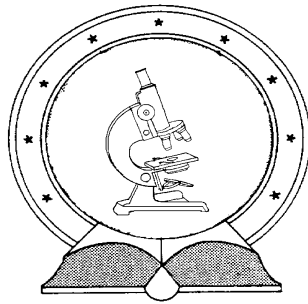


DE-TTK



1949

Az *Aspergillus nidulans* autolitikus enzimtermelésének vizsgálata

Egyetemi doktori (PhD) értekezés

Szilágyi-Bónizs Melinda

Témavezető: Dr. Emri Tamás egyetemi docens

DEBRECENI EGYETEM

Természettudományi Doktori Tanács

Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola

Debrecen, 2012

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

Debrecen, 2012.

Szilágyi-Bónizs Melinda

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

Debrecen, 2012.

Dr. Emri Tamás

Az *Aspergillus nidulans* autolitikus enzimtermelésének vizsgálata

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

Írta: Szilágyi-Bónizs Melinda okleveles biológus/biotechnológus

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

Témavezető: Dr. Emri Tamás

A doktori szigorlati bizottság:

elnök:	Prof. Dr. Borbély György	-----
tagok:	Dr. Szabó Judit	-----
	Dr. Manczinger László	-----

A doktori szigorlat időpontja: 2011. november 8.

Az értekezés bírálói:

Dr.	-----	-----
Dr.	-----	-----
Dr.	-----	-----

A bírálóbizottság:

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

Az értekezés védésének időpontja: 2012. -----

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	1
2. Irodalmi áttekintés	3
2.1 Az <i>Aspergillus</i> ok	3
2.2 Aszexuális sporuláció az <i>Aspergillus nidulans</i> fonalas gombában	4
2.3 Az <i>Aspergillus nidulans</i> autolízise	11
2.4 A β -glükánok és a β -glükánázok	14
2.5 A kitin és a kitinázok	18
2.6 Sejtfa fehérjék és proteinázok	19
3. Eredmények	23
3.1 Extracelluláris glükánázok vizsgálata az <i>Aspergillus nidulans</i> szénforrás éhezéssel indukált autolizáló tenyészeiben	23
3.1.1 Az <i>EngA</i> β -1,3-endoglükánáz tisztítása, azonosítása, jellemzése	23
3.1.2 Az <i>engA</i> autolízisben betöltött szerepének vizsgálata	25
3.1.3 A glükánáz termelés szabályozása az <i>Aspergillus nidulans</i> autolizáló tenyszeiben	28
3.2 Extracelluláris proteinázok vizsgálata az <i>Aspergillus nidulans</i> szénforrás éhezéssel indukált autolizáló tenyszeiben	29
3.2.1 A <i>PepJ</i> extracelluláris metalloproteináz tisztítása, azonosítása, jellemzése	29
3.2.2 A <i>PrtA</i> és <i>PepJ</i> proteinázok autolízisben betöltött szerepének vizsgálata	32
3.2.3 Az extracelluláris proteináz termelés szabályozásának vizsgálata az <i>Aspergillus nidulans</i> autolizáló tenyszeiben	33
3.2.4 A pH hatásának vizsgálata az extracelluláris proteináz termelésre	35
3.3 Az autolízis alatt termelődő extracelluláris enzimek a sejtfa lebontásán túlmutató jelentőségének vizsgálata	36
3.3.1 Az autolízis alatt termelődő extracelluláris enzimek antifungális hatásának vizsgálata	36
3.3.2 Az <i>EngA</i> és <i>ChiB</i> életképességre, növekedésre, konídiumképzésre és fajok közötti interakcióra gyakorolt hatásának vizsgálata	38
3.4 A szénéhezés hatására indukálódó és represszálódó gének azonosítása microarray vizsgálat segítségével	41
4. Eredmények megbeszélése	52
4.1 Extracelluláris glükánázok vizsgálata az <i>Aspergillus nidulans</i> szénforrás éhezéssel indukált autolizáló tenyszeiben	52
4.2 Extracelluláris proteinázok vizsgálata az <i>Aspergillus nidulans</i> szénforrás éhezéssel indukált autolizáló tenyszeiben	55
4.3 Az autolízis alatt termelődő extracelluláris enzimek a sejtfa lebontásán túlmutató jelentőségének vizsgálata	59
4.4 A szénéhezés hatására indukálódó és represszálódó gének azonosítása microarray vizsgálat segítségével	62
4.4.1 Változások a sejtfa homeosztázisban	62
4.4.2 Programozott sejtfa halál	65
4.4.3 Változások a szénhidrát, nitrogén és lipid anyagcserében	68
4.4.4. Hidrolitikus enzimek	69
4.4.5. A fehérjeszintézisben bekövetkező változások	71
4.4.6. A konidiogenezishez köthető változások	72
4.4.7. Redox folyamatok	73
4.4.8. Szekunder anyagcsere	74
5. Anyag és módszer	76

5.1 A vizsgált <i>Aspergillus nidulans</i> törzsek és tenyésztésük	76
5.1.1 Felületi tenyészetek	77
5.1.2 Rázatot tenyészetek	78
5.2 További gombatorzsek és tenyésztésük	79
5.3 Mintavétel	79
5.4 Életképesség mérés	80
5.5 Az antifungális hatás tesztelése	80
5.6 Enzimtisztítás és MALDI-TOF analízis	81
5.7 Poliakrilamid gélelektroforézis	82
5.8 Enzimaktivitás mérések	82
5.8.1 Az EngA β -1,3-endoglükánáz és PepJ proteináz pH függésének és pH-függő stabilitásának meghatározása	83
5.8.2 Az EngA β -1,3-endoglükánáz és PepJ proteináz hőmérsékletfüggésének és hőstabilitásának meghatározása	83
5.8.3 A PepJ EDTA-val való gátolhatóságának vizsgálata	84
5.9 A sejtek szuperoxid és peroxid tartalmának mérése	84
5.10 A tápközeg glükóz tartalmának mérése	84
5.11 Vékonyréteg kromatográfia	85
5.12 Transzkripció vizsgálatok	85
5.12.1 RNS izolálás, koncentráció meghatározás és denaturáló agaróz gélelektroforézis	85
5.12.2 Génexpresszó vizsgálata RT-PCR segítségével	86
5.12.3 Génexpresszió vizsgálata microarray technika segítségével	90
5.13 Az extracelluláris termelődést jelző szignálszekvenciák vizsgálata	92
5.14 Homológ fehérjék azonosítása	92
5.15 Statisztikai vizsgálatok	92
5.16 Felhasznált vegyszerek	92
6. Összefoglalás	93
7. Summary	98
8. Irodalomjegyzék	102
9. Függelék	119
10. Köszönetnyilvánítás	123
11. Tudományos közlemények jegyzéke	124

1. Bevezetés

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

A gombák akár a természetben, akár a fermentációs iparban gyakran szembesülnek az éhezés jelenségével, amely sejtdegradációhoz, sejthalálhoz és autolízishez vezethet. Ezen utóbbi egy olyan nagy hidroláz aktivitással kísért sejtpusztulási folyamat, amely magában foglalja a sejtfal lebomlását is (White és munkatársai 2002). Feltételezhető jelentőségük ellenére, az eddig azonosított, autolízis alatt termelődő enzimek száma igen csekély. Az *Aspergillus nidulans*, mint gyakran alkalmazott modellszervezet autolizáló tenyészetéből eddig csupán két, a kitin lebontásában közreműködő enzimet, a ChiB kitinázt és a NagA N-acetil- β -D-glükózaminidázt kódoló gének szénéhezés hatására bekövetkező indukcióját és a ChiB autolízisben betöltött központi jelentőségét igazolták (Pusztahelyi és munkatársai 2006; Pócsi és munkatársai 2009; Shin és munkatársai 2009). Hasonló a helyzet a proteínáz aktivitású enzimek terén, a vizsgált – PrtA (alkalikus szerin proteínáz; Katz és munkatársai 1994) és PrtB (savas aszpartát proteínáz; vanKuyk és munkatársai 2000) – proteínázokat kódoló gének közül a *prtA* szénéhezés alatti aktivációját mutatták ki, így feltételezhető, hogy az autolízis jelenségét kísért magas extracelluláris proteínáz aktivitás egy részéért e gén terméke tehető felelőssé (Emri és munkatársai 2008). Kiemelném ugyanakkor, hogy eddig egyetlen, az *A. nidulans* autolízisében szerepet játszó glükánázt sem azonosítottak. Az autolízisre vonatkozó hiányos ismereteinkre való tekintettel célul tűztük ki az *A. nidulans* szénéhezéssel indukált autolizáló tenészetében termelődő enzimek megismerését, valamint a

szénéhezésre adott transzkripciós szintű változások feltérképezését. Célkitűzéseink között az alábbi vizsgálatok szerepeltek:

1) Az extracelluláris glükánázok vizsgálata az *A. nidulans* szénforrás éhezéssel indukált autolizáló tenyészeiben: új extracelluláris glükánáz/glükánázok izolálása, azonosítása, részleges jellemzése; autolízisben betöltött jelentőségének megismerése; az autolízis alatt termelődő extracelluláris glükánázok szabályozásának felderítése.

2) Az extracelluláris proteinázok vizsgálata az *A. nidulans* szénforrás éhezéssel indukált autolizáló tenyészeiben: új extracelluláris proteináz/proteinázok izolálása, azonosítása, részleges jellemzése; az eddig ismert, autolízis alatt termelődő proteinázok autolízisben betöltött jelentőségének megismerése; szabályozásuk felderítése.

3) Az autolízis alatt termelődő extracelluláris enzimek a sejtfal lebontásán túlmutató jelentőségének megismerése: antifungális hatásuk vizsgálata, az életképességre, konídium termelőképeségre, növekedésre, valamint más fajokkal szemben mutatott interakcióra gyakorolt hatásuk megismerése.

4) A szénéhezés hatására indukciót vagy repressziót mutató gének azonosítása és ezen keresztül a szénéhezés, valamint az autolízis jelenségét kísérő fiziológiai változások alaposabb feltérképezése microarray vizsgálat segítségével.

2. Irodalmi áttekintés

2.1 Az *Aspergillus*ok

Az *Aspergillus*ok az *Ascomycota* törzs *Plectinomyces* osztályán belül az *Eurotiales* rend *Trichocomaceae* családjába sorolhatóak. Az *Aspergillus*ok nemzetsége több mint 200 fajt számlál, de az ismert fajok száma jelenleg is folyamatosan bővül. Széles körben elterjedtek és talán a környezetünkben leggyakrabban előforduló gombák közé tartoznak, megtalálhatóak a talajban, élelmiszereken, takarmányokon, szerves hulladékon, de találkozhatunk velük otthonainkban is (Gugnani 2003; Fleißner és Dersch 2010).

Számos *Aspergillus* faj rendelkezik kiemelkedő ipari jelentőséggel. Felhasználják őket enzimek (pl. amiláz, glükóz oxidáz, kataláz, pektináz, lipáz, proteináz, fitáz, xilanáz) (Fleißner és Dersch 2010), valamint primer (pl. citromsav, glükonsav) és szekunder metabolitok (pl. lovasztatin) termeltetésére (Ward és munkatársai 2005; Jaivel és Marimuthu 2010). Az élelmiszeriparban az *A. oryzae*, *A. sojae* és *A. tamari* fajok évezredek óta kiemelkedő szerepet töltenek be (Gugnani 2003), de *Aspergillus* fajok alkalmasak heterológ fehérjék (emberi laktoferrin, birka kimozin, növényekből származó édesítőszer: taumatinn, neokulin) előállítására is (Fleißner és Dersch 2010). Az *Aspergillus*okat a gyengén növénypatogén gombák között tartják számon, melyek szántóföldi és raktári kártevőkként is nagy termékvesztésért tehető felelőssé, de a legnagyobb aggodalom talán mikotoxin termelő képességükkel függ össze. Bár a rákkeltő aflatoxin termelésére csupán néhány faj képes (pl. az *A. flavus*, *A. parasiticus*), a szintén rákkeltő aflatoxin intermedier szterigmatocisztint további fajok termelhetik (pl. az *A. nidulans*, *A. versicolor*, *A. rugulosus*). Emellett a vesekárosító hatású ochratoxin előállítására képes pl. az *A. ochraceus*, *A. carbonarius*, és az *A. niger* (Cotty és munkatársai 1994; Kelkar és munkatársai 1997; Gugnani 2003). Az *Aspergillus*ok között több humánpatogén faj is ismert. A leggyakoribb kórokozó az *A. fumigatus*, amit az *A. flavus* és az *A. niger* követ. Számos opportunistá fertőzést okoznak, a szem és a fül fertőzései mellett komoly légzőszervrendszeri kórképek, allergiás bronchopulmonális aszpergillozis, aszpergilloma és invazív aszpergillozis

kialakulásáért is felelősek. Az invazív *Aspergillus* fertőzések gyakorisága az utóbbi években növekedést mutat, ami az agresszív kemoterápiára és immunszuppresszív kezelésekre szoruló betegek egyre nagyobb számával állhat összefüggésben (Gugnani 2003).

Az autolízis megismerését célzó vizsgálatainkhoz több okból is az *A. nidulans* fonalas gombára esett a választásunk:

- 1) Az *A. nidulans* a molekuláris biológiai kutatások egyik gyakran alkalmazott modellszervezete, genomi szekvenciája ismert, tanulmányozását számos kidolgozott klasszikus és molekuláris genetikai módszer is segíti. Emellett számos adatbázis, génkönyvtár, vektor, illetve mutáns is rendelkezésre áll.
- 2) Az autolízis jelentős morfológiai változásokat idéz elő tenyészetében, így az autolízis folyamata szabad szemmel is nyomon követhető.
- 3) Az *A. nidulans* sok, gyakorlati és egészségügyi szempontból is kiemelkedő fontosságú mikroorganizmus (pl. *A. niger*, *A. oryzae*, *A. fumigatus*) közeli rokona (Gugnani 2003), így ezen organizmus megismerését célzó vizsgálataink hasznosak lehetnek mind a biotechnológiai vállalatok számára, mind a patogén fajokkal szembeni védekezést célzó eljárások kidolgozásánál.

2.2 Aszexuális sporuláció az *Aspergillus nidulans* fonalas gombában

Az *Aspergillus*ok aszexuális reprodukív ciklusa két részre osztható: a vegetatív növekedés fázisára és a fejlődési szakaszra. Bizonyos körülmények között (pl. levegőnek való kitettség, ozmotikus és tápanyag stressz) a növekedés egy meghatározott szakasza után néhány vegetatív sejt megáll a növekedésben és megkezdődik az aszexuális fejlődési szakasz (konidiogenezis), ami a konidiofórok kialakulását és a spóráképzést foglalja magába. A konidiofórok képzésének folyamata a megvastagodott falú lábsejt képződésével indul, majd a lábsejtből kialakul a nyél. Hozzávetőleg 6 órával az indukciót követően a nyél csúcsán egy globuláris struktúra, a vezikulum jön létre, amelyben a többszörös osztódás következtében létrejövő sejtmagok egyenletesen szétszóródnak a felszín alatt. Ezt követően bimbózással metulák képződnek. Miután egy-egy sejtmag belép a

metulákba, szeptum képződik, ami elválasztja a metulát a vezikulumtól. A metulák egy speciális osztódáson mennek keresztül, melynek eredményeképp kialakulnak a hosszú konídium láncolatokat létrehozó fialidok (1. ábra; Adams és munkatársai 1998; Etxebeste és munkatársai 2010). A konídiumok képződésük után a hosszútávú életképesség elérése érdekében egy érési folyamaton mennek keresztül, amelynek két fontos mozzanata a többrétegű sejtfal kialakulása (Sewall és munkatársai 1990a) és a trehalóz akkumulációja (Lingappa és munkatársai 1959; d'Enfert és munkatársai 1997; Ni és Yu 2007).



1. ábra A konidiofór kialakulása során megfigyelhető morfológiai változások. A: nyél, B: a vezikula kialakulása, C: a metulák megjelenése, D: a fialidok kialakulása, E: konidiofór konídiumokkal (Adams és munkatársai 1998).

A konidiofór képzésben a kulcslépést a *brlA* gén expressziója jelenti, ami egy, a C-terminálisán két C_2H_2 cink ujj motívumot tartalmazó transzkripciósi faktort kódol, és más, a konidiogenezisben szerepet játszó gének expressziójának indukálásáért felelős (2. ábra). A *brlA* génben mutáns törzsek ún. „bristle” fenotípust mutatnak: a konidiofór nyelére emlékeztető struktúrákat képeznek, amelyek akár 20-szor, 30-szor nagyobbak a normális konidiofóroknál és nem képesek vezikulák, metulák, fialidok és így konídiumok kialakítására. Számos gén promoter régiójában találtak BrlA kötőhelyet (5'-(C/A)(G/A)AGGG(G/A)-3'), ilyenek az *abaA*, *wetA*, valamint a hidrofobint kódoló *rodA* és a spórák pigmentációjáért felelős *yA* (Adams és munkatársai 1998; Yu 2010).

Az *abaA* gén szintén egy transzkripciósi faktort kódol, amely a fialidok fejlődésénél kezd expresszálni (Yu 2010). Nullmutánsára „abacus” fenotípus jellemző, ezek a mutánsok fialidok nélküli, konídium képzésre nem képes

érésében közreműködő gén indukálásáért felelős, amelyek a konídiumok falrétegeinek befejezéséért és/vagy összeillesztésük irányításáért felelősek. Nullmutánsára a „wet-white” fenotípus jellemző: színtelen konídiumokat képez, amelyek pár nap alatt teljesen autolizálnak, így kicsi cseppecskéket (wet) hagyva maguk után (Clutterbuck és munkatársai 1969). A *wetA* gén indukálásában - bár promotere BrlA kötőhelyet is tartalmaz - nem a BrlA, hanem az AbaA vesz részt (2. ábra; Yu 2010).

A *vosA* mRNS-e a szexuális és aszexuális spóráképzés alatt akkumulálódik, és egy olyan transzkripciósfaktort kódol, amely a spórákérésében szerepet játszó gének indukálása mellett a *brlA* negatív feedback regulációjában fontos (2. ábra). A *vosA* deléciója a spórákban a trehalóz hiányát okozza és a citoplazma gyors eltűnéséhez, a sejtorganellumok széteséséhez, a spórák hosszú-távú életképességének elvesztéséhez vezet, ráadásul a *vosA* mutáns spórák csökkent toleranciát mutatnak a hő és oxidatív stresszre. A VosA a metulákban és fialidokban expresszálódik, majd a konídiumok sejtmagjában lokalizálódik, de szintje csökken a konídiumok csírázása és a vegetatív növekedés alatt (Ni és Yu 2007).

Számos olyan gént azonosítottak, amelyek az aszexuális sporuláció *brlA*-n keresztüli indukálásában fontosak. A *fluG*-ben, vagy az *flbA-E* génekben okozott mutációk egyaránt „fluffy” fenotípus (a vegetatív hifák differenciálatlan tömege által nagy, gyapjú-szerű kolóniák képzése; Adams és munkatársai 1998) kialakulásához és a *brlA* gén alacsony expressziójához vezetnek (flb: fluffy with low *brlA* expression) (Lee és Adams 1994a; Wieser és munkatársai 1994; Wieser és Adams 1995).

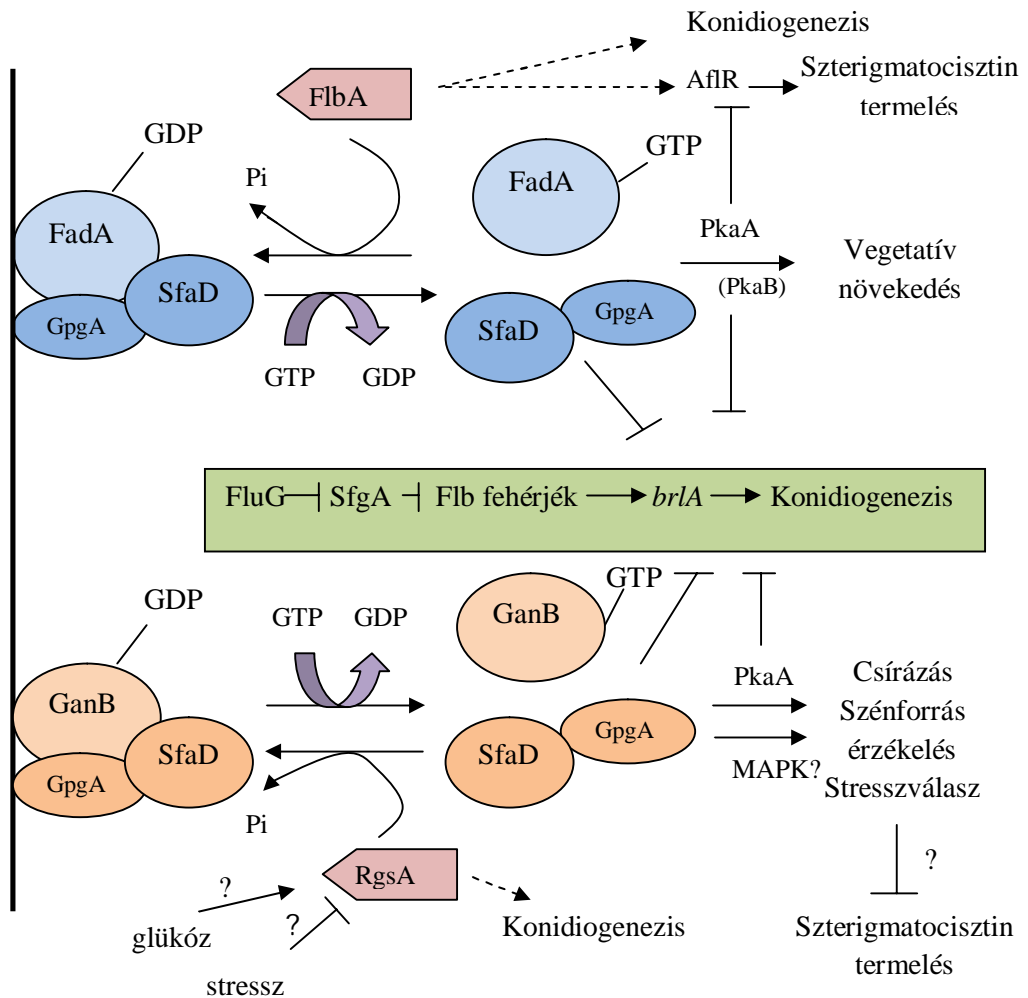
A *fluG* gén hiányában mind a konidiogenezis, mind a szterigmatocisztin szintézis zavart szenved (Lee és Adams 1994b; Hicks 1997). A FluG egy 96 kDa méretű fehérje, amelynek C-terminális fele egy glutamin szintetáz I (GSI) szerű domént tartalmaz (Lee és Adams 1994b). A *fluG* gén egészének, vagy C-terminális felének túlermelése konidiofórok képzését váltotta ki sülyesztett körülmények között – ahol normál esetben az aszexuális sporuláció gátolt. Emellett megfigyelték, hogy a *fluG* mutáns törzs képes konídiumok képzésére, ha vad típusú törzs mellett növesztik. A *fluG* mRNS és fehérje szintje viszonylag állandó szintet mutat az

életciklus során (Lee és Adams 1994b; d'Souza 2001). Valószínűsíthető, hogy a *fluG* egy extracelluláris, aszexuális sporulációt indukáló molekula konstitutív szintéziséhez szükséges, amely a glutaminnal, vagy a glutamáttal mutathat rokonságot (Adams és munkatársai 1998).

Az *sfgA* gén egy olyan 68 kDa nagyságú, 601 aminosavból álló fehérjét kódol, amely egy Gal4-típusú Zn(II)₂Cys₆ DNS-kötő motívummal rendelkezik az N terminálisán, ami arra utal, hogy az SfgA egy transzkripció faktor lehet. Az SfgA a gének egy olyan csoportját aktiválja, amelyek a konidiogenezis negatív kontrolljában vesznek részt. Az *sfgA* gén kiütése megszüntette a konidiogenezis és a szterigmatocisztin szintézis FluG igényét. Feltételezhető, hogy a korai vegetatív növekedés fázisában a FluG faktor szintje a sejtekben alacsony és az SfgA konidiogenezist represszáló hatása érvényesül. Amikor a FluG faktor akkumulációja elér egy bizonyos szintet, megszünteti a konidiogenezis SfgA-hoz kapcsolt represszióját. Tehát a FluG elsődleges szerepe a konidiogenezis során, hogy az SfgA represszív hatását megszüntesse (Seo és munkatársai 2006).

Az FlbB, FlbC és FlbD fehérjék egy leucin cipzárral, két C₂H₂ cink ujjal és egy eMyb-DNS kötő doménnal rendelkező transzkripció faktorok, amelyek a *brlA* indukálásában vesznek részt (Yu 2010). Az FlbC a *brlA*, *abaA* és *vosA* gének promoter régiójához képes kötődni és a konidiogenezis megfelelő indukálásához szükséges. Az FlbC mRNS szintje a vegetatív növekedés, a korai aszexuális és késői szexuális fejlődés során ér el magas szintet (Kwon és munkatársai 2010a). Az *flbD* transzkripciója a hifák növekedése és az aszexuális fejlődés korai fázisában figyelhető meg. Az FlbB részt vesz az *flbD* expressziójának pozitív regulációjában, majd az FlbB (feltételezhetően egy specifikusan aktivált formája) és az FlbD együttesen szükségesek a *brlA* indukálásához (Garzia és munkatársai 2010). Az *flbB* expressziója 48 órával az aszexuális fejlődés megkezdése után újra megindul, ami arra enged következtetni, hogy az FlbB ciklikus úton hat, egyfajta érzékelési funkcióval rendelkezik és a konidiogenezis megerősítésében lehet fontos (Etxebeste és munkatársai 2008). Az *flbE* egy 201 aminosavból álló polipeptidet kódol, melynek egyik funkciója feltételezhetően az lehet, hogy az FlbB megfelelő lokalizációját és funkcióját biztosítsa a hifacsúcsok, konkrétan a Spitzenkörper

(másnéven apikális test, a növekvő hifák csúcsában megtalálható struktúra, amely vezikula elosztó központként funkcionál; Virag és Harris 2006) közelében. Ezzel az FlbE közvetve részt vesz az *flbD* transzkripciójának szabályozásában (Garzia és munkatársai 2010). Ugyanakkor az FlbE-nek feltételezhetően az FlbB-től upstream is lehet szerepe (Kwon és munkatársai 2010b).



3. ábra Az aszexuális fejlődés és szterigmatocisztin termelés G protein-RGS protein által megvalósuló szabályozása *Aspergillus nidulans*ban (Yu 2006). Magyarázat a szövegben.

Az aszexuális sporuláció és a szterigmatocisztin szintézis szabályozásában heterotrimer G-protein útvonalak is részt vesznek az *A. nidulans*ban (3. ábra). A heterotrimer G-proteinek olyan α , β és γ alegységből álló fehérjék, amelyek a

membránhoz kötött G-proteinekhez kapcsolt receptorok által érzékelt jeleket továbbítják szabályozó fehérjék (effektorok) különböző csoportjai felé (Yu 2006).

Az első $G\alpha$ alegység, amit *A. nidulans*-ban tanulmányoztak a FadA volt. A domináns interferáló (d-) FadA^{G203R} mutáció csökkent vegetatív növekedést, hiperaktív aszexuális sporulációt és korai szterigmatocisztin termelést eredményezett (Yu és munkatársai 1996a; Hicks és munkatársai 1997). A FadA, az *A. nidulans*-ban jelenlévő egyetlen $G\beta$ és $G\gamma$ alegységgel, az SfaD és a GpgA (Seo és munkatársai 2005) fehérjékkel heterotrimer egységet képez, ahol az aktivált GTP-FadA ($G\alpha$) közvetíti a szignált, ami a vegetatív növekedés elősegítésében, valamint az aszexuális és szexuális fejlődés, illetve a toxin termelés gátlásában vesz részt (3. ábra; Yu 2006). A szterigmatocisztin termelésre a szterigmatocisztin szintézisben érintett gének aktiválásában szerepet betöltő AflR transzkripciós faktor és az *aflR* indukálásában fontos LaeA metiltranszferáz működésének gátlásán keresztül van hatással (Shwab és Keller 2008). A FadA közvetítette válasz továbbítása – legalábbis részben – a protein kináz A útvonalon keresztül történik (Shimizu és Keller 2001).

A FadA útvonal szabályozásában az FlbA RGS fehérje (**R**egulators of **G** protein signaling) tölt be központi szerepet, amely a FadA közvetített szignált valószínűsíthetően a FadA GTPáz aktivitásának fokozása révén mérsékli (Yu és munkatársai 1996a; 1999; Yu 2006). Mivel sem a FadA, sem az SfaD hiánya nem tudta megkerülni az aszexuális fejlődés FluG igényét, valószínűsíthető, hogy a két útvonal különálló és független (3. ábra; Rosén és munkatársai 1999; Yu 2006). Az FlbA a FadA közvetítette jel kikapcsolásával közvetve pozitív hatást gyakorol a szterigmatocisztin termelésre is, de valószínűsíthető a szterigmatocisztin szintézis indukálásában betöltött további szerepe is. A FluG fehérje a szterigmatocisztin szintézisre közvetve, az *flbA* gén aktiválásán keresztül lehet hatással (Shwab és Keller 2008).

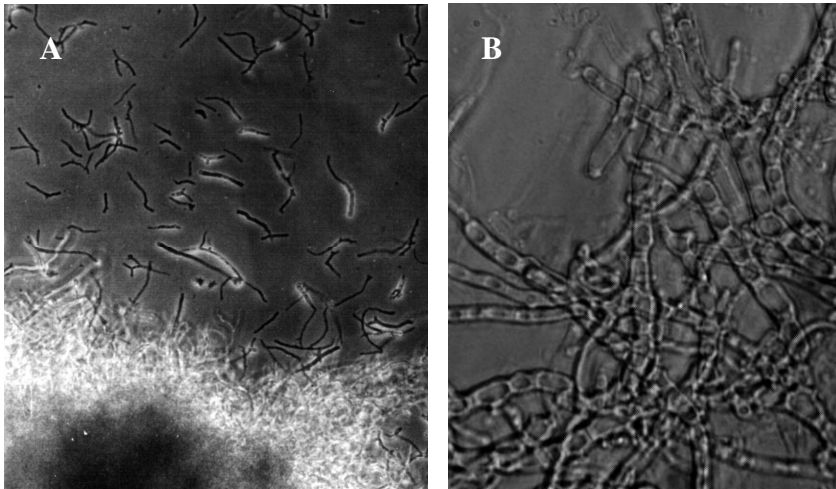
A *ganB* – amely szintén egy $G\alpha$ alegységet kódol - különböző negatív mutációi konidiofórok kialakulását és a *brlA* gén transzkripciós szintjének emelkedését mutatták süllyesztett kultúrákban, valamint a törzsek csírázásának csökkent mértékét eredményezték. Feltételezhetően a GanB negatívan befolyásolja

az aszexuális sporulációt a *brlA* expressziójának represszálásán keresztül – legalábbis sülyesztett kultúrákban - és elősegíti a konídiumok csírázását, valószínűsíthetően a külső szénforrás érzékelésén keresztül (3. ábra; Chang és munkatársai 2004). A GanB és az SfaD::GpgA szintén heterotrimert képez, ami szénforrás érzékelés hatására aktiválódik és egy gyors, átmeneti cAMP szignált, majd a protein kináz A aktivitás stimulációját váltja ki, ami a csírázás indukálásában fontos. Itt a GanB az aktiváló elem, míg az SfaD::GpgA heterodimer szerepe az, hogy biztosítsa a GanB plazma membránhoz történő relokalizációját, így lehetővé téve a szénforrás által bekövetkező reaktivációját (Lafon és munkatársai 2005). A GanB által aktivált útvonal mérsékléséért az RgsA RGS fehérje felelős (Han és munkatársai 2004).

2.3 Az *Aspergillus nidulans* autolízise

Az autolízis egy olyan természetes sejtpusztulási folyamat, amely során hidrolitikus enzimek (pl. kitinázok, glükánázok, proteinázok, RNázok, DNázok) indukálódnak, intenzív vakuolizációt, a sejtorganelumok lebomlását, a hifák kiürülését és a sejtfal degradálódását eredményezve (White és munkatársai 2002). Az autolízis aktív és energiaigényes voltát támasztja alá, hogy a fehérjeszintézis, vagy az ATP szintézis gátlásával az autolízis gátolható (Emri és munkatársai 2004a), valamint erős, szubletális stressz (pl. oxidatív stressz) hatására leáll (Emri és munkatársai 2004b). Ezen utóbbi folyamat magyarázatául szolgálhat, hogy a stressz elleni védekezés egyfelől energiát vonhat el a sejtektől, másfelől, jelentősen gátolja a fehérjeszintézist és a vele kapcsolatban álló folyamatokat (Pócsi és munkatársai 2005). A *prtA* proteinázt és *chiB* kitinázt kódoló gének autolízis alatti indukálódása szintén arra utal, hogy az autolízis jelenségét kísérő magas enzimaktivitások mögött *de novo* fehérjeszintézis áll (Emri és munkatársai 2006). Az autolízist a növekedés szempontjából optimális körülmények megváltozása (pl. éhezés, oxigén hiány, toxikus anyagok jelenléte vagy magas hőmérséklet) indukálhatja (McIntyre és munkatársai 1999 és 2000; White és munkatársai 1999 és 2002). A természetben kedvezőtlen körülmények között az autolízis a tenyészet anyagainak

újrahasznosításán keresztül a fonalas gombák túlélésében lehet fontos (Gordon és Lilly 1995).



4. ábra A) Fonalak fragmentálódása (oltástól számított 72 h) (Emri és munkatársai 2004a); B) Vakuolizáció (oltástól számított 44 h) az *Aspergillus nidulans* szénéhező tenyészeiben.

Az autolízis vizsgálatát széleskörű gyakorlati vonatkozásai is szükségessé teszik. Az autolízis indukálása elősegítheti az intracellulárisan felhalmozódó, vagy sejtfalhoz kötött termék kinyerését, valamint az autolízis alatt termelődő, iparilag jelentős hidrolázok (proteínázok, kitinázok, glükánázok) termelődését (White és munkatársai 2002; Tabera és munkatársai 2006). Az autolízis gátlásával ugyanakkor lehetőség nyílik az idiofázis hosszának elnyújtására, az ipari szempontból kedvező pelletes morfológia megtartására és a proteínáz termelés visszaszorítása révén a termék proteolitikus degradációjának mérséklésére (White és munkatársai 2002; Pócsi és munkatársai 2003). Mindezek mellett az autolízis megismerése új típusú antifungális szerek kifejlesztéséhez is elvezethet (Reichard és munkatársai 2000; Pócsi és munkatársai 2001; Thrane és munkatársai 2004).

Az autolízis indukálására a szénforrás éhezés hatékony módszernek bizonyult (Emri és munkatársai 2008). Az *A. nidulans* szénforrás éhező tenyészeiben jellegzetes morfológiai és fiziológiai változások figyelhetők meg. Az intenzív vakuolizáció mellett (4/B ábra), a glükóz elfogyását követően megkezdődik - a korai autolitikus szakaszban kisebb (oltástól számított 34-100 h), a

későiben (oltástól számított 100 h után) viszont kifejezettebb mértékű - szárazanyag tartalom csökkenés. A stacioner (oltástól számított 24-34 h), illetve a korai autolitikus szakaszban még pelletes morfológiát mutató micélium degradálódik (4/A ábra), ami a pelleték átmérőjének folyamatos csökkenésében, majd teljes dezintegrálódásában mutatkozik meg. Ezzel párhuzamosan a tenyészetekben magas extracelluláris kitináz és proteináz aktivitások mérhetőek (Emri és munkatársai 2004a). Az autolitikus fenotípus jellemzésére leginkább ezen, a sejtfal degradációjához erősen kötődő jellemvonások használhatóak. Tehát szűkebb értelemben az autolízisen egy intenzív sejtfal degradációval járó folyamatot, illetve az ezt lehetővé tévő fiziológiai, valamint az ennek következtében megvalósuló morfológiai változásokat értjük (autolitikus sejtfal degradáció; Emri és munkatársai 2004a; 2008).

A szénforrás éhezés – amellet, hogy indukálja az elhalt sejtek falának lebontását – hatással van a sejtek fiziológiájára is. A glükóz elfogyását követően a sejtek glutation anyagcseréjében bekövetkező változások eredményeként a redukált glutation/oxidált glutation aránya (GSH/GSSG) gyorsan csökken, ami egybeesik a magas γ -glutamil transzpeptidáz aktivitással. A tenyészetek légzése - mind a citokróm-C-függő, mind az alternatív oxidáz-függő légzés - visszaesik és megnő az alternatív légzés aránya, valamint a reaktív oxigénformák mennyisége (szuperoxid, peroxid) is emelkedést mutat (Emri és munkatársai 2004a). Mindezek mellett a tenyészet vitalitására folyamatos csökkenés jellemző és a sejtek apoptotikus pusztulását jelzi több apoptotikus marker jelenléte (membráninverzió, DNS fragmentálódás, megváltozott morfológiájú sejtmagok kialakulása) (Emri és munkatársai 2004a, 2005b).

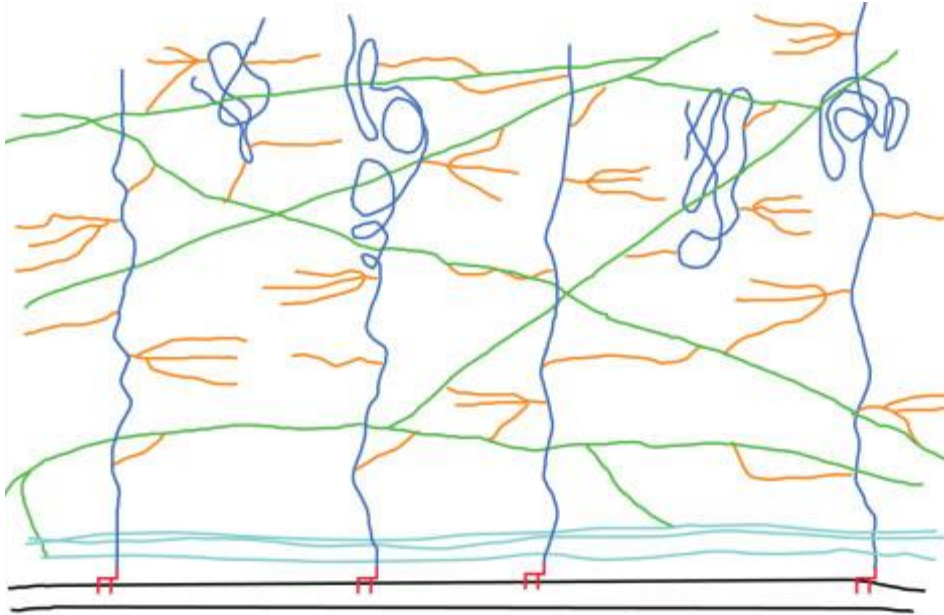
Az autolízis szabályozottságára utal, hogy számos jelátvitelben, illetve a transzkripció szabályozásában sérült mutáns esetében figyelhető meg az autolízis folyamatának megváltozása (Molnár és munkatársai 2004; 2006; Emri és munkatársai 2005a, 2005b). Eddig az alábbi mutációkat hordozó *A. nidulans* törzsek autolízisét vizsgálták. A *fluG* mutációja nem autolizáló fenotípust eredményez, ami a hifák fragmentációjának és a szárazanyag tartalom csökkenésének elmaradásában, az alacsony extracelluláris kitináz, illetve proteináz aktivitásokban,

valamint a pelletes morfológia megmaradásában is megmutatkozott (Emri és munkatársai 2005a). A *ΔbrlA* törzset a szárazanyag tartalom kisebb mértékű csökkenése és alacsony extracelluláris kitináz aktivitások jellemezték, az extracelluláris proteináz termelés ugyanakkor intenzívebbnek mutatkozott, mint a kontroll törzs esetében (Emri és munkatársai 2005a). A sporuláció szabályozásában részt vevő további elemek (pl. *flb* gének, *abaA*, *wetA*) sérülése azonban csak kisebb változásokat eredményezett az autolitikus fenotípus kialakulásában (Emri és munkatársai 2005a; nem közölt adat). A *fadA^{G203R}* és a *ΔflbA* mutációk nem befolyásolták a szárazanyag tartalom csökkenését, illetve az extracelluláris kitináz aktivitások alakulását és az extracelluláris proteináz termelésre is csak kisebb mértékben hatottak (Molnár és munkatársai 2004). Szintén csupán az extracelluláris proteináz termelésre gyakoroltak hatást a *ganB* és *rgsA* gének mutációi (Molnár és munkatársai 2006). A *creA*, karbon represszióért felelős transzkripciósfaktor kódoló gén (Shroff és munkatársai 1997) nullmutánsát hiperautolitikus fenotípus jellemezte, ami a szárazanyag tartalom intenzívebb csökkenésében, valamint a nagyobb extracelluláris kitináz és proteináz aktivitásokban nyilvánult meg (Emri és munkatársai 2006). Azonban a *creA* útvonal mellett feltételezhető *creA* független útvonal/útvonalak szerepe is az autólízis kedvező tápanyag ellátottság esetén megvalósuló gátlásában, ami feltehetően a FluG-BrlA útvonal gátlásán keresztül fejti ki hatását (Emri és munkatársai 2006).

2.4 A β-glükánok és a β-glükánázok

A β-glükánok glikozidos kötésekkel összekapcsolódó, β-D-glükóz molekulákból felépülő homopolimerek (Stone és Clarke 1992; Pitson és munkatársai 1993). A természetben a legnagyobb mennyiségben előforduló β-glükán a cellulóz (β-1,4-glükán). A β-glükánokat lánckonfigurációjuk és a domináns kötéstípus alapján osztályozhatjuk (Pitson és munkatársai 1993; Martin és munkatársai 2007). Egyes β-glükánokat az egyetlen kötéstípusból építkező elágazás nélküli szerkezet jellemzi (pl. a paramylon: β-1,3-glükán), míg mások szerkezetének felépítésében többféle kötéstípus is részt vesz, így komplexebb lineáris, vagy elágazó struktúrákat

alakítva ki (pl. az árpában található β -1,3-1,4-glükán) (Stone és Clarke 1992; Pitson és munkatársai 1993). β -glükánok termelésére képesek növények, gombák és állatok is (invertebráták) (Stone és Clarke 1992).



5. ábra A gombasejtfal általános felépítésének vázlata (Bowman és Free 2006). A kitin (világoskék vonal) nagyrésze a plazma membrán (fekete vonal) közelében helyezkedik el. A β -1,3-glükán (zöld vonal) a sejtfal egészét átszövi. A glikoproteinek - amelyek fehérjékből (sötétkék vonalak), illetve N- és O-oligoszacharidokból (narancs vonalak) állnak – egy része GPI-horgonnyal (piros vonal) kapcsolódik a plazmamembránhoz.

Az *Ascomycota* törzsbe tartozó gombák sejtfalában a glükánok reprezentálják a fő poliszacharid alkotórészt, a sejtfal száraztömegének közel 50-60%-át alkotják. A sejtfal glükán tartalmának 65-90%-át a β -1,3-glükán teszi ki, amely mellett más glükánok (β -1,6-glükán, β -1,3-1,4-glükán, α -1,3-glükán és α -1,4-glükán) is előfordulhatnak (Bernard és Latge 2001; Bowman és Free 2006). A β -1,3-glükán tekinthető a sejtfal fő strukturális alkotójának, amely β -1,6-kötésekkel elágazó szerkezetet formál és nem redukáló végeihez kovalens kötéssel kapcsolódik a többi sejtfal alkotó (5. ábra; Bernard és Latge 2001).

A β -glükánázok a β -glükánok glikozid kötéseit bontó O-glikozil-hidrolázok (EC 3.2.1-). Termelésükre képesek gombák, baktériumok, archeák, algák, növények és egyes állatok (pl. puhatestűek) is (Stone és Clarke 1992; Pitson és munkatársai

1993). Két fő csoportjuk különíthető el: az exo-, és endo-hidrolázok csoportja. Az exo-hidrolázok a β -glükán lánc nem redukáló végéről glükóz egységeket szabadítanak fel, az endo-hidrolázok pedig a β -glükán lánc belsejében random hasítanak (Pitson és munkatársai 1993). Az alapján, hogy milyen kötéstípusok hasítására képesek, az alábbi csoportokat különböztethetjük meg (Pitson és munkatársai 1993):

- 1) **Celluláz** (1,4-[1,3;1,4]- β -D glükán 4 glükánhidroláz): endoenzim, elsősorban a cellulóz 1,4-kötéseit hasítja, de kisebb mértékben más β -D-glükánok 1,3 és 1,4 kötéseit is hidrolizálja (EC szám: 3.2.1.4).
- 2) **Laminarináz** (1,4-[1,3;1,4]- β -D glükán 3(4) glükánhidroláz): endoenzim, a β -D-glükánok 1,3 és 1,4 kötéseit hidrolizálja (EC szám: 3.2.1.6).
- 3) **β -glükozidáz** (β -D-glükozid glükohidroláz): exoenzim, a β -glükánok és más β -D-glükozidok nem redukáló végét hidrolizálja (EC szám: 3.2.1.21).
- 4) **β -1,3-endoglükánáz** (1,3- β -D-glükán glükánhidroláz): endoenzim, az 1,3- β -D-glükánok 1,3 kötéseit hidrolizálja (EC szám: 3.2.1.39).
- 5) **β -1,3-exoglükánáz** (1,3- β -D-glükán glükohidroláz): exoenzim, az 1,3- β -D-glükán lánc nem redukáló végén lévő 1,3 kötéseket hidrolizálja (EC szám: 3.2.1.58).
- 6) **β -1,2-endoglükánáz** (1,2- β -D-glükán glükánhidroláz): endoenzim, az 1,2 kötést tartalmazó β -glükánok 1,2-kötéseit hidrolizálja (EC szám: 3.2.1.71).
- 7) **Lichenáz** (1,3-1,4- β -D-glükán 4 glükánhidroláz): endoenzim, az 1,3 és 1,4 kötéseket is tartalmazó β -D-glükánon belül lévő 1,4 kötéseket hidrolizálja (EC szám: 3.2.1.73).
- 8) **β -1,4-exoglükánáz** (1,4- β -D-glükán glükohidroláz): exoenzim, az 1,4- β -D-glükán nem redukáló végén lévő 1,4 kötéseket hidrolizálja (EC szám: 3.2.1.74).
- 9) **β -1,6-endoglükánáz** (1,6- β -D-glükán glükánhidroláz): endoenzim, az 1,6 kötést tartalmazó β -glükánok 1,6 kötéseit hidrolizálja (EC szám: 3.2.1.75).

Az aminosav szekvencia alapján a glikozil-hidrolázok családokba sorolhatóak, amelyek további klánokba csoportosíthatóak (Bourne és Henrissat 2001). Ez a csoportosítási mód – az előbb bemutatottal ellentétben - a hidrolázok szerkezeti tulajdonságait és lehetséges fiolgenetikai kapcsolatait is tükrözi (Davies és Henrissat 1995; Bourne és Henrissat 2001). Eddig 130 glikozil hidroláz családot

azonosítottak, melyek közül a β -glükánáz aktivitású enzimek az alábbiakba sorolhatóak: GH1, 3, 5, 6, 7, 9, 12, 16, 30, 44, 45, 48, 51, 55, 64, 74, 81, 124, 128 (www.cazy.org).

Annak köszönhetően, hogy a β -1,3-glükán a gomba sejtfa egyik fő komponense, a β -1,3-glükánázok fontosak a sejtfa plaszticitásának fenntartásában, mivel a növekedés a már meglévő sejtfa hidrolízise és az újonnan létrejövő komponensek szintézise közötti finom egyensúly segítségével valósul meg (Adams 2004). Emellett még számos morfológiai folyamat igényli ezen enzimek jelenlétét, mint pl. a csírázás, a hifa elágazások és szeptum képzés, a párosodás, a sporuláció, a sarjadzás és az élesztő-micéliális forma közötti átmenet (Pitson és munkatársai 1993; Adams 2004). Az extracelluláris β -glükánázok extracelluláris β -glükánok lebontásában is részt vehetnek, amely sokszor az organizmus által nagy glükóz koncentráció esetén termelt extracelluláris β -glükán éhező körülmények közötti lebontását jelenti, mint pl. a *Phanaerochaete chrysosporium* esetében (Bes és munkatársai 1987; Pitson és munkatársai 1993). A növénypatogén gombák extracelluláris β -glükánázai fontosak a patogenezis során a növényben történő invázió elősegítésében és a kórtünetek kialakításában (Riou és munkatársai 1991; Ruel és Joseleau 1991), de a mikoparazita *Trichoderma* fajok β -1,3-glükánázai is elengedhetetlenek a gombasejtfa bontása során (Cruz és munkatársai 1995). Mindemellett a β -1,3-glükánázok fontosak a sejtfa β -1,3-glükánjának szén és energiaforrás hiány alatti mobilizálásában, így az autolitikus enzimek közé sorolhatóak (Nuero és munkatársai 1993).

A β -glükánázok nagy gyakorlati jelentőséggel bíró enzimek (Pitson és munkatársai 1993). β -glükánázokat használnak gabonafélék β -glükán tartalmának vizsgálatára és csökkentésére, glükánok szerkezetének meghatározása, az élesztőkivonat gyártásakor az élesztő sejtfa lebontására, terápiás poliszacharidok módosítására és oligoszacharid (pl. trehalóz, gentibióz, izomaltóz, cellobióz, laminaribióz) szintézisre is. A β -glükánázok (elsősorban a cellulolitikus aktivitást mutató enzimek) fontosak a növényi eredetű szerves anyag bioetanolá történő konvertálásában, de használnak β -glükánázokat a borászatban és a sörgyártásban is.

2.5 A kitin és a kitinázok

A kitin egy 1,4-glikozidos kötésekkel összekapcsolódó N-acetil- β -D-glükózamin molekulákból felépülő polimer. A cellulóz után a kitin tekinthető a bioszférában a második leggyakoribb polimernek (Tharanathan és Kittur 2003). A kitin előfordul a gombák sejtfalának, a rovarok, rákok és férgek kültakarójának alkotójaként (Dahiya és munkatársai 2006). A természetben három formában jelenhet meg, melyek az α -, β -, és γ -kitin. A leginkább elterjedt, kompakt α -kitinben az N-acetil-D-glükózamin láncok antiparallel lefutásúak, míg a kevésbé stabil β -kitinre a láncok parallel lefutása jellemző. A γ -kitin az α -, és β -kitin keverékéből épül fel (Kurita 2001). A kitin a gombák sejtfalában egy kisebb mennyiségben előforduló, de strukturálisan fontos szerepet betöltő alkotó. Az élesztők sejtfalában a szárazanyag tartalom mindössze 1-2 %-át teszi ki, míg a fonalas gombák sejtfala 10-20 % kitint tartalmaz. A kitin a β -1,3-glükánnal együtt a sejtfal szilárdságának meghatározásában fontos (5. ábra; Bowmann és Free 2006).

A kitinázok a kitin bontására képes enzimek. Többféleképpen is csoportosíthatóak (Duo-Chuan 2006), jelen esetben az alábbi osztályozási módot ismertetem:

1) **Endokitinázok:** a kitin belsejében, random hasítanak, kis molekulatömegű N-acetil-D-glükózamin multimereket eredményezve (kitotrióz, kitotetraóz, diacetilkitobióz) (EC 3.2.1.14).

2) **Exokitinázok:**

- **kitobiozidázok:** a kitin nem redukáló végéről diacetilkitobiózt szabadítanak fel (EC 3.2.1.29).

- **β -1,4-N-acetil-glükóaminidázok:** az endokitinázok és kitobiázok termékeit bontják és N-acetil-glükózamin monomereket szabadítanak fel (EC 3.2.1.30).

Érdemes még megemlíteni a **kitin dezacetilázokat** (EC 3.5.1.41) és a **kitozanázokat** (EC 3.2.1.132) is. Az előbbieket a kitin N-acetil kötéseit hidrolizálják, míg az utóbbiak az így létrejött kitozánt bontják glükózamin egységekre (Dahiya és munkatársai 2006). Az aminosav szekvencia szerinti csoportosítás alapján a

kitinázokat a glikozil-hidrolázok alábbi családjába sorolják: 18, 19, 20, 48, 84 (www.cazy.org).

Kitinázok termelésére képesek vírusok, baktériumok, gombák, ízeltlábúak, illetve magasabb rendű növények és állatok is (Duo-Chuan 2006). A gombák kitinázai a β -glükánázokhoz hasonló szereppel rendelkeznek a morfogenezis során a sejtfa plaszticitásának fenntartásában. Mindemellett fontosak az elhalt hifák sejtfalában, illetve az ízeltlábú tetemek vázában jelenlévő kitin lebontásában, így tápanyagforrásként való felhasználásában, de jelentőséggel bírnak a más gombákkal vagy ízeltlábúakkal szemben folytatott kompetíció és védekezés folyamatában is. Számos gomba alkalmazza továbbá a kitinázokat gombákkal (mikoparazita gombák), rovarokkal (entomopatogén gombák) vagy nematódákkal (nematodapatogén gombák) szembeni patogenezise során (Adams 2004; Duo-Chuan 2006; Seidl 2008). Mindemellett a kitinázok fontosak az autólízis alatt a sejtfa kitin tartalmának degradációjában és az autolitikus fenotípus kialakításában (Emri és munkatársai 2008).

A kitinázok számos gyakorlati vonatkozással rendelkeznek (Dahiya és munkatársai 2006). Kitinázokat használnak a rákfélék vázában lévő kitin lebontására - érdemes megemlíteni, hogy egy rák teljes tömegének 75%-át hulladéknak tekintik, melynek 20-58%-át a kitin teszi ki (Wang és Chang 1997). Emellett alkalmazzák őket a laboratóriumi gyakorlatban protoplasztok előállítására, illetve a gyógyszeriparban használt kitoooligoszacharidok, glükózamin, N-acetil-glükózamin előállítására. Fontosak lehetnek a szúnyogok elleni védekezésben, valamint krémek összetevőjeként az antifungális terápiában, de a kitináz aktivitás meghatározásával képet kaphatunk a talajban előforduló gombák biomasszájáról, illetve a kitinhez kötődő molekulák mellett használhatóak gombás fertőzések detektálásra is (Dahiya és munkatársai 2006).

2.6 Sejtfa fehérjék és proteinázok

Minden gombasejtfa felépítésében részt vesznek fehérjék, amelyek szorosan összefonódnak a glükán és kitin alkotta strukturális mátrixszal. Az élesztők

sejtfalában a száraztömeg megközelítőleg 30-50%-át, míg a fonalas gombák esetében a sejtfal száraztömegének hozzávetőleg 20-30%-át teszik ki. A hagyományosan sejtfal fehérjéknek tekintett fehérjék N- és O-oligoszacharidokkal módosított glikoproteinek. A *Saccharomyces cerevisiae* és *Candida albicans* sejtfalára a mannoproteinek jelenléte jellemző, míg a *Neurospora crassa* és az *A. fumigatus* sejtfalában galaktózt és mannózt tartalmazó galaktomannán fordul elő (Bowmann és Free 2006).

A sejtfal fehérjék számos csoportját lehet megkülönböztetni (de Groot és munkatársai 2009):

- 1) Hidrofobinok (Wösten 2001).
- 2) Diszulfid kötött sejtfal fehérjék.
- 3) GPI (glikozilfoszfatidil-inozitol)-horgonnyal rendelkező sejtfal fehérjék: a plazma membránhoz, vagy a sejtfal β -glükánjához GPI-horgonyukon keresztül kapcsolódnak (de Groot és munkatársai 2005).
- 4) Pir-proteinek (**proteins with internal repeats**): a β -1,3-glükánhoz észter kötéssel kapcsolódnak (de Groot és munkatársai 2005; Ecker és munkatársai 2006). A sejtfalból enyhe lúgos kezeléssel szabadíthatók fel.
- 5) Más, enyhe lúgos kezeléssel eltávolítható, Pir ismétlődést nem tartalmazó fehérjék, amelyek esetében ismeretlen a sejtfal makromolekuláihoz való kötődésük.

A proteínázok (más néven proteázok, peptidázok, proteolitikus enzimek) a fehérjék peptid kötéseinek bontására képes enzimek (Rawlings és munkatársai 2007), melyek működése eredményeként kisebb peptidek, vagy aminosavak keletkeznek. A katalizált reakció alapján az alábbi csoportokat különböztethetjük meg (Rawlings és munkatársai 2007):

- 1) **Endopeptidázok**: a fehérjék belső, α -peptid kötéseit hidrolizálják, melyek a láncvégektől távol helyezkednek el. Egyes képviselőik csak kisebb szubsztrátok hasítására képesek (oligopeptidázok). Az aktív centrum felépítése szerint megkülönböztethetünk: szerin (EC 3.4.21), cisztein (EC 3.4.22), aszpartát (EC 3.4.23), metallo (EC 3.4.24) és treonin endoproteínázokat (EC 3.4.25).

2) **Omega peptidázok:** a láncon belül, de a láncvégek közelében hasítanak (a képződött termékek tripeptidnél hosszabbak). Egyes képviselőik a nem α -peptid kötéseket is hasítják (EC 3.4.19).

3) **Exopeptidázok:** működésükhöz vagy szabad N-terminális amino-csoport, vagy szabad C-terminális karboxi-csoport szükséges. A láncvégeken hasítanak és legfeljebb tripeptid hosszúságú szakaszt hasítanak le. További csoportjaik: aminopeptidázok (EC 3.4.11); dipeptidázok (EC 3.4.13); dipeptidil-peptidázok és tripeptidil-peptidázok (EC 3.4.14); peptidil-dipeptidázok (EC 3.4.15) és karboxipeptidázok (EC 3.4.16-18).

Ezen csoportosítási mód azonban nem tükrözi az evolúciós kapcsolatokat. A MEROPS adatbázisban a proteinázokat molekuláris szerkezetük és homológiájuk alapján csoportosították. Az egymással homológ proteinázok és proteináz inhibitorok csoportokba kerültek, e csoportokat pedig családokba és klánokba csoportosították tovább (Rawlings és munkatársai 2007; 2010). Ez alapján az *A. nidulans*-ban eddig 218 proteinázt és 136 proteináz homológot azonosítottak (merops.sanger.ac.uk).

A proteinázok az élőlények minden csoportjában létfontosságúak, kódolásukban a gének közel 2 %-a vesz részt. Számos biológiai folyamatban nélkülözhetetlenek, mint pl. a táplálékul szolgáló fehérjék lebontásában, az intracelluláris fehérjék újrafeldolgozásában, fehérjék poszttranszlációs módosításában (Rawlings és munkatársai 2007). A gombák extracelluláris proteinázai részt vehetnek más extracelluláris hidrolázokkal együtt a környezetükben előforduló polimerek (jelen esetben fehérjék) tápanyagként történő hasznosításában. Emellett a proteinázok számos gomba esetében szükségesek a kolonizáció és a virulencia folyamatában (Kwon-Chung és munkatársai 1985; Hube és munkatársai 1994). Az *Aspergillus* fajok proteinázai segítenek az invazív tüdő aszpergillózis során a fehérje természetű „barrier”-eken (elasztin, laminin, kollagén) való átjutásban (Starcher 1986), így a proteinázok virulencia faktoroknak tekinthetőek (Kothary és munkatársai 1984; Rhodes és munkatársai 1988; Cohen 1991). Az autólízis jelenségét szintén magas proteináz aktivitás kíséri (Santamaria és Reyes 1988), mely alapján feltételezhető a belső energiaforrások lebontása, illetve a

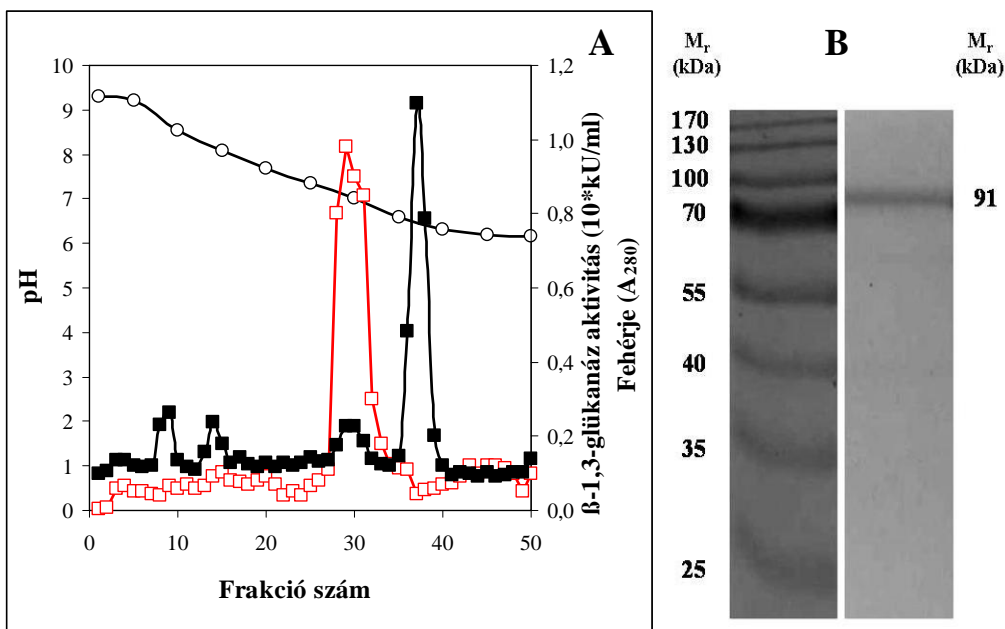
sejtfal degradációja során betöltött szerepük (McIntyre és munkatársai 2000; Emri és munkatársai 2008).

A proteínázok az iparban leginkább alkalmazott enzimek közé tartoznak, a teljes enzimeladások közel 60%-át teszik ki (Barrette és Rawlings 2003). Használják őket az élelmiszeriparban, a sütőiparban, a sajt és szójaszószer előállításánál, valamint a tejalvasztás és a húspuhítás folyamatában. A bőrparban a proteínázokat a bőr szőrtelenítésére, illetve rugalmasabbá tételére használják, de alkalmazzák őket a mosószergyártásban (mosóenzimek) és a szennyvíztisztításban is. Emellett széles körű az egészségügyi felhasználásuk (pl. a bőr kezelése, a vércsoport meghatározása során, valamint inhibitoraikat felhasználják gyulladásos, illetve rákos betegségek kezelésére). A laboratóriumi gyakorlatban kiemelkedő fontosságúak a fehérje szekvenálás és a rekombináns fúziós fehérjék előállítása során (Rawlings és munkatársai 2007).

3. Eredmények

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

3.1.1 Az EngA β -1,3-endoglükánáz tisztítása, azonosítása, jellemzése



6. ábra A) Az EngA β -1,3-endoglükánáz tisztítása $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -al való kicsapást és dialízist követően kromatofókuszással. Az ábrán a pH (fekete kör), a β -1,3-glükánáz aktivitás (piros négyzet) és a fehérjertalom (fekete négyzet) változását tüntettem fel. Egy frakció 2 ml térfogatú volt. B) A 30-as frakció tisztaságának ellenőrzése és az EngA molekulaméretének meghatározása redukáló SDS poliakrilamid gélelektroforézis segítségével. Az ábra egy reprezentatív kísérlet eredményét mutatja.

Sikerült megtisztítanunk egy β -1,3-glükánáz aktivitású enzimet az *A. nidulans* FGSC26 törzs autolizáló tenyészetének fermentlevéből. A tisztításához a glükózmentes minimál tápközegbe átmosott tenyészet 44 óras (átmosás után 24 órával) leszűrt fermentlevét használtuk fel. Részben a nagyobb β -1,3-glükánáz aktivitás (44 óras glükózmentes minimál tápközegbe átmosott tenyészetben: 90 ± 5 U/ml; 44 óras nem átmosott tenyészetben: 70 ± 4 U/ml), részben a zavaró fehérjék feltételezett kisebb mértékű jelenléte miatt esett erre a tápközegre a választásunk. A tisztítást két lépésben végeztük, az $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -al végzett kicsapást kromatofókuszással követte, a kapott frakció tisztaságát SDS poliakrilamid

gélelektroforézis segítségével ellenőriztük (6. ábra, 1. táblázat). A tisztított enzim jól hidrolizálta a laminarint, de nem bontotta sem a karboximetil-cellulóz (β -1,4-glükanáz), sem a p-nitrofenil- β -D-glükóz (β -glükozidáz) szubsztrátokat, tehát feltehetőleg β -1,3-endoglükanáz aktivitású.

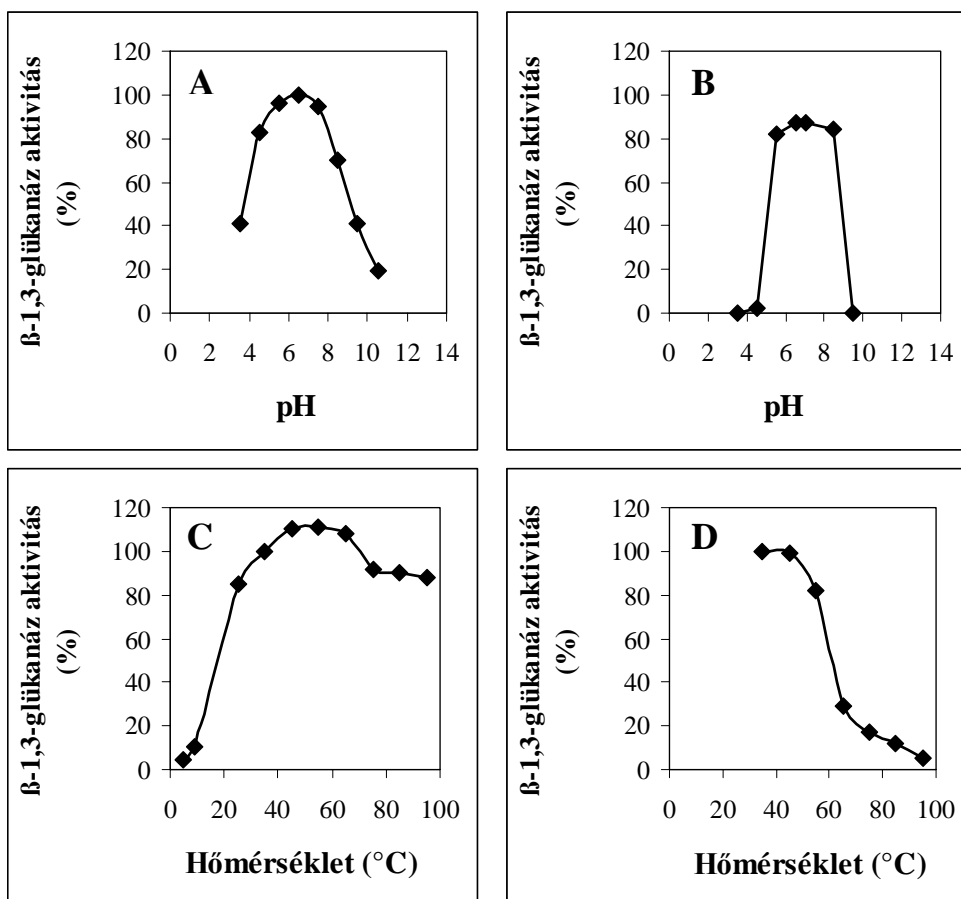
Tisztítási lépés	Térfogat (ml)	Fehérje tartalom (μ g)	Specifikus aktivitás (U/ μ g fehérje)	Kihozatal (%)
Nyers fermentlé	100	9521	1,838	100
(NH ₄) ₂ SO ₄ -os kicsapás	10	6400	0,328	12
Kromatofókusálás	6	252	5	7

1. táblázat Az EngA tisztítási táblázata.

A tisztított fehérje MALDI-TOF analízis segítségével történő azonosítása során az *engA* (locus ID: AN0472.3; de Groot és munkatársai 2009) gén termékének bizonyult, amely szekvencia adatok alapján egy 95,2 kDa méretű β -1,3-endoglükanázt kódol. Az EngA fehérje a glikozil hidrolázok 81-es családjába tartozik (eukarióta β -1,3-glükanázok családjá) és az aminosav szekvenciája alapján a *Saccharomyces cerevisiae* (Dse4p/Eng1p; E-érték: 2e-150), valamint a *Schizosaccharomyces pombe* (Eng1; E-érték 3e-167 és Eng2; E-érték: 5e-172) β -1,3-endoglükanázaihoz hasonló. Az EngA a SignalP program alapján extracelluláris termelődést jelző szignálszekvenciával rendelkezik.

Az EngA fehérje részleges jellemzésekor izoelektromos pontja 7,05-nak, SDS poliakrilamid gélelektroforézissel megállapított molekulatömege pedig 91 \pm 3 kDa-nak adódott (6. ábra). Az EngA pH optimumának és pH-függő stabilitásának vizsgálatokor azt tapasztaltuk, hogy pH 3,5 és 10,5 között számottevő aktivitást mutatott, pH optimuma pedig 6,5-nek adódott (7/A ábra). Stabilitását pH 5,5 és 8,5 között 24 órán át megőrizte (37°C), ennél savasabb, vagy lúgosabb tartományban azonban teljesen inaktíválódott (7/B ábra). Hőmérséklet optimumának vizsgálatokor a legmagasabb aktivitást 45 és 65 °C között mértük, de még 95 °C-on is detektáltunk

jól mérhető aktivitást (7/C ábra), igaz 55 °C felett hőstabilitása már igen kicsinek bizonyult (7/D ábra).

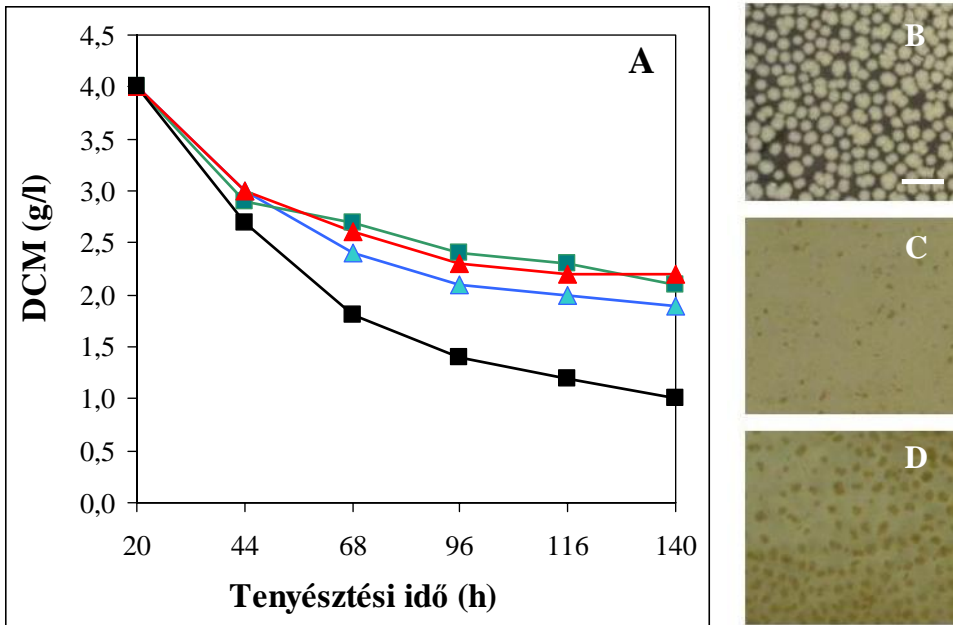


7. ábra A: Az enzimaktivitás pH-függése. A pH 6,5-nél, azaz a szénéhező tenyészetek kiindulási pH-jánál mért értéket (95 U/ml) tekintettük 100 %-nak. B: Az enzim pH-függő stabilitása. Az adott pH-n mért kiindulási aktivitásokat vettük 100 %-nak. C: Az enzimaktivitás hőmérséklet függése. A 37 °C-on, azaz a tenyésztési hőmérsékleten mért értéket (90 U/ml) tekintettük 100 %-nak. D: Az enzim hőstabilitása. A nem hőkezelt minták aktivitását vettük 100 %-nak. Az ábrákon a szórás sehol sem haladta meg az átlag 8 %-át.

3.1.2 Az *engA* autolízisben betöltött szerepének vizsgálata

Az EngA β -1,3-endoglükánáz autolízisben betöltött jelentőségének felderítése érdekében megvizsgáltunk egy $\Delta engA$ és egy $\Delta engA\Delta chiB$ kettős mutáns törzset. Ezekhez a vizsgálatokhoz a különböző törzsek glükózmentes minimál tápközegebe átmosott tenyészeit használtuk. Azért ezen kísérleti elrendezés mellett

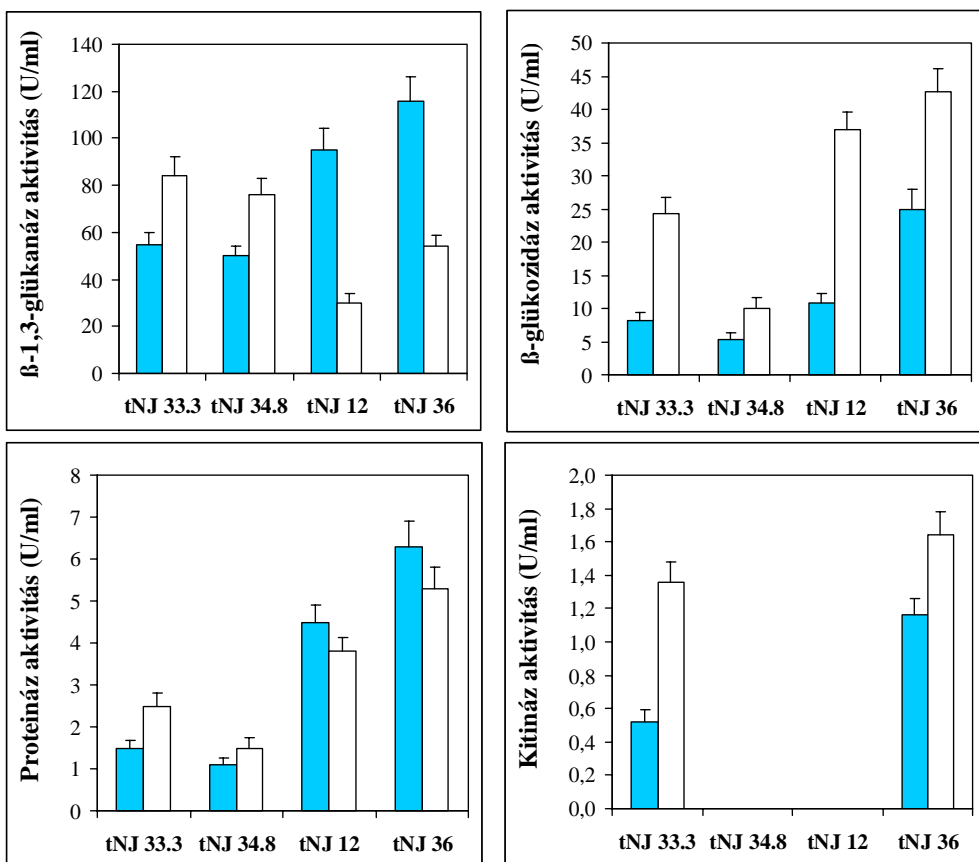
döntöttünk, mert az átmosás során a kontroll és a mutáns törzsek szénéhezése szinkronizálható, a szénéhező tenyészetek kiindulási biomasszája közel azonos értékre állítható, így a kapott eredmények összehasonlíthatóbbá válnak és a kísérleti hiba is csökkenthető.



8. ábra A) A szárazanyag tartalom (DCM) csökkenése a tNJ33.3 ($\Delta engA$; kék vonal), a tNJ12 ($\Delta chiB$; piros vonal), a tNJ34.8 ($\Delta engA \Delta chiB$; zöld vonal) és a tNJ36 kontroll (fekete vonal) törzsekben. A tNJ12-es törzshöz használt kontroll törzsnél (tNJ11) tapasztalt változások nem tértek el a tNJ36-os kontroll törzsnél tapasztaltaktól, ezért azt külön nem tüntettem fel. Az eredmények 4 független mérésből származnak és a szórás kisebb volt, mint 12 %. B) A tNJ36 kontroll törzs pellet morfológiája 20 óras és C) 144 óras tenyészetben. D) A tNJ33.3 törzs pellet morfológiája 144 óras tenyészetben. Bar = 10 mm.

Az *engA* gén hiányában a szárazanyag tartalom kisebb mértékű csökkenése mellett a pelletes morfológia is tovább megmaradt (8. ábra). A $\Delta engA$ törzsben az extracelluláris β -1,3-glükánáz aktivitásokkal együtt az extracelluláris kitináz, proteináz és β -glükozidáz aktivitások is csökkenést mutattak és a $\Delta engA \Delta chiB$ törzsben is alacsonyabb extracelluláris β -glükozidáz és proteináz aktivitásokat mértünk (9. ábra). Ez a tendencia megmutatkozott a *pepJ* és *prtA* proteináz, valamint a *chiB* kitináz gének alacsonyabb transzkripciójában is (2. táblázat). Érdekes

megemlíteni, hogy a *ΔchiB* törzs esetében szintén hasonló jelenséget tapasztaltunk (9. ábra).



9. ábra Extracelluláris β-1,3-glükánáz, β-glükozidáz, proteináz és kitináz termelés a tNJ33.3 (*ΔengA*), tNJ34.8 (*ΔengAΔchiB*), tNJ12 (*ΔchiB*) és tNJ36 (kontroll) törzsekben. A tNJ12 törzsnél használt kontroll törzs (tNJ11) esetében az enzim aktivitások hasonlóan alakultak a tNJ36 törzshöz, ezért külön nem tüntettem fel. A tNJ34.8 és tNJ12 törzseknél mért kitináz aktivitások a kimutathatósági határ alatt voltak. A minták a glükózmentes minimál tápközegbe való átmosást követően 24 (kék oszlopok) és 120 (fehér oszlopok) órával származtak. Az ábrán 4 független mérés átlaga és szórása van feltüntetve.

Törzsek	Relatív transzkripció (Δ CP)			
	<i>chiB</i>	<i>prtA</i>	<i>pepJ</i>	<i>engA</i>
tNJ36 (kontroll)	3,4 \pm 0,4	1 \pm 0,2	2,8 \pm 0,4	1,8 \pm 0,2
tNJ33.3 (Δ engA)	9 \pm 1*	6,2 \pm 0,6*	15,2 \pm 2*	-
tNJ34.8 (Δ engA Δ chiB)	-	6 \pm 0,6*	11 \pm 1,6*	-

2. táblázat A *chiB*, *prtA*, *pepJ* és *engA* gének relatív transzkripciója (Δ CP: az adott gén, és a referencia gén esetében kapott ciklusszámok különbsége) a tNJ36 (kontroll), a tNJ33.3 (Δ engA) és a tNJ34.8 (Δ engA Δ chiB) törzsekben. A táblázatban 3 független mérés átlagát és szórását tüntettem fel. A „*” jelölés a kontroll tenyészetektől való szignifikáns eltérést jelöli (Student-féle t teszt; $p < 5\%$).

3.1.3 A glükánáz termelés szabályozása az *Aspergillus nidulans* autolizáló tenyészetekben

A glükánáz termelés szabályozásának felderítése érdekében megvizsgáltuk több, a tanszéken végzett korábbi vizsgálatok során a hidroláz termelés szabályozásában fontosnak bizonyult mutáció extracelluláris glükánázok termelésére gyakorolt hatását. Ezekhez a vizsgálatokhoz a különböző törzsek glükózmentes minimál tápközegbe átmosott tenyészeit használtuk, a korábban vázolt okok miatt.

Törzsek	β -glükozidáz aktivitás (U/ml)	β -1,3-glükánáz aktivitás (U/ml)
FGSC26 kontroll	26 \pm 2	90 \pm 5
FGSC744 (<i>fluG1</i>)	2 \pm 0,4 *	4 \pm 0,4 *
FGSC749 (<i>brlA</i>)	2 \pm 0,6 *	15 \pm 2 *
FGSCA1035 (<i>fada</i> ^{G203R})	21 \pm 2 *	85 \pm 6
RMdgB03 (Δ ganB)	20 \pm 2*	83 \pm 7
<i>creA</i> nullmutáns	42 \pm 4 *	94 \pm 8

3. táblázat Extracelluláris β -glükozidáz és β -1,3-glükánáz termelés különböző mutáns törzsekben. Az enzimaktivitások méréséhez szükséges minták az átmosás után 24 órával származtak. A táblázatban 3 független mérés átlaga és szórása van feltüntetve. A „*” jelölés az FGSC26-os kontroll törzstől való szignifikáns eltérést mutatja (Student-féle t teszt; $p < 5\%$).

A FluG-BrlA útvonalat ért mutációk nagy hatást gyakoroltak a tenyészetek extracelluláris glükánáz termelésére. Mind a *fluG*, mind a *brlA* nullmutáns törzsek

esetében a β -1,3-glükánáz és β -glükozidáz termelés visszaesése mellett az *engA* transzkripciója is alacsonyabb szintű volt (az *engA* relatív transzkripciója (Δ CP) a FGSC26 törzsnél: $2,2 \pm 0,3$; a *fluG1* törzsnél: $7,1 \pm 0,7$; a *AbriA* törzsnél: $4,5 \pm 0,4$ volt). Ugyanakkor sem a vizsgált heterotrimer G protein útvonalakat ért mutációk (*fadA*^{G203R}, Δ *ganB*), sem a karbon represszióért felelős *creA* gén mutációja nem volt hatással a tenyészetek extracelluláris β -1,3-glükánáz termelésére (3. táblázat). A β -glükozidáz termelés esetében a FadA és GanB heterotrimer G-protein útvonalakat ért mutációk alacsonyabb, a *creA* mutációja pedig magasabb extracelluláris β -glükozidáz aktivitásokat eredményezett (3. táblázat).

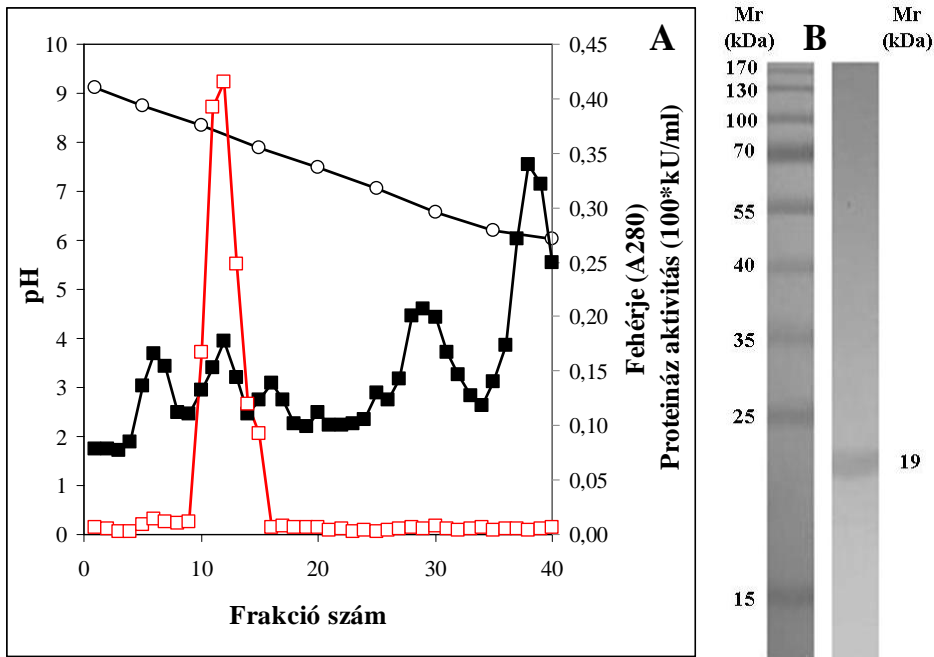
3.2 Extracelluláris proteinázok vizsgálata az *Aspergillus nidulans* szénforrás éhezéssel indukált autolizáló tenyészeiben

3.2.1 A PepJ extracelluláris metalloproteináz tisztítása, azonosítása, jellemzése

A PepJ tisztítását szintén az FGSC26 törzs glükózmentes minimál tápközegbe átmosott tenyészetének fermentlevéből végeztük. A tisztítást ebben az esetben is két lépésben, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -al végzett kicsapást követő kromatofókuszálással kiviteleztük (10/A ábra, 4. táblázat). Az így kapott 5,2 U/ml aktivitással rendelkező frakció tisztaságát SDS poliakrilamid gélelektroforézissel ellenőriztük (10/B ábra), majd MALDI-TOF analízis segítségével azonosítottuk.

Tisztítási lépés	Térfogat (ml)	Fehérje tartalom (μg)	Specifikus aktivitás (U/mg fehérje)	Kihozatal (%)
Nyers fermentlé	100	8743	37,7	100
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -os kicsapás	7	6671	8,3	17
Kromatofókuszálás	6	252	124,5	10

4. táblázat A PepJ tisztítási táblázata.

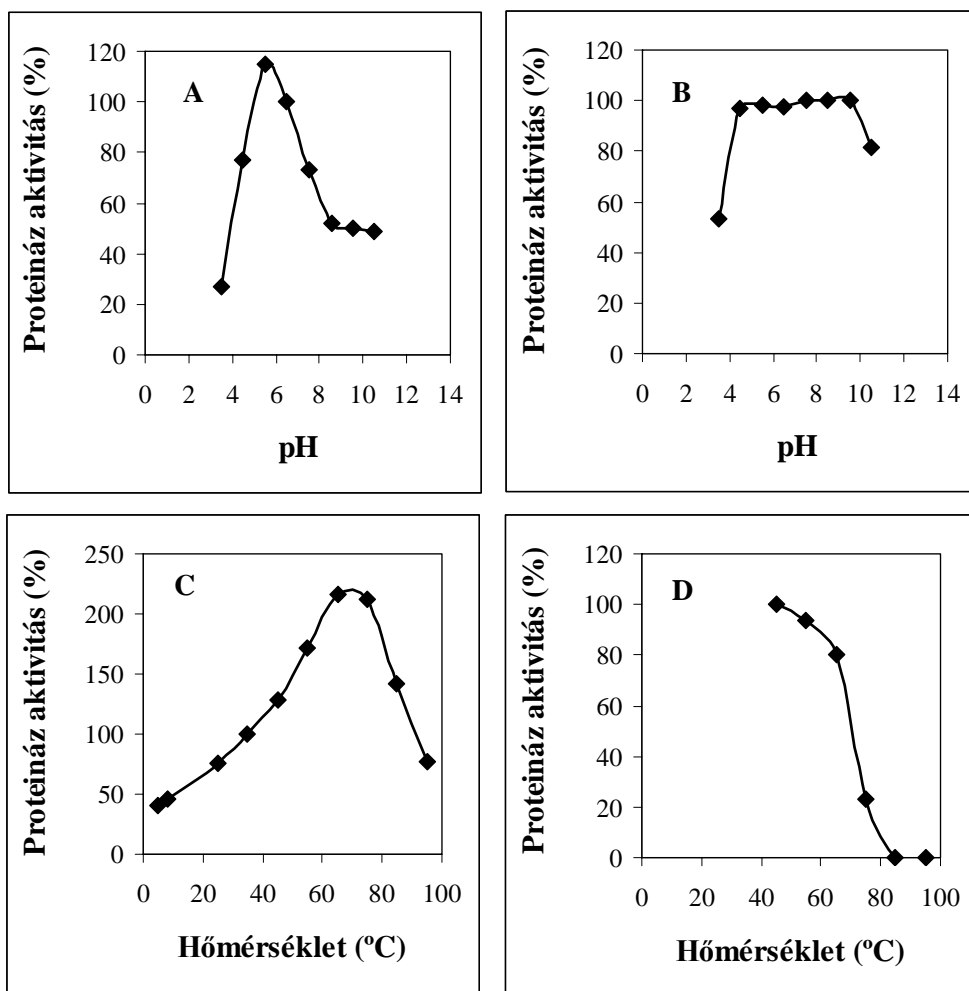


10. ábra A) A PepJ metalloproteináz tisztítása $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -al való kicsapás és dialízist követően kromatofókuszáással. Az ábrán a pH (fekete kör), a proteináz aktivitás (piros négyzet) és a fehérjetartalom (fekete négyzet) változását tüntettem fel. Egy frakció 2 ml térfogatú volt. B) A 12-es frakció tisztaságának ellenőrzése és a PepJ molekulaméretének meghatározása redukáló SDS poliakrilamid gélelektroforézis segítségével. Az ábra egy reprezentatív kísérlet eredményét mutatja.

A tisztított fehérje a *pepJ* gén termékének bizonyult (locus ID: AN7962.3; Katz és munkatársai 2008), mely szekvencia adatok alapján egy deuterolizin típusú, 37 kDa méretű metalloproteinázt kódol. A PepJ aminosav szekvenciája alapján az *A. oryzae* proteinázával (AOR_1_818024; E-érték: 5e-152), és a *P. citrinum* penicillolizinjével (PlnC; P47189; E-érték: 7e-146) mutat nagymértékű hasonlóságot. A tisztított PepJ fehérje érzékenynek bizonyult 10 mmol/l $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ -val szemben: 30 perces inkubációt követően az enzimaktivitás az eredeti érték 47 %-ára (2,4 U/ml) esett vissza, ami alátámasztja a szekvencia adatokat, miszerint a PepJ egy metalloproteináz.

A PepJ általunk meghatározott paraméterei a következők: SDS poliakrilamid gélelektroforézissel meghatározott molekulamérete 19 kDa (10/B ábra). A legaktívabb frakció pH-ja alapján az enzim izoelektromos pontja 8,6 (10/A ábra). A PepJ pH optimuma pH 5,5-nek adódott, de jelentős aktivitást mutatott

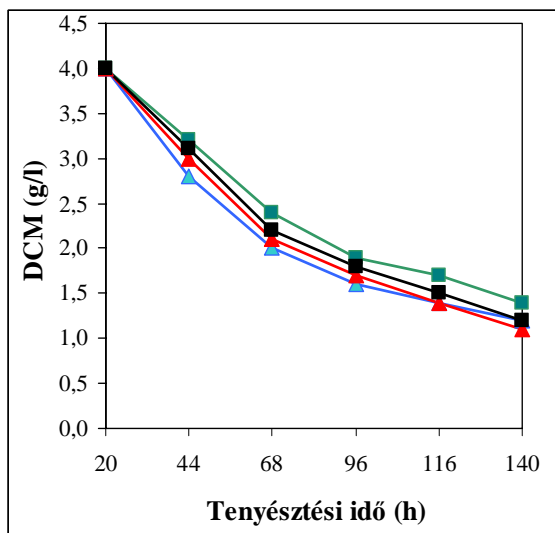
egészen pH 10,5-ig (11/A ábra) és stabilnak bizonyult a pH 3,5 és pH 10,5 tartományban (11/B ábra). Hőmérséklet optimuma 65 °C-nak adódott, mely hőmérsékletig stabilnak is mutatkozott. Érdekes azonban megemlíteni, hogy bár a 30 perces 95 °C-on történő előkezelés teljesen inaktíválta az enzimet, a 95 °C-on mért aktivitás megegyezett a 37 °C-on mért értékekkel (11/C és D ábra).



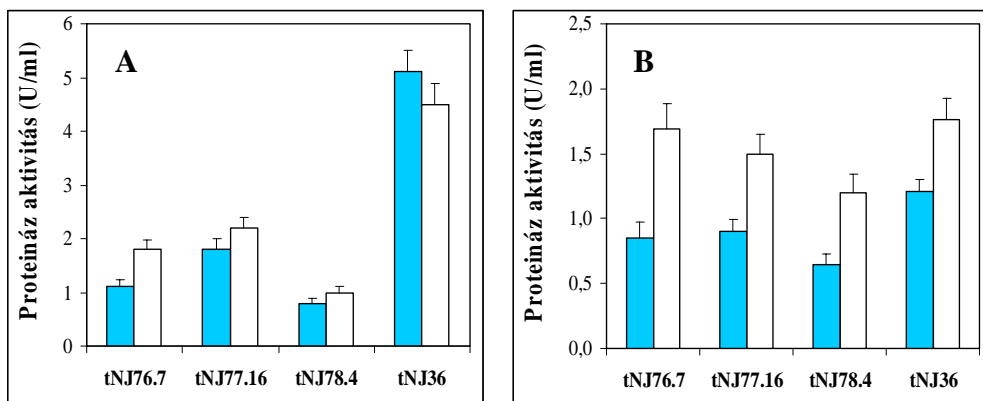
11. ábra A: Az enzimaktivitás pH-függése. A pH 6,5-nél, azaz a szénéhező tenyészetek kiindulási pH-jánál mért értéket (5,8 U/ml) tekintettük 100 %-nak. B: Az enzim pH-függő stabilitása. Az adott pH-n mért kiindulási aktivitásokat vettük 100 %-nak. C: Az enzimaktivitás hőmérséklet függése. A 37 °C-on, azaz a tenyésztési hőmérsékleten mért értéket (5,8 U/ml) tekintettük 100 %-nak. D: Az enzim hőstabilitása. A nem hőkezelt minták aktivitását vettük 100 %-nak. Az ábrákon a szórás sehol sem haladta meg az átlag 8 %-át.

3.2.2 A *PrtA* és *PepJ* proteinázok autolízisben betöltött szerepének vizsgálata

A *PrtA* extracelluláris szerin proteináz és az általunk megtisztított *PepJ* extracelluláris metalloproteináz autolízisben betöltött jelentőségének tisztázása érdekében megvizsgáltunk egy $\Delta pepJ$, egy $\Delta prtA$ és egy $\Delta prtA\Delta pepJ$ mutáns törzset.



12. ábra A szárazanyag tartalom (DCM) csökkenése a tNJ76.7 ($\Delta pepJ$; zöld vonal), a tNJ77.16 ($\Delta prtA$; kék vonal), a tNJ78.4 ($\Delta prtA\Delta pepJ$; piros vonal) és a tNJ36 kontroll (fekete vonal) törzsekben. Az eredmények 4 független mérésből származnak, a szórás kisebb volt, mint 8 %.



13. ábra A) Azokazeinnel és B) BSA-val (Bovine Serum Albumin) mért extracelluláris proteináz aktivitás a tNJ76.7 ($\Delta pepJ$), tNJ77.16 ($\Delta prtA$), tNJ78.4 ($\Delta prtA\Delta pepJ$) és tNJ36 kontroll törzsben. A minták a glükózmentes minimál tápközegbe való átmosást követően 24 (kék oszlopok) és 120 (fehér oszlopok) órával származtak. Az ábrán 4 független mérés átlaga és szórása van feltüntetve.

Ebben az esetben is a glükózmentes minimál tápközegbe átmosott tenyészeteket vizsgáltuk, a korábban említett okok miatt. Bár nem tapasztaltunk jelentős változást a mutánsok szárazanyag tartalmának csökkenésében (12. ábra), jelentősen csökkent – bár nem szűnt meg - az azokazeinnel detektálható extracelluláris proteináz aktivitás (13/A ábra). A BSA-val detektált proteináz aktivitás a mutáns törzsekben szintén csökkenést mutatott ugyan, de ez a visszaesés nem volt az azokazeinnel detektált aktivitásnál tapasztaltnál hasonló mértékű (13/B ábra).

3.2.3 Az extracelluláris proteináz termelés szabályozásának vizsgálata az *Aspergillus nidulans* autolizáló tenyészeteiben

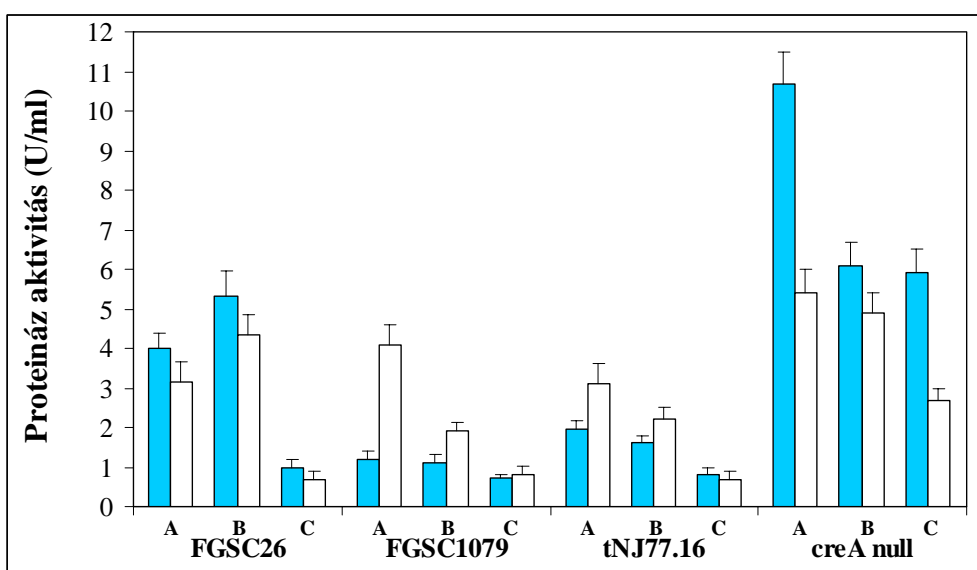
Törzsek	Specifikus proteináz aktivitás (U/ml)		Relatív transzkripció (Δ CP)	
	24 h	120 h	<i>prtA</i>	<i>pepJ</i>
FGSC26 (kontroll)	5,3 ± 0,6	4,1 ± 0,5	0,2 ± 0,4	2,6 ± 0,8
FGSC744 (<i>fluG1</i>)	0,2 ± 0,1*	0,3 ± 0,1*	8,2 ± 0,8*	12 ± 2*
FGSC1079 (<i>ΔbrlA</i>)	1,1 ± 0,1*	1,9 ± 0,2*	3,4 ± 1*	7,5 ± 2*
FGSCA1035 (<i>fadA^{G203R}</i>)	5,2 ± 0,3	5,0 ± 0,3*	1,1 ± 1	3,5 ± 1,3
RMdgB03 (<i>ΔganB</i>)	6,1 ± 0,6*	4,3 ± 0,4	1,5 ± 1,5	3,5 ± 1,2
FGSC242 (<i>pacC5</i>)	3,9 ± 0,4*	2,7 ± 0,4*	3,5 ± 1,3*	1,5 ± 1
<i>creA</i> nullmutáns	6,1 ± 0,6*	4,9 ± 0,5*	0,5 ± 0,6	2,5 ± 1

5. táblázat Extracelluláris proteináz termelés és a *prtA*, *pepJ* gének relatív transzkripciója (Δ CP: az adott gén, és a referencia gén esetében kapott ciklusszámok különbsége) különböző mutáns törzsekben. A táblázatban 6 független mérés átlagát és szórását tüntettem fel. A „*” jelölés az FGSC26-os kontroll törzstől való szignifikáns eltérést mutatja (Student-féle t teszt; $p < 1\%$).

Az extracelluláris proteináz termelés, valamint a *prtA* és a *pepJ* gének szabályozásának felderítése érdekében több, fontosnak vélhető mutációt hordozó törzs extracelluláris proteináz termelését is megvizsgáltuk. Ezekben a kísérletekben a korábbi tanszéki vizsgálatoktól eltérően – ahol nem átmosott tenyészeteket vizsgáltak – glükózmentes minimál tápközegbe átmosott tenyészeteket tanulmányoztunk, a korábban említett okok miatt. Ezen tenyészetek extracelluláris proteináz aktivitásait a glükózmentes minimál tápközegbe való átmosást követően

24 és 120 órával is meghatároztuk, hogy a korai és késői autolitikus tenyészetek proteináz termeléséről is képet kapjunk. A proteináz aktivitások meghatározásához – a korábbi kísérletekhez hasonlóan - azokazein szubsztrátot használtunk.

Vizsgálataink alapján a FluG-BrlA útvonal kiemelkedő fontosságúnak bizonyult az extracelluláris proteináz termelés szabályozásában, ami a *prtA* és *pepJ* gének transzkripciójában is megmutatkozott (5. táblázat). Ugyanakkor a FadA és GanB hetertrimer G protein útvonalak mutációi csak kisebb mértékben befolyásolták az extracelluláris proteináz termelést. A *creA* mutációja szintén csak mérsékelt növekedést okozott a proteináz aktivitásokban (5. táblázat).

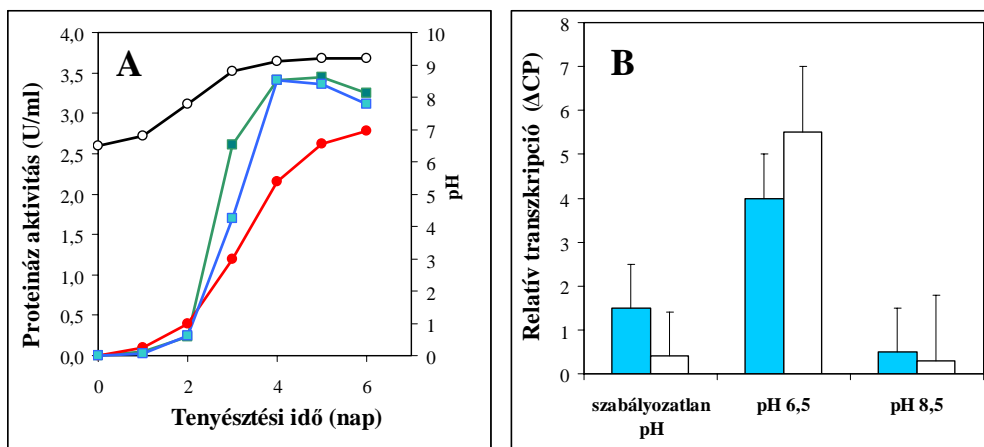


14. ábra Extracelluláris proteináz aktivitások az FGSC26 (kontroll), FGSC1079 ($\Delta brlA$), tNJ77.16 ($\Delta prtA$) és *creA* nullmutáns törzsek nem átmosott (A), glükózmentes minimál tápközegbe (B), valamint glükózmentes, élesztőkivonatot tartalmazó tápközegbe (C) átmosott tenyészetekben. Az enzimaktivitások az oltás után 48 (kék oszlopok) és 144 (fehér oszlopok) órával lettek lemerve. Az ábrán 4 független mérés átlaga és szórása van feltüntetve.

A tápközeg összetételének az extracelluláris proteináz termelésre gyakorolt hatását nem átmosott, glükózmentes minimál és élesztőkivonatot tartalmazó táptalajok alkalmazásával vizsgáltuk. A kontroll törzs esetében – az extracelluláris β -1,3-glükánáz aktivitáshoz hasonlóan - a glükózmentes minimál tápközegbe átmosott tenyészetekben nagyobb extracelluláris proteináz aktivitás volt mérhető,

mint a nem átvolt kultúrákban. Ez a jelenség nem a tápközeg élesztőkivonat tartalmával függhetett össze, mivel a legkisebb aktivitás a glükózmentes, élesztőkivonatot tartalmazó tápközegbe átvolt tenyészetekre volt jellemző (14. ábra). Néhány mutáns törzs azonban eltérően viselkedett. Míg a *creA* nullmutáns törzs nem átvolt kultúráiban a kontroll törzsnél jóval nagyobb extracelluláris proteináz aktivitás volt mérhető, ez az átvolt tenyészetekre kevésbé volt igaz (14. ábra). Emellett a $\Delta brlA$ törzs 144 órás, nem átvolt tenyészeit jelentős extracelluláris proteináz termelés jellemezte, ugyanakkor a glükózmentes minimál tápközegbe átvolt tenyészetekben a proteináz aktivitás a kontroll törzsből mérhető alatt maradt (14. ábra). Szintén különösen viselkedett a $\Delta prtA$ mutáns, amelynél – a $\Delta pepJ$ és $\Delta prtA\Delta pepJ$ törzsektől eltérően – a nem átvolt tenyészetekben az extracelluláris proteináz aktivitás a 144 órás tenyészetekben nagyobbak mutatkoztak, mint a glükózmentes minimál tápközegben (14. ábra).

3.2.4 A pH hatásának vizsgálata az extracelluláris proteináz termelésre



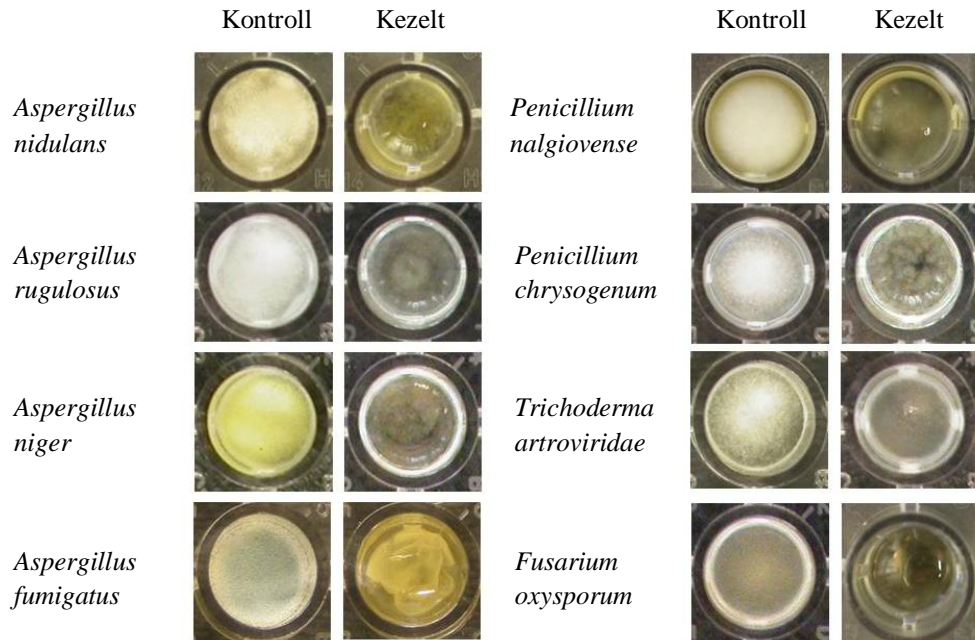
15. ábra A) Az extracelluláris proteináz aktivitás alakulása több különböző pH-n: pH 8,5 (zöld vonal), pH 6,5 (piros vonal), szabályozatlan pH (kék vonal). A fekete vonal a pH változást mutatja szabályozatlan körülmények között. Az ábrán 4 független mérés átlaga van feltüntetve, a szórás kevesebb volt, mint 10 %. B) A *prtA* (kék oszlopok) és *pepJ* (fehér oszlopok) gének relatív transzkripciója (ΔCP : az adott gén, és a referencia gén esetében kapott ciklusszámok különbsége) szabályozatlan pH-n, illetve pH 6,5 és pH 8,5 értékeken. Az RNS minták az oltástól számítva 3 napos tenyészetekből származtak. Az ábrán 4 független mérés átlaga és szórása van feltüntetve.

Fermentorban végzett kísérleteink alapján az extracelluláris proteináz termelés szabályozásában a pH is meghatározónak bizonyult. Nagyobb proteináz aktivitások voltak mérhetőek, ha a pH-t nem szabályoztuk, vagy pH 8,5-re állítottuk, mint amikor pH 6,5-ön tartottuk (15/A ábra). Ez a tendencia a *prtA* és *pepJ* gének transzkripciójában is megmutatkozott (15/B ábra). Emellett a PacC pH szabályozási útvonalban szerepet játszó transzkripciós faktor jelentősnek bizonyult a *prtA* szabályozásában (5. táblázat). A *pacC* hiánymutáns törzsben jelentősen visszaesett az extracelluláris proteináz termelés, ami – legalábbis részben – a *prtA* gén kisebb mértékű transzkripciójával függhetett össze (5. táblázat). Emellett – a korábbi eredményekkel összhangban – az autolizáló tenyészetben a pH folyamatos emelkedését figyeltük meg, a kiindulási pH 6,5-ös értékről egészen pH 9-ig (15/A ábra).

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

3.3.1 Az autolízis alatt termelődő extracelluláris enzimek antifungális hatásának vizsgálata

Arra a kérdésre kerestük a választ, hogy az *A. nidulans* FGSC26 kontroll törzsének extracelluláris enzimekben gazdag (glükózmentes minimál tápközegbe átmosott autolizáló tenyészetből származó) fermentleve rendelkezik-e antifungális hatással. Ennek érdekében a fermentlevet liofilizáltuk, majd a kis molekulatömegű (12600 Da-nál kisebb), esetlegesen szintén antifungális hatással bíró szekunder metabolitoktól és antifungális fehérjéktől dialízis segítségével szabadultunk meg. Az így nyert, mintegy húszszorosára töményített fermentlének különböző hígításait használtuk fel. A töményített fermentlé kétszeres hígításban gátolta az általunk vizsgált valamennyi gombafaj csírázását/növekedését (16. ábra).



16. ábra Az *Aspergillus nidulans* FGSC26 törzs húszszorosára töményített és dializált fermentlevének antifungális hatása különböző gombafajokkal szemben kétszeres hígításban. Az ábrán egy reprezentatív kísérlet eredménye látható.

Megvizsgáltuk több, hidroláz termelésben sérült mutáns *A. nidulans* törzs glükózmentes minimál tápközegbe átmosott tenyészetből származó töményített fermentlevének antifungális hatását is. A korábban vizsgált fajok közül az eredeti termelő törzset, az *A. nidulans* FGSC26-ot és egy jól detektálható módon reagáló fajt, a *P. nalgiovensét* választottuk ki. Az FGSC26 törzs töményített fermentleve hatékonyan gátolta a saját és a *P. nalgiovense* növekedését/csírázását még húszszoros hígításban is (6. táblázat). Ezzel szemben az alacsony hidroláz termelő képességgel rendelkező *fluG1* és $\Delta engA\Delta chiB$ mutáns törzsek töményített fermentleveinek esetében ez a gátlás elmaradt és a gátlás mértékének csökkenése jellemezte a $\Delta engA$ és $\Delta chiB$ törzsek töményített fermentleveit is (6. táblázat). A $\Delta pepJ$ törzs esetében ugyanakkor a gátlás az FGSC26 kontroll törzs töményített fermentlevénél tapasztaltnál hasonlóan alakult. A ChiB és EngA önmagukban is antifungális hatást fejtettek ki, de a PepJ esetében ez a hatás elmaradt (6. táblázat).

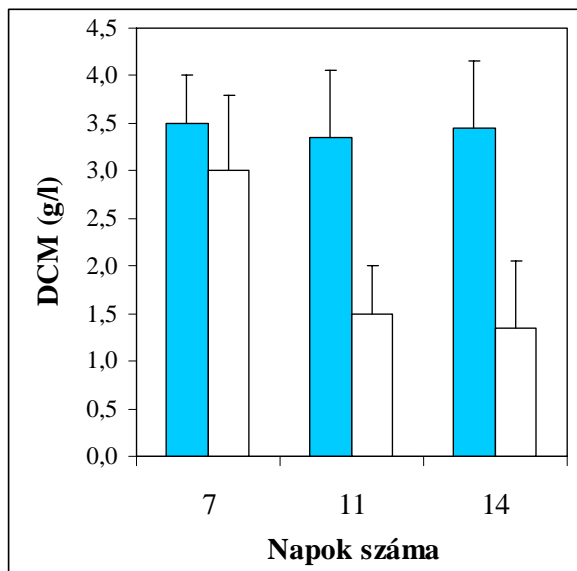
Minta	Növekedés (%)				
	Kontroll	Végző hígítás			
		2X	4X	10X	20X
FGSC26	100 ± 8	30 ± 5 *	52 ± 9 *	73 ± 11 *	85 ± 10 *
	100 ± 9	38 ± 7 *	49 ± 9 *	63 ± 10 *	85 ± 10 *
FGSC744 (<i>fluG1</i>)	100 ± 7	90 ± 9	94 ± 11	95 ± 8	98 ± 10
	100 ± 8	92 ± 8	94 ± 7	99 ± 10	101 ± 11
tNJ34.8 (<i>ΔengAΔchiB</i>)	100 ± 8	96 ± 7	92 ± 9	104 ± 12	99 ± 10
	100 ± 10	87 ± 9	92 ± 8	99 ± 11	97 ± 10
tNJ12 (<i>ΔchiB</i>)	100 ± 9	67 ± 12 *	78 ± 8 *	84 ± 9 *	94 ± 7
	100 ± 10	69 ± 8 *	78 ± 9 *	83 ± 9 *	95 ± 11
tNJ33.3 (<i>ΔengA</i>)	100 ± 10	64 ± 11 *	81 ± 9 *	89 ± 12	91 ± 11
	100 ± 10	53 ± 6 *	64 ± 9 *	75 ± 8 *	88 ± 11
tNJ76.7 (<i>ΔpepJ</i>)	100 ± 10	42 ± 9 *	57 ± 8 *	78 ± 7 *	87 ± 6 *
	100 ± 11	41 ± 9 *	58 ± 7 *	74 ± 8 *	85 ± 8 *
Tisztított	100 ± 11	59 ± 12 *	66 ± 9 *	79 ± 8 *	86 ± 9
ChiB	100 ± 9	43 ± 6 *	51 ± 7 *	64 ± 9 *	87 ± 9
Tisztított	100 ± 10	48 ± 6 *	56 ± 8 *	72 ± 10 *	81 ± 11 *
EngA	100 ± 8	49 ± 5 *	68 ± 7 *	89 ± 8	94 ± 9
Tisztított	100 ± 9	91 ± 8	91 ± 8	95 ± 10	102 ± 11
PepJ	100 ± 11	91 ± 9	95 ± 10	99 ± 11	97 ± 10

6. táblázat Különböző *Aspergillus nidulans* törzsek glükózmentes minimál tápközegre átmosott tenyészetéből származó fermentleveinek és a tisztított ChiB, EngA, PepJ hidrolázok hatása a *Penicillium nalgivense* (fekete) és az *Aspergillus nidulans* FGSC26 (piros) törzsek csírázására/növekedésére. A százalékok a növekedés mértékét mutatják az adott kontrollhoz képest. Az ábrán 4 független mérés átlagát és szórását tüntettem fel. A „*„**” jelölés az aktuális kontrolltól való szignifikáns eltérést mutatja (Student-féle t teszt; $p < 5\%$).

3.3.2 Az EngA és ChiB életképességre, növekedésre, konídiumképzésre és fajok közötti interakcióra gyakorolt hatásának vizsgálata

Az EngA és a ChiB extracelluláris hidrolázok az autolitikus sejtfal degradációban betöltött szerepükön túlmutató jelentőségének felderítése érdekében a *ΔengAΔchiB* kettős mutáns és a kontroll törzset több különböző szempontból is megvizsgáltuk. Az életképesség idő előrehaladtával bekövetkező csökkenését glükózmentes minimál tápközegbe átmosott tenyészetekben tanulmányoztuk. A kései autolitikus fázisban lévő tenyészetek életképességének megállapítása érdekében a mérést az atmoszféra követően 7, 11 és 14 nappal is elvégeztük. Amint az a 17. ábrán látható, a *ΔengAΔchiB* törzs életképessége többé-kevésbé állandó szintet

mutatott, míg a kontroll törzs életképességét az autolízis előrehaladtával folyamatosan csökkenő tendencia jellemezte.



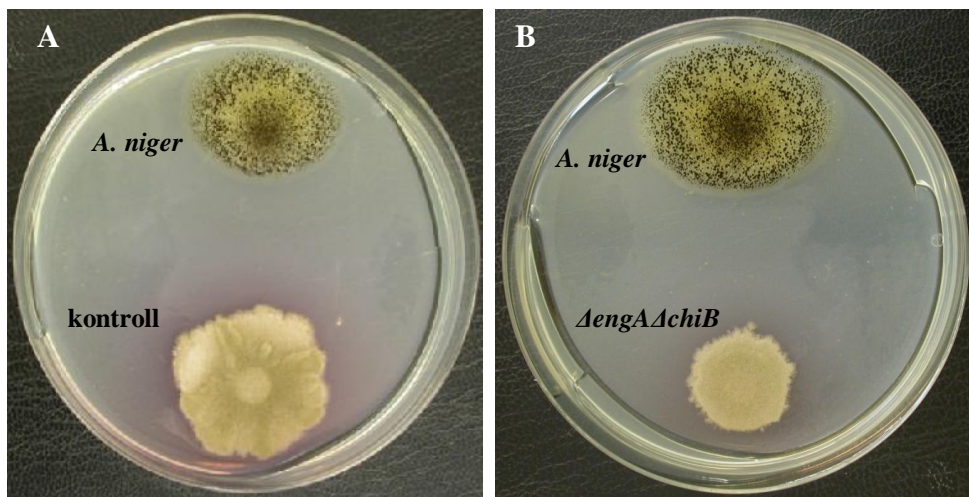
17. ábra Az életképesség változása a tNJ34.8 ($\Delta engA\Delta chiB$, kék oszlopok) és a tNJ36 (kontroll, fehér oszlopok) törzsek glükózmentes minimál tápközegre átváltott autolizáló tenyészetekben. A 7, 11 és 14 napos tenyészetekből származó mintákat friss, komplex tápközegbe helyeztük. Az ábra a 15 óra növekedés utáni száraztömeg (DCM) értékeket mutatja. Az ábrán 4 független mérés átlaga és szórása van feltüntetve.

A növekedés és a konídiumtermelő képesség összehasonlítását célzó vizsgálataink alkalmával a szénforrásként glükózt tartalmazó tápközegen a két törzs növekedésében nem láttunk különbséget (7. táblázat). Azonban ha a tápközeg glükóz helyett Na-acetátot és/vagy élesztőkivonatot tartalmazott, a $\Delta engA\Delta chiB$ kettős mutáns törzs növekedése alulmaradt a kontroll törzssel szemben (7. táblázat). A $\Delta engA\Delta chiB$ törzset ugyanakkor jobb konídiumképzés jellemezte; a képződött konídiumok száma a kontroll törzs esetében alacsonyabbnak mutatkozott a vizsgált körülmények között (7. táblázat).

Az EngA és a ChiB az *A. niger*rel szemben mutatott interakcióra gyakorolt hatásának tanulmányozásakor a kontroll törzs az *A. niger* növekedésének hatékonyabb gátlására volt képes, mint a $\Delta engA\Delta chiB$ kettős mutáns törzs (18. ábra).

Tápközeg összetétele	Növekedési ráta (mm/nap)		Konídiumképzés (millió konídium/cm ²)	
	tNJ34.8 (<i>ΔengAΔchiB</i>)	tNJ36.1 (kontroll)	tNJ34.8 (<i>ΔengAΔchiB</i>)	tNJ36.1 (kontroll)
10 g/l glükóz	4,8 ± 0,4	5,0 ± 0,5	54 ± 8*	42 ± 7
5 g/l élesztő kivonat	9 ± 1*	11 ± 1	17 ± 3*	9 ± 2
10 g/l Na-acetát	5 ± 0,4*	6,2 ± 0,5	3,8 ± 0,4*	2,6 ± 0,4
10 g/l Na-acetát, 5 g/l élesztőkivonat	3,6 ± 0,3*	4,7 ± 0,4	46 ± 8*	29 ± 6

7. táblázat A tNJ36.1 (kontroll) és tNJ34.8 (*ΔengAΔchiB*) törzsek növekedésének és konídiumtermelő képességének összehasonlítása különböző tápközegeken. A mérés az oltástól számított 7. napon történt. A táblázatban 5 független mérés átlaga és szórása van feltüntetve. A „*„ jelölés a kontroll törzsnél mért értéktől való szignifikáns eltérést mutatja (Student-féle t teszt; $p < 5\%$).



18. ábra Az *Aspergillus nidulans* tNJ36.1 (kontroll; A) és tNJ34.8 (*ΔengAΔchiB*; B) törzsek az *Aspergillus niger* VG1 törzsszel szemben növesztve. A fotók az *Aspergillus nidulans* törzsek oltásától számított 11. napon készültek. A képen egy reprezentatív kísérlet eredménye látható.

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

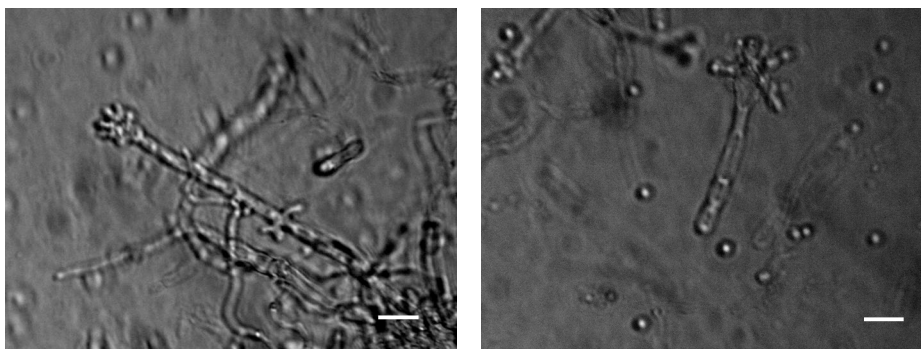
A microarray vizsgálat során egy növekvő és egy szénforrás éhező tenyészet transzkripció mintázatát hasonlítottuk össze azon, a szénéhezés hatására indukálódó és represszálódó gének azonosítása céljából, amelyek esetlegesen az autolízis folyamatában is szerepet játszhatnak. A 20 órás, növekvő tenyészeteket glükózmentes minimál tápközegbe (szénforrás éhező tenyészet), és 10 g/l glükózt tartalmazó minimál tápközegbe mostuk át (növekvő tenyészet).

Vizsgált paraméterek	Növekvő tenyészet	Szénéhező tenyészet
Glükóz tartalom (g/l)	9 ± 0,5	0*
Extracelluláris β-1,3-glükanáz aktivitás (U/ml)	2 ± 0,3	9 ± 1*
Extracelluláris β-glükozidáz aktivitás (U/ml)	0,24 ± 0,03	0,9 ± 0,08*
Extracelluláris proteináz aktivitás (U/ml)	0,2 ± 0,03	1,3 ± 0,2*
Extracelluláris kitináz aktivitás (U/ml)	0,2 ± 0,03	0,88 ± 0,3*
Szuperoxid tartalom (pmol Et/mg DCM)	0,03 ± 0,01	0,06 ± 0,01*
Peroxid tartalom (pmol DCF/mg DCM)	0,5 ± 0,1	0,8 ± 0,1*
Száraztömeg változás (g/l)	1 ± 0,1	0 ± 0,1*
pH	6,6 ± 0,1	6,7 ± 0,1
Vakuolizáció	Nincs	Van
Konidiogenezis	Nincs	Nincs
Szterigmatocisztin termelés	Nincs	Nincs
Fragmentáció	Nincs	Nincs

8. táblázat Az autolízissel kapcsolatba hozható néhány paraméter vizsgálata az FGSC26 törzs 10g/l glükózt tartalmazó (növekvő), illetve glükózmentes minimál tápközegbe (szénéhező) átmosott tenyészeiben az átmosást követően 4 órával. A táblázatban 5 független mérés átlaga és szórása van feltüntetve. A „*” jelölés a növekvő tenyészetben tapasztaltaktól szignifikáns eltérést jelöli (Student féle t-teszt $p < 5\%$).

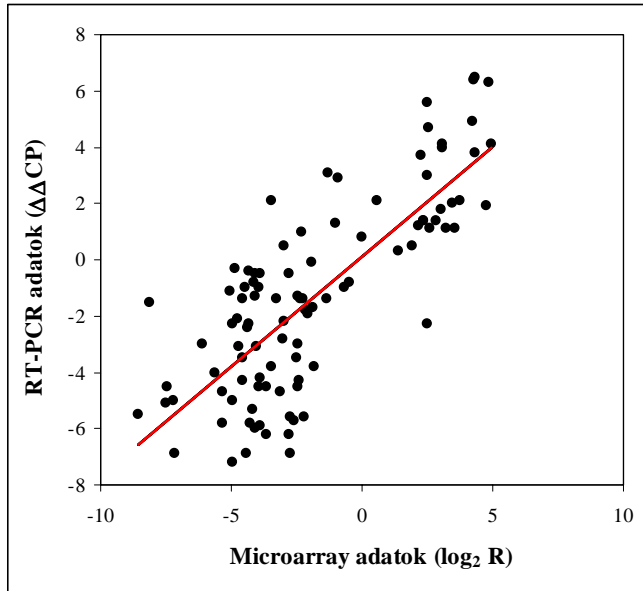
A mintavétel időpontját úgy választottuk meg, hogy a tenyészetek között a klasszikus fiziológiai módszerekkel is jól detektálható különbségek legyenek (8. táblázat). A mintavétel időpontjában a szénéhező tenyészetet magasabb extracelluláris enzimaktivitások jellemezték, bár azok még nem érték el az idősebb tenyészetekre jellemző szintet (8. táblázat). Ezzel összhangban sem száraztömeg

csökkenés, sem fragmentáció nem jellemezte még a tenyészetet, azonban a vakuolizáció már megfigyelhető jelenség volt. A szénéhező tenyészetben a szuperoxid és peroxid tartalom magasabbnak mutatkozott, mint a növekvő tenyészet esetében (8. táblázat), összehangban a korábban tapasztaltakkal (Emri és munkatársai 2004a). A mintavétel időpontjában sem konidiofórok és konídiumok képződését, sem szterigmatocisztin termelést nem tapasztaltunk. Érdekes azonban kihangsúlyozni, hogy a szénéhező tenyészetben 24 órával később a sejtek már jelentős mennyiségű (1-2 mg/g DCM) szterigmatocisztint tartalmaztak és gyengén differenciált konidiofórok jelentek meg, amelyekre szintén jellemző volt a vakuolizáció és röviddel megjelenésük után leváltak, letöredeztek a hifákról (19. ábra).



19. ábra Konidiofór és konídiumok az *Aspergillus nidulans* FGSC26 törzs szénéhező, süllyesztett tenyészetében (oltástól számított 48 h). Bar = 5 μ m.

A microarray vizsgálat alapján a szénforrás éhezés hatására összesen 1676 gén aktivitásában tapasztaltunk változást, ebből 816 repressziót, 860 pedig indukciót mutatott. RT-PCR vizsgálatot 99 gén esetében végeztünk. Az éhező és növekvő tenyészetekre kapott Δ CP értékek különbsége, a $\Delta\Delta$ CP jó korrelációt mutatott a microarray adatokkal ($\log_2 R$), a korrelációs koefficiens 0,78 volt (20. ábra). Az indukálódott és represszálódott géneket feltételezett, illetve ismert funkciójuk alapján csoportosítottuk (9. táblázat).



20. ábra Korreláció a 99 kiválasztott gén microarray ($\log_2 R$ értékei) és RT-PCR adatai ($\Delta\Delta CP$) között. A korrelációs koefficiens 0,78.

Feltételezett funkció (kódolt fehérje)	Szénéhezésre indukálódó gének	Szénéhezésre represszálódó gének
Szénhidrát anyagcsere, légzés (a sejtfal poliszacharidok metabolismusában részt vevő gének kivételével) (összesen)	52	78
Glikolízis és kapcsolódó folyamatok	1	6
Glükoneogenezis, szénhidrát és szacharid bioszintézis	2	12
Pentóz-foszfát útvonal	1	6
Citromsav ciklus és kapcsolódó folyamatok	3	4
Légzés és kapcsolódó fehérjék	1	14
Hidrolázok, szacharid degradáció	26	23
Cukor-alkohol metabolismus	5	4
Transzport	13	9
Lipid anyagcsere (összesen)	35	31
Ergoszterol bioszintézis és kapcsolódó fehérjék	4	6
Zsírsvav szintézis és kapcsolódó fehérjék	3	7
Zsírsvavbontás és kapcsolódó fehérjék	12	4
Foszfolipid, szfingolipid metabolismus	4	6
Lipázok, foszfolipázok, észterázok, kutinázok	11	8
Transzport	1	0
Nitrogén anyagcsere (összesen)	59	36
Nitrát hasznosítás	0	3
Aminosav, nukleotid bioszintézis	8	9
Aminosav, nukleotid bontás és bioszintézis	6	3
Aminosav, nukleotid bontás	14	5
Nukleázok	7	0

Proteinázok	17	6
Transzport	7	10
Sejtfal anyagcsere (összesen)*	21	10
β-glükán szintézis	0	5
β-glükán hidrolízis	4	0
Kitin szintézis	1	2
Kitin hidrolízis/hasznosítás	8	1
α-glükán szintézis	1	1
α-glükán hidrolízis	3	0
Hidrofobinok	4	0
Egyéb sejtfal fehérjék	0	1
Redox homeosztázis és DNS repair (összesen)	19	14
Katalázok, szuperoxid dizmutázok, peroxidázok	5	5
Glutation metabolizmus	3	5
Tioredoxin metabolizmus	1	1
Repair	10	3
Autofágiában, ubikvitinációban érintett és proteoszóma fehérjék (összesen)	4	5
Autofágia	3	0
Ubikvitináció	1	2
Proteoszóma	0	3
Fehérjeszintézis és kapcsolódó fehérjék (összesen)	50	16
Transzkripció, transláció és kapcsolódó fehérjék	22	9
Folding, posztranszlációs módosítás, szállítás és kapcsolódó fehérjék	28	7
Szabályozás, jelátviteli fehérjék (összesen)	46	46
Transzkripciós faktorok, transzkripcionális regulátorok	29	27
Egyéb	17	19
Fajok közötti inteakciókban résztvevő fehérjék (összesen)	17	5
Antifungális fehérjék	2	0
Bakteriális sejtfal bontás	3	0
Penicillin szintézis	3	0
Szterigmatocisztin szintézis	0	1
Melanin szintézis	4	1
Nem-riboszomális peptid szintézis	2	1
Poliketid szintézis	3	2
Vegyes (összesen)	205	235
Nem karakterizált fehérjék (összesen)	352	340
Összesen	860	816

9. táblázat A microarray kísérletekben indukálódott és represszálódott gének funkció szerinti csoportosítása. „*”- a génlista de Groot és munkatársainak (2009) cikke alapján lett összeállítva és a kitin oligomerek lebontásában potenciónalisán résztvevő intracelluláris enzimeket kódoló génekkel lett kiegészítve.

A szénéhezés hatására a microarray adatok alapján valószínűsíthető változások közül az alábbiakat szeretném kiemelni (9. táblázat):

- 1) A glükóz aerob lebontásához köthető folyamatok (glikolízis, pentóz-foszfát út, citrát kör, légzés) aktivitása - transzkripcionális szinten - csökkent.
- 2) A lipid-anyagcserében a szintézis-lebontás egyensúlya a lebontás irányába mozdult el. Számos, észterkötés hasítására képes hidrolázt kódoló gén indukálódott.
- 3) A nitrát hasznosításához köthető gének represszálódtak. Az aminosav, nukleotid anyagcserében a hangsúly a lebontó folyamatokra helyeződött át, amit nukleázok és proteinázok képződése kísért.
- 4) A sejtfal anyagcserében érintett gének közül számos hidrolitikus enzimet kódoló gén indukálódott (kitin, β -glükán és α -glükán hidrolízis), a sejtfalalkotók szintéziséért felelős gének ugyanakkor represszálódtak.
- 5) Több hidrofobint kódoló gén indukálódott.
- 6) A redox homeosztázisban szerepet játszó gének (antioxidáns enzimek, glutation metabolizmus) aktivitásában változás következett be.
- 7) Autofágiában közreműködő gének indukálódtak.
- 8) A szénéhezés hatására csak kevés, a fehérje szintézishez (transzkripció, transláció, folding, poszttranszlációs módosítások, intracelluláris szállítás) köthető gén represszálódott, számos ilyen funkciójú gén indukálódott.
- 9) Több, szekunder metabolitok képződésében érintett gén indukciója mellett kisméretű antifungális fehérjéket és antibakteriális hidrolázokat kódoló gének is indukálódtak. A melanin szintézisben érintett gének ugyancsak indukciót mutattak.

Az RT-PCR-es vizsgálatainkkal a 10. táblázatban bemutatott gének aktivitásváltozását teszteltük. Ezek közül az alábbiakat szeretném kiemelni:

- 1) A glikolízisben közreműködő *gpdA* (glicerinaldehid-3-foszfát dehidrogenázt kódoló), a pentóz-foszfát útvonalban szerepet játszó *gsdA* (glükóz-6-foszfát dehidrogenáz), és a *citA* citrát szintetázt kódoló gén, a feltehetőleg a citokróm C oxidázt (AN10585) és az alternatív oxidázt (*aoxA*) kódoló génekkel együtt represszálódtak. Az *mstE* kis affinitású glükóz transzportert kódoló és az AN3357 feltételezett monoszacharid transzportert kódoló gének represszálódtak a fruktóz-2,6-biszfoszfát szintéziséért felelős *pfkZ* génnel együtt.

- 2) Az *mstA*, AN5104, AN8347 és AN9168 feltehetőleg cukor transzportereket kódoló gének, valamint a *hxtA* nagy affinitású glükóz transzportert kódoló gén indukciót mutattak a *bglM* β -glükozidázt kódoló génnel együtt.
- 3) A *tpsA* trehalóz-6-foszfát szintetáz alegységét kódoló gén repressziót mutatott, azonban a *treA* savas trehalázt kódoló gén indukálódott.
- 4) A *chsF*, *chsB* kitin szintetáz és a növekedő tenyészetekben aktív *chiA* kitinázt kódoló gének represszálódtak, a *chiB* kitinázt és a *nagA* N-acetil- β -D-glükózaminidázt kódoló gének indukálódtak. A kitin monomerek hasznosításában fontos kitin dezacetilázt (AN9380), N-acetilglükózamin-6-foszfát-dezacetilázt (AN1428) és glükózamin-6-foszfát-izomerázt (AN1418) kódoló gének szintén indukálódtak.
- 5) A növekedő tenyészetekben aktív *fksA* β -1,3-glükán szintetáz, *gela* és *gelE* β -1,3-transzglükolizázok, az AN10779 β -1,6-glükán transzglükozidáz, valamint az *eglC* β -1,3-endoglükánáz egyaránt represszálódtak. Az *engA* β -1,3-endoglükánáz, az AN0245 β -1,3(4)-endoglükánáz és az AN0779, illetve az AN4825 feltehetőleg β -1,3-exoglükánázokat kódoló gének indukálódtak.
- 6) Az *agsB* α -1,3-glükán-szintetáz alegységet kódoló gén repressziót, míg a *mutA* α -1,3-glükánázt kódoló gén indukciót mutatott.
- 7) Az AN7539 feltételezett hidrofobint kódoló gén represszálódott, míg a *rodA* hidrofobint kódoló gén indukálódott. A sejtfal integritás útvonalaéhoz tartozó *mpkA* és *rlmA* gének nem mutattak indukciót szénéhezés hatására.
- 8) A feltehetőleg az ergoszterol bioszintézishez kötődő hidroximetil-glutaril-CoA szintetázt kódoló AN4923 gén represszálódott a *fasB* zsírsav szintetázt kódoló génnel együtt. Az AN8242 lipázt és az AN6464 észterázt feltehetőleg kódoló gének indukálódtak.
- 9) A *niaD* nitrát reduktazt és a *niiA* nitrit reduktazt kódoló gének represszálódtak, míg a tirozin lebontásában fontos 4-hidroxifenilpiruvát-dehidrogenázt kódoló *hpdA* gén indukálódott.
- 10) Több, feltehetőleg proteinázt (*prtA*, *pepJ*, *pepI*, az AN8445, AN6438, AN2572, AN8498, AN2237) és nukleázt kódoló gén (AN1723, AN11897, AN11062)

indukcióját is megerősítettük. Emellett kimutattuk a glutamináz A-t kódoló *gtaA* gén indukcióját is.

11) A glutation lebontásáért felelős, feltehetőleg γ -glutamil transzpeptidázt kódoló gének közül mind az AN5658, mind az AN10444 indukálódott, azonban az AN3150 feltehetőleg γ -glutamil-cisztein szintázt kódoló gén aktivitása lényegesen nem változott.

12) Az AN1131 és a *sodB* gének által kódolt szuperoxid dizmutázok indukálódtak, a *sodA*, *catA* és *catB* kataláz gének viszont represszálódtak. A NADPH dehidrogenázt kódoló *noxA* gén nem mutatott indukciót.

13) A feltehetőleg az autofágiában érintett AN5174 és AN2876 gének (a *S. cerevisiae* Atg5 és Atg22 ortológjai) indukálódtak a *tipA* TOR útvonal gátlásában szerepet játszó génnel együtt. A metakaspázt kódoló *casA* gén ugyanakkor nem mutatott indukciót.

14) A fehérje foldingban közreműködő *pdiA* diszulfid izomerázt kódoló gén, a poszttranszlációs módosításban fontos α -1,2-mannozidázzal (*mns1B*) együtt indukálódtak, az intracelluláris szállításban fontos gének (AN2738, AN1117) mellett. Az „Unfolded Protein Response” folyamatában közreműködő *hacA* transzkripciós faktor szintén indukciót mutatott.

15) Az anizin antifungális fehérjét és feltehetőleg egy hozzá hasonló fehérjét kódoló gén (AN11510), valamint a bakteriális sejtfalat hidrolizáló N,O-diacetil-muramidázt kódoló gének (AN6470) indukciót mutattak. Indukálódott az AN9129, feltételezhetően nem riboszómális peptid szintetázt kódoló gén a konidiofor pigmentációjáért felelős *ivoA* génnel és a melanin szintézisében érintett AN0230 feltehetőleg tirozinázt kódoló génnel együtt. Az *aflR* szterigmatocisztin bioszintézisben közreműködő transzkripciós faktor ugyancsak indukciót mutatott.

16) A *brlA* és az *xprG* transzkripciós faktorokat kódoló gének indukciója szintén megfigyelhető volt az AN2265, feltehetőleg Ser/Thr protein kinázt kódoló gén indukciójával együtt.

Gén azonosító	(Feltételezett) géntermék	Log ₂ R	RT-PCR adatok	
			Növekvő tenyészet (ΔCP)	Szénéhező tenyészet (ΔCP)
Szénhidrát anyagcsere (a sejtfal metabolizmusban érintett gének kivételével)				
AN5144	Feltételezett 6-foszfofrukto-2-kináz (PfkZ)	2,55	5,3 ± 0,8	10 ± 1*
AN8041	Glicerinaldehid-3-foszfát-dehidrogenáz (GpdA) [1]	3,05	-3,2 ± 0,4	-1,4 ± 0,3*
AN2981	Feltételezett glükóz-6-foszfát-1-dehidrogenáz (GsdA)	2,37	-0,7 ± 0,2	0,7 ± 0,2*
AN8275	Citrát szintetáz (CitA) [2]	3,54	5,1 ± 0,5	6,2 ± 0,5*
AN2099	Feltételezett alternatív oxidáz (AoxA)	2,17	7 ± 0,6	8,2 ± 0,6*
AN10585	Feltételezett citokróm C oxidáz	2,57	-3,9 ± 0,4	-2,8 ± 0,1*
AN5523	Trehalóz-6-foszfát-szintetáz alegység (TpsA) [3]	2,37	3 ± 0,3	4,4 ± 0,5*
AN9340	Savas trehaláz (TreA) [4]	-2,14	3,9 ± 0,5	2,1 ± 0,3*
AN7396	Feltételezett β-glükozidáz (BglM)	-7,47	12,6 ± 1	8,1 ± 0,7*
AN6620	Glikozil hidroláz domént tartalmazó fehérje	-4,84	4 ± 0,5	3,7 ± 0,3
AN2017	Feltételezett α-glükozidáz (AglA)	-3,00	5,4 ± 0,4	5,9 ± 0,6
AN5860	Alacsony affinitású glükóz transzporter (MstE) [5]	4,26	3 ± 0,2	9,4 ± 0,8*
AN3357	Feltételezett MFS monoszacharid transzporter	4,78	13,1 ± 0,9	15 ± 1*
AN8737	Feltételezett MFS monoszacharid transzporter (MstA)	-4,04	6,6 ± 0,7	3,5 ± 0,4*
AN6923	Nagy affinitású hexóz transzporter (HxtA) [6]	-2,77	5,6 ± 0,4	-0,9 ± 0,2*
AN5104	Feltételezett MFS monoszacharid transzporter	-2,39	5,3 ± 0,6	1 ± 0,2*
AN8347	Feltételezett hexóz transzporter	-4,77	6 ± 0,7	3,9 ± 0,4*
AN9168	Feltételezett cukor transzporter	-1,85	6,6 ± 0,8	2,8 ± 0,3*
AN6669	Feltételezett MFS monoszacharid transzporter	-1,9	14,1 ± 1	14 ± 1,2
Lipid anyagcsere				
AN8242	Feltételezett lipáz	-3,13	7,1 ± 0,8	2,4 ± 0,4*
AN6464	Feltételezett észteráz	-5,35	12,3 ± 1	6,5 ± 0,8*
AN4923	Feltételezett hidroxil-metil-glutaril-coA szintetáz	3,08	0,6 ± 0,1	4,7 ± 0,7*
AN9408	Zsírsvav szintetáz (FasB) [7]	3,23	0,4 ± 0,2	1,5 ± 0,3*
Nitrogén anyagcsere				
AN1006	Nitrát reduktáz (NiaD) [8]	4,21	6,1 ± 0,7	11 ± 0,9*
AN1007	Nitrit reduktáz (NiiA) [8]	4,33	-3 ± 0,3	3,5 ± 0,4*
AN1899	4-hidroxifenilpiruvát-dioxigenáz (HpdA) [9]	-8,58	12 ± 0,9	6,5 ± 0,6*
AN8559	Feltételezett 2-oxoizovaleriát dehidrogenáz	-3,88	9,9 ± 0,8	9,4 ± 1
AN5558	Alkalikus proteináz (PrtA) [10]	-4,58	4,9 ± 0,5	0,6 ± 0,2*
AN7962	Metalloproteináz (PepJ)	-2,47	4 ± 0,4	1 ± 0,2*

AN3393	Feltételezett deuterolizin típusú metalloproteináz (Pepl)	-4,22	11,9 ± 1,2	7,4 ± 0,7*
AN8445	Feltételezett aminopeptidáz [11]	-5,33	5,7 ± 0,7	1 ± 0,2*
AN6438	Feltételezett dipeptidil peptidáz [11]	-3,93	3 ± 0,3	-1,5 ± 0,1*
AN2572	Feltételezett dipeptidil peptidáz	-4,96	12,1 ± 1,1	9,8 ± 0,9*
AN8498	Feltételezett proteináz	-1,87	2,7 ± 0,3	1 ± 0,2*
AN2237	Feltételezett karboxipeptidáz [11]	-0,66	3,6 ± 0,4	2,6 ± 0,4*
AN2092	Feltételezett prolyl aminopeptidáz (PapA)	-4,48	15,5 ± 1,3	14,5 ± 1,2
AN4282	Feltételezett aminopeptidáz	-5,05	11,3 ± 0,9	10,2 ± 1
AN1723	Feltételezett ribonukleáz T1	-7,48	7,8 ± 0,8	2,7 ± 0,2*
AN11897	Feltételezett ribonukleáz T2	-4,11	3,3 ± 0,4	2 ± 0,1*
AN11062	Feltételezett L-PSP endoribonukleáz	-7,21	5,9 ± 0,6	0,9 ± 0,2*
AN4809	Feltételezett glutamináz A (GtaA)	-3,66	6,4 ± 0,6	1,9 ± 0,3*
Sejtfal anyagcsere				
AN4367	Feltételezett kitin szintetáz (ChsF) [12, 13]	3,09	7 ± 0,6	11 ± 1,2*
AN2523	Kitin szintetáz (ChsB) [12, 14]	-0,92	4,7 ± 0,6	7,6 ± 0,7*
AN8710	Feltételezett kitin bioszintézis protein	-2,32	2,7 ± 0,6	3,7 ± 0,7
AN8241	Kitináz (ChiA) [12, 15]	4,94	4,4 ± 0,5	8,5 ± 1*
AN4871	Kitináz (ChiB) [12, 16]	-3,47	4 ± 0,6	0,2 ± 0,1*
AN9390	Feltételezett kitináz (ChiC) [12]	-4,14	12,3 ± 1	11,5 ± 0,9
AN9380	Kitin dezacetiláz [12, 17]	-8,14	3,1 ± 0,4	1,6 ± 0,3*
AN1502	N-acetilglükózaminidáz (NagA) [12, 18]	-4,69	4,1 ± 0,4	1 ± 0,2*
AN1418	Feltételezett glükózamin-6-foszfát-izomeráz	-4,39	3,4 ± 0,5	1 ± 0,2*
AN1428	Feltételezett N-acetilglükózamin-6-foszfát-dezacetiláz	-6,10	7,5 ± 1	4,5 ± 0,6*
AN3729	β-1,3-glükán szintetáz komplex katalitikus alegység (FksA) [12, 19]	-1,30	4,7 ± 0,6	7,8 ± 0,8*
AN7657	Feltételezett β-1,3-transzglükóziláz (GelA) [12]	2,82	-1,8 ± 0,3	-0,4 ± 0,2*
AN7511	Feltételezett β-1,3-transzglükolizáz (GelE) [12]	3,74	3,8 ± 0,5	5,9 ± 0,7*
AN10779	Feltételezett β-1,6-glükán transzglükózidáz [12]	3,45	12 ± 1	14 ± 1,1*
AN7950	β-1,3-endoglükánáz (EglC) [12, 20]	2,27	1,7 ± 0,3	5,4 ± 0,6*
AN0472	β-1,3-endoglükánáz (EngA)	-2,75	9 ± 1,3	2,1 ± 0,4*
AN0245	Feltételezett β-1,3(4)-glükánáz [12]	-5,62	4,8 ± 0,6	0,8 ± 0,2*
AN0779	Feltételezett β-1,3-exoglükánáz [12]	-1,34	2,5 ± 0,3	1,1 ± 0,2*
AN4825	Feltételezett β-1,3-exoglükánáz [12]	-4,44	6,3 ± 0,7	-0,6 ± 0,2*
AN3307	Feltételezett α-1,3-glükán-szintetáz komplex katalitikus alegység (AgsB) [12]	4,35	2,9 ± 0,4	6,7 ± 0,7*
AN7349	α-1,3-glükánáz (MutA) [12, 21]	-3,66	9,8 ± 1	3,6 ± 0,3*
AN7539	Feltételezett hidrofobin [12]	2,48	-1,2 ± 0,2	4,4 ± 0,4*
AN8803	Hidrofobin (RodA) [12, 22]	-2,74	7 ± 0,7	1,4 ± 0,2*
AN0940	Feltételezett hidrofobin [12]	-4,31	4,3 ± 0,5	3,9 ± 0,4
AN5666	MAP protein kináz (MpkA) [12, 23]	-0,01	15,3 ± 1,2	16,1 ± 1,3
AN2984	Transzkripció faktor (RlmA) [12, 24]	1,90	1,3 ± 0,3	1,8 ± 0,3

Glutation anyagszere, tioredoxin anyagszere, katalázok, szuperoxid dizmutázok

AN3150	Feltételezett glutamát-cisztein ligáz	1,40	3,6 ± 0,4	3,9 ± 0,3
AN5658	Feltételezett γ -glutamil-transzpeptidáz	-2,97	5,4 ± 0,5	3,2 ± 0,4*
AN10444	Feltételezett γ -glutamil-transzpeptidáz	-3,04	5,6 ± 0,6	2,8 ± 0,2*
AN5652	Feltételezett hidantoináz/5-oxoprolináz	-3,44	2,5 ± 0,4	4,6 ± 0,6*
AN8218	Feltételezett tioredoxin reduktáz (TrxB)	-2,79	3 ± 0,4	2,5 ± 0,3
AN0241	Szuperoxid dizmutáz (SodA) [25]	0,58	0,1 ± 0,1	2,2 ± 0,3*
AN5577	Feltételezett Mn szuperoxid dizmutáz (SodB)	2,50	4 ± 0,3	1,7 ± 0,2*
AN1131	Feltételezett Cu/Zn szuperoxid dizmutáz	-4,57	3,8 ± 0,5	0,3 ± 0,1*
AN8637	Kataláz A (CatA) [26]	4,86	9,3 ± 1	15,6 ± 1,3*
AN9339	Kataláz B (CatB) [27]	2,48	3 ± 0,4	6 ± 0,5*
AN5918	Kataláz C (CatC) [28]	-3,93	5,5 ± 0,7	4,5 ± 0,6

Autofágiában érintett gének

AN5174	Feltételezett autofágiás fehérje (Atg5) [29]	-4,58	14 ± 0,8	12,6 ± 0,7*
AN2876	Feltételezett autofágiás fehérje (Atg22) [29]	-3,91	6,4 ± 0,5	2,2 ± 0,2*
AN5814	Feltételezett TOR útvonalban szerepet játszó fehérje (TipA) [30]	-2,07	4,8 ± 0,5	2,9 ± 0,2*

Foldingban, posztranszlációs módosításban, intracelluláris szállításban érintett gének

AN9397	Transzkripciós faktor (HacA) [31]	-2,28	2,6 ± 0,2	1,2 ± 0,1*
AN7436	Feltételezett diszulfid-izomeráz (PdiA)	-2,52	5,1 ± 0,5	1,6 ± 0,3*
AN0787	Feltételezett α -1,2-mannoizidáz (Mns1B)	-4,31	2,5 ± 0,3	0,2 ± 0,1*
AN2738	Feltételezett COPII vezikula membrán protein	-3,25	4,5 ± 0,5	3,1 ± 0,4*
AN1117	Feltételezett COPII vezikula membrán protein	-2,47	2,1 ± 0,2	0,8 ± 0,1*

Szekunder metabolit termelésben, fajok közötti interakcióban részt vevő gének

AN2091	Feltételezett tirozin dekarboxiláz	-4,08	3,9 ± 0,3	3,4 ± 0,4
AN0230	Feltételezett tirozináz [32]	-4,07	5,6 ± 0,7	-0,4 ± 0,1*
AN10576	Nem riboszómális peptid szintetáz (IvoA) [33]	-4,20	8,2 ± 0,8	2,9 ± 0,4*
AN9129	Feltételezett nem riboszómális peptid szintetáz	-3,91	11,3 ± 1,1	5,4 ± 0,6*
AN7820	C6 transzkripciós faktor (AflR) [34]	-2,62	6 ± 0,7	0,3 ± 0,1*
AN6470	N,O-diacetil-muramidáz [35]	-7,16	9,1 ± 1	2,2 ± 0,4*
AN5046	Anizin [36]	-4,96	7,5 ± 0,8	2,5 ± 0,3*
AN11510	Feltételezett atezin	-4,95	12,8 ± 1,2	5,6 ± 0,5*

Egyéb

AN1414	Transzkripciós faktor (XprG) [37]	-2,36	2,2 ± 0,3	0,8 ± 0,2*
AN0973	Transzkripciós faktor (BrlA) [38]	-4,28	8 ± 1	2,2 ± 0,3*
AN2265	Feltételezett szerin/treonin protein kináz	-2,20	5,5 ± 0,5	-0,1 ± 0,2*
AN5457	NADPH oxidáz (NoxA) [39]	-1,00	0,4 ± 0,2	0,7 ± 0,2
AN5712	Feltételezett metakaspáz (CasA) [40]	-0,48	-1 ± 0,2	-0,8 ± 0,2

10. táblázat Az RT-PCR-rel ellenőrzött gének relatív transzkripciója (Δ CP: az adott gén, és a referencia gén esetében kapott ciklusszámok különbsége) és \log_2 R értékei (\log_2 R < -2

indukciót, $\log_2 R > 2$ repressziót mutat szénforrás éhezés hatására). A mintavétel a glükózmentes minimál (szénéhező tenyészet) és a 10 g/l glükózt tartalmazó (növekvő tenyészet) táptalajra való átmosást követően 4 órával történt. Az RT-PCR adatok esetében 4 független mérés átlagát és szórását tüntettem fel. A „*” jelölés a két tenyészet közötti szignifikáns eltérést jelöli (Student-féle t teszt; $p < 5\%$). A gének annotálása a Broad Institute és az *Aspergillus* Genome Database adatbázis mellett az alábbi források felhasználásával történt. Az adatokat a GO számokkal is egybevetettük.

1- Punt és munkatársai 1988; 2- Park és munkatársai 1997; 3- Fillinger és munkatársai 2001; 4-d'Enfert és Fontaine 1997; 5- Forment és munkatársai 2006; 6- Wei és munkatársai 2004; 7- Brown és munkatársai 1996; 8- Johnstone és munkatársai 1990; 9- da Silva Ferreira és munkatársai 2006; 10- Peña-Montes és munkatársai 2008; 11- Schneider és munkatársai 2010; 12- de Groot és munkatársai 2009; 13- Horiuchi 2009; 14- Borgia és munkatársai 1996; 15- Yamazaki és munkatársai 2008; 16- Erdei és munkatársai 2008; 17- Alfonso és munkatársai 1995; 18- Kim és munkatársai 2002; 19- Kelly és munkatársai 1996; 20- Choi és munkatársai 2005; 21- Wei és munkatársai 2001; 22- Stringer és munkatársai 1991; 23- Bussink és munkatársai 1999; 24- Fujioka és munkatársai 2007; 25- Oberegger és munkatársai 2000; 26- Navarro és munkatársai 1996; 27- Kawasaki és munkatársai 1997; 28- Kawasaki és Aguirre 2001; 29- Kiel és van der Klei 2009; 30- Fitzgibbon és munkatársai 2005; 31- Saloheimo és munkatársai 2003; 32- Nahlik 2007; 33- Birse és Clutterbuck 1990; 34- Yu és munkatársai 1996b; 35- Bauer és munkatársai 2006; 36- Eigentler és munkatársai 2011; 37- Katz és munkatársai 2006; 38- Adams és munkatársai 1998; 39- Lara-Ortiz és munkatársai 2003; 40- Cheng és munkatársai 2003.

4. Eredmények megbeszélése

4.1 Extracelluláris glükánázok vizsgálata az *Aspergillus nidulans* szénforrás éhezéssel indukált autolizáló tenyészeiben

Az autolízissel párhuzamosan bekövetkező β -1,3-glükánáz termelődést *A. nidulans* (Nuero és munkatársai 1993) mellett más fonalas gombákban (pl. *P. chrysogenum*ban, Harvey és munkatársai 1998; *P. italicum*ban, Santos és munkatársai 1977; *N. crassaban*, Reyes és munkatársai 1979) is megfigyelték már és feltehetőleg általánosnak tekinthető a sejtfalukban jelentős mennyiségű β -1,3-glükánt tartalmazó gombák körében (Pitson és munkatársai 1993). Az *A. nidulans* esetében Nuero és munkatársai (1993) három β -1,3-glükánáz aktivitású ezimet izoláltak a fermentléből, melyek képződését az autolízis jelenségével kötétk össze, azonban ezen enzimek azonosítása elmaradt.

Az *A. nidulans* szénforrás éhezéssel indukált autolizáló tenyészeiben magas extracelluláris β -1,3-glükánáz és β -glükozidáz aktivitásokat detektáltunk (3. táblázat). Elsőként sikerült azonosítanunk *A. nidulans*ban egy, az autolízis alatt termelődő extracelluláris β -1,3-endoglükánázt (6/A ábra), mely MALDI-TOF spektruma alapján az *engA* (AN0472) gén termékének bizonyult. Az EngA a glikozil hidrolázok 81-es családjába tartozik, mely családba számos élesztőből (pl. *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *C. albicans*) és fonalas gombából (pl. *A. fumigatus*, *N. crassa*) azonosított extra és intracelluláris enzim tartozik, de képviselőik megtalálhatóak baktériumokban is (McGrath és Wilson 2006; Martín-Cuadrado és munkatársai 2008). Az EngA a *S. cerevisiae* és a *S. pombe* szintén extracelluláris Eng1 β -1,3-endoglükánázával mutat hasonlóságot, melyek a sejtszeparáció folyamatában játszanak szerepet (Baladrón és munkatársai 2002; Martín-Cuadrado és munkatársai 2003). Az EngA SDS poliakrilamid gélelektroforézissel meghatározott mérete – összhangban a szekvencia adatok alapján jószolt mérettel - 91 kDa-nak adódott (6/B ábra). A gombák β -glükánázainak mérete általában 20 és 80 kDa között mozog, habár leírtak már 150 és 230 kDa közé eső nagyságúakat is (Pitson és munkatársai 1993). Izoelektromos pontja (7,05; 6/A ábra) összhangban van a gombák β -glükánázainál általában tapasztaltakkal, amelyek 4,0 és 8,0 között mozognak (Pitson

és munkatársai 1993). A gombák β -glükánázainak esetében a pH optimum általában a savas tartományba, pH 4 és 6 közé esik és aktivitásukat a pH 3-8 tartományban sokáig megőrzik (Pitson és munkatársai 1993). Az EngA pH optimuma 6,5-nek adódott, de jelentős aktivitást mutatott egészen pH 10,5-ig és a pH 5,5-8,5 közötti tartományban stabilnak bizonyult (7. ábra). Érdeemes megemlíteni, hogy a szénéhezés alatt képződő ChiB kitináz pH optimuma az EngA-hoz hasonlóan a pH 5,5-6,5 tartományba esett (Erdei és munkatársai 2008) és szintén jelentős aktivitást mutatott egészen pH 10,5-ig (nem közölt adat). Ezen enzimek lúgosabb pH-n mutatott aktivitása azért jelentős, mert szénéhezés alatt - az ammónia felszabadulás miatt - a pH folyamatosan emelkedik és meghaladhatja akár a pH 9 értéket is (15/A ábra; Emri és munkatársai 2004a). Az EngA-hoz hasonlóan számos gomba β -glükánáz megőrzi stabilitását 50-60 °C-ig és szintén jellemző a hőstabilitástól magasabb hőmérséklet optimum, ami ezen enzimek szubsztrát általi stabilizálódására utalhat (7. ábra; Santos és munkatársai 1977; Pitson és munkatársai 1993).

Az EngA autolízisben betöltött jelentőségének igazolása érdekében megvizsgáltunk egy $\Delta engA$ és egy $\Delta engA\Delta chiB$ törzset. A ChiB extracelluláris kitinázról már korábban bebizonyosodott, hogy meghatározó jelentőségű az autolízis alatti sejtfal degradáció során (Pócsi és munkatársai 2009). A *chiB* gén hiányában az autolizáló tenyészetek szárazanyag tartalma csak lassan csökkent, a fonalak darabolódása és a pelleték szétesése nem, illetve csak igen idős tenyészetekben volt megfigyelhető (8. ábra; Pócsi és munkatársai 2009). Hasonló fenotípus jellemezte a $\Delta engA$ és a $\Delta engA\Delta chiB$ mutáns törzseket, ami igazolja, hogy az EngA nélkülözhetetlen szereppel bírhat a sejtfal hatékony lebontásában az autolízis alatt (8. ábra). Érdeemes azonban megemlíteni, hogy a $\Delta engA$ törzs extracelluláris β -1,3-glükánáz termelése – bár jelentősen csökkent - nem szűnt meg teljesen, ráadásul a késői autolitikus fázisban a β -1,3-glükánáz aktivitás meghaladta a kontroll törzsnél tapasztalt szintet (9. ábra). A megfigyelt extracelluláris β -1,3-glükánáz aktivitás azonban nem biztosította az autolízis normál lefolyását (8. ábra). A megmaradt aktivitás, valamint Nuero és munkatársainak (1993) eredményei más, az autolízis alatt termelődő extracelluláris β -1,3-glükánázok termelődését feltételezik. Emellett a

deléciók törzsekkel végzett vizsgálatok egy további érdekes megfigyelést eredményeztek. A *ΔengA* törzs esetében az extracelluláris β-1,3-glükánáz aktivitás mellett csökkenést mutattak az extracelluláris β-glükozidáz, kitináz és proteináz aktivitások is, illetve a *ΔengAΔchiB* törzsben is alacsonyabb extracelluláris β-glükozidáz és proteináz aktivitások voltak mérhetőek, mint a kontroll törzsben (9. ábra). Az enzimaktivitások hasonlóképpen alakultak a *ΔchiB* törzsnél is, amelyre az extracelluláris kitináz aktivitás hiánya mellett az extracelluláris β-1,3-glükánáz, β-glükozidáz és proteináz aktivitások csökkenése is jellemző volt (9. ábra). Ez a tendencia megmutatkozott a *prtA*, *pepJ* proteinázok és a *chiB* kitináz gének transzkripciójában is (2. táblázat). Ezen megfigyelések egy lehetséges magyarázata azzal lehet összefüggésben, hogy a sejtfa degradációjában valamely központi jelentőségű enzim hiánya, vagy csökkent aktivitása a felszabaduló sejtfa poliszacharid monomerek mennyiségének csökkenését vonhatja maga után. A β-glükán hidrolízise során felszabaduló dimer és trimer termékek β-glükánázok képződést indukáló tulajdonsága (Stoppok és munkatársai 1982; Pitson és munkatársai 1993), valamint az N-acetil-D-glükózamin, N,N'-diacetil-kitobióz és N,N',N''-triacetil-kitobióz ChiB kitináz indukáló hatása (Pusztahelyi és munkatársai 2006) egyaránt ismert jelenség. Elképzelhető, hogy a sejtfa lebontás intenzitásának csökkenése e pozitív feed back szabályozás elmaradásán keresztül befolyásolta a hidrolitikus enzimek termelődését.

A szénéhező tenyészetekben megfigyelhető β-glükánáz termelés szabályozásának vizsgálatok a FluG-BrlA jelátviteli útvonal központi jelentőségűnek bizonyult, amit az *engA* gén RT-PCR-es vizsgálata is megerősített (3. táblázat). Ugyanakkor sem a *FadA*, sem a *GanB* heterotrimer útvonalakat érintő mutációk nem voltak hatással a szénéhező tenyészetek extracelluláris β-1,3-glükánáz termelésére és a karbon katabolit represszor *creA* mutációjára is csak a β-glükozidáz termelés bizonyult érzékenynek (3. táblázat). Hasonló eredményt tapasztaltak az *eglC* β-1,3-endoglükánáz transzkripciójának vizsgálatok, ahol a *fadA* és *creA* mutációi szintén nem voltak hatással ezen gén transzkripció szintjének változására (Choi és munkatársai 2005). Érdemes felhívni a figyelmet az extracelluláris β-1,3-glükánáz és kitináz termelés szabályozásának közös elemeire. A szénéhező

tenyészetek kitináz termelését ugyancsak nem befolyásolták sem a FadA, sem a GanB heterotrimer G protein útvonalakat érintő mutációk (Molnár és munkatársai 2004; 2006), ugyanakkor a FluG-BrlA útvonal mutációi a kitináz termelésben és a *chiB* transzkripció szintű szabályozásában is központi jelentőségűnek bizonyultak (Pócsi és munkatársai 2009). A szabályozásbeli hasonlóság, a $\Delta engA$ és a $\Delta chiB$ törzsek megegyező - nem autolizáló - fenotípusa mellett, szintén alátámasztja azon feltételezésünket, miszerint az EngA β -1,3-endoglükánáz a ChiB kitinázhoz hasonlóan részt vesz a sejtfal szénéhező tenyészetekben történő lebontásában. Autolízisben betöltött központi jelentőségük miatt az EngA és a ChiB jó célpontai az ipari szempontból kedvező pelletes morfológia megtartását célzó kutatásoknak.

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

Az autolízis alatti proteináz termelés már régóta ismert jelenség a gombák körében (Santamaria és Reyes 1988) és egyben az autolízis kezdetének, intenzitásának, lefolyásának jellemzésére használt paraméterek egyike (McIntyre és munkatársai 2000). McIntyre és munkatársai (2000) a *P. chrysogenum* autolizáló tenyészeiből szerin, aszpartát és metalloproteinázokat is kimutattak. Bár az *A. nidulans* autolizáló tenyészeit szintén magas extracelluláris proteináz termelés jellemzi (Emri és munkatársai 2004a), ezen enzimekről csupán kevés adat áll rendelkezésre.

Vizsgálatainkban egy új, eddig enzim szinten nem azonosított proteináz képződését sikerült kimutatnunk az *A. nidulans* szénforrás éhezéssel indukált autolizáló tenyészetéből (10. ábra). A kromatofókuszálással megtisztított 19 kDa méretű fehérje MALDI-TOF spektruma alapján a *pepJ* (AN7962.3) gén termékének bizonyult. A *pepJ* gén egy extracelluláris termelődést jelző szignálszekvenciával rendelkező deuterolizin típusú metalloproteinázt kódol. A szekvencia alapján várható molekulamérete (37 kDa) mintegy kétszer nagyobb az általunk, SDS poliakrilamid gélelektroforézissel kapott méretnél (10/B ábra), mely poszttranszlációs módosítás (proteolitikus hasítás) meglétére utalhat. Hasonló jelenség figyelhető meg az *A. oryzae* proteinázának esetében (az AO090010000493

gén által kódolt deuterolizin típusú neutrális proteínáz II), ahol a 353 aminosavból álló prekursor fehérje az érés után már csak 177 aminosav hosszúságú és 19 kDa-os molekulaméretet mutat (Tatsumi és munkatársai 1991). Emellett a *P. citrinum* penicillolizin proteínáza (177 aminosav; 18 kDa) éretlen formában szintén tartalmaz egy, az érett enzimből hiányzó 155 aminosavból álló szekvenciát (Matsumoto és munkatársai 1994). A szekvencia adatok mellett, a PepJ EDTA-val való gátlhatósága szintén arra utal, hogy az általunk megtisztított enzim egy metalloproteínáz. Az enzim lúgos tartományba eső izoelektromos pontja (pI 8,6; 10/A ábra) a penicillolizinnel mutatott hasonlóságot (pI 9,6; Yamaguchi és munkatársai 1993). Habár a PepJ pH optimuma pH 5,5-nek adódott, a lúgos tartományban (pH 10,5-ig) is számottevő aktivitást mutatott és aktivitása a pH 3,5-10,5 tartományban stabilnak mutatkozott (11. ábra), azaz a PrtA (Peña-Montes és munkatársai 2008), EngA és ChiB hidrolázokhoz hasonlóan képes aktivitását megőrizni a szénéhezés alatt a pH lúgosodása ellenére is. A PepJ hőmérséklet optimuma 65 °C-nak adódott. A 95 °C-on történő előinkubálás gyorsan inaktíválta az enzimet, de a 95 °C-on detektált enzimaktivitás még így sem maradt el a 37 °C-on detektált értékektől (11. ábra). Bár a deuterolizin típusú proteínázok általában stabilak magas hőmérsékleten (az *A. oryzae* és *A. soyae* deuterolizinje stabilnak bizonyult 100 °C-on is; Doi és munkatársai 2003; Sekine 1972), a *P. citrinum* penicillolizinje magas hőmérsékleten – a PepJ-hez hasonlóan – gyorsan inaktíválódott (Doi és munkatársai 2004). Érdeemes megemlíteni, hogy a PepJ és a PrtA enzimológiai tulajdonságai némileg eltérnek egymástól – a PrtA izoelektromos pontja: 4,5; molekulatömeg: 37 kDa; pH optimuma: 8,5; hőmérséklet optimuma: 40 °C (Peña-Montes és munkatársai 2008). Emellett a PepJ a PrtA-val ellentétben nem képes a zselatin szubsztrát hasítására (Szilágyi és munkatársai 2011). Feltehetőleg a termelt proteínázok sokfélesége biztosítja, hogy a tenyészetek változatos körülmények között sokféle szubsztrát jelenlétében is használható proteínáz aktivitással rendelkezzenek.

A *prtA* és *pepJ* autolízisben betöltött jelentőségének felderítése érdekében megvizsgáltunk egy $\Delta prtA$, egy $\Delta pepJ$ és egy $\Delta prtA\Delta pepJ$ törzset. Ezen deléciós törzsek esetében bár jelentősen csökkent az azokazeinnel detektálható extracelluláris

proteináz aktivitás (13/A ábra), nem tapasztaltunk lényeges változást az autolitikus sejtfa degradáció lefolyásában (12. ábra). A PrtA és a PepJ szerepe a sejtfa degradáció folyamatában és így az autolitikus fenotípus kialakításában közel sem olyan jelentős, mint azt az EngA és ChiB esetében láttuk. Ugyanakkor a megmaradt azokazeináz aktivitás, a mutáns törzsekben BSA-val mért (13/B ábra), viszonylag nagyobb aktivitások mellett további extracelluláris proteinázok jelenlétére utal egy, a zimogram analízis során megfigyelhető harmadik, szintén 19 kDa méretű proteináz jelenléte (Szilágyi és munkatársai 2011). Érdeemes továbbá megjegyezni, hogy az *A. nidulans* bükkfa lombhulladékán való növesztése során a celluláz és pektináz aktivitások mellett jelentős proteináz aktivitást is megfigyeltek. Összesen 11 extracelluláris proteinázt azonosítottak, melyek között szerepelt a PrtA és a PepJ is (Schneider és munkatársai 2010). Elképzelhető, hogy a PrtA és PepJ hiányában ezen enzimek valamelyike biztosította a sejtfa fehérjekomponenseinek lebontását.

Az extracelluláris proteináz termelés a termék degradációjának veszélye miatt komoly problémát testesít meg a heterológ expressziós rendszerekben. Felhívnom a figyelmet arra, hogy az *A. oryzae*, *pepJ*-vel ortológiát mutató *nptB* génjének kiütése, 22%-al növelte a humán lizozim heterológ expressziójának hatékonyságát (Kimura és munkatársai 2008). A *prtA* és a *pepJ* gének eliminálása az *A. nidulans* alapuló heterológ expresszió esetében is jelentősen javíthatja a kihozatalt, megakadályozva a termék lebontását a fermentáció kései szakaszában, amikor is a szénforrás mennyiségének csökkenése miatt képződésük számottevő lehet. Hatékony heterológ expressziós rendszerek kifejlesztése érdekében szintén szükséges további, a szénéhezés hatására termelődő extracelluláris proteinázok azonosítása.

A szénéhezés alatt termelődő extracelluláris proteinázok szabályozásának megismerését célzó vizsgálataink alkalmával a FluG-BrlA sporulációs jelátviteli útvonal - a korábban vizsgált *engA* β -1,3-endoglükánázhoz és *chiB* kitinázhoz hasonlóan - meghatározónak bizonyult mind az extracelluláris proteinázok, mind a *prtA* és a *pepJ* szabályozásában is (5. táblázat). A vizsgált FadA és GanB heterotrimer útvonalak mutációi ugyanakkor nem mutattak a *fluG* és *brlA* mutációihoz hasonló jelentőséget, csak kisebb mértékben befolyásolták a proteináz

termelődést és megnövekedett proteináz aktivitásokat eredményeztek (5. táblázat). Kísérleteink egyik meglepő megállapítása az volt, hogy a tenyészetek proteináz termelése erősen függött a szénforrás éhezés indukálásának módjától. A kontroll törzstől eltérően a *creA* gén delécióját kísérő megemelkedett extracelluláris proteináz termelés kifejezettebb volt nem átmosott körülmények között (14. ábra). Hasonlóképpen magasabb aktivitások jellemezték a *ΔbrlA* és *ΔprtA* törzsek nem átmosott kultúráit, bár ez a jelenség itt a késői autolitikus fázisban jelentkezett (14. ábra). A megfigyelt jelenségért ugyanakkor nem az élesztőkivonat jelenléte, vagy hiánya lehetett a felelős (14. ábra). A kétféle tenyésztési körülmény közötti fő különbséget a stacioner fázis megléte, illetve hiánya jelentette. Nem átmosott körülmények között a sejtek a szénéhezéssel egy rövid (5-10 óra hosszúságú) stacioner fázis után szembesülnek, amikor kis mennyiségben még jelen vannak hozzáférhető tápanyagok (glükóz, az élesztőkivonatból származó peptidek és egyéb tápanyagok). A mosott sejtes kísérletekben a még növekvő tenyészetek közvetlenül szénforrásmentes tápközegbe lettek átmosva. Azaz, a mosott sejtes tenyészetekben a szénforrás éhezés közvetlenül érte a még növekvő sejteket, ráadásul maga az átmosási folyamat is stressz a gombák számára. A nem átmosott tenyészetek esetében ugyanakkor hosszú idő állt rendelkezésre, hogy a sejtek felkészüljenek a szénéhező körülményekre. Eredményeink arra utalnak, hogy a proteinázok képződése igen komplex szabályozás alatt áll és e szabályozás egyes elemei a stacioner fázis alatt aktiválódhatnak. A stacioner fázis elmaradásakor e hatások az autolitikus fázisban már nem tudnak érvényesülni.

Az extracelluláris proteináz termelés szabályozásában nagy jelentősége van a környezet pH-jának is (Katz és munkatársai 2000). Az *A. nidulans* pH szabályozási útvonalában a PacC transzkripció faktor kiemelkedő szerepet játszik (Tilburn és munkatársai 1995). A PacC inaktív formában szintetizálódik, majd alkalikus körülmények között kétlépéses proteolízis által aktiválódik (Díez és munkatársai 2002) és a *palD* (alkalikus foszfatázt kódol), valamint az *ipnA* (izopenicillin-N-szintetázt kódol) mellett a *prtA* aktiválásában vesz részt (Peñalva és Arst 2002). Nem meglepő tehát, hogy a *pacC* génben deléció törzs vizsgálatok az alacsonyabb extracelluláris proteináz aktivitások mellett a *prtA* gén expressziójában

is csökkenést tapasztaltunk (5. táblázat). Emellett fermentorban végzett kísérleteinkben a pH folyamatos emelkedését figyeltük meg, ami összhangban van azzal a megfigyeléssel, hogy az autolízis alatt az aminosavak és peptidok lebontása következtében ammónia szabadul fel (15/A ábra; Emri és munkatársai 2004a). Emellett lúgosabb pH-n a magasabb extracelluláris proteináz aktivitásokat a *prtA* és *pepJ* nagyobb mértékű expresszója kísérte, azonban - bár csökkent - nem szűnt meg a proteináz termelés pH 6,5-ön sem (15. ábra). Összességében tehát az autolízis alatt kialakuló lúgos pH kedvez az extracelluláris proteináz termelésnek, mely hatás részben a lúgos körülmények között aktiválódó PacC transzkripció faktoron keresztül valósul meg. A proteinázok termelődésének indukciójában azonban - legalább is az *A. nidulans* esetében - más tényezők (pl. éhezés) játszhatják a főszerepet.

4.3 Az autolízis alatt termelődő extracelluláris enzimek a sejttal lebontásán túlmutató jelentőségének vizsgálata

Az autolízis jelenségét kísérő magas extracelluláris hidroláz aktivitás további szerepének felderítése érdekében több különböző vizsgálatot végeztünk el. Az antifungális hatás tesztelése során azt tapasztaltuk, hogy az *A. nidulans* kontroll törzsének extracelluláris hidrolázokban gazdag, autolizáló tenyészetből származó koncentrált fermentleve gátolta számos gombafaj csírázását/növekedését (16. ábra). A különböző, hidrolitikus enzimtermelésben sérült mutánsok (*flug1*, *ΔengA*, *ΔchiB*, *ΔengAΔchiB*) autolizáló tenyészeiből nyert fermentlevek csökkent antifungális hatásán, valamint az EngA és ChiB tisztított formában mutatott csírázás/növekedés gátló hatásán keresztül megbizonyosodtunk arról, hogy a tapasztalt hatás hátterében a fermentlemben jelen lévő extracelluláris enzimek (elsősorban az EngA és ChiB) álltak (6. táblázat). Kitinázok és glükánázok antifungális hatását számos esetben leírták már. A szakirodalomban főként a mikoparazita *Trichoderma* fajok által termelt enzimek antifungális hatására találhatunk példákat, melyek közül kiemelném, hogy a *T. harzianum*-ból izolált, a ChiB-hez hasonló molekulatömegű, 43 kDa méretű kitináz és az EngA-hoz hasonló nagyságú, 74 kDa méretű β-1,3-endoglükánáz szintén növekedésgátló hatást váltott ki *Sclerotium rolfsii*-val

szemben (El-Katatny és munkatársai 2001). Ugyanakkor beszámoltak már bakteriális (Nielsen és munkatársai 1997; Hong és Meng 2003; Reyes-Ramírez 2004) és növényi (Karasuda és munkatársai 2003; Liu és munkatársai 2009) β -glükánázok és kitinázok antifungális hatásáról is. A PepJ proteináz azonban nem mutatott az EngA-hoz és ChiB-hez hasonló mértékű csírázás/növekedés gátló hatást és a *ΔpepJ* törzs esetében sem láttunk lényeges csökkenést az antifungális hatás kifejtésében (6. táblázat). Felhívnom a figyelmet azon megfigyelésre, hogy a *Bacillus megaterium* proteináza képes volt inaktíválni a *Rhizoctonia solani* extracelluláris enzimeit (Bertagnolli és munkatársai 1996). Emellett a *T. harzianum* proteolitikus enzimek szelekciójával hatékonyan inaktíválta a *Botrytis cinerea* által termelt enzimeket, valamint a *T. harzianum* izolátum *B. cinerea*hoz való keverése megemelkedett proteináz szintézist váltott ki (Elad és Kapat 1999). Azaz, az extracelluláris proteinázok mellett, hogy részt vehetnek az idegen fajok sejtfalának lebontásában (De Marco és munkatársai 2002), jelentőséggel bírhatnak a környezetben előforduló mikroorganizmusok által termelt enzimek inaktíválásában is (Elad 2000).

A növényvédelemben a kémiai védekezés alternatívájaként alkalmazott biokontroll eljárások sikere gyakran a kitinázok és β -1,3-glükánázok antifungális hatásán múlik (Gohel és munkatársai 2006). A védekezés történhet - gomba, illetve baktérium eredetű - kitinázok és glükánázok növényekben való heterológ expressziójával, vagy extracelluláris litikus enzimeket termelő mikroorganizmusok (pl. *Trichoderma*) alkalmazásával egyaránt, mindkét esetben a termelt sejtfalbontó hidrolázok akadályozzák meg a patogén faj elszaporodását, illetve kolonizációját (Gohel és munkatársai 2006). Munkánk jelentősége abban áll, hogy felhívja a figyelmet a biokontrollban használható sejtfalbontó enzimek kiterjedtebb vizsgálatának jelentőségére, hiszen a mikoparazita gombák (pl. *Trichoderma* fajok) és baktériumok (pl. *Bacillus*) által termelt sejtfalbontó enzimek mellett szaprofita gombafajok kitinázai, glükánázai is hatékonyak lehetnek, így ezen fajok szisztematikus vizsgálatával kibővíthet a biokontroll folyamatában alkalmazható enzimek köre.

Vizsgálataink alapján a $\Delta engA\Delta chiB$ törzs életképessége lassabban csökkent az autólízis előrehaladtával a kontroll törzshöz viszonyítva (17. ábra), mely jelenség magyarázatául szolgálhat az EngA és a ChiB a termelő törzsre kifejtett antifungális hatása (6. táblázat). Hasonló jelenséget tapasztaltak Shin és munkatársai (2009), amikor a *nagA* gén kiütése a sejtpusztulás mértékének csökkenését eredményezte. Rövidebb (7 napos) periódus alatt és nem átmosott tenyészetekben - ahol a hidroláz termelés alulmarad a glükózmentes minimál tápközegbe átmosott tenyészetekben tapasztaltakhoz képest – a termelt hidrolázoknak az életképességre gyakorolt hatása azonban nem bizonyult szignifikánsnak (Emri és munkatársai 2005b; Pócsi és munkatársai 2009). Ez azt sugallja, hogy a tenyészetek - legalábbis egy ideig - képesek ellenállni ezen enzimek káros hatásának.

Felületi kultúrákban az EngA és ChiB képződése csökkentette a konídiumtermelés képességét (7. táblázat). Azonban ha glükóz helyett más szénforrást alkalmaztunk (Na-acetát és/vagy élesztőkivonat), a kontroll törzs gyorsabb növekedésre volt képes, mint a $\Delta engA\Delta chiB$ kettős mutáns törzs (7. táblázat). Ezen megfigyelésünk összhangban van azzal a feltételezéssel, miszerint a tenyészet öregebb részeinek „újrahasznosítása” segítheti a növekedést (Bainbridge és munkatársai 1971; McIntyre és munkatársai 1999; 2000). A hifák öregebb, disztális részeinek makromolekulái hidrolizálnak, hogy ezzel monomereket és/vagy tápanyagokat szolgáltatassanak az apikális régiók növekedésének fenntartásához (McIntyre és munkatársai 2000). Ha a sejtfal lebontása zavart szenved, e hidrolízis termékek utánpótlása elakad, a növekedés lassulását vonva maga után. Megfigyeléseink elvetik ugyanakkor annak a lehetőségét, hogy az autólízis során a sejtfal bontásával nyert tápanyagok a konídiumképzés során hasznosulnának (Emri és munkatársai 2008).

Az *A. niger*rel szemben folytatott interakciós vizsgálataink során a kontroll törzs hatékonyabban volt képes gátolni az *A. niger* növekedését (18. ábra). Ezen folyamatban az EngA és ChiB valószínűleg nem közvetlenül - az *A. niger* sejtfalának bontásával - hanem közvetve - a vegetatív növekedés és ezen keresztül a tápanyagok gyors felhasználásának elősegítésével - vehetett részt. Ezen kísérletekben természetesen nem zárható ki az enzimeknél lényegesen

diffuzibilisebb szekunder metabolitok, vagy kisméretű antifungális fehérjék képződése sem (Eigentler és munkatársai 2011), amit az EngA és ChiB a telep méret növelésére gyakorolt pozitív hatásukkal közvetve szintén elősegíthettek. Tehát az extracelluláris hidrolázok a gombatenyészetek ökológiájára is jelentős befolyást gyakorolhatnak. Az exogén, vagy endogén eredetű biopolimerek lebontásán és hasznosításán keresztül befolyásolhatják a tenyészetek növekedését, amelyen keresztül erősíthetik a tenyészet kompetíciós képességét is.

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

Transzkripció vizsgálatainkban (microarray, RT-PCR) a szénéhezés hatására megfigyelhető korai transzkripcionális változásokat tanulmányoztuk. Eredményeink alapján a szénforrás éhezés igen komplex, sok gént érintő transzkripcionális változást okozott a tenyészetekben, összesen 1676 gén aktivitása változott meg (9. táblázat).

4.4.1 Változások a sejtfalhomeosztázisban

Bár a 4 h-s tenyészetekben számottevő szárazanyag tartalom csökkenés és hifafragmentáció (autolitikus sejtfal degradáció) még nem volt megfigyelhető (8. táblázat), a transzkripció adatok alapján a sejtfalhomeosztázisban résztvevő gének aktivitása már ebben az időpontban jelentősen átalakult. A sejtfal kitin, β -1,3-glükán és α -1,3-glükán alkotóinak esetében egyaránt a szintetikus folyamatok háttérbe szorulása és a degradatív folyamatok előtérbe kerülése volt jellemző a szénéhezés hatására. Represszálódtak a kitin szintetázok III-as csoportjába tartozó *chsB* és *chsF* gének (10. táblázat), melyek közül a ChsB esetében korábban kimutatták a növekedés során betöltött központi jelentőségét (Yanai és munkatársai 1994; Borgia és munkatársai 1996). A *chiA* kitináz kódoló gén - összhangban Pusztahelyi és munkatársai korábban kapott eredményeivel (2006) - szintén repressziót mutatott (10. táblázat). A ChiA egy GPI-horgonnyal rendelkező enzim, amely valószínűsíthetően a kitin rigid struktúrájának lazításában vesz részt a konídiumok

csírázásakor, a hifa elágazások kialakításakor, valamint fontos az újonnan szintetizált kitin sejtfalba történő beépülésében is a hifák csúcsi régiójában (Yamazaki és munkatársai 2008). A korábban már vizsgált *chiB* kitináz és *nagA* N-acetil- β -D-glükózaminidáz szénéhezés alatti indukálódását eredményeink megerősítették, ugyanakkor a *chiC* expressziójában nem tapasztaltunk lényeges változást (10. táblázat), ami szintén összhangban van a korábban tapasztaltakkal (Pusztahelyi és munkatársai 2006). Ezen felül megfigyeltük további, a kitin lebontásához köthető gének indukálódását. A kitin kitozánná való alakításában fontos kitin dezacetiláz aktivitású enzim autolízis alatti termelődését *A. nidulans*ban Alfonso és munkatársai (1995) is bizonyították. Az aktivált kitin monomerek lebontásában közreműködő N-acetil-glükózamin-6-foszfát dezacetiláz és glükózamin-6-foszfát izomeráz enzimeket kódoló gének ugyancsak indukálódtak (10. táblázat). Ezen enzimek működése nélkülözhetetlen a kitin C (és N) forrásként való hasznosítása során, így indukciójuk a kitin energiaforrásként való felhasználására utal. Ez összhangban van azon korábban említett megfigyelésünkkel, miszerint felületi kultúrákban – ahol a növekedés és a szénéhezés a telep különböző részein, de egyidőben megfigyelhető - a $\Delta engA\Delta chiB$ kettős mutáns törzs növekedése elmaradt a kontroll törzshöz képest gyengén hasznosítható szénforrást (Na-acetát és/vagy élesztőkivonat) tartalmazó táptalajon (7. táblázat).

A β -1,3-glükán metabolizmusában a szintetikus folyamatok háttérbe szorulására utal az *fksA*, β -1,3-glükán szintetáz katalitikus alegységét kódoló gén repressziója (10. táblázat), amely a *S. cerevisiae* Fks1 és Fks2, a β -1,3-glükán szintézisben központi jelentőségű fehérjéihez nagy hasonlóságot mutató fehérjét kódol és feltehetően az egyetlen FKS típusú fehérje az *A. nidulans*ban (Kelly és munkatársai 1996). Emellett a β -1,3-glükán lánc elongációján keresztül a sejtfal bioszintézisben szintén fontos szerepet betöltő β -1,3-transzglükozilázok (Mouyna és munkatársai 2000) képződését ugyancsak represszió jellemezte (10. táblázat). Az *eglC* β -1,3-endoglükánáz is repressziót mutatott a szénéhezés hatására (10. táblázat), amely azt feltételezi, hogy az EglC - a ChiA kitin metabolizmusa során betöltött szerepéhez hasonlóan - a sejtfal β -1,3-glükánjának remodellezésében játszhat szerepet a növekedés alatt. Ezt megerősíti, hogy a hasonló funkciójú enzimekkel

egyetemben az EglC is rendelkezik GPI-horgonnyal; ugyanakkor az *eglC* deléciója nem befolyásolta érdemben a növekedési rátát és a konídiumok csírázását sem (Choi és munkatársai 2005). Hasonló jelenséget tapasztaltak az *A. fumigatus* sejtfalhoz kötött β -1,3-endoglükánázait kódoló *engl1* és *eng2* gének esetében is, melyek kiütése szintén nem okozott fenotípusbeli változást (Mouyna és munkatársai 2002; Hartl és munkatársai 2011). Az autolitikus sejtfal degradációban fontos *engA* mellett egy feltehetőleg β -1,3(4)-endoglükánázt és két további, feltehetőleg β -1,3-exoglükánázt kódoló gén szénéhezés alatti indukálódását mutattuk ki (10. táblázat). Exo és endo aktivitással rendelkező β -glükánázok együttes szintézise általános a gombák körében melyek szinergizmusa gyakran figyelhető meg a β -glükánok hidrolízise alatt (Pitson és munkatársai 1993). Az autolízis főleg a β -glükánok β -endoglükánázok általi bontásával valósul meg, így oligoszacharid láncokat szabadítva fel, de a teljes hidrolízishez - mely a glükóz egységek felszabadulását eredményezi - a β -exoglükánázok jelenléte is szükséges (Pitson és munkatársai 1993).

A szénéhezés hatására az *agsB* α -1,3-glükán szintetáz enzim is repressziót mutatott (10. táblázat), mely az *A. niger* *agsE* génjével ortológ (Fujioka és munkatársai 2007), ahol valószínűsíthetően a fő expresszálandó α -1,3-glükán szintetázt kódoló génnek tekinthető a vegetatív növekedés alatt (Damveld és munkatársai 2005). A szénéhező tenyészetben emellett több α -1,3-glükánáz aktivitású enzim indukálódását is kimutattuk (9. táblázat; Függelék: 1. táblázat), melyek közül a *mutA* indukcióját RT-PCR-es vizsgálataink is megerősítették (10. táblázat). A glükóz elfogyását követő α -1,3-glükánáz termelés régóta ismert jelenség (Zonneveld és munkatársai 1974). Kimutatták továbbá, hogy a *mutA* deléciós mutáns törzs sejtfala a kontroll törzsénél mintegy kétszer több α -1,3-glükánt tartalmazott 12 nap elteltével minimál tápközegen növesztve (Wei és munkatársai 2001). Mivel ebben az időpontban az autolitikus sejtfal degradáció már megfigyelhető jelenség (Emri és munkatársai 2004a), feltételezhető, hogy a magasabb α -1,3-glükán tartalom háttérében a *mutA* autolízis alatti sejtfalbontásban betöltött funkciójának elvesztése állhatott.

Feltételezhetően a gomba nemcsak a kitin monomereket, de az α - és β -glükánok lebontásakor keletkező glükózt is felhasználja szénéhezés alatt. Erre a $\Delta engA\Delta chiB$ kettős mutáns korábban már említett viselkedése mellett (7. táblázat) a feltehetőleg monoszacharid transzportereket kódoló gének (*hxtA*, *mstA*, AN5104, AN8347, AN9168) RT-PCR-rel is igazolt indukciója utal (10. táblázat). A *hxtA* egy nagy affinitású glükóz transzportert kódol, melynek magas glükóz koncentráció alatti represszióját és szénforrás éhezés hatására bekövetkező indukcióját Wei és munkatársainak eredményei is megerősítik (2004).

4.4.2 Programozott sejthalál

Szénéhezés alatt több, a (makro)autofágia folyamatához köthető fehérjét kódoló gén indukálódását is megfigyeltük. Az autofágia egy, az eukarióta sejtekben gyakran előforduló, nem szelektív degradatív folyamat, amely a gombáktól az emberig konzerváltnak tekinthető. Fonális gombákban az autofágia a sejt anyagainak éhezés alatti újrahasznosításán keresztül a túlélés meghosszabbítását biztosítja, de a fejlődési folyamatok normális lefolyásában is jelentős lehet (Levine és Klionsky 2004; Yorimitsu és Klionsky 2005; Pollack és munkatársai 2009). Az autofágia gátlásában a TOR útvonal vesz részt. Az autofágia indukálásakor a TOR útvonal gátlását az autofagoszómák kialakulása követi, melyek vakuólumokkal történő fúziója után valósul meg a sejt anyagainak makromolekulákká való bomlása (Pollack és munkatársai 2009). Az autofágiában potenciálisan szerepet játszó, szénéhezés hatására indukálódott gének közül az AN2876 és AN5174 gének indukálódását RT-PCR-es vizsgálataink is megerősítették (10. táblázat), mely gének a *S. cerevisiae* Atg22 és Atg5 ortológjait kódolják (Kiel és munkatársai 2009). Az Atg22 egy olyan vakuoláris membrán protein, amely permeázként a vakuoláris proteinázok által felszabadított aminosavak a vakuólumból a citoszól felé irányuló transzportjában vesz részt (Yang és munkatársai 2006). Az Atg5 az autofagoszómák kialakulásában fontos fehérje (Pollack és munkatársai 2009). A microarray adatok alapján egy további gén, az AN7428, a *S. cerevisiae* Atg7 ortológ indukciója szintén megfigyelhető volt (Függelék: 1. táblázat), amely az Atg5-höz hasonlóan az

autofagoszóma kialakulásában vehet részt (Pollack és munkatársai 2009). A fentiekén túl a TOR útvonal egyik tagja, a *tipA* indukciója is kimutatható volt (10. táblázat), amely a *S. cerevisiae* Tip41 ortológja (Fitzgibbon és munkatársai 2005) és feltehetően a TOR útvonal gátlásán keresztül az autofágia indukálásában vesz részt (Jacinto és munkatársai 2001). A szénéhezés kiváltása után 4 órával már megfigyelhető intenzív vakuolizáció (8. táblázat) szintén autofágiás folyamatok jelenlétére utal. A szénéhező tenyészetekben lejátszódó autofágiás folyamatok jelenlétét Kim és munkatársainak (2011) adatai is megerősítik.

Az *A. nidulans* apoptózisának szabályozásáról keveset tudunk. Az apoptózis indukálásában feltehetőleg résztvevő gének közül sem az *aifA* (Savoldi és munkatársai 2008), sem a *casA* (Cheng és munkatársai 2003), sem a *prpA* (Semighini és munkatársai 2006) nem indukálódott a microarray adatok alapján (10. táblázat; Függelék: 1. táblázat). Az *ndeA* és a *ndiA* külső és belső alternatív NADH-dehidrogenázok génjei - melyek a farnezol által indukált apoptózis kivédésében vesznek részt (Dinamarco és munkatársai 2010) - represszálódtak (Függelék: 1. táblázat). Ugyanakkor a tanszéken végzett korábbi vizsgálatok több apoptótikus marker jelenlétét is kimutatták szénéhező tenyészetekben (Emri és munkatársai 2005b). Ezen vizsgálatok alkalmával azonban az apoptótikus sejtek (protoplasztok) részaránya igen kicsi volt szénéhezés alatt és számottevő apoptózis inkább csak az öreg tenyészetekben volt detektálható. Ráadásul az apoptózis intenzitása nem követte a sejtpusztulás intenzitását, amely inkább a szénéhezés korai szakaszában volt jelentős (Emri és munkatársai 2005b). Feltételezhető tehát, hogy az apoptózis szerepe az autofágiához képest csak másodlagos. Az autofágia biztosíthatja a sejtek aktív lebontásával a tápanyagok felszabadítását és a tenyészet hosszú távú fennmaradását, míg az apoptózis feladata inkább csak az éhezés, illetve az ezt kísérő oxidatív stressz (Emri és munkatársai 2004a) miatt „meghibásodott” sejtek eltávolítása lehet.

Érdeemes kitérni a sejtfallbontó enzimek - köztük az EngA és ChiB -, valamint a sejtpusztulás lehetséges kapcsolatára is. Mint azt korábban bemutattam, az EngA és ChiB enzimek jól detektálható antifungális aktivitással rendelkeznek és hosszabb távon (1 hétnél idősebb szénéhező tenyészetekben) hatást gyakorolnak a

tenyészetek életképességre (6. táblázat; 17. ábra). A szénéhezés korai időszakában (1 hétnél fiatalabb tenyészetek) ugyanakkor nem tapasztalható korreláció a sejtfalbontó enzimek mennyisége és a sejtpusztulás, illetve az apoptózis intenzitása között. A fentiek alapján a szénéhezés korai szakaszában megfigyelhető sejtpusztulás nem írható a sejtfalbontó enzimek számlájára, káros hatásuk inkább csak hosszú távon és nagy aktivitások esetén lehet jelentős. A sejtfalbontó enzimek feladata feltehetően azon sejtek falának lebontása, amelyek már átestek az autofágián, vagy más módon pusztultak el (apoptózis, nekrozis). Ez egyben azt is feltételezi, hogy a még élő sejtek képesek védekezni a sejtfalbontó hidrolitikus enzimeik káros hatásával szemben. A számos környezeti stimulus hatására indukálódó sejtfal integritás útvonal működésében szerepet játszó, transzkripcionális szinten is szabályozott *mpkA* (MAP kináz) és *rlmA* (transzkripció faktor) (Fujioka és munkatársai 2007) transzkripciója vizsgálataink alapján nem változott, habár az *rlmA* gén aktívnak bizonyult mindkét tenyésztési körülmény között (10. táblázat). A sejtfal metabolizmus egyensúlyának a lebontás irányába történő erős elmozdulása, illetve több, a növekedés folyamatában esszenciális fehérje represszálódása (9. 10. táblázat) szintén azt jelzi, hogy a sejtek nem intenzív sejtfal szintézissel védekeznek a hidrolitikus enzimek sejtfalkárosító hatása ellen.

Az élő sejtek sejtfal hidrolázokkal szembeni időleges rezisztenciájára magyarázatot adhat az autolízis jelenségét kísérő, szabad szemmel is nyomon követhető intenzív melanin szintézis (8/C és D ábra). A melaninok nagy molekulatömegű pigmentek, amelyek fenol komponensek oxidatív polimerizációjával képződnek és általában sötétbarna vagy fekete színűek (Jacobson 2000). Az indukálódott, melaninok szintézisében érintett gének közül (Függelék: 1. táblázat) az AN0230 tirozinázt kódoló gén és az *ivoA* – mely szerepet tölt be a konidiofórok pigmentációjában (Clutterbuck 1990) - indukálódását RT-PCR-es vizsgálataink is megerősítették (10. táblázat). Az autolízis alatti melanin képződés oka/célja jelenleg még tisztázatlan. Érdeemes azonban megemlíteni, hogy a *Wangiella dermatidis* melanizált sejtjei rezisztensebbnek bizonyultak az enzimátikus hidrolízissel szemben, mint a melanin bioszintézisben deficiens sejtek (Dixon és munkatársai 1991), valamint számos penészgomba esetében figyelték meg az

enzimatis sejtfa degradáció melaninokkal történő gátlását (Nosanchuk és Casadevall 2003). Az *A. nidulans* esetében szintetikus melaninok adagolása gátolta a glükánáz és kitináz hidrolitikus aktivitásokat, valamint azt is kimutatták, hogy a β -1,3-glükánázokkal, kitinázokkal szembeni rezisztenciáért a sejtfa melanin tartalma tehető felelőssé (Kuo és Alexander 1967).

4.4.3 Változások a szénhidrát, nitrogén és lipid anyagcserében

A szénéhezés hatására jelentős változást tapasztaltunk az *A. nidulans* metabolizmusában is. Glükóz hiányában represszálódott a kis affinitású glükóz transzportert kódoló *mstE* gén (10. táblázat), melynek glükóz és más represszáló szénforrások jelenlétében mutatott aktivitását Forment és munkatársai (2006) is leírták már. A megfigyelt transzkripcionális változások alapján (9. 10. táblázatok) a glikolízis, a pentóz-foszfát út, a citrát kör és a légzés (beleértve az alternatív légzést is) intenzitása egyaránt csökkenést mutatott és a *tpsA* trehalóz-6-foszfát szintetáz is represszió jellemezte. Eredményeink összhangban vannak Emri és munkatársai (2004a) korábbi adataival, miszerint éhezés hatására a citokróm c és az alternatív oxidázfüggő légzés intenzitása csökken, mellyel párhuzamosan nő a tenyészet oldott oxigén tartalma (nem közölt adat). Hasonló jelenséget *P. chrysogenum* esetében is leírták (Sámi és munkatársai 2003). Emellett a sejtek specifikus glükóz-6-foszfát dehidrogenáz aktivitását szintén csökkenés jellemezte (Emri és munkatársai 2004a).

A lipid metabolizmusban bekövetkezett változások a szintetikus folyamatok repressziójára és a lebontó folyamatok indukálódására utalnak (9. 10. táblázat). Az RT-PCR-es vizsgálatok alapján a *fasB* zsírsav szintetáz mellett az ergosterol bioszintézisben közreműködő hidroximetil-glutaril-CoA szintetáz feltehetőleg kódoló AN4923 gén is represszálódott (10. táblázat). Érdeemes megemlíteni, hogy mind a *fasB*, mind az AN4923 esszenciálisnak tekinthető a növekedés alatt (David és munkatársai 2008).

A nitrát hasznosítását lehetővé tévő nitrát (*niaD*) és nitrit redukáz (*niia*) kódoló géneket szintén represszió jellemezte (10. táblázat). Ez nem meglepő, hiszen indukálódásukhoz mind a NirA, mind az AreA transzkripció faktorokra szükség

van, ugyanakkor az AreA sejtmagi akkumulációját a szénforrás éhezés gátolja (Todd és munkatársai 2005). A *niiA* és *niaD* gének promoterét gyakran használják konstitutív, illetve túltermelő mutánsok készítésére. Az általunk tapasztalt represszió felhívja a figyelmet arra, hogy ezekben a mutánsokban a szénéhezés (pl. felületi kultúrákban, illetve hosszú ideig történő batch fermentációknál) jelentősen módosíthatja az érintett gének transzkripcióját. A nitrát asszimiláció repressziója együtt járt számos, az aminosavak és nukleotidok lebontásában/átalakításában résztvevő gén indukciójával (9. táblázat), melyek közül a tirozin lebontásában közreműködő 4-hidroxifenil-piruvát-dehidrogenáz (*hpdA*) gén indukcióját RT-PCR-es vizsgálataink is megerősítették (10. táblázat). A nitrogén tartalmú szerves vegyületek szénéhezés alatti intenzív lebontását az ammónia képződése (Emri és munkatársai 2004a) és a pH emelkedése is jelzi (15/A ábra).

4.4.4. Hidrolitikus enzimek

Szénéhező körülmények között a sejtek raktározott tápanyagaik mellett energiaforrásként felhasználhatják saját anyagaikat (pl. sejtfalat, vagy egyes intracelluláris molekulákat) és a környezetükben kis mennyiségben jelenlévő és/vagy nehezen hasznosítható tápanyagokat is. (Természetesen, ha a tápközegben nagyobb mennyiségben jelen van valamilyen alternatív szén/energiaforrás, a növekedés egy átmeneti leállás után újraindul, azaz nem szénéhezésről, hanem szénforrás limitációról beszélünk.) A gomba sejtfal lebontását végző hidrolázok génjei mellett számos, a szénéhezés alatt indukálódott hidrolázt kódoló gént (nukleáz, észteráz, proteináz) azonosítottunk (9. 10. táblázat; Függelék: 1. táblázat). Ezen gének egy jelentős része a SignalP program alapján szignálszekvenciával is rendelkezik, azaz termékük valószínűsíthetően az extracelluláris térbe szekretálódik. Ezen enzimek a saját biopolimerek bontása mellett részt vehetnek az exogén eredetű tápanyagok hasznosításában és akár a fajok közötti interakciók befolyásolásában is.

Az *A. nidulans* autolizáló tenyészetekre jellemző lipáz termelést mások is tapasztalták már (García-Lepe és munkatársai 1997). Több intra- és extracelluláris lipázt is sikerült azonosítanunk (9. táblázat, Függelék: 1. táblázat). Az AN8242, és

az AN6464 gének indukálódását RT-PCR-es adataink is megerősítették, melyek közül az AN6464 által kódolt fehérje extracelluláris szignálszekvenciával rendelkezik (10. táblázat). Emellett számos intracelluláris nukleáz kódoló gén indukálódása mellett, 2 extracelluláris nukleáz kódoló gén (AN11897, AN1723) indukációját is detektáltuk (10. táblázat; Függelék: 1. táblázat). Az autólízis alatt megjelenő extra- és intracelluláris RNáz, illetve DNáz aktivitást több gombafaj esetében is kimutatták. Az RNáz aktivitások általában már az autólízis elején elérték maximumukat, míg a DNázokhoz köthető aktivitások maximuma – legalább is az *A. nidulans* esetében - csak később, a 3. nap után jelentkezett (Reyes és munkatársai 1990). A szénéhezés hatására indukálódó hidrolitikus enzimek közül külön érdemes kiemelni a nagyszámú extracelluláris proteinázt. A *prtA* és a *pepJ* mellett 7, a szénéhezés hatására indukálódó, szignálszekvenciával rendelkező feltehetőleg proteinázt kódoló gént azonosítottunk (Függelék: 1. táblázat). Ezt figyelembe véve nem meglepő, hogy a *prtA* és *pepJ* gének kiütése nem okozott lényeges különbséget a fenotípusban (12. ábra). Érdemes megemlíteni, hogy a *prtA* és *pepJ* gének mellett az AN2237, AN8445, AN7121, AN7231 és AN6438 gének termékét is kimutatták a fermentléből az *A. nidulans* bükkfa lombhulladékon való tenyésztése során (Schneider és munkatársai 2010). Az intenzív extracelluláris proteináz termeléssel lehet összefüggésben az XprG transzkripció faktor (10. táblázat) indukálódása, melynek szerepét a szénéhezés alatti proteináz termelés szabályozásában Katz és munkatársai (2006) igazolták. Az extracelluláris proteinázok azonosítása – mint azt korábban említettem – heterológ expressziós rendszerek kifejlesztése céljából lehet jelentős (4.2 fejezet).

Az *A. nidulans*, mint szaprofita fonális gomba a természetben általában elhalt vagy korhadó növényi részeken növekszik. Több, a szénhidrátok bontásában közreműködő enzim indukálódását is detektáltuk (9. táblázat; Függelék: 1. táblázat), melyek közül a *bglM* indukálódását RT-PCR-es adataink is megerősítették (10. táblázat). A BglA szénéhezés alatti termelődését Kim és munkatársai (2011) is kimutatták. Kifejezetten a növényi sejtfal poliszacharidok lebontására az *A. nidulans* igen sokféle extracelluláris hidrolázt termel. Schneider és munkatársai (2010) az *A. nidulans* növényi lombhulladékon növekvő tenyészeiben számos celluláz, pektináz

és proteináz képződését detektálták. Szénforrás éhezés hatására azonban csupán néhány, nem gomba eredetű szénhidrát lebontásában közreműködő, szignálszekvenciával rendelkező hidrolitikus enzim indukálódását figyeltük meg (9. táblázat, Függelék: 1. táblázat). Ennek oka feltehetőleg az lehet, hogy ezen enzimek képződésében a glükóz mediált represszió alól való felszabadulás mellett az indukciónak is meghatározó szerepe lehet.

Indukciót mutatott a *treA* savas trehalázt kódoló gén is szénéhezés hatására. Mivel a *treA* génben sérült *A. nidulans* törzs nem volt képes trehalózon, mint egyedüli szénforráson növekedni, valószínűsíthetően ezen enzim az extracelluláris trehalóz hasznosításában tölt be szerepet (d'Enfert és Fontaine 1997). Mivel a trehalóz egy számos funkcióval rendelkező, kémiaiailag meglehetősen stabil, az organizmusok széles körében (mikroorganizmusok, rovarok, növények) elterjedt diszacharid, a talajban potenciális szénforrásként szolgálhat (Jorge és munkatársai 1997).

4.4.5. A fehérjeszintézisben bekövetkező változások

Szénéhezés hatására több, a fehérjeszintézishez (transzkripció, transláció, folding, poszttranszlációs módosítás, intracelluláris szállítás) köthető gén indukálódott (9. táblázat). Ezen gének egy jelentős része a fehérjék poszttranszlációs módosításában és az endoplazmatikus retikulum – Golgi apparátus közötti transzportban vesz részt, amely a szénéhező tenyészetekre jellemző intenzív extracelluláris hidroláz termeléssel lehet összefüggésben. Más, indukciót mutató gének az „Unfolded Protein Response” (UPR) részét képezik (Függelék: 1. táblázat), mely folyamat aktiválódását az energiahány, a szénéhezés alatt megfigyelhető oxidatív stressz (Emri és munkatársai 2004a) és az intenzív extracelluláris fehérje termelés is magyarázhatja. A fiziológiai, vagy környezeti stressz megzavarják az endoplazmatikus retikulumban zajló fehérje foldingot, ami a nem feltekeredett fehérjék felhalmozódásához vezet. Erre a sejtek az endoplazmatikus retikulumban jelen lévő, a foldingban szerepet játszó fehérjéket kódoló gének transzkripciójának növelésével válaszolnak, így növelve annak folding

kapacitását, mely folyamat az UPR részét képezi. Az UPR egy sokoldalú szabályozási rendszernek tekinthető, amely az endoplazmatikus retikulum homeosztázisának és funkciójának stressz alatti fenntartásában fontos (Mulder és munkatársai 2004). Ebben a folyamatban *S. cerevisiae*-ben a Hac1 transzkripciós faktor játszik főszerepet, amelynek ortológját a HacA-t *A. nidulans*-ban is leírták (Saloheimo és munkatársai 2003). Az UPR szénéhezés alatti jelentőségére utal e transzkripciós faktor indukciója mellett többek között a *pdiA*, feltehetőleg az UPR-hez kötődő diszulfid izomerázt kódoló gén (Sims és munkatársai 2005) indukálódása is (10. táblázat, Függelék: 1. táblázat).

4.4.6. A konidiogenezishez köthető változások

Korábbi megfigyeléseinkkel összhangban (Szilágyi és munkatársai 2010a) transzkripciós vizsgálataink a *brlA*, sporulációs jelátviteli útvonalban központi szerepet betöltő transzkripciós faktor (2.2 fejezet) indukálódását is kimutatták. Érdemes megemlíteni, hogy bár a 4 órás szénéhező tenyészetekben konidiogenezis még nem volt megfigyelhető, 24 órával később konidiofórok és konídiumok megjelenését tapasztaltuk (19. ábra), összhangban Skromne és munkatársainak eredményeivel (1995). Mint azt korábban bemutattam, a BrlA jelentősnek bizonyult az autolízis alatti hidrolitikus enzim produkció szabályozásában (3. és 5. táblázat). Ráadásul a 4 órás tenyészetekben a *chiB* és *engA* gének indukciója mellett az extracelluláris kitináz és β -1,3-glükánáz aktivitások is jól detektálhatónak bizonyultak (8. és 10. táblázat), tehát a BrlA az autolitikus sejtfal degradáció iniciálásában is fontos lehet. Azaz a BrlA feltehetőleg nem egyszerűen csak a konidiogenezis indukálása során tölt be szerepet, hanem ennél lényegesen komplexebb szabályozási feladatokat lát el szénéhező tenyészetekben. Valószínűsíthetően a konidiogenezis megindulásával hozható összefüggésbe a megfigyelt hidrofobinokat kódoló gének indukciója is (10. táblázat, Függelék: 1. táblázat). A hidrofobinok a micéliális gombák sejtfal fehérjéinek egy speciális, ciszteinben gazdag csoportját képviselik, amelyek a konídiumok, aszkospórák, bazidiokarpok és aerális hifák felszínén helyezkednek el és egy olyan amfipatikus

réteget formáznak, amely e struktúrák felszínének hidrofób tulajdonságot kölcsönöz (Wösten 2001; de Groot és munkatársai 2009). A microarray adatok alapján 4 feltehetőleg hidrofobint kódoló gén (AN0940, AN1837, AN6401 és *rodA*) indukálódott (9. táblázat, Függelék: 1. táblázat) és 1 (AN7539) represszálódott. Az AN7539 gén represszióját és a *rodA* gén indukcióját RT-PCR-es vizsgálataink is megerősítették (10. táblázat). A vegetatív növekedés, illetve a szénéhezés alatt történő hidrofobin termelést *T. harzianum* esetében is leírták már (Mikus és munkatársai 2009). A *rodA* gén terméke a konídiumok felületén lévő rodlet réteg kialakításában vesz részt és deléciója a konídiumok hidrofobicitásának jelentős csökkenését eredményezte (Girardin és munkatársai 1999). Felhívnom ugyanakkor a figyelmet arra, hogy hidrofobinokat a süllyesztett kultúrában lévő hifák is képeznek. Az SC3 hidrofobin termelésére nem képes *Schizophyllum commune* bazidiomycota süllyesztett kultúrában növekvő hifái nem voltak képesek a folyadék-levegő határfelület leküzdésére és a levegőben való növekedésre, amely fenotípus a hidrofobin tápközeghez való adagolásával helyreállítható volt (Wessels 2000).

4.4.7. Redox folyamatok

A redukált glutation (γ -L-glutamil-L-ciszteinil-glicin) az eukarióta sejtekben legnagyobb mennyiségben előforduló tiol-csoportot tartalmazó vegyület, amely a redox folyamatokban, a nukleofil szubsztitúciós és addíciós reakciókban, valamint (γ -glutamil-csoportja révén) a transzpeptidázreakciókban is részt vehet (Pócsi és munkatársai 2004). A szénforrás éhezés alatt az AN10444 és az AN5658, feltehetőleg γ -glutamil transzpeptidázokat kódoló gének indukcióját is megfigyeltük (10. táblázat). Eredményeink összhangban vannak azon korábbi megfigyelésekkel, miszerint a szénéhezés hatására a γ -glutamil-transzpeptidáz aktivitások emelkedése mellett a sejtek glutation tartalma gyors csökkenést mutat (Emri és munkatársai 2004a). A glutation, mint antioxidáns molekula mennyiségének csökkenése együtt jár a reaktív oxigénformák akkumulálódásával szénéhező körülmények között (8. táblázat; Emri és munkatársai 2004a). Ezzel párhuzamosan az antioxidáns enzimeket kódoló gének egy részénél indukciót, míg másoknál repressziót tapasztaltunk (9. 10.

táblázat). Hasonlóan ellentmondásosak a fiziológiai mérések eredményei is: a specifikus kataláz és glutation peroxidáz aktivitások egy átmeneti növekedés után jelentősen csökkentek, míg a Mn- és CuZn-dependens szuperoxid dizmutáz aktivitások egy átmeneti csökkenés után egyenletesen emelkedtek szénéhező tenyészetekben (Emri és munkatársai 2004a).

A reaktív oxigénformák akkumulálódását szénéhezés hatására más fajokban is tapasztalták (Jakubowski és munkatársai 2000; Sámi és munkatársai 2003). A reaktív oxigénformák káros hatásai (Fridovich 1998) mellett számos folyamat szabályozásában vehetnek részt, szerepük van többek között a növények és gombák közötti (szimbiotikus vagy parazitikus) kapcsolat kialakításában, a spórák csírázásának gátlásában, de bizonyították a kleisztotécium képzésben betöltött jelentőségüket is (Gessler és munkatársai 2007). Valószínűsíthető a szénéhezés és/vagy autolízis alatt betöltött szerepük is, mivel kis mennyiségű menadion-biszulfid (szuperoxid generáló ágens), illetve *tert*-butil-hidroperoxid adagolása az autolizáló tenyészetekhez a kitináz aktivitás növekedéséhez és gyorsult autolízishez vezetett, ugyanakkor az E vitamin az autolízis és a sporuláció hatékony gátlószerének bizonyult (Emri és munkatársai 2004b). Pontos szerepük és eredetük felderítése azonban további vizsgálatokat igényel. A ROS generáló NADPH-oxidázt kódoló *noxA* gén bár aktívnak bizonyult, nem mutatott indukciót szénéhezés hatására (10. táblázat). Érdeemes megemlíteni, hogy e gén indukálódását kimutatták a szexuális fejlődés iniciálása során, mely folyamatot a *noxA* deléciója gátolta. Az aszexuális fejlődésre és a növekedésre azonban nem volt hatással *A. nidulans*-ban (Lara-Ortiz és munkatársai 2003).

4.4.8 Szekunder anyagcsere

Bár az általunk vizsgált törzs (FGSC26) hordoz egy *veA1* mutációt, ami jelentősen csökkenti a szekunder metabolit termelés képességét (Stinnett és munkatársai 2007) a microarray és az RT-PCR adatok is igazolják több, szekunder metabolitok képződésében szerepet játszó fehérje indukálódását (9. 10. táblázat; Függelék: 1. táblázat). Ezt jelzi a szterigmatocisztin szintézisben érintett gének

indukálásában jelentős *afIR* transzkripciós faktor (Yu és munkatársai 1996b) indukálódása is (10. táblázat). Érdeemes megemlíteni, hogy bár a 4 órás szénéhező tenyészetekből szterigmatocisztint nem lehetett kimutatni, 24 órával később a kultúrák jól detektálható szterigmatocisztin tartalommal rendelkeztek. A szénéhezés alatt megfigyelhető szekunder metabolit termelés nem meglepő, figyelembe véve, hogy szekunder metabolitok képzése és a konidiogenezis gyakran egymás mellett folyó jelenségek, melyek szabályozásának is vannak közös elemei (3. ábra; Adams és munkatársai 1998; Calvo és munkatársai 2002). A szekunder metabolit termelés jelentősen befolyásolja/szabályozza a gombák más élőlényekkel (mikroorganizmusokkal, növényekkel, állatokkal) mutatott kölcsönhatásait. Számos esetben igazolták a sejtfalbontó enzimek és szekunder metabolit termékek szinergizmusát az antifungális hatás kifejtésében (Lorito és munkatársai 1996).

Kimutattuk továbbá az anizin antifungális defenzint kódoló gén indukciója (Eigentler és munkatársai 2011) mellett feltehetőleg egy hozzá hasonló antifungális fehérjét kódoló gén (AN11510) indukálódását is szénéhezés alatt (10. táblázat). Ezen fehérjék antifungális hatásuk kifejtése mellett más folyamatokban is szerepet tölthetnek be, erre utal, hogy az anizin termelésére nem képes törzs kevesebb konídiumot képzett (Eigentler és munkatársai 2011). Emellett több a bakteriális peptidoglükán bontására képes enzimet kódoló gén is indukálódott (10. táblázat, Függelék: 1. táblázat). Ezen antifungális, antibakteriális metabolitok/fehérjék jelentősen befolyásolhatják a gomba és a környezetében élő egyéb mikroorganizmusok interakcióját, ami szénforrás éhező körülmények között (a rendelkezésre álló exogén és endogén tápanyagok „megvédésén” keresztül) alapvetően meghatározhatja telep túlélését.

5. Anyag és módszer

5.1 A vizsgált *Aspergillus nidulans* törzsek és tenyésztésük

A kísérleteinkben használt *A. nidulans* törzseket a 11. táblázat foglalja össze.

Név	Genotípus	Törzsek eredete/referencia
FGSC26	<i>biA1</i>	FGSC, McCluskey 2003
FGSC744	<i>pabaA</i> ; <i>yA2</i> ; <i>fluG1</i>	FGSC
FGSC1079	<i>biA</i> ; <i>pabaA1</i> ; <i>pyroA4</i> ; Δ <i>brlA</i> ; <i>veA</i> ⁺	FGSC
FGSC1035	<i>yA2</i> ; <i>fadA</i> ^{G203R}	FGSC
FGSC242	<i>biA1</i> ; <i>pacC5</i>	FGSC
RMdgB03	<i>paba1</i> ; <i>yA2</i> ; Δ <i>argB::trpC</i> ; Δ <i>ganB::argB</i> ⁺ ; <i>trpC801</i> ; <i>veA</i> ⁺	Chang és munkatársai 2004
<i>creA</i> nullmutáns	Δ <i>creA</i> , <i>pabaA1</i> , <i>yA1</i> ; <i>riboB2</i>	Shroff és munkatársai 1997
tNJ11	<i>biA1</i> ; <i>argB2</i> ; <i>metG1</i> ; <i>argB</i> ⁺	Pócsi és munkatársai 2009
tNJ12	<i>biA1</i> ; <i>argB2</i> ; Δ <i>chiB::argB</i> ⁺ ; <i>metG1</i>	Pócsi és munkatársai 2009
tNJ36	<i>pyrG89</i> ; <i>AfupyrG</i> ⁺ ; <i>pyroA4</i> ; <i>veA</i> ⁺ ;	Kwon és munkatársai 2010b
tNJ33.3	<i>pyrG89</i> ; Δ <i>engA::AfupyrG</i> ⁺ ; <i>pyroA4</i> ; <i>veA</i> ⁺	Szilágyi és munkatársai 2010b
tNJ34.8	<i>pyrG89</i> ; Δ <i>engA::AfupyrG</i> ⁺ ; <i>pyroA4</i> ; Δ <i>chiB::AnpyroA</i> ⁺ ; <i>veA</i> ⁺	Szilágyi és munkatársai 2010b
tNJ76.7	<i>pyrG89</i> ; Δ <i>pepJ::AfupyrG</i> ⁺ ; <i>pyroA4</i> ; <i>veA</i> ⁺	Szilágyi és munkatársai 2011
tNJ77.16	<i>pyrG89</i> ; Δ <i>prtA::AfupyrG</i> ⁺ ; <i>pyroA4</i> ; <i>veA</i> ⁺	Szilágyi és munkatársai 2011
tNJ78.4	<i>pyrG89</i> ; Δ <i>pepJ::AfupyrG</i> ⁺ ; <i>pyroA4</i> ; Δ <i>prtA::AnipyroA</i> ⁺ ; <i>veA</i> ⁺	Szilágyi és munkatársai 2011

11. táblázat Kísérleteinkben felhasznált *Aspergillus nidulans* törzsek. A táblázatban szereplő valamennyi *Aspergillus nidulans* törzs hordozza a *veA1* allélt, kivéve az FGSC1079, tNJ36, tNJ33.3, tNJ34.8, tNJ76.7, tNJ77.16, tNJ78.4, RMdgB03 törzsek. FGSC: Fungal Genetic Stock Centre, University of Missouri, Kansas City, Missouri, USA.

A törzseket, glükózt tartalmazó minimál tápagon tartottuk fenn (Barratt és munkatársai 1965). A tápagar összetétele: 6 g/l NaNO₃, 1,5 g/l KH₂PO₄, 0,5 g/l MgSO₄·4H₂O, 0,5 g/l KCl volt, szénforrásként pedig 10 g/l glükózt tartalmazott. Ezen felül 0,1 v/v% nyomelem oldatot és 20 g/l agart (pH 6,5) tartalmazott, amit szükség szerint 25 µg/l biotinnal, 0,2 g/l L-metioninnal, 200 µg/l 4-aminobenzoésavval (*paba*), 20 µg/l riboflavinnal, vagy 200 µg/l piridoxinnal egészítettünk ki. A nyomelem oldat összetétele a következő volt: 22 g/l

ZnSO₄·7H₂O, 11 g/l H₃BO₃, 5 g/l MnCl₂·4 H₂O, 5 g/l FeSO₄·7H₂O, 1,6 g/l CoSO₄·5 H₂O, 1,6 g/l CuSO₄·5 H₂O, 1,1 g/l (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O és 50 g/l Na₂EDTA. A tápagarra leoltott törzseket 1 héten át 37 °C-on inkubáltuk, majd a kinőtt és bespórázott tenyészeteket 4 °C-on tároltuk. A maximum 1 hétig tárolt, bespórázott tenyészeteket használtuk fel kísérleteinkhez.

5.1.1 Felületi tenyészetek

Ebben az esetben is a Barratt-féle minimál tápközeget használtuk (Barratt és munkatársai 1965), az alábbi szénforrást érintő módosításokkal:

- 1) **Komplex tápközeg:** 10 g/l glükóz, 5 g/l élesztőkivonat.
- 2) **Glükózt tartalmazó minimál tápközeg:** 10 g/l glükóz.
- 3) **Glükózmentes, élesztőkivonatot tartalmazó tápközeg:** 5 g/l élesztőkivonat.
- 4) **Na-acetátot tartalmazó komplex tápközeg:** 10 g/l Na-acetát, 5 g/l élesztőkivonat.
- 5) **Na-acetátot tartalmazó minimál tápközeg:** 10 g/l Na-acetát.

A különböző *A. nidulans* törzsek konídiumtermelő képességének és növekedésének vizsgálatok az oltáshoz 10 µl, 1000 spóra/µl töménységű spórasuszpenziót használtunk, majd ezt követően a tenyészeteket 37 °C-on inkubáltuk. A képződött konídiumokat 1 ml 1 v/v % Tween 80 segítségével mostuk le és számukat Bürker kamra segítségével határoztuk meg. A termelt konídiumok mennyiségét egységnyi telepterületre vonatkoztattuk. A telepek átmérőjének növekedését szintén meghatároztuk.

Az *A. niger*rel szemben mutatott interakció vizsgálatok az *A. nidulans* törzseket (10000 spóra 10 µl-ben felszuszpendálva) a fent leírt, Na-acetátot tartalmazó komplex tápközegre oltottuk. 3 napig 37 °C-on inkubáltuk, majd az *A. niger* VG1 (10000 spóra 10 µl-ben felszuszpendálva) törzset mellé oltottuk és 24 °C-on inkubáltuk tovább.

5.1.2 Rázott tenyészetek

A Barratt-féle táplevest (a táptalaj agarmentes változata) használtuk fel, az alábbi szénforrást érintő módosításokkal:

- 1) **Komplex tápközeg:** 10 g/l glükóz, 5 g/l élesztőkivonat.
- 2) **Glükózt tartalmazó minimál tápközeg:** 10 g/l glükóz.
- 3) **Glükózmentes minimál tápközeg:** nem tartalmazott szénforrást.
- 4) **Glükózmentes, élesztőkivonatot tartalmazó tápközeg:** 4 g/l élesztőkivonat.

Az alkalmazott kísérleti elrendezések:

- 1) **Nem átmosott tenyészetek:** a törzseket 500 ml-es, 100 ml komplex tápoldatot tartalmazó lombikokban növesztettük fel. A tápleves 100 ml-ét 50 millió spórával oltottuk be és a tenyészeteket rázóinkubátorban 37 °C-on 220 rpm-mel ráztuk a leoltástól számítva 144 órán keresztül.
- 2) **Átmosott tenyészetek:** a törzseket 500 ml-es, 100 ml komplex tápoldatot tartalmazó lombikokban növesztettük fel. A tápleves 100 ml-ét 50 millió spórával oltottuk be és a tenyészeteket rázóinkubátorban 37 °C-on 220 rpm-mel ráztuk a leoltástól számítva 20 órán keresztül. A 20 órás, még exponenciálisan növekvő tenyészeteket zsugorított üvegszűrőn leszűrtük, mostuk, majd 100 ml friss táplevesben (glükózmentes minimál tápközegben, glükózt tartalmazó minimál tápközegben vagy glükózmentes, élesztőkivonatot tartalmazó tápközegben) szuszpendáltuk fel és 37 °C-on 220 rpm-mel ráztuk további 124 órán át. A micélium mosásához 37 °C-ra előmelegített, steril desztillált vizet használtunk. Az átmosást követően a tenyészetek szárazanyag tartalma 4 g/l volt.

A tápközeg pH-jának extracelluláris proteináz termelésre gyakorolt hatását 2 l-es fermentorban (Biostat B-plus; Sartorius) vizsgáltuk. Az 1,8 l glükózt tartalmazó minimál táplevest tartalmazó fermentor oltásához mintegy 20 g nedvestömegű, 20 órás, az előbb említett módon komplex tápközegben felnövesztett folyékony tenyészetekből származó micéliumot használtunk. A tenyészetet 37 °C-on, 2 l/min levegőztetés és 200 rpm kevertetés mellett 5 napig (120 óra) inkubáltuk. A fermentor oltását követően 24 óráig a pH-t nem szabályoztuk, majd ezt követően a tenyésztést kontrollálatlan pH-n, pH 6,5-ön, illetve pH 8,5-ön folytattuk tovább.

5.2 További gombatörzsek és tenyésztésük

A vizsgálatainkban felhasznált nem *A. nidulans* törzseket a 12. táblázat tartalmazza. A törzseket malátás tápagon tartottuk fenn. A malátás tápagar összetétele a következő volt: 10 g/l malátakivonat, 20 g/l glükóz, 5 g/l élesztőkivonat és 20 g/l agar. A tápagra leoltott törzseket 1 héten át 24 °C-on inkubáltuk, majd a kinőtt és bespórázott tenyészeteket 4 °C-on tároltuk. A maximum 1 hétig tárolt, bespórázott tenyészeteket használtuk fel a kísérleteinkhez.

Név	Genotípus	Törzsek eredete
<i>Aspergillus rugulosus</i> CBS171.71	vad típus	CBS
<i>Aspergillus niger</i> VG1	vad típus	Vasas G. (Debreceni Egyetem)
<i>Aspergillus fumigatus</i> FGSC1100 (AF293)	vad típus	FGSC
<i>Penicillium nalgiovense</i> NCAIM F-001333	vad típus	NCAIM
<i>Penicillium chrysogenum</i> NCAIM 00237	kevés penicillint termelő ipari törzs	NCAIM
<i>Trichoderma atroviride</i> T122	vad típus	Galgóczi L. (Szegedi Tudományegyetem)
<i>Fusarium oxysporum</i> VG5	vad típus	Vasas G. (Debreceni Egyetem)

12. táblázat A vizsgálatainkban használt nem *Aspergillus nidulans* törzsek. CBS: Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands (Fungal Biodiversity Centre). FGSC: Fungal Genetic Stock Centre, University of Missouri, Kansas City, Missouri, USA. NCAIM: National Collection of Agricultural and Industrial Microorganisms, Corvinus University, Budapest, Hungary.

5.3 Mintavétel

Az extracelluláris enzimaktivitások meghatározásához, az enzimsztításhoz és az antifungális hatás teszteléséhez szükséges fermentlé elválasztásához a tenyészeteket zsugorított üvegszűrőn szűrtük át. A tenyészetek szárazanyag tartalmának (DCM) mérésekor 5 ml tenyészetből származó micéliumot desztillált vízzel mostunk, majd súlyállandóságig (2 nap) szárítottuk (Pusztahelyi és munkatársai 1997).

Az RNS izoláláshoz 5-15 ml tenyészetet zsugorított üvegszűrőn átszűrtünk, a micéliumot jéghideg dietil-pirokarbonáttal (DEPC) kezelt vízzel mostuk, majd felhasználásig $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk. Az RNS mintákat (ha másképp nem jelöltem) a glükózmentes minimál tápközegbe való átmosást követően legkésőbb 8 órával vettük le az RNS megfelelő minősége érdekében. Öregebb tenyészetek RNS mintáit az RNS nagyfokú degradáltsága miatt nem tudtuk felhasználni.

5.4 Életképesség mérés

A tenyészetek életképességének meghatározásakor 5 ml tenyészetet zsugorított üvegszűrőn leszűrtünk, az így nyert micéliumot 20 ml friss komplex tápközegben szuszpendáltuk fel. A tenyészeteket rázóinkubátorban $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on 220 rpm-mel ráztuk további 15 órán keresztül. Ezt követően a tenyészeteket zsugorított üvegszűrőn leszűrtük és súlyállandóságig (2 nap) szárítottuk. Az életképesség jellemzésére a száraztömeg növekedését használtuk fel (Molnár és munkatársai 2006).

5.5 Az antifungális hatás tesztelése

Az 5.1.2 pontban leírt módon glükózmentes minimál tápközegbe átmosott tenyészetek, az átmosás után 24 órával leszűrt fermentlevének 20 ml-ét liofilizáltuk, majd 0,75 ml 0,1 mol/l K-foszfát pufferben (pH 6,75) oldottuk fel. Ezt követően egy éjszakán át dializáltuk (membrán pórusmérete: 12600 Da) $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on, ugyanezen pufferrel szemben. A dializált minták térfogatát egységesen 1 ml-re állítottuk a K-foszfát puffer segítségével.

Az antifungális hatás teszteléséhez 96 lyukú plate-et használtunk. Egy lyuk 100 μl össtérfogatot tartalmazott, ami 50 μl kétszeres töménységű táplevesből és 50 μl az előbb leírt kezeléssel átesett fermentlevek, illetve a tisztított enzimek (PepJ, EngA, ChiB) különböző hígításaiból (1X, 2X, 5X, 10X) állt. Mivel az 50 μl táplevessel a kezelt fermentlevek, illetve a tisztított enzimek kétszeresükre hígultak, a tényleges koncentrációjuk 2X, 4X, 10X, 20X hígítású volt. Az *A. nidulans* törzsek esetében komplex táplevest, a többi törzs esetében malátás táplevest használtunk. Az

egyszeres töménységű malátás tápleves összetétele megegyezett az 5.2 pontban leírt malátás tápagar összetételével, de agart nem tartalmazott. A kontrollméréseknél a fermentleveket, illetve a tisztított enzimeket előzőleg 20 percig inkubáltuk 100 °C-on. Az oltáshoz 1000 spórát használtunk fel.

Az antifungális hatás jellemzésére a növekedés kontroll tenyészetekhez viszonyított %-os mértékét használtuk fel. A tenyészetek növekedését a platekról készített fotók CP Atlas software (www.lazarsoftware.com) segítségével történő kiértékelésével jellemeztük. A méréseket Elisa-Reader segítségével is elvégeztük 630 nm-en. Az így kapott adatok (rövid inkubációs idők esetén) jól korreláltak a fényképek számítógépes elemzésével nyert adatokkal. Nagyobb micéliumtömeg esetén (hosszabb inkubációs idő) az „image analysis” bizonyult megbízhatóbb eljárásnak, így a dolgozatban is csak ezeket az értékeket mutatom be.

5.6 Enzimmtisztítás és MALDI-TOF analízis

A fermentléhez (200 ml) 90 %-os (PepJ), illetve 100 %-os (EngA, ChiB) telítettségig kristályos $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -ot adagoltunk állandó keverés mellett 4 °C-on és 1 órán át kevertettük. A kicsapódó fehérjéket lecentrifugáltuk (10000 rpm, 10 perc, 4 °C), majd a csapadékot 5 ml 75 mmol/l Tris/ecetsav pufferben (pH 9,3) vettük fel és egy éjszakán át dializáltuk ugyanezen pufferrel szemben. A fermentlé fehérjetartalmának meghatározása Bradford reagenssel történt ($\lambda=595$ nm; Bradford 1976).

A kromatofókuszáláshoz Polipuffer Exchanger 94 oszlopot (15 mm x 120 mm; Pharmacia Biotech) használtunk pH 9-6 tartományban (Binod és munkatársai 2005). A 0,5 ml/perc folyási sebesség mellett vett 2 ml térfogatú frakciók fehérjetartalmát ($\lambda=280$ nm), aktivitását és pH-ját is meghatároztuk. Az aktivitást mutató fehérje csúcsok izoelektromos pontját a maximális aktivitással rendelkező frakció pH-jával becsültük meg. Az aktív fehérje csúcsot 12,5 %-os SDS poliakrilamid gélen futtattuk meg, majd a gélből kivágott fehérjét MALDI-TOF MS analízis segítségével azonosítottuk (Pusztahelyi és munkatársai 2006). A MALDI-TOF MS vizsgálatokat Dr. Darula Zsuzsa (SZBK, Szeged) végezte.

5.7 Poliakrilamid gélelektroforézis

Az SDS poliakrilamid gélelektroforézishez 12,5 %-os gélt használtunk (LeBlanc és Cochrane 1987) és a protein sávokat Coomassie Blue festéssel tettük láthatóvá (Laemmli 1970). Molekulasúly markerként előfestett Page-Ruler™ (Fermentas) fehérje létrát használtunk.

5.8 Enzimaktivitás mérések

A kitináz aktivitás mérésénél 50 µl mintához 300 µl 0,1 mol/l citrát puffert (pH 5,0) és 50 µl CM-Chitin-RBV (Loewe Biochimica GmbH, Sauerlach, Germany) kromofór-csoporttal jelölt szubsztrátoldatot adtunk. A 10 perces inkubációt (25 °C) követően a reakciót 300 µl 2 mol/l-es HCl-val állítottuk le. A minták centrifugálása (10000g, 5perc, 4°C) után a felszabaduló színes termék mennyiségét a felülúszóból, fotometriásan ($\lambda=550$ nm) határoztuk meg (Emri és munkatársai 2004a).

A proteináz aktivitás mérésénél 100 µl mintához, 100 µl, 25 mg/ml-es, 0,2 mol/l Na_2HPO_4 /0,1 mol/l citromsav (pH 6,5) pufferben feloldott azokazein (kromofór-csoporttal jelölt kazein) oldatot adtunk. A 30 perces inkubációt (37°C) követően a reakciót 800 µl 5 w/v %-os triklór-ecetsavval állítottuk le. A minták centrifugálása (10000 g, 5 perc, 4°C) után a felülúszóhoz 1:1 arányban 0,5 mol/l-es NaOH oldatot adtunk. A proteináz aktivitás hatására felszabaduló színes termék mennyiségének meghatározása fotometriásan történt ($\lambda=440$ nm) (Tomarelli és munkatársai 1949). Egyes kísérletekben a proteináz aktivitást BSA (Bovine Serum Albumin; 25 mg/ml) szubsztrát segítségével is meghatároztuk ($\lambda=280$ nm).

A β -1,3-glükánáz aktivitás méréséhez laminarin szubsztrátot (*Laminarin digitata*) használtunk. Az enzimatis reakció során 10 µl mintához 40 µl, 0,64 mg/ml laminarint tartalmazó 100 mmol/l imidazol/ecetsav puffert (pH 7,0) adtunk, majd 30 percig 37 °C-on inkubáltuk (Fontaine és munkatársai 1997). A képződött redukáló cukor mennyiségét PAHBAH (p-hidroxibenzoészav hidrazid) reagenssel ($\lambda=410$ nm) határoztuk meg (Lever 1973).

A β -1,4-glükánáz aktivitás mérése a β -1,3-glükánáz aktivitás méréséhez hasonló módon történt, de ebben az esetben szubsztrátként karboximetil-cellulózt használtunk.

A β -glükozidáz aktivitás méréséhez 50 μ l mintához 200 μ l 5 mg/ml *p*-nitrofenil- β -D-glükózt tartalmazó, 120 mmol/l Na-acetát puffert (pH 7) adtunk. A 30 perces inkubáció (37 °C) után a reakciót 500 μ l 100 mmol/l borát pufferrel (pH 10) állítottuk le. A felszabaduló *p*-nitrofenol mennyiségét fotometriásan (λ =400 nm) határoztuk meg (Fontaine és munkatársai 1997).

Az enzimaktivitások értékét egységekben (U) fejeztem ki, 1 U az az enzimmennyiség, ami 1 egység adszorbanciaváltozást okoz a fent leírt aktivitásmérés során. A mért értékeket a méréshez felhasznált minta térfogatára vonatkoztattam és U/ml dimenzióban adtam meg.

5.8.1 Az EngA β -1,3-endoglükánáz és PepJ proteináz pH függésének és pH-függő stabilitásának meghatározása

Az EngA és PepJ pH-függésének tesztelésekor az β -1,3-glükánáz és proteináz aktivitást az 5.8 pontban leírtaknak megfelelően, de különböző pH-jú pufferekben (pH 3,5–7,0: 0,2 mol/l Na_2HPO_4 /0,1 mol/l citrát puffer; pH 7,0–8,5: 0,2 mol/l Tris/HCl; pH 8,5–10,5: 0,2 mol/l NaOH/0,2 mol/l Gly puffer) határoztuk meg. Az enzimek pH-függő stabilitásának vizsgálatakor az enzimpreparátumokat 24 órán át 37°C-on előinkubáltuk a különböző pH-jú pufferekben (pH 3,5–10,5), majd az enzimek megmaradt aktivitását az 5.8 fejezetben leírtaknak megfelelően mértük. Az azokazein savas pH-n mutatott alacsony oldhatósága miatt a proteináz aktivitás mérését BSA szubsztrát felhasználásával végeztük.

5.8.2 Az EngA β -1,3-endoglükánáz és PepJ proteináz hőmérsékletfüggésének és hőstabilitásának meghatározása

Az EngA és PepJ hőmérsékletfüggésének tesztelésekor a β -1,3-glükánáz és proteináz aktivitást az 5.8 pontban leírtaknak megfelelően, de különböző hőmérsékleteken (5, 15, 25, 35, 45, 55, 65, 75, 85 és 95°C) határoztuk meg. Az

enzimek hőstabilitásának vizsgálatakor az enzimpreparátumot 15 percig különböző hőmérsékleteken (35, 45, 55, 65, 75, 85 és 95°C) előinkubáltuk, majd az enzim megmaradt aktivitását az 5.8 fejezetben leírtaknak megfelelően mértük.

5.8.3 A *PepJ* EDTA-val való gátolhatóságának vizsgálata

Az enzim EDTA-val való gátolhatóságának vizsgálatakor az enzimpreparátumot 10 mmol/l Na₂-EDTA (pH 6,5) jelenlétében 30 percig előinkubáltuk (37°C) és a proteínáz aktivitás mérését az 5.8 pontban leírtaknak megfelelően végeztük el.

5.9 A sejtek szuperoxid és peroxid tartalmának mérése

A sejtek szuperoxid (Carter és munkatársai 1994) és peroxid (Royall és Ischiropoulos 1993) tartalmának vizsgálatánál a tenyészetekhez dihidroetidint, illetve 2',7'-diklórfluoreszcein diacetátot adtunk 10 µmol/l-es végkoncentrációban. Az egy óra alatt képződő etidium (Et), valamint 2',7'-diklórfluoreszcin (DCF) koncentrációjának meghatározásához a tenyészet 5 ml-ét zsugorított üvegszűrőn átszűrtük, desztillált vízzel alapon mostuk, majd 1 ml 5 w/v % 5'-szulfoszalicilsav oldatban szuszpendáltuk fel. A sejtaltörmeléket 20 perc 4 °C-on történő inkubációt követően lecentrifugáltuk (10 min, 10000 g, 4 °C). A felülúszó 0,5 ml-ét 0,5 ml 0,5 mol/l NaOH-tal semlegesítettük, majd a minták Et, illetve DCF tartalmát fluorimetriás módszerrel határoztuk meg ($\lambda_{\text{ext,Et}}=488$ nm, $\lambda_{\text{em,Et}}=610$ nm; $\lambda_{\text{ext,DCF}}=502$ nm, $\lambda_{\text{em,DCF}}=523$ nm). A képződött Et és DCF mennyiségét a sejtek száraztömegére vonatkoztattam és pmol/mg DCM dimenzióban adtam meg.

5.10 A tápközeg glükóz tartalmának mérése

A tápközeg glükóz tartalmának mérésekor a Leary és munkatársai (1992) által kidolgozott "rate assay" eljárást használtuk. A reakcióelegy összetétele 0,1 mol/l K-Na-foszfát puffer (pH 6,6), 4 kU/l glükóz-oxidáz, 1 kU/l peroxidáz, 0,76 mmol/l 4-aminoantipirin, 11 mmol/l fenol és 3 v/v % minta volt. Az adszorbancia változást

500 nm-en detektáltuk. Az 1 perc alatt bekövetkezett adszorbancia változás alapján egy glükóz oldat segítségével készített kalibráló sor alapján számoltuk ki a minták glükóz koncentrációját.

5.11 Vékonyréteg kromatográfia

A szénéhezés alatt termelt szterigmatocisztin mennyiségének meghatározásához a micéliumból liofolezést követően 20 mg-ot kimértünk, majd a szterigmatocisztint 500 µl 70 v/v %-os aceton oldat segítségével extraháltuk. Centrifugálás után a felülúszó 25 µl-ét szilikagél vékonyrétegre vittük fel. A futtatószer összetétele a következő volt: 80 v/v % toluol, 10 v/v % etil-acetát, 10 v/v % jégecet. Előhívóként 96 v/v %-os etanolban feloldott AlCl_3 -ot (10 g/l) használtunk és a szterigmatocisztint az $\text{UV}_{254\text{nm}}$ fényben zöld színt mutató csíkok jelezték (Klich és munkatársai 2001). A szterigmatocisztin mennyiségét sztenderd sor segítségével határoztuk meg és a micélium szárazanyag tartalmára vonatkoztattuk.

5.12 Transzkripció vizsgálatok

5.12.1 RNS izolálás, koncentráció meghatározás és denaturáló agaróz gélelektroforézis

Az RNS izolálást liofilizált micéliumból, TRISOL reagens segítségével (Invitrogen, Lofer, Ausztria) a gyártó ajánlása szerint kiviteleztük (Chomczynski és munkatársai 1993). A minták RNS koncentrációját és tisztaságát fotometriásan határoztuk meg ($\lambda=280/260$). Az RT-PCR-es vizsgálatokhoz az RNS minták DNáz kezelést követően kerültek felhasználásra.

Az RNS minták minőségének ellenőrzése denaturáló agaróz gélelektroforézissel történt. Az agaróz gél összetétele a következő volt: 10 g/l agaróz, 10 v/v % 10X MOPS-EDTA oldat, 0,002 v/v % etídium-bromid (10 mg/ml), 5 v/v % formaldehid. Az RNS mintákat (10 µg) 2 µl 25 mmol/l EDTA és 1% SDS oldat, illetve 2 µl mintafelvivő puffer (5X RNA loading buffer, Invitrogen, Lofer,

Ausztria) elegyében inkubáltuk (10 perc, 68 °C), majd a futtatást 1X MOPS-EDTA oldatban végeztük (80 V). A 10X MOPS-EDTA összetétele a következő volt: 200 mmol/l MOPS, 50 mmol/l Na-acetát, 10 mmol/l EDTA (pH 7,0).

5.12.2 Génexpresszó vizsgálata RT-PCR segítségével

Az RT-PCR reakciókat Brilliant® II SYBR® Green QRT-PCR Master Mix kit (Stratagene) segítségével kiviteleztek, a gyártó által megadott protokollt követve. A reakcióelegy összetétele a következő volt: 400 ng totál RNS, 2,5 mmol/l Mg²⁺, 0,5 µmol/l génspecifikus primer. Az RT-PCR reakciók során felhasznált primerek szekvenciáját és az egyes primerek hibridizációs lépésénél alkalmazott hőmérsékleteket a 13. táblázat tartalmazza.

Az RT-PCR reakció lépései a következők voltak:

- 1) reverz transzkripció, 50 °C, 30 perc
- 2) reverz transzkriptáz denaturáció, 95 °C, 15 perc
- 3) DNS denaturáció, 94 °C, 15 másodperc
- 4) primer hibridizáció (annealing), T_m-(5-8) °C, 30 másodperc
- 5) lánchosszabbítás (extenzió), 72 °C, 30 másodperc
- 6) a ciklus ismétlése a harmadik lépéstől 40 ciklus erejéig

Az RT-PCR termékek homogenitásának megállapítása olvadáspont meghatározással, illetve agaróz gélelektroforézissel történt. Az olvadáspont meghatározása során a PCR termék 95 °C-ra történő melegítését követően a készülék a hőmérsékletet 0,5 °C-os lépésekben 55 °C-ra csökkentette. Eközben a fluoreszcens jel változását mérte. Az agaróz gélelektroforézis 1 %-os gélben, 1X TAE puffer, illetve DNS minta felvivő puffer (Invitrogen, Lofer, Ausztria) felhasználásával történt. A TAE puffer összetétele a következő volt: 40 mmol/l Tris, 20 mmol/l ecetsav, 1 mmol/l EDTA (pH 8).

A relatív transzkripció (Δ CP) mértékét a Δ módszerrel számoltuk ki: Δ CP = CP_{gén} - CP_{referencia}, ahol a CP a PCR termék akkumulálódásához szükséges ciklusszám a vizsgált gén (gén), illetve a „housekeeping” gén (referencia) esetében. A

„housekeeping” gén az eEF-3 elongációs faktor (AN6700) volt. A Δ CP érték csökkenése utal a gén indukciójára.

Gén neve, hibridizációs hőmérséklet	„Forward primer” szekvenciája	„Reverse primer” szekvenciája
AN0230, 53 °C	5'-ATTCCTCCACAGTCGCC-3'	5'-AAGCAGTCATCCATCGGG-3'
AN0241, 51 °C	5'-CTTCCACATCCACCAGTTC-3'	5'-CAGCGTTACCAGTCTTCTTG-3'
AN0245, 51 °C	5'-AACGGCGGTGAGATTGAC-3'	5'-CATTCGGTGGCATAGACG-3'
AN0472, 47 °C	5'-GACGAAAACAGCCAGTAG-3'	5'-CTCCATTCTTGCGAACAGG-3'
AN0779, 52 °C	5'-TGAGAACAAGCAGCAGGG-3'	5'-AGCAGGACAGAACCAACAG-3'
AN0787, 53 °C	5'-ACGCCTTACCAACATCAAC-3'	5'-GTATTCCACTGCCCTTCTG-3'
AN0940, 52 °C	5'-ATCTTTCCACCTCCGCTG-3'	5'-TCAACGCCATCACCACCC-3'
AN0973, 51 °C	5'-CGACTTTCTCTCTGGATACGATG-3'	5'-CTGGTGACGGTAGTTGTTGTTG-3'
AN1006, 52 °C	5'-TATGTCGTCCAAAACCCG-3'	5'-TTATTCTTCGTCGCTCC-3'
AN1007, 52 °C	5'-TCGTGATTGGAGAAGAGCC-3'	5'-CGGGTATTGAGGTAGTAGTC-3'
AN10444, 51 °C	5'-GTCGCCATCGCTGTCGTTATC-3'	5'-CGAGTCCAACGGTGACGGAAG-3'
AN10576, 52 °C	5'-ACTCTCTTCGGTGTGGC-3'	5'-GGGCTCTATCTCGTAATG-3'
AN10585, 52 °C	5'-CATCTTTGCCGTTATCCCTG-3'	5'-GTCTTGTCTTGTGTGGTAG-3'
AN10779, 52 °C	5'-CAAGGAGAGGATTCGCATAC-3'	5'-ATTGTAAGCAGCACCAACC-3'
AN11062, 52 °C	5'-CCAGGTATCTACTCCCAG-3'	5'-GTCCGAACAGGCTTAACG-3'
AN1117, 52 °C	5'-CCATCCGTGAACATACAAGC-3'	5'-GAAAGCGTGAGTGATACCC-3'
AN1131, 52 °C	5'-CACCACGCTTCCCTTCTG-3'	5'-CTCAAATCGCCAACCTCGC-3'
AN11510, 51 °C	5'-TCTGGGGTGCTGGCGATG-3'	5'-CCGTGGTAGGTTCCGTCC-3'
AN11897, 53 °C	5'-AAGGACTACAGCGGAGAC-3'	5'-GCCATCACGCCAACATAC-3'
AN1414, 52 °C	5'-CGATGCCAGTATATCCGTG-3'	5'-GTCAGTTCTGCTCCTTGC-3'
AN1418, 52 °C	5'-GCATTAGCGGTCAAGGAG-3'	5'-TGTTCACTGTCATCGGAGC-3'
AN1428, 52 °C	5'-GCCCGAACAAGACTATTAGAC-3'	5'-GCGATGATGCCGTAGAATAAAC-3'
AN1502, 53 °C	5'-ATTGGGACGCCGATCTACAG-3'	5'-GCCAGTGAAGGACATTGAGC-3'
AN1723, 52 °C	5'-TTCTCTCTCCACCTCTC-3'	5'-GCCCTCGTAGTTGTTGTAG-3'
AN1899, 52 °C	5'-CGGGCAGACTACACATAC-3'	5'-TCAACGGACCAGAATCGG-3'
AN2017, 52 °C	5'-GCCAACATCTACGGACAG-3'	5'-CCTGCGGATTCAACACAAC-3'
AN2091, 53 °C	5'-CGTCTCTCAGGCAATCGC-3'	5'-ATCCCGTCCGCAAATAGC-3'
AN2092, 52 °C	5'-GCACTGGACAAAGGATACC-3'	5'-CTGGGAAGAAGGAAAGATAGG-3'

AN2099, 52 °C	5'-CAGATGACGGAAAAGGAATGG-3'	5'-GTGGCGAGATGAGATAAGAG-3'
AN2237, 52 °C	5'-GCAAATACCACTGAGAACGC-3'	5'-AAGAACGCAGAGAAAACGG-3'
AN2265, 51 °C	5'-GCTGATTATGTTAGAGACCGAC-3'	5'-ATTGATTTGGGGACTTTGGATG-3'
AN2523, 52 °C	5'-TTGCGACAAGGACACATTGG-3'	5'-ACCGAAAGCGTTGAACAGC-3'
AN2572, 52 °C	5'-CCAATCACACTACTGCCTAC-3'	5'-TGCTCTTATCCGTCCACTTG-3'
AN2738, 52 °C	5'-TACGAGGAAAAGGGGTCTG-3'	5'-GGCAGGTAGGATGTTGAG-3'
AN2876, 52 °C	5'-TGCTCCTCGCTCTTACAG-3'	5'-TCAAATCCTCCTCCCTCG-3'
AN2981, 52 °C	5'-GGTGTGCTCGTATTATTGTC-3'	5'-CAGGTGGCATTGAAGAACTC-3'
AN2984, 51 °C	5'-GCCGAATCCCTCTGTCTACA-3'	5'-GTATGGATGGATGAGGTGGC-3'
AN3150, 47 °C	5'-AGGAGGGAGGTAGCAAAAAG-3'	5'-CAGATGGAGGGTAATAAGGC-3'
AN3307, 52 °C	5'-ACGCCATCACCGAAATCC-3'	5'-TCATAACACCCGACCAGG-3'
AN3357, 52 °C	5'-GTATCAACCTTGGAACGGAG-3'	5'-CTGCGATTGGATTTACAGC-3'
AN3393, 52 °C	5'-GTTCCACCACCTACTACTG-3'	5'-CGCAGCATCATACCCATAG-3'
AN3729, 52 °C	5'-CCACCACGATGACTACTAC-3'	5'-TACGACACCTGCGAAGAAG-3'
AN4282, 52 °C	5'-CGATACGACCCAGTGATG-3'	5'-GACCCAGTTTTCCATAGC-3'
AN4367, 52 °C	5'-GACTTCACGCTCCGCAATG-3'	5'-GAACACCAGGCAGACCAC-3'
AN4809, 55 °C	5'-GACGCCGCTCCTATTCTCTG-3'	5'-ATTGCCTCTCGCTGGGTTAG-3'
AN4825, 52 °C	5'-GCGTGGTCGTCAAAGATGC-3'	5'-TGTAGAGGTCCCGTTAGC-3'
AN4871, 52 °C	5'-TGGTACCAGGCGAATCTC-3'	5'-CGGGACGAAGGATCATAAG-3'
AN4923, 52 °C	5'-CCACGGAAACACCAACATC-3'	5'-GTAAGAAGCACGGAGACC-3'
AN5046, 53 °C	5'-CAATTCTCCGCCATCGTCC-3'	5'-GCACCAAAGATACCACCAAG-3'
AN5104, 51 °C	5'-CGTGTCAATTAGGTGTCTTCC-3'	5'-AGCATCATCATAGGTAGCC-3'
AN5144, 52 °C	5'-GCAAGCCGATGACCGAAAG-3'	5'-GCAAAGTGTGGAGACGAAGG-3'
AN5174, 52 °C	5'-CCCCTATCTTATCTCCTATCC-3'	5'-CTTGATTTGCTGCTGGTTTCG-3'
AN5457, 51 °C	5'-GCGAAACGGAGATTGTGAAG-3'	5'-AAAGGGGCAGGAAGTGATG-3'
AN5523, 52 °C	5'-CTGCCAACCCTCCTAATG-3'	5'-GTCAACGCCCTACCATAAGC-3'
AN5558, 52 °C	5'-TTCTGTCCGTCAAGGTTTTTC-3'	5'-TGAAGGCGTAAGAGTATCCAC-3'
AN5577, 51 °C	5'-CTTGCTTACGACTATGGCG-3'	5'-GTTGATGGCTTTGGAGAGAG-3'
AN5652, 52 °C	5'-CGCAAGGAGCACATCGTC-3'	5'-GAGGTTCCGTCTGGTCTG-3'
AN5658, 51 °C	5'-CCAGACAAAACCCCGACTTTG-3'	5'-CAGCATTTCACCCTGACTC-3'
AN5666, 52 °C	5'-TCTGGAACACCCTTACCTTG-3'	5'-GCACCGATTGGCGAAAACG-3'
AN5712, 52 °C	5'-GGTCTGCTCTGGATTTGCC-3'	5'-TGGTCTTGGTCTGCTTGGTTC-3'
AN5814, 52 °C	5'-GAGAAGAGTGGATGGAGC-3'	5'-AAAGTATTGGGTCAGGGC-3'
AN5860, 52 °C	5'-AACACTCCAAGCCACAAC-3'	5'-GAAGACCGACGATTAGACCG-3'

AN5918, 52 °C	5'-CAGAGCAAG CCGAGAAGTTC-3'	5'-CAAGGTGGGAGGGAGAGAAG-3'
AN6438, 51 °C	5'-TCCAGCCGAGAAGATACC-3'	5'-GTCCATAAGTTGTTGCCGC-3'
AN6464, 52 °C	5'-GACGGCTGGGAAGTTAATATG-3'	5'-GGGTGGAAAGGACAATCAAAG-3'
AN6470, 52 °C	5'-CGACCCCTTTTCAACAC-3'	5'-CAGAGAGCCCGTAACATC-3'
AN6620, 53 °C	5'-CGATTCAAACGAGGGCGG-3'	5'-ACGGCAACATTCAGCAGC-3'
AN6669, 52 °C	5'-CAAAGCCGAGTATGAAGCC-3'	5'-ACAAACCCGACACCGAATC-3'
AN6700, 52 °C	5'-CCTATTCCCGAGCAAGTTC-3'	5'-TGATGTTCTGACGATGGC-3'
AN6923, 51 °C	5'-ACTACTTTCAGGTCGGCG-3'	5'-TGCTTTGGGCTCACTTCG-3'
AN7349, 51 °C	5'-TGTCCTCGCGTGGTTTTC-3'	5'-TCTCTCCCGCTTGATG-3'
AN7396, 53 °C	5'-AATCGCCTCCAGTTTACCC-3'	5'-CCCGCATCGCTCATACAG-3'
AN7436, 51 °C	5'-ATGCGTTCTTTGGTCCG-3'	5'-GTCACTTCTTGCTCCCTAC-3'
AN7511, 53 °C	5'-ATTCTCTCTCGCCCTTG-3'	5'-CGGTCGTGGTTCTTGCTG-3'
AN7539, 52 °C	5'-CTGAGAAGCGCAAAGCG-3'	5'-AGAGAAGACCAACGGAGC-3'
AN7657, 51 °C	5'-CACCTTGGCTTTCTTCTCC-3'	5'-TCACTTCGCTCCTCATCAG-3'
AN7820, 51 °C	5'-CAACACCGACGAATACGA-3'	5'-ACCGAGAGGAGTGACGATAG-3'
AN7950, 51 °C	5'-AACAGTGCCCGTCTCTACAC-3'	5'-TGGTTGATAGCCCGCTTGAG-3'
AN7962, 47 °C	5'-TCTCCAGATCAACAACAC-3'	5'-GTCAAACCTATCCTCAAAGC-3'
AN8041, 52 °C	5'-ACCAACATCATCCCCTCC-3'	5'-ATACCCGCCTTAGCATCG-3'
AN8218, 51 °C	5'-TCACCTCAATCGTCCCTG-3'	5'-TGCTCGTATCCGTCACAC-3'
AN8241, 53 °C	5'-CGCAGAAGCCAAATCCAA-3'	5'-GAAGGCACCCCAAGAAAAGTC-3'
AN8242, 52 °C	5'-TCCATCTTCAGCCGTTG-3'	5'-CATCTCCCCTACTACAC-3'
AN8275, 52 °C	5'-CCAGAAGGACAAGGACTAC-3'	5'-CAGAGCACTACCAACAAGG-3'
AN8347, 52 °C	5'-TTGATTGGTGCCTGCGTTG-3'	5'-AGTTCGTCGTCCTCGTCG-3'
AN8445, 47 °C	5'-TTGAAGCCACGACAATGAC-3'	5'-AGATGCCTACGATAACCAG-3'
AN8498, 52 °C	5'-GCTTACACCATCAGAATCGC-3'	5'-GTCAGTTACGGGAACCTTTG-3'
AN8559, 53 °C	5'-GCTTGTCGTCTTGTCGGC-3'	5'-GGAGTGCGGCGTTGATTG-3'
AN8637, 52 °C	5'-CAAACGCTCCGCCATCTA C-3'	5'-CTTGAGGTGCCCGAATGT C-3'
AN8710, 53 °C	5'-AATATCCCCGTTGTGGTGC-3'	5'-CCCGCTCTGACTGGTTTG-3'
AN8737, 52 °C	5'-ATGGCTGGTGTGGCTTTTC-3'	5'-GAGGAGTTGGAGGGCAATC-3'
AN8803, 51 °C	5'-CAACAAGGGCAACAGCAAC-3'	5'-GAGGACAGCAACATCAAGC-3'
AN9129, 52 °C	5'-GTCCATTGCTACTGTCC-3'	5'-TTCTGTGCTTCTTCCCG-3'
AN9168, 51 °C	5'-GCTTACTGGGTCTGCTTC-3'	5'-GCTGGTCTTGGTCATCTC-3'
AN9339, 52 °C	5'-CCGAGCCCGACAACACTTAC-3'	5'-GTTCAGCGACGACAATGACG-3'
AN9340, 53 °C	5'-ACATACAGGCAGAAACGAACG-3'	5'-ATACGACCAGATAAGACACC-3'

AN9380, 52 °C	5'-CGCACATACATACGACCACG-3'	5'-TTCCACCAGCATCCAGTTG-3'
AN9390, 53 °C	5'-ATACCCGACTCTGACCTTTAC-3'	5'-TCTCTCACTCTCTCCACTTG-3'
AN9397, 52 °C	5'-AGACGAAGAATGTGGTGGC-3'	5'-ACGCTGAAGAAGGAACTGG-3'
AN9408, 52 °C	5'-GGCATCAATACACCTCGTTC-3'	5'-GCATCATCTTCACCCTCTTC-3'

13. táblázat Az RT-PCR vizsgálatok során használt primerek szekvenciája és a primerek hibridizációs lépésénél alkalmazott hőmérséklet.

5.12.3 Génexpresszió vizsgálata microarray technika segítségével

A microarray vizsgálat során egy növekvő és egy szénéhező tenyészet transzkripció mintázatát hasonlítottuk össze. A tenyészeteket az 5.1.2 pontban leírtaknak megfelelően komplex tápközegben növesztettük fel, majd a 20 órás tenyészeteket 10 g/l glükózt tartalmazó és glükózmentes minimál táplevesbe mostuk át. Az RNS mintákat az atmoszt követően 4 órával vettük le; az RNS izolálása az 5.12.1 pontban leírtak alapján történt.

A microarray vizsgálat kivitelezése során a hibridizációt, illetve a leolvasást a Kromat Kft. végezte. A DNS chip-et az alábbi honlapon hozzáférhető eArray szoftver (earray.chem.agilent.com/earray/) (Agilent) segítségével Dr. Miskei Márton és Karányi Zsolt (Debreceni Egyetem), az *A. nidulans* FGSCA4 genom szekvenciájának felhasználásával tervezték meg és a 024712 „design number” alatt érhető el. Az Agilent array *in-situ* szintézissel készült. Egy lemezen négy független mintához felhasználható blokk foglalt helyet, egy blokk 44000 génspecifikus, 60 nukleotid hosszúságú oligomert tartalmazott (4 x 44 K array). Az *A. nidulans* minden egyes génspecifikus oligomere 16 példányban volt jelen a lemezen, kivéve 300-at, amely 32 példányban szerepelt. A növekvő, illetve szénéhező tenyészetből származó RNS minták vizsgálatához 1 blokk lett felhasználva. A hibridizációhoz használt minták előkészítése az Agilent Two-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis protocol (Version 5.7) alapján történt. A minták RNeasy mini spin oszlopokon (Qiagen) lettek megtisztítva, minőségük az Agilent Bioanalyzer 2100, mennyiségük az ND-1000 NanoDrop Spectrophotometer segítségével lett meghatározva. A cRNS-ek jelöléséhez cy3 és cy5 festékeket használtak. A blokkra 825 ng fragmentált cRNS lett hibridizálva (17 h, 65°C és 10 rpm; Agilent hybridization oven). A blokk Agilent MicroArray Scanner segítségével lett

detektálva és az előnormalizált nyers adatok az Agilent Feature Extraction software (version 9.1) segítségével lettek meghatározva. A nyers adatokból képzett \log_2 arányok LOESS normalizálását ($\log_2 R$ értékek; intensity-dependent block-by-block normalization) Dr. Miskei Márton és Karányi Zsolt (Debreceni Egyetem) végezte.

A gének által kódolt fehérjék adatait a Broad Institute honlapján hozzáférhető adatbázisból (www.broadinstitute.org) gyűjtöttük ki. Ezen adatokat az *Aspergillus* Genome Database adatbázis (www.aspergillusgenome.org) adataival és a génekhez tartozó GO számokkal is egybevetettük. Azon gének annotálását fogadtuk el helyesnek, ahol a három adatbázis adatai nem mondtak ellent egymásnak. Egyes gének esetében a tudományos közleményekben publikált annotációt használtuk fel.

A géneket az alábbiak szerint csoportosítottuk:

1) A szénéhező tenyészetekre karakterisztikus gének

Ide olyan gének kerültek, ahol a jelintenzitás legalább a szénéhező tenyészet esetében nagyobb volt, mint 1000 egység, illetve a $\log_2 R < -2$.

2) A növekvő tenyészetekre karakterisztikus gének

Ide olyan gének kerültek, ahol a jelintenzitás legalább a növekvő tenyészet esetében nagyobb volt, mint 1000 egység, illetve a $\log_2 R > 2$.

3) Szénforrás éhezés által „nem befolyásolt” gének

Az első két csoportból kimaradt gének. Természetesen ez a csoport számos olyan gént tartalmazhat, melyek fontosak lehetnek a szénforrás éhezés alatt végbemenő fiziológiai változásokban, illetve szabályozásukban, de kis aktivitásuk, vagy kismértékű indukciójuk/repressziójuk miatt nem kerültek bele az első két csoportba. Tapasztalataink szerint az olyan gének transzkripcióváltozását lehet nagy valószínűséggel RT-PCR segítségével igazolni, vagy elvetni, ahol a fent említett feltételek teljesülnek.

5.13 Az extracelluláris termelődést jelző szignálszekvenciák vizsgálata

Az extracelluláris termelődést jelző szignálszekvencia meglétét az Expasy (www.expasy.org) oldalán hozzáférhető SignalP program segítségével azonosítottuk (Bendsten és munkatársai 2004).

5.14 Homológ fehérjék azonosítása

A homológ fehérjék keresése az NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) honlapján hozzáférhető Protein BLAST (BLASTP) program segítségével történt és a homológia mértékének jellemzésére az E-értéket használtuk fel.

5.15 Statisztikai vizsgálatok

A dolgozatban minden egyes kísérletnél 3-6 független mérés átlagát és annak szórását adtam meg. Az átlagértékek közötti eltéréseket a Student-féle t-próbával teszteltük és csak a $p \leq 5\%$ valószínűségek esetén fogadtuk el a különbséget szignifikánsnak.

5.16 Felhasznált vegyszerek

A kísérleteinkben felhasznált finomvegyszerek, ha másként nem jelöltem, a Sigma-Aldrich Kft termékei voltak. Minden további vegyszer szintén analitikai minőségű volt és a VWR vállalattól (korábban Spektrum 3D Kft) került beszerzésre.

6. Összefoglalás

Az autolízis egy olyan aktív, energiaigényes, nagy hidroláz aktivitással kísért természetes sejtpusztulási folyamat, amely a sejtfa lebomlását is magában foglalja (White és munkatársai 2002). Bár az autolízis a természetben és a fermentációs iparban a szénforrás éhezésre adott stresszválasz részeként gyakran megfigyelhető jelenség, a mögötte rejlő komplex transzkripcionális változásokról és ezek fiziológiai következményeiről rendelkezésre álló adatok igen hiányosak. Az autolízis alatt termelődő extracelluláris hidrolázok azonosítása, képződésük és fiziológiai szerepük megismerése nemcsak az autolízis folyamatának jobb megértését segítheti elő, de gyakorlati jelentőséggel is bírhat. A szénforrás éhezés kiváltotta autolízis folyamatának komplex megértése érdekében vizsgálataink között szerepelt az új extracelluláris enzimek azonosítása és jelentőségének megértése mellett a szénéhezést kísért genomi szintű transzkripciós szintű változások feltérképezése is.

Munkánk során elsőként sikerült azonosítanunk egy, az autolízis alatt termelődő extracelluláris β -1,3-endoglükánázt, amely az *engA* gén termékének bizonyult. Részleges jellemzésekor kapott paraméterei jó összhangban voltak a gombáknál általában tapasztaltakkal. Lúgos körülmények között mutatott aktivitása és stabilitása az autolízis alatt kialakuló lúgos pH miatt mutat jelentőséget. A $\Delta engA$ és a $\Delta engA\Delta chiB$ duplamutáns törzs nem autolizáló fenotípusa arra utal, hogy az EngA az autolízisben a ChiB-hez hasonlóan kiemelkedő jelentőséget tölt be. Ezen törzsek extracelluláris enzimintázata (β -1,3-glükánáz, β -glükozidáz, kitináz, proteináz) a sejtfa lebontásában részt vevő enzimek komplex szabályozását tételezi fel, ahol egy kulcsfontosságú enzim hiánya a többi enzim csökkent termelődését vonja maga után. Ugyanakkor a $\Delta engA$ és a $\Delta engA\Delta chiB$ törzsek esetében megmaradt extracelluláris β -1,3-glükánáz aktivitás további, az EngA-tól eltérő β -1,3-glükánázok termelődésére utal. Microarray vizsgálatunk alkalmával további három (egy β -1,3(4)-endoglükánázt és két β -1,3-exoglükánázt) β -glükánáz mellett 4 β -glükozidázt kódoló gén indukcióját is kimutattuk szénforrás éhezés hatására.

Sikerült továbbá megtisztítanunk és azonosítanunk az *A. nidulans* autolizáló tenyészetének fermentlevéből egy extracelluláris metalloproteinázt, amely a *pepJ* gén termékének bizonyult. Az SDS poliakrilamid gélelektroforézissel kapott 19 kDa-os, a szekvencia adatok alapján várhatóanál kisebb molekulaméret posztranszlációs módosítás meglétére utal, amelyet más fajok proteinázai esetében is leírtak (Tatsumi és munkatársai 1991; Matsumoto és munkatársai 1994). Lúgos pH-n mutatott aktivitása és stabilitása szintén az autólízis alatt lúgosodó pH miatt jelentős, amely ráadásul kifejezetten kedvezőnek bizonyult az extracelluláris proteinázok képződésének. Ebben a folyamatban a PacC, lúgos körülmények között aktív transzkripció faktor is részt vett a *prtA* transzkripciójának szabályozásán keresztül. A *pepJ* és a *prtA* génekben mutáns törzsek ($\Delta pepJ$, $\Delta prtA$ és $\Delta pepJ\Delta prtA$) fenotípusa alapján megállapítottuk, hogy ezen proteinázok nem központi jelentőségűek az autolitikus sejtfal degradáció folyamatában, azonban a megmaradt extracelluláris proteináz aktivitás további proteolitikus enzimek jelenlétét sugallja. Microarray vizsgálatunk során további 7 extracelluláris proteinázt kódoló gén indukcióját tapasztaltuk szénéhezés hatására.

Az extracelluláris hidrolázok szabályozásának vizsgálatokor a FluG-BrlA sporulációs jelátviteli útvonal az extracelluláris β -glükánázok, proteinázok és kitinázok (Pócsi és munkatársai 2009) esetében egyaránt központi jelentőségűnek bizonyult, ami a konidiogenezis és az autólízis közötti kapcsolatot tételezi fel. Emellett a *brlA*, konidiogenezishez kötődő transzkripció faktor indukciójával összhangban konidiofórok megjelenését tapasztaltuk a 48 órás rázatott, szénéhező tenyészetekben. Figyelembe véve, hogy a szénforrás éhezés, mind a konidiogenezis, mind az autólízis kiváltásában jelentős, nem meglepő, ha szabályozásuknak is vannak közös elemei. Azonban ez a kapcsolat vizsgálataink alapján nem az autólízis alatt felszabaduló energia konídiumok képzésére történő fordításában merül ki, mivel a nem autolizáló $\Delta engA\Delta chiB$ kettős mutáns törzs több konídium termelésére volt képes, mint a kontroll törzs. Feltehetően a BrlA a konidiogenezis iniciálása mellett a sejtfalbontó enzimek termelésének megindításán keresztül az autólízis indukálásában is részt vehet.

Az autolízis során nyert energia a növekedés fenntartásában való hasznosulására utal azon megfigyelésünk, miszerint a $\Delta engA\Delta chiB$ kettős mutáns törzs kedvezőtlen szénforráson a kontroll törzsnél lassabb növekedésre volt képes. A sejtfal lebontásából származó monomerek szénforrásként való felhasználására utal transzkripcionális vizsgálataink azon eredménye, miszerint kitin dezacetilázt, N-acetil-glikózamin-6-foszfát dezacetilázt, glükózamin-6-foszfát izomerázt és β -exoglükánázt kódoló gének is indukálódtak szénéhezés hatására a kitinázok és β -endoglükánázok mellett. Ezen feltételezést támasztja alá továbbá számos monoszacharid transzporter, köztük a *hxtA* nagy affinitású glükóz transzporter indukálódása is.

Vizsgálataink során az autolizáló tenyészet extracelluláris enzimekben gazdag fermentleve több gombafaj csírázását/növekedését is gátolta, mely folyamat mögött nagyrészt a fermentlében jelen lévő EngA és ChiB állhattak. Az extracelluláris enzimek más fajokkal szembeni interakcióban betöltött jelentőségét bizonyítja a $\Delta engA\Delta chiB$ kettős mutáns törzs az *A. niger* növekedésének gátlásában mutatott csökkent képessége (ezen folyamatban valószínűsíthető azonban a gombatelep által termelt szekunder metabolitok és/vagy kisméretű antifungális fehérjék jelentősége is). Tehát a gombák az autolízist kiváltó, kedvezőtlen körülmények között hatást gyakorolhatnak a környezetükben előforduló, más mikroorganizmusokra is. A szénéhezés alatt megfigyelt szekunder metabolit termelés mellett az antibakteriális enzimeket és antifungális fehérjéket kódoló gének indukciója szintén megerősíti ezt a feltételezést.

Microarray vizsgálatunk során a szénforrás éhezés hatására több, a (makro)autofágiában érintett gén indukálódását is megfigyeltük. Mivel apoptózisban érintett fehérjéket kódoló gének indukciója nem volt jellemző a szénéhezés korai szakaszában, feltételezhetően a szénéhezés/autolízis alatti sejtpusztulás elsősorban a (makro)autofágia számlájára írható. A sejtpusztulásban az extracelluláris enzimek is jelentős szerepet tölthetnek be, amit bizonyít, hogy a $\Delta engA\Delta chiB$ kettős mutáns törzs életképessége kevésbé csökkent a kontroll törzshöz viszonyítva. Ezen megfigyelés összhangban van az EngA és a ChiB enzimek a termelő törzsre gyakorolt antifungális hatásával. Ezen enzimek sejtpusztulást indukáló hatása

azonban csak idősebb tenyészetekben figyelhető meg, ami arra enged következtetni, hogy a sejtek egy ideig képesek védekezni ezen enzimek káros hatásával szemben. Ezen védekező folyamatok felderítése a jövő feladata, de magyarázatul szolgálhat az autolízis jelenségét kísért intenzív melanin szintézis, mivel számos esetben igazolták az enzimikus sejtfal degradáció melaninokkal történő gátlását (Nosanchuk és Casadevall 2003).

Microarray adataink alapján további transzkripcionális változások is megfigyelhetők a szénforrás éhezés korai szakaszában. Az intenzív fehérjeszintézisre utal több, a fehérjeszintézisben és a fehérjék módosításában közreműködő fehérjéket kódoló gének indukálódása. A környezeti stressz hatására gyakran megfigyelhető „Unfolded Protein Response” megindulását jelzi az ezen útvonalhoz köthető gének indukálódása. A sejtfalhomeosztázisban a sejtfal különböző komponenseinek szintézisében esszenciális gének repressziója, valamint az autolízis jelenségéhez szorosan köthető extracelluláris sejtfalbontó enzimek indukciója a bioszintetikus folyamatok háttérbe szorulását és a sejtfal degradáció előtérbe kerülését jelzik, amely végső soron az autolitikus fenotípus kialakításához vezet (Emri és munkatársai 2008). A glikolízis, a pentóz-foszfát út, a citrát kör és a mitokondriális légzés repressziója mellett a nitrát és nitrit reduktázok, illetve a lipidek bioszintézisében érintett gének is repressziót mutattak. A saját és a környezetben esetlegesen jelenlévő anyagok lebontását célzó folyamatok előtérbe kerülését jelzi több, intra- és extracelluláris degradatív enzimet (szénhidrátokat bontó enzimek, nukleázok, lipázok, proteinázok) kódoló gén indukálódása. A szénéhező tenyészetek redox folyamataiban szintén változásokat tapasztaltunk. A szénéhezés reaktív oxigénformák akkumulálódásához vezetett a tenyészetben, amit antioxidáns enzimeket kódoló gének indukálódása és repressziója követett. Emellett megfigyeltük több γ -glutamil transzpeptidáz kódoló gén indukálódását, amely összhangban van a korábban megfigyelt nagy γ -glutamil transzpeptidáz aktivitásokkal és a csökkenő glutation tartalommal (Emri és munkatársai 2004a).

Microarray vizsgálataink tehát egyértelműen alátámasztják, hogy a szénéhezés alatt megfigyelt fiziológiai folyamatok nem egyszerűen a tápanyaghiány

okozta passzív változások, hanem egy aktív, jól szabályozott energiaigényes válaszreakció (stressz válasz) a gomba környezetében bekövetkezett változásokra.

7. Summary

Autolysis can be defined as a natural process of self-digestion of aged hyphal cultures, occurring as a result of hydrolase activity and causing degradation of cell wall structures (White *et al.* 2002). Although autolysis is frequently observable in response to carbon starvation both in the Nature and in the industry during the fermentation process only little information is available on its transcriptional background and physiological consequences. Identification of new extracellular hydrolytic enzymes produced during autolysis and understanding their formation together with their physiological function could be also relevant because of their potential industrial significance. In order to understand the autolytic process induced by carbon starvation different experiments were performed including identification of new extracellular enzymes, investigation of their role and determining the genome wide transcriptional changes in response to carbon starvation.

We purified and identified an extracellular β -1,3-glucanase from the autolysing culture of *A. nidulans*, which proved to be the product of the *engA* gene. Its enzymological properties were in good accordance with those of other fungal β -glucanases. EngA was active at alkalic pH, which is important since autolytic cultures alkalyfy their environment. The non-autolytic phenotype of the $\Delta engA$ and $\Delta engA\Delta chiB$ strains indicated the significant role of EngA in autolysis, as it was experienced earlier in the case of the ChiB chitinase as well. The extracellular enzyme (β -1,3-glucanase, β -glucosidase, proteinase, chitinase) profile of these mutant strains suggested a complex regulation pattern of cell wall degrading enzymes where the lack of one significant enzyme caused decreased production of the others. The extracellular β -1,3-glucanase activity observable in case of $\Delta engA$ and $\Delta engA\Delta chiB$ strains indicated the synthesis of other β -1,3-glucanases besides EngA. In the microarray experiment induction of 3 extracellular β -glucanase (1 β -1,3(4)endoglucanase, 2 β -exoglucanases) and 4 β -glucosidase coding genes were identified in response to carbon starvation.

We also purified and characterized an extracellular metalloproteinase, which was encoded by the *pepJ* gene. Since its molecular mass gained from SDS polyacrylamide gelelectrophoresis was smaller than it was predicted according to the sequence data, it is possible that PepJ went through posttranslational modification. Similar phenomenon was observed in other fungi (Tatsumi *et al.* 1991; Matsumoto *et al.* 1994). PepJ was active at alkalic pH and the alkalic pH was also beneficial for extracellular proteinase production. The transcription factor PacC did not contributed in the induction of *pepJ*, although it was important in the regulation of *prtA* encoding an extracellular serine proteinase. According to the properties of the $\Delta pepJ$, $\Delta prtA$, $\Delta pepJ\Delta prtA$ mutants these proteinases did not prove to be important in the autolytic cell wall degradation. The significant extracellular proteinase activity observed in the deletion mutants suggests that these cultures produced other proteinases than PrtA and PepJ. According to the microarray data, beside of *prtA* and *pepJ*, 7 genes encoding extracellular proteinases were induced during carbon starvation.

The FluG-BrlA sporulation pathway proved to be important in the regulation of extracellular glucanase, proteinase and chitinase (Pócsi *et al.* 2009) production. It suggests that autolysis and sporulation may be tightly coupled processes. Besides the induction of the *brlA* transcription factor we observed conidiophors and conidia in the 48 h old submerged carbon starving cultures. Taking into consideration that carbon starvation is significant in the initiation of both asexual sporulation and autolysis it would not be surprising if these processes had similar regulation elements. The non autolysing $\Delta engA\Delta chiB$ double mutant strain produced more conidia than the control strain so it is unlikely that energy derived from autolysis was used during conidia formation. In addition to initiating sporulation BrlA is essential in the regulation of autolysis as well by initiating the production of cell wall degrading enzymes.

The growth of the $\Delta engA\Delta chiB$ double mutant strain was slower on media containing a weak carbon source. This observation suggests that nutrients released from autolysing cells may be used during maintaining hyphal growth. Induction of genes encoding enzymes with chitin deacetylase, N-acetylglucosamine-6-phosphate

deacetylase, glucosamine-6-phosphate isomerase and β -exoglucanase activity was also observed besides the induction of chitinase and β -endoglucanase coding genes. These data support that cell wall monomers are (also) used as carbon and nitrogen sources during carbon starvation. The induction of monosaccharide transporters e.g. the high affinity glucose transporter coding *hxtA* gene also confirmed this hypothesis.

The fermentation broth of autolysing culture, which is rich in extracellular enzymes, inhibited the germination and/or hyphal extension of several fungi. We found that mainly EngA and ChiB were responsible for this phenomenon. Extracellular enzymes may be significant in influencing interactions with other species. This hypothesis was supported by the observation that the $\Delta engA\Delta chiB$ double mutant strain did not inhibit the growth of *A. niger* so effectively as the control strain did (although production of secondary metabolites and/or antifungal peptides could be also relevant in this process). It was concluded that fungi could influence other microorganisms not only with the production of secondary metabolites, extracellular antibacterial enzymes and antifungal proteins but also with enzymes hydrolyzing fungal cell wall.

Induction of genes involved in (macro)autophagy in response to carbon starvation was also observed. Since apoptotic genes did not show induction, (macro)autophagy was responsible for the majority of cell death observed in early autolytic cultures. The role of extracellular cell wall degrading enzymes in cell death was confirmed by the observation that deletion of *engA* and *chiB* increased long-term viability. This result is in good accordance with the antifungal effect of EngA and ChiB experienced against the producing strain. The fact that these enzymes induced cell death only in old cultures supports the existence of defense mechanisms in autolysing cultures. These processes have not been identified yet but the synthesis of melanin found in autolysing cultures may be a possible explanation because melanin has protective role against enzymatic cell wall degradation (Nosanchuk and Casadevall 2003).

We observed further transcriptional changes in response to carbon starvation. Induction of genes related to protein synthesis (posttranslational

modification, secretion) together with genes involved in the UPR (Unfolded Protein Response) pathway, which proved to be active under environmental stress conditions, was observed. Several genes contributing in cell wall biosynthesis were repressed and another set of genes involved in cell wall degradation were induced, which is in good accordance with the observed autolytic cell wall degradation (Emri *et al.* 2008). Glycolysis, hexose monophosphate shunt, citrate cycle and mitochondrial respiration as well as nitrate reduction and the biosynthesis of lipids also showed repression according to the microarray data. Several extra- and intracellular hydrolytic enzymes (nucleases, lipases, proteinases, glycosilases) involved in the degradation either of own materials and/or nutrients presented in the environment was induced. Moreover, we observed changes in redox processes. Carbon starvation led to the elevation of reactive oxygen species that was followed by the induction and repression of several genes encoding antioxidant enzymes. We could also detect the induction of genes encoding putative γ -glutamyl-transpeptidases which is in good accordance with the observed high γ -glutamyl-transpeptidase activities and the decreasing glutathione content of cells during carbon starvation (Emri *et al.* 2004a).

Microarray data supported the hypothesis that autolysis is an active, energy consuming process occurring in response to environmental stress and the observed properties of carbon starving cultures are not consequences of passive (necrotic) changes caused by nutrient starvation.

8. Irodalomjegyzék

- Adams, T.H., Wieser, J.K., Yu, J.H. (1998) Asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Microbiol Mol Biol Rev* 62, 35-54.
- Adams, D. J. (2004) Fungal cell wall chitinases and glucanases. *Microbiology* 150, 2029-2035.
- Aguirre, J. (1993) Spatial and temporal controls of the *Aspergillus brlA* developmental regulatory gene. *Mol Microbiol* 8, 211-218.
- Alfonso, C., Nuero, O.M., Santamaría, F., Reyes, F. (1995) Purification of a heat-stable chitin deacetylase from *Aspergillus nidulans* and its role in cell wall degradation. *Curr Microbiol* 30, 49-54.
- Aramayo, R., Timberlake, W.E. (1993) The *Aspergillus nidulans* *yA* gene is regulated by *abaA*. *EMBO J* 12, 2039-2048.
- Bainbridge, B.W., Bull, A.T., Pirt, S.J., Rowley, B.I., Trinci, A.P.J. (1971) Biochemical and structural changes in non-growing maintained and autolysing cultures of *Aspergillus nidulans*. *Trans Br Mycol Soc* 56, 371-385.
- Baladrón, V., Ufano, S., Dueñas, E., Martín-Cuadrado, A.B., del Rey, F., Vázquez de Aldana, C.R. (2002) Eng1p, an endo-1,3- β -glucanase localized at the daughter side of the septum, is involved in cell separation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* 1, 774-786.
- Barratt, R.W., Johnson, G.B., Ogata, W.N. (1965) Wild-type and mutant stocks of *Aspergillus nidulans*. *Genetics* 52, 233-246.
- Barrette, A.J., Rawlings, N.O. (2003). Evolutionary families of peptidases. *Biochem J* 290, 205-218.
- Bauer, S, Vasu, P., Persson, S., Mort, A.J., Somerville, C.R. (2006) Development and application of a suite of polysaccharide-degrading enzymes for analyzing plant cell walls. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 11417-11422.
- Bendtsen, J.D., Nielsen, H., von Heijne, G., Brunak, S. (2004) Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J Mol Biol* 340, 783-795.
- Bernard. M., Latgé, J.P. (2001) *Aspergillus fumigatus* cell wall: composition and biosynthesis. *Med Mycol* 39 Suppl 1, 9-17.
- Bertagnolli, B.L., Dal Soglio, F.K., Sinclait, J.B. (1996) Extracellular enzyme profiles of the fungal pathogen *Rhizoctonia solani* isolate 2B-12 and two antagonists, *Bacillus megaterium* strain B153-2-2 and *Trichoderma harzianum* isolate Th008. I. Possibel correlation with inhibition of growth and biocontrol. *Physiol Plant Pathol* 48, 145-160.

- Bes, B., Pettersson, B., Lennholm, H., Iverson, T., Eriksson, K. (1987) Synthesis, structure and enzymic degradation of an extracellular glucan produced in nitrogen-starved cultures of the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Biotechnol Appl Biochem* 9, 310–318.
- Binod, P., Pusztahelyi, T., Nagy, V., Sandhya, C., Szakacs G., Pócsi I., Pandey, A.(2005) Production and purification of extracellular chitinases from *Penicillium aculeatum* NRRL 2129 under solid-state fermentation. *Enzyme Microb Technol* 36, 880-887.
- Birse, C.E., Clutterbuck, A.J. (1990) N-acetyl-6-hydroxytryptophan oxidase, a developmentally controlled phenol oxidase from *Aspergillus nidulans*. *J Gen Microbiol* 136, 1725-1730.
- Birse, C.E., Clutterbuck, A.J. (1991) Isolation and developmentally regulated expression of an *Aspergillus nidulans* phenol oxidase-encoding gene, *ivoB*. *Gene* 98, 69-76.
- Borgia, P.T., Iartchouk, N., Riggle, P.J., Winter, K.R., Koltin, Y., Bulawa, C.E. (1996) The *chsB* gene of *Aspergillus nidulans* is necessary for normal hyphal growth and development. *Fungal Genet Biol* 20, 193-203.
- Bourne, Y., Henrissat, B. (2001) Glycoside hydrolases and glycosyltransferases: families and functional modules. *Curr Opin Struct Biol* 11, 593–600.
- Bowman, S.M., Free, S.J. (2006) The structure and synthesis of the fungal cell wall. *BioEssays* 28, 799-808.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing of the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248–254.
- Brown, D.W., Adams, T.H., Keller, N.P. (1996) *Aspergillus* has distinct fatty acid synthases for primary and secondary metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 14873-14877.
- Bussink, H.J., Osmani, S.A. (1999) A mitogen-activated protein kinase (MPKA) is involved in polarized growth in the filamentous fungus, *Aspergillus nidulans*. *FEMS Microbiol Lett* 173, 117-125.
- Calvo, A.M., Wilson, R.A., Bok, J.W., Keller, N.P. (2002) Relationship between Secondary Metabolism and Fungal Development. *Microbiol Mol Biol Rev* 66, 447-459.
- Carter, W.O, Narayanan, P.K. and Robinson J.P. (1994) Intracellular hydrogen peroxide and superoxide anion detection in endothelial cells. *J Leukoc Biol* 55, 253-258.
- Chang, M.H., Chae, K.S., Han, D.M., Jahng, K.Y. (2004) The GanB Ga-protein negatively regulates asexual sporulation and plays a positive role in conidial germination in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* 167, 1305-1315.
- Cheng, J., Park, T.S., Chio, L.C., Fischl, A.S., Ye, X.S. (2003) Induction of apoptosis by sphingoid long-chain bases in *Aspergillus nidulans*. *Mol Cell Biol* 23, 163-177.

- Choi, C.J., Ju, H.J., Park, B.H., Qin, R., Jahng, K.Y., Han, D.M., Chae, K.S. (2005) Isolation and characterization of the *Aspergillus nidulans* *eglC* gene encoding a putative β -1,3-endoglucanase. *Fungal Genet Biol* 42, 590-600.
- 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.
- Clutterbuck, A.J. (1969) A mutational analysis of conidial development in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* 63, 317-327.
- Clutterbuck, A.J. (1990) The genetics of conidiophore pigmentation in *Aspergillus nidulans*. *J Gen Microbiol* 136, 1731-1738.
- Cohen, J. (1991) Clinical manifestations and management of aspergillosis in the compromised patient. In: Fungal infection in the compromised patient. Eds: Warnock D.W., Richardson M.D. John Wiley and Sons, New York.
- Cotty, P.J., Bayman, P., Egel, D. S., Elias, K. E. (1994) Agriculture, aflatoxin and *Aspergillus*. In: The Genus *Aspergillus*. Eds: Powell, K.A, Reenwick, A., Peberdy J.F. Plenum Press, New York.
- Cruz, J., Pintor-Toro, J.A., Benitez, T., Llobell, A., Romero, L.C. (1995) A novel endo-beta-1,3-glucanase, BGN13.1, involved in the mycoparasitism of *Trichoderma harzianum*. *J Bacteriol* 177, 6937-6945.
- Dahiya, N., Tewari, R., Hoondal, G.S. (2006) Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review. *Appl Microbiol Biotechnol*. 71, 773-82.
- Damveld, R.A., vanKuyk, P.A., Arentshorst, M., Klis, F.M., van den Hondel, C.A., Ram, A.F. (2005) Expression of *agsA*, one of five 1,3-alpha-D-glucan synthase-encoding genes in *Aspergillus niger*, is induced in response to cell wall stress. *Fungal Genet Biol* 42, 165-77.
- da Silva Ferreira, M.E., Savoldi, M., Sueli Bonato, P., Goldman, M.H., Goldman, G.H. (2006) Fungal metabolic model for tyrosinemia type 3: molecular characterization of a gene encoding a 4-hydroxy-phenyl pyruvate dioxygenase from *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot Cell* 5, 1441-1445.
- David, H., Ozçelik, I.S., Hofmann, G., Nielsen, J. (2008) Analysis of *Aspergillus nidulans* metabolism at the genome-scale. *BMC Genomics* 9, 163.
- Davies, G., Henrissat, B. (1995) Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure* 15, 853-859.
- d'Enfert, C., Fontaine, T. (1997) Molecular characterization of the *Aspergillus nidulans* *treA* gene encoding an acid trehalase required for growth on trehalose. *Mol Microbiol* 24, 203-216.
- de Groot, P.W.J., Ram, A.F., Klis, F.M. (2005) Features and functions of covalently linked proteins in fungal cell walls. *Fungal Genet Biol* 42, 657-675.

- de Groot, P.W., Brandt, B.W., Horiuchi, H., Ram, A.F., de Koster, C.G., Klis, F.M. (2009) Comprehensive genomic analysis of cell wall genes in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Biol* 46 Suppl 1, 72-81.
- de Marco, J.L., Felix, C.R. (2002) Characterization of a protease produced by a *Trichoderma harzianum* isolate which controls cocoa plant witches' broom disease. *BMC Biochem* 3, 3.
- Díez, E., Alvaro, J., Espeso, E.A., Rainbow, L., Suárez, T., Tilburn, J., Arst, H.N. Jr, Peñalva, M.A. (2002) Activation of the *Aspergillus* PacC zinc finger transcription factor requires two proteolytic steps. *EMBO J* 21, 1350–1359.
- Dinamarco, T.M., Pimentel, Bde, C., Savoldi, M., Malavazi, I., Soriani, F.M., Uyemura, S.A., Ludovico, P., Goldman, M.H., Goldman, G.H. (2010) The roles played by *Aspergillus nidulans* apoptosis-inducing factor (AIF)-like mitochondrial oxidoreductase (AifA) and NADH-ubiquinone oxidoreductases (NdeA-B and NdiA) in farnesol resistance. *Fungal Genet Biol* 47, 1055-1069
- Dixon, D.M., Szaniszló, P.J., Polak, A. (1991) Dihydroxynaphthalene (DHN) melanin and its relationship with virulence in the early stages of phaeohyphomycosis. In: The fungal spore and disease initiation in plants and animals. Eds: Cole, G.T., Hoch, H.C. Plenum Press, New York.
- Doi, Y., Lee, B.R., Ikeguchi, M., Ohoba, Y., Ikoma, T., Tero-Kubota, S., Yamauchi, S., Takahashi, K., Ichishima, E. (2003) Substrate specificities of deuterolysin from *Aspergillus oryzae* and electron paramagnetic resonance measurement of cobalt-substituted deuterolysin. *Biosci Biotechnol Biochem* 67, 264-270.
- Doi, Y., Akiyama, H., Yamada, Y., Ee, C.E., Lee, B.R., Ikeguchi, M., Ichishima, E. (2004) Thermal stabilization of penicillolysin, a thermolabile 19 kDa Zn²⁺-protease, obtained by site-directed mutagenesis. *Protein Eng Des Sel* 17, 261-266.
- d'Souza, C.A., Lee, B.N., Adams, T.H. (2001) Characterization of the role of the FluG protein in asexual development of *Aspergillus nidulans*. *Genetics* 158, 1027–1036.
- Duo-Chuan, L. (2006) Review of fungal chitinases. *Mycopathologia* 161, 345-60.
- Ecker, M., Deutzmann, R., Lehle, L., Mrša, V., Tanner, W. (2006) PIR-proteins of *Saccharomyces cerevisiae* are attached to β-1,3-glucan by a new protein-carbohydrate linkage. *J Biol Chem* 281, 11523–11529.
- Eigentler, A., Pócsi, I., Marx, F. (2011) The anisin1 gene encodes a defensin-like protein and supports the fitness of *Aspergillus nidulans*. *Arch Microbiol* DOI 10.1007/s00203-011-0773-y.
- Elad, Y., Kapat, A. (1999) The role of *Trichoderma harzianum* protease in the biocontrol of *Botrytis cinerea*. *Eur J Plant Pathol* 105, 177-189.
- Elad, Y. (2000) Biological control of foliar pathogens by means of *Trichoderma harzianum* and potential modes of action. *Crop Prot* 19,709–714.

- El-Katatny, M.H., Gudelj, M., Robra, K.H., Elnaghy, M.A. Gübitz, G.M. (2001) Characterization of a chitinase and an endo-beta-1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum* Rifai T24 involved in control of the phytopathogen *Sclerotium rolfisii*. *Appl Microbiol Biotechnol* 56, 137-143.
- Emri, T., Molnár, Zs., Pusztahelyi, T., Pócsi, I. (2004a) Physiological and morphological changes in autolysing *Aspergillus nidulans* cultures. *Folia Microbiol* 49, 277-284.
- Emri, T., Molnár, Zs., Pusztahelyi, T., Rosén, S., Pócsi, I. (2004b) Effect of vitamin E on the autolysis and sporulation of *Aspergillus nidulans*. *Appl Biochem Biotechnol* 118, 337-348.
- Emri, T., Molnár, Zs., Pusztahelyi, T., Varcza Z., Pócsi, I. (2005a) The FluG-BrlA pathway contributes to the initialisation of autolysis in submerged *Aspergillus nidulans* cultures. *Mycol Res* 109, 757-763.
- Emri, T., Molnár, Zs., Pócsi, I. (2005b) The appearances of autolytic and apoptotic markers are concomitant but differently regulated in carbon-starving *Aspergillus nidulans* cultures. *FEMS Microbiol Lett* 251, 297-303.
- Emri, T., Molnár, Zs., Veres, T., Pusztahelyi, T., Dudás, G. Pócsi, I. (2006) Glucose-mediated repression of autolysis and conidiogenesis in *Emericella nidulans*. *Mycol Res* 110, 1172-1178.
- Emri, T., Molnár, Zs., Szilágyi, M., Pócsi, I. (2008) Regulation of autolysis in *Aspergillus nidulans*. *Appl Biochem Biotechnol* 151, 211-220.
- 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.
- Etxebeste, O., Ni, M., Garzia, A., Kwon, N.J., Fischer, R., Yu, J.H., Espeso, E.A., Ugalde, U. (2008) Basic-zipper-type transcription factor FlbB controls asexual development in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot Cell* 7, 38-48.
- Etxebeste, O., Garzia, A., Espeso, E.A., Ugalde, U. (2010) *Aspergillus nidulans* asexual development: making the most of cellular modules. *Trends Microbiol* 18, 569-576.
- Fillinger, S., Chaverroche, M.K., van Dijck, P., de Vries, R., Ruijter, G., Thevelein, J., d'Enfert, C. (2001) Trehalose is required for the acquisition of tolerance to a variety of stresses in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Microbiology* 147, 1851-1862.
- Fitzgibbon, G.J., Morozov, I.Y., Jones, M.G., Caddick, M.X. (2005) Genetic analysis of the TOR pathway in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot Cell* 4, 1595-1598.
- Fleißner A., Dersch, P. (2010) Expression and export: recombinant protein production systems for *Aspergillus*. *Appl Microbiol Biotechnol* 87, 1255-1270.
- Fontaine, T., Hartland, R. P., Beauvais, A., Diaquind, M., Latge, J-P. (1997) Purification and characterization of an endo-1,3- β -glucanase from *Aspergillus fumigatus*. *Eur J Biochem* 243, 315-321.

- Forment, J.V., Flipphi, M., Ramón, D., Ventura, L., Maccabe, A.P. (2006) Identification of the *mstE* gene encoding a glucose-inducible, low affinity glucose transporter in *Aspergillus nidulans*. *J Biol Chem* 281, 8339-8346.
- Fridovich, I. (1998) Oxygen toxicity: a radical explanation. *J Exp Biol* 201, 1203-1209.
- Fujioka, T., Mizutani, O., Furukawa, K., Sato, N., Yoshimi, A., Yamagata, Y., Nakajima, T., Abe, K. (2007) MpkA-Dependent and -independent cell wall integrity signaling in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot Cell* 6, 1497-1510.
- García-Lepe, R., Nuero, O.M., Reyes, F., Santamaría, F. (1997) Lipases in autolysed cultures of filamentous fungi. *Lett Appl Microbiol* 25, 127-130.
- Garzia, A., Etxebeste, O., Herrero-García, E., Ugalde, U., Espeso, E.A. (2010) The concerted action of bZip and cMyb transcription factors FlbB and FlbD induces *brlA* expression and asexual development in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* 75, 1314-1324.
- Gessler, N.N., Aver'yanov, A.A., Belozerskaya, T.A. (2007) Reactive oxygen species in regulation of fungal development. *Biochemistry* 72, 1091-1109.
- Girardin, H., Paris, S., Rault, J., Bellon-Fontaine, M.N., Latgé, J.P. (1999) The role of the rodlet structure on the physicochemical properties of *Aspergillus* conidia. *Lett Appl Microbiol* 29, 364-369.
- Gohel, V., Singh, A., Vimal, M., Ashwini, P., Chhatpar, H.S. (2006) Bioprospecting and antifungal potential of chitinolytic microorganisms. *Afr J Biotechnol* 5, 54-72.
- Gordon, L.J., Lilly, W.W. (1995) Quantitative analysis of *Schizophyllum commune* metalloprotease ScPrB activity in SDS-gelatin page reveals differential mycelial localization of nitrogen limitation induced autolysis. *Curr Microbiol* 30, 337-343.
- Gugnani H.C. (2003) Ecology and taxonomy of pathogenic *Aspergilli*. *Front Biosci* 8, 346-357.
- Han, K.H., Seo, J.A., Yu, J.H. (2004) Regulators of G-protein signaling in *Aspergillus nidulans*: RgsA downregulates stress response and stimulate asexual sporulation through attenuation of GanB (G α) signaling. *Mol Microbiol* 53, 529-540.
- Hartl, L., Gastebois, A., Aïmanianda, V., Latgé, J.P. (2011) Characterization of the GPI-anchored endo β -1,3-glucanase Eng2 of *Aspergillus fumigatus*. *Fungal Genet Biol* 48, 185-191.
- Harvey, L.M., McNeil, B., Berry, D.R., White, S. (1998) Autolysis in batch cultures of *Penicillium chrysogenum* at varying agitation rates. *Enzyme Microbial Technol* 22, 446-458.
- Hicks, J.K., Yu, J.H., Keller, N.P., Adams, T.H. (1997) *Aspergillus* sporulation and mycotoxin production both require inactivation of the FadA Ga protein-dependent signaling pathway. *EMBO J* 16, 4916-4923.

- Hong, T.Y., Meng, M. (2003) Biochemical characterization and antifungal activity of an endo-1,3-beta-glucanase of *Paenibacillus* sp. isolated from garden soil. *Appl Microbiol Biotechnol* 61, 472-478.
- Horiuchi, H. (2009) Functional diversity of chitin synthases of *Aspergillus nidulans* in hyphal growth, conidiophore development and septum formation. *Med Mycol; Suppl* 1:S47-52.
- Hube, B., Monod, M., Schofield, D.A., Brown, A.J., Gow, N.A. (1994) Expression of seven members of the gene family encoding secretory aspartyl proteinases in *Candida albicans*. *Mol Microbiol* 14, 87-99.
- Jacinto, E., Guo, B., Arndt, K.T., Schmelzle, T., Hall, M.N. (2001) TIP41 interacts with TAP42 and negatively regulates the TOR signaling pathway. *Mol Cell* 8, 1017-1026.
- Jaivel, N., Marimuthu, P. (2010) Optimization of lovastatin production in solid state fermentation by *Aspergillus terreus*. *Int J Eng Sci* 2, 2730-2733.
- Jacobson, E.S. (2000) Pathogenic roles for fungal melanins. *Clin Microbiol Rev* 13, 708-717.
- Jakubowski, W., Biliński, T., Bartosz, G. (2000) Oxidative stress during aging of stationary cultures of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Free Radical Biol Med* 28, 659-664.
- Johnstone, I.L., McCabe, P.C., Greaves, P., Gurr, S.J., Cole, G.E., Brow, M.A., Unkles, S.E., Clutterbuck, A.J., Kinghorn, J.R., Innis, M.A. (1990) Isolation and characterisation of the *crnA-niiA-niaD* gene cluster for nitrate assimilation in *Aspergillus nidulans*. *Gene* 90, 181-192.
- Jorge, J.A., Polizeli, M.L., Thevelein, J.M., Terenzi, H.F. (1997) Trehalases and trehalose hydrolysis in fungi. *FEMS Microbiol Lett* 154, 165-171.
- Joseph, J.D., Heitman, J., Means, A.R. (1999) Molecular cloning and characterization of *Aspergillus nidulans* cyclophilin B. *Fungal Genet Biol* 27, 55-66.
- Karasuda, S., Tanaka, S., Kajihara, H., Yamamoto, Y., Koga, D. (2003) Plant chitinase as a possible biocontrol agent for use instead of chemical fungicides. *Biosci Biotechnol Biochem* 67, 221-224.
- Katz, M.E., Rice, R.N., Cheetham, B.F. (1994) Isolation and characterization of an *Aspergillus nidulans* gene encoding an alkaline protease. *Gene* 150, 287-292.
- Katz, M.E., Masoumi, A., Burrows, S.R., Shirliv, C.G., Cheetham, B.F. (2000) The *Aspergillus nidulans xprF* gene encodes a hexokinase-like protein involved in the regulation of the extracellular proteases. *Genetics* 156, 1559-1571.
- Katz, M. E., Gray K.-A., Cheetham, B. F. (2006) The *Aspergillus nidulans xprG* (*phoG*) gene encodes a putative transcriptional activator involved in the response to nutrient limitation. *Fungal Genet Biol* 43, 190-199.

- Katz, M. E., Bernardo S. M., Cheetham B. F. (2008) The interaction of induction, repression and starvation in the regulation of extracellular proteases in *Aspergillus nidulans*: evidence for a role for CreA in the response to carbon starvation. *Curr Genet* 54, 47–55.
- Kawasaki, L., Wysong, D., Diamond, R., Aguirre, J. (1997) Two divergent catalase genes are differentially regulated during *Aspergillus nidulans* development and oxidative stress. *J Bacteriol* 179, 3284-3292.
- Kawasaki, L., Aguirre, J. (2001) Multiple catalase genes are differentially regulated in *Aspergillus nidulans*. *J Bacteriol* 183, 1434-1440.
- Kelkar, H.S., Skloss, T.W., Haw, J.F., Keller, N.P., Adams, T.H. (1997) *Aspergillus nidulans stcL* encodes a putative cytochrome P 450 monooxygenase required for bisfuran desaturation during aflatoxin/sterigmatocystin biosynthesis. *J Biol Chem* 272, 1589-1594.
- Kelly, R., Register, E., Hsu, M.J., Kurtz, M., Nielsen, J. (1996) Isolation of a gene involved in 1,3-beta-glucan synthesis in *Aspergillus nidulans* and purification of the corresponding protein. *J Bacteriol* 178, 4381-4391.
- Kiel, J.A., van der Klei, I.J. (2009) Proteins involved in microbody biogenesis and degradation in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Biol* 46 Suppl 1, 62-71.
- Kim, S., Matsuo, I., Ajisaka, K., Nakajima, H., Kitamoto, K. (2002) Cloning and characterization of the *nagA* gene that encodes beta-n-acetylglucosaminidase from *Aspergillus nidulans* and its expression in *Aspergillus oryzae*. *Biosci Biotechnol Biochem* 66, 2168-2175.
- Kim, Y., Islam, N., Moss, B.J., Nandakumar, M.P., Marten, M.R. (2011) Autophagy induced by rapamycin and carbon-starvation have distinct proteome profiles in *Aspergillus nidulans*. *Biotechnol Bioeng* 108, 2705-2715.
- Kimura, S., Maruyama, J., Takeuchi, M., Kitamoto, K. (2008) Monitoring global gene expression of proteases and improvement of human lysozyme production in the *nptB* gene disruptant of *Aspergillus oryzae*. *Biosci Biotechnol Biochem* 72, 499–505.
- 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.
- Kothary, M.H., Chase, T.Jr., Macmillan, J.D. (1984) Correlation of elastase production by some strains of *Aspergillus fumigatus* with ability to cause pulmonary invasive aspergillosis in mice. *Infect Immun* 43, 320–325.
- Kuo, M.J., Alexander, M. (1967) Inhibition of the lysis of fungi by melanins. *J Bacteriol* 94: 624–629.
- Kurita, A. (2001) Controlled functionalization of the polysaccharide chitin. *Prog Polym* 26, 1921-1971.
- Kwon-Chung, K.J., Lehman, D., Good, C. Magee, P.T. (1985) Genetic evidence for role of extracellular proteinase in virulence of *Candida albicans*. *Infect Immun* 49, 571–575.

- Kwon, N.J., Garzia, A., Espeso, E.A., Ugalde, U., Yu, J.H. (2010a) FlbC is a putative nuclear C2H2 transcription factor regulating development in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* 77, 1203-1219.
- Kwon, N.J., Shin, K.S., Yu, J.H. (2010b) Characterization of the developmental regulator FlbE in *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Biol* 47, 981-993.
- Laemmli, K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lafon, A., Seo, J.A., Han, K.H., Yu, J.H., d'Enfert, C. (2005) The heterotrimeric G-protein GanB(α)-SfaD(β)-GpgA(γ) is a carbon source sensor involved in early cAMP-dependent germination in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* 171, 71-80.
- Lara-Ortíz, T., Riveros-Rosas, H., Aguirre, J. (2003) Reactive oxygen species generated by microbial NADPH oxidase NoxA regulate sexual development in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* 50, 1241-1255.
- Leary, N.O., Pembroke, A., Duggan, P.F. (1992) Improving accuracy of glucose oxidase procedure for glucose determinations on discrete analyzers. *Clin Chem*, 38, 298-302.
- LeBlanc, G.A., Cochrane, B.J. (1987) Identification of multiple glutathione S-transferases from *Daphnia magna*. *Comp Biochem Physiol* 88B, 39-45.
- Lee, B.N., Adams, T.H. (1994a) Overexpression of *flbA*, an early regulator of *Aspergillus* asexual sporulation leads to activation of *brlA* and premature initiation of development. *Mol Microbiol* 14, 323-334.
- Lee, B.N., Adams, T.H. (1994b) The *Aspergillus nidulans fluG* gene is required for production of an extracellular developmental signal. *Genes Dev* 8, 641-651.
- Lever, M., Powell, J.C., Killip, M., Small, C.W. (1973) A comparison of 4-hydroxybenzoic acid hydrazide (PAHBAH) with other reagents for the determination of glucose. *J Lab Clin Med* 82, 649-655.
- Levine, B., Klionsky, D.J. (2004) Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell* 6, 463-477.
- Lingappa, B.T., Sussman, A.S. (1959) Endogenous substrates of dormant, activated and germinating ascospores of *Neurospora tetrasperma*. *Plant Physiol* 34, 466-472.
- Liu, B., Lu, Y., Xin, Z., Zhang, Z. (2009) Identification and antifungal assay of a wheat beta-1,3-glucanase. *Biotechnol Lett* 31, 1005-1010.
- Lorito, M., Woo, S.L., D'Ambrosio, M., Harman, G.E., Hayes, C.K., Kubicek, C.P., Scala, F. (1996) Synergistic interaction between cell wall degrading enzymes and membrane affecting compounds. *Mol Plant Microbe Interact* 9, 206-213.
- Marshall, M.A., Timberlake, W.E. (1991) *Aspergillus nidulans wetA* activates spore-specific gene expression. *Mol Cell Biol* 11, 55-62.

- Martin, K., McDougall, B.M., McLroy, S., Chen, J., Seviour, R.J. (2007) Biochemistry and molecular biology of exocellular fungal beta-(1,3)- and beta-(1,6)-glucanases. *FEMS Microbiol Rev* 31, 168-192.
- Martín-Cuadrado, A.B., Dueñas, E., Sipiczki, M., Vázquez de Aldana, C.R., del Rey, F. (2003) The endo- β -1,3-glucanase Eng1p is required for dissolution of the primary septum during cell separation in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Sci* 116, 1689–1698.
- Martín-Cuadrado, A.B., Fontaine, T., Esteban, P.F., del Dedo, J.E., de Medina-Redondo, M., del Rey, F., Latgé, J.P., de Aldana, C.R. (2008) Characterization of the endo-beta-1,3-glucanase activity of *S. cerevisiae* Eng2 and other members of the GH81 family. *Fungal Genet Biol* 45, 542-553.
- Matsumoto, K., Yamaguchi, M., Ichishima, E. (1994) Molecular cloning and nucleotide sequence of the complementary DNA for penicillolysin gene, *plnC*, and 18 kDa metalloendopeptidase gene from *Penicillium citrinum*. *Biochim Biophys Acta* 1218, 469-472.
- McCluskey, K. (2003) The Fungal Genetics Stock Center, from molds to molecules. *Adv Appl Microbiol* 52, 245-262.
- McGrath, C.E., Wilson, D.B. (2006) Characterization of a *Thermobifida fusca* β -1,3-glucanase (Lam81A) with a potential role in plant biomass degradation. *Biochemistry* 45, 14094–14100.
- McIntyre, M., Berry, D.R., McNeil, B. (1999) Response of *Penicillium chrysogenum* to oxygen starvation in glucose and nitrogen limited chemostat cultures. *Enzyme Microb Technol* 25, 447-454.
- McIntyre, M., Berry, D.R., McNeil, B. (2000) Role of proteases in autolysis of *Penicillium chrysogenum* chemostat cultures in response to nutrient depletion. *Appl Microbiol Biotechnol* 53, 235-242.
- Mikus, M., Hatvani, L., Neuhof, T., Komoń-Zelazowska, M., Dieckmann, R., Schwecke, T., Druzhinina, I.S., von Döhren, H., Kubicek, C.P. (2009) Differential regulation and posttranslational processing of the class II hydrophobin genes from the biocontrol fungus *Hypocrea atroviridis*. *Appl Environ Microbiol* 75, 3222-3229.
- Molnár, Zs., Mészáros, E., Szilágyi, Zs., Rosén, S., Emri, T., Pócsi, I. (2004) Influence of *fdaA*^{G203R} and *AflbA* mutations on the morphology and physiology of submerged *Aspergillus nidulans* cultures. *Appl Biochem Biotechnol* 118, 349-360.
- Molnár, Zs., Emri, T., Zavaczki, E., Pusztahelyi, T., Pócsi, I. (2006) Effects of mutations in the GanB/RgsA G protein mediated signaling on the autolysis of *Aspergillus nidulans*. *J Basic Microbiol* 46, 495-503.
- Mulder, H.J., Saloheimo, M., Penttilä, M., Madrid, S.M. (2004) The transcription factor HACA mediates the unfolded protein response in *Aspergillus niger*, and up-regulates its own transcription. *Mol Genet Genomics* 271, 130-140.

Mouyna, I., Fontaine, T., Vai, M., Monod, M., Fonzi, W.A., Diaquin, M., Popolo, L., Hartland, R.P., Latgé, J.P. (2000) Glycosylphosphatidylinositol-anchored glucanoyltransferases play an active role in the biosynthesis of the fungal cell wall. *J Biol Chem* 275, 14882-14889.

Mouyna, I., Sarfati, J., Recco, P., Fontaine, T., Henrissat, B., Latgé, J.P. (2002) Molecular characterization of a cell wall-associated $\beta(1-3)$ endoglucanase of *Aspergillus fumigatus*. *Med Mycol* 40, 455-464.

Nahlik, K. (2007) The COP9 signalosome of *Aspergillus nidulans* : Regulation of protein degradation and transcriptional pathways in sexual development. PhD Thesis, Georg August University Göttingen.

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

Nielsen, P., Sorensen, J. (1997) Multi-target and medium-independent fungal antagonism by hydrolytic enzymes in *Paenibacillus polymyxa* and *Bacillus pumilus* strains from barley rhizosphere. *Fems Microbiol Ecol* 22, 183-192.

Ni, M., Yu, J.H. (2007) A novel regulator couples sporogenesis and trehalose biogenesis in *Aspergillus nidulans*. *PLoS One* 2, e970.

Nosanchuk, J.D., Casadevall, A. (2003) The contribution of melanin to microbial pathogenesis. *Cell Microbiol* 5, 203-223.

Nuero, O. M., Alfonso, C., Del Amo, F., Reyes, F. (1993) Study of β -1,3-glucanase activity during autolysis of *Aspergillus nidulans* by FPLC ion-exchange chromatography. *Letts Appl Microbiol* 17, 104-108.

Oberegger, H., Zadra, I., Schoeser, M., Haas, H. (2000) Iron starvation leads to increased expression of Cu/Zn-superoxide dismutase in *Aspergillus*. *FEBS Lett* 485, 113-116.

Park, B.W., Han, K.H., Lee, C.Y., Lee, C.H., Maeng, P.J. (1997) Cloning and characterization of the *citA* gene encoding the mitochondrial citrate synthase of *Aspergillus nidulans*. *Mol Cells* 7, 290-295.

Peña-Montes, C., González, A., Castro-Ochoa, D., Farrés, A. (2008) Purification and biochemical characterization of a broad substrate specificity thermostable alkaline protease from *Aspergillus nidulans*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 78, 603-612.

Peñalva, M.Á., Arst, H.N.Jr, (2002) Regulation of gene expression by ambient pH in filamentous fungi and yeasts. *Microbiol Mol Biol Rev* 66, 426-446.

Pérez-Gonzalez, J.A., De Graaff, L.H., Visser, J., Ramón, D. (1996) Molecular cloning and expression in *Saccharomyces cerevisiae* of two *Aspergillus nidulans* xylanase genes. *Appl Environ Microbiol* 62, 2179-2182.

Pitson, S.M., Seviour, R.J., McDougall, B.M. (1993) Noncellulolytic fungal β -glucanases: their physiology and regulation. *Enz Microb Technol* 15, 178-190.

- Pócsi, I., Sámi, L., Leiter, É., Majoros, L., Szabó, B., Emri, T., Pusztahelyi, T. (2001) Searching for new-type antifungal drugs. *Acta Microbiol Immunol Hung* 48, 533-543.
- Pócsi, I., Pusztahelyi, T., Sámi, L., Emri, T. (2003) Autolysis of *Penicillium chrysogenum* - a holistic approach. *Indian J Biotechnol* 2, 293-301.
- Pócsi, I., Prade, R.A., Penninckx, M.J. (2004) Glutathione, altruistic metabolite in fungi. *Adv Microb Physiol* 49, 1-76.
- Pócsi, I., Miskei, M., Karányi, Zs., Emri, T., Ayoubi, P., Pusztahelyi, T., Balla, Gy., Prade, R.A. (2005) Comparison of gene expression signatures of diamide, H₂O₂ and menadione exposed *Aspergillus nidulans* cultures - linking genome-wide transcriptional changes to cellular physiology. *BMC Genomics* 6,182-192.
- Pócsi, I., Leiter, É., Kwon, N.J., Shin, K.S., Kwon, G.S., Pusztahelyi, T., Emri, T., Abuknesha, R.A., Price, R.G., Yu, J.H. (2009) ChiB production depends on FluG-BrlA asexual sporulation signaling in submerged cultures of *Aspergillus nidulans*. *J Appl Microbiol* 107, 514–523.
- Pollack, J.K., Harris, S.D., Marten, M.R. (2009) Autophagy in filamentous fungi. *Fungal Genet Biol* 46, 1-8.
- Punt, P.J., Dingemanse, M.A., Jacobs-Meijnsing, B.J., Pouwels, P.H., van den Hondel, C.A. (1988) Isolation and characterization of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene of *Aspergillus nidulans*. *Gene* 69, 49-57.
- Pusztahelyi T, Pócsi I, Kozma J, Szentirmai A (1997) Ageing of *Penicillium chrysogenum* cultures under carbon starvation I: morphological changes and secondary metabolite production. *Biotechnol Appl Biochem* 25, 81-86.
- Pusztahelyi, T., Molnár, Zs., Emri T., Klement, É., Miskei, M., Kekégyártó, J., Balla, J., Pócsi, I. (2006) Comparative studies on differential expression of chitinolytic enzymes encoded by *chiA*, *chiB*, *chiC* and *nagA* genes in *Aspergillus nidulans*. *Folia Microbiol* 51, 547-554.
- Ramón, D., Carramolino, L., Patiño, C., Sánchez, F., Peñalva, M.A. (1987) Cloning and characterization of the isopenicillin N synthetase gene mediating the formation of the beta-lactam ring in *Aspergillus nidulans*. *Gene* 57, 171-181.
- Rawlings, N.D., Morton, F.R., Barrett, A.J. (2007) An introduction to peptidases and the MEROPS database. In: Industrial enzymes. Eds: Polonia, J., MacCabe, A.P. Springer.
- Rawlings, N.D., Barrett, A.J., Bateman, A. (2010) MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res* 38, 227-233.
- Reichard, U., Hung, C.Y., Thomas, P.W., Cole, G.T. (2000) Disruption of the gene which encodes a serodiagnostic antigen and chitinase of the human fungal pathogen *Coccidioides immitis*. *Infect Immun* 68, 5830-5838.

- Reyes, F., Lahoz, R., Val Moreno, A. (1979) Influence of carbon and nitrogen sources on release of β -1,3-glucanase and β -N-acetylglucosaminidase during *Neurospora crassa* autolysis. *Trans Br Mycol Soc* 72, 447-451.
- Reyes, F., Villanueva, P., Alfonso, C. (1990) Nucleases in the autolysis of filamentous fungi. *FEMS Microbiol Lett* 57, 67-72.
- Reyes-Ramírez, A., Escudero-Abarca, B.I., Aguilar-Uscanga, G., Hayward-Jones, P.M., Eleazar Barboza-Corona, J. (2004) Antifungal Activity of *Bacillus thuringiensis* Chitinase and Its Potential for the Biocontrol of Phytopathogenic Fungi in Soybean Seeds. *J Food Sci* 69, 131-134.
- Rhodes, J.C., Bode, R.B., McCuan-Kirsch, C.M. (1988) Elastase production in clinical isolates of *Aspergillus*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 10, 165-170.
- Riou, C., Freyssinet, G., Fevre, M. (1991) Production of Cell Wall-Degrading Enzymes by the Phytopathogenic Fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. *Appl Environ Microbiol* 57, 1478-1484.
- Rosén, S., Yu, J.H., Adams, T.H. (1999) The *Aspergillus nidulans* *sfaD* gene encodes a G protein β subunit that is required for normal growth and repression of sporulation. *EMBO J* 18, 5592-5600.
- Royall, J.A., Ischiropoulos, H. (1993) Evaluation of 2',7'-dichlorofluorescein and dihydrorhodamine 123 as fluorescent probes for intracellular H_2O_2 in cultured endothelial cells. *Arch Biochem Biophys* 302,348-355.
- Ruel, K., Joseleau, J.P. (1991) Involvement of an Extracellular Glucan Sheath during Degradation of Populus Wood by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Environ Microbiol* 57, 374-384.
- Saloheimo, M., Valkonen, M., Penttilä, M. (2003) Activation mechanisms of the HAC1-mediated unfolded protein response in filamentous fungi. *Mol Microbiol* 47, 1149-1161.
- Sámi, L., Karaffa, L., Emri, T., István Pócsi (2003) Autolysis and ageing of *Penicillium chrysogenum* cultures under carbon starvation: respiration and glucose oxidase production. *Acta Microbiol Immunol Hung* 50, 67-76.
- Santamaria, F., Reyes, F. (1988) Proteases produced during autolysis of filamentous fungi. *Trans Br Mycol Soc* 91, 217-220.
- Santos, T., Villanueva, J. R., Nombela, C. (1977) Production and catabolite repression of *Penicillium italicum* β -glucanases. *J Bacteriol* 129, 52-55.
- Savoldi, M., Malavazi, I., Soriani, F.M., Capellaro, J.L., Kitamoto, K., da Silva Ferreira, M.E., Goldman, M.H., Goldman, G.H. (2008) Farnesol induces the transcriptional accumulation of the *Aspergillus nidulans* Apoptosis-Inducing Factor (AIF)-like mitochondrial oxidoreductase. *Mol Microbiol* 70, 44-59.

- Schneider, T., Gerrits, B., Gassmann, R., Schmid, E., Gessner, M.O., Richter, A., Battin, T., Eberl, L., Riedel, K. (2010) Proteome analysis of fungal and bacterial involvement in leaf litter decomposition. *Proteomics* 10, 1819-1830.
- Seidl, V. (2008) Chitinases of filamentous fungi: a large group of diverse proteins with multiple physiological functions. *Fungal Biol Rev* 22, 36-42.
- Sekine, H. (1972) Neutral proteinases I and II of *Aspergillus sojae*. *Agric Biol Chem* 36, 2143-2150.
- Semighini, C.P., Savoldi, M., Goldman, G.H., Harris, S.D. (2006) Functional characterization of the putative *Aspergillus nidulans* poly(ADP-ribose) polymerase homolog PrpA. *Genetics* 173, 87-98.
- Seo, J.A., Han, K.H., Yu, J.H. (2005) Multiple roles of a heterotrimeric G protein γ subunit in governing growth and development of *Aspergillus nidulans*. *Genetics* 171, 81-89.
- Seo, J.A., Guan, Y., Yu, J.H. (2006) FluG-dependent asexual development in *Aspergillus nidulans* occurs via derepression. *Genetics* 172, 1535-1544.
- Sewall, T.C., Mims, C.W., Timberlake, W.E. (1990a) Conidium differentiation in *Aspergillus nidulans* wild-type and wet-white (wetA) mutant strains. *Dev Biol* 138, 499-508.
- Sewall, T.C., Mims, C.W., Timberlake, W.E. (1990b) *abaA* controls phialide differentiation in *Aspergillus nidulans*. *Plant Cell* 2, 731-739.
- Shimizu, K., Keller, N.P. (2001) Genetic involvement of a cAMP-dependent protein kinase in a G protein signaling pathway regulating morphological and chemical transitions in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* 157, 591-600.
- Shin, K.S., Kwon, N.J., Kim, Y.H., Park, H.S., Kwon, G.S., Yu, J.H. (2009) Differential roles of the ChiB chitinase in autolysis and cell death of *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot Cell* 8, 738-746.
- Shroff, R.A., O'Connor, S.M., Hynes, M.J., Lockington, R.A., Kelly, J.M. (1997) Null alleles of *creA*, the regulator of catabolite repression in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Biol* 22, 28-38.
- Shwab, E.K., Keller, N.P. (2008) Regulation of secondary metabolite production in filamentous ascomycetes. *Mycol Res* 112, 225-230.
- Sims, A.H., Gent, M.E., Lanthaler, K., Dunn-Coleman, N.S., Oliver, S.G., Robson, G.D. (2005) Transcriptome analysis of recombinant protein secretion by *Aspergillus nidulans* and the unfolded-protein response in vivo. *Appl Environ Microbiol* 71, 2737-2747.
- Skromne, I., Sánchez, O., Aguirre, J. (1995) Starvation stress modulates the expression of the *Aspergillus nidulans* *brlA* regulatory gene. *Microbiology* 141, 21-28.
- Spröte, P., Hynes, M.J., Hortschansky, P., Shelest, E., Scharf, D.H., Wolke, S.M., Brakhage, A.A. (2008) Identification of the novel penicillin biosynthesis gene *aatB* of *Aspergillus*

nidulans and its putative evolutionary relationship to this fungal secondary metabolism gene cluster. *Mol Microbiol* 70, 445-461.

Starcher, B.C. (1986) Elastin and the lung. *Thorax* 41, 577-585.

Stinnett, S.M., Espeso, E.A., Cobeño, L., Araújo-Bazán, L., Calvo, A.M. (2007) *Aspergillus nidulans* VeA subcellular localization is dependent on the importin alpha carrier and on light. *Mol Microbiol* 63, 242-255.

Stone, B., Clarke, A. (1992) Chemistry and Biology of (1,3) β -Glucans. La Trobe University Press, Melbourne.

Stoppok, W., Rapp, P., Wagner, F. (1982) Formation, Location, and Regulation of Endo-1,4-beta-Glucanases and beta-Glucosidases from *Cellulomonas uda*. *Appl Environ Microbiol* 44, 44-53.

Stringer, M.A., Dean, R.A., Sewall, T.C., Timberlake, W.E. (1991) Rodletless, a new *Aspergillus* developmental mutant induced by directed gene inactivation. *Genes Dev* 5, 1161-1171.

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

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

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

Tabera, L., Muñoz, R., Gonzalez, R. (2006) Deletion of *bcy1* from the *Saccharomyces cerevisiae* genome is semidominant and induces autolytic phenotypes suitable for improvement of sparkling wines. *Appl Environ Microbiol* 72, 2351-2358.

Tatsumi, H., Murakami, S., Tsuji, R.F., Ishida, Y., Murakami, K., Masaki, A., Kawabe, H., Arimura, H., Nakano, E., Motai, H. (1991) Cloning and expression in yeast of a cDNA clone encoding *Aspergillus oryzae* neutral protease II, a unique metalloprotease. *Mol Gen Genet* 228, 97-103.

Tharanathan, R.N., Kittur, F.S. (2003) Chitin—the undisputed biomolecule of great potential. *Crit Rev Food Sci Nutr* 43, 61-87.

Thrane, C., Kaufmann, U., Stummann, B.M., Olsson, S. (2004) Activation of caspase-like activity and poly (ADP-ribose) polymerase degradation during sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Biol* 41, 361-368.

- Tilburn, J., Sarkar, S., Widdick, D.A., Espeso, E.A., Orejas, M., Mungroo, J., Peñalva, M.A., Arst, H.N.Jr. (1995) The *Aspergillus* PacC zinc finger transcription factor mediates regulation of both acid- and alkaline-expressed genes by ambient pH. *EMBO J* 14, 779–790.
- Tobin, M.B., Fleming, M.D., Skatrud, P.L., Miller, J.R. (1990) Molecular characterization of the acyl-coenzyme A:isopenicillin N acyltransferase gene (penDE) from *Penicillium chrysogenum* and *Aspergillus nidulans* and activity of recombinant enzyme in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 172, 5908-5914.
- Todd, R.B., Fraser, J.A., Wong, K.H., Davis, M.A., Hynes, M.J. (2005) Nuclear accumulation of the GATA factor AreA in response to complete nitrogen starvation by regulation of nuclear export. *Eukaryotic Cell* 4, 1646–1653.
- Tomarelli, R.M., Charney, J., Harding, M.L. (1949) The use of azoalbumin as a substrate in the colorimetric determination of peptic and tryptic activity. *J Lab Clin Med* 34, 428-433.
- vanKuyk, P.A., Cheetham, B.F., Katz, M.E. (2000) Analysis of two *Aspergillus nidulans* genes encoding extracellular proteases. *Fungal Genet Biol* 29, 201-210.
- Virag, A., Harris, S.D. (2006) The Spitzenkörper: a molecular perspective. *Mycol Res* 110, 4–13.
- Wang, S.L., Chang, W.T. (1997) Purification and characterization of two bifunctional chitinases/lysozymes extracellularly produced by *Pseudomonas aeruginosa* K-187 in shrimp and crab shell powder medium. *Appl Environ Microbiol* 63, 380–386.
- Ward, O.P., Qin, W.M., Dhanjoon, J., Ye, J., Singh, A. (2005) Physiology and Biotechnology of *Aspergillus*. *Adv Appl Microbiol.* 58C, 1-75.
- Wei, H., Scherer, M., Singh, A., Liese, R., Fischer, R. (2001) *Aspergillus nidulans* alpha-1,3 glucanase (mutanase), *mutA*, is expressed during sexual development and mobilizes mutan. *Fungal Genet Biol* 34, 217-227.
- Wei, H., Vienken, K., Weber, R., Bunting, S., Requena, N., Fischer, R. (2004) A putative high affinity hexose transporter, *hxtA*, of *Aspergillus nidulans* is induced in vegetative hyphae upon starvation and in ascogenous hyphae during cleistothecium formation. *Fungal Genet Biol* 41,148-56.
- Wessels J.G.H. (2000) Hydrophobins, unique fungal proteins. *Mycologist* 14, 153-159.
- White, S., Berry, D.R., McNeil, B. (1999) Effect of phenylacetic acid feeding on the process of cellular autolysis in submerged batch cultures of *Penicillium chrysogenum*. *J Biotechnol* 75, 173–185.
- White, S., McIntyre, M., Berry, D. R., McNeil, B. (2002). The autolysis of industrial filamentous fungi. *Crit Rev Biotechnol* 22, 1–14.
- Wieser, J., Lee, B.N., Fondon, J.W., Adams, T.H. (1994) Genetic requirements for initiating asexual development in *Aspergillus nidulans*. *Curr Genet* 27, 62–69.

- Wieser, J., Adams, T.H. (1995) *flbD* encodes a Myb-like DNA-binding protein that coordinates initiation of *Aspergillus nidulans* conidiophore development. *Genes Dev* 9, 491–502.
- Wösten, H.A. (2001) Hydrophobins: multipurpose proteins. *Annu Rev Microbiol.* 55, 625-46.
- Yamaguchi, M., Hanzawa, S., Hirano, K., Yamagata, Y., Ichishima, E. (1993) Specificity and molecular properties of penicillolysin, a metalloproteinase from *Penicillium citrinum*. *Phytochemistry* 33, 1317-1321.
- Yamazaki, H., Tanaka, A., Kaneko, J., Ohta, A., Horiuchi, H. (2008) *Aspergillus nidulans* ChiA is a glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored chitinase specifically localized at polarized growth sites. *Fungal Genet Biol* 45, 963-972.
- Yanai, K., Kojima, N., Takaya, N., Horiuchi, H., Ohta, A., Takagi, M. (1994) Isolation and characterization of two chitin synthase genes from *Aspergillus nidulans*. *Biosci Biotechnol Biochem* 58, 1828-1835.
- Yang, Z., Huang, J., Geng, J., Nair, U., Klionsky, D.J. (2006) Atg22 recycles amino acids to link the degradative and recycling functions of autophagy. *Mol Biol Cell* 17, 5094–5104.
- Yorimitsu, T., Klionsky, D.J. (2005) Autophagy: molecular machinery for self-eating. *Cell Death Differ* 12 Suppl. 2, 1542–1552.
- Yu, J.H., Wieser, J., Adams, T.H. (1996a) The *Aspergillus* FlbA RGS domain protein antagonizes G-protein signaling to block proliferation and allow development. *EMBO J* 15, 5184-5190.
- Yu, J.H., Butchko, R.A., Fernandes, M., Keller, N.P., Leonard, T.J., Adams, T.H. (1996b) Conservation of structure and function of the aflatoxin regulatory gene *aflR* from *Aspergillus nidulans* and *A. flavus*. *Curr Gene* 9, 549-555.
- Yu, J.H., Rosèn, S., Adams, T.H. (1999) Extragenic suppressors of loss-of-function mutations in the *Aspergillus* FlbA regulator of G-protein signaling domain protein. *Genetics* 151, 97-105.
- Yu, J.H. (2006) Heterotrimeric G protein signaling and RGSs in *Aspergillus nidulans*. *J Microbiol* 44, 145-154.
- Yu, J.H. (2010) Regulation of development in *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus fumigatus*. *Mycobiology* 38, 229-237.
- Zonneveld, B.J.M. (1974) Alpha-1,3 glucan synthesis is correlated with alpha-1,3-glucanase synthesis, conidiation and fructification in morphogenetic mutants of *Aspergillus nidulans*. *J Gen Microbiol* 81, 445–451.

9. Függelék

Gén azonosító	(Feltételezett) géntermék	Log ₂ R
Autofágiában érintett gének		
AN5174	Feltételezett autofágiás fehérhe (Atg5) [1]	-4,57*
AN2876	Feltételezett autofágiás fehérje (Atg22) [1]	-3,91*
AN7428	Feltételezett autofágiás fehérje (Atg7) [1]	-2,25
AN5814	Feltételezett TOR útvonalban szerepet játszó fehérje (TipA) [2]	-2,07*
Apoptózisban érintett gének		
AN9103	Feltételezett apoptózis indukáló faktor (AifA) [3]	2,71
AN5712	Feltételezett metakaspáz (CasA) [4]	-0,48*
AN3129	Feltételezett poli-ADP-ribóz-polimeráz (PrpA) [5]	0,94
AN7500	Feltételezett NADH-dehidrogenáz (NdeA) [6]	2,88
AN10660	Feltételezett NADH-dehidrogenáz (NdiA) [6]	6,26
Feltehetőleg extracelluláris lebontó enzimek		
<i>Lipázok, foszfolipázok, észterázok, kutinázok</i>		
AN8046	Feltételezett triacilglicerol lipáz	-5,40
AN1433	Feltételezett triacilglicerol lipáz	-2,74
AN0137	Feltételezett glicerofoszfokolin foszfodiészteráz	-2,36
AN5309	Feltételezett kutináz	-4,65
AN6464	Feltételezett észteráz	-5,35*
AN5777	Feltételezett triacilglicerol lipáz	-3,62
AN3037	Feltételezett karboxilészteráz	-2,18
<i>Nukleázok</i>		
AN11897	Feltételezett ribonukleáz T2	-4,11*
AN1723	Feltételezett ribonukleáz T1	-7,48*
<i>Proteinázok</i>		
AN5558	Alkalikus proteináz (PrtA) [7]	-4,58*
AN7962	Metalloproteináz (PepJ)	-2,47*
AN8445	Feltételezett aminopeptidáz [8]	-5,33*
AN6438	Feltételezett dipeptidil-peptidáz [8]	-3,93*
AN7231	Feltételezett szerin karboxipeptidáz [8]	-3,95
AN7121	Feltételezett karboxipeptidáz [8]	-3,71
AN3393	Feltételezett deuterolizin típusú metalloproteináz (PepI)	-4,22*
AN2572	Feltételezett dipeptidil peptidáz	-4,96*
AN2366	Feltételezett tripszin szerű proteináz	-6,04
<i>Antibakteriális hidrolázok</i>		
AN8969	Feltételezett N,O-diacetilmuramidáz	-6,26
AN6470	N,O-diacetil-muramidáz [9]	-7,16*
AN8730	Feltételezett N-acetil-muramoil-L-alanin amidáz	-3,40
<i>Gomba sejtfal bontásához kapcsolódó enzimek</i>		
AN4871	Kitináz (ChiB) [10,11]	-3,47*
AN1502	N-acetil-glukózaminidáz (NagA) [10,12]	-4,69*
AN9390	Kitináz (ChiC) [10]	-4,14
AN9380	Kitin dezacetiláz [10, 13]	-8,14*
AN1852	Feltételezett kitin dezacetiláz [10]	-4,11
AN0472	β-1,3-endoglükánáz (EngA)	-2,75*

AN0245	Feltételezett β -1,3(4)-glükánáz [10]	-5,62*
AN4825	Feltételezett β -1,3-exoglükánáz [10]	-4,44*
AN7349	α -1,3-glükánáz (MutA) [10,14]	-3,66*
AN3790	Feltételezett α -1,3-glükánáz (AgnB) [10]	-3,66
AN9042	Feltételezett α -1,3-glükánáz (AgnC) [10]	-3,44
<i>Nem gomba sejtfal eredetű szénhidrátokat, növényi sejtfal komponenseket bontó enzimek</i>		
AN2395	Feltételezett β -glükoronidáz	-4,39
AN8007	α -1,5-endoarabináz (AbnC) [9]	-2,92
AN1870	Feltételezett xilanáz	-2,97
AN3613	Xilanáz (XlnA) [15]	-4,21
AN0012	Feltételezett glukuron liáz	-3,56
<i>Szénhidrátokat bontó enzimek</i>		
AN4102	Feltételezett β -glükozidáz (BglA)	-4,54
AN10482	Feltételezett β -glükozidáz (BglF)	-5,87
AN2828	Feltételezett β -glükozidáz (BglL)	-4,25
AN7396	Feltételezett β -glükozidáz (BglM)	-7,47*
AN6819	Feltételezett glikozil hidroláz	-2,23
AN2017	Feltételezett α -glükozidáz (AgdA)	-3,00
AN11143	Feltételezett glükamiláz (GlaA)	-4,08
AN2325	Feltételezett glikozil hidroláz	-5,17
AN8432	Feltételezett glükozidáz	-4,05
AN9340	Savas trehaláz (TreA) [16]	-2,14*
AN11778	Feltételezett β -fruktozidáz	-2,30
<i>Egyéb</i>		
AN4809	Feltételezett glutamináz A (GtaA)	-3,66*
Feltehetőleg nem extracelluláris lebontó enzimek		
<i>Lipázok, foszfolipázok, észterázok, kutinázok</i>		
AN4245	Feltételezett ceramidáz	-2,45
AN8546	Feltételezett foszfolipáz	-4,49
AN8242	Feltételezett lipáz	-3,13*
AN1713	Feltételezett foszfolipáz	-4,98
<i>Nukleázok</i>		
AN11062	Feltételezett L-PSP endoribonukleáz	-7,21*
AN2153	Feltételezett exoribonukleáz	-2,56
AN2185	Feltételezett mitokondriális nukleáz (NucA)	-2,18
AN7298	Feltételezett nukleáz	-2,82
AN3812	Feltételezett nukleáz	-2,26
<i>Proteinázok</i>		
AN4282	Feltételezett aminoszteinidáz	-5,05
AN2092	Feltételezett prolil aminoszteinidáz (PapA)	-4,48
AN0369	Feltételezett aminoszteinidáz	-4,14
AN10184	Feltételezett karboxipeptidáz	-4,09
AN2779	Feltételezett dipeptidáz	-3,73
AN1780	Feltételezett dipeptidáz	-4,41
AN8102	Feltételezett pepszinszerű aszpartát proteináz (PepAc)	-2,23
AN9003	Feltételezett aszpartát proteináz	-3,46
<i>Gomba sejtfal bontásához kapcsolódó enzimek</i>		
AN0299	Feltételezett kitináz [10]	-3,20
AN2385	β -1,3-1,4-glükánáz (XgeA) [10, 9]	-2,87
AN1428	Feltételezett N-acetil-glükózamin-6-foszfát dezacetiláz	-6,10*
AN1418	Feltételezett glükózamin-6-foszfát izomeráz	-4,39*

Nem gomba sejtfal eredetű szénhidrátokat, növényi sejtfal komponenseket bonó enzimek

AN3991	Feltételezett glukuronil hidroláz	-5,93
AN7864	Feltételezett β -1,4-xilozidáz (Bx1D)	-4,98
AN10199	Feltételezett β -xilozidáz	-2,65
AN10935	Feltételezett α -xilozidáz	-3,33
AN12368	Feltételezett α -ramnozidáz (RhaB)	-2,49

Szénhidrátokat bontó enzimek

AN6620	Glikozil hidroláz domént tartalmazó fehérje	-4,84
AN3837	Feltételezett glikozil hidroláz	-2,68
AN6518	Feltételezett poliszacharid dezacetiláz	-2,61
AN1416	Feltételezett N-acetiltranszferáz	-2,48
AN3368	β -mannozidáz (MndB) [9]	-2,93

Hidrofobinok

AN8803	Hidrofobin (RodA) [10,17]	-2,74*
AN6401	Feltételezett hidrofobin [10]	-4,23
AN1837	Feltételezett hidrofobin [10]	-3,55
AN0940	Feltételezett Hidrofobin [10]	-4,31

UPR-hez kötődő gének

AN9397	Transzkripciós faktor (HacA) [18]	-2,28*
AN2062	Feltételezett ER chaperon (BipA) [19]	-2,57
AN8343	Feltételezett FK506 kötő fehérje (Fkbp4) [19]	-2,32
AN4467	Ciklofilin (CypB) [19, 20]	-2,06
AN3592	Feltételezett kalnexin (ClxA) [19]	-2,48
AN0847	Feltételezett ER chaperon [19]	-2,24
AN7436	Feltételezett diszulfid izomeráz (PdiA) [19]	-2,52*

Szekunder metabolit termeléshez köthető gének

AN7820	C6 transzkripciós faktor (AflR) [21]	-2,62*
AN2943	Feltételezett szerin/treonin protein kináz (RfeA)	-3,31
AN2623	Izopenicillin-N,N-acetiltranszferáz (AatA) [22]	-3,73
AN6775	Penicillin bioszintézishez köthető fehérje (AatB) [23]	-2,84
AN2622	Izopenicillin-N-szintetáz (IpnA) [24]	-3,81
AN9005	Feltételezett poliketid szintetáz	-2,35
AN6791	Feltételezett poliketid szintetáz	-2,22
AN6448	Feltételezett poliketid szintetáz (PkbA)	-4,01
AN2545	Feltételezett nem riboszómális peptid szintetáz (EasA)	-3,06
AN9129	Feltételezett nem riboszómális peptid szintetáz	-3,91*
AN10576	Nem riboszómális peptid szintetáz (IvoA) [25]	-4,20*
AN0231	Fenol oxidáz (IvoB) [26]	-5,26
AN2091	Feltételezett tirozin dekarboxiláz	-4,08
AN0230	Feltételezett tirozináz [27]	-4,07*

1. táblázat Néhány, a diszkuszióban tárgyalt géncsoport \log_2 R értékei. A „*” jelölés az adott gének esetében a microarray adat RT-PCR-rel történő megerősítését jelzi. A gének annotálása a Broad Institute, az *Aspergillus* Genome Database adatbázis és az alábbi hivatkozások felhasználásával történt. Az adatokat a gének GO számaival is egybevetettük.

1- Kiel és van der Klei 2009; 2- Fitzgibbon és munkatársai 2005; 3-Savoldi és munkatársai 2008; 4- Cheng és munkatársai 2003; 5-Semighini és munkatársai 2006; 6-Dinamarco és munkatársai 2010; 7- Peña-Montes és munkatársai 2008; 8- Schneider és munkatársai 2010; 9- Bauer és munkatársai 2006; 10- de Groot és munkatársai 2009; 11- Erdei és munkatársai 2008; 12- Kim és munkatársai 2002; 13- Alfonso és munkatársai 1995; 14- Wei és munkatársai 2001; 15- Pérez-Gonzalez és munkatársai 1996; 16- d'Enfert és Fontaine 1997;

17- Stringer és munkatársai 1991; 18- Saloheimo és munkatársai 2003; 19- Sims és munkatársai 2005; 20- Joseph és munkatársai 1999; 21- Yu és munkatársai 1996b; 22- Tobin és munkatársai 1990; 23- Spröte és munkatársai 2008; 24- Ramón és munkatársai 1987; 25- Birse és Clutterbuck 1990; 26- Birse és Clutterbuck 1991; 27- Nahlik 2007.

10. Köszönetnyilvánítás

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

Köszönettel tartozom Dr. Miskei Mártonnak és Karányi Zsoltnak (Debreceni Egyetem) a microarray vizsgálat során a DNS chip tervezésében és az eredmények normalizálásában nyújtott segítségükért. Szeretném megköszönni Prof. Dr. Jae-Hyuk Yu egyetemi tanárnak és Dr. Nak-Yung Kwonnak (University of Wisconsin-Madison, Amerikai Egyesült Államok), hogy a $\Delta engA$, $\Delta engA\Delta chiB$, $\Delta pepJ$, $\Delta prtA$, $\Delta pepJ\Delta prtA$ mutánsok létrehozásával hozzájárultak vizsgálataim elvégzéséhez.

Szeretném megköszönni László Krisztina, Dorogi Csilla, Bakti Fruzsina és Anton Fruzsina szakdolgozóknak lelkes és odaadó munkájukat, továbbá a Mikrobiális Biotechnológiai és Sejtbiológiai Tanszék minden dolgozójának segítségüket, valamint azt, hogy munkámat kellemes légkörben, barátok közt végezhettem.

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

2011. szeptember és 2012. szeptember között a Debreceni Egyetem Tudományos Képzési Műhelyeinek Támogatása című projekt doktorjelölti ösztöndíjában részesültem (TÁMOP-4.2.2/B-10/1-2010-0024).

11. Tudományos közlemények jegyzéke

Az értekezés alapjául szolgáló tudományos közlemények

- 1) Emri, T., **Szilágyi, M.**, László, K., Hamvas, M., Pócsi, I. (2009) PepJ is a new extracellular proteinase of *Aspergillus nidulans*. *Folia Microbiologica* 54, 105-109. IF: 0,978
- 2) **Szilágyi, M.**, Kwon, N-J., Dorogi, Cs., Pócsi, I., Yu, J-H., Emri, T. (2010) The extracellular β -1,3-endoglucanase EngA is involved in autolysis of *Aspergillus nidulans*. *Journal of Applied Microbiology* 109, 1498-1508. IF: 2,365
- 3) **Szilágyi, M.**, Kwon, N-J, Bakti, F., M-Hamvas, M., Jámbrik, K., Park, H.S., Pócsi, I., Yu, J-H., Emri, T. (2011) Extracellular proteinase formation in carbon starving *Aspergillus nidulans* cultures – physiological function and regulation. *Journal of Basic Microbiology* 51, 625-634. IF: 1,395
- 4) **Szilágyi, M.**, Anton, F., Forgács, K., Yu, J-H., Pócsi, I., Emri, T. (2012) Antifungal activity of extracellular hydrolases produced by autolysing *Aspergillus nidulans* cultures. *Journal of Microbiology* közlésre elfogadva DOI 10.1007/s12275-012-2001-0 IF: 1,266

Az értekezés alapjául szolgáló, közlésre előkészített tudományos közlemények

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

Egyéb közlemények

- 1) Emri, T., Molnár, Zs., **Szilágyi, M.**, Pócsi, I. (2008) Regulation of autolysis in *Aspergillus nidulans*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 151, 211-220. IF: 1,040
- 2) Emri, T., **Szilágyi, M.**, Justyák, A., Pócsi, I. (2008) Heterotrimeric G protein mediated regulation of proteinase production in *Aspergillus nidulans*. *ACTA Microbiologica et Immunologica Hungarica* 55, 111-117.
- 3) **Szilágyi, M.**, Pócsi, I., Forgács, K., Emri, T. (2010) MeaB dependent nutrition sensing regulates autolysis in carbon starving *Aspergillus nidulans* cultures. *Indian Journal of Microbiology* 50, 104-108. IF: 0,938

Az értekezés témakörében elhangzott előadások és poszterek

- 1) **Szilágyi, M.**, Kwon, N-J., Dorogi, Cs., Pócsi, I., Yu, J-H., Emri, T. (2010) Autolysis and extracellular glucanase production in *Aspergillus nidulans*. A Magyar Mikrobiológiai Társaság 2010. évi Naggyűlése, Keszthely.
- 2) Pócsi, I., Emri, T., Kwon, N-J., **Szilágyi, M.**, Bakti, F., Pusztahelyi, T., Park, H.S., Leiter, É., Yu, J-H (2011) Regulation of autolytic hydrolase production in *Aspergillus nidulans*. 26th Fungal Genetics Conference, Asilomar, USA.
- 3) **Szilágyi, M.**, Bakti, F., Anton, F., Dorogi, Cs., Pócsi, I., Emri, T. (2012) Autolytic hydrolases of *Aspergillus nidulans*. *Mikológiai közlemények Clusiana* 51, 33-35. V Hungarian Conference of Mycology, Budapest, Hungary.
- 4) Emri, T., **Szilágyi, M.**, Szarvas, V., Miskei, M., Karányi, Zs., Pócsi, I. (2012) Transcriptional changes induced by carbon starvation in *Aspergillus nidulans*. *Mikológiai közlemények Clusiana* 51, 31-32. V Hungarian Conference of Mycology, Budapest, Hungary.

Egyéb előadások, poszterek

- 1) Emri, T., Molnár, Zs., **Szilágyi, M.**, Justyák, A., Pusztahelyi, T., Pócsi, I. (2007) Regulation of the extracellular chitinases and proteinases in autolysing *Aspergillus nidulans* cultures. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* 54, 28. 15th International Congress of the Hungarian Society for Microbiology, Budapest, Hungary.
- 2) Emri, T., Molnár, Zs., **Szilágyi, M.**, Pócsi, I. (2007) Regulation of autolysis in *Aspergillus nidulans*. NHBT-2007, Trivandrum, India.
- 3) **Szilágyi, M.**, Emri, T., Pócsi, I. (2008) MeaB dependent regulation of autolysis in *Aspergillus nidulans*. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* 55, 249. IV Hungarian Conference of Mycology, Debrecen, Hungary.
- 4) Emri, T., **Szilágyi, M.**, Justyák, A., Pócsi, I. (2008) Heterotrimeric G protein mediated regulation of proteinase production in *Aspergillus nidulans*. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* 55, 111-118. IV Hungarian Conference of Mycology, Debrecen, Hungary.
- 5) Emri, T., Tóth, V., Spicz Müller, Zs., Vasas, G., **Szilágyi, M.**, Pócsi, I. (2009) Glutathione metabolism of carbon starving *Aspergillus nidulans* cultures. *Acta Microbiologica and Immunologica Hungarica* 56, 143. 2nd Central European Forum for Microbiology, Keszthely, Hungary.

6) Tóth, V., Spitzmüller, Zs., Vasas, G., **Szilágyi, M.**, Pócsi, I., Emri, T. (2011)
Production of glutaminase A by *Aspergillus nidulans*. A Magyar Mikrobiológiai
Társaság 2011. évi Naggyűlése, Budapest.