezni témavezetőmnek Dr. Emri Tamás egyetemi docensnek, lelkes témavezetéséért, önzetlen segítségnyújtásáért, szaktudásának továbbadásáért. Köszönettel tartozom Prof. Dr. Pócsi István tanszékvezető egyetemi tanárnak, aki lehetővé tette és értékes tanácsaival mindvégig támogatta munkámat a Debreceni Egyetem, TTK, Biotechnológiai és Mikrobiológiai Tanszékén.

Köszönettel tartozom Dr. Keserű Juditnak (Debreceni Egyetem) a 2D PAGE, Dr. Csősz Évának (Debreceni Egyetem) a nanoHPLC-MS vizsgálatok, valamint Dr. Gonda Sándornak (Debreceni Egyetem) és Dr. Kiss-Szikszai Attilának (Debreceni Egyetem) az LC-ESI-MS/MS vizsgálatok kivitelezéséért. Köszönet illeti Prof. Dr. Jae-Hyuk Yut és Dr. Nak-Yung Kwont (University of Wisconsin-Madison, Amerikai Egyesült Államok), hogy az általuk készített deléciós és komplementált törzseket a rendelkezésemre bocsátották.

Szeretném megköszönni Hajdu Márton biológia BSc szakos hallgató lelkiismeretes munkáját, továbbá a Biotechnológiai és Mikrobiológiai Tanszék minden egyes dolgozójának, PhD hallgatójának az odaadó segítséget, valamint azt, hogy munkámat kellemes légkörben, barátok közt végezhettem.

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

A dolgozat a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal (K100464, K112181), valamint a TÁMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0045 projekt támogatásával készült.

7. Introduction and objectives

Carbon stress, including both carbon starvation (when the quantity and/or quality of the carbon source does not allow growth) and carbon limitation (when the quantity and/or quality of the carbon source allows only slow growth) is among the most common stresses in Nature (Winderickx *et al.* 2003, McArthur 2006). Studying the physiology of carbon stress response helps us to understand how microbes adapt to their continuously changing environment and provides useful data to elucidate the virulence of pathogen species (Dagenais and Keller 2009), the production of mycotoxins (Jiao *et al.* 2008, Bouras and Strelkov 2010) and the behavior of industrial strains during fermentation (Glazer and Nikaido 2007). The physiology of carbon stressed cultures has been under investigation for a long time at the Department of Biotechnology and Microbiology (University of Debrecen) (Pusztahelyi *et al.* 1997, Sámi *et al.* 2001, Emri *et al.* 2008, Szilágyi *et al.* 2013). One of the interesting observations to come from these studies is that carbon starvation induces γ -glutamyl transpeptidase (γ GT) formation both in *Penicillium chrysogenum* and *Aspergillus nidulans* which is accompanied with the bulk degradation of intracellular glutathione (GSH)

and accumulation of reactive oxygen forms (ROS) (Sámi *et al.* 2001, Emri *et al.* 2004). Since γ GT is regarded as the key enzyme of GSH degradation (Penninckx and Elskens 1993), it is assumed that cells induce their γ GT activity under carbon stress to utilize their GSH content as a carbon source which - after depletion of GSH pools - leads to oxidative stress. However, recent developments in this field caution us: γ GT is not involved in the degradation of (cytosolic) GSH in many species (Kumar *et al.* 2003, Ohkama-Ohtsu *et al.* 2008, Kumar *et al.* 2012).

In this study we aimed to study the γ GT of *A. nidulans* as a model organism and elucidate its physiological function in carbon stressed cultures. We also aimed to identify genes/enzymes responsible for GSH degradation and understand the role of γ GT in it. The following tasks were planned:

- 1) Identification of genes responsible for γ GT activity. Collecting putative γ GT genes from the *Aspergillus* Genome Database (www.aspgd.org) and studying the γ GT activity of the appropriate deletion strains.
- 2) Determination of factors affecting γ GT production. Studying the effects of carbon starvation and carbon limitation on the

γ GT activity of cultures as well as on the transcription of putative γ GT genes in wild type strains and strains harboring inactive *meaB* (Wong *et al.* 2007) or *creA* (Shroff *et al.* 1997) genes.

3) Demonstrating the active secretion of γ GT. Sequence analysis of putative and known γ GT genes from *Aspergillus* species to find potential signal sequences. Testing the fermentation broth for γ GT activity in carbon stressed *A. nidulans* cultures. Studying the secretome of *A. nidulans*.

4) Characterization of purified γ GT. Isolation of γ GT from the fermentation broth. Determination of its pH and temperature optima as well as studying its substrate specificity.

5) Elucidating the physiological role of γ GT. Comparison of growth, protease and reactive species (RS) production, GSH content as well as conidia and cleistothecia formation of control and γ GT null mutant strains.

8. Materials and methods

The *A. nidulans* strains presented in Table 1 were used in these studies.

Strains	Genotype
rJMP1.59	<i>pyrG89; pyroA4; veA⁺</i>
tNJ190-1	<i>pyrG89, ΔAN10444::Aspergillus fumigatus pyrG⁺, pyroA4, veA⁺</i>
tNJ190-2	<i>pyrG89, ΔAN10444::A. fumigatus pyrG⁺, pyroA4, veA⁺</i>
tNJ190-3	<i>pyrG89, ΔAN10444::A. fumigatus pyrG⁺, pyroA4, veA⁺</i>
tNJ188-1	<i>pyrG89, ΔAN5658::A. fumigatus pyrG⁺, pyroA4, veA⁺</i>
tNJ188-2	<i>pyrG89, ΔAN5658::A. fumigatus pyrG⁺, pyroA4, veA⁺</i>
tNJ188-3	<i>pyrG89, ΔAN5658::A. fumigatus pyrG⁺, pyroA4, veA⁺</i>
tNJ151-1	<i>PyrG89, ΔAN10444::A. fumigatus pyrG⁺, 3/4pyroA4::AN10444:pyroA⁺, veA⁺</i>
tNJ151-2	<i>pyrG89, ΔAN10444::A. fumigatus pyrG⁺, 3/4pyroA4::AN10444:pyroA⁺, veA⁺</i>
tNJ189-1	<i>pyrG89, ΔAN5658::A. fumigatus pyrG⁺, 3/4pyroA4::AN5658:pyroA⁺, veA⁺</i>
tNJ189-2	<i>pyrG89, ΔAN5658::A. fumigatus pyrG⁺, 3/4pyroA4::AN5658:pyroA⁺, veA⁺</i>
tNJ36	<i>pyrG89, pyrG89::A. fumigatus pyrG⁺, pyroA4, veA⁺</i>
JMK1	<i>pabaA1, riboB, yA1, ΔcreA, veA1</i>
FGSC A24	<i>sC12, veA1</i>
FGSC A26	<i>biA1, veA1</i>
FGSC A41	<i>biA1, sB3, veA1</i>
FGSC A451	<i>pabaA1, meaB6, cnxH3, sC12, veA1</i>
FGSC A553	<i>biA1, cnxH3, veA1</i>

Table 1

All strains were maintained on minimal nitrate agar plates (Barratt *et al.* 1965). The same plates were also used to study conidia and cleistothecia formations (Kawasaki *et al.* 2002, Hagiwara *et al.* 2007).

Physiology of carbon stressed cultures was investigated in submerged cultures using mycelial mass previously grown in YGL broth. Mycelia were suspended in Barratt's minimal nitrate broth and were cultivated at 37 °C on 200 rpm. The type/amount of carbon and nitrogen sources depended on the experiments: for isolation of extracellular γ GT, media contained lactose instead of glucose. To study the formation of γ GT and to test the properties of deletion strains either carbon source-free (carbohydrate-free) or lactose containing media were used which were variously supplemented – depending on the experiments – with casein peptone, yeast extract, bovine serum albumin (BSA), glycyl-glycine (Gly-Gly), Na-Glu and Na-Gln. For investigating the transcription of genes potentially involved in GSH metabolism media contained the following carbon and nitrogen sources: glucose and NaNO₃; lactose and NaNO₃; lactose; yeast extract and NaNO₃; NaNO₃ (without any carbon source); yeast extract and NaNO₃; glucose (without any nitrogen source).

The γ GT and proteinase activities were detected photometrically using γ -glutamyl-*p*-nitroanilide (γ GpN) and azocasein artificial substrates, respectively (Tomarelli *et al.* 1949, Emri *et al.* 1997). The protein content of the samples was determined with Bradford's reagent (Bradford 1976).

The reactive species content of cells was measured fluorimetrically with dichlorofluorescein diacetate (Halliwell and Gutteridge 2007). The intracellular GSH and oxidized glutathione (GSSG) concentrations were detected with the “rate assay” of Anderson (1985).

Total RNA was isolated from lyophilized mycelia with TRISOL reagent (Invitrogen) according to Chomczynski (1993). Prior RT-qPCR, RNA samples were DNase treated (Turbo DNA-free Kit; Life Technology). The QuantiTect™ SYBR® Green RT-qPCR kit (Qiagen) was used according to the manufacturer’s protocol to detect relative transcription of selected genes. Relative transcription was characterized with the ΔCP value. $\Delta CP = CP_{\text{studied gene}} - CP_{\text{reference gene}}$, where CP stands for RT-qPCR cycle numbers of crossing points.

Extracellular γ GT was purified using fractionated $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ precipitation and DEAE-Sephadex anion exchange chromatography. The temperature and pH dependence of the enzyme activity were studied in the 25-75 °C temperature range and in the pH 5-7 (K-phosphate buffer), pH 7-9 (Tris/HCl buffer) and pH 9-11 (Gly buffer) pH ranges, respectively. The substrate specificity of the purified enzyme was tested with glutamine (Gln), GSH and glutathione disulfide (GSSG), as the γ -glutamyl donor, and Gly-Gly,

cysteinyl-glycine (Cys-Gly), water, hydroxylamine and various amino acids as γ -glutamyl acceptors. The γ -Glu-Gly-Gly and GSH produced were identified with LC-ESI-MS/MS (Dr. Sándor Gonda and Dr. Attila Kiss-Szikszai; University of Debrecen).

2D-gel electrophoresis of extracellular proteins was carried out by Dr. Judit Keserű (University of Debrecen) and proteins were identified after digestion with trypsin using nanoHPLC-MS (Dr. Éva Csősz; University of Debrecen).

9. Results and discussion

9.1 Identification of the γ GT gene

Two genes were found in the genome of *A. nidulans* which putatively encode γ GT enzymes (Bello and Epstein 2013). One of the two genes, *ggtA* (AN10444), was responsible for the high intra- and extracellular γ GT activities detected in carbon stressed cultures. This statement was demonstrated by the following:

- Deletion of the *ggtA* gene decreased γ GT activity below the detection limit in all cultures and strains tested.
- Complementation of deletion strains with active *ggtA* gene restored their γ GT activities.
- The relative transcription of the *ggtA* gene showed positive correlation with detected γ GT activities.

Since no detectable γ GT activity was measured in Δ *ggtA* strains, we can conclude that *ggtA* was the only physiologically relevant gene encoding γ GT in carbon stressed cultures. Deletion of the AN5658 gene, which also encodes a putative γ GT, did not influence γ GT activities, thus the biochemical nature of this protein remains unknown.

9.2 The role of GgtA in intracellular metabolism

Contrary to our original expectations the lack of *ggtA* did not alter the GSH content of cells. The reduction of GSH content induced by carbon stress was equally pronounced in the *ΔggtA* strains as it was with the control strains. Moreover, we did not experience any negative correlation between the relative transcription of *ggtA* and the GSH content of the cells. These results do not exclude the possibility that the GgtA participates in the degradation of intracellular GSH, but they clearly demonstrate that GgtA is not essential in the bulk degradation of intracellular GSH nor in the regulation of intracellular GSH content. Our observations are consistent with the existing data in the literature. γ GT does not play a role in the reduction of cytosolic GSH content in *Saccharomyces cerevisiae* (Ganguli *et al.* 2007), *Arabidopsis thaliana* (Ohkama-Ohtsu *et al.* 2008) or mammalian cells (Kumar *et al.* 2012). In the case of *S. cerevisiae* and *Candida albicans* (Kumar *et al.* 2003; Ganguli *et al.* 2007; Desai *et al.* 2011; Kaur *et al.* 2012) the DUG pathway is responsible for the degradation of cytosolic GSH. Orthologues of the three DUG pathway genes (AN3459, AN1879 and AN1092 as *dug1*, *dug2*, and *dug3*, respectively) can be found in the genome of *A.*

nidulans as well and a strong negative correlation was found between the relative transcription of the AN3459 and AN1092 genes and the GSH content of the cells in our experiments. (The relative transcription of the AN1879 gene was constant.) Based on these data, we assume that the DUG pathway is responsible for the intracellular degradation of GSH in *A. nidulans*. Further experiments - *e.g.* investigation of GSH metabolism in loss-of-function *dug* strains - are needed to secure support for this assumption.

9.3 Extracellular localization of GgtA

Induction of GgtA production was accompanied by increases in both intracellular and extracellular γ GT activities. The extracellular appearance of the enzyme is unexpected since the *ggtA* gene does not encode a signal sequence predictable by the SignalP 4.1 software (Petersen *et al.* 2011) (even though the presence of classical signal sequences is detectable in many orthologue genes). The lack of a signal sequence raises the question of whether this enzyme is a true intracellular enzyme which appears in the fermentation broth only after the autolysis (disintegration) of carbon starving cells. The observation that GgtA also appears in the fermentation broth of cultures growing on lactose (carbon limitation stress) does not support

this hypothesis: no autolysis was detected in carbon limitation stressed cultures. Moreover, we could detect only true extracellular enzymes (CelB, CatB, GelA, AbnC, PapJ, SodA; Holdom *et al.* 1996; Emri *et al.* 2009; Saykhedka *et al.* 2012) from the fermentation broth of these cultures. Beside *ggtA*, there are other, well-known genes in the genome of *A. nidulans* which encode extracellular proteins without any detectable signal sequence. The ChiB chitinase and the SodA superoxide dismutase are examples of these proteins (Holdom *et al.* 1996; Erdei *et al.* 2008; Saykhedkar *et al.* 2012; Szilágyi *et al.* 2012). This means that the lack of a signal sequence does not necessarily mean that the protein is not going to be secreted. On the other hand, our researches have shown that the *ggtA* gene - in contrast to the *chiB* and *sodA* genes - encodes a “hidden” signal sequence close to the N-terminal of the translated sequence. We could detect the presence a very similar “hidden” signal sequence in the *ggtA* orthologue, AO090023000537, gene of *Aspergillus oryzae*. Further studies are required to investigate whether the detection of these “hidden” signal sequences is a consequence of annotation errors or if it indicates the dual (intra- and extracellular) formation of GgtA.

9.4 The possible physiological significance of the GgtA

Most extracellular γ GTs are involved in the hydrolysis and utilization of various γ -glutamyl compounds as C-, N- and S- sources. The γ GT, partially purified from the extracellular space in this study (GgtA), showed only negligible hydrolase activity compared with its transpeptidase activity. This suggests that the main function of *A. nidulans* GgtA is not to hydrolyse but to synthesize γ -glutamyl compounds. It is worth noting that, owing to its low hydrolase activity, GgtA may be a useful enzyme for the production of various γ -glutamyl compounds (Suzuki *et al* 2007).

Several experimental data suggest that the biosynthesis of GgtA is connected to nitrogen metabolism (utilization of amino acids and peptides) in many ways.

- Intensive GgtA production was detected in carbon stressed cultures, which means that the enzyme was produced when the utilization of alternative energy sources (e.g. peptides) was at a high priority for the fungus. Not surprisingly these cultures also produce high protease activity (Szilágyi *et al.* 2013).
- Production of GgtA was highly enhanced by the presence of amino acids, peptides and proteins. This phenomenon was also

observed during the production of extracellular proteases (Szilágyi *et al.* 2010).

- Production of GgtA was strongly influenced by the presence of MeaB protein. MeaB is a bZIP type transcript factor which plays a significant role in controlling nitrogen catabolite repression (Wong *et al.* 2007). Lack of active MeaB significantly reduced the production of both GgtA and extracellular proteases (Szilágyi *et al.* 2010).

- Deletion of *ggtA* reduced protease production and decreased growth (on lactose) in the presence of casein peptone as well as decreasing the negative effect of casein peptone on RS formation.

- Deletion of *ggtA* also influenced the maturation of cleistothecia. This observation can also be linked to the nitrogen metabolism, since the presence of amino acids enhances (Han *et al.* 2001), while the lack of extracellular protease reduces, the formation of cleistothecia (T. Emri University of Debrecen, unpublished data).

On the basis of these data we suggest that GgtA contributes to the utilization of peptides and amino acids by synthesizing γ -glutamyl compounds. Formation of γ -glutamyl compounds is supported by the alkaline pH of carbon stressed cultures (which is close to the pH optima of GgtA) and by the

high amino acid and peptide concentrations (which are the consequence of high extracellular protease activity in these cultures) (Emri *et al.* 2004, 2008; Suzuki *et al.* 2007). The formation of γ -glutamyl compounds can be beneficial for several reasons. γ -Glutamyl compounds may have regulatory functions, for example in control of protease production. Viña *et al.* (1985) suggested that γ -glutamyl-amino acids produced by γ GT could stimulate the amino acid uptake of mammalian cells. γ -Glutamyl amino acids also have several advantageous properties. γ -Glutamylation can increase their solubility (*e.g.* γ -glutamyl-Cys is 1000x times more soluble in aqueous media than Cys itself; Hara *et al.* 1992). It can also affect their stability (*e.g.* γ -glutamyl-Gln is less likely to produce pyroglutamate than Gln itself; Suzuki *et al.* 2007). These examples suggest that under appropriate conditions the production of γ -glutamyl compounds and the uptake of amino acids and peptides in the form of γ -glutamyl compounds may be advantageous for the fungus. Of course, further research is needed to test this hypothesis.

10. Summary

Carbon stress (carbon starvation and carbon limitation) is one of the most common stresses both in Nature and in industry. Here, I studied carbon starved and carbon limited cultures of *A. nidulans* as a model organism. One of the characteristic features of these cultures is that the GSH content of hyphae continuously decreases until it reaches a very low (less than 10 % of original value) level in a few days (Emri *et al.* 2004, 2008). Similar changes have previously been observed with carbon starved *P. chrysogenum* cultures (Sámi *et al.* 2001). Depletion of the GSH pool is followed by the accumulation of RS and the induction of processes (*e.g.* apoptosis and secondary metabolism) which are regulated by oxidative stress (Emri *et al.* 2004, 2008). Since carbon starved cultures also produce high γ GT activities and this enzyme is thought to be involved in GSH degradation (Pócsi *et al.* 2004), we assumed a causal relationship between the two phenomenon (GSH depletion and induction of γ GT). I studied the properties, regulation and physiological significance of γ GT in *A. nidulans*. The main results of this study are the followings:

- 1) Deletion of the *ggtA* gene reduced γ GT activity to below the detection limit suggesting that - at least under the conditions

we studied - GgtA (encoded by the AN10444 gene) was the only protein which had significant γ GT activity.

2) Both carbon starvation and carbon limitation induced γ GT production according to the detected changes in the relative transcription of *ggtA* as well as in the specific γ GT activities of cultures. Addition of peptides to the fermentation broth enhanced this induction but only in the presence of active *meaB* gene. In this respect, GgtA formation was similar to extracellular protease production.

3) γ GT activities were detected both from hyphae and from the fermentation broth. Although the *ggtA* gene does not encode a regular signal sequence, the extracellular occurrence of this enzyme was - most likely - the consequence of active secretion and not passive liberation from autolysing cells.

4) GgtA was partially purified by fractionated ammonium-sulfate precipitation and DEAE-Sephadex anion exchange chromatography. The pH and temperature optima of the enzyme were pH 8.0 and 45 °C, respectively. It showed Michaelis-Menten kinetics with γ GpNA as the substrate (K_m = 0,2 mM) and its activity did not increase, but even decreased, in the presence of NaCl. The slightly alkaline pH optimum

indicates that the enzyme can be active in the fermentation broth of carbon starved cultures.

5) The partially purified enzyme had significant transpeptidase and negligible hydrolase activity. Besides GlyGly, Glu was the best γ -glutamyl acceptor and in addition to γ GpNA, Gln and GSH (as well as GSSG to a much lesser extent) functioned as γ -glutamyl donors in the GgtA catalyzed reaction.

6) Surprisingly, GgtA was not necessary for the bulk degradation of intracellular GSH under carbon stress according to the phenotype of the Δ ggtA strains. RT-qPCR experiments suggest that instead of GgtA, the orthologues of the *S. cerevisiae* DUG pathway (Kaur *et al.* 2012; Kumar *et al.* 2003) may be responsible for the regulation of intracellular GSH contents.

7) On the basis of the similarities between protease and γ GT production, the phenotype of Δ ggtA strain and the weak hydrolase activity of GgtA we assume that the main function of GgtA is not to degrade but synthesize γ -glutamyl compounds. This process may help the utilization of peptides and amino-acids in carbon stressed cultures. However, additional experiments are needed to verify this hypothesis.

11. Thesis

- 1) The AN10444 gene of *A. nidulans* encodes an enzyme (GgtA) possessing γ GT activity. This enzyme is responsible for the high intra- and extracellular γ GT activities detected in carbon stressed cultures.
- 2) GgtA is induced by carbon stress and this induction is enhanced by amino acids and peptides in strains possessing active *meaB* gene.
- 3) GgtA is not necessary for bulk degradation of intracellular GSH under carbon stress.
- 4) Deletion of *ggtA* influences the utilization of extracellular peptides as well as sexual development of the fungus.
- 5) The purified enzyme has an alkaline pH optimum and its hydrolase activity is negligible in comparison to its transpeptidase activity.
- 6) Relative transcription of AN3459 (*dug1*) and AN1092 (*dug3*) genes show strong negative correlation with the GSH content of the cells. The DUG pathway is therefore a good candidate to be responsible for intracellular GSH degradation.
- 7) The protein encoded by the AN5658 gene does not contribute to the γ GT activities of carbon stressed cultures.

12. Acknowledgements

I would like to express my thanks to my supervisor Dr. Tamás Emri for his valuable help and his unselfish assistance. I am grateful to Prof. Dr. István Pócsi, head of department, who supported my work and made it possible at the Department of Biotechnology and Microbiology (University of Debrecen).

I am also grateful to Dr. Judit Keserű (University of Debrecen) and Dr. Éva Csősz (University of Debrecen) for the 2D PAGE and nanoHPLC-MS identification of extracellular proteins, respectively as well as to Dr. Sándor Gonda (University of Debrecen) and Dr. Attila Kis-Szikszai (University of Debrecen) for the detection of tripeptides by the LC-ESI-MS/MS system. I would like to express my thanks to Prof. Dr. Jae-Hyuk Yu and Dr. Nak-Yung Kwon (University of Wisconsin-Madison, USA) for the deleted and complemented strains which were made at their laboratory.

I am grateful to Marton Hajdu BSc student for his valuable assistance in RT-qPCR experiments as well as to all the employees and PhD students of the Department of Biotechnology and Microbiology (University of Debrecen) for their help, advice and fellowship.

Last but not least, I would like to say thanks to my family and friends for their continuous support and inspiration.

This work was supported by the National Research, Development and Innovation Office - NKFIH K100464 and K112181. The project was also supported financially by TAMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0045 project, which is co-financed by the European Union and the European Social Fund.

13. Irodalomjegyzék / References

- Anderson, M.E. (1985) Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. *Methods Enzymol* 113, 548-555.
- Barratt, R.W., Johnson, G.B., Ogata, W.N. (1965) Wild-type and mutant stocks of *Aspergillus nidulans*. *Genetics* 52, 233-246.
- Bello, M.H., Morin, D., Epstein, L. (2013) γ -Glutamyltransferases (GGT) in *Colletotrichum graminicola*: mRNA and enzyme activity, and evidence that CgGGT1 allows glutathione utilization during nitrogen deficiency. *Fungal Genet Biol* 51, 72-83.
- Bouras, N. and Strelkov, S.E. (2010) Influence of carbon source on growth and mycotoxin production by isolates of *Pyrenophora tritici-repentis* from wheat. *Can J Microbiol* 56, 874-884.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.
- Chomczynski, P. (1993) A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques* 15, 532-537.
- Dagenais, T.R. and Keller, N.P. (2009) Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in Invasive Aspergillosis. *Clin Microbiol Rev* 22, 447-465.
- Desai, P.R., Thakur, A., Ganguli, D., Paul, S., Morschhäuser, J., Bachhawat, A.K. (2011) Glutathione utilization by *Candida*

albicans requires a functional glutathione degradation (DUG) pathway and OPT7, an unusual member of the oligopeptide transporter family. *J Biol Chem* 286, 41183-41194.

Emri, T., Pócsi, I., Szentirmai, A. (1997) Glutathione metabolism and protection against oxidative stress caused by peroxides in *Penicillium chrysogenum*. *Free Radical Biol Med* 23, 809-814.

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

Emri, T., Molnár, Zs., Pusztahelyi, T., Rosén, S. and Pócsi, I. (2004) Effect of vitamin E on the autolysis and sporulation of *Aspergillus nidulans*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 118, 337-348.

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

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

Erdei, E., Pusztahelyi, T., Miskei, M., Barna, T., Pócsi, I. (2008) Characterization and heterologous expression of an age-dependent fungal/bacterial type chitinase of *Aspergillus nidulans*. *Acta Microbiol Immunol Hung* 55, 351-361.

Ganguli, D., Kumar, C., Bachhawat, A.K. (2007) The alternative pathway of glutathione degradation is mediated by a

novel protein complex involving three new genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 175, 1137-1151.

Glazer A. N. and Nikaido H. (2007) Microbial Biotechnology. *Fundamentals of Applied Microbiology*, Second Edition.

Hagiwara, D., Asano, Y., Marui, J., Furukawa, K., Kanamaru, K., Kato, M., Abe, K., Kobayashi, T., Yamashino, T., Mizuno, T. (2007) The SskA and SrrA response regulators are implicated in oxidative stress responses of hyphae and asexual spores in the phosphorelay signaling network of *Aspergillus nidulans*. *Biosci Biotechnol Biochem* 71, 1003-1014.

Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. (2007) Free Radicals in Biology and Medicine, 4th edn. *Oxford University Press*, Oxford.

Han, K.H., Han, K.Y., Yu, J.H., Jahng, K.Y. and Chae, K.S. (2001) The *nsdD* gene encodes a putative GATA-type transcription factor necessary for sexual development of *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* 41, 299-309.

Hara, T., Yokoo, Y., Furukawa, T. (1992) Potential of γ -L-glutamyl-L-cystine and bis- γ -L-glutamyl-L-cystine as a cystine-containing peptide for parental nutrition. In: *Frontiers and New Horizons in Amino Acid Research*, Takai, K. (ed.), Elsevier, Amsterdam, pp. 607-611.

Holdom, M.D., Hay, R.J., Hamilton, A.J. (1996) The Cu,Zn superoxide dismutases of *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus terreus*: purification and biochemical comparison with the *Aspergillus fumigatus* Cu,Zn superoxide dismutase. *Infect Immun* 64, 3326-3332.

Jiao, F., Kawakami, A., Nakajima, T. (2008) Effects of different carbon sources on trichothecene production and Tri gene expression by *Fusarium graminearum* in liquid culture. *FEMS Microbiol Lett* 285, 212-219.

Kaur, H., Ganguli, D., Bachhawat, A.K. (2012) Glutathione degradation by the alternative pathway (DUG pathway) in *Saccharomyces cerevisiae* is initiated by (Dug2p-Dug3p)₂ complex, a novel glutamine amidotransferase (GATase) enzyme acting on glutathione. *J Biol Chem* 287, 8920-8931.

Kawasaki, L., Sánchez, O., Shiozaki, K., Aguirre, J. (2002) SakA MAP kinase is involved in stress signal transduction, sexual development and spore viability in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* 45, 1153-1163.

Kumar, A., Tikoo, S., Maity, S., Sengupta, S., Sengupta, S., Kaur, A., Bachhawat, A.K. (2012) Mammalian proapoptotic factor ChaC1 and its homologues function as γ -glutamyl cyclotransferases acting specifically on glutathione. *EMBO Rep* 13, 1095-1101.

Kumar, C., Sharma, R., Bachhawat, A.K. (2003) Utilization of glutathione as an exogenous sulfur source is independent of gamma-glutamyl transpeptidase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for an alternative glutathione degradation pathway. *FEMS Microbiol Lett* 219, 187-194.

McArthur J. V. (2006) Microbial Ecology: An Evolutionary Approach. *Academic Press*, 1st Edition.

Ohkama-Ohtsu, N., Oikawa, A., Zhao, P., Xiang, C., Saito, K., Oliver, D.J. (2008) A gamma-glutamyl transpeptidase-independent pathway of glutathione catabolism to glutamate via 5-oxoproline in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 148, 1603-1613.

Penninckx, M.J. and Elskens, M.T. (1993) Metabolism and functions of glutathione in micro-organisms. *Adv Microb Physiol* 34, 239-301.

Petersen, T.N., Brunak, S., von Heijne, G., Nielsen, H. (2011) SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat Methods* 8, 785-786.

Pócsi, I., Prade, R.A. and Penninckx, M.J. (2004) Glutathione, altruistic metabolite in fungi. *Adv Microb Physiol* 49, 1-76.

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

Sámi, L., Pusztahelyi, T., Emri, T., Varecza, Z., Fekete, A., Grallert, Á., Karányi, Zs., Kiss, L. and Pócsi, I. (2001) Autolysis and aging of *Penicillium chrysogenum* cultures under carbon starvation: chitinase production and antifungal effect of allosamidin. *J Gen Appl Microbiol* 47, 201-211.

Saykhedkar, S., Ray, A., Ayoubi-Canaan, P., Hartson, S.D., Prade, R., Mort, A.J. (2012) A time course analysis of the extracellular proteome of *Aspergillus nidulans* growing on sorghum stover. *Biotechnol Biofuels* 26, 5-52.

Shroff, R.A., O'Connor, S.M., Hynes, M.J., Lockington, R.A., Kelly, J.M. (1997) Null alleles of *creA*, the regulator of carbon catabolite repression in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Biol* 22, 28-38.

Suzuki, H., Yamada, C., Kato, K. (2007) Gamma-glutamyl compounds and their enzymatic production using bacterial gamma-glutamyltranspeptidase. *Amino Acids* 32, 333-340.

Szilágyi, M., Pócsi, I., Forgács, K., Emri, T. (2010) MeaB dependent nutrition sensing regulates autolysis in carbon starving *Aspergillus nidulans* cultures. *Indian J Microbiol* 50, 104-108.

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. *J Microbiol* 50, 849-854.

Szilágyi, M., Miskei, M., Karányi, Z., Lenkey, B., Pócsi, I., Emri, T. (2013) Transcriptome changes initiated by carbon starvation in *Aspergillus nidulans*. *Microbiology* 159, 176-190.

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

Viña, J.R., Puertes, I.R., Montoro, J.B., Saez, G.T., Viña, J. (1985) Gammaglutamyl-amino acids as signals for the hormonal regulation of amino acid uptake by the mammary gland of the lactating rat. *Biology of the Neonate* 48, 250-256.

Winderickx, J., Holsbeeks, I., Lagatie, O., Giots, F., Thevelein, J. & de Winde H. (2003) From feast to famine; adaptation to nutrient availability in yeast. In *Yeast stress responses*, pp. 305-387. Edited by S. Hohman and Mager, W.H. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Wong, K.H., Hynes, M.J., Todd, R.B., Davis, M.A. (2007) Transcriptional control of *nmrA* by the bZIP transcription factor MeaB reveals a new level of nitrogen regulation in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* 66, 534-551.



Nyilvántartási szám: DEENK/225/2016.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Spitzmüller Zsolt
Neptun kód: BY9HSG
Doktori Iskola: Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10046448

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

Időgen nyelvű tudományos közlemények hazai folyóiratban (1)

1. **Spitzmüller, Z.**, Hajdú, M., Pócsi, I., Emri, T.: Degradation of glutathione in *Aspergillus nidulans*: Short communication.
Acta Biol. Hung. 66 (2), 242-245, 2015. ISSN: 0236-5383.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/018.66.2015.2.10>
IF: 0.605

Időgen nyelvű tudományos közlemények külföldi folyóiratban (2)

2. **Spitzmüller, Z.**, Gonda, S., Kiss-Szikszai, A., Vasas, G., Pócsi, I., Emri, T.: Characterization of extracellular [gamma]-glutamyl transpeptidase from *Aspergillus nidulans*.
Mycoscience. [Epub], [4], 2016. ISSN: 1340-3540.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.myc.2016.07.002>
IF: 1.165 (2015)
3. **Spitzmüller, Z.**, Kwon, N. J., Szilágyi, M., Keserű, J., Tóth, V., Yu, J. H., Pócsi, I., Emri, T.: [Gamma]-Glutamyl transpeptidase (GgtA) of *Aspergillus nidulans* is not necessary for bulk degradation of glutathione.
Arch. Microbiol. 197 (2), 285-297, 2015. ISSN: 0302-8933.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00203-014-1057-0>
IF: 1.76

A közlő folyóiratok összesített impact faktora: 3,53

A közlő folyóiratok összesített impact faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 3,53

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudománymetriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor Lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2016.09.07.



Registry number: DEENK/225/2016.PL
Subject: PhD Publikációs Lista

Candidate: Zsolt Spitzmüller
Neptun ID: BY9HSG
Doctoral School: Pál Juhász-Nagy Doctoral School of Biology and Environmental Sciences
MTMT ID: 10046448

List of publications related to the dissertation

Foreign language scientific articles in Hungarian journals (1)

1. **Spitzmüller, Z.**, Hajdú, M., Pócsi, I., Emri, T.: Degradation of glutathione in *Aspergillus nidulans*: Short communication.
Acta Biol. Hung. 66 (2), 242-245, 2015. ISSN: 0236-5383.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/018.66.2015.2.10>
IF: 0.605

Foreign language scientific articles in international journals (2)

2. **Spitzmüller, Z.**, Gonda, S., Kiss-Szikszai, A., Vasas, G., Pócsi, I., Emri, T.: Characterization of extracellular [gamma]-glutamyl transpeptidase from *Aspergillus nidulans*.
Mycoscience. [Epub], [4], 2016. ISSN: 1340-3540.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.myc.2016.07.002>
IF: 1.165 (2015)
3. **Spitzmüller, Z.**, Kwon, N. J., Szilágyi, M., Keserü, J., Tóth, V., Yu, J. H., Pócsi, I., Emri, T.: [Gamma]-Glutamyl transpeptidase (GgtA) of *Aspergillus nidulans* is not necessary for bulk degradation of glutathione.
Arch. Microbiol. 197 (2), 285-297, 2015. ISSN: 0302-8933.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00203-014-1057-0>
IF: 1.76

Total IF of journals (all publications): 3,53

Total IF of journals (publications related to the dissertation): 3,53

The Candidate's publication data submitted to the iDEa Tudóstér have been validated by DEENK on the basis of Web of Science, Scopus and Journal Citation Report (Impact Factor) databases.

07 September, 2016