



Szénéhező *Aspergillus nidulans* tenyészetek morfológiai és fiziológiai változásai G-protein mediált jelátvitelben defektes mutánsokban

Doktori (Ph.D.) értekezés

Molnár Zsolt

Debreceni Egyetem  
Természettudományi Kar  
Debrecen, 2007.



Ezen értekezést a Debreceni Egyetem TTK Biológia Doktori Iskola „A bioreguláció molekuláris és fiziológiai szerveződése és biotechnológiai vonatkozásai” programja keretében készítettem a Debreceni Egyetem TTK doktori (PhD) fokozatának elnyerése céljából.

Debrecen, 2007. december 10.

Molnár Zsolt  
(jelölt)

Tanúsítom, hogy Molnár Zsolt doktorjelölt 2003- 2006 között a fent megnevezett Doktori Iskola „A bioreguláció molekuláris és fiziológiai szerveződése és biotechnológiai vonatkozásai” programjának keretében irányításommal végezte munkáját. Az értekezésben foglalt eredményekhez a jelölt önálló alkotó tevékenységével meghatározóan hozzájárult. Az értekezés elfogadását javasolom.

Debrecen, 2007. december 10.

Dr. Emri Tamás  
(témavezető)

# Tartalomjegyzék

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. Bevezetés</b> .....   | <b>7</b>  |
| <b>1.2. Irodalmi előzmények</b> .....   | <b>9</b>  |
| 1.2.1 Az <i>Aspergillus nidulans</i> mint modellszervezet .....   | 9         |
| 1.2.2 A G-proteinek és működésük .....  | 10        |
| 1.2.3 Heterotrimer G-proteinek és szerepük <i>Aspergillus nidulans</i> fonalas gombában ...                                   | 13        |
| 1.2.4 Az <i>Aspergillus nidulans</i> aszexuális sporulációjának szabályozása .....  | 21        |
| 1.2.5 Az autolízis .....  | 25        |
| 1.2.6 Az apoptózis .....  | 27        |
| 1.2.7 Apoptózis a gombákban .....   | 30        |
| <b>2. Anyagok és vizsgálati módszerek</b> .....   | <b>35</b> |
| <b>2.1 A vizsgált <i>Aspergillus nidulans</i> törzsek</b> .....   | <b>35</b> |
| <b>2.2 Az <i>Aspergillus nidulans</i> tenyésztése</b> .....   | <b>36</b> |
| <b>2.3 Fiziológiai vizsgálatok</b> .....  | <b>36</b> |
| 2.3.1 Intracelluláris enzimaktivitások mérése .....   | 36        |
| 2.3.2 A sejtek GSH és GSSG tartalmának meghatározása.....   | 37        |
| 2.3.3 A sejtek szuperoxid és peroxid tartalmának mérése.....  | 38        |
| 2.3.4 A tápközeg glükóz és ammónia tartalmának mérése.....  | 38        |
| 2.3.5 A tenyészetek specifikus MTT redukciós aktivitásának mérése .....   | 39        |
| 2.3.6 A teljes és a cián-rezisztens légzés mérése.....  | 39        |
| <b>2.4 Az autolitikus markerek nyomon követése</b> .....  | <b>39</b> |
| <b>2.5 Apoptotikus markerek vizsgálata</b> .....  | <b>40</b> |
| 2.5.1 A sejtmag morfológiájának vizsgálata DAPI (4',6'-diamino-2 fenilindol) festéssel .....                                  | 40        |
| 2.5.2 Protoplaszt előállítás és tisztítás .....   | 40        |
| 2.5.3 A foszfátidil-szerin oldalláncok externalizációjának vizsgálata „Annexin V assay” felhasználásával .....                | 41        |
| 2.5.4 DNS fragmentáció vizsgálata TUNEL festéssel .....   | 41        |
| <b>2.6 RNS izolálás, koncentráció meghatározás és denaturáló (agaróz) gélelektroforézis, génexpressziós vizsgálatok</b> ..... | <b>42</b> |
| 2.6.1 RNS izolálás, koncentráció meghatározás és denaturáló (agaróz) gélelektroforézis .....                                  | 42        |
| 2.6.2 Génexpresszó vizsgálata RT-PCR segítségével .....   | 42        |
| <b>2.7 Statisztikai módszerek</b> .....   | <b>43</b> |
| <b>2.8 Felhasznált vegyszerek</b> .....   | <b>44</b> |
| <b>3. Eredmények</b> .....  | <b>45</b> |
| <b>3.1. Szénéhező <i>Aspergillus nidulans</i> tenyészetek morfológiai és fiziológiai jellemzői</b> ..                         | <b>45</b> |
| 3.1.1 Autolízis szénéhező <i>Aspergillus nidulans</i> tenyészetekben.....   | 45        |
| 3.1.2 Redox változások szénéhező <i>Aspergillus nidulans</i> tenyészetekben.....  | 48        |
| 3.1.3 Apoptózis és apoptotikus markerek kifejeződése <i>Aspergillus nidulans</i> szénéhező tenyészeiben.....                  | 53        |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>3.2 A G-protein mediált jelátviteli útvonalak szerepe az <i>Aspergillus nidulans</i> szénéhezõ tenyészetekben.....</b>                              | <b>57</b> |
| 3.2.1 A <i>fdaA<sup>G203R</sup></i> és <i>ΔflbA</i> mutációk hatása az <i>Aspergillus nidulans</i> szénéhezõ tenyészetekre .....                       | 57        |
| 3.2.2 A <i>ΔganB</i> , a <i>ΔrgsA</i> és <i>ΔganBΔrgsA</i> mutációk hatása az <i>Aspergillus nidulans</i> szénéhezõ tenyészetekre.....                 | 64        |
| <b>3.3 Az <i>Aspergillus nidulans</i> aszexuális sporulációját szabályozó <i>brlA</i> és <i>fluG</i> gének mutációinak hatása az autolízisre .....</b> | <b>70</b> |
| <b>3.4 Apoptotikus markerek <i>Aspergillus nidulans fluG1</i> és a <i>ΔbrlA</i> mutáns törzseiben</b>  | <b>72</b> |
| <b>4. Az eredmények megbeszélése .....</b>   | <b>74</b> |
| <b>4.1. A szénéhezõ <i>Aspergillus nidulans</i> tenyészetek morfológiai és fiziológiai jellemzői</b>   | <b>74</b> |
| 4.1.1 Az autolizáló <i>Aspergillus nidulans</i> tenyészetek morfológiai változásai .....   | 74        |
| 4.1.2. Hidrolitikus enzimek <i>Aspergillus nidulans</i> autolizáló tenyészetében .....   | 75        |
| 4.1.3 A redox egyensúly változása az autolízis során .....   | 76        |
| 4.1.4 A glutation anyagcsere alakulása és kapcsolata a morfológiával szénéhezõ tenyészetekben.....   | 78        |
| 4.1.5 Szénéhezõ <i>Aspergillus nidulans</i> tenyészetek és az apoptózis .....  | 80        |
| <b>4.2 A G-protein mediált jelátviteli útvonalak szerepe az <i>Aspergillus nidulans</i> szénéhezõ tenyészetekben.....</b>                              | <b>80</b> |
| <b>4.3 Az <i>Aspergillus nidulans</i> aszexuális sporulációját szabályozó <i>brlA</i> és <i>fluG</i> gének mutációinak hatása az autolízisre .....</b> | <b>85</b> |
| <b>4.4 Apoptotikus markerek <i>Aspergillus nidulans fluG1</i> és a <i>ΔbrlA</i> mutáns törzseiben</b>  | <b>86</b> |
| <b>5. Összefoglalás.....</b>   | <b>88</b> |
| <b>6. Summary.....</b>   | <b>91</b> |
| <b>7. Irodalomjegyzék .....</b>  | <b>94</b> |

## A dolgozatban használt rövidítések:

|             |   |
|-------------|---|
| BSA         | borjú szérum albumin  |
| DCF         | 2',7'-diklorofluoreszcein   |
| DCM         | szárazanyag-tartalom (dry cell mass)  |
| DAPI        | 4',6'-diamino-2 fenilindol  |
| DEPC        | dietil-pirokarbonát   |
| EDTA        | etilén-diamin-tetraecetsav  |
| Et          | etidium   |
| G6PD        | glükóz-6-foszfát dehidrogenáz   |
| GPx         | glutation peroxidáz   |
| GR          | glutation reduktáz  |
| GSH         | glutation (redukált forma)  |
| GSSG        | glutation-diszulfid (oxidált forma)   |
| GST         | glutation-S-transzferáz   |
| GTP         | guanozin-trifoszfát   |
| $\gamma$ GT | $\gamma$ -glutamil transzpeptidáz   |
| MOPS        | 3-(N-morfolino)propánszulfonsav   |
| MTT         | metil-tiazoltetrazolium (3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolium)   |
| NADP-ID     | NADP-specifikus izocitrát dehidrogenáz  |
| NBT         | Nitro Blue Tetrazolium (2,2'-di- <i>p</i> -nitrofenil-5,5'-difenil-(3,3'-dimetoxi-4,4'-difenilén)-ditetrazolium klorid) |
| PABA        | <i>p</i> -aminobenzoésav (4-aminobenzoic acid)  |
| PKA         | proteinkináz A  |
| PMSF        | $\alpha$ -toluil-szulfonil-fluorid (fenil-metil-szulfonil-fluorid)  |
| ROS         | reaktív oxigénformák (reactive oxygen species)  |
| SDS         | nátrium-lauril-szulfát  |
| SOD         | szuperoxid diszmutáz  |

# 1. Bevezetés

A gombák differenciálódási és sejtpusztulási folyamatainak vizsgálata az utóbbi évtizedben a mikológiai kutatások középpontjába került. Nem véletlenül: a gombák gazdasági, ipari, egészségügyi és ökológiai jelentősége igen nagy. A gombák életciklusának jobb megértésétől egyfelől olyan új stratégiák kidolgozását remélik, amelyek forradalmasíthatják a gombafertőzésekkel szembeni védekezést, és a gombák biotechnológiai alkalmazását, másfelől a gombák, mint könnyen tanulmányozható modellszervezetek vizsgálatán keresztül értékes információkhoz juthatunk a magasabb rendű eukarióta élőlények sejteinek differenciálódásával kapcsolatban is.

Az utóbbi években számos érdekes eredmény látott napvilágot a gombák G-proteinek által mediált jelátviteli útvonalainak működéséről és funkciójáról. E jelátviteli utak a gombák életében számos kulcsfontosságú esemény szabályozásában részt vesznek, sokszor meghatározó módon. Szerepük van többek között a vegetatív növekedés fenntartásában, az ivaros és ivartalan szaporodás regulációjában, a gombák stresszválaszainak kialakításában (Lee és munkatársai, 1994a; Hicks és munkatársai, 1997; Adams és munkatársai, 1998; Rosen és munkatársai, 1999; Chang és munkatársai, 2004; Han és munkatársai, 2004a, b; Lukov és munkatársai, 2005; Yu, 2006), sőt részt vehetnek az apoptózis iniciálásában is (Leiter és munkatársai, 2005).

Annak ellenére, hogy az *Aspergillus nidulans* fonalas gomba közkedvelt modell organizmusnak számít, keveset tudunk a szénéhező tenyészetek morfológiai és fiziológiai változásairól, és a mögöttük álló szabályozó mechanizmusokról. Nem tisztázott a G-proteinek által mediált útvonalak szerepe a gomba szénéhező, autolizáló tenyészetek anyagcsere változásainak szabályozásában, és - bár gyakorlati szempontból is fontos - kevésbé feltérképezett terület az autolízis és az apoptózis regulációja és a két folyamat kapcsolata is.

Vizsgálataim középpontjában az *Aspergillus nidulans* Ascomycota fonalas gomba szénforrás éhező, öregedő tenyészetek morfológiai és fiziológiai változásai, autolitikus és apoptotikus folyamatai, és a heterotrimer G-protein függő jelátviteli útvonalaknak a fenti folyamatok szabályozásában betöltött szerepének megismerése állt.

A következő kérdésekre kerestem a választ:

1. Milyen morfológiai és fiziológiai változásokkal jellemezhető az *Aspergillus nidulans* szénforrás éhezéssel indukált autolízise? (A tenyészetek szárazanyag-tartalmának, extracelluláris kitináz és proteináz aktivitásának, ammónia

termelésének és légzésének nyomon követése, a morfológiai változások detektálása.)

2. Hogyan hat a szénforrás éhezés a tenyészetek redox folyamataira? (A peroxidok, a szuperoxid, a GSH és a GSSG mennyiségében megfigyelhető változások mérése. Antioxidáns enzimek - kataláz, CuZn- és Mn-szuperoxid diszmutáz, glutation peroxidáz, glutation reduktáz, glükóz-6-foszfát dehidrogenáz, NADP-specifikus izocitrát dehidrogenáz - specifikus aktivitásának, valamint a cián-rezisztens légzés arányának és a specifikus  $\gamma$ -glutamil transzpeptidáz aktivitások változásának vizsgálata.)
3. A sporuláció szabályozásában szerepet játszó G-protein mediált jelátviteli útvonalak mutációi milyen hatást gyakorolnak az *Aspergillus nidulans* autolízisére? (A tenyészetek szárazanyag-tartalmának, extracelluláris kitináz és proteináz aktivitásának nyomon követése.)
4. A G-protein útvonalakban defektes *Aspergillus nidulans* törzsek tenyészetek redox folyamatai mennyiben térnek el a kontroll törzseknél tapasztaltaktól? (A peroxidok, a szuperoxid, a GSH és a GSSG mennyiségében megfigyelhető változások mérése. Antioxidáns enzimek – kataláz, glutation peroxidáz, glutation reduktáz – specifikus aktivitásának, valamint a specifikus  $\gamma$ -glutamil transzpeptidáz aktivitások változásának vizsgálata.)
5. Hogyan befolyásolja az *Aspergillus nidulans* autolízisét a FluG-BrlA útvonal kulcsfontosságú génjeinek inaktiválása? (A tenyészetek szárazanyag-tartalmának, extracelluláris kitináz és proteináz aktivitásának, illetve morfológiai változásainak nyomon követése.)
6. Van-e kapcsolat az apoptotikus és autolitikus folyamatok között *Aspergillus nidulans* törzsek tenyészetekben? (Apoptotikus markerek vizsgálata nem autolizáló fenotípusú („loss-of-function” *fluG*, *ΔbrlA*) és kontroll (FGSC 26) törzsek öregedő tenyészetekben, apoptózis indukálására alkalmas szfingozin származékok hatásának nyomon követése.)

## 1.2. Irodalmi előzmények

### 1.2.1 Az *Aspergillus nidulans* mint modellszervezet

Az *Aspergillus nidulans* Eidam Wint (Syn: *Emericella nidulans* Vuill és *Sterigmatocystin nidulans* Eidam) a fonalas *Ascomycota* taxon *Plectomycetes* osztályának *Eurotiales* rendjébe tartozik (Geiser és LoBuglio, 2001). Többnyire a talajban és növényi maradványokon fordul elő, de izolálták már humán másodlagos fertőzésekből is (Fassatióva, 1984). Széles körben használják a kutatásban, mert könnyen tenyészthető és kevésbé patogén. Szexuális és paraszexuális ciklusa ismert, így genetikai vizsgálatokra is kiválóan alkalmas. Penicillin és szterigmatocisztin termelése révén felhasználható a  $\beta$ -laktám típusú antibiotikumok (Brakhage, 1998), valamint a mikotoxinok (Shimizu és Keller, 2001) képződésének tanulmányozásában, továbbá sikerrel alkalmazták emberi örökletes metabolikus betegségek, pl.: alkaptonuria, I-es típusú örökletes tyrosinaemia, molekuláris biológiai háttérének felderítésére, beleértve a felelős emberi gének azonosítását is (Fernandez-Canon és Penalva, 1995). Genomjának szekvenáltsága 100%-os és *Aspergillus nidulans* DNS chipek is a rendelkezésünkre állnak (Dunn-Coleman és Prade, 1998).

Rokonsági körébe számos a gyakorlati élet szempontjából fontos faj tartozik: az *Aspergillus niger*-t többek között glükóamiláz, glükózoxidáz, kataláz,  $\beta$ -glukonáz, citromsav és glükonsav, az *Aspergillus oryzae*-t  $\alpha$ -amiláz és proteináz, az *Aspergillus awamori*-t xylanáz, az *Aspergillus fumigatus*-t epoxiszukcinilsav, az *Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus rugulosus* és *Aspergillus sydowii* fajokat (1,3) $\beta$ -glükán-szintetáz előállítására használják. Más *Aspergillus* fajoknak a lovasztatin, különböző észterázok, glukonázok, illetve pektinázok előállításában van szerepe. Az *Aspergillus niger* és az *Aspergillus fumigatus*, bár fitopatogéneknek nem nevezhetőek, a raktározott terményekben jelentős károkat okozhatnak és a különböző *Aspergillus* fajok (pl.: *Aspergillus flavus* és *Aspergillus parasiticus*) által termelt toxinok (legismertebbek az aflatoxinok) révén az emberi egészséget is veszélyeztetik.

Egészségügyi szempontból elsősorban az *Aspergillus fumigatus* és az *Aspergillus flavus* jelentős, amelyek főleg immunszuppresszált betegekben okoznak opportunistá kórokozóként külső vagy belső aspergillost. Az *Aspergillus nidulans* vizsgálatából származó eredmények éppen ezért a biotechnológia, az egészségügy és a növényvédelem számára is értékesek lehetnek.

## 1.2.2 A G-proteinek és működésük

A guanin nukleotid kötő fehérjék családjába tartozó proteinek központi szerepet játszanak a másodlagos hírvivő molekulák kaszkád mechanizmusában. Nevüket onnan kapták, hogy működésük közben guanozin-difoszfát (GDP) disszociál le róluk és helyére guanozin-trifoszfát (GTP) kerül. A G-proteinek felfedezéséért és tanulmányozásért Alfred Gilman és Martin Rodbell 1994-ben fiziológiai és orvostudományi Nobel-díjat kapott.

A G-proteinek a GTPázok csoportjába tartoznak. GDP kötött állapotukban inaktívak, valamilyen külső szignál hatására azonban a GDP disszociál róluk, és helyére GTP kerül. A GTP-t a fehérje saját, intrinzik GTPáz aktivitása révén hasítani képes, és így újra inaktív állapotba kerül. A GTPáz aktivitást speciális fehérjék szabályozzák, egészen pontosan gyorsítják, így a G-proteinek és az általuk mediált útvonalak negatív regulátorai. A G-proteinek alapvetően két nagy csoportra oszthatóak: a heterotrimer vagy „nagy” G-proteinekre és a „kis” G-proteinekre (Gilman, 1987; Voet és munkatársai, 1995; Kandel és munkatársai, 2000; Lodish és munkatársai, 2000).

A „kis” G-proteinek vagy kis GTPázok egy alegységből állnak (monomerek), gyakran poszttranszkripció módosítás során lipid oldalláncot (prenil-csoport) kapnak. Hasonlóan a „nagy” G-proteinekhez, GTP-GDP kötő képességgel rendelkeznek. Az általuk mediált útvonalak negatív szabályozó molekuláit GAP (**G**TPase **a**ctivating **p**rotein) fehérjéknek hívjuk. Emlősökben a monomer G-proteinek kulcsfontosságú szerepet játszanak több alapvető folyamat szabályozásában, mint a sejt proliferáció, a sejt-sejt kölcsönhatások (sejt adhézió), a citoszkeleton működése és a sejtek mozgása, illetve az apoptózis. A Ras az egyik legismertebb, emlősökben és gombákban is előforduló „kis” G-protein „szupercsalád”, amelynek tagjai a Ras, a Rho és a Rab fehérje családok. A Rab fehérjék a vezikulumok mozgását irányítják az endoplazmatikus retikulum, a Golgi apparátus, a lizoszómák, az endoszómák és a sejtmembrán között. A Rho/Rac család fehérjéi a citoszkeleton és a sejtmembrán közötti kapcsolatot, míg a Ras proteinek a sejtek növekedését, proliferációját regulálják. Ezért nem meglepő, hogy a Ras család fehérjéinek mutációja igen gyakori okozója különböző daganatos elváltozásoknak (Gilman, 1987; Voet és munkatársai, 1995; Kandel és munkatársai, 2000; Lodish és munkatársai, 2000).

A heterotrimer G-proteinek három alegységből ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) épülnek fel, és egy sejt felszíni receptort kötnek össze egy effektor fehérjével. Ez lehet egy enzim (pl.: adenilát-cikláz, foszfolipáz C), ami másodlagos hírvivő molekulák képzésével továbbítja a jelet a sejt belseje

felé, vagy közvetlenül egy ioncsatorna. A receptor aktivált G-proteinek a sejtmembrán belső felszínéhez kapcsolódnak. Szintézisüket követően, a „kis” G-proteinekhez hasonlóan, a heterotrimer G-proteinek is áteshetnek különböző módosításokon, amiknek következtében mirisztil-, palmitoil- vagy prenil-csoporttal gazdagodhatnak (Gilman, 1987; Voet és munkatársai, 1995; Kandel és munkatársai, 2000; Lodish és munkatársai, 2000).

A heterotrimer G-proteinek nagyszámú úgynevezett G-protein kapcsolt receptorok (GPCR, **G**-**p**rotein **c**oupled **r**eceptor) által aktiválódhatnak, ezeken gyakran palmitát csoport található. Valamennyi eddig leírt G-protein kapcsolt receptor hét hidrofób, 20-25 aminosavból álló transzmembrán doménnel rendelkezik, amelyeket extra- és intracelluláris hurkok kötnék össze. A számos receptor klónozása során szerzett tapasztalatok alapján elmondhatjuk, hogy funkciójukat tekintve igen sokrétűek és diverzek. A kisméretű ligandok rendszerint a membránban található aminosav maradékokhoz kapcsolódnak, míg a nagy polipeptidek és proteinek a receptor extracelluláris doménjéhez, amely a polipeptid és protein ligandokat kötő receptorok esetében nagyobb méretű. Általában a receptor karboxi-terminálisához legközelebb eső, harmadik citoplazmatikus hurkon található aminosav maradék lép kölcsönhatásba a G-proteinnel (Gilman, 1987; Voet és munkatársai, 1995; Kandel és munkatársai, 2000; Lodish és munkatársai, 2000).

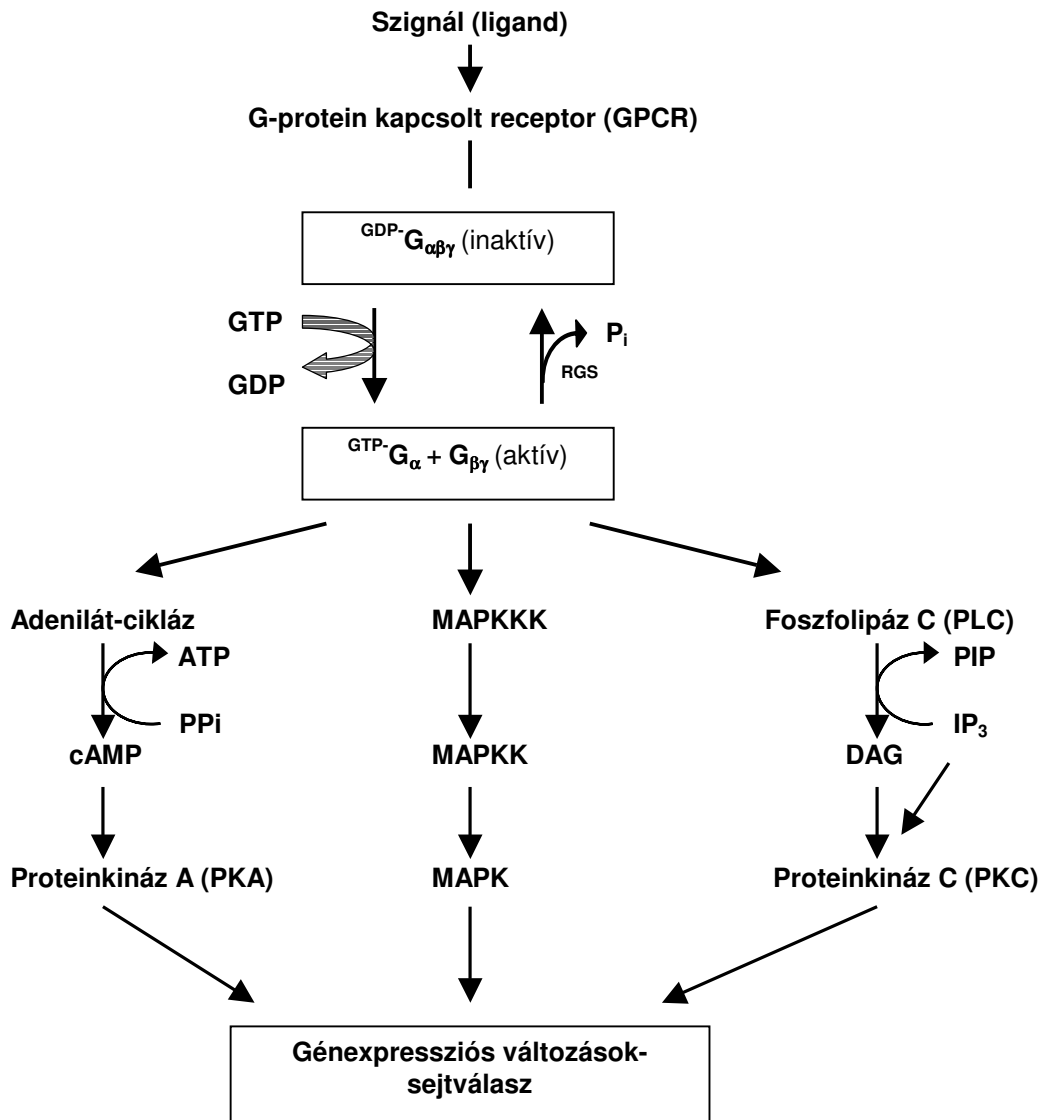
Ha egy ligand aktiválja a GPCR-t, a G-protein a receptor konformáció változásának hatására kölcsönhatásba lép azzal. Az  $\alpha$ -alegységről távozik a GDP, majd ezt követően GTP kötődik hozzá. A GTP kapcsolódása után az  $\alpha$ -alegység leválik a heterotrimer másik két tagjáról és aktiválja az effektor fehérjét. Egy jól ismert G-protein aktivált jelátviteli út a cAMP (ciklikus **a**denuzin-**m**onofoszfát) útvonal. A GTP kötött  $G_{\alpha s}$ -alegység indukálja az adenilát-cikláz, és rajta keresztül a cAMP szintézist. A másodlagos hírvivő ezután különböző fehérjékre (pl.: cAMP-függő proteinkináz (**p**rotein**k**ináz **A**, PKA)) hatva továbbítja a szignált a sejtbe (1. ábra). Ezek után az  $\alpha$ -alegység intrinszik GTPáz aktivitása révén hasítja a GTP-t, és a pirofoszfát csoport távozása után a GDP-t kötő alegység újra kapcsolódik a  $\beta$ - és  $\gamma$ -alegységekhez, megszüntetve ezzel az effektor molekulák aktivációját (1. ábra). A  $\beta$ - és a  $\gamma$ -alegység ez idő alatt nem válik el egymástól, de az  $\alpha$ -alegység távozása után a  $G_{\beta\gamma}$  komplex maga is képes szignalizációs útvonalak aktiválására, másodlagos hírvivő molekulák felszabadulásának vagy ioncsatornák áteresztő képességének szabályozása révén (1. ábra). A hisztamin receptorhoz kötött  $G_{\beta\gamma}$  komplex például foszfolipáz  $A_2$  aktiválása által továbbítja a szignált, míg muszkarinos acetilkolin receptorokhoz kapcsolt formája közvetlenül G-protein

kapcsolt befelé egyenirányító kálium-csatornákat (GIRK) nyit (1. ábra) (Gilman, 1987; Voet és munkatársai, 1995; Kandel és munkatársai, 2000; Lodish és munkatársai, 2000).

A  $G\alpha$ -alegységek két doménből állnak: egy GTPáz és egy alfa helikális doménből. Legalább húsz különböző  $G\alpha$ -alegység létezik az emlős sejtekben, amelyeket a következő fő családokba sorolhatunk:

1.  $G_{\alpha s}$ -(stimulatórikus) alegységek – növelik az adenilát-cikláz aktivitást és ezen keresztül a cAMP szintézist.
2.  $G_{\alpha i}$ -(inhibítórikus) alegységek – gátolják az adenilát-cikláz aktivitást.
3.  $G_{\alpha olf}$ -(olfatórikus) alegységek – olfatórikus receptorokhoz kapcsolódnak.
4.  $G_r$ -(transzducin) alegységek – a vizuális szignálok továbbítása a retinában.
5.  $G_q$ -alegységek – növelik a foszfolipáz C aktivitását.
6.  $G_{12/13}$ -alegység család – tagjai fontos szerepet játszanak a citoszkeleton, a sejt-sejt kapcsolatok és más sejt mozgással összefüggésbe hozható folyamatok szabályozásában.

A „nagy” G-proteinek esetében a GTPáz aktivitás indukálását úgynevezett RGS (regulator of G-protein signaling) fehérjék végzik, így az RGS proteinek a heterotrimer G-proteinek által közvetített útvonalak szabályozói.



1. ábra A főbb, G-proteinek által mediált jelátviteli útvonalak (Yu, 2006).

### 1.2.3 Heterotrimer G-proteinek és szerepük *Aspergillus nidulans* fonalas gombában

Az *Aspergillus nidulans* genomjában eddig tizenhat, feltételezhetően G-protein kapcsolt receptort (**G**-**p**rotein **c**oupled **r**eceptor, GPCR) kódoló gént (*gprA-P*, *nopA*) azonosítottak (3. ábra) (Han és munkatársai, 2004a, b; Seo és munkatársai, 2004; Lafon és munkatársai, 2006). A receptorokat nagymértékben konzervált hét transzmembrán régiójuk alapján sikerült megtalálni. Jelenleg kilenc osztályba sorolják a GPCR-eket: az első és második csoportba a GprA és GprB fehérjék tartoznak, amelyek az élesztők feromon receptorához hasonló szerkezetűek, és *Aspergillus nidulans*-ban az önmegtermékenyítésben

vesznek részt (Soe és munkatársai, 2004). A harmadik osztályba a GprC, D és E fehérjéket sorolják, ezek feltételezhetően a szénforrás függő szabályozási folyamatokban működnek közre, mivel nagy homológiát mutatnak a *Saccharomyces cerevisiae* Gpr1 receptorával (Kraakman és munkatársai, 1999). A GprF és GprG receptorok alkotják a negyedik csoportot, amelyek a *Schizosaccharomyces pombe* Stm1 receptorával mutatnak hasonlóságot (Chung és munkatársai, 2001). A feltételezhetően cAMP érzékelésében szerepet játszó receptorokból (GprH, I) áll az ötödik csoport (Galagan és munkatársai, 2003). Lafon és munkatársai *Aspergillus* fajok genomjának összehasonlító elemzése révén arra a következtetésre jutottak, hogy valószínűleg további hét G-protein kapcsolt receptor található az *Aspergillus nidulans*-ban, ezeket a fehérjéket a következő módon osztályozták: GprJ (IV. csoport), GprK (VI. csoport), GprM, N (VII. csoport), GprO és P (VIII. csoport) és NopA (IX. csoport) (Lafon és munkatársai, 2006). A nagyszámú receptor molekula ellenére nem ismert, hogy az ezen GPCR-ek által érzékelt szignál mely G-proteinek továbbítják a sejt belsejébe.

Jelenlegi ismereteink szerint három G-protein  $\alpha$ -alegységet kódoló gén található *Aspergillus nidulans*-ban: *fadA*, *ganA* és *ganB* (3. ábra) (Lee és Adams, 1994; Yu és munkatársai, 1996a; Chang és munkatársai, 2004; Han és munkatársai, 2004b; Lafon és munkatársai, 2005).

A FadA (**f**luffy **a**utolytic **d**ominant **A**) G $\alpha$ -alegység volt az első, amelyet sikerült azonosítani a gomba genomjában, egy domináns aktiváló mutáció (d+:G42R) vizsgálata révén, amely kontrollálatlan légmicélium képzést („fluffy” fenotípus) és autolízist eredményezett (Yu és munkatársai, 1996a). A folyamatosan aktív FadA GTPáz aktivitása feltételezhetően csökkent, vagy hiányzik. A hasonló FadA<sup>d+</sup> mutáns aléllel rendelkező törzsek közös jellemzője a „fluffy” fenotípus és a szterigmatocisztin (ST) mikotoxin termelésének hiánya (Yu és munkatársai, 1996a; Wieser és munkatársai, 1997; Yu és munkatársai, 1999). Ezzel szemben a domináns interferáló (d-) FadA<sup>G203R</sup> mutáció – a GTP –t kötött FadA G $\alpha$ -alegység nem válik le a G $\beta\gamma$ -alegységről – hatása csökkent vegetatív növekedésben, hiperaktív aszexuális sporulációban és korai szterigmatocisztin (ST) termelésben nyilvánul meg (Yu és munkatársai, 1996a). Ezek alapján a FadA elsődleges szerepe a növekedési szignál fenntartása, amelyet proteinkináz A/cAMP másodlagos hírvivő útvonal segítségével végez, illetve a *brlA* (az aszexuális sporuláció egyik központi transzkripciós faktorának génje) és az *aflR* (a szterigmatocisztin termelés specifikus transzkripciós faktorának génje) gének repressziója révén a konidiogenezis és a ST termelés gátlása (2. ábra). Bár szekvenciája a

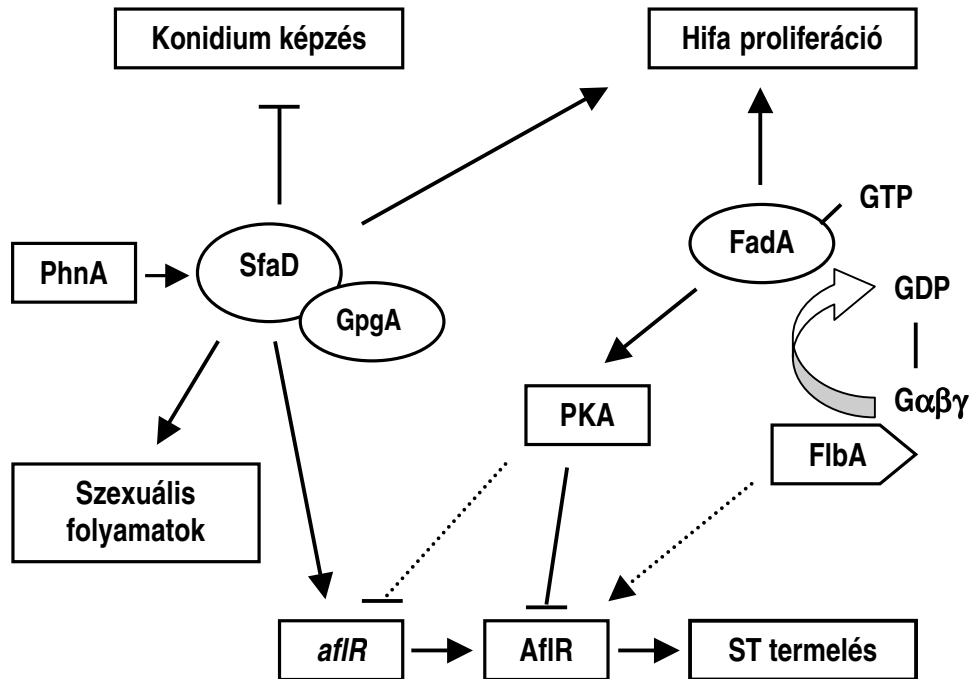
humán inhibitorikus  $\alpha$ -alegységek szekvenciájával mutat homológiát, úgy tűnik, hogy *Aspergillus nidulans*-ban stimulatórikus funkcióval rendelkezik (Yu és munkatársai, 1996a).

A másik két  $G\alpha$ -alegységet heterológ hibridizáció és degenerált primerekkel történő PCR segítségével sikerült azonosítani. A *ganA* pontos szerepét egyelőre nem ismerjük, de a *ganB* gén funkciója viszonylag jól körvonalazható: a konidiumok és az aszkospórák csírázásának szénforrás függő szabályozása, a hő és oxidatív stresszre adott válaszok illetve a pigment termelés indukálása, a konidiogenezis és a ST termelés gátlása (Chang és munkatársai, 2004). A *ganB* allél deléciója vagy domináns interferáló mutációja (G207) süllyesztett kultúrákban is megjelenő konidiofór képzéshez vezet. Folyamatosan aktív formája (Q208L, R182L) csökkent hifa növekedést és az aszexuális ciklus számos zavarát eredményezi. Míg a „loss-of-function” vagy a domináns negatív GanB mutáns törzsek gyengébb csírázási képességgel bírnak, addig a GanB<sup>Q208L</sup> mutánsok korai és szénforrás hiányában is bekövetkező csírázást mutatnak (Chang és munkatársai, 2004). A GanB és a cAMP szignalizációs utak szénforrás érzékelésben betöltött szerepét Lafon és munkatársai (2005) vizsgálták részletesen: a GanB a csírázás korai szakaszában egy gyors és tranzienst cAMP szintézist indukál. Tehát a GanB útvonal által a konidiumok csírázására és a stresszválaszra kifejtett hatásai feltételezhetően a cAMP/PKA, esetleg mitogén aktivált proteinkináz (MAPK) útvonalon keresztül mediálódnak (6. ábra).

*Aspergillus nidulans*-ban, a rendelkezésünkre álló információk alapján, csak egy  $G\beta$ -alegység található, amelyet az *sfaD* gén kódol (2., 3. ábra). Az SfaD fehérje 352 aminosavból épül fel, rendelkezik egy konzervált Trp-Asp régióval (WD-40 motívum) és szekvenciája 60%-ban azonos az emlős  $G\beta$ -alegységekével (Rosén és munkatársai, 1999). Az *sfaD* gén hiányában hipersporuláció és erősen redukált hifa növekedés figyelhető meg, ami arra utal, hogy az SfaD által közvetített jel nélkülözhetetlen a megfelelő növekedés fenntartásához és az aszexuális spóráképzés gátlásához (Rosén és munkatársai, 1999). Érdekes módon azonban az *sfaD* deléciója önmagában nem elegendő a FadA<sup>dt</sup> mutációk (R178 és Q204L) miatt kialakuló kontrollálatlan hifa növekedés gátlásához. Ebből arra lehet következtetni, hogy elsősorban a FadA felelős a hifa proliferáció szabályozásáért (Seo és munkatársai, 2005). Fontos szerep jut továbbá az SfaD számára a szexuális ciklus – elengedhetetlen a termőtest képzés szempontjából – és a ST szintézise során (Rosén és munkatársai, 1999; Seo és Yu, 2006). Hatását feltehetőleg a  $G\alpha$ -alegységektől függetlenül fejt ki.

Az *Aspergillus nidulans* gemonjának analízise során Seo és munkatársai (2005) egy olyan gént találtak (*gpgA*), ami feltételezhetően  $G\gamma$ -alegységet kódol (2., 3., 6. ábra). A GpgA

90 aminosavból áll, amelyek szekvenciája 72%-ban az élesztő Ste18p-nel. N-terminális régiójában egy úgynevezett „tekercselt-tekercs” (coiled-coil) doménnel rendelkezik, amely a G $\gamma$ - és a hozzátartozó G $\beta$ -alegység összekapcsolásához nélkülözhetetlen (Seo és munkatársai, 2005). A *gpgA* null mutáns törzsek korlátozott növekedés mellett csökkent (késleltetett) konidium képzést mutatnak, továbbá hasonlóan a *ΔsfaD* mutációhoz a *gpgA* deléciónja is a kleisztotécium képzés elmaradásához és a szexuális folyamatokban bekövetkező komoly károsodásokhoz vezet. Ezekből a megfigyelésekből Seo és munkatársai (2005) azt a következtetést vonták le, hogy az SfaD:GpgA heterodimer az *Aspergillus nidulans* szexuális ciklusának elsődleges regulátora, de ezen túlmenően az aszexuális konidiumok képzéséhez is elengedhetetlen. Mindezek mellett a GpgA G $\gamma$ -alegység a vegetatív növekedés fenntartásához és a ST mikotoxin szintézis szabályozásában is nélkülözhetetlen (Seo és Yu, 2006). Az SfaD/GpgA heterodimer a ST szintézis szabályozását egy Zn(II)<sub>2</sub>Cys<sub>6</sub> DNS kötő domént tartalmazó, Gla4-típusú transzkripció faktoron keresztül végzi (Brown és munkatársai, 1996; Yu és munkatársai, 1996b), amelynek overexpressziója, *alcA*(p) indukálható promóter irányítása alatt, SfaD fehérje hiányában is képes helyre állítani a ST szintézis zavarait. A G $\beta\gamma$  dimer mindezt feltételezhetően, mint az *aflR* gén transzkripció szintű aktivátora teszi (Seo és Yu, 2006). Mindezek alapján elmondhatjuk, hogy egy-egy G-protein útvonalnak az egyes elemei eltérő, sőt ellentétes módon hathatnak a ST termelésre (2. ábra).



2. ábra A FadA, SfaD, GpgA és PhnA fehérjék szerepe a növekedés, a szexuális ciklus és a ST szintézis szabályozásában (Yu, 2006).

A G-proteinek által közvetített jelátviteli útvonalak mind negatív, mind pozitív regulátor fehérjékkel rendelkeznek:

A foszducinok vagy foszducin-szerű proteinek (**ph**osducin-**l**ike **p**roteins, PhLPs) a G $\beta\gamma$  jelközvetítő egység evolúciósan konzervált pozitív regulátorainak egy csoportját képezik. Egyfajta molekuláris chaperon (dajka) funkciót látnak el a G $\beta\gamma$ -alegység összeszerelése során és nélkülözhetetlenek a G $\beta$ - és a G $\gamma$ -alegységek megfelelő szintjének megtartásához (Kasahara és munkatársai, 2000; Lukov és munkatársai, 2005; Knol és munkatársai, 2005). Az *Aspergillus nidulans* genetikai állománya három potenciális PhLPs-t tartalmaz (PhnA, PhnB és PhnC; 3. ábra) (Seo és Yu, 2006). PhnA egy a gombákban bizonyítottan előforduló G $\beta\gamma$ -alegység aktivátorhoz (Bdm-1) (Kasahara és munkatársai, 2000) igen hasonló protein, és génje érdekes módon a VIII. kromoszómán az *sfaD* génnel szorosan kapcsolva helyezkedik el. A *phnA* deléziós mutánsok a  $\Delta$ *sfaD* törzsekkel majdnem azonos (csökkent biomassza képzés, hiperaktív konidium képzés), míg a  $\Delta$ *gpgA* mutánsoktól eltérő megjelenésűek (Seo és Yu, 2006). Ebből arra lehet következtetni, hogy a PhnA nélkülözhetetlen az SfaD megfelelő működéséhez és az is lehetséges, hogy az SfaD és a GpgA fehérjék eltérő módon továbbítják a jelet a sejt belsejébe (2. ábra) (Seo és munkatársai, 2005). A  $\Delta$ *phnA* mutánsok szexuális

reprodukciója, kleisztotécium képzése súlyos zavart szenved (Han és munkatársai, 2001; Seo és Yu, 2006), emellett a PhnA jelenléte a ST szintézise szempontjából is elengedhetetlen (Seo és Yu, 2006) (2. ábra).

A G-protein mediált jelátviteli utak negatív regulátorai az úgynevezett RGS (**r**egulator of **G**-protein **s**ignaling) fehérjék, amelyek ~130 aminosavból álló konzervált úgynevezett RGS régióval rendelkeznek, ami a GTP-G $\alpha$ -alegység intrinszik GTPáz aktivitását képes növelni, és így a szignalizációt megszakítani (3. ábra) (Chidiac és Roy, 2003; McCudden és munkatársai, 2005). A különböző RGS fehérjék aktivitása révén a sejtek képesek a beérkező jelek egyfajta finom hangolására és a megfelelő sejtválasz kialakítására. Az RGS fehérjék kulcsfontosságú szerepet játszanak a fonalas gombák alapvető biológiai folyamatainak - mint a vegetatív növekedés, a sporuláció, a mikotoxin/pigment termelés, a patogenitás és a szexuális ciklus egyes elemeinek - regulálásában. Eddigi ismereteink szerint öt eltérő RGS protein található az *Aspergillus nidulans*-ban:

Az elsőként azonosított RGS fehérje az FlbA volt, amelyet egy „fluffy”-autolizáló fenotípusú mutáns törzs tanulmányozása során fedeztek fel (Lee és Adams, 1994a). Az FlbA egy RGS és két DEP (**d**ishevelled, **E**gl-10, **p**leckstrin) domént tartalmaz. A DEP domén *Saccharomyces cerevisiae*-ben „target” szekvenciaként szerepet játszhat az RGS fehérjéknek a Golgi-ba és a sejtmembránba történő transzportjában, és egy stresszválasz elemet (**s**tressz **r**esponse **e**lement, STRE) tartalmazó géncsoport indukciójában (Burchett és munkatársai, 2000). Az FlbA/FadA pár volt az első *Aspergillus nidulans*-ban azonosított RGS-G $\alpha$  egység. Ez a fehérje páros felel a hifa proliferáció és a ST szintézisének szabályozásáért (Yu és munkatársai, 1996a; Hicks és munkatársai, 1997; Yu és Keller, 2005) (2., 3. ábra). Ahogyan azt már említettem a FadA, az SfaD és a GpgA által képzett heterotrimer, részben proteinkináz A-n keresztül, stimulálja a gomba vegetatív növekedését, az FlbA pedig a FadA fehérje által közvetített jelutat kontrollálja a G $\alpha$ -alegység saját GTPáz aktivitásának fokozása által (Yu és munkatársai, 1996a; 1999; Rosén és munkatársai, 1999; Shimizu és Keller, 2001). FlbA aktivitása a növekedésből a sporulációra történő áttéréshez szükséges. Ha az *flbA* elveszíti működő képességét az a FadA<sup>d+</sup> mutáns allélhez hasonlóan „fluffy” fenotípust eredményez (Lee és Adams, 1994b; Yu és munkatársai, 1996a; Weiser és munkatársai, 1997).

Az RgsA fehérje RGS doménje a protein N-terminalis végen helyezkedik el (Han és munkatársai, 2004b). 28%-ban azonos és 43%-ban hasonló a *Saccharomyces cerevisiae* Rgs2p fehérjéjéhez (Versele és munkatársai, 1999). Ellentétben az *flbA* génnel, ami folyamatosan expresszálódik (Lee és Adams, 1994a), az *rgsA* mRNS (~2.0 kb)

transzkripciója a korai növekedési fázisban meglehetősen magas, az aszexuális és szexuális folyamatok alatt relatíve alacsony, míg az askospórákban ismét magas szintet ér el, ami azt mutatja, hogy az *rgsA* expresszója komplex transzkripciós szintű szabályozás alatt áll. Han és munkatársai (2004b) szerint az RgsA egy olyan RGS fehérje, ami a stresszválasz aktivátora és az aszexuális sporuláció gátlójaként ismert GanB útvonal specifikus negatív szabályozója. Az ismert *Aspergillus nidulans*  $G\alpha$ -alegységek közül csak *ganB* deléciója által okozott morfológiai, fiziológiai és anyagcserebeli változásokat lehet elnyomni (kioltani) az *rgsA* gén „kiütésével”. Az *rgsA* deléciójának hatására csökkent telep átmérő, szénforrás hiányában is meginduló csírázás és sötét barna pigment akkumuláció figyelhető meg (Chang és munkatársai, 2004). Az *rgsA* gén overexpressziója süllyesztett kultúrában is kialakuló konidiofórokat eredményez (Chang munkatársai, 2004). Lafon és munkatársai (2005) megfigyelései szerint az RgsA a cAMP/PKA útvonal és a csírázás regulálásában a GanB jel attenuálása által vesz részt. Fontos megjegyezni, hogy az RgsA azonosítása és jellemzése során fény derült egy a stresszválaszok ellen irányuló regulációs mechanizmusra: *rgsA* deléciója fokozott pigment termelést (mind a hifákban mind a konidiumokban) és oxidatív stressz, illetve hő toleranciát eredményez (Han és munkatársai, 2004b) (6. ábra). Tehát az RgsA fehérje a GanB útvonal már említett, stresszválasz indukáló hatását kontrollálja/gátolja akkor, ha nincs szükség erre a potenciálisan energia igényes folyamatra. Érdeemes megemlíteni, hogy ez a fajta szabályozási modell ellentétes az élesztőkben megfigyelttel: *Saccharomyces cerevisiae*-ben Rgs2p hiányában megnő a hőstresszel szembeni érzékenység, míg overexpressziója esetén szignifikánsan emelkedik a hőtűrés (Versele és munkatársai, 1999), továbbá a PKA aktivitás gátolja az általános stresszválaszt és a glikogén akkumulációját (Smith és munkatársai, 1998). Fontos azonban hangsúlyoznunk, hogy két különböző gombában egyazon mechanizmus alkalmazása a szignál transzdukcióban nem feltétlenül jár azonos fiziológiai hatással.

A fentiekén kívül további három RGS-ről tudunk (RgsB, RgsC and GprK) (3. ábra), ám mivel ezek jellemzése jelenleg is folyik, pontos funkciójukról csak kevés információ áll rendelkezésünkre:

Az RgsB igen hasonlít a Rax1 proteinhoz, ami az élesztők bipoláris sarjadzásában játszik szerepet, és feltételezhetően egy a C-terminális végen három transzmembrán doménnel rendelkező fehérje (Lafuente és Gancedo, 1999). Az *rgsB* gén egy 2,5 kb méretű transzkriptummal rendelkezik, ami a gomba egész életciklusa során viszonylag folyamatosan jelen van (Han és munkatársai, 2004b). Ellentétben az FlbA és RgsC proteinekkal, mind az

RgsA mind az RgsB-típusú RGS fehérjék kifejezetten a gombákra jellemzőek és kétségtelenül nincs emlősökben is előforduló párjuk.

Az RgsC a fehérje középső részén egy RGS doménnel, az N-terminális végén egy PXA, a C-terminális végén pedig egy PX doménnel rendelkezik. A PX doménnek egyfajta fehérje szortírozó szerepe lehet: a proteinek foszfoinozitol csoporthoz kapcsolva érik el a számukra megfelelő helyet (Sato és munkatársai, 2001). Az RgsC típusú gomba RGS fehérjék az emlős F alcsaládba tartozó RGS proteinekkel mutatnak hasonlóságot. Han és munkatársai szerint (2004b) RgsC a heterotrimer G-protein szignalizációban, a hifa növekedésben, a sejtmag elhelyezkedésének és az organellumuk transzportjának (vezikuláris trafficking) regulálásában játszik szerepet. Az *rgsC* gén egy 4.7 kb hosszúságú terméket kódol, az *rgsC* mRNS szintje az aszexuális szaporodás során magas (Han és munkatársai, 2004b).

GprK egyedülálló abból a szempontból, hogy 7-TM és RGS domént egyaránt tartalmaz (Lafon és munkatársai, 2006). Az *Arabidopsis thaliana* RGS proteinjével mutat hasonlóságot (AtRGS1), ami a Gpa1 G $\alpha$ -alegység negatív regulátora és az *Arabidopsis*-ban a sejt proliferációt irányítja (Chen és munkatársai, 2003).

| G-protein kapcsolt receptorok (GPCR) | Heterotrimer alegységek              | Ismert effektor molekulák         |
|--------------------------------------|--------------------------------------|-----------------------------------|
| GprA<br>GprB                         | G $\alpha$ :<br>FadA<br>GanA<br>GanB | Adenilát-cikláz                   |
| GprC<br>GprD<br>GprE                 | G $\beta$ : SfaD                     | Proteinkináz A                    |
|                                      | G $\gamma$ : GpgA                    |                                   |
| GprF<br>GprG<br>GprJ                 | Heterotrimer alegységek regulátorai  | MAP-kinázok ?                     |
|                                      | PhLP: PhnA<br>PhnB<br>PhnC           |                                   |
| GprH<br>GprI                         | RGS: FlbA<br>RgsA<br>RgsB<br>RgsC    | MpkA<br>MpkB<br>MpkC<br>HogA=SakA |
| GprK<br>+5 járulékos GPCR            |                                      |                                   |

3. ábra *Aspergillus nidulans* heterotrimer G-proteinek által mediált jelátviteli útvonalainak alapvető elemei (Yu, 2006).

#### 1.2.4 Az *Aspergillus nidulans* aszexualis sporulációjának szabályozása

A vegetatív növekedési fázis magába foglalja a konidiumok csírázását és az egymással kapcsolatban lévő differenciálatlan hifák hálózatából létrejövő micélium kialakulását. A növekedési periódust követően, megfelelő körülmények között, a hifák egyes sejtjei felhagynak a növekedéssel és bonyolult, soksejtes struktúrákat hoznak létre, amelyekről láncszerűen konidiumok fűződnek le. Ezeket a képleteket hívjuk konidiofóroknak (4. ábra). Az utóbbi néhány évtizedben, a G-proteinek mellett, igen sok olyan gént azonosítottak, amelyek közvetlenül vagy közvetve, de részt vesznek az *Aspergillus nidulans* sporulációjának szabályozásában (Adams és munkatársai, 1998; Lengeler és munkatársai, 2000; Rosén és munkatársai, 1999; Shimizu és Keller, 2001; Chang és munkatársai, 2004; Chang és munkatársai, 2004; Han és munkatársai, 2004; Lafon és munkatársai, 2005; Seo és munkatársai, 2006b). A *blrA*, az *abaA* és a *wetA* gének egymást követő expressziója egy központi szabályozási útvonalat alkot, ami a vegetatív növekedésről az aszexualis sporulációra való áttéréshez szükséges (5. ábra).

A *blrA* gén egy Cys<sub>2</sub>-His<sub>2</sub> „zinc finger” típusú DNS kötő fehérjét kódol, ami az *abaA* és a *wetA* gének transzkripció szintű aktivátora és a konidium képzés során a vezikula kialakulása körül indukálódik. Az *abaA*, *wetA* gének, illetve a hidrofobin kódoló *rodA*, valamint egy a konidiumok színének kialakulásáért felelős *yA* gén BRE (***blrA*** ***r***espons ***e***lements) kötőhelyeket tartalmaznak. A BrlA hiányában elmarad a fent említett gének expressziója és emiatt a sporuláció is, és úgynevezett „bristle” fenotípus alakul ki, ami annak köszönhető, hogy a konidiumtartó nyél végén elmarad a vezikula képzés, és a nyél a normális hosszának 20-30 szorosára nő meg. A *blrA* gén, azaz a központi útvonal aktiválása legalább hat regulátor géntől függ: *fluG*, *flbB*, *flbC*, *flbD*, *flbE* és az *sfgA* (5. ábra). Ezen gének bármelyikének hiánya „fluffy” fenotípust eredményez (Adams és munkatársai, 1988; 1998).

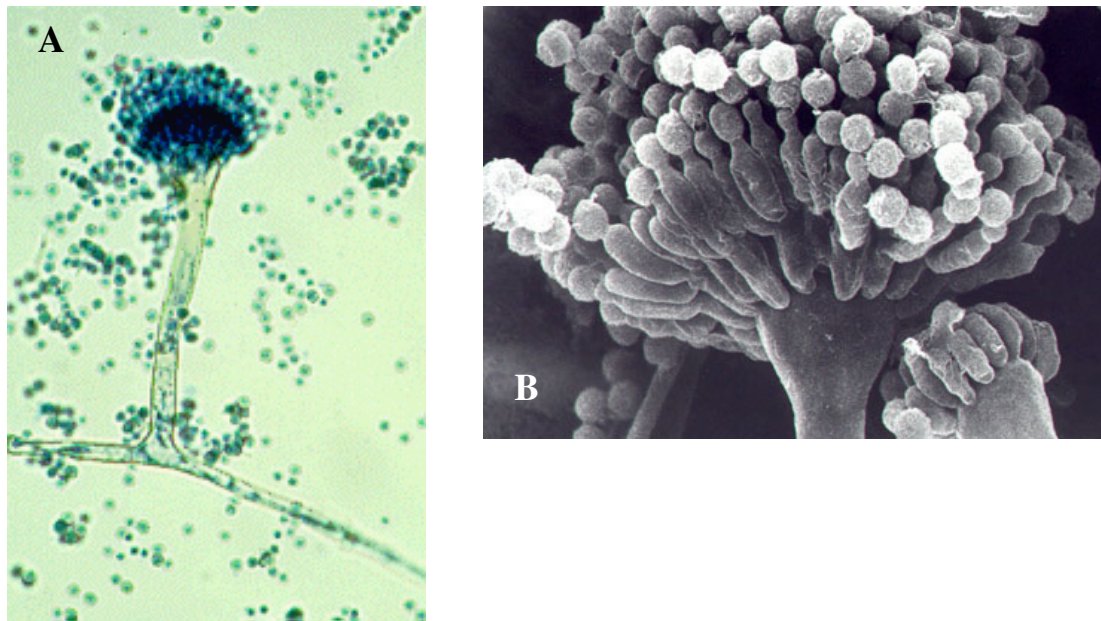
Az *abaA* („abacus”) egy ATTS/TEA DNS kötő motívummal rendelkező transzkripció faktor. Működése nélkülözhetetlen a konidiofórok képződéséhez, a fialid sejtek differenciálódásához és funkciójuknak megtartásához. (Aramayo és Timberlake, 1993; Andrianopoulos és Timberlake, 1994) (5. ábra). „Loss-of-function” mutációja a fialid képzés hiányát és ismétlődő metula sejt képződést eredményez. Az így keletkező metulák friss tápközegbe kerülve képesek vegetatív hifákká alakulni (Andrianopoulos és Timberlake, 1994). Az *abaA* gén overexpressziója önmagában nem elegendő a sporuláció indukálásához (Aramayo és Timberlake, 1993; Andrianopoulos és Timberlake, 1994).

A *wetA* gén termékének funkció vesztése hasonló eredménnyel jár, mint az *abaA*-é: abnormális morfológiájú és funkcióját betölteni képtelen, éretlen konidiofórok képződnek, amiken „wet-white” típusú pigmentálatlan, éretlen spórák jönnek létre. A *wetA* gén egy 60 kDa méretű, szerinben, treoninban és prolinban gazdag fehérjét kódol. Magában a *wetA* túltermelése sem képes a sporuláció indukálására, viszont gátolja a hifák vegetatív növekedését (Marshall és Timberlake, 1991).

Az FluGp egy kisméretű, diffúzibilis, az extracelluláris térbe ürülő, eddig még nem azonosított molekula (ECF) szintéziséhez szükséges. Ezt a feltételezést az a tény látszik igazolni, hogy az egyébként nem spórázó *fluG* mutánsok, vad típusú törzs telepei mellett fejlődve konidiumot képeznek (Lee és Adams, 1994b). Az ECF egy receptorhoz kötődve - az *flbB-D* géneken keresztül - a *brlA*-t aktiválja (5. ábra). A *fluG* deléciója „fluffy” fenotípust eredményez. Ezen mutánsokban a *brlA* gén átírása, és a sporuláció, illetve a ST termelés sem figyelhető meg. A FluG fehérje C-terminális felén egy glutamin szintetáz I (GSI)-szerű domén helyezkedik el (Lee és Adams, 1994b). A *fluG* egész C-terminalis felének overexpressziója konidiofór képzést indukál sülyesztett tenyészetekben, ahol egyébként az aszexuális folyamatok gátoltak (Lee és Adams, 1996; D’Souza és munkatársai, 2001). A FluG aktivitásának következményeit összefoglalva azt lehet mondani, hogy az aszexuális szaporodást szabályozó kaszkádot aktivál, illetve az FlbA/FadA G-protein jelátviteli útvonal RGS tagjának (FlbA) (közvetve SfgA-n keresztül) pozitív modulátora, így a vegetatív növekedési szignál inaktíválója (5. ábra). Itt érdemes kitérni arra, hogy a *fadA*, az *sfaD* és a *gpgA* gének deléciója esetén sem válik nélkülözhetővé a FluG az aszexuális ciklus során. Mivel a FluGp az egész életciklus alatt folyamatosan termelődik valószínűleg poszttranszkripcionálisan szabályozott.

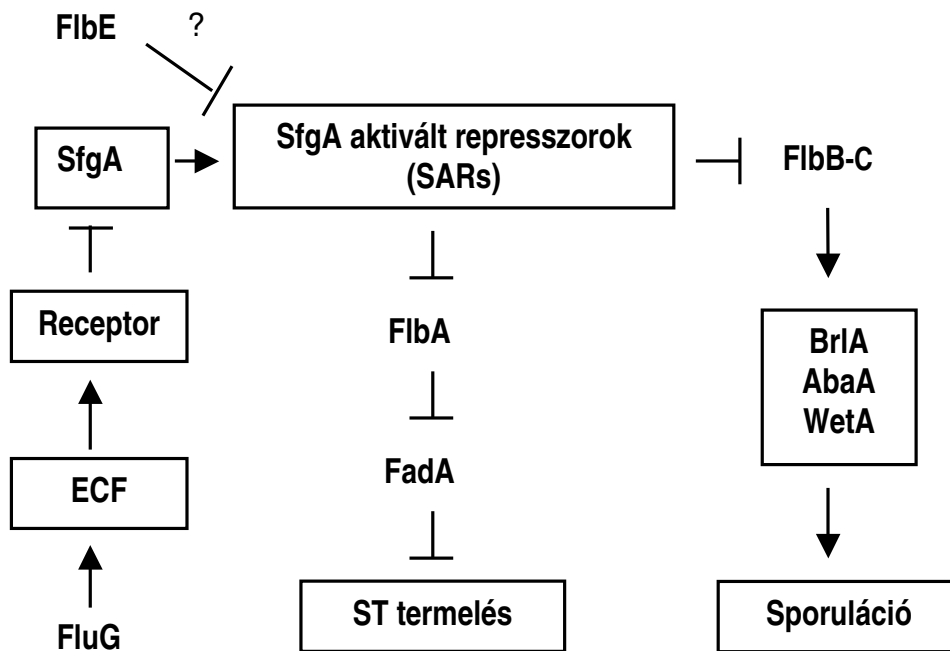
A FluG működésének jobb megismerése érdekében olyan mutációkat (supressor of *fluG*, *sfg*) kerestek, amelyek feleslegessé teszik a *fluG* gén jelenlétét, illetve működését a konidium képzés és a ST szintézis szempontjából (Seo és munkatársai, 2003). Negyven különböző *sfg* gént érintő mutációt sikerült azonosítani. Az *sfgA* gén kulcsfontosságúnak bizonyult, annál is inkább, mivel a 40 mutációból 31 ezt a gént érintette. *SfgA* egy 601 aminosavból álló fehérjét kódol, aminek N-terminalis végén egy igen konzervatív Gal4 típusú „Zn(II)2Cys6” DNS kötő motívum található, ami arra enged következtetni, hogy *SfgA* egy transzkripciós faktor lehet (Seo és munkatársai, 2006). A gén transzkripciója során képződő mRNS nagy mennyiségben akkumulálódik a vegetatív növekedés során, majd expressziójának szintje folyamatosan csökken az aszexuális és szexuális folyamatok alatt. Az *sfgA* gén átírása valószínűleg transzkripciós szintű szabályozás mellett folyik. Az *sfgA* hiánya

teljesen feleslegessé teszi a *fluG* jelenlétét, illetve működését az aszexuális sporuláció és a ST termelés szabályozásában, míg overexpresszója gátolja ezt a két folyamatot. Úgy tűnik, hogy a konidiogenezis elindításához az SfgA gátló hatásának megszűnésére van szükség *Aspergillus nidulans*-ban. A FluG elsődleges szerepe az lehet, hogy az SfgA intracelluláris repressziós hatását feloldja (5. ábra).



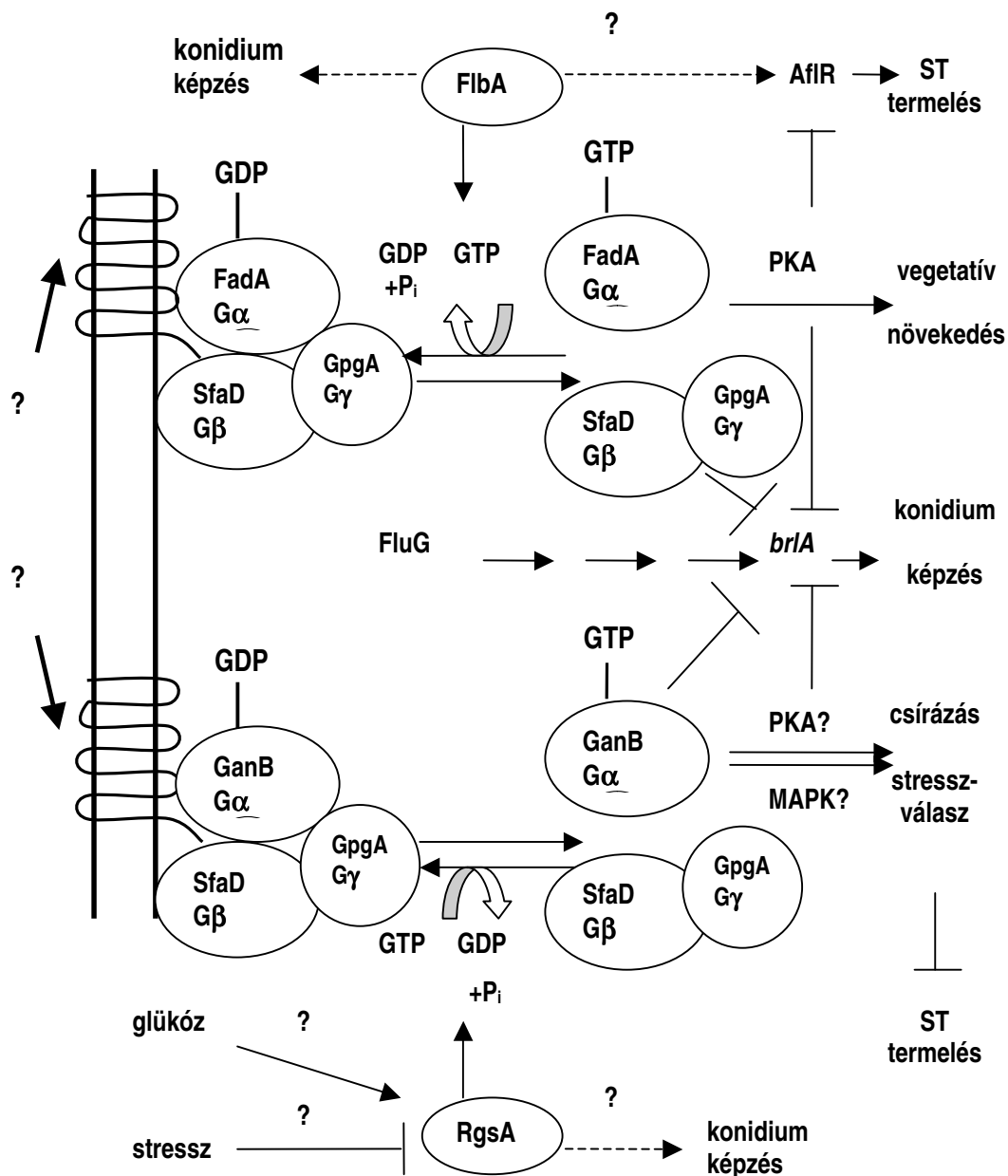
4. ábra Konidiumok és konidiofórok *Aspergillus nidulans*-ban. (A: <http://www.mycology.adelaide.edu.au/images/nidulans2.gif>; B: <http://www.mycology.adelaide.edu.au/images/nidulans2.gif>)

Az *flbB*, *flbC* és *flbD* gének szekvenciájuk alapján feltehetőleg transzkripciósfaktorokat kódolnak, míg az *flbE* nem mutat hasonlóságot egyetlen más regulátor fehérjével sem. Hiánymutánsaik „fluffy” fenotípust és korlátozott sporulációs képességet mutatnak. Pontos szerepük nem ismert, de valószínűleg közvetett módon a *brlA* gén működését szabályozzák. Kettős mutánsokkal kivitelezett vizsgálatok alapján arra a következtetésre jutottak, hogy az *flbB*, *flbD*, *flbC* gének az *sfgA*-t követve, az *flbE* viszont azt megelőzve vagy azzal egy szinten vesz részt a sporuláció és a növekedés szabályozásában (5. ábra) (Seo és munkatársai, 2006).



5. ábra *FluG*, a *brlA*, illetve az *flb* gének szerepe az *Aspergillus nidulans* sporulációjában (Seo és munkatársai, 2006).

A sporuláció szabályozásában a fent vázolt útvonal mellett, de ahhoz szorosan kapcsolódva szerepe van G-protein mediált útvonalaknak is (Lee és munkatársai, 1994; Yu és munkatársai, 1996a; Wieser és munkatársai, 1997; Adams és munkatársai, 1998; Yu és munkatársai, 1999; Rosén és munkatársai, 1999; Shimizu és Keller, 2001; Chang és munkatársai, 2004; Han és munkatársai, 2004; Lafon és munkatársai, 2005; Seo és munkatársai, 2005; Seo és Yu, 2006). Ezek a korábban már említett *FadA/FlbA* és *GanB/RgsA* jelátviteli útvonalak (6. ábra).

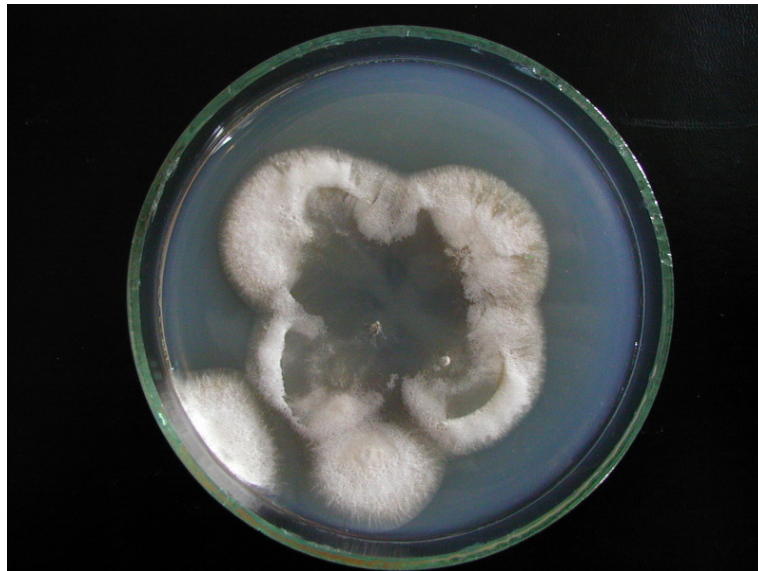


6. ábra A G-protein mediált jelátviteli útvonalak szerepe az aszexuális sporuláció szabályozásában *Aspergillus nidulans*-ban (Yu, 2006).

### 1.2.5 Az autolízis

Az autolízis a gombák életciklusához szorosan hozzátartozó komplex folyamat. Bár az autolízis, mint fogalom gyakran szerepel mikológiai témájú munkákban, az autolízis egyértelmű definíciójával csak ritkán lehet találkozni. Adams és munkatársai (1998) autolitikus fenotípuson a felületi *Aspergillus nidulans* tenyészetek azon jellegzetességét

értették, amikor a telepek belsejében egy idő után a micéliumok „feloldódnak”, eltűnnek, mely jelenség különösen nem spórázó mutánsoknál figyelhető meg jól (7. ábra). White és munkatársai (2002) az autolízist egy olyan természetes sejtpusztulási folyamatként definiálták, amely során hidrolitikus enzimek (pl.: kitinázok, glukanázok, proteinázok, RNázok, DNázok) indukálódnak, amit intenzív vakuolizáció, a sejtorganelumok szétesése, a hifák kiürülése és a sejtfa lebomlása kísér.



7. ábra *Aspergillus nidulans*  $\Delta flbA$  mutáns törzsének autolizáló tenyésztete szilárd táptalajon.

Az autolízis vizsgálata gyakorlati szempontból ígéretes terület (White és munkatársai, 2002; Pócsi és munkatársai, 2003). A fermentációs iparban az autolízis gátlásával lehetőség nyílik a termelő fázis (idiofázis) hosszának elnyújtására és ezen keresztül a képződő termék mennyiségének növelésére, illetve a termék (pl.: fehérje) autolitikus proteinázok általi degradációjának mérséklésére. Kontrollált indukálása ugyanakkor segítheti az intracellulárisan felhalmozódó molekulák felszabadulását és könnyebb kinyerését is. Az autolízis számos hidrolitikus enzim képződését befolyásolja, melyek közül az extracelluláris proteinázoknak, kitinázoknak és glukanázoknak is nagy gyakorlati jelentősége van (White és munkatársai, 2002; Patidar és munkatársai, 2005). Az autolízis indukálásával ezen enzimek mennyisége többszörösére növelhető. Az autolízis folyamatának megzavarása, a fentiekén túl, lehetőséget biztosíthat új típusú antifungális szerek kifejlesztésére is (Pócsi és munkatársai, 2001). Potenciális gyakorlati jelentősége ellenére keveset tudunk a gombák, különösen a fonalas gombák autolíziséről.

Elsőként McIntyre és munkatársai (1999) hívták fel a figyelmet arra, hogy az autolízis nem egy passzív, nekrotikus sejtpusztulás, hanem egy jól szabályozott, aktív, energiaigényes folyamat. Azt tapasztalták ugyanis, hogy a *Penicillium chrysogenum* oxigén megvonással indukált autolízise szén-, azaz energiaforrás jelenlétében intenzívebb volt, mint szénforrás mentes tápközegben (McIntyre és munkatársai, 1999). Az autolízis oxigén és ATP igénye mellett (McIntyre és munkatársai, 1999), az autolízisben résztvevő hidrolázok képződésének erőteljes szabályozottsága és az autolízis egyes lépéseinek programszerű lefutása (Pócsi és munkatársai, 2003) is arra utal, hogy az autolízis egy aktív folyamat.

Az autolízist ma már a gombák stressz válasza részének tekintjük, amit a növekedés szempontjából optimális körülmények megváltozása, pl.: éhezés, oxigén hiány, toxikus anyagok jelenléte vagy magas hőmérséklet indukálhat (Lahoz és munkatársai, 1974; McIntyre és munkatársai, 1999, 2000; White és munkatársai, 1999, 2002). Az autolízisben ténylegesen résztvevő hidrolázokról, képződésükről és működésük szabályozásáról azonban keveset tudunk. Egy korai feltételezés szerint az *Aspergillus nidulans* autolízisének indukálásában a FadA útvonal vehet részt (Adams és munkatársai, 1998). E feltételezés szerint kedvező tápanyag ellátottság mellett a FadA útvonal a vegetatív éhezés alatt az autolízis fenntartását biztosítja, miközben a sporulációt gátolja. A FluG-BrlA útvonal ugyanakkor a FadA útvonal gátlásával biztosítja a növekedés és az autolízis gátlását, és teszi lehetővé a sporulációt.

### 1.2.6 Az apoptózis

A sejtpusztulás alapvetően három csoportra osztható: autofágiára (mikro- és makroautofágia), apoptózisra és nekrozisra. Az első kettő egy meghatározott program szerint zajlik, genetikailag szabályozott, míg a harmadik egy a környezeti tényezők (fizikai vagy kémiai sérülések) által kiváltott folyamat (Kües és Fischer, 2006).

A metazoa szervezeteknek szükségük van arra, hogy megszabaduljanak a felesleges vagy életműködéseiket akadályozó, esetleg gátló sejtektől. Ezt leggyakrabban a programozott sejthalál révén teszik meg. E jelenségek egy csoportját nevezzük apoptózisnak, amely a nekrozistól markánsan elkülönülő morfológiai jellegzetességekkel bír. Az apoptózis során megfigyelhető változások: a kromatin kondenzálódása, a DNS fragmentálódása, a jellemzően a plazmamembrán intracelluláris oldalán elhelyezkedő foszfatidil-szerin oldalláncok kikerülése az extracelluláris oldalra, a reaktív oxigénformák (reactive oxygen species, ROS) felhalmozódása, a mitokondriumok kondenzálódása és sejtmag köré rendeződése, illetve a

sejtek pusztulását követően megjelenő úgynevezett apoptotikus testek kialakulása (Strasser és munkatársai, 2000; Kropper és Fésüs, 2002).

Emlősökben az apoptózis alapvetően két útvonalon aktiválódhat: a halálligand-halálreceptor úton (I. típusú apoptotikus reakció), illetve a mitokondriális citokróm-c kiszabadulása révén (II. típusú apoptotikus reakció).

Az I. típusú apoptotikus reakció kiváltásában kulcsfontosságú ligandok a **tumor nekrózis faktorok** (TNF), amelyek közé tartozik többek között FAS és a TNF- $\alpha$ . Ezen molekuláknak a **tumor nekrózis faktor receptorok** (TNFR) családjába tartozó úgynevezett halálreceptorokkal való kapcsolódása több nagy szignálmolekula-család aktiválódását vagy gátlását eredményezheti, így például: a kaszpázokét, a foszfolipázokét, a MAP-kinázokét, a NF- $\kappa$ B (**nuclear factor-kappa B**) aktivációs kaszkádét, illetve a reaktív gyökökét. A halálreceptorok szignálútjai más receptorok jelátviteléhez hasonlóak: stimulus (TNF, FAS ligand) – szenzor (TNFR) – adaptor (**TNF receptor-associated death domain** (TRADD), **Fas-associated death domain** (FADD) fehérje komplexek) – iniciátorkaspázok (kaspáz-8), szfingomielinázok, foszfolipázok, MAP-kinázok, NF- $\kappa$ B – effektorkaspázok (kaspáz-3, -6, -7) – sejtválasz – apoptózis (Kropper és Fésüs, 2002).

Mivel a kaszpázok az apoptózis jelátviteli és végrehajtó szakaszában is központi szerepet játszanak, érdemes róluk néhány szót szólni. A kaszpázok a fehérjéket az aszparaginsav mellett hasító proteinázok. Mivel degradatív enzimek, proenzimek (prokaspázok) formájában fordulnak elő a sejtben. Az érett kaszpázok heterotetramer szerkezetűek, heterodimerek homodimerei, két nagy és két kis alegységből állnak. A kaszpáz-2-t, -8-at, -9-et és -10-et nevezzük iniciátorkaspáznak, míg a kaszpáz-3 az elsődleges effektor, melynek működését a kaszpáz-6 és -7 segíti. A kaszpáz-3 szubsztrátjai lehetnek struktúrfehérjék és olyan enzimek, amelyek aktiválásuk után a sejtek lebontását végzik. Az utóbbiak közé tartozik pl. a kaszpáz-2, -6 és -10. Itt meg kell jegyezni, hogy létezik a sejthalálnak egy olyan formája is, amely a kaszpázok gátlása mellett figyelhető meg. Jelenleg még nem tudjuk, hogy mi áll az ilyen jellegű sejtpusztulási folyamatok mögött, de egyre inkább elfogadottá válik egy kaszpázfüggetlen sejthalál jelútjának létezése. (Strasser és munkatársai, 2000; Kropper és Fésüs, 2002).

A II. típusú apoptotikus reakció kialakulásában a mitokondriumoknak kulcsfontosságú szerep jut. A mitokondriumot szokták az apoptotikus szignálok integrátorának is nevezni, mivel számos irányból érhetik olyan jelek, amelyek a citokróm-c kiáramlását, és így a

programozott sejthalál aktiválódását okozhatják. A citokróm-c mitokondriumból történő kiáramlása, a feltételezések szerint alapvetően kétféle módon történhet:

1. a citokróm-c a külső mitokondrium membrán valamilyen pórusán, csatornáján keresztül jut ki a citoplazmába. E pórusok kialakításában jelentős szerepet játszik a Bax, oligomerizálódása révén önállóan, illetve feszültségfüggő anioncsatornával (VDAC) komplexet alkotva.
2. a mitokondriális mátrix duzzadása a külső membrán felszakadásához és citokróm-c kiáramláshoz vezet. A duzzadást a nukleotidtranszport gátlása vagy az átmeneti permeabilitási póruskomplex (permeability transition pore complex, PTP) megnyílása okozhatja.

A citokróm-c kiáramlást okozó jelek közül kiemelném a DNS károsodását, aminek hatására a genom épsége fölött örökös p53 aktiválódik. Hatására számos gén indukálódik: ilyen a sejt redoxállapotát szabályozó *pig3* (p53-indukált gén 3), amelynek terméke hatásosan állít elő reaktív oxigénradikálokat, amelyek a mitokondrium enzimszisztémáiban tehetnek kárt, illetve a permeabilitási pórus (PTP) nyílását okozhatják. Ez membrán depolarizációt és citokróm-c kiáramlást eredményezhet. A p53 nem csak más gének aktiválása révén, hanem különböző környezeti hatásokra a sejtmagból a mitokondriumba transzlokálódva, hősokk fehérjékkel és más proteinekkal együttműködve is képes a mitokondrium membrán depolarizációját kiváltani. Említést érdemel még a *bax*, egy pórusformáló képességgel rendelkező fehérje génje, amely a citokróm-c kiáramlását képes előidézni (Kropper és Fésüs, 2002).

A sejt  $Ca^{2+}$  háztartásának felborulása is okozhat citokróm-c kiáramlást és apoptózist. A citoszol  $Ca^{2+}$  szintjének változása hatással van, különböző transzport rendszereken keresztül, a mitokondrium  $Ca^{2+}$  szintjére is. Bizonyos hatásokra oly mértékben megemelkedhet az intracelluláris  $Ca^{2+}$  koncentráció, hogy kalcium túltöltődés lép fel, ez a PTP nyitásával szüntethető meg, ami viszont a belső membrán depolarizációját eredményezi. Ha sokáig áll fenn a membrán depolarizáltsága, akkor a citokróm-c citoszolba áramlása is bekövetkezhet, és beindulhat az apoptózis (Kropper és Fésüs, 2002).

Közvetve ugyan, de a ceramid is okozhat membrán depolarizációt és ennek következményeként citokróm-c kiáramlást. A kaspázok felfedezése előtt sokáig a ceramidot tartották a FAS és a TNFR indukálta apoptózis mediátorának. A kívülről adott C2-ceramid indukálja, míg más szfingolipid-származékok (pl.: szfingozin-1-foszfát) gátolják az apoptózist. A ceramid közvetlenül nem idézi elő a mitokondrium membrán depolarizációját, de az endoplazmatikus retikulumban és a Golgi-apparátusban a belőle képződő GD3-

gangliozid igen. Szerepe valószínűleg másodlagos, mivel szfingomielináz defektes sejtvonalakban is kimutatható apoptotikus sejtpusztulás. Hasonló hatással rendelkeznek a forbolészterek, a retinoidszármazékok és a mikrotubuluskárosodás is, de citokróm-c kiáramlást indukálhatnak különböző kinázok, foszfatázok és természetesen kaszpázok egyaránt (Kropper és Fésüs, 2002).

### 1.2.7 Apoptózis a gombákban

Bár az apoptózist először, mint a metazoákra jellemző folyamatot írták le, számos apoptózisra utaló jelenséget figyeltek meg növényekben és gombákban is (Beers, 1997; Madeo és munkatársai, 1997; Fröhlich és Madeo, 2000; Cheng és munkatársai, 2003; Leiter és munkatársai, 2005; Weis és munkatársai, 2004; Gechev, 2006). Gombákban elsőként Madeo és munkatársai (1997) mutattak ki apoptózis-szerű sejtpusztulást. A *Saccharomyces cerevisiae cdc48S<sup>565G</sup>* mutánsának tanulmányozásakor azt tapasztalták, hogy a sejtpusztulás együtt járt bizonyos apoptotikus markerek (membrán inverzió, kromatin kondenzáció, DNS fragmentáció, sejt fragmentáció) kifejeződésével. Később, apoptózis-szerű sejtpusztulást több más egysejtű és fonalas morfológiájú gombából is kimutattak, többek között a *Schizosaccharomyces pombe* (Rodriguez-Menocal és D'Urso, 2004), *Pichia pastoris* (Weis és munkatársai, 2004), *Kluyveromyces lactis* (Mazzoni és munkatársai, 2003), *Candida albicans* (Keyhani és Keyhani, 2004; Gyetvai és munkatársai, 2006), *Mucor racemosus* (Roze és Linz, 1998), *Aspergillus fumigatus* (Mousavi és Robson, 2003), *Aspergillus nidulans* (Cheng és munkatársai, 2003; Leiter és munkatársai, 2005) és *Neurospora crassa* (Marek és munkatársai, 2003) fajokból.

Számos gént, illetve fehérjét azonosítottak az elmúlt évtizedben, amelyek részt vesznek a gombák apoptózis-szerű sejtpusztulási folyamatainak szabályozásában.

Az emlősökben központi szerepet betöltő RAS-cAMP-PKA szignál út vonal, amely mind proapoptotikus, mind antiapoptotikus jelek továbbításában részt vesz, az élesztő gombákban is jelentős szerephez jut a sejtproliferáció és a sejthalál szabályozásában. *Saccharomyces cerevisiae*-ben MAP-kináz és cAMP-PKA függő válaszok regulálásában játszik szerepet (Leberer és munkatársai, 2001; Rocha és munkatársai, 2001). A *ras* gén deléciója *Candida albicans*-ban a halálszignálokkal szembeni érzékenységet csökkenti, míg hiperaktív formája gyorsítja a sejthalált, bár önmagában nem elegendő az apoptózis

elindításához (Chang és munkatársai, 2000; Saavedra és munkatársai, 2002; Phillips és munkatársai, 2006).

Természetesen a gombákban is fellelhetők az emlős kaszpázokkal homológ fehérjék, amelyek jelenléte általában szükséges a programozott sejthalál kialakulásához, ezek a metakaspázok. *Aspergillus nidulans* és *Aspergillus fumigatus* genomjában kettő darab metakaspáz kódoló gént sikerült azonosítani, ezek *Neurospora crassa*-ban is megtalálhatóak (Thrane és munkatársai, 2004). Élesztőkben egy olyan metakaspáz található (YCA1), ami az emlős kaszpázok szerkezeti homológja. Az YCA1 overexpressziója apoptózist stimulál *Saccharomyces cerevisiae*-ben, míg hiányában az apoptózis elmarad (Váchová és munkatársai, 2006). Itt kell megjegyezzük, hogy az emlősökhöz hasonlóan gombákban is megfigyelték a programozott sejthalál olyan típusát, amely feltehetőleg független a kaszpázoktól: *Aspergillus nidulans* egyik, metakaspáz kódoló *casA* génjének deléció mutációjában is sikerült apoptózist indukálni fitoszfingozin segítségével (Cheng és munkatársai, 2003).

A kaszpázok mellett számos más fehérje is előfordul a gombákban, amelyek részt vesznek az apoptózis szabályozásában, és emlős regulátor fehérjékkel mutatnak hasonlóságot. Ezek között vannak apoptotikus és antiapoptotikus hatású proteinek is. *Schizosaccharomyces pombe* Rad9 fehérjéje, egy a DNS sérülését ellenőrző protein, ami olyan domént tartalmaz, amely az emlős proapoptotikus Bax BH-3 haláldoménjével mutat hasonlóságot (Kamatsu és munkatársai, 2000). Az emlősökben a mitokondrium belső membránjában található **a**poptózis-**i**ndukáló **f**aktor (AIF) homológ fehérjét (Aif1p) élesztőkben is sikerült azonosítani (Wissing és munkatársai, 2004). Az antiapoptotikus fehérjék közül az emlősökben és a növényekben is igen konzervált **B**ax **i**nhibitor-**1**-et (BI-1) Chae és munkatársai (2003) írták le élesztőkben. Egy másik hasonló hatású protein az IAP (**i**nhibitor of **a**poptosis **p**rotein) génjét *Saccharomyces cerevisiae* genomjában sikerült azonosítani (Uren és munkatársai, 1999). Emlősökben a HtrA2 (**h**ihg-**t**emperature **r**esistance **A**) fehérje az IAP gátlása révén indukálja az apoptózist. Fahrenkorg és munkatársainak (2004) *Saccharomyces cerevisiae* genomjában sikerült azonosítani a HtrA2 homológját, amit Nma111p-nek nevezték el.

Igen sokféle körülmény képes apoptózist kiváltani gombákban:

A környezeti körülmények változása (tápanyagok, pH, ROS) nem csak nekrotikus sejt pusztulást eredményezhetnek, hanem bizonyos esetekben apoptózist is. *Saccharomyces cerevisiae* és *Candida albicans* tenyésztésében ecetsavkezelés hatására, a koncentrációtól

függően, előbb apoptózis-szerű folyamatok, majd nekrozis figyelhető meg. Egyes aminosavak hiánya is lehet apoptózis indukáló hatású auxotróf élesztők esetében (Eisler és munkatársai, 2004). Számos eredmény utal arra, hogy szoros kapcsolat van a ROS akkumulálódása és az apoptotikus folyamatok indukciója között. A ROS koncentrációjának emelkedése és az antioxidáns enzimek (pl.: szuperoxid diszmutázok, katalázok, peroxidázok) hiánya gyorsítja az öregedést és csökkenti a sejtek élettartamát, míg az antioxidáns anyagok (pl. glutation,  $\alpha$ -tokoferol) ellentétes hatással bírnak (Laun és munkatársai, 2001; Marchetti és munkatársai, 2005). Az oxidatív stressz, fiziológiás körülmények között, nem csak a gombák sejtjeinek öregedésében és nekrozisában, hanem programozott sejthalálának szabályozásában is fontos szerepet játszik (Laun és munkatársai, 2001; Amin és munkatársai, 2004; Marchetti és munkatársai, 2005). Így nem meglepő, hogy az apoptózis jól indukálható reaktív gyökök (hidrogénperoxid) segítségével *Saccharomyces cerevisiae* és *Candida albicans* tenyészeiben (Madeo és munkatársai, 1997, 1999). *Saccharomyces cerevisiae* öreg anyasejtjei a mitokondriumból származó erősen oxidált molekulákat tartalmaznak, és apoptotikus folyamatokra utaló jeleket mutatnak abban az esetben is, ha nincs jelen a tápközegben külső szabadgyök forrás (Laun és munkatársai, 2001). Hasonló hatással bír a ROS fonalas gombák esetében is: *Aspergillus fumigatus* tenészeihez toxikus, de szubletális koncentrációjú hidrogénperoxidot adva apoptotikus fenotípus figyelhető meg, amely kaszpá zgátlók jelenlétében is kialakul (Amin és munkatársai, 2004).

A reaktív oxigénformák képződésének egyik legfontosabb helye a mitokondrium. Emellett a szabad gyökök akkumulálódását a mitokondrium membránjának depolarizációja követheti, ami citokróm-c felszabaduláshoz és az apoptózis indukációjához vezethet (Khan és munkatársai, 2005). A *Saccharomyces cerevisiae cdc48* (egyfajta ATPáz kódoló gén) génjének pontmutációja (*cdc48<sup>S565G</sup>*) olyan zavarokat okoz a fehérje degradációban, ami a mitokondriumok diszfunkciójához, citokróm-c felhalmozódáshoz és apoptotikus fenotípus kialakulásához vezet (Madeo és munkatársai, 1997, 1999; Braun és munkatársai, 2006). A CDC48 fehérje mutációja által indukált apoptózist a fentiek mellett ROS akkumulálódás és „kaspáz-szerű” aktivitás kíséri (Braun és munkatársai, 2006). A citokróm-c sejtplazmába történő kiáramlását *Saccharomyces cerevisiae* tenészeihez adott ecetsav (Ludovico és munkatársai, 2001) és egyes hiszton chaperon fehérjét kódoló gének (*asf1/cia1*) hiánya (Yamaki és munkatársai, 2001) is előidézhetheti.

A mitokondriumok és a citoskeleton közötti igen szoros kapcsolat – a mitokondriumok az aktin filamentumok mentén mozognak, és kerülnek az újonnan képződött utód sejtbe (Simon és munkatársai, 1999; Boldogh és munkatársai, 2001) – lehet a

magyarázata annak, hogy az aktin filamentumok dinamikájának, az aktin szálak felépülésének és bomlásának lassulása, a mitokondrium membránjának depolarizációját, megemelkedett intracelluláris ROS szintet és DNS fragmentációt, vagyis apoptotikus jellegeket eredményez (Gourlay és munkatársai, 2004, 2005).

Az apoptózis során a ceramid mellett a szfingozin szint átmeneti emelkedése is megfigyelhető. Az exogén szfingozin (fitoszfingozin (PHS), illetve a dihidroszfingozin (DHS)) hatékony induktora az apoptózisnak (Kolesnick és munkatársai, 1998; Hannun és munkatársai, 2000, 2001; Cheng és munkatársai, 2003). Az szfingozin-1-foszfát a ceramid antagonistája, mivel G-protein kapcsolt receptoron keresztül fokozza a sejt proliferációt és növeli a sejt túlélésének esélyét (Olivera és munkatársai, 1993; Strasser és munkatársai, 2000). *Aspergillus nidulans*-ban a szfingolipidek elengedhetetlenek a sejtpolarizáció kialakításában és fenntartásában, az aktin citoskeleton kontrollja révén (Cheng és munkatársai, 2003). A szfingozinok által indukált programozott sejthalál *Aspergillus nidulans*-ban metakaspázok hiányában is tetten érhető (Cheng és munkatársai, 2003).

A trigliceridek (TAG) fontos energia-raktározó molekulák az eukariótákban. *Schizosaccharomyces pombe*-ben a TAG szintézis két kulcs enzimét kódoló génnek (*ph1*, *dgal*) hiányában az élesztő sejtek (DKO sejtek) elveszítik életképességüket a stacioner fázisba lépve. Az exponenciális fázisban lévő DKO sejtekben diacilglicerol (DAG) kezelés hatására drámai apoptotikus folyamatok indulnak. Az éhező DKO sejtekre csökkent életképesség, DNS fragmentáció, foszfatidil-szerin externalizáció és ROS képződés jellemző, amelyek jól ismert apoptotikus markerek (Zhang és munkatársai, 2003).

Az örökítőanyag, illetve a replikációs folyamatok sérülése is apoptózisba taszíthatja a sejteket. Ennek oka lehet: oxidáció, illetve UV fény hatására, esetleg a replikációs komplex vagy a replikációs iniciációs komplex hibája miatt kialakuló károsodás. Az ilyen jellegű defektusok a ciklin-dependens kinázok gátlása révén a mitózis elmaradásához, és ezen keresztül, az emlős sejtekhez hasonlóan, a gombákban is programozott sejthalálhoz vezetnek (Ribeiro és munkatársai, 2006; Weinberger és munkatársai, 2005). Így a hasadó élesztőkben, a telomerek fenntartásához és replikációjához elengedhetetlen telomer kötő fehérjék inaktivációja abnormális telomerek kialakulásához és a sejtciklust a G2/M fázisban való leállításához vezet (Nugent és munkatársai, 1996). Ha a károsodott részek javítása nem történik meg, a sejt elindul a programozott sejthalál útján, miközben az apoptózis összes jellegzetessége megfigyelhető rajta. Ez a fajta programozott sejthalál feltételezhetően a kaspázok aktivitásától független (Wysocki és Korn, 2004). A DNS replikáció elindításához sarjadzó élesztőkben elengedhetetlen az ORC1 és ORC2 (origin recognition komplex), ami a

pre-replikációs komplex összeszereléséhez szükséges a G1 fázis során, hiányában a sejt fejlődése megáll a G2/M fázisban, majd elindul a sejthalál program (Burhans és munkatársai, 2003). Hasonló eredménnyel jár az ASF1 élesztő hiszton-acetiltransferáz inaktiválódása is (Yamaki és munkatársai, 2001).

Érdekes típusa a programozott sejthalálnak a gombák differenciálódási folyamataihoz kötött formája. Ilyen például a *Podospora*-ban és *Neurospora*-ban megfigyelt vegetatív inkompatibilitás által indukált, vagy a „nagy” gombáknál a termőtest lemezes vagy csöves termőrétégének kialakulása során tetten érhető sejtpusztulás (Saupe és munkatársai, 2000; Umar és munkatársai, 1997, 1998).

## 2. Anyagok és vizsgálati módszerek

### 2.1 A vizsgált *Aspergillus nidulans* törzsek

Kísérleteinkben az alábbi törzseket használtuk:

| A törzs jele              | A törzs genotípusa   |
|---------------------------|--|
| FGSC 26 <sup>**</sup>     | <i>biA1, veA1</i>  |
| FGSC 1035 <sup>*</sup>    | <i>yA2, fadA<sup>G203R</sup></i>   |
| RJH046 <sup>*</sup>       | <i>argB2, biA1, pyroA4, veA1, Δflba::argB</i>                                |
| RKH51.117 <sup>***</sup>  | <i>pabaA1, yA2</i>   |
| RKH51.09 <sup>b ***</sup> | <i>pabaA1, yA2, ΔrgsA::argB<sup>+</sup></i>                                  |
| RMdgB03 <sup>***</sup>    | <i>pabaA1, yA2, ΔargB::trpC<sup>+</sup> ΔganB::argB<sup>+</sup>, trpC801</i> |
| RKH52.02 <sup>***</sup>   | <i>pabaA1, yA2, ΔrgsA::argB<sup>+</sup> ΔganB::argB<sup>+</sup></i>          |
| FGSC 1079 <sup>**</sup>   | <i>biA1, pabaA1, pyroA1, ΔbrlA, veA+</i>                                     |
| FGSC 744 <sup>**</sup>    | <i>fluG1, pabaA1, yA2</i>  |

A törzsekhez Prof. Dr. Stefan Rosén<sup>\*</sup> (Lund University, Svédország), a Fungal Genetic Stock Center<sup>\*\*</sup> (University of Kansas Medical Center, Kansas, Egyesült Államok), illetve Dr. Jae-Hyuk<sup>\*\*\*</sup> Yu (University of Wisconsin-Medison, Egyesült Államok) szíves közreműködése révén jutottunk hozzá. A minimál tápagon (Barrat és munkatársai, 1965) felnövesztett (37°C, 1 hét) törzseket 4°C-on tároltuk, és kísérleteinkhez a két hétnél nem öregebb tenyészetek spóráit használtuk fel. A minimál tápagar összetétele a következő volt: 10 g/l glükóz, 20 g/l agar, 6 g/l NaNO<sub>3</sub>, 1,5 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5 g/l MgSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O, 0,5 g/l KCl, 0,1 % (v/v) nyomelem oldat pH 6,5. A nyomelem oldat összetétele a következő volt: 22 g/l ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 11 g/l H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 5 g/l MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 5 g/l FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 1,6 g/l CoSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 1,6 g/l CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 1,1 g/l (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>·4H<sub>2</sub>O és 50 g/l Na<sub>2</sub>EDTA.

A tápagar szükség szerint 25 µg/l biotint, 1 mg/l piridoxint, 25 µg/l para-aminobenzoésavat is tartalmazott. Az RJH046 törzs aszexuális sporulációját 25 µg/l biotint, 1 mg/l piridoxint és 48 g/l NaCl-ot tartalmazó tápagon indukáltuk.

## 2.2 Az *Aspergillus nidulans* tenyésztése

A süllyesztett tenyészetek vizsgálatához komplex tápoldatot használtunk. E tápoldat összetétele megegyezett a fent leírtakkal, de agart nem tartalmazott és 5 g/l élesztőkivonattal (Oxoid, Basingstake, Nagy Britannia) egészítettük ki. A tápleves 100 ml-ét 50 millió spórával oltottuk be, és a tenyészeteket rázóinkubátorban 37 °C-on 180 rpm-mel rázattuk.

Az apoptózis indukálásakor a tenyészetekhez 0,005 g/l D,L-dihidroszfingozint és 0,3 g/l fitoszfingozint adtunk a tenyésztés 30. órájában.

## 2.3 Fiziológiai vizsgálatok

### 2.3.1 Intracelluláris enzimaktivitások mérése

Az intracelluláris enzimek aktivitásának mérésekor 10 ml tenyészetet zsugorított üvegszűrőn szűrtünk át, desztillált vízzel mostunk, majd a micéliumokat 10 ml 4 °C-os 0,1 mol/l-es foszfát pufferben (pH 7,6) szuszpendáltuk fel, és -20°C-on megfagyasztottuk. A fagyott mintákat X-press (AB Biox, Göteborg, Svédország) segítségével tártuk fel. A sejtmentes kivonatot 1,44 mmol/l  $\alpha$ -toluil-szulfonil-fluorid (fenil-metil-szulfonil-fluorid, PMSF) proteínázgátlóval kezeltük, centrifugáltuk (10000g, 10 perc, 4°C) és a felülúszót használtuk méréseinkhez (Emri és munkatársai, 1997). Az enzimaktivitásokat – a  $\gamma$ -glutamil-transzpeptidáz ( $\gamma$ GT) aktivitások kivételével - „rate assay” módszerekkel fotometriásan határoztuk meg. Az egyes enzimeknél a reakcióelegyek végtérfogata 1 ml volt és 10% (v/v) minta mellett az alábbi komponenseket tartalmazták:

Glükóz-6-foszfát dehidrogenáz (G6PD): 20 mmol/l Hepes (pH=7,6), 1 mmol/l glükóz-6-foszfát, 1 mmol/l NADP, 10 mmol/l MgCl<sub>2</sub>. A NADPH képződését 340 nm-en követtük nyomon (Emri és munkatársai, 1994).

NADP-specifikus izocitrát dehidrogenáz (NADP-ID): 20 mmol/l Hepes (pH=7,6), 0,5 mmol/l izocitrát, 1 mmol/l NADP, 10 mmol/l MgCl<sub>2</sub>. A NADPH képződését 340 nm-en követtük nyomon (Bruinenberg és munkatársai, 1983).

Kataláz: 20 mmol/l Hepes (pH 7,6), 0,1 mmol/l H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fogyását 240 nm-en követtük nyomon (Roggenkamp és munkatársai, 1974).

Szuperoxid diszmutáz (SOD): teljes SOD {SOD(CuZn) + SOD(Mn)} aktivitásánál 50 mmol/l Na-foszfát puffer (pH 7,8), 1,4 mmol/l DETAPAC, 70  $\mu$ mol/l Nitro Blue Tetrazolium

(NBT), 0,2 mmol/l xantin, 10 U/l xantin oxidáz, 1000 U/l kataláz. A SOD(Mn) aktivitás mérésénél a fenti oldat 5 mmol/l NaCN-ot is tartalmazott. Az NBT oxidálódását 560 nm-en követtük nyomon (Oberley és munkatársai, 1984).

Glutation reduktáz (GR): 0,1 M Na-foszfát puffer (pH 7,6), 0,1 mmol/l NADPH, 1,5 mmol/l oxidált glutation (GSSG). A NADPH fogyását 340 nm-en detektáltuk (Pinto és munkatársai, 1984).

Glutation peroxidáz (GPx): 50 mmol/l Tris-HCl (pH 7,6), 0,091 mmol/l EDTA, 0,12 mmol/l NADPH, 0,25 mmol/l GSH, 440 U/l GR, 0,1 mmol/l kumén-hidroperoxid. A NADPH fogyását 340 nm-en detektáltuk (Chiu és munkatársai, 1976).

A  $\gamma$ GT esetében a reakcióelegy 0,1 M Tris-HCl-t (pH 8,0), 20 mmol/l glicin-glicint, 1 mmol/l  $\gamma$ -glutamil-*p*-nitroanilidet és 50% (v/v) mintát tartalmazott. A méréshez közvetlenül az X-press-szel feltárt, de még nem centrifugált sejtmentes kivonatot használtuk. Az 1 órás, szobahőmérsékleten történő inkubációt követően a mintákat centrifugáltuk (10000g, 10 perc, 4°C), és a felszabadult *p*-nitroanilid mennyiségét a 410 nm-en mért abszorbancia változásból határoztuk meg (Emri és munkatársai, 1997).

Az enzimaktivitásokat a minták fehérjetartalmára vonatkoztattuk, és a specifikus aktivitásokat mkat/kg-protein (kataláz esetében kat/kg-protein) dimenzióban adtuk meg. A SOD-ok aktivitását egységekben (U) tüntettük fel. (1U az az enzimmenyiség volt, amely az NBT redukciójában 50%-os gátlást okozott). A minták fehérjetartalmát a Peterson által módosított (1983) Folin reakció segítségével határoztuk meg.

### **2.3.2 A sejtek GSH és GSSG tartalmának meghatározása**

A sejtek glutation (GSH) és glutation-diszulfid (GSSG) tartalmának meghatározásakor 5 ml tenyészetet zsugorított üvegszűrőn átszűrtünk, desztillált vízzel mostunk, és a sejteket 1 ml 4°C-os, 5% (w/v) 5'-szulfoszalicilsav oldatban tártuk fel (20 perc inkubálás 4°C-on). A mintákat centrifugáltuk (10000g, 10 perc, 4°C), és a felülúszót trietanol-aminnal való közömbösítés után használtuk fel méréseinkhez (Emri és munkatársai, 1997).

A sejtek oxidált glutation (GSSG) tartalmának méréséhez az Anderson (1985) által kidolgozott „rate assay” eljárást használtuk. A reakcióelegy ebben az esetben az alábbi összetételű volt: 115 mmol/l Na-foszfát puffer (pH 7,5), 50 mmol/l EDTA, 0,6 mmol/l 5,5'-ditio-*bis*(2-nitrobenzoesav) (DTNB), 0,2 mmol/l NADPH, 1,5 kU/l GR és 10% (v/v) minta. A

DTNB redukálódását 412 nm-en, fotometrikus úton követtük nyomon. A minták GSH tartalmát előzetesen 2-vinilpiridines kezeléssel (185 mmol/l, 1 óra, pH 6,0-7,0) reagáltattuk el.

A GSH tartalom meghatározása szintén az Anderson-féle (1985) módszer alapján történt oly módon, hogy a minták teljes glutation (GSH+GSSG) tartalmát mértük meg (a 2-vinilpiridines kezelés elhagyásával), és a GSSG tartalom ismeretében határoztuk meg a GSH mennyiségét.

A mért GSH és GSSG mennyiségeket a tenyészetek szárazanyag-tartalmára (DCM) vonatkoztattuk, és mmol/kg DCM dimenzióban adtuk meg (a DCM meghatározás módszerét a 2.4 fejezetben írtam le).

### **2.3.3 A sejtek szuperoxid és peroxid tartalmának mérése**

A sejtek szuperoxid és peroxid tartalmának meghatározásakor 5 ml tenyészetet szűrtünk át zsugorított üvegszűrőn, és azt a GSH, GSSG koncentrációmérésnél leírtak szerint tártuk fel. A mintákat centrifugáltuk (10000g, 10 perc, 4°C), és a felülúszót 2 mol/l-es NaOH oldattal történő közömbösítés után használtuk fel méréseinkhez (Emri és munkatársai, 1997).

A sejtek szuperoxid (Carter és munkatársai, 1994) termelésének vizsgálatánál a tenyészetekhez dihidroetidint, peroxid tartalmának méréséhez (Royall és Ischiropoulos 1993) 2',7'-diklorofluorescein-diacetátot adtunk 10 µmol/l-es koncentrációban. Az egy óra alatt képződő etidium (Et), illetve 2',7'-diklorofluorescein (DCF) koncentrációját fluorimetriásan 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 DCM-ra vonatkoztattuk, és mmol/kg DCM dimenzióban adtuk meg.

### **2.3.4 A tápközeg glükóz és ammónia tartalmának mérése**

A tápközeg glükóz tartalmának meghatározása a Leary és munkatársai (1992) által kidolgozott "rate assay" segítségével történt. A reakcióelegy összetétele az alábbi volt: 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. A mérés 500 nm-en történt.

A tápközeg ammónia koncentrációját OP-NH<sub>3</sub>-7113-S típusú ammónia-szenzitív elektróddal (Radelkis, Magyarország) mértük meg (Pusztahelyi és munkatársai, 1997a).

### **2.3.5 A tenyészetek specifikus MTT redukciós aktivitásának mérése**

Az 1 ml tenyészetből származó és centrifugálással (5 perc, 4000 rpm, 24 °C) kiülepített micéliumokat 2 ml, 5 mg/ml MTT (metil-tiazoltetrazolium) koncentrációjú friss tápoldatban szuszpendáltuk fel, és 4 órán át 37 °C-on inkubáltuk forgóinkubátorban. Az MTT redukciójának leállításához és a sejtekben képződött MTT-formazán felszabadításához 0,6 ml, 200 g/l SDS-t és 20 mmol/l HCl-t tartalmazó oldatot adtunk a szuszpenzióhoz, és tovább inkubáltuk 37 °C-on. A mintákat végül centrifugáltuk (5 perc, 10000 rpm, 24 °C), és az MTT-formazán mennyiségét fotometriásan ( $\lambda=550$  nm) határoztuk meg a felülúszóból. A mért abszorbancia értékeket ( $A_{550}$ ) a minták DCM-ra vonatkoztattuk, és az élő sejtek arányának jellemzésére használtuk (Lee és munkatársai, 1999).

### **2.3.6 A teljes és a cián-rezisztens légzés mérése**

A tenyészetek légzését 37 °C-on, 15 ml-es oxinográfiás cellában, OXY 320 típusú polarográfiás oxigén elektróddal (WTW, Weilheim, Gemany) határoztuk meg. A cián-rezisztens légzés (alternatív légzés) mérésekor a citokró-m-c függő utat 5 mmol/l KCN-dal gátoltuk, és a megmaradó aktivitást tekintettük cián-rezisztens légzésnek, amit a teljes légzés százalékában adtunk meg (Bahr és Bonner, 1973).

## **2.4 Az autolitikus markerek nyomon követése**

Az autólízis nyomon követésére alapvetően a tenyészetek öt jellemzőjét vettük alapul: a szárazanyag-tartalom változását, a kitináz és a proteináz aktivitásokat, illetve a pelletátmérő csökkenését és a fonalak fragmentálódását.

A tenyészetek szárazanyag-tartalmának (DCM) mérésekor 5 ml tenyészetet zsugorított üvegszűrőn szűrtünk át, a kiszűrt micéliumokat desztillált vízzel mostuk, majd súlyállandóságig (2 nap) szárítottuk (Pusztahelyi és munkatársai, 1997a). A szűrletet a tápközeg kitináz és proteináz aktivitásának meghatározásához használtuk fel.

A kitináz aktivitások mérésénél 100  $\mu$ l mintához 600  $\mu$ l 0,1 mol/l-es citrát puffert (pH 5,0) és 100  $\mu$ l CM-Chitin-RBV (Loewe Biochemica GmbH, Sauerlach, Germany) kromofór csoporttal jelölt szubsztrátoldatot adtunk. A 10 perces inkubáció (25°C) után a reakciót 300  $\mu$ l 2 mol/l-es HCl-val állítottuk le. A felszabaduló színes termék mennyiségét, a minták

centrifugálását (10000g, 5 perc, 4°C) követően a felülúszóból, fotometriásan ( $\lambda=550$  nm) határoztuk meg. A kapott abszorbancia értékeket a tenyészetek DCM-ra vonatkoztattuk, és használtuk fel az enzimaktivitás jellemzésére (Emri és munkatársai, 2003).

Az extracelluláris proteináz aktivitások mérésénél 100  $\mu$ l mintához 100  $\mu$ l 25 mg/ml-es azokazein oldatot adtunk. A 30 perces inkubáció (37°C) után a reakciót 800  $\mu$ l 5% (v/w)-os triklór-ecetsavval állítottuk le. A minták centrifugálását (10000g, 5 perc, 4 °C) követően a felülúszót 0,5 mol/l-es NaOH oldattal semlegesítettük, és a proteináz aktivitás hatására felszabaduló színes termékek mennyiségét fotometriásan határoztuk meg 440 nm-en. A kapott abszorbancia értékekből a Tomarelli és munkatársai (1949) által kidolgozott módszer alapján számoltuk ki a K reakciósebességi állandót, amit a tenyészetek DCM-ra vonatkoztattuk, és az enzimaktivitás jellemzésére használtunk (Pusztahelyi és munkatársai, 1997b).

A sejtek, hifák, pelleték morfológiájának vizsgálatához OLYMPUS BH-2, SPlan 20NH fáziskontraszt objektívvel felszerelt mikroszkópot (Sipiczki és munkatársai, 1998), illetve Carl Zeiss Labovar4-es fáziskontraszt mikroszkópot használtunk.

## **2.5 Apoptotikus markerek vizsgálata**

Az apoptózisra utaló változások közül a sejtmag morfológiájának megváltozását, a DNS fragmentálódását és a foszfatidil-szerin oldalláncok externalizációját vizsgáltuk.

### **2.5.1 A sejtmag morfológiájának vizsgálata DAPI (4',6'-diamino-2 fenilindol) festéssel**

A sejtmag morfológiájának nyomon követése céljából a zsugorított üvegszűrőn átszűrt és desztillált vízzel mosott micéliumot 70 % (v/v) etanollal fixáltuk, és permeabilizáltuk, majd PBS-sel mostuk, és ezt követően 1  $\mu$ g/ml DAPI oldattal festettük. Az újabb PBS-sel történő mosás után a sejteket epifluoreszcens mikroszkóppal (OLYMPUS BH-2) vizsgáltuk (Moreno és munkatársai, 1991). A PBS oldat összetétele a következő volt: 137 mmol/l NaCl, 2,7 mmol/l KCl, 4,3 mmol/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,47 mmol/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4.

### **2.5.2 Protoplaszt előállítás és tisztítás**

A DNS fragmentálódásának és a foszfatidil-szerin oldalláncok externalizációjának vizsgálatához szükséges protoplasztokat az alábbi módon hoztuk létre:

A micéliumot steril gézen átszűrtük, majd L1 oldattal (0,6 mol/l MgSO<sub>4</sub>) mostuk. Az oldatot steril szűrőpapír segítségével eltávolítottuk, majd a micélium tömegét steril petricsészén lemértük. 1,5 g micéliumot 15 ml 30 mg/ml csigaenzimmel kiegészített L2 oldatban (1,2 mol/l MgSO<sub>4</sub>, 10 mmol/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 10 mmol/l NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 5,8) szuszpendáltunk fel, majd az elegyhez 0,035 % (v/v) β-merkaptotetanolt és 5 perces jégen történő inkubáció után 250 µl L3 oldatot (12 mg/ml borjú szérum albumin (BSA) L2 oldatban) adtunk. A szuszpenziót 12 órán át 30 °C-on 80 rpm-mel rázattuk. A protoplasztok képződését mikroszkóppal követük nyomon. A csigaenzimet Dr. Vágvölgyi Csaba (Szegei Tudományegyetem, TTK, Mikrobiológiai Tanszék) bocsátotta rendelkezésünkre.

A protoplasztokat lehűtöttük, majd két térfogat 4 °C-os L2 oldattal mostuk és centrifugáltuk: 2000 rpm, 20 perc, 4 °C. A felülúszóhoz 1:1 arányban L4 oldatot (1 mol/l szorbitol, 10 mmol/l Tris-HCL, pH 7,5) adtunk folyamatos keverés mellett, majd az elegyet 3500 rpm-mel 12 perc-ig centrifugáltuk 4 °C-on. A pelletet L4 oldatban vettük fel, majd ismét centrifugáltuk (3500 rpm, 12 perc, 4 °C). A mosást kétszer végeztük el, majd a protoplasztokat L4 oldatban szuszpendáltuk fel (Tilburn és munkatársai, 1983; Vágvölgyi és Ferenczy, 1991).

### **2.5.3 A foszfatidil-szerin oldalláncok externalizációjának vizsgálata „Annexin V assay” felhasználásával**

A protoplasztokon Vybrant Apoptosis Kit (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) segítségével tettük láthatóvá az extracelluláris tér felé forduló foszfatidil-szerin oldalláncokat. A protokoll során a gyártó ajánlása szerint jártunk el. A festési eljárás tartalmazott propidium jodidos kezelést is, amely a sérült protoplasztok kiszűrését tette lehetővé. Csak az Annexin V pozitív és propidium jodid negatív sejteket tekintettük „apoptotikus” sejteknek. Az eljárás során 5000 protoplaszt analízisét végeztük el epifluoreszcens mikroszkóppal (OLYMPUS BH-2) (Leiter és munkatársai, 2005).

### **2.5.4 DNS fragmentáció vizsgálata TUNEL festéssel**

A DNS fragmentáció nyomon követését Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-mediated dUTP Nick End Labelling (TUNEL) „assay” segítségével, APO-BrdU<sup>TM</sup> TUNEL Assay Kit (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) felhasználásával, a gyártó utasításai szerint

eljárva végeztük. A maggal rendelkező sejtek számát DAPI festéssel határoztuk meg, és a TUNEL pozitív és DAPI pozitív sejtek arányát adtuk meg. A vizsgálat során 5000 protoplaszt analízisét végeztük el OLYMPUS BH-2 epifluoreszcens mikroszkóppal (Mousavi és munkatársai, 2003; Leiter és munkatársai, 2005).

## **2.6 RNS izolálás, koncentráció meghatározás és denaturáló (agaróz) gélelektroforézis, génexpressziós vizsgálatok**

### **2.6.1 RNS izolálás, koncentráció meghatározás és denaturáló (agaróz) gélelektroforézis**

RNS izoláláshoz a tenyészetet zsugorított üvegszűrőn átszűrtük, jéghideg (0°C-os) dietil-pirokarbonáttal (DEPC) kezelt vízzel mostuk, majd a micéliumból 0,5 ml-t -70 °C-on előhűtött steril eppendorf csövekbe mértünk.

Az izolálást fagyasztva szárított micéliumból TRISOL reagenssel (Invitrogen, Lofer, Ausztria) végeztük a gyártó ajánlása szerint (Chonczynski és munkatársai, 1993). Az RNS mintákat DNáz kezelést követően használtuk fel az RT-PCR mérésekhez. A minták RNS koncentrációját és tisztaságát spektrofotométerrel határoztuk meg ( $\lambda=280/260$ ). Az RNS minták minőségét denaturáló agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük. Az agaróz gél 10 g/L agarózt, 10 % (v/v) 10x MOPS-EDTA oldatot, 0.002 % (v/v) etídium-bromidot (10 mg/ml) és 5 % (v/v) formaldehidet tartalmazott. A futtatás 1x MOPS-EDTA oldatban történt 80 V feszültség mellett. Az RNS mintákat (7,5  $\mu$ g) az elektroforézis előtt 5  $\mu$ l 25 mmol/l etiléndiamin-tetraecetsavat (EDTA) és 10 g/l nátrium-lauril-szulfátot (SDS) tartalmazó oldat és 25  $\mu$ l minta felvivő puffer (RNA loading buffer, Invitrogen, Lofer, Ausztria) elegyében inkubáltuk 10 percig 68 °C-on. A 10x MOPS-EDTA összetétele a következő volt: 200 mmol/l MOPS, 50 mmol/l nátrium-acetát, 10 mmol/l EDTA, pH 7,0.

### **2.6.2 Génexpresszó vizsgálata RT-PCR segítségével**

Az RT-PCR reakciókat QuantiTect™ SYBR® Green RT-PCR kittel (Qiagen, Hilden, Németország) végeztük el, a gyártó által megadott protokoll alapján. Minden reakcióelegy 400 ng totál RNS-t, 2,5 mmol/l  $Mg^{2+}$ -t és 0,5  $\mu$ mol/l génspecifikus primert tartalmazott. 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 (annealálás),  $T_m$ -(5-8) °C, 30 másodperc; (5) lánchosszabbítás (extenzió), 72 °C, 30 másodperc; (6) a ciklus ismétlése a harmadik lépéstől 40 ciklus erejéig.

Az alábbi oligonukleotid PCR primereket használtuk az egyes gének transzkripciójának nyomon követésére (Genodia, Budapest, Magyarország; IDT, Coralville, IA, USA):

1. *catA* F: 5'-CAA ACG CTC CGC CAT CTA C-3'  
R: 5'-CTT GAG GTG CCC GAA TGT C-3'
2. *catB* F: 5'-CCG AGC CCG ACA ACA CTT AC-3'  
R: 5'-GTT CAG CGA CGA CAA TGA CG-3'
3. *catC* F: 5'-CAG AGC AAG CCG AGA AGT TC-3'  
R: 5'-CAA GGT GGG AGG GAG AGA AG-3'
4. *prtA* F: 5'-TTC TGT CCG TCA AGG TTT TC-3'  
R: 5'-TGA AGG CGT AAG AGT ATC CAC-3'
5. *prtB* F: 5'-GCT TGA ATC TCC TCT GTT TGC-3'  
R: 5'-GTC CAA CCA CCG TAG AAG AAG-3'
6. *chiB* R: 5'-CGGGACGAAGGATCATACG-3'  
F: 5'-TGGTCACCAGGCGAATCTC-3'

Az RT-PCR termékek homogenitásának megállapítása olvadáspont meghatározással és agaróz gélelektroforézissel történt. Előbbi esetben a készülék a PCR terméket 95 °C-ra melegítette, majd a hőmérsékletet 0,5 °C-os lépésekben 55 °C-ra csökkentette, közben a fluoreszcens jel változását mérte. Az agaróz gélelektroforézist 1 %-os gél és 1x TAE puffer, illetve DNS minta felvivő puffer (Invitrogen, Lofer, Ausztria) segítségével végeztük. A TAE puffer összetétele a következő volt: 0,4 mol/l hidroximetil-aminometán- hidroklorid (Tris), 0,01 mol/l EDTA, 0,2 mol/l ecetsav, pH 8,5.

## 2.7 Statisztikai módszerek

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

Az RT-PCR mérések pontatlanságát minden mérésnél meghatároztuk. A mérésen belüli variációs koefficiens (CV) mindig kevesebb volt, mint 2,5 % (n=8), a mérések közötti

variációs koefficiens legfeljebb 2,7 % volt (n=5). A standard deviációt (SD) minden gén esetében meghatároztuk, értéke mindig kevesebb, mint 0,6 ciklus volt.

## **2.8 Felhasznált vegyszerek**

A kísérleteinkben felhasznált finomvegyszerek, ha másként nem jelöltem, a Sigma-Aldrich Kft. (Budapest, Magyarország) termékei voltak. Minden egyéb vegyszer analitikai minőségű volt és a Spektrum-3D Kft-től (Debrecen, Magyarország) került beszerzésre.

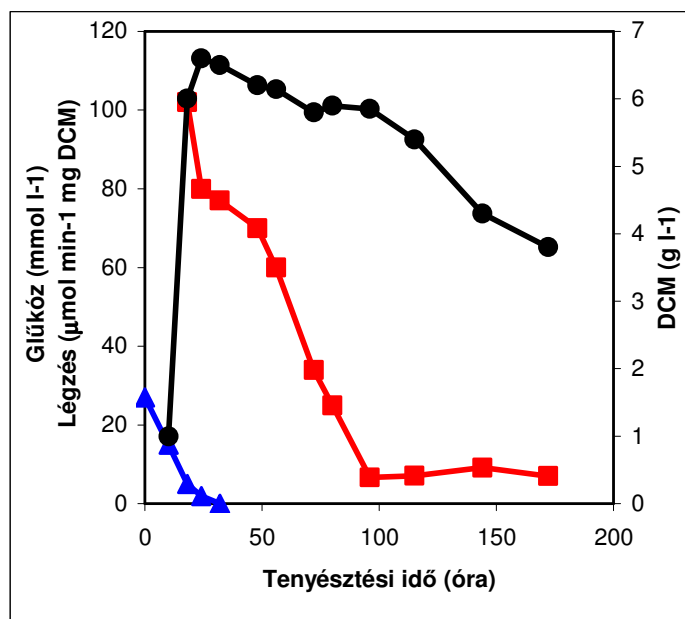
## 3. Eredmények

### 3.1. Szénéhező *Aspergillus nidulans* tenyészetek morfológiai és fiziológiai jellemzői

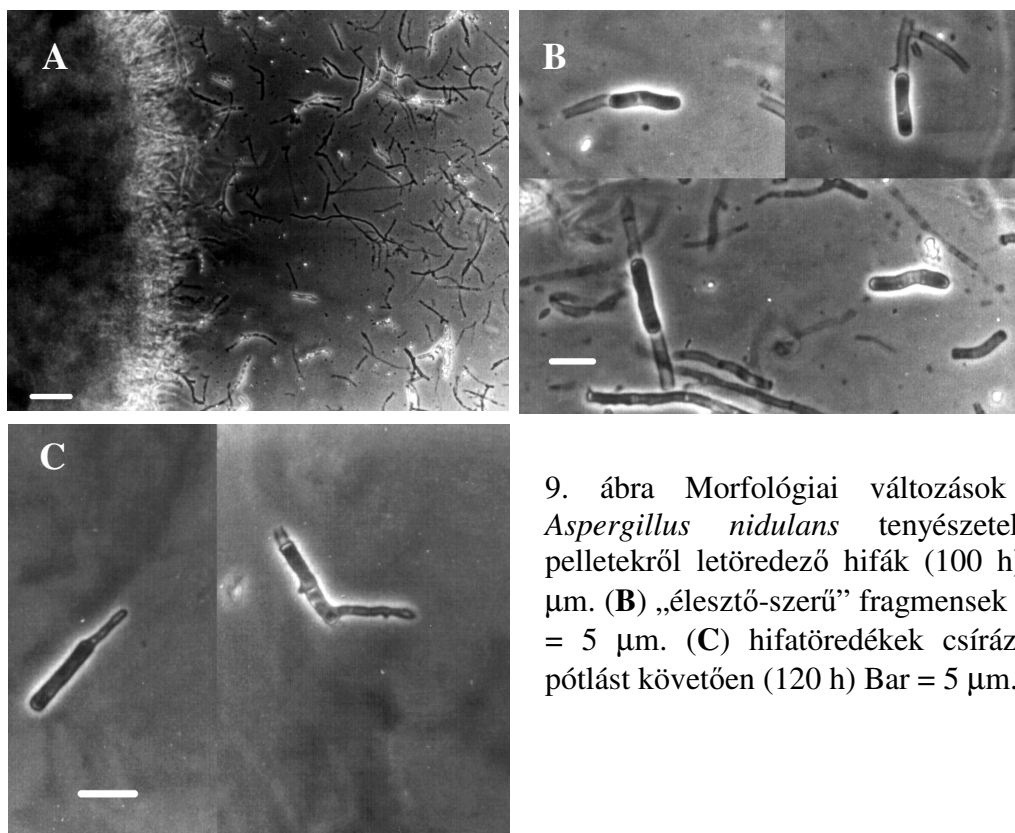
#### 3.1.1 Autolízis szénéhező *Aspergillus nidulans* tenyészetekben

Az *Aspergillus nidulans* növekedése a glükóz elfogyását követően három szakaszra volt bontható: stacioner fázis (25-35 h), korai autolitikus fázis (35-100 h) és kései autolitikus fázis (100- h). A stacioner fázisban a DCM elérte maximumát ( $6,6 \pm 0,5$  g/l n=6), majd előbb lassabban (korai autolitikus fázis) később gyorsabban (kései autolitikus fázis) kezdett csökkenni (8. ábra). A stacioner fázisban a tenyészetek pelletes morfológiát mutattak. A fonalak fragmentálódásának következtében a pelleték átmérője a korai autolitikus fázisban folyamatosan csökkent, a tápközegben ezzel párhuzamosan hosszabb-rövidebb fonaldarabok jelentek meg (9.A ábra). E fonalak darabolódásával 1-2 sejtből álló rövid hifa töredékek, „élesztő-szerű” képletek (Pusztahelyi és munkatársai, 1997a) képződtek (9.B ábra). Ezek száma mintegy 0,1-0,5 millió/ml volt, és lényegesen nem változott a tenyészet öregedése során. Friss tápközegbe átváltoztatva, vagy glükóz hozzáadását követően ezen hifa darabok képesek voltak kicsírázni, illetve növekedésnek indulni (9.C ábra). A kései autolitikus fázisban a fonalak intenzív darabolódásának hatására a pelleték végül szétestek, de a tenyészet ennek ellenére az autolízis során mindvégig megőrizte fonalas morfológiáját.

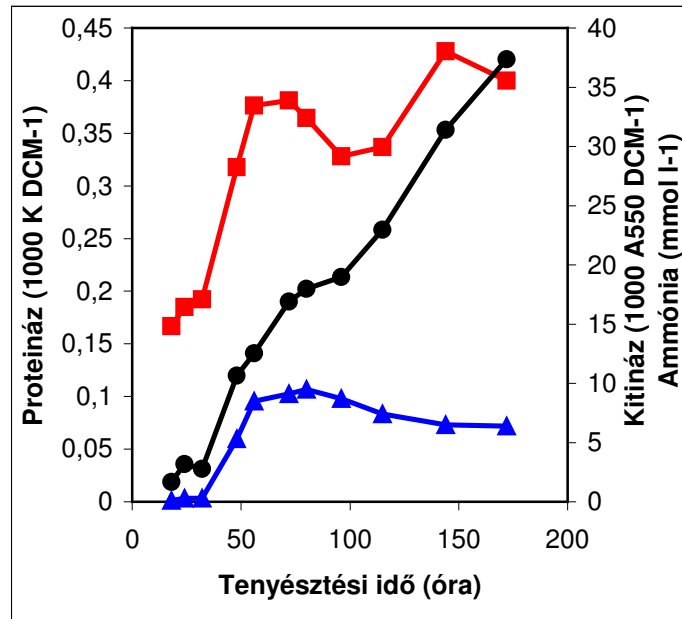
A glükóz elfogyását követően a várakozásnak megfelelően a légzés gyorsan csökkent, a korai autolitikus fázis elejére elért egy viszonylag alacsony értéket (8-10  $\mu\text{mol}/(\text{min mg DCM})$ ), ami a kései autolitikus fázisban tovább már nem változott (8. ábra). Ezzel párhuzamosan a tápközeg proteináz és kitináz aktivitása, valamint ammónia tartalma megnőtt (10. ábra).



8. ábra A tápközeg glükóz koncentrációjának (▲), a tenyészetek DCM-nak (●) és a micéliumok légzésének (■) változása *Aspergillus nidulans* FGSC 26 törzs süllyesztett kultúráiban. Az ábrán négy független mérés átlagát tüntettük fel; a szórás kevesebb, mint 12 % a légzés esetében kevesebb, mint 15 % volt.

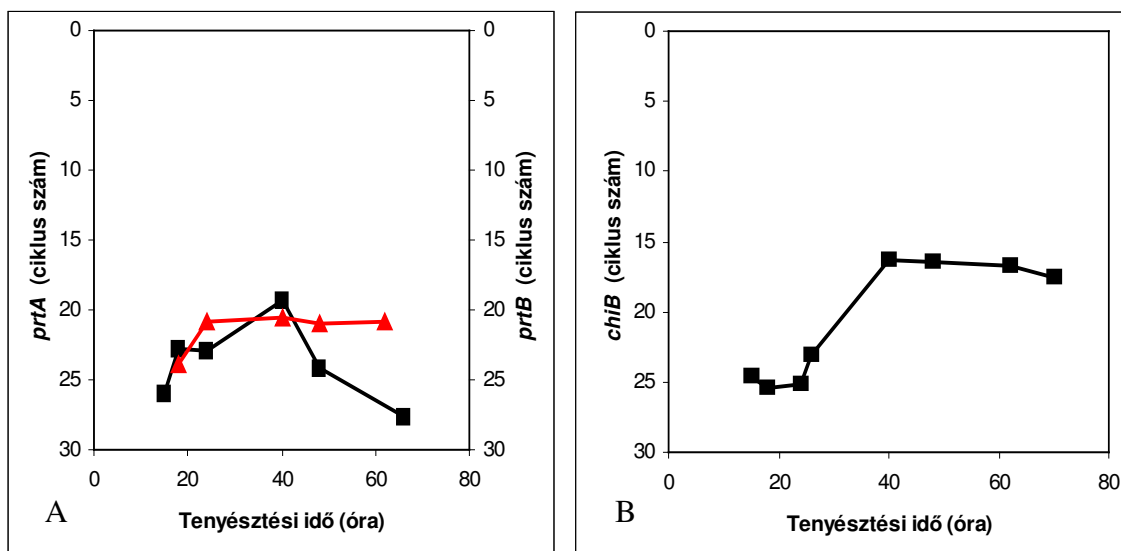


9. ábra Morfológiai változások autolizáló *Aspergillus nidulans* tenyészetekben. (A) pelletekről letöredező hifák (100 h) Bar = 20 µm. (B) „élesztő-szerű” fragmensek (120 h) Bar = 5 µm. (C) hifatöredékek csírázása glükóz pótlást követően (120 h) Bar = 5 µm.



10. ábra A tápközeg ammónia tartalmának (▲) proteináz (■), illetve kitináz (●) aktivitásának változása *Aspergillus nidulans* FGSC 26 törzs öregező tenyészteteiben. Az ábrán három független mérés átlagát tüntettük fel; a szórás kevesebb, mint 12 % volt.

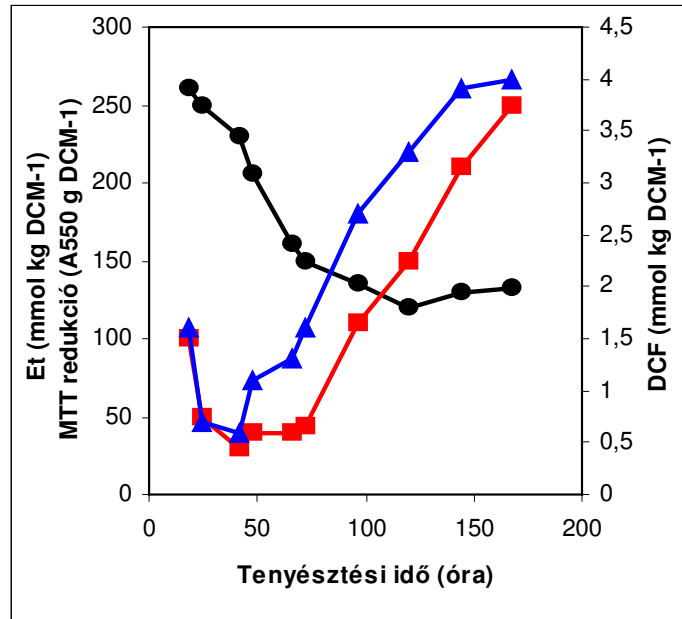
A megfigyelt enzimaktivitás-változásokkal összhangban a *prtA* és *prtB* (Katz és munkatársai, 1994; vanKuyk és munkatársai, 2000) proteinázokat kódoló gének, valamint a *chiB* (Yamazaki és munkatársai, 2007) kitináz kódoló gén indukcióját figyeltük meg a tenyésztés első 66 órájában (11. ábra). Sajnos az mRNS degradálódása a 66. óra után annyira felgyorsult, hogy megfelelő minőségű és mennyiségű RNS-t izolálni öregebb tenyészetekből már nem tudtunk (Pusztahelyi és munkatársai, 2006).



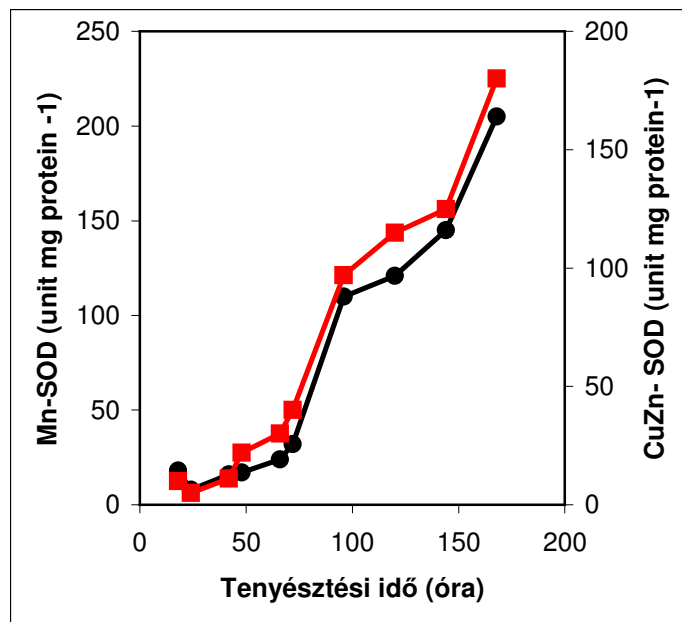
11. ábra A *prtA* (■), a *prtB* (▲) (A) és a *chiB* (B) gének expressziójának változása az *Aspergillus nidulans* FGSC 26 törzs sülyesztett tenyészeiben. Az ábrán három független mérés átlagát tüntettük fel; a szórás kevesebb, mint 12 % volt.

### 3.1.2 Redox változások szénéhező *Aspergillus nidulans* tenyészetekben

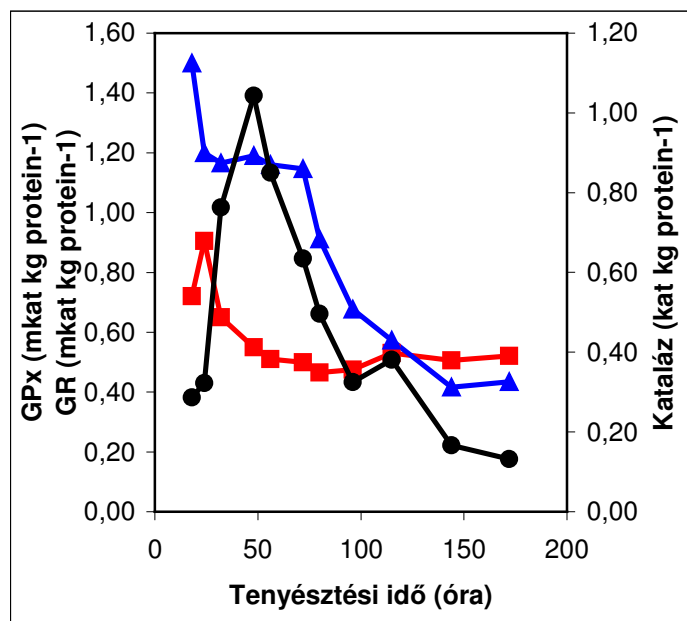
A glükóz elfogyását követően a sejtek szuperoxid és peroxid tartalma egyenesen növekedett (12. ábra). Minél öregebb volt a tenyészet annál több ROS halmozódott fel a sejtekben, miközben a tenyészet specifikus MTT redukáló aktivitása (amit Lee és munkatársai (1999) az élő sejtek arányának jellemzésére használtak) folyamatosan csökkent (12. ábra). A gyökök akkumulálódását egyes antioxidáns enzimek, így a szuperoxid diszmutáz (SOD) és kataláz indukciója követte, míg a glutation peroxidáz (GPx) már a reaktív gyökök akkumulálódásának megindulása előtt indukálódott (12, 14. ábra). A vizsgált enzimek közül a specifikus CuZn- és a Mn-SOD aktivitások mindvégig növekedtek a tenyészet öregedése alatt (13. ábra). A GPx és a kataláz esetében csak a stacioner, illetve a korai autolitikus fázisban figyeltünk meg egy átmeneti indukciót, később ezen enzimek aktivitása csökkent (14. ábra). A kataláz aktivitásokban megfigyelt változásokért a *catB* gén volt felelős, a *catA* és *catC* gének transzkripciója megközelítőleg konstitutív volt (15. ábra).



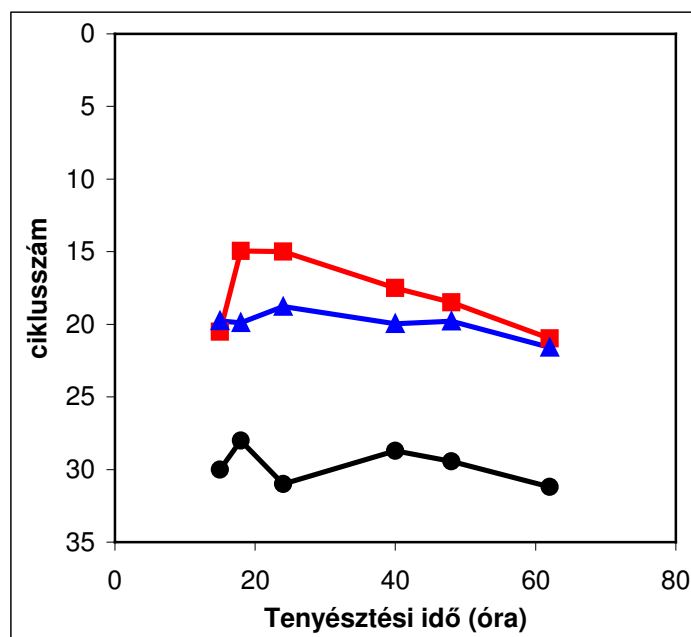
12. ábra *Aspergillus nidulans* tenyészetek MTT redukáló képességének (●), valamint intracelluláris szuperoxid (Et) (■) és peroxid (DCF) (▲) tartalmának változása öregedő tenyészetekben. Az ábrán három-négy független mérés átlagát tüntettük fel; a szórás kevesebb, mint 15 % volt.



13. ábra A specifikus CuZn- (■) és Mn-SOD (●) aktivitásainak és az alternatív légzés arányának (▲) változása öregedő *Aspergillus nidulans* tenyészetekben. Az ábrán három független mérés átlagát tüntettük fel; a szórás kevesebb, mint 15 % volt.



14. ábra A specifikus kataláz (●), GPx (■) és GR (▲) aktivitások változása öregedő *Aspergillus nidulans* tenyészetekben. Az ábrán három-négy független mérés átlagát tüntettük fel; a szórás kevesebb, mint 12 % volt.

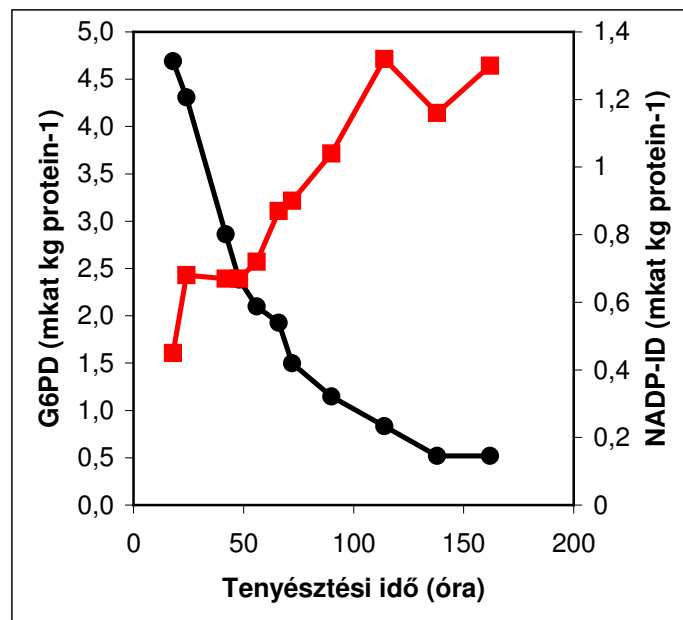


15. ábra A *catA* (●), *catB* (■) és a *catC* (▲) gének expressziójának változása az *Aspergillus nidulans* RKH51.117 „vad” típusú törzsének sülyesztett tenyészeitében. Az ábrán három független mérés átlagát tüntettük fel; a szórás kevesebb, mint 12 % volt.

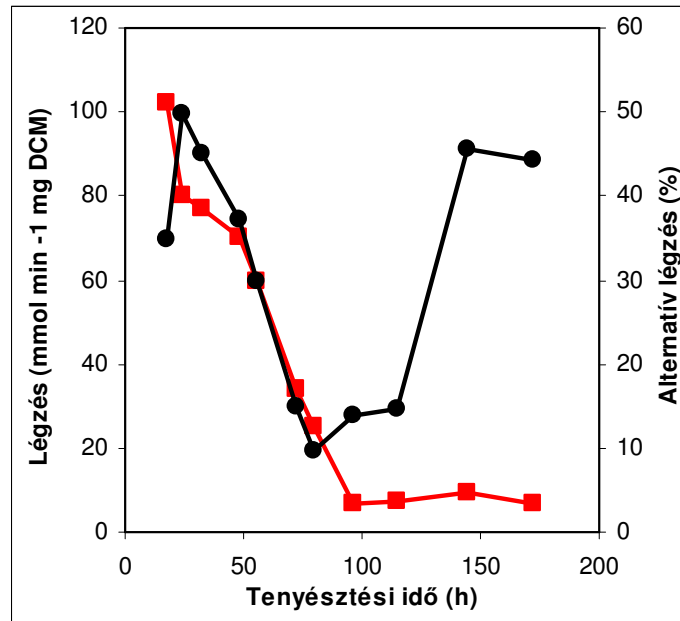
A GR és a G6PD aktivitása egyenletesen csökkent a szénéhezés alatt (14, 16. ábra), ezzel szemben egy másik NADPH termelő enzim, a NADP-ID indukcióját figyeltük meg (16. ábra).

A cián-rezisztens légzés aránya a stacioner és a korai autolitikus fázisban csökkent, majd a kései autolitikus fázisban ismét emelkedni kezdett (17. ábra).

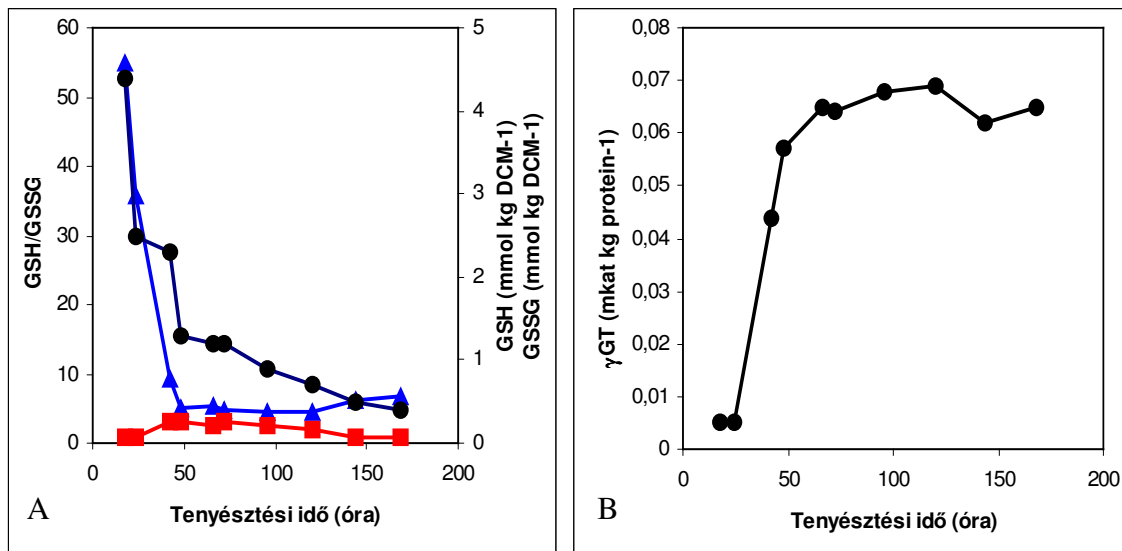
Szénéhező *Aspergillus nidulans* tenyészetekben a GSH mennyisége folyamatosan csökkent, míg a GSSG koncentrációja átmenetileg nőtt (18.A ábra). Ezért a GSH/GSSG arány gyors csökkenése volt megfigyelhető (18.A ábra). A GSH gyors fogyásával párhuzamosan a GSH lebontásáért felelős  $\gamma$ GT indukcióját figyeltük meg (18.B ábra). A glutation-S-transzferáz (GST) aktivitása lényegében alig változott 0,03 és 0,05 mkat kg protein<sup>-1</sup> között ingadozott.



16. ábra A specifikus G6PD (●) és NADP-ID (■) aktivitások változása öregedő *Aspergillus nidulans* tenyészetekben. Az ábrán három független mérés átlagát tüntettük fel; a szórás kevesebb, mint 12 % volt.



17. ábra A tenyészetek légzésének (■) és az alternatív légzés arányának (●) változása *Aspergillus nidulans* FGSC 26 törzs sülyesztett kultúráiban. Az ábrán négy független mérés átlagát tüntettük fel; a szórás kevesebb, mint 12 % volt.

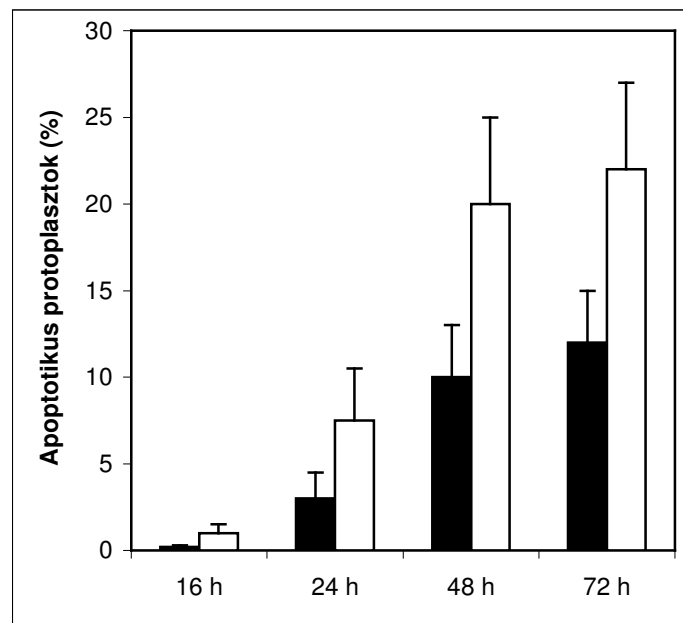


18. ábra A sejtek GSH (●), GSSG (■) és GSH/GSSG (▲) tartalmának (A) és specifikus  $\gamma$ GT aktivitásának (B) változása *Aspergillus nidulans* FGSC 26 törzs öregedő tenyészeiben. Az ábrán három független mérés átlagát tüntettük fel; a szórás kevesebb, mint 12 %, a GSH/GSSG aránynál kevesebb, mint 18% volt..

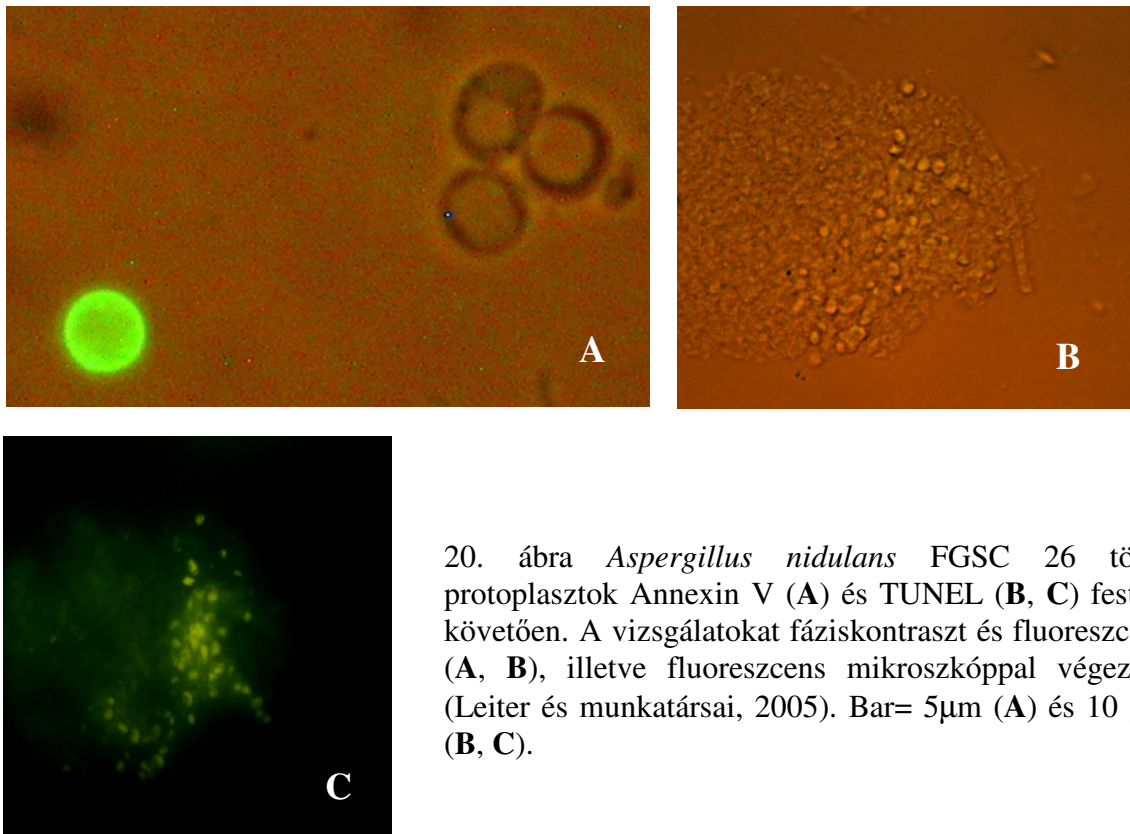
### 3.1.3 Apoptózis és apoptotikus markerek kifejeződése *Aspergillus nidulans* szénéhező tenyészeiben

A glükóz elfogyását követően folyamatosan nőtt azon sejtek/protoplasztok aránya, amelyek apoptózisra utaló tulajdonságokat mutattak. Mind a membrán inverziót, mind a DNS fragmentációt sikerült kimutatnunk (19, 20. ábra).

A fent megfigyelttel párhuzamosan lényeges változásokat tapasztaltunk a sejtmagok morfológiájában is. A tenyésztési idő előre haladtával folyamatosan nőtt a megnyúlt, abnormális morfológiájú magok aránya (21. A, B, C ábra). A tenyésztés 168. órájában ezen abnormális morfológiájú magok száma elérte a 20 %-ot.

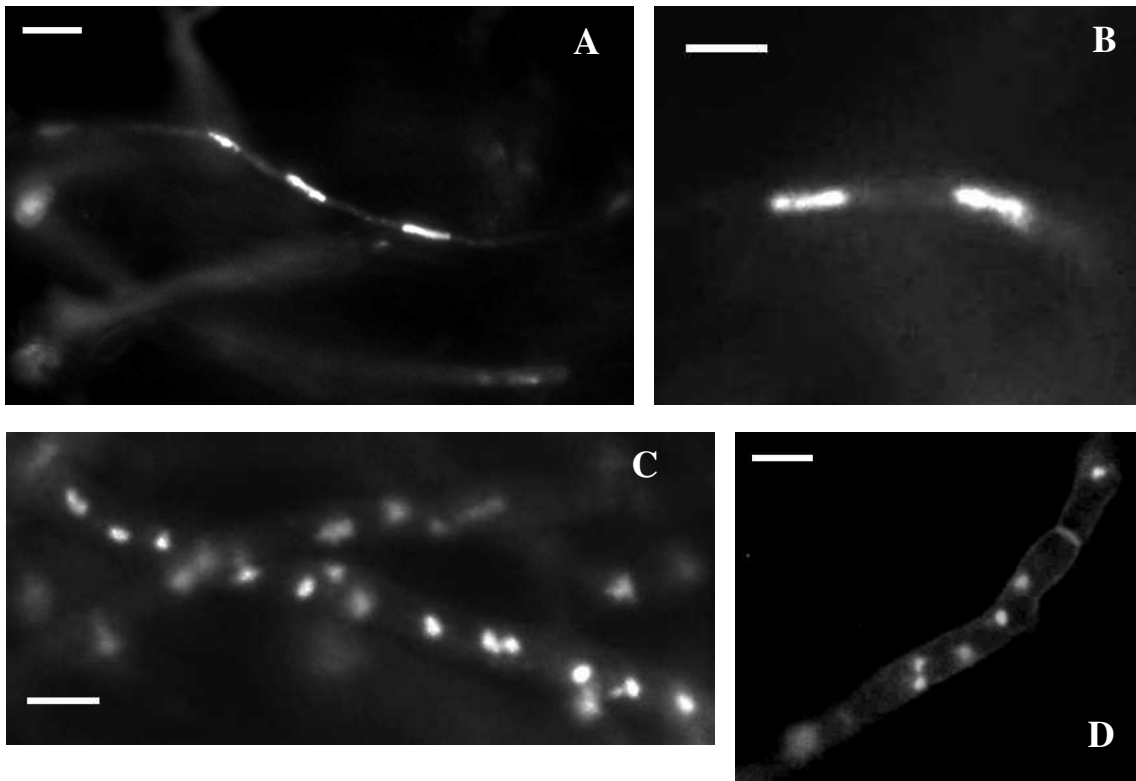


19. ábra Apoptotikus markerek időbeni változása *Aspergillus nidulans* FGSC 26 törzs tenyészeiben. A foszfatidil-szerin externalizációt (Anexin V pozitív; fekete oszlopok) és az intenzív DNS fragmentációt mutató sejteket protoplasztálást követően számoltuk meg. Az ábrán négy független mérés átlagából számolt SD értéket tüntettük fel.

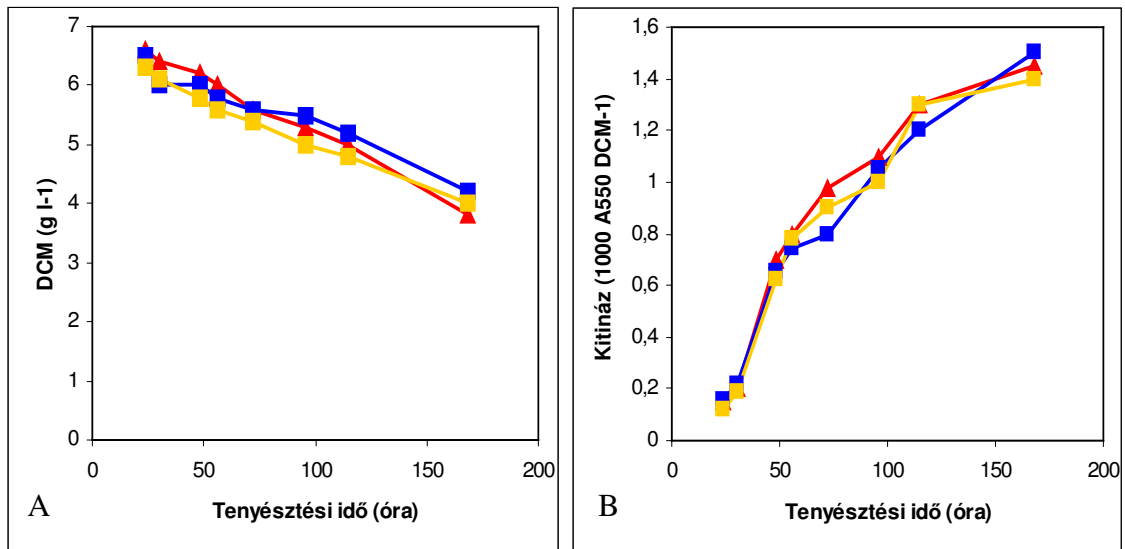


20. ábra *Aspergillus nidulans* FGSC 26 törzs protoplasztok Annexin V (A) és TUNEL (B, C) festést követően. A vizsgálatokat fáziskontraszt és fluoreszcens (A, B), illetve fluoreszcens mikroszkóppal végeztük (Leiter és munkatársai, 2005). Bar= 5 $\mu$ m (A) és 10  $\mu$ m (B, C).

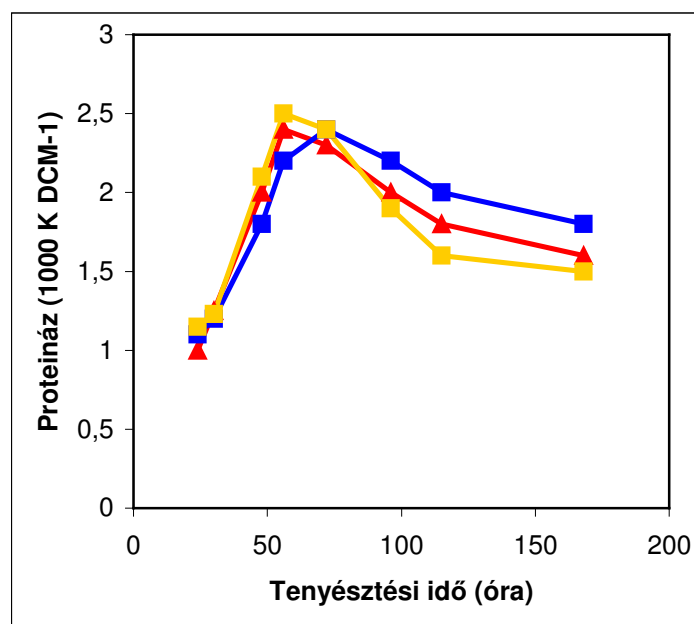
Az FGSC 26 törzs süllyesztett kultúráihoz a tenyésztés 30. órájában 0,05 g/l D,L-dihidroszfingozint, vagy 0,03 g/l fitoszfingozint adva az apoptotikus sejtek száma több mint kétszeresére nőtt. Az Annexin V pozitív protoplasztok száma a kontroll FGSC 26 tenyészetben  $11 \pm 3\%$ , a D,L-dihidroszfingozinnal kezelt FGSC 26 tenyészetben  $25 \pm 4\%$ , míg a fitoszfingozinnal kezelt FGSC 26 tenyészetben  $28 \pm 5\%$  volt (az eredmények négy független mérés átlagából származnak). A fenti változásokkal párhuzamosan sem a szárazanyag-tartalom mennyiségének csökkenését, sem a pelleték szétesését, sem pedig az extracelluláris hidrolázok (kitináz, proteínáz) aktivitásának növekedését (22, 23. ábra) nem sikerült megfigyelniük.



21. ábra A sejtmagok morfológiájának változása *Aspergillus nidulans* FGSC 26 törzs autolizáló tenyészeiben. Megnyúlt, pálca-szerű sejtmagok DAPI festett hifákban (72 h) (**A**, **B**). Átlagos morfológiával rendelkező DAPI festett sejtmagok exponenciális növekedési fázisban lévő fonálban (20 h) és autolitikus hifa darabban (72 h) (**C**, **D**). Bar= 10 $\mu$ m (**A**), 5  $\mu$ m (**B**) és 3  $\mu$ m (**C**, **D**).



22. ábra A DCM (A) és az extracelluláris kítináz aktivitás (B) változása az *Aspergillus nidulans* (FGSC 26) (0,03 g/l) fitoszfingozinnal (■) és (FGSC 26) (0,05 g/l) D,L-dihidroszfingozinnal (■) kezelt (30 h), illetve kontroll (▲) tenyészetek süllyesztett kultúráiban. Az ábrán négy független mérés átlagát tüntettük fel; a szórás kevesebb, mint 12 % volt.

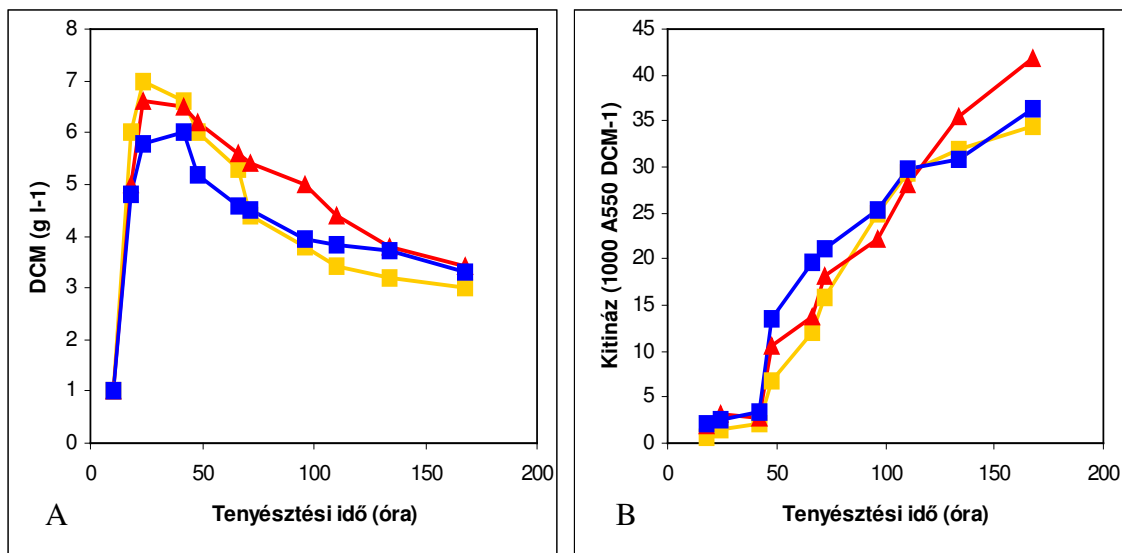


23. ábra Az extracelluláris proteináz aktivitás-változása az *Aspergillus nidulans* (FGSC 26) (0,03 g/l) fitoszfingozinnal (■) és (FGSC 26) (0,05 g/l) D,L-dihidroszfingozinnal (■) kezelt (30 h), illetve kontroll (▲) tenyészetek süllyesztett kultúráiban.. Az ábrán négy független mérés átlagát tüntettük fel; a szórás kevesebb, mint 12 % volt.

## 3.2 A G-protein mediált jelátviteli útvonalak szerepe az *Aspergillus nidulans* szénéhező tenyészeiben

### 3.2.1 A *fadA*<sup>G203R</sup> és *ΔflbA* mutációk hatása az *Aspergillus nidulans* szénéhező tenyészeire

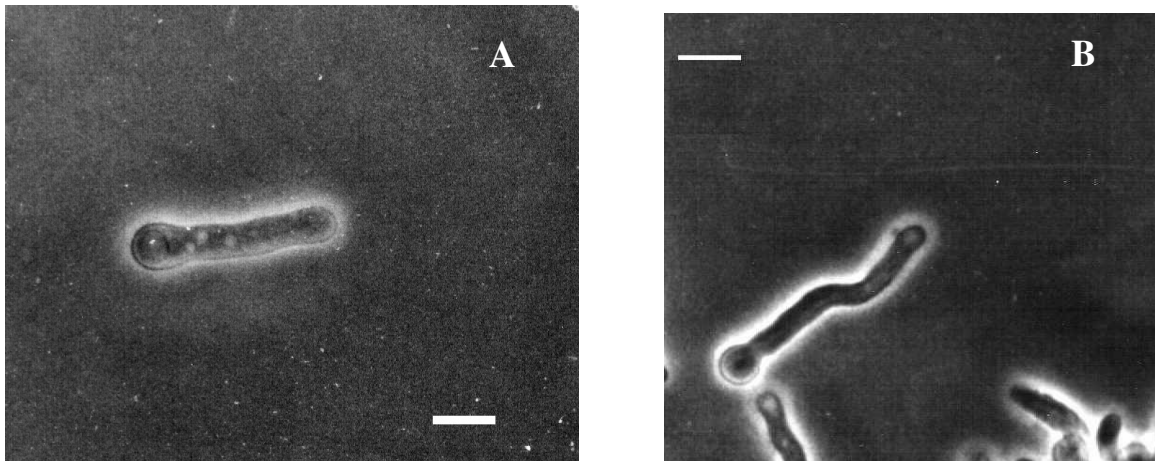
A *ΔflbA* (RJH046) és *fadA*<sup>G203R</sup> (FGSC 1035) mutációk nem okoztak szignifikáns változást sem a tenyészetek szárazanyag-tartalmának változásában (24.A ábra), sem kitináz termelésében (24.B ábra).



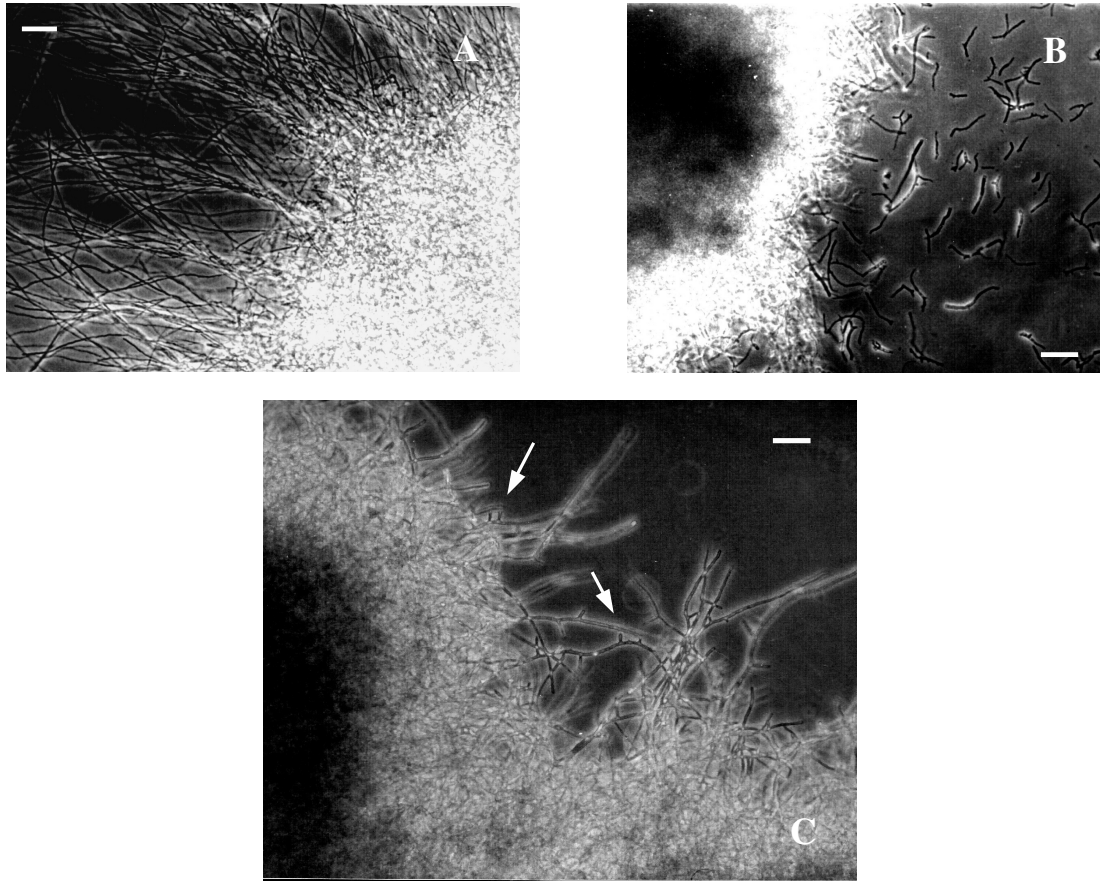
24. ábra A DCM (A) és a kitináz (B) aktivitás-változása az *Aspergillus nidulans fadA*<sup>G203R</sup> (FGSC 1035) (■), *ΔflbA* (RJH046) (■) és kontroll (FGSC 26) (▲) törzseinek sülyesztett kultúráiban. Az ábrán három független mérés átlagát tüntettük fel; a szórás kevesebb, mint 12 % volt.

A fentiekkel szemben a mutáns törzsek sülyesztett kultúráinak morfológiájában számos változás volt tetten érhető: a *ΔflbA* (RJH046) törzs konidiumai a leoltást követő 5. óra után szokatlanul vaskos csíratömlőket képeztek, majd az exponenciális fázis végén a kontrollhoz hasonló méretű, de attól eltérő morfológiájú pelletek képződtek (25, 26. ábra). A pelletek felületén hosszú, el nem ágazó, intenzíven növekvő fonalak voltak megfigyelhetőek („fluffy” pelletek). A stacioner fázis során konidiofórok, illetve konidiumok képződését sem a mutáns, sem a kontroll törzsekben nem sikerült megfigyelni (26. ábra). A tenyészetek az

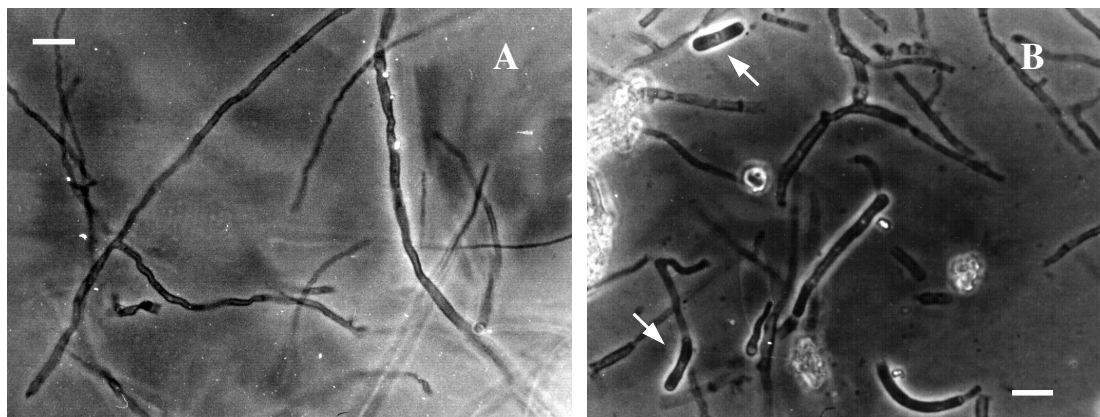
autolízis alatt igen sokáig megőrizték pelletes morfológiájukat. A fonalak fragmentációja lassú volt, ennek következtében csak kevés „élesztő-szerű” (egy-két sejtből álló fonáldarab, fragmentum) sejt keletkezett ( $1 \times 10^4/\text{ml}$ ) (27. ábra). A *fadA*<sup>G203R</sup> mutáció nem okozott hasonló változást sem a csíratömlők, sem a pelletek morfológiájában. A késői exponenciális fázisban a pelletek átmérője azonban csak a kontroll törzs hasonló korú tenyészetében található pelletméret felét érték el (28. ábra). A stacioner fázisban konidiofórok és Hülle sejtek jelentek meg a *fadA*<sup>G203R</sup> (FGSC 1035) tenyészetében, ez azért érdekes, mert a kontroll törzs kultúráiban ilyen körülmények között Hülle sejt és konidiofór képzése nem volt megfigyelhető (29. ábra). Az autolitikus fázis során a micélium feldarabolódásával „élesztő-szerű” fragmensek képződtek ( $0,3-0,7 \times 10^6/\text{ml}$ ), amelyek a kontroll törzs tenyészetéhez hasonló számban ( $0,1-0,5 \times 10^6/\text{ml}$ ) jelentek meg.



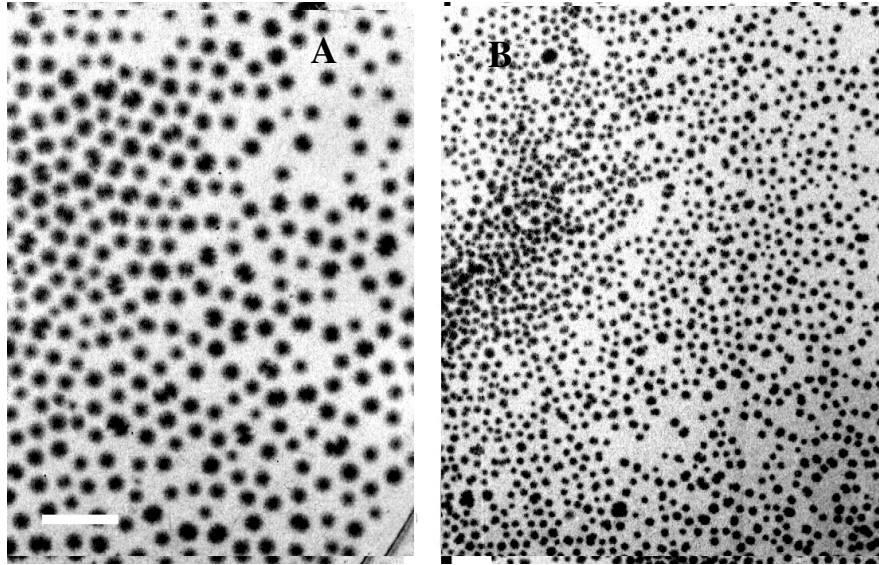
25. ábra *Aspergillus nidulans* *AflbA* (RJH046) (A) és kontroll (FGSC 26) (B) törzsek konidiumainak csírázása a leoltást követő 7. órában. Bar=5  $\mu\text{m}$ .



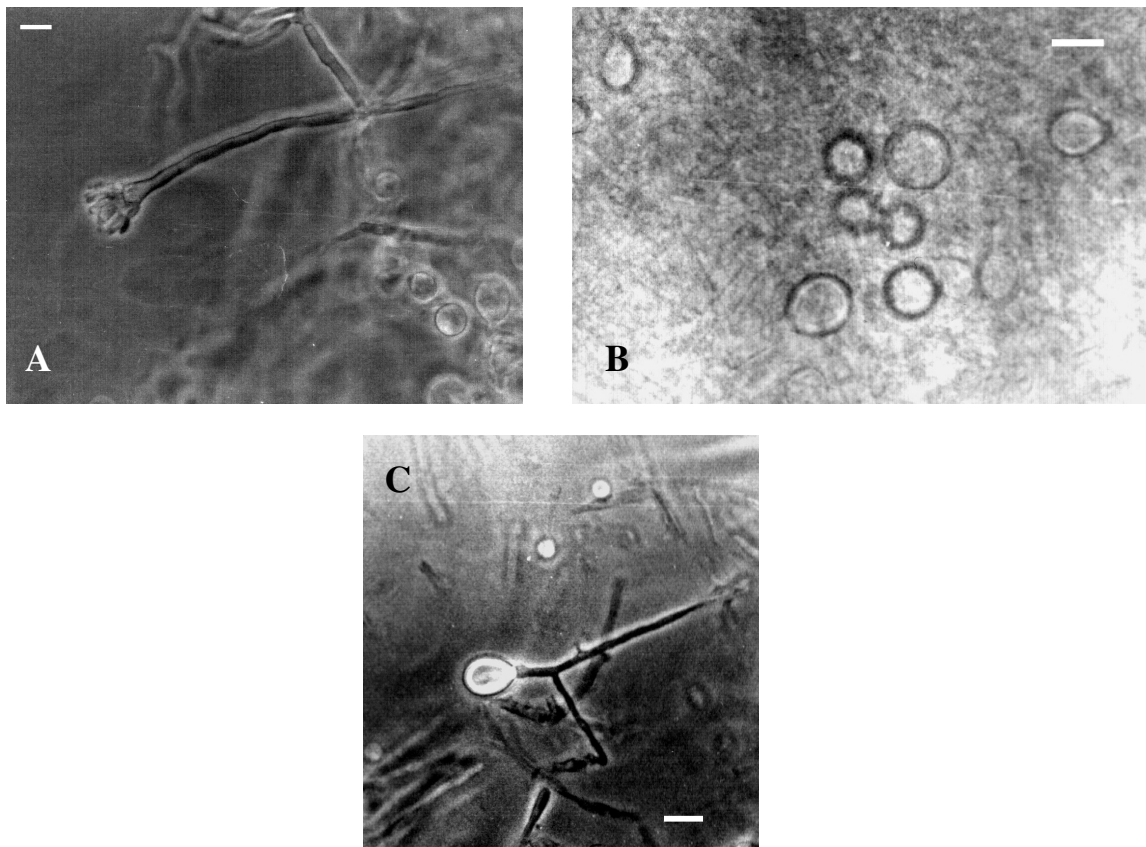
26. ábra A  $\Delta flbA$  (RJH046) (24h) (A); kontroll (FGSC 26) (24h) (B); és a  $fadA^{G203R}$  (FGSC 1035) (20h) (C) *Aspergillus nidulans* törzsek pelleteinek morfológiája a késői exponenciális növekedési fázisban. A nyíl a  $fadA^{G203R}$  (FGSC 1035) törzsre jellemző rövid oldalelágazásokat mutatja. Bar=20  $\mu$ m.



27. ábra Fragmentálódó fonalak morfológiája 160 órás inkubációt követően autolizáló *Aspergillus nidulans* tenyészetekben:  $\Delta flbA$  mutáns (A) és kontroll (FGSC 26) (B) törzsek esetében. A nyilak „élesztő-szerű” sejteket jelölnek. Bar=5  $\mu$ m.



28. ábra Pellet méretek a kontroll (FGSC 26) (A) és *fadA*<sup>G203R</sup> (FGSC 1035) (B) törzsek 24 órás tenyészeiben. Bar=10 mm. Az átlagos pellet átmérő és a standard deviáció  $2,9\pm 0,3$  ( $n=30$ ) és  $1,2\pm 0,2$  ( $n=30$ ) volt.



29. ábra A *fadA*<sup>G203R</sup> mutáns morfológiája a stationer fázisban (140 h). A: konidiofór Hülle sejtekkel, B: Hülle sejt egy pellet belsejében C: Hülle sejt fragmentálódott fonal darabon. Bar=5  $\mu$ m.

Az FlbA/FadA útvonal a proteináz termelés időbeni lefutását változtatta meg, a mért aktivitások nagyságát alig befolyásolta (30.A ábra).

A proteináz kódoló gén (*prtA*) expressziós mintázatát az *flbA* gén deléciója, illetve a *fadA* domináns interferáló mutációja, a proteináz aktivitásban mért változásokhoz hasonlóan, jelentősen módosította a tenyésztés első 60 óra alatt (30.B ábra).

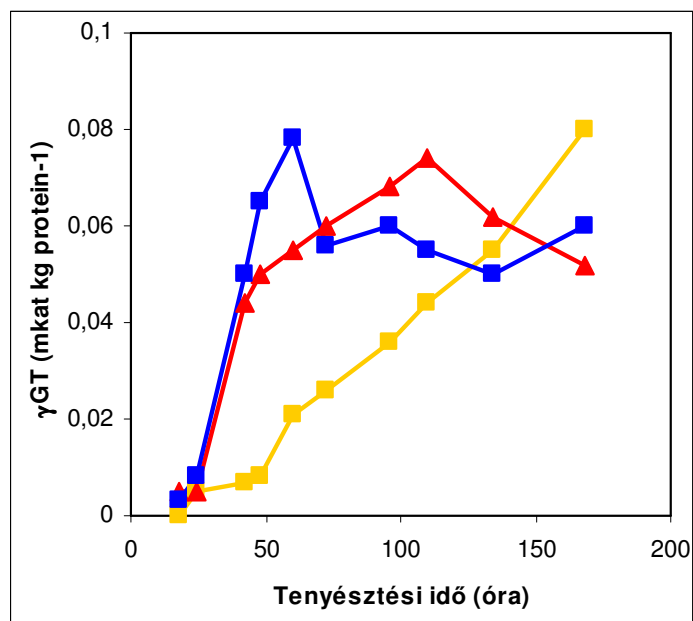
A  $\gamma$ GT esetében „csupán” az aktivitás-változás időbeni lefutása változott az FlbA/FadA pár mutációjának hatására (31. ábra). A  $\gamma$ GT aktivitás-változásában a kontroll és a mutáns törzsek között megfigyelhető különbségek a sejtek GSH tartalmának változásában is nyomon követhetők voltak (32. ábra).



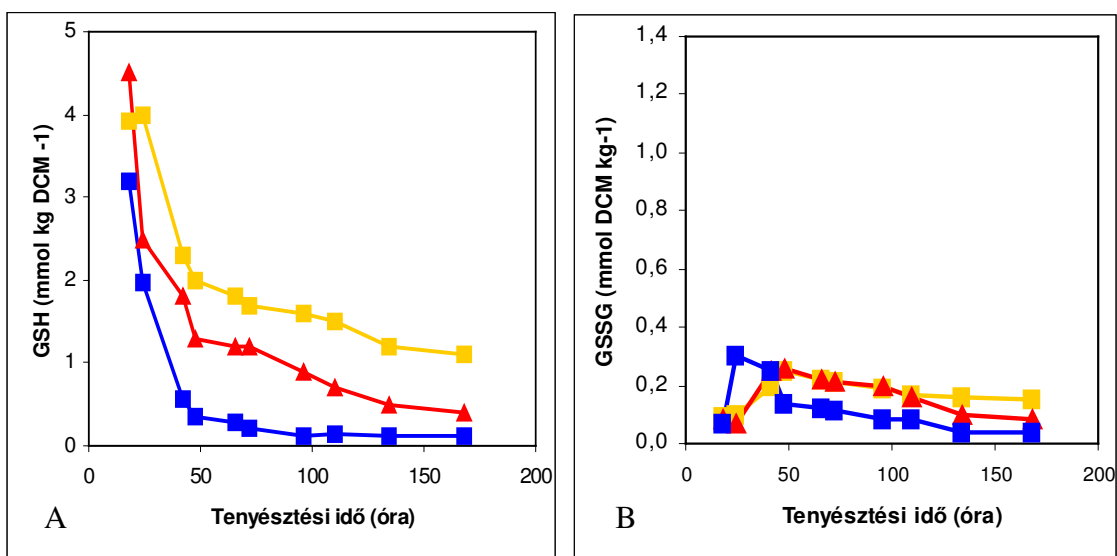
30. ábra A proteináz aktivitás (A) és a *prtA* génexpresszó változása (B) az *Aspergillus nidulans fadA*<sup>G203R</sup> (FGSC 1035) (■),  $\Delta$ *flbA* (RJH046) (■) és kontroll (FGSC 26) (▲) törzseinek sülyesztett kultúráiban. Az ábrán három független mérés átlagát tüntettük fel; a szórás kevesebb, mint 12 % volt.

Itt érdemes megjegyezni, hogy míg a FadA/FlbA útvonal az antioxidáns enzimek közül a kataláz aktivitás mértékére, illetve annak időbeni lefutására nem hatott, addig a  $\Delta$ *flbA* mutáció csökkentette, a *fadA*<sup>G203R</sup> pedig növelte a GPx termelés mértékét (33. ábra).

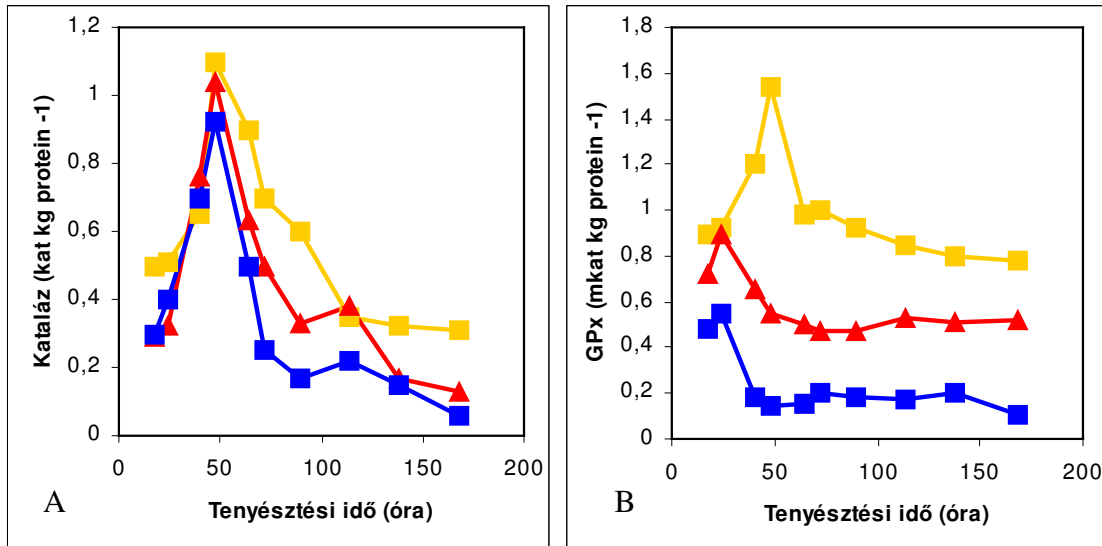
A  $\Delta$ *flbA* törzs esetében a kontrollhoz viszonyítva kis mértékben fokozott gyök akkumuláció volt megfigyelhető (34. ábra).



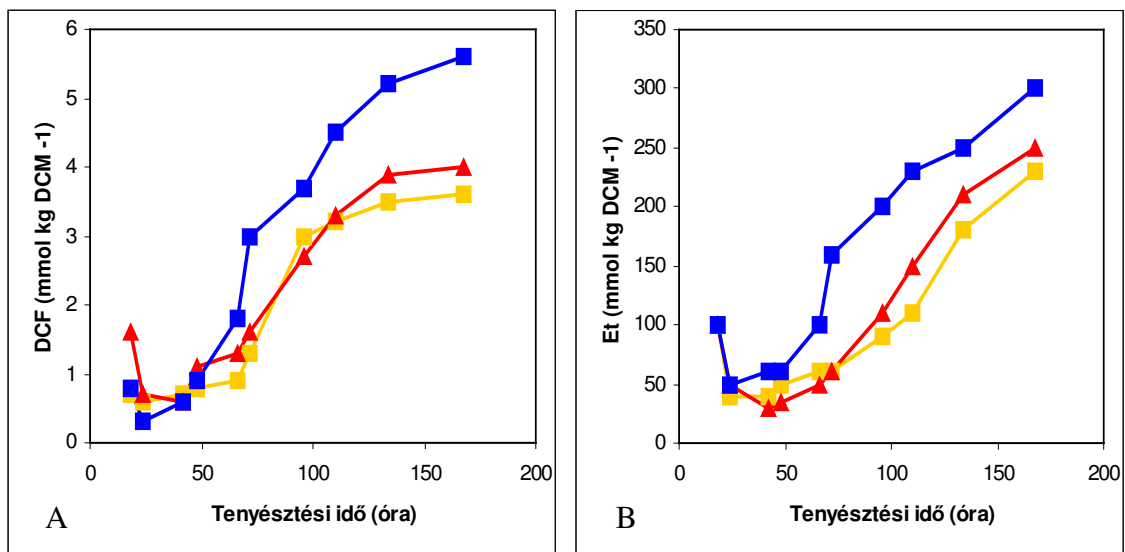
31. ábra A  $\gamma$ GT aktivitás-változása az *Aspergillus nidulans fada*<sup>G203R</sup> (FGSC 1035) (■), *ΔflbA* (RJH046) (■) és kontroll (FGSC 26) (▲) törzseinek sülyesztett kultúráiban. Az ábrán három független mérés átlagát tüntettük fel; a szórás kevesebb, mint 12 % volt.



32. ábra A sejtek GSH (A) és GSSG (B) tartalmának változása *Aspergillus nidulans fada*<sup>G203R</sup> (FGSC 1035) (■), *ΔflbA* (RJH046) (■) és kontroll (FGSC 26) (▲) törzseinek sülyesztett kultúráiban. Az ábrán három független mérés átlagát tüntettük fel; a szórás kevesebb, mint 12 % volt.



33. ábra A kataláz (A) és GPx (B) aktivitás-változása az *Aspergillus nidulans* (A) *fadA*<sup>G203R</sup> (FGSC 1035) (■), *ΔflbA* (RJH046) (■) és kontroll (FGSC 26) (▲) törzseinek sülyesztett kultúráiban. Az ábrán három független mérés átlagát tüntettük fel; a szórás kevesebb, mint 12 % volt.



34. ábra *Aspergillus nidulans fadA*<sup>G203R</sup> (FGSC 1035) (■), *ΔflbA* (RJH046) (■) és kontroll (FGSC 26) (▲) törzsei tenyésztéseinek intracelluláris peroxid (DCF) (A) és szuperoxid (Et) (B) tartalom változása. Az ábrán három-négy független mérés átlagát tüntettük fel; a szórás kevesebb, mint 15 % volt.

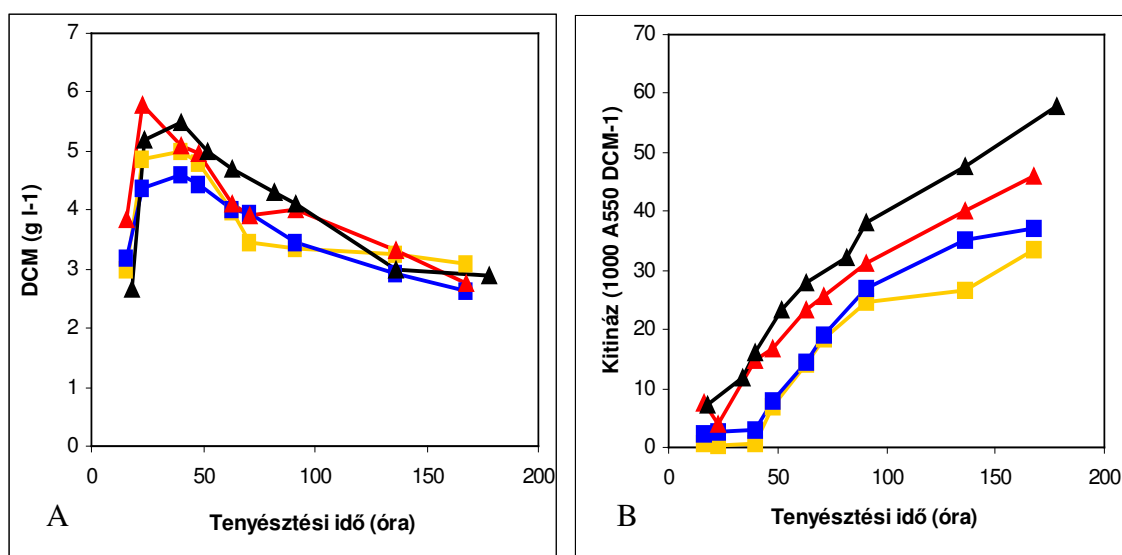
### 3.2.2 A $\Delta ganB$ , a $\Delta rgsA$ és $\Delta ganB\Delta rgsA$ mutációk hatása az *Aspergillus nidulans* szénéhezõ tenyészeire

Hasonlóan a *fadA*<sup>G203R</sup> (FGSC 1035),  $\Delta flbA$  (RJH046) mutációkhoz a  $\Delta ganB$  (RMdgB03), a  $\Delta rgsA$  (RKH51.09) és a  $\Delta ganB\Delta rgsA$  (RKH52.02) mutációk sem okoztak jelentõs eltérést a kontroll törzshöz (RKH51.117) viszonyítva a tenyészetek szárazanyag-tartalmának változásában vagy kitináz termelésében (35. ábra).

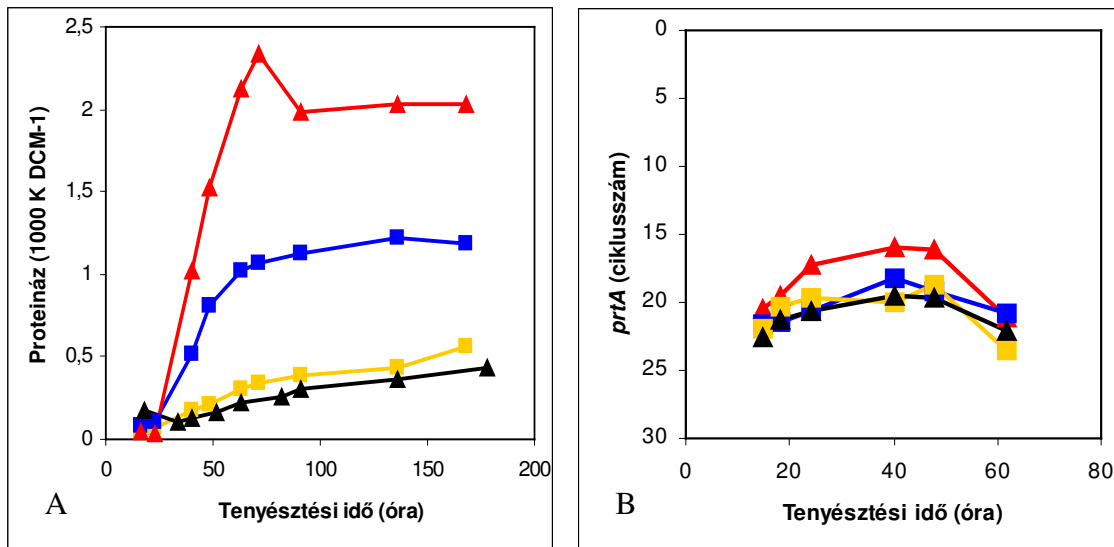
A *ganB* és *rgsA* gének hiánya a *fadA*<sup>G203R</sup> és a  $\Delta flbA$  mutációknál tapasztaltakkal szemben nem okozott számottevõ változást a tenyészetek morfológiáját illetõen.

Az *rgsA/ganB* gének hiányában a proteináz aktivitás számottevõen csökkent (36.A ábra), míg a  $\gamma$ GT aktivitás a mutáns törzsekben jelentõsen megnõtt a kontroll törzshöz viszonyítva (37 ábra). A megnövekedett  $\gamma$ GT aktivitás nem eredményezett sem gyorsabb GSH koncentráció csökkenést, sem fokozott GSSG szint emelkedést a sejtekben (38. ábra).

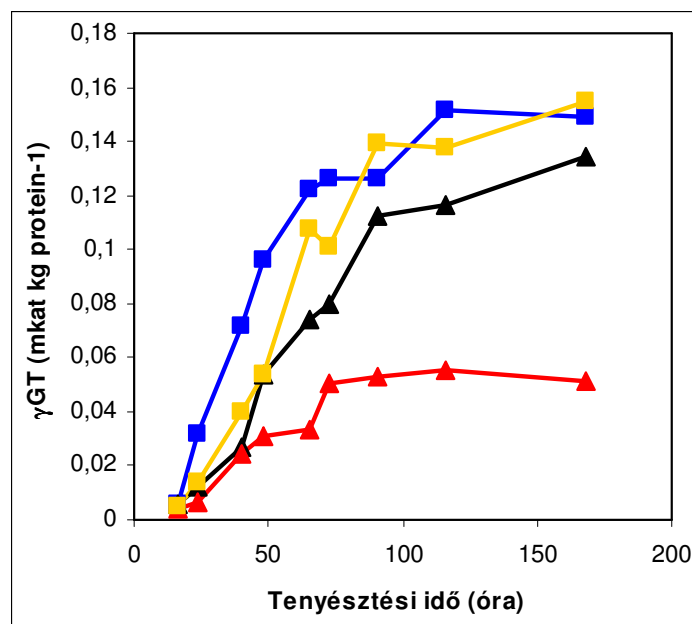
A proteináz aktivitás csökkenés háttérében a *prtA* gén expressziójának megváltozása állhat (36.B ábra).



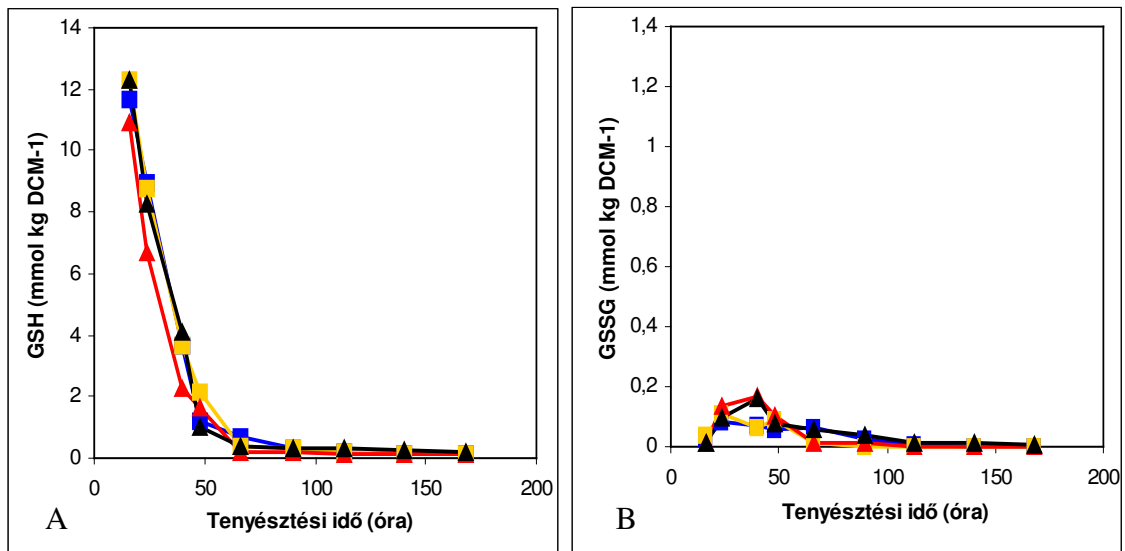
35. ábra A DCM (A) és a kitináz aktivitás-változása (B) az *Aspergillus nidulans*  $\Delta ganB$  (RMdgB03) (□),  $\Delta rgsA$  (RKH51.09) (■),  $\Delta ganB\Delta rgsA$  (RKH52.02) (▲) és kontroll (RKH51.117) (▲) törzseinek sülyesztett kultúráiban. Az ábrán három független mérés átlagát tüntettük fel; a szórás kevesebb, mint 12 % volt.



36. ábra A proteináz aktivitásának (A) és a *prtA* gén expressziójának (B) változása az *Aspergillus nidulans*  $\Delta$ *ganB* (RMdgb03) (■),  $\Delta$ *rgsA* (RKH51.09) (■),  $\Delta$ *ganB* $\Delta$ *rgsA* (RKH52.02) (▲) és kontroll (RKH51.117) (▲) törzseinek süllyesztett kultúráiban. Az ábrán három független mérés átlagát tüntettük fel; a szórás kevesebb, mint 12 % volt.



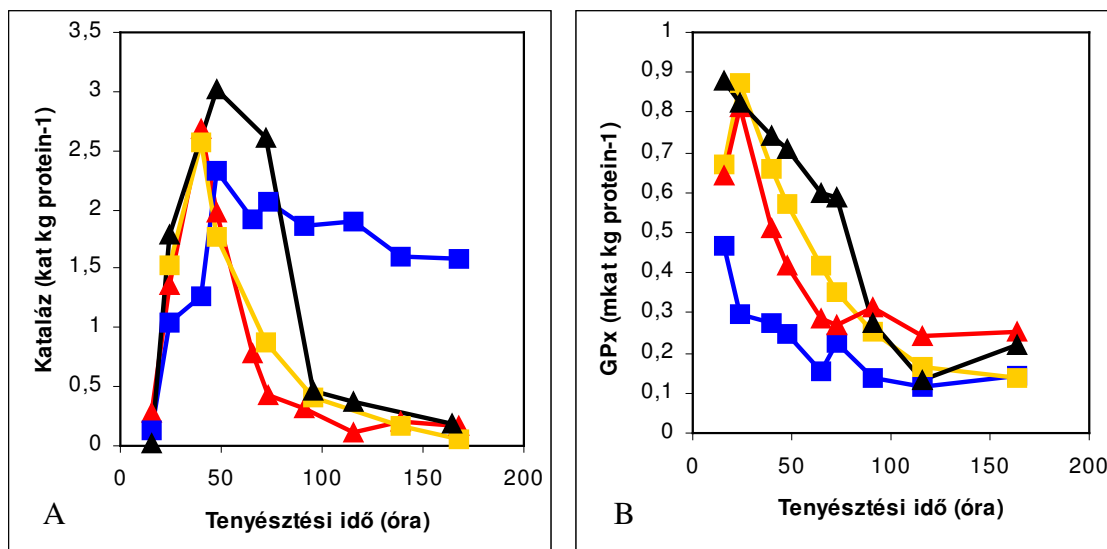
37. ábra A  $\gamma$ GT változása az *Aspergillus nidulans*  $\Delta$ *ganB* (RMdgb03) (■),  $\Delta$ *rgsA* (RKH51.09) (■) és  $\Delta$ *ganB* $\Delta$ *rgsA* (RKH52.02) (▲) és kontroll (RKH51.117) (▲) mutáns törzseinek süllyesztett tenyészteteiben. Az ábrán három független mérés átlagát tüntettük fel; a szórás kevesebb, mint 12 % volt.



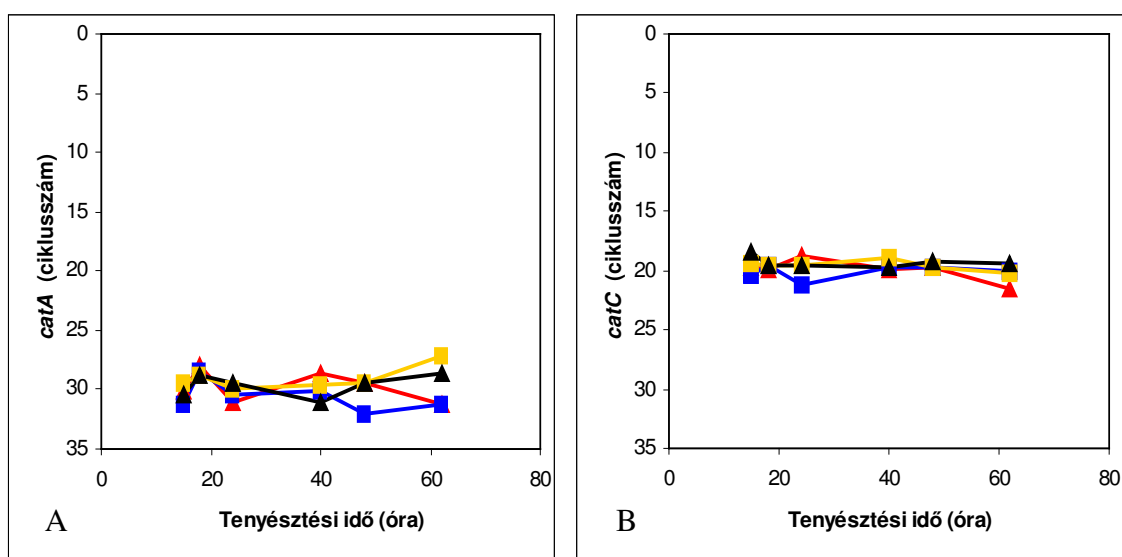
38. ábra A sejtek GSH (A) és GSSG (B) tartalmának változása *Aspergillus nidulans*  $\Delta$ ganB (RMdgb03) (■),  $\Delta$ rgsA (RKH51.09) (■),  $\Delta$ ganB $\Delta$ rgsA (RKH52.02) (▲), és kontroll (RKH51.117) (▲) törzseinek sülyesztett kultúráiban. Az ábrán három független mérés átlagát tüntettük fel; a szórás kevesebb, mint 12 % volt.

Az FGSC 26 törzs esetében a kataláz termelés indukciója a stacioner, illetve a korai autolitikus fázisban volt megfigyelhető, később az enzim aktivitása csökkent (14. ábra). A kontroll (RKH51.117) törzs és a  $\Delta$ ganB (RMdgb03) törzs kataláz aktivitás-változása nagyon hasonlóan alakult. Ezzel szemben az  $\Delta$ rgsA mutáns tenyészetének kataláz termelése az 50. órától lassabban csökkent, és ennek következményeként folyamatosan magasabb volt, mint a kontroll törzsé. A kettősmutáns  $\Delta$ ganB $\Delta$ rgsA (RKH52.02) törzs „átmeneti” viselkedést mutatott: a kataláz aktivitás 25 órával később kezdett el csökkenni, mint a kontroll törzs esetében (39.A ábra).

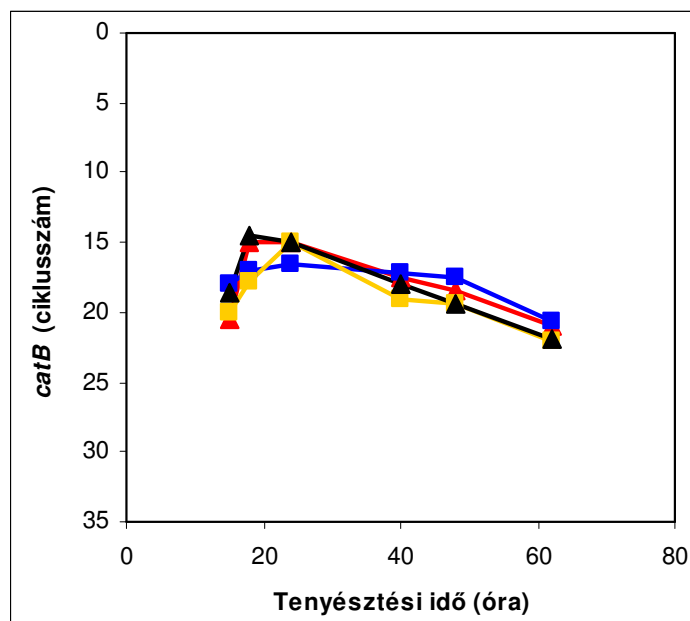
A *catA* (40.A ábra) és a *catC* (40.B ábra) kataláz kódoló gének (Kawasaki és munkatársai, 1997; 2001) kifejeződése megközelítőleg konstitutív volt valamennyi törzs esetében a tenyésztés első 60 órájában. A *catB* gén expressziós mintázata a kataláz aktivitás-változáshoz nagyon hasonló mintázatot mutatott (41. ábra).



39. ábra A kataláz (A) és GPx (B) aktivitás-változása *Aspergillus nidulans*  $\Delta$ ganB (RMdgB03) (■),  $\Delta$ rgsA (RKH51.09) (■),  $\Delta$ ganB $\Delta$ rgsA (RKH52.02) (▲) és kontroll (RKH51.117) (▲) törzseinek sülyesztett kultúráiban. Az ábrán három-négy független mérés átlagát tüntettük fel; a szórás kevesebb, mint 12 % volt.



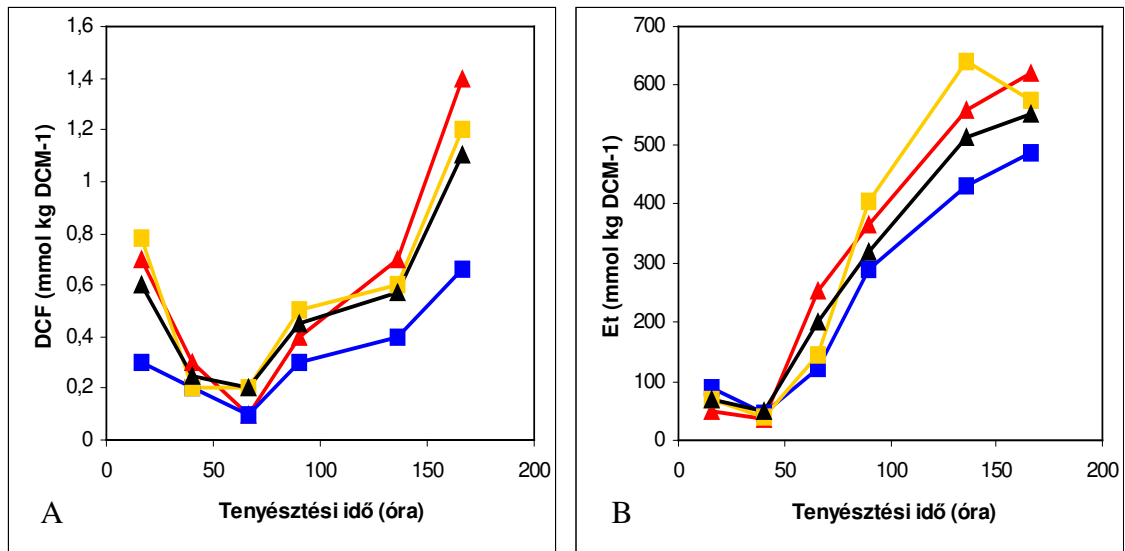
40. ábra A *catA* (A) és a *catC* (B) gén expressziójának változása az *Aspergillus nidulans*  $\Delta$ ganB (RMdgB03) (■),  $\Delta$ rgsA (RKH51.09) (■),  $\Delta$ ganB $\Delta$ rgsA (RKH52.02) (▲) és kontroll (RKH51.117) (▲) törzsek sülyesztett tenyészteteiben. Az ábrán három független mérés átlagát tüntettük fel; a szórás kevesebb, mint 12 % volt.



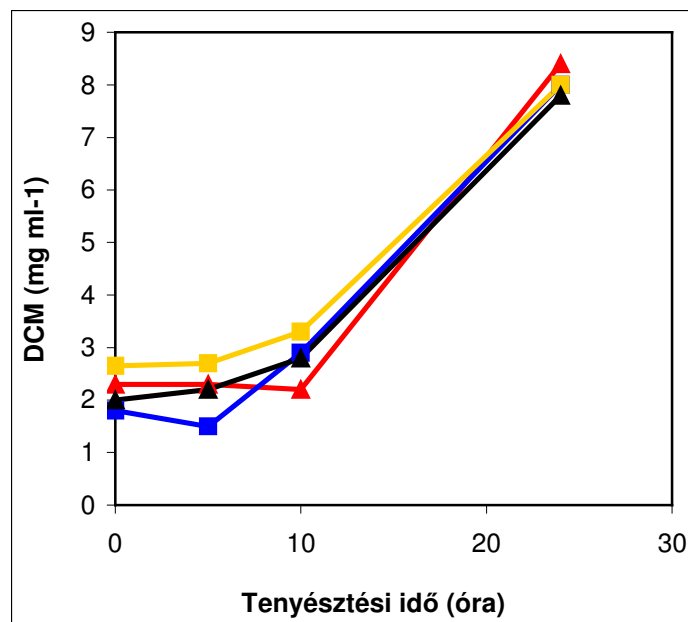
41. ábra A *catB* gén expressziójának változása az *Aspergillus nidulans*  $\Delta$ ganB (RMdgB03) (■),  $\Delta$ rgsA (RKH51.09) (■),  $\Delta$ ganB $\Delta$ rgsA (RKH52.02) (▲) és kontroll (RKH51.117) (▲) törzsek sülyesztett tenyészeiben. Az ábrán három független mérés átlagát tüntettük fel; a szórás kevesebb, mint 12 % volt.

A kataláz aktivitással ellentétben a  $\Delta$ rgsA mutáns törzs GPx aktivitása alacsonyabb, míg a két másik mutáns törzs GPx termelése, kis mértékben ugyan, de magasabb volt, mint a kontroll törzsé (39.B ábra).

Az intracelluláris peroxid (42.A ábra) és szuperoxid (42.B ábra) akkumuláció mértéke a kontroll és a mutáns törzseknél nagyon hasonló volt. Azonban a  $\Delta$ rgsA törzsnél a kontrollnál mérttől alacsonyabb peroxid szint volt megfigyelhető. A gyengébb peroxid felhalmozás nem járt fokozott életképességgel. Az életképesség vizsgálatához a micéliumokat a leoltást követő 5., 7., illetve 11. napon friss táplevesbe helyeztük, majd nyomon követtük a DCM változását. Az atmoszt követő 5., 10. és 24. órában vett minták alapján mindegyik törzs hasonló mértékben indult növekedésnek (43. ábra).



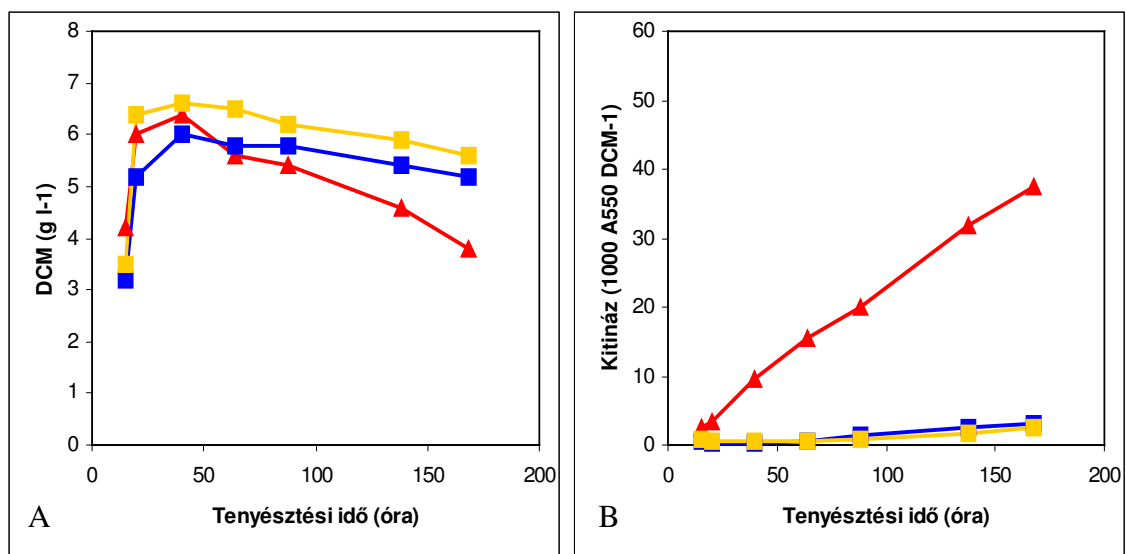
42. ábra *Aspergillus nidulans*  $\Delta$ ganB (RMdgB03) (■),  $\Delta$ rgsA (RKH51.09) (■) és  $\Delta$ ganB $\Delta$ rgsA (RKH52.02) (▲) és kontroll (RKH51.117) (▲) törzsei tenyészteteinek intracelluláris peroxid (DCF) (A) és szuperoxid (Et) (B) tartalmának változása. Az ábrán három-négy független mérés átlagát tüntettük fel; a szórás kevesebb, mint 15 % volt.



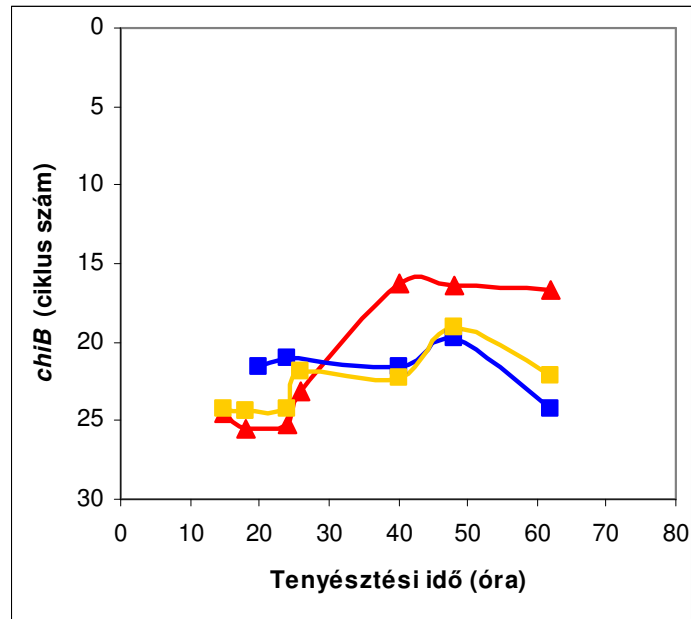
43. ábra *Aspergillus nidulans*  $\Delta$ ganB (RMdgB03) (■),  $\Delta$ rgsA (RKH51.09) (■),  $\Delta$ ganB $\Delta$ rgsA (RKH52.02) (▲) és kontroll (RKH51.117) (▲) törzseinek DCM változása 5, 10 és 24 órával a friss tápközegbe történő átmosást követően. Az ábrán négy független mérés átlagát tüntettük fel; a szórás kevesebb, mint 10 % volt.

### 3.3 Az *Aspergillus nidulans* aszexuális sporulációját szabályozó *brlA* és *fluG* gének mutációinak hatása az autolízisre

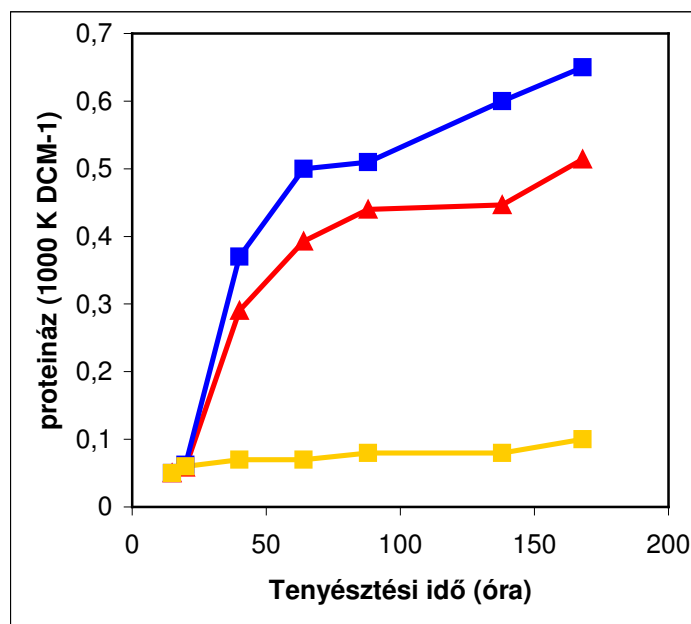
A „loss-of-function” *fluG* (*fluG1*, FGSC 744) mutáció jelentősen lassította az autolízist ezzel egyfajta nem autolizáló fenotípust alakítva ki. Ez abban mutatkozott meg, hogy a DCM a kontrollhoz viszonyítva szignifikánsan lassabban csökkent, és tulajdonképpen nem volt mérhető az extracelluláris kitináz, illetve proteináz aktivitás ezen törzs tenyészteteiben (44, 46. ábra). A  $\Delta brlA$  (FGSC 1079) mutáns a fentiekhez nagyon hasonlóan viselkedett: a tenyészetek szárazanyag-tartalma a kontrollhoz viszonyítva lassan csökkent, és igen alacsony extracelluláris kitináz aktivitásokat mértünk, míg a mutáció nem volt hatással a proteináz termelésre (46. ábra). Az alacsony extracelluláris kitináz aktivitás-változással párhuzamosan a kitináz kódoló *chiB* gén indukciója is jelentősen elmaradt a kontroll (FGSC 26) törzs tenyészteteiben mérhető *chiB* expresszió mértékétől (45. ábra).



44. ábra A DCM (A) és az extracelluláris kitináz aktivitás (B) változása az *Aspergillus nidulans fluG1* (FGSC 744) (■),  $\Delta brlA$  (FGSC 1079) (■) és kontroll (FGSC 26) (▲) törzseinek sülyesztett kultúráiban. Az ábrán három független mérés átlagát tüntettük fel; a szórás kevesebb, mint 12 % volt.

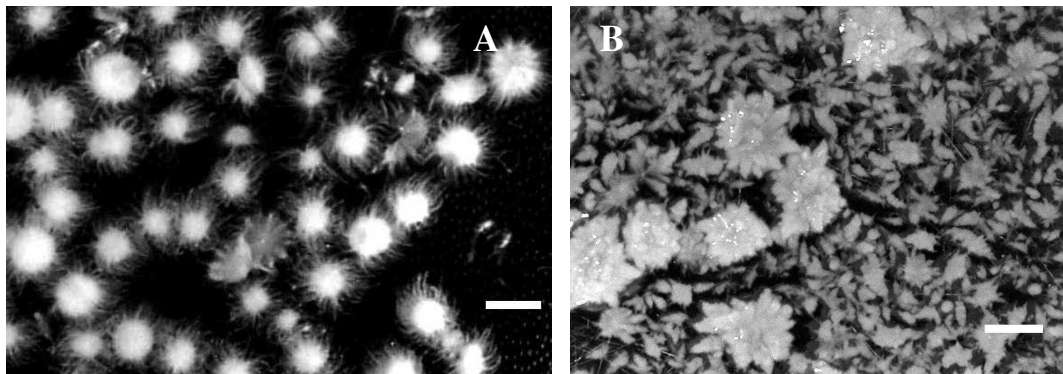


45. ábra A *chiB* gén expressziójának változása az *Aspergillus nidulans fluG1* (FGSC 744) (■),  $\Delta brlA$  (FGSC 1079) (■) és kontroll (FGSC 26) (▲) törzseinek sülyesztett tenyészteteiben. Az ábrán három független mérés átlagát tüntettük fel; a szórás kevesebb, mint 12 % volt.



46. ábra Az extracelluláris proteínáz aktivitás-változása az *Aspergillus nidulans fluG1* (FGSC 744) (■),  $\Delta brlA$  (FGSC 1079) (■) és kontroll (FGSC 26) (▲) törzseinek sülyesztett kultúráiban. Az ábrán három független mérés átlagát tüntettük fel; a szórás kevesebb, mint 12 % volt.

A *fluG1* mutáns törzs, olyan „fluffy” pelletekkel rendelkezett, mint amelyeket korábban a *ΔflbA* törzs esetében megfigyeltünk, de ebben az esetben a fonalak fragmentációja lényegében elmaradt, a pelleték átmérője nem csökkent, a pelleték pereméről leváló fonál darabokat, kötegeket nem sikerült megfigyelnünk. A tenyészetek 168 órás inkubációt követően is megőrizték pelletes morfológiájukat (47.A ábra). A *ΔbrlA* (FGSC 1079) törzs is pelletes morfológiát mutatott, amit meg is őrzött 168 órig annak ellenére, hogy gyenge fragmentálódás volt tapasztalható. Az így, a pelleték széléről leszakadó fonál kötegek azonban nem estek szét további kisebb darabokra (47.B ábra).

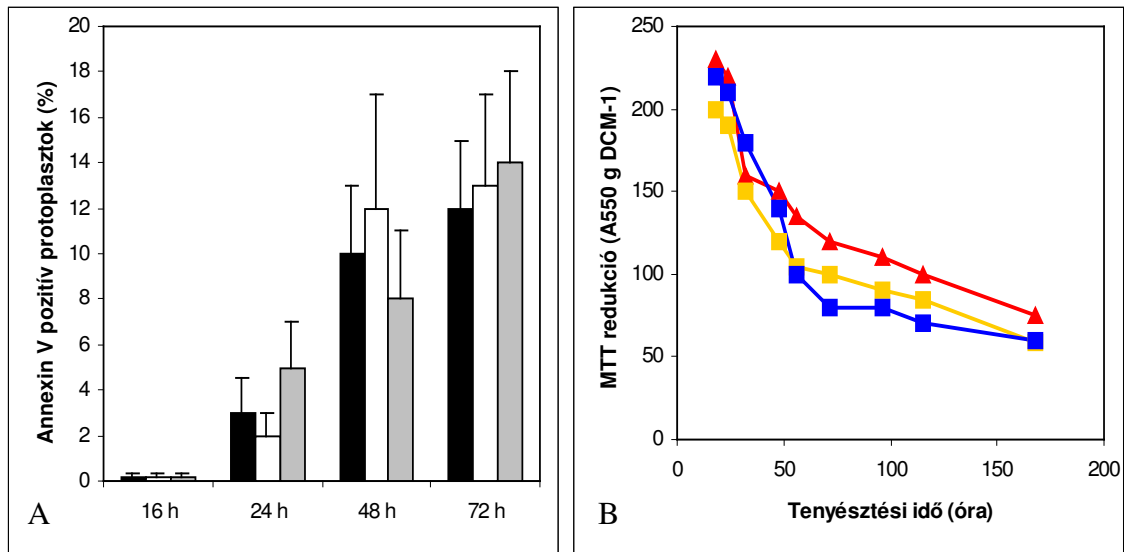


47. ábra A *fluG1* (FGSC 744) (A) és a *ΔbrlA* (FGSC 1079) (B) mutáns pelletjeinek morfológiája (168 h). Bar=3 mm.

### 3.4 Apoptotikus markerek *Aspergillus nidulans fluG1* és a *ΔbrlA* mutáns törzseiben

Az Annexin V pozitív sejtek számának változását „loss of function” *fluG* (*fluG1*) (FGSC 744) és *ΔbrlA* (FGSC 1079) mutáns sülyesztett kultúráiban is nyomon követtük, de a három törzs között jelentős eltérést nem tapasztaltunk (48.A ábra). A TUNEL pozitív protoplasztok számának változása is hasonlóan alakult: az apoptotikus sejtek aránya az FGSC 26, *fluG1* (FGSC 744) és *ΔbrlA* (FGSC 1079) törzs 72 órás tenyészetében rendre:  $22\pm 5\%$ ,  $19\pm 6\%$  és  $25\pm 6\%$  voltak. A 16 órás kultúrákban a TUNEL pozitív protoplasztok aránya a következő volt:  $1\pm 0,5\%$ ,  $0,5\pm 0,3\%$ ,  $0,8\pm 0,3\%$ . Ezek alapján nem meglepő, hogy a három törzs tenyészetének életképessége is igen hasonlóan változott (48.B ábra). A megnyúlt

hosszúkás alakú sejtmagok számának változása, a tenyésztés 48. órájától nyomon követve, a kontrollnál már leírt kinetika szerint történt, arányuk legfeljebb 10-20% volt.



48. ábra A sejt pusztulás előrehaladása és az életképesség csökkenése az *Aspergillus nidulans fluG1* (FGSC 744),  $\Delta brlA$  (FGSC 1079) és kontroll (FGSC 26) törzseinek süllyesztett kultúráiban. (A): Az Annexin V pozitív protoplasztok arányának változása *Aspergillus nidulans* kontroll (FGSC 26, fekete oszlopok), *fluG1* (FGSC 744, fehér oszlopok) és  $\Delta brlA$  (FGSC 1079, szürke oszlopok) törzseinek tenyészteteiben. Az ábrán két párhuzamos mérés átlagából számolt SD értéket tüntettük fel. (B): Az MTT redukáló képesség változása *Aspergillus nidulans fluG1* (FGSC 744) (■),  $\Delta brlA$  (FGSC 1079) (■) és kontroll (FGSC 26) (▲) törzseinek süllyesztett kultúráiban. Az ábrán három független mérés átlagát tüntettük fel; a szórás kevesebb, mint 20 % volt.

## 4. Az eredmények megbeszélése

### 4.1. A szénéhező *Aspergillus nidulans* tenyészetek morfológiai és fiziológiai jellemzői

#### 4.1.1 Az autolizáló *Aspergillus nidulans* tenyészetek morfológiai változásai

*Penicillium chrysogenum*  $\beta$ -laktam termelő ipari (NCAIM 00237) törzsének szénforrás éhező, autolizáló tenyészeire a lekerekített „élesztő-szerű” sejtek (Pusztahelyi és munkatársai 1997a; Pócsi és munkatársai, 2007) képződése jellemző. Ezek, a fonalak gyors fragmentálódása következtében, a pelleték korai szétesésével és a hifák további darabolódásával nagy számban jelennek meg, egy-két sejtből álló, osztódásra nem, de friss tápközegben csírázásra képes kitartó képletek formájában. Az autolizáló tenyészetek gyakorlatilag csak ilyen „élesztő-szerű” sejtekből állnak (Pusztahelyi és munkatársai, 1997a; Sámi és munkatársai, 2001b; Yamazaki és munkatársai, 2007; Pócsi és munkatársai, 2007). Hasonló morfológiai változások, megfelelő tápközegben, egyes alacsony penicillin szintézist mutató *Penicillium chrysogenum* törzseknél (pl.: ATCC 28089) is megfigyelhetőek, de nem jellemző a vad típusú törzsek tenyészeiben (Pócsi és munkatársai, 2007). A fonalak fragmentálódása és az „élesztő-szerű” sejtek kialakulása más ipari jelentőségű fajokban, például cefalosporin C termelő *Acremonium chrysogenum* esetében is megfigyelhető (Demain és munkatársai, 1998; Nagy és munkatársai, 2003).

*Aspergillus nidulans* vad típusú törzseinek tenyészeiben, bár a fonalak fragmentálódásának következtében a pelleték átmérője folyamatosan csökkent (9.A ábra), a stationer fázist követően is sokáig megmaradt a pelletes morfológia. A tápközegben, hasonlóan a korábban *Penicillium chrysogenum*-nál tapasztaltakkal, hosszabb-rövidebb fonaldarabok jelentek meg, amelyek darabolódásával 1-2 sejtből álló „élesztő-szerű” képletek képződtek (9.B ábra). Mikroszkópos vizsgálatok alapján ezek a hifa fragmensek a fonalak apikális és interkaláris részéből egyaránt kialakulhattak, és hasonlóan a *Penicillium chrysogenum*-nál tapasztaltakhoz friss tápközegben kicsíráztak, növekedésnek indultak (9.C ábra). A kései autolitikus fázisban a fonalak intenzív darabolódásának hatására a pelleték végül szétestek, de a tenyészetek ennek ellenére, szemben a *Penicillium chrysogenum* kultúráival, az autolízis során mindvégig megőrizték alapvetően fonalas morfológiájukat, az élesztőszerű sejtek nem váltak domináns képletté a tenyészetekben (9.A ábra). Minthogy az

*Aspergillus nidulans*-nál tapasztalt morfológiai változások a vad típusú *Penicillium chrysogenum* és sok más *Penicillium* és *Aspergillus* fajban is megfigyelhetőek voltak (Pócsi és munkatársai, 2007), összességében az *Aspergillus nidulans* esetében tapasztalt morfológiai változásokat tekinthetjük általánosnak, míg az ipari *Penicillium* törzs kultúráiban, nagy számban kialakuló „élesztő-szerű” sejtek valószínűleg csak a törzsnemesítés melléktermékei (Pócsi és munkatársai, 2007).

#### **4.1.2. Hidrolitikus enzimek *Aspergillus nidulans* autolízáló tenyészetében**

Bár a *Penicillium chrysogenum* NCAIM 00237 törzse morfológiailag eltérően viselkedett az általunk vizsgált *Aspergillus* törzsekhez viszonyítva, a szénéhezés alatt megfigyelhető fiziológiai változások igen hasonlóak voltak, sőt hasonló változásokat más gomba fajok, pl.: *Aspergillus niger*, *Penicillium oxalicum*, *Neurospora crassa*, szénéhező tenyészeiben is kimutattak (Lahoz és munkatársai, 1976; Perez-Leblic és munkatársai, 1982; Reyes és munkatársai, 1990; White és munkatársai, 2002).

Ilyen jellegzetes változás volt, többek között, az extracelluláris hidrolitikus enzimek indukciója. A kitináz aktivitás folyamatos, a korai és a kései autolitikus fázisban is nyomon követhető növekedése (10. ábra), jól párhuzamba állítható a biomassza (DCM) csökkenésével (8. ábra), valamint a pelleték és a hifák fragmentálódásával (9. ábra). Az *Aspergillus nidulans* genomjában mintegy 15 feltételezhetően kitináz kódoló gén található (Pusztahelyi és munkatársai, 2007). Ezen gének közül három (*chiA-C*) fiziológiai szerepét tanulmányozták ez idáig (Takaya és munkatársai, 1998, Yamazaki és munkatársai, 2007, Pusztahelyi és munkatársai, 2007). Saját vizsgálataink, összhangban az irodalmi adatokkal, arra utalnak, hogy a szénéhező tenyészetek autolízisében a *chiB* gén terméke vett részt: 1. szemben a *chiA* és *chiC* génekkel (Pusztahelyi és munkatársai 2007) a *chiB* gén indukálódott szénéhező körülmények között (11.B ábra), 2. a western bloton (Pusztahelyi és munkatársai, 2007) és a *chiB* génben sérült mutáns tanulmányozásán (Yamazaki és munkatársai, 2007) alapuló vizsgálatok szerint az extracelluláris kitináz aktivitás legalább 90 %-áért a *chiB* gén volt felelős szénéhező tenyészetekben, 3. kísérleteinkben az extracelluláris kitináz aktivitások jól korreláltak az autolízis más markereivel (DCM csökkenése, pelleték szétesése, fragmentáció) (8., 10., 24., 35., 44. ábra), 4. a *chiB* génben sérült mutáns autolízise lassúbb volt a kontroll törzsekhez képest (Yamazaki és munkatársai, 2007).

A kitináz termelés fokozódása mellett az ammónia koncentráció, illetve az extracelluláris proteináz aktivitás szintje is megemelkedett (10. ábra). A tápközeg ammónia

tartalmának emelkedése (10. ábra) arra utal, hogy a glükóz elfogyását követően (8. ábra) a sejtek aminosavakat, esetleg aminocukrokat (Pusztahelyi és munkatársai, 1997b) használtak energiaforrásként. A proteináz aktivitás-változások háttere után kutatva a *prtA* és *prtB* gének (Katz és munkatársai, 1994; vanKuyk és munkatársai, 2000) expressziós mintázatában bekövetkező változásokat követtük nyomon. A *prtA* gén terméke egy alkalikus szerin proteináz, amely mennyiségét tekintve – deléciós mutánsokkal végzett vizsgálatok alapján – az extracelluláris proteinázok jelentős hányadát teszi ki (Katz és munkatársai, 1994), emellett meglehetősen széles pH tartományban kimutatható a fermentléből (Katz és munkatársai, 2000). A *prtB* feltételezhetően egy savas aszpartát proteináz kódoló gén (vanKuyk és munkatársai, 2000). Valószínűleg vannak további proteináz kódoló gének is az *Aspergillus nidulans* genomjában, annál is inkább, mivel eddig összesen hat proteináz gént azonosítottak *Aspergillus* fajokban (Katz és munkatársai, 2000). *Aspergillus nidulans* szénéhező szülyesztet kultúráiban a *prtA* gén transzkripciója mutatott a proteináz aktivitás-változásával összevethető mintázatot, míg a *prtB* gén kifejeződése, a vizsgált időszakban egy korai indukciót követően, konstitutív volt (11.A ábra). Meglepő módon az extracelluláris proteináz aktivitások és a tenyészetek autolízise között nem találtunk szoros korrelációt (24., 30., 35., 36. ábra), noha a deléciós mutánsokkal végzett vizsgálatok (Emri és munkatársai, 2008a) arra utalnak, hogy a *prtA* gén valóban részt vesz az autolízisben. Ez az ellentmondás feltehetőleg azzal magyarázható, hogy az extracelluláris proteinázok nemcsak az autolízisben (sejtek, a sejtfal fehérjéinek lebontásában) vesznek részt, de egyéb funkciókat is ellátnak (pl.: tápanyagok mobilizálása) szénéhező körülmények között. Erre utal a proteináz termelés komplex szabályozottsága is: az *Aspergillus* fajokban alapvetően négy faktor – a karbon, nitrogén és kén metabolit represszió és a pH változás, illetve az *Aspergillus niger*-ben, és bizonyos körülmények között *Aspergillus nidulans*-ban, az exogén fehérje jelenléte – is szabályozza az extracelluláris proteináz termelését (Katz és munkatársai, 1994, 2000).

Itt érdemes kiemelni, hogy a vizsgált hidrolázok génjeinek indukciója fontos bizonyíték arra nézve, hogy nem a növekedési fázisban megtermelt hidrolázok „szabadulnak el” autolízis alatt, hanem az autolizáló tenyészet *de novo* termeli meg az autolízishez szükséges enzimeket.

#### **4.1.3 A redox egyensúly változása az autolízis során**

Az autolizáló tenyészetek másik jellegzetessége az redox státuszban bekövetkező változás volt. A szénforrás éhező kultúrák légzése gyorsan csökkent, majd a kései autolitikus

fázisban tovább már nem változott (8. ábra). A glükóz elfogyását követően a sejtek szuperoxid és peroxid tartalma egyenletesen növekedett, miközben a tenyészet specifikus MTT redukáló aktivitása folyamatosan csökkent (12. ábra). Hasonló jelenségeket más mikroorganizmusokban is megfigyeltek. A ROS koncentrációjának emelkedését tapasztalták a *Neurospora crassa* (Munkres és Minssen, 1976), és a *Podospora anserina* (Dufour és munkatársai, 2000) szeneszcenciája, a *Penicillium chrysogenum* autolízise (Sámi és munkatársai, 2001a) alatt és a *Saccharomyces cerevisiae* stacioner fázisú tenyészeiben is (Jakubowski és munkatársai, 2000). A *Saccharomyces cerevisiae* esetében a kísérleti adatok azt is sugallják, hogy a reaktív oxigénformák termelődéséért – a csökkent légzés ellenére – nagyrészt a mitokondrium volt felelős (Longo és munkatársai 1999).

Az alternatív, vagy cián-rezisztens légzés oxidatív stresszben betöltött szerepének megítélése nem teljesen egyértelmű az irodalomban. Egyes megfigyelések arra utalnak, hogy az alternatív oxidáznak a ROS eliminálásában van szerepe (Yip és Vanlerberghe, 2001), míg más esetekben éppen a gyöktermelő aktivitását emelik ki (Lorin és munkatársai, 2001). *Aspergillus nidulans* esetében azt tapasztaltuk, hogy a stacioner és a korai autolitikus fázisban csökkent a cián-rezisztens légzés aránya, majd a kései autolitikus fázisban ismét emelkedni kezdett (17. ábra) hasonlóan a *Penicillium chrysogenum*nál és az *Acremonium chrysogenum*nál tapasztaltakhoz (Karaffa és munkatársai, 2001; Sámi és munkatársai, 2003). Függetlenül attól, hogy a cián-rezisztens légzés a ROS eliminálásában vagy termelésében vesz részt, arányának megváltozása a teljes légzés csökkenésével és a mitokondriális Mn-SOD indukciójával – amelyre később még kitérek – együtt arra utal, hogy a mitokondriumban, mint a legfontosabb gyökgeneráló sejt szervben, jelentős fiziológiai változások történtek.

A G6PD aktivitása érdekes módon egyenletesen csökkent az autolízis alatt (16. ábra), annak ellenére, hogy ezen enzim NADPH termelése révén fontos szerepet játszik a növekedő tenyészetekben az oxidatív stressz elleni védekezésben és - legalábbis egyes élesztőkben (Jamieson és munkatársai, 1996; Izawa és munkatársai, 1995) - specifikus aktivitását a ROS szabályozzák. A G6PD specifikus aktivitásának csökkenése együtt járt egy másik NADPH termelő enzim, a NADP-ID indukciójával (16. ábra). Úgy tűnik tehát, hogy öregedő tenyészetekben a glükóz anyagcseréhez szorosan kapcsolódó oxidatív pentóz-foszfát útvonal aránya jelentősen csökkent a NADPH termelésben, míg az aminosavak lebontásához metabolikusan szorosabban kapcsolódó NADP-ID szerepe megnőtt. Ezen változás feltehetőleg nem a ROS akkumulálódásának, hanem inkább a glükóz elfogyásának és az aminosavak energiaforrásként való alkalmazásának lehetett következménye.

A gyökök akkumulálódását egyes antioxidáns enzimek indukálódása követte. A vizsgált enzimek közül a specifikus CuZn- és a Mn-SOD aktivitások mindvégig növekedtek a tenyészet öregedése alatt (13. ábra). A GPx és a kataláz esetében csak a stacioner, illetve a korai autolitikus fázisban figyeltünk meg egy átmeneti indukciót, később ezen enzimek aktivitása csökkent (14. ábra). Az *Aspergillus nidulans* genomjában eddig három katalázt kódoló gént írtak le (*catA-C*). A *catA* és *catB* transzkripcionális és poszttranszkripcionális szabályozás alatt áll. A CatA a konidiumtartókban akkumulálódik, a CatB termelése az aszexuális spóra képzés során indukálódik, míg a CatC fehérje a peroxiszómákban található (Kawasaki és munkatársai, 1997, 2001). Megfigyeléseink arra utalnak, hogy az autolizáló tenyészetek kataláz aktivitás-változásainak hátterében a *catB* gén állhat (15., 40.A, B, 41.. ábra).

A ROS akkumulálódását és antioxidáns enzimek indukcióját figyelték meg *Penicillium chrysogenum* (Sámi és munkatársai, 2001a), *Saccharomyces cerevisiae* (Jakubowski és munkatársai, 2000) és *Candida albicans* szénéhező tenyészeiben (Gyetvai és munkatársai, 2006), illetve *Neurospora crassa* (Munkres és Minssen, 1976), és *Podospora anserina* (Dufour és munkatársai, 2000) szeneszcenciája alatt is. E különböző mikrobákban megfigyelt hasonló jelenségek alátámasztják az öregedés szabadgyökös elméletét („Free-radical Theory of Ageing”; Harman, 1993) és felhívják a figyelmet arra, hogy szénéhező, öregedő tenyészetekben igen jelentős redox változások várhatóak. A ROS akkumulálódása a szénéhező, öregedő tenyészetek egyik legáltalánosabb jellegzetességének tekinthető, amit nem szabad figyelmen kívül hagyni ezen tenyészetek fiziológiájának, differenciálódásának tanulmányozása során. Azonban a ROS-nak nem csak a sejtek öregedésében lehet fontos szerepe. Befolyásolhatja a *Neurospora crassa* tenyészetek morfológiáját („Oxygen avoiding theory of development”; Hansberg és Aguire 1993), hatással lehet a szeneszcenciára (Munkres és Minssen, 1976), és ne feledjük, hogy a redox egyensúly felborulása az apoptózis egyik legfontosabb kiváltója gombákban (Madeo és munkatársai 2004).

#### **4.1.4 A glutation anyagcsere alakulása és kapcsolata a morfológiával szénéhező tenyészetekben**

Autolizáló *Aspergillus nidulans* tenyészetekben a redukált glutation (GSH) és a glutation diszulfid (GSSG) arány gyors csökkenése szintén megfigyelhető volt (18.A ábra). E változás látszólag jól összhangban van a ROS mennyiségének növekedésével (12. ábra). A GSH/GSSG arány csökkenését azonban nem elsősorban a GSH GSSG-vé történő

oxidálódása, vagy a detoxifikáció során glutation S-konjugátumokba történő beépülése okozhatta, hiszen a GSSG mennyiségében csak kismértékű változást tapasztaltunk (18.A. ábra). Ezt a feltételezést az is alátámasztja, hogy az antioxidáns GPx és GR (14. ábra), illetve a xenobiotikumok detoxifikációjában is szerepet játszó GST aktivitása autolizáló tenyészetekben alacsony, vagy legalábbis nem növekszik, míg a többek között a GSH lebontásáért és egyes aminosavak transzportjáért felelős  $\gamma$ GT indukciója az öregedő tenyészetekben is megfigyelhető (18.B ábra) (Pócsi és munkatársai, 2004). Ezek alapján feltételezhetjük, hogy bár a GSH anyagcsere meghatározó szerepet játszik glükóz jelenlétében a növekedő tenyészetek oxidatív stressz elleni védekezésében (Emri és munkatársai, 1997; 1999; Pócsi és munkatársai, 2002), öregedő tenyészetekben a jelentősége lényegesen kisebb. Az intracelluláris GSH koncentráció gyors csökkenésének egyik lehetséges oka a GSH-nak, mint tartalék tápanyagnak a mobilizálása is lehet. Hasonló jelenséget többek között *Saccharomyces cerevisiae*-nél figyeltek meg (Penninckx, 2000). Ennek az elgondolásnak azonban ellentmond az, hogy a szerves nitrogénforrás hiánya fékezi a  $\gamma$ GT indukcióját (Emri és munkatársa, 2008b). Így feltételezhetjük, hogy a  $\gamma$ GT indukciójának nem a glutation lebontása és energiaforrásként való hasznosítása az elsődleges célja, hiszen ez esetben minimál tápközegben fokozott enzimtermelést kellett volna tapasztalni (Emri és munkatársa, 2008b). Viszont felveti annak lehetőségét, hogy a  $\gamma$ GT fontos szerepet tölt be a sejtmembránon, esetleg a vakuoláris membránon keresztül zajló aminosav transzportban (Pócsi és munkatársai 2004).

Érdekes, hogy míg *Aspergillus nidulans* esetében a GSH/GSSG arány csökkent és a tenyészetek sokáig megőrizték pelletes morfológiájukat szénforrás-limitált, öregedő tenyészetekben, addig *Penicillium chrysogenum* ipari törzse (NCAIM 00237) esetében a GSH/GSSG arány nőtt és a pelletek korai szétesését „élesztő-szerű” sejtek keletkezése kísérte (Pusztahelyi és munkatársai, 1997a; Sámi és munkatársai, 2001b; Pócsi és munkatársai, 2007). Érdeemes megjegyezni, hogy az ennyire redukív GSH/GSSG egyensúly és az ipari *P. chrysogenum* (NCAIM 00237) törzs esetében tapasztalt fokozott fragmentáció és “élesztő-szerű” sejt képzés, ellentétben a GSH/GSSG arány csökkenésével és a fonalas morfológia megtartásával, nagyon ritka fonalas gombákban és feltételezhetően az ipari nemesítés eredménye (Pócsi és munkatársai, 2004, 2007). Elképzelhető, hogy GSH/GSSG arány olyan transzkripciós programok indukálásában is fontos szerepet tölt be, amelyek megváltozott morfológia például „élesztő-szerű” képletek kialakulásához és stabilizálásához vezetnek (Pócsi és munkatársai, 2003, 2004, 2007; Pusztahelyi és munkatársai, 1997a; Sámi és

munkatársai, 2001b). Erre utal az, hogy *Aureobasidium pullulans* és *Candida albicans* dimorf gomba élesztő alakjában számottevően nagyobb a GSH koncentráció, mint ugyanazon faj fonalas formájában (Thomas és munkatársai, 1991; Jürgens és munkatársai, 2001).

#### **4.1.5 Szénéhező *Aspergillus nidulans* tenyészetek és az apoptózis**

A stacioner és a korai autolitikus fázisban, hasonlóan az *Aspergillus fumigatus*-hoz (Mousavi és munkatársai, 2003), az *Aspergillus nidulans* FGSC 26 törzs süllyesztett kultúráiban is a sejtek apoptózis-szerű pusztulása volt megfigyelhető, amit a biomassza és a sejtek életképességének csökkenése kísért (19-22. ábra). Az apoptotikus markerek közül a membráninverziót (20.A. ábra) és a DNS fragmetálódását (20.B, C ábra) is sikerült megfigyelni és elképzelhető, hogy a szénéhező tenyészetek hifáiban erősen eltorzult, pálcika-szerű morfológiával rendelkező sejtmagok (21. ábra) kialakulása szintén a kromatin állomány apoptotikus megváltozásával hozható összefüggésbe. Lehetséges, hogy a *Saccharomyces cerevisiae* populációknál leírt, adaptációs-növekedési modell (Fabrizio és munkatársai, 2004) fonalas gombák autolízáló tenyészeire is alkalmazható. E modell lényege, hogy a környezet durva változásai apoptózist indukálhatnak, ami lehetővé teszi a gomba számára, hogy túlélje a kedvezőtlen periódust az adott körülményekhez jobban alkalmazkodott „mutáns” sejtpopulációk kisselektálódásával és fennmaradásával. Így a ROS-t nem akkumuláló, ezért hosszú élettartamú és csekély apoptotikus jelenséget mutató mutánsok a természetben gyorsan kisselektálódnak (Fabrizio és munkatársai 2004). Sajnos azonban az egy- és kétsejtes hifa fragmentumok kialakulása és azokból új fonál képződése csak ritkán (pl.: friss tápközegbe való átoltás után) figyelhető meg autolízáló *Aspergillus nidulans* tenyészetekben (Emri és munkatársai, 2004a). Az apoptózis következtében elpusztult sejtek anyagai azonban fontos tápanyagforrásként szolgálhatnak a szénéhező tenyészetek számára (Thrane és munkatársai, 2004; Emri és munkatársai, 2004a; Herker és munkatársai, 2004; Pusztahelyi és munkatársai, 1997).

#### **4.2 A G-protein mediált jelátviteli útvonalak szerepe az *Aspergillus nidulans* szénéhező tenyészeiben**

A *fadA*<sup>G203R</sup>, *AflbA* valamint a  $\Delta$ *ganB*,  $\Delta$ *rgsA* és  $\Delta$ *ganB* $\Delta$ *rgsA* mutációk, ellentétben a várakozásainkkal, nem okoztak jelentős változást az autolízis ütemében, így sem a DCM, sem

az extracelluláris kitináz aktivitás-változásában, sem a fragmentációban (24, 35. ábra). Ez, a növekedés és a sporuláció szabályozásában ilyen fontos szerepet betöltő gének esetében (Yu, 2007) meglepő volt számunkra, különösen azért mert egyes korai vizsgálatok (Adam és munkatársai, 1998) azt valószínűsítették, hogy az autolízis szabályozásában a FadA útvonal meghatározó szerepet játszik.

Bár a FadA és GanB útvonalak hatása az autolízisre elhanyagolhatónak bizonyult, a FadA út mutációi számottevő változásokat okoztak a gomba morfológiájában, és mindkét jelátviteli út lényegesen befolyásolta a tenyészetek fiziológiáját:

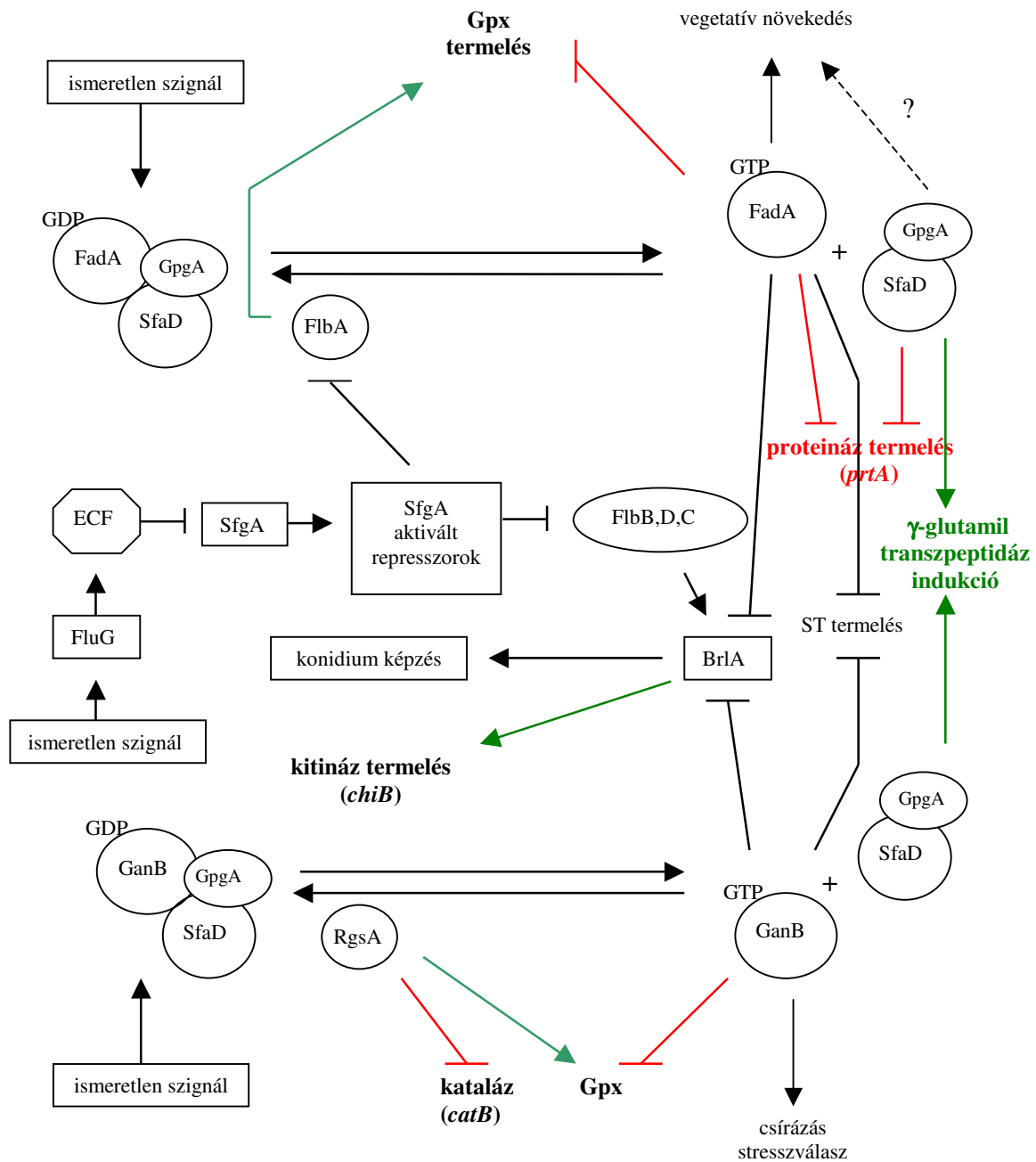
A *fadA*<sup>G203R</sup> mutáns sülyesztett tenyészeiben a pelleték átmérője elmaradt a kontroll törzsekben megfigyeltekhez képest (28. ábra) és a szénforrás elfogyását követően konidiofórok és Hülle-sejtek differenciálódását figyeltük meg (27.B, 29. ábra), összhangban azzal, hogy e mutáció lassú növekedést, intenzív sporulációt és a szexuális folyamatoktól független Hülle-sejt képződést eredményez felületi tenyészetekben (Adams és munkatársai, 1998). A *ΔflbA* mutáns esetében a kontrollhoz hasonló méretű, de attól eltérő morfológiájú pelleték képződtek (26.A ábra). A pelleték felületén hosszú, el nem ágazó, intenzíven növekvő fonalak voltak megfigyelhetőek, ami párhuzamba állítható a felületi tenyészetekben megfigyelt intenzív légmicélium képzéssel („fluffy” fenotípus) (Adams és munkatársai, 1998). A tenyészetek az autolízis alatt igen sokáig megőrizték pelletes morfológiájukat. A fonalak fragmentációja lassú volt, ennek következtében kevés „élesztő-szerű” sejt keletkezett ( $1 \times 10^4$ /ml) (26.A, 27.A ábra). A fentiekén túl az *flbA* gén delécióját a megszokottól jelentősen vastagabb csíratömlők kialakulása is kísérte (25. ábra), azaz a spórák csírázását is befolyásolta, noha az irodalmi adatok inkább a GanB útvonalat hozzák kapcsolatba a csírázás szabályozásával (Chang és munkatársai, 2004; Lafon és munkatársai, 2005). A GanB, illetve RgsA génekben sérült mutánsok esetében lényeges morfológiai változást nem észleltünk.

A kitináz termelődésével ellentétben a *ΔflbA* és *fadA*<sup>G203R</sup> mutációk hasonlóan az *rgsA/ganB* gének hiányához jelentős változásokat okoztak a proteínáz termelésben, de míg az FlbA/FadA útvonal a proteínáz termelés időbeni lefutását befolyásolta, és a mért aktivitás nagyságára nem vagy csak kismértékben hatott (30.A ábra), addig az RgsA/GanB útvonal a proteínáz termelődés mértékét szabályozta számottevően (36.A ábra). A *fadA*<sup>G203R</sup> (FGSC 1035) törzs tenyészeiben a kontrollhoz képest hamarabb, míg a *ΔflbA* (RJH046) törzs kultúráiban később éri el a proteínáz aktivitás a maximumát, míg az *rgsA/ganB* gének deléciója nagymértékben csökkentette az extracelluláris proteínáz termelést (30.A, 36.A. ábra). A változások transzkripció szintű háttérében legalábbis részben a *prtA* gén

expressziójának megváltozása állt, mivel a gén transzkripciójának mintázata jól összevethető a proteínáz aktivitás-változásokkal a tenyésztés első 60 órájában (30.B, 36.B. ábra).

Saját vizsgálataim, valamint a *fadA*, az *sfaD* (G $\beta$ ) és a *gpgA* (G $\gamma$ ) deléciós mutánsokkal végzett kísérletek eredményei alapján (Emri és munkatársai, 2008a) feltételezhetjük, hogy a FadA útvonal vesz részt az extracelluláris proteínázok képződésének gátlásában, mind a G $\alpha$ - (FadA), mind a G $\beta\gamma$ - (SfaD-GpgA) alegységek révén, míg a GanB útvonal hatását csak közvetve, a FadA útvonallal közös, G $\beta\gamma$ -alegységeken keresztül fejt ki (6., 30.A, 36.A, 49. ábra). Ez a szabályozási modell azonban nem ad magyarázatot a  $\Delta$ *f1bA* és *fadA*<sup>G203R</sup> törzsek proteínáz aktivitás-változásaira. Elképzelhető, hogy a két mutáció növekedésre gyakorolt hatása idézett elő olyan változásokat (pl.: a proteínáz szintézis karbon repressziójában), ami a fent leírt eredményekhez vezetett. Érdeemes megemlíteni, hogy *Botrytis cinerea*-ban szintén leírták a proteínáz termelés heterotrimer G-protein függő szabályozását (Gronover és munkatársai 2001).

A G-proteinek nitrogén anyagcsere szabályozásában betöltött szerepének fontosságát erősíti, hogy a szerves nitrogén források mobilizálásában, a glutation lebontásában és az aminosavak transzportjában is jelentős szerepet játszó  $\gamma$ GT aktivitás-változása a mutáns törzsekben jelentősen eltért a kontroll törzsekétől (31, 37. ábra). A  $\Delta$ *f1bA* (RJH046) és *fadA*<sup>G203R</sup> (FGSC 1035) törzsek tenyésztésében, hasonlóan a proteínáz aktivitásnál tapasztaltakkal az aktivitás-változás időbeni lefutása módosult (31. ábra). A *fadA* pozitív domináns mutációjának hatására a  $\gamma$ GT termelés a kontroll törzshöz képest hamarabb, míg a  $\Delta$ *f1bA* (RJH046) törzs esetében lényegesen később érte le maximumát (31. ábra). A *rgsA/ganB* gének mutánsainak tenyésztésében jelentősen megemelkedett szintű  $\gamma$ GT termelést rögzítettünk a kontroll (RKH51.117) törzshöz viszonyítva (37. ábra). Említést érdemel, hogy a  $\gamma$ GT aktivitás-változásában a kontroll és a mutáns törzsek között megfigyelhető különbségek nem vagy alig voltak nyomon követhetők a GSH és a GSSG sejten belüli koncentrációjának változásában (32., 38. ábra). Ebből is látszik, hogy a glutation anyagcsere mennyire összetett, és hogy a rendszer képes a fokozott GSH bontást ellensúlyozni és megőrizni más folyamatokhoz - például a detoxifikációhoz vagy az aminosav transzporthoz – fontos minimális GSH készletet. A fenti eredmények, valamint a *fadA*, *sfaD* (G $\beta$ ) és *gpgA* (G $\gamma$ ) hiány mutánsaival végzett vizsgálatok eredményei alapján (Emri és munkatársai, 2008a), a  $\gamma$ -glutamil transzpeptidáz képződését az SfaD-GpgA komplex, azaz a heterotrimer G proteinekről disszociált G $\beta\gamma$ -alegység aktiválhatja (49. ábra).



49. ábra A FluG és a G-protein mediált útvonalak lehetséges szerepe, *Aspergillus nidulans* metabolizmusa és életciklusa egyes elemeinek szabályozásában (Seo és munkatársai, 2006; Yu, 2006).

A proteináz termelés és a  $\gamma$ GT indukcióján túl a FadA/FlbA és GanB/RgsA útvonalak befolyásolták egyes antioxidáns enzimek (kataláz, GPx) termelődését is, ami különösen a kataláz esetében volt szembeötlő, ahol a GanB/RgsA útvonal működése, konkrétan az RgsA

fehérje jelenléte szükségesnek bizonyult a kataláz aktivitások – a stacioner és korai autolitikus fázisban tapasztalt indukciót követő - gyors csökkenéséhez (39.A ábra). Az FlbA/FadA útvonal elemeinek mutációja nem befolyásolta a kataláz termelődésének mértékét és időbeni lefutását (33.A ábra). A korábbi eredményeinkkel összhangban, a G-protein útvonal mutációiban is, a *catB* gén expressziója mutatott a kataláz aktivitás-változáshoz hasonló mintázatot (Kawasaki és munkatársai, 1997; 2001) (40.A, B, 41. ábra). A G-protein mediált útvonal, és azon belül az RgsA fehérje, legalábbis részben a *catB* gén transzkripciójának szabályozásán (gátlásán) keresztül fejtheti ki hatását. Fontos kiemelni, hogy idáig igen kevés ismeret állt rendelkezésünkre a katalázok szabályozását illetően.

A G-protein útvonalak egyes elemeit kódoló gének hiánya kisebb-nagyobb mértékben ugyan, de befolyásolta a GPx termelést (33.B, 39.B ábra). Ebből arra következtethetünk, hogy a két RGS alegység: az FlbA és az RgsA egyaránt indukálja a GPx termelést, hiszen hiányukban kisebb enzim aktivitások mérhetőek, míg az  $\alpha$ -alegységek (FadA, GanB) hatása ezzel ellentétes (33.B, 39.B ábra).

Az intracelluláris peroxid (34.A, 42.A ábra) és szuperoxid (34.B, 42.B ábra) akkumuláció mértékében, az antioxidáns enzimaktivitásokban mért eltérések ellenére, – eltekintve a  $\Delta$ *rgsA* törzsnél tapasztalt gyengébb peroxid felhalmozástól, amely nem járt fokozott életképességgel (43. ábra) – nem tapasztaltunk jelentős változást. Az antioxidáns enzimek és az intracelluláris gyökszint nagymértékű szabályozottsága nem véletlen, hiszen a ROS és redox egyensúly számos területen - apoptózis, proliferáció, szexuális szaporodás - mint egyes jelátviteli mechanizmusok elemei szerepelnek.

Fontos kihangsúlyozni, hogy vizsgálataink alapján az antioxidánsként is funkcionáló GSH lebontása ( $\gamma$ GT indukciója), valamint a kataláz aktivitások növekedését követő csökkenése is aktív, heterotrimer G-protein útvonalak által szabályozott folyamatoknak bizonyultak. Ez azt sugallja, hogy a sejtek úgy viselkednek, mintha próbálnák elősegíteni a ROS akkumulálódását és így a ROS által indukált folyamatokat. Érdeemes megemlíteni, hogy az *Aspergillus nidulans* szexuális szaporodásának szabályozásában a G $\beta\gamma$  alegység és így a heterotrimer G-protein-függő útvonalak központi jelentőségűek (Yu, 2006), sőt az is ismert, hogy a reaktív oxigénformák képződése fontos eleme a szexuális szaporodásnak (Lara-Ortiz és munkatársai, 2003). Éppen ezért elképzelhető, hogy a  $\gamma$ -glutamil transzpeptidáz indukálódása, valamint a kataláz gátlása ROS háztartásra gyakorolt hatásuk révén a gomba ivaros folyamatainak előkészítését segítik.

Összességében azt mondhatjuk, hogy bár ellentétben várakozásainkkal az ismert G-protein mediált útvonalak nem töltenek be központi szerepet az autolízis szabályzásában *Aspergillus nidulans*-ban, a nitrogén anyagcsere vagy az antioxidáns enzimek termelésének regulációja révén alapvetően befolyásolják a szénéhező tenyészetek fiziológiáját.

### **4.3 Az *Aspergillus nidulans* aszexuális sporulációját szabályozó *brlA* és *fluG* gének mutációinak hatása az autolízisre**

Mivel a G-protein kapcsolt útvonalak nem váltották be a hozzájuk fűzött reményeket, ami az autolízis szabályozását illeti, a sporuláció indukciójához szükséges központi transzkripciós faktort (BrlA), és az azt aktiváló extracelluláris sporulációs faktor (ESF) előállításához szükséges FluG fehérjék génjének autolízisben betöltött szerepét is górcső alá vettük.

Mind a *brlA*, mind a *fluG* génben sérült mutánsok nem autolizáló fenotípust mutattak: a DCM lassan csökkent (44.A ábra), tulajdonképpen nem volt mérhető extracelluláris kitináz aktivitás (44.B ábra), ami a szintén igen alacsony *chiB* expresszióval volt magyarázható (45. ábra) és mindkét mutáns hosszú időn át megőrizte pelletes morfológiáját.

Vizsgálataink alapján tehát a FluG útvonal nemcsak a sporuláció, de nem várt módon, az autolízis iniciálásához is nélkülözhetetlennek bizonyult. Eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy az autolízis és a sporuláció szorosan összetartozó, a FluG-BrlA útvonal által szabályozott jelenségek. Az autolízis egyik legfontosabb fiziológiai jelentősége szénéhező tenyészetekben feltehetőleg éppen az, hogy a sejtek egy részének lebontásával tápanyagokat szabadít fel, melyeket a nem autolizáló sejtek a külső szénforrás elfogyását követően konídiumok előállítására tudnak felhasználni. E folyamat eredményeképpen akár a teljes vegetatív biomassza felhasználódhat konídiumok képzésére. A konídiumok, mint propagáló képletek segítségével a gomba új termőterületekre juthat el, illetve a konídiumok kitartó képletként funkcionálva biztosíthatják a telep túlélését a tápanyagok kimerülését követően is.

Meglepő módon a *fluG1* mutáns nem, míg a  $\Delta$ *brlA* mutáns kifejezetten sok proteinázt termelt (46. ábra), ami összefügg a FluG útvonal és a FadA útvonal közötti kapcsolattal: a FluG fehérje az SfgA gátlásán keresztül nemcsak a *brlA* gént indukálja, de gátolja a FadA útvonal működését is (Seo és munkatársai, 2006) így serkenti a proteináz termelést (5., 46. 49. ábra).

Az általunk vizsgált két mutánsra jellemző nem autolizáló fenotípus ipari szempontból is előnyös lehet: a hosszú ideig stabil, a szénforrás elfogyása után is megmaradó pelletes morfológia következtében e tenyészetek még idős korukban is könnyen kevertethetőek és hatékonyan szűrhetők. A proteináz termelés hiánya (*fluG1* mutáns) ugyanakkor a termék proteolitikus degradációját akadályozza meg. Mivel csupán egyetlen gén hiánya okozta ezen változásokat, érdekes alternatíva lehet hasonló fenotípusú törzsek ipari nemesítésbe való bevonása. A fentiekén túl a nem autolizáló mutánsokban megfigyelt gyenge fragmentáció alátámasztja azt a feltételezést, miszerint a fonalak darabolódása alapvetően egy aktív, enzimatikus folyamat és nem pusztán a rázatás, illetve kevertetés következtében fellépő mechanikai nyíróerők következménye (White és munkatársai, 2002).

#### **4.4 Apoptotikus markerek *Aspergillus nidulans fluG1* és a *AbriA* mutáns törzseiben**

Noha mind a „loss of function” *fluG* (*fluG1*) (FGSC 744), mind *AbriA* (FGSC 1079) törzs nem autolizáló fenotípust mutatott (44. A, B, 47. ábra), sejtpusztulási folyamataikban lényeges eltérést nem tapasztaltunk a kontroll törzsekhez viszonyítva: sem az Annexin V pozitív sejtek (48.A ábra), sem a TUNEL pozitív protoplasztok (48.B ábra) számának változásában. A kontroll törzsnél megismert kinetika szerint változott a megnyúlt, apoptotikus folyamatokra utaló sejtmagok száma is. Ezek után nem meglepő, hogy a különböző törzsek tenyészetekének MTT redukáló képessége is igen hasonlóan alakult (48. B ábra).

Az apoptózis különböző szfingozin származékokkal (D,L-dihidroszfingozint, fitoszfingozin) jól indukálhatónak bizonyult, nem csak a csírázó spóráknál és fiatal hifáknál (Cheng és munkatársai, 2003), hanem az egyébként a környezeti stresszhatásokkal szemben ellenállóbb (Pócsi és munkatársai, 2004) idős tenyészeteknél is (19. ábra). A stacioner fázisban alkalmazott szfingozin kezelés bár megduplázta az apoptotikus (Annexin V pozitív) sejtek számát (19. ábra), a fokozott apoptózist nem kísérte az autolitikus markerek (DCM csökkenés, extracelluláris hidrolázok aktivitásának növekedése) szintjének emelkedése (22-23. ábra). Mindezek alapján az autolitikus fenotípus kifejeződése és a tenyészetek vitalitásának csökkenése, illetve apoptotikus folyamatai között szoros kapcsolatot nem találtunk. Ez egyben azt is jelenti, hogy szénéhező tenyészetekben a sejtek pusztulását nem az autolízis (az autolitikus fenotípus kifejeződése) idézi elő, az autolízis „csupán” a már elhalt sejtek anyagainak mobilizálását végzi. Autolizáló tenyészetekben két folyamat zajlik: 1. a

sejtek pusztulása (a tenyészet vitalitásának csökkenése, apoptotikus markerek kifejeződése),  
2. az elhalt sejtek anyagainak – beleértve a sejtfalet is - lebontása (az autolitikus fenotípus kialakulása).

A sejtpusztulás és a sejtfalet degradáció eltérő szabályozottságának élettani jelentősége nem ismert. Egy lehetséges magyarázat a gomba fonalas morfológiájával függhet össze: a sejtfaletnek köszönhetően az elhalt sejtek anyagainak jelentős része nem folyik el, hanem a szomszédos, még élő sejtek számára könnyen hozzáférhető módon megmarad. Így ha a sejtpusztulás nem jár együtt szükségszerűen a sejtfalet lebomlásával, a gomba hatékonyabban tudja intracelluláris anyagait újrahasznosítani.

## 5. Összefoglalás

A mikológiai vizsgálatok túlnyomó többsége a növekedő, exponenciális fázisban lévő tenyészetek tanulmányozására szorítkozik. Viszonylag kevés tanulmány vizsgálja a szénéhező kultúrák morfológiai-fiziológiai változásait és azok szabályozását. Ez azért is meglepő, mert a szénforrás éhezés az egyik leggyakoribb stresszhelyzet mind a természetben, mind ipari körülmények között. Szénéhező körülmények között számos gyakorlati jelentőséggel bíró enzim és metabolit termelődik, sőt a szénéhezés alatt megfigyelhető sejtpusztulási folyamatok jobb megértése a gombák elleni védekezésben is jól hasznosítható eredményekre vezethet. Vizsgálataim középpontjában az *Aspergillus nidulans*, mint modell organizmus szénéhező tenyészeitének tanulmányozása, a szénéhező tenyészetek morfológiájának, fiziológiájának és sejtpusztulási folyamatainak jobb megismerése állt. Munkám során nagy hangsúlyt kapott a heterotrimer G-protein útvonalak szénéhező tenyészetek működésében betöltött szerepének megismerése.

*Aspergillus nidulans* szénéhező tenyészeit morfológiailag igen eltérőnek bizonyultak a korábban a tanszékünkön vizsgált ipari *Penicillium chrysogenum* törzsétől (Pusztahelyi és munkatársai 1997a; Pócsi és munkatársai, 2007). Az *Aspergillus nidulans* esetében ugyanis a szénforrás elfogyását követően a pelletek csak lassan estek szét, és a tenyészetek mindvégig megőrizték fonalas morfológiájukat. A *Penicillium chrysogenum* esetében megfigyelt élesztőszerű sejtek megjelentek ugyan de sohasem váltak domináns képletté. Irodalmi adatok alapján (Pócsi és munkatársai, 2007) az *Aspergillus nidulans*-nál tapasztaltak tekinthetők általánosnak, míg a *Penicillium chrysogenum*-nál megfigyelt sajátos morfológia feltehetőleg csak az ipari nemesítés mellékterméke.

Az alapvető morfológiai különbségek ellenére a szénéhező tenyészetekben megfigyelt fiziológiai változások (pl.: ROS akkumuláció, antioxidáns enzimek termelődése, apoptotikus és autolitikus folyamatok beindulása, extracelluláris hidroláz termelés) igen hasonlóak voltak a *Penicillium chrysogenum*-nál tapasztaltakhoz (Sámi és munkatársai, 2001a), sőt az általunk megfigyelt jelenségek egyes elemeit sok más gombából is kimutatták már (Munkres és Minssen, 1976; Dufour és munkatársai, 2000; Jakubowski és munkatársai, 2000; Gyetvai és munkatársai, 2006). Mindezen vizsgálatok együttesen azt sugallják, hogy a gombákban szénéhező körülmények között igen komplex, jól szabályozott fiziológiai változások zajlanak. Azaz, a szénéhező tenyészeteket nem tekinthetjük hanyatló, nekrotikus sejtek összességének,

hanem a stresszhelyzettel szemben aktívan védekező és azt túlélni képes kultúrákról van szó (Winderickx és munkatársai 2003).

Vizsgálataink alapján a FadA/FlbA és GanB/RgsA útvonalak nem csak a csírázó spórák, illetve a növekedő hifák fiziológiáját (Adams és munkatársai, 1998; Chang és munkatársai, 2004; Lafon és munkatársai, 2005), de a szénéhező tenyészetek működését is alapvetően befolyásolták. Szabályozó szerepük jelentős volt az extracelluláris proteínáz (*prtA*) termelésben, a  $\gamma$ GT indukálódásában és így a GSH lebomlásában, valamint egyes antioxidáns enzimek – GPx, kataláz (*catB*) – és ezen keresztül a ROS képződésében is. Meglepő módon a fenti heterotrimer G-protein útvonalak érdemben nem befolyásolták a tenyészetek autolízisét.

A FadA/FlbA és GanB/RgsA útvonalakkal szemben a sporulációért felelős FluG-BrlA útvonal (Lee és Adams, 1988, 1994b, 1998; Lee és Adams, 1996; D'Souza és munkatársai, 2001) nélkülözhetetlennek bizonyult az autolízis szabályozásában. Ez az útvonal befolyásolta a DCM csökkenését, az extracelluláris kitináz (*chiB*) képződését, és a fonalak fragmentálódását (pelleték szétesése, élesztőszerű sejtek kialakulása) is. Vizsgálataink alapján tehát az autolízis és a sporuláció szorosan összetartozó, a FluG-BrlA útvonal által szabályozott jelenségek. Az autolízis egyik legfontosabb fiziológiai jelentősége szénéhező tenyészetekben feltehetőleg éppen az, hogy a sejtek egy részének lebontásával tápanyagokat szabadít fel, melyeket a nem autolizáló sejtek a külső szénforrás elfogyását követően konídiumok előállítására tudnak felhasználni. E folyamat eredményeképpen akár a teljes vegetatív biomassza felhasználódhat konídiumok képzésére. A konídiumok, mint propagáló képletek segítségével a gomba új termőterületekre juthat el, illetve a konídiumok kitartó képletként funkcionálva biztosíthatják a telep túlélését a tápanyagok kimerülését követően is.

Meglepő módon a FluG-BrlA út mutációi nem befolyásolták sem az apoptotikus markerek kifejeződését, sem a sejtek pusztulását, sőt az apoptózis indukálása sem járt együtt fokozott autolízissel. Mindezek alapján az autolitikus fenotípus kifejeződése és a tenyészetek vitalitásának csökkenése, illetve apoptotikus folyamatai között szoros kapcsolatot nem találtunk. Ez egyben azt is jelenti, hogy szénéhező tenyészetekben a sejtek pusztulását nem az autolízis (az autolitikus fenotípus kifejeződése) idézi elő, az autolízis „csupán” a már elhalt sejtek anyagainak mobilizálását végzi. Autolizáló tenyészetekben két folyamat zajlik: 1. a sejtek pusztulása, (a tenyészet vitalitásának csökkenése, apoptotikus markerek kifejeződése) 2. az elhalt sejtek anyagainak – beleértve a sejtfalet is - lebontása (az autolitikus fenotípus kialakulása). A sejtpusztulás és a sejtfalet degradáció eltérő szabályozottságának élettani jelentősége nem ismert. Egy lehetséges magyarázat a gomba fonalas morfológiájával függhet össze: A sejtfaletnek köszönhetően az elhalt sejtek anyagainak jelentős része nem folyik el,

hanem a szomszédos, még élő sejtek számára könnyen hozzáférhető módon megmarad. Így ha a sejtpusztulás nem jár együtt szükségszerűen a sejtfallabomlásával a gomba hatékonyabban tudja intracelluláris anyagait újrahasznosítani.

Vizsgálataim több, gyakorlati szempontból is tovább gondolásra érdemes eredményre vezettek: kimutattam, hogy az autolízis alatt képződő hidrolázok *de novo* keletkeznek, azaz az autolízis indukálásával ezen enzimek túltermelése előidézhető az iparban. A *fluG1* és *ΔbrlA* törzsek fenotípusán keresztül igazoltam, hogy a fonalak fragmentálódása egy aktív folyamat és nem a kevertetés, rázatás során fellépő mechanikai nyíróerők következménye, azaz a megfelelő sejtfallabontó enzimek aktivitásának szabályozásán keresztül lehetőség van a tenyészetek morfológiáját befolyásolni. A *fluG1* mutáns fenotípusa ugyanakkor jó példa arra is, hogy egyetlen gén inaktiválásával olyan mutánst lehet létrehozni, amely ipari szempontból előnyös lehet: A hosszú ideig stabil, a szénforrás elfogyása után is megmaradó pelletes morfológia következtében e tenyészetek még idős korukban is könnyen kevertethetőek és hatékonyan szűrhetők. A proteináz termelés hiánya ugyanakkor a termék proteolitikus degradációját akadályozza meg.

## 6. Summary

Most of the mycological investigations dealt with the studying of growing, exponential phase cultures. Only a few studies examine the morphological and physiological changes of the carbon starving cultures and the regulation that lies behind. This is surprising, because the starving of carbon sources is one of the most common stress situations both in the nature and in industrial conditions. Many enzyme and metabolite, which have great practical importance, are produced in carbon starving conditions; moreover the better understanding of the cell death processes occur during carbon starvation can lead us results which can be useful in the protection against fungi. In the center of my investigations was the study of the carbon starving cultures of *Aspergillus nidulans*, as model organism, and the better understanding of the morphology, physiology and cell death processes of the carbon starving cultures. During my work the role of the heterotrimer G protein mediated pathways in carbon starving cultures, had great accent.

The morphology of the *Aspergillus nidulans* cultures was very altered from the industrial *Penicillium chrysogenum* strain, examined former at our department (Pusztahelyi *et al.*, 1997a; Pócsi *et al.*, 2007). The pellets disintegrated slowly and the cultures preserved their filamentous morphology after the carbon source had depleted at *Aspergillus nidulans*. Although the “yeast-like” cells, observed at *Penicillium chrysogenum*, appeared but they never became dominant. The changes observed at *Aspergillus nidulans* can be considered general by the literature (Pócsi *et al.*, 2007), while the specific morphology noticed at *Penicillium chrysogenum* is probably a side effect of the industrial breeding.

Instead of the essential morphological differences the physiological changes observed in carbon starving cultures (ROS accumulation, antioxidant enzyme production, induction of apoptotic and autolytic processes, extracellular hydrolase production) were similar to the noticed at *Penicillium chrysogenum* (Sámi és munkatársai, 2001a). Some elements of the phenomena observed by us were demonstrated at other fungi (Munkers and Minssen, 1976; Dufur *et al.*, 2000; Jakubowski *et al.*, 2000; Gyetvai *et al.*, 2006). All these investigations suggest us that well regulated, complex physiological changes occur in carbon starving fungi cultures. That’s why the carbon starving cultures can not considered as mass of declining, necrotic cells, but we can speak about cultures which can actively defend themselves against stress situation and they are able to survive it (Winderickx *et al.*, 2003).

Based on our investigations the FadA/FlbA and GanB/RgsA pathways not only effected an the germinating spores and the physiology of growing hyphae, but the operation of the carbon starving cultures as well (Adams *et al.*, 1998; Chang *et al.*, 2004; Lafon *et al.*, 2005). Their regulative role was significant in the production of extracellular proteinase (*prtA*), in the induction of  $\gamma$ GT and GSH degradation, furthermore via the production of some antioxidant enzyme – GPx, catalase (*catB*) – in the creation of ROS. Surprisingly the above heterotrimeric G protein mediated pathways did not influence notably the autolysis of the cultures.

Instead of the FadA/FlbA and GanB/RgsA pathways the FluG-BrlA pathways responsible for the sporulation (Adams *et al.*, 1988; Lee and Adams, 1994b, 1996; D'Souza *et al.*, 2001) were essential in the regulation of the autolysis. These pathways influenced the decrease of the DCM, the production of extracellular chitinase (*chiB*) and the fragmentation of hyphae (pellet disintegration, creation of “yeast-like” cells) too. Based on our experiments the autolysis and the sporulation are linked closely together, and regulated by the FluG-BrlA pathway. One of the main physiological importance of the autolysis in carbon starving cultures is probably that it liberates nutrients through the degradation of some cells, which can be used by the autolysing cells to produce conidia after the depletion of the carbon source. As the result of this procedure even the whole vegetative biomass can be utilized for conidia creation. The fungus can reach new productive areas via the conidia, which is a propagator formation. The conidia as persistent formation can ensure survive of the colony after the depletion of the nutrients.

Surprisingly the mutations of the fluG-BlrA pathway did not influence nor the expression of the apoptotic markers neither the cell death, even the induction of the apoptosis was not followed by increased autolysis. According these we could not find close relationship between the expression of the autolytic phenotype, the decrease in the vitality of the cultures and the apoptotic processes. This means in the same time, that the cell death is not caused by the autolysis (expression of autolytic phenotype) in carbon starving cultures, but it mobilizes the materials of the dead cells. Two procedures welter in the autolysing cultures: 1. the destruction of the cells (the decrease of the vitality of the cultures, the expression of the apoptotic markers), 2. disassembly of the materials of the dead cells (expression of autolytic phenotype). The importance of the different regulation of the cell death and cell wall degradation is unknown. A possible explanation is connected to the morphology of the fungus: the remarkable part of the materials of the dead cells does not flow away thanks to the cell wall, but remains easily accessible for the neighbour, living cells. In this way the cell

death is not accompanied necessarily by cell wall disintegration and the fungus can reuse its substance more effectively.

My examinations led me to several results, which are worth to go over in practical aspects: I have demonstrated, that the hydrolyse enzymes are produced *de novo* during the autolysis, namely over production of these enzymes can be generated by the induction the autolysis in the industry. I have proved through the phenotype of the *fluGI* and  $\Delta$ *brlA* strains, that the fragmentation of the hyphae is an active process and not a consequence of the mechanical shearing forces caused by the stirring and shaking. Namely the morphology of the cultures can be manipulated by the regulation of the activity of the adequate cell wall degrading enzymes. The phenotype of the *fluGI* mutant is a good example to that how we can create an industrially beneficial strain with the inactivation of only one gene: The cultures, which are stable for long time and keep their intact pellet morphology after depletion of the carbon sources, remain well shakeable and efficiently filterable even when they are old. The lack of the proteinase enzyme production can hinder the proteolytic degradation of the product at the same time.

## 7. Irodalomjegyzék

Adams. T. H., Boylan, M. T. and Timberlake, W. E. 1988 *brlA* is necessary and sufficient to direct conidiophore development in *Aspergillus nidulans*. *Cell.*, 29;353-62.

Adams, T. H., Wieser, J. K. and Yu, J. H. 1998. Asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Microbiol Mol. Biol. Rev.*, 62, 35-54.

Aguirre, J., Ríos-Momberg, M., Hewitt, D. and Hansberg, W. 2005. Reactive oxygen species and development in microbial eukaryotes. *Trends. Microbiol.*, 13, 111-118.

Amin, S., Mousavi, S. and Robson G. D. 2004. Oxidative and amphotericin B-mediated cell death in the opportunistic pathogen *Aspergillus fumigatus* is associated with an apoptotic-like phenotype. *Microbiology*, 150, 1937-1945.

Anderson M. E. 1985. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. *Methods Enzymol.* 113, 548-55.

Andrianopoulos, A and Timberlake, W. E. 1994. The *Aspergillus nidulans abaA* gene encodes a transcriptional activator that acts as a genetic switch to control development. *Mol. and Cell. Biol.*, 14, 2503-2515.

Aramayo, R. and Timberlake, W. E. 1993. The *Aspergillus nidulans yA* gene is regulated by *abaA*. *EMBOJ.*, 12, 2039-2048.

Bahr, J.T. and Bonner, W.D. Jr. 1973. Cyanide-insensitive respiration. I. The steady states of skunk cabbage spadix and bean hypocotyl mitochondria. *J. Biol. Chem.*, 248, 3441-3445.

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

Beers, E. P. 1997. Programmed cell death during plant growth and development. *Cell Death Differ.*, 4(8),649-61.

Boldogh, I. R., Yang, H. C., Nowakowski, W. D., Karmon, S. I., Hays L. G., Yates, Y. R. III and Pon, L. A. 2001. Arp2/3 komplex and actin dynamics are required for actin-based mitochondrial motility in yeast. *Proc. Natl. Acad.*, USA 98, 3162-3167.

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

Brown, D. W., Yu, J. H., Kelkar, H. S., Fernandes, M., Nesbitt, T. C., Keller, N. P., Adams, T. H. and Leonard, T. J. 1996. Twenty-five coregulated transcripts define a

sterigmatocystin gene cluster in *Aspergillus nidulans*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 1418-1422.

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

Burchett, S. A., Flanary, P., Aston, C., Jiang, L., Young, K. H., Uetz, P., Fields, S., Dohlman, H. G. 2002. Regulation of stress response signaling by the N-terminal dishevelled/EGL-10/pleckstrin domain of Sst2, a regulator of G-protein signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biol. Chem., 277, 22156-67.

Burhans, W.C., Weinberger, M., Marchetti, M. A., Ramachandran, L., D'Urso, G., Huberman, J. A. 2003. Apoptosis-like yeast cell death in response to DNA damage and replication defects. Mutat. Res., 27;532, 227-43.

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.

Chae, H. J., Ke, N., Kim, H.R., Chen, S., Godzik, A., Dickman, M. and Reed, J. C. 2003. Evolutionarily conserved cytoprotection provided by Bax Inhibitor-1 homologs from animals, plants, and yeast. Gene, 24;323, 101-13.

Chang, H. S., Jeon, K. W., Kim, Y. H., Chung, I. Y. and Park, C. S. 2000. Role of cAMP-dependent pathway in eosinophil apoptosis and survival. Cell Immunol., 10;203(1), 29-38.

Chang, M. H., Chea, K. S., Han, D. M. and Jahng, K. Y. 2004. The GanB G $\alpha$ -protein negatively regulates asexual sporulation and plays a positive role in conidial germination in *Aspergillus nidulans*. Genetics., 167, 1305-15.

Chen, Q., Crosby, M. and Almasan, A. 2003. Redox Regulation of Apoptosis before and after Cytochrome C Release. Korean J. Biol. Sci., 7, 1-9.

Chen, J. G., Willard, F. S., Huang, J., Liang, J., Chasse, S. A., Jones, A. M. and Siderovski, D. P. 2003. A seven- transmembrane RGS protein that modulates plant cell proliferation. Science, 301, 1728-1731.

Cheng, J., Park, T. S., Chio, L. C., Fischl, A. S. and Ye, X. S. 2003. Induction of apoptosis by sphingoid long-chain bases in *Aspergillus nidulans*. Mol Cell Biol., 23(1),163-77.

Chidiac, P. and Roy, A. A. 2003. Activity, regulation, and intracellular localization of RGS proteins. Receptors Channels, 9, 135-47.

Chiu, D.T.Y., Stults, F. H. and Tappel, A. L. 1976. Purification and properties of rat lung soluble glutathione peroxidase. Biochem. Biophys., Acta, 445, 558-566.

Chomczynski, P. 1993. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques*. 15, 532-4, 536-7.

Chung, K. S., Won, M., Lee, S. B., Jang, Y. J., Hoe, K. L., Kim, D. U., Lee, J. W., Kim, K.W. and Yoo, H. S. 2001. Isolation of a novel gene from *Schizosaccharomyces pombe*: *stm1+* encoding a seven-transmembrane loop protein that may couple with the heterotrimeric Galpha 2 protein, Gpa2. *J. Biol. Chem.* 276. 40190-201.

Chem 2002 Mar 1;277(9):7626-7. Cuvillier, O., Edsall, L. and Spiegel, S. 2000. Involvement of sphingosine in mitochondria-dependent Fas-induced apoptosis of type II Jurkat T cells. *J. Biol. Chem.*, 275, 15691-700.

Dalla Libera, L., Sabbadini, R., Renken, C., Ravara, B., Sandri, M., Betto, R., Angelini, A. and Vescovo, G. 2001. Apoptosis in the skeletal muscle of rats with heart failure is associated with increased serum levels of TNF-alpha and sphingosine. *J. Mol. Cell Cardiol.*, 33, 1871-8.

Demain, A. L., Zhang, J. 1998 Cephalosporin C production by *Cephalosporium acremonium*: the methionine story. *Critical Reviews in Biotechnology* 18, 283-294.

D'Souza, C. A., Lee, B. N. and Adams, T. H. 2001. Characterization of the role of the FluG protein in asexual development of *Aspergillus nidulans*. *Genetics*. 158, 1027-36.

Dufour, E., Boulay, J., Rincheval, V. and Sainsard-Chanet, A. 2000. A causal link between respiration and senescence in *Podospora anserina*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 97,4138-43.

Dunn-Coleman, N. and Prade, R. G. 1998 Toward a global filamentous fungus genome sequencing effort. *Nat. Biotechnol.*, 16, 5.

Eisler, H., Frohlich, K. U. and Heidenreich, E. 2004. Starvation for an essential amino acid induces apoptosis and oxidative stress in yeast. *Exp. Cell Res.*, 1;300, 345-53.

Emri, T., Bartók, G. and Szentirmai, A. 1994. Regulation of specific activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase in *Penicillium chrysogenum*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 117, 67-70.

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

Emri, T., Pócsi, I. and Szentirmai, A. 1999a. Analysis of the oxidative stress response of *Penicillium chrysogenum* to menadione. *Free Rad. Res.*, 30, 125-132.

Emri, T., Sámi, L., Szentirmai, A. and Pócsi, I. 1999*b*. Co-ordination of the nitrate and nitrite assimilation, the glutathione and free radical metabolisms, and the pentose phosphate pathway in *Penicillium chrysogenum*. J. Basic Microbiol., 39, 109-115.

Emri, T., Leiter, É. and Pócsi, I. 2000. Effect of phenoxyacetic acid on the glutathione metabolism of *Penicillium chrysogenum*. J. Basic Microbiol., 40, 93-104.

Emri, T., Leiter, É., Farkas, E. and Pócsi, I. 2001. Penicillin productivity and glutathione-dependent detoxification of phenylacetic and phenoxyacetic acids in *Penicillium chrysogenum*. J. Basic Microbiol., 41, 67-73.

Emri, T., Oláh, B., Sámi, L. and Pócsi, I. 2003. Does the detoxification of penicillin side-chain precursors depend on microsomal monooxygenase and glutathione S-transferase? J. Basic Microbiol. 43, 287-300.

Emri, T., Molnár, Z., Pusztahelyi, T. and Pócsi, I. 2004*a*. Physiological and morphological changes in autolyzing *Aspergillus nidulans* cultures. Folia Microbiol., 49, 277-284.

Emri, T., Molnár, Z., Pusztahelyi, T., Rosén, S. and Pócsi, I. 2004*b*. Effect of vitamin E on autolysis and sporulation of *Aspergillus nidulans*. Appl. Biochem. Biotechnol., 118, 337-348.

Emri, T., Molnár, Z., Pusztahelyi, T., Varcza, Z. and Pócsi, I. 2004*c*. The FluG-BrlA pathway contributes to the initialisation of autolysis in submerged *Aspergillus nidulans* cultures. Mycol. Res., 109, 757-763.

Emri, T., Molnár, Z. and Pócsi, I. 2005. 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., Szilágyi, M. and Pócsi, I. 2008*a* Regulation of autolysis in *Aspergillus nidulans*. Appl. Biochem. Biotechnol. közlésre benyújtva

Emri, T. Szilágyi, M. and Pócsi I. 2008*b* Effect of yeast extract on the autolysis in *Aspergillus nidulans*. J. Basic Microbiol. közlésre előkészítve

Fabrizio, P., Battistella, L., Vardavas, R., Gattazzo, C., Liou, L. L., Diaspro, A., Dossen, J. W., Gralla, E. B and Longo, V. D. 2004. Superoxide is a mediator of an altruistic aging program in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Cell. Biol., 27;166, 1055-67.

Fahrenkrog, B., Sauder, U. and Aebi, U. 2004. The *S. cerevisiae* HtrA-like protein Nma111p is a nuclear serine protease that mediates yeast apoptosis. J. Cell Sci., 1;117, 115-26.

Fassatiová, O. 1984. Penészek és fonalgombák az alkalmazott mikrobiológiában. Mezőgazdasági Kiadó, Budapest.

Fernandez-Canon, J. M. and Penalva, M. A. 1995. Fungal metabolic model for human type I hereditary tyrosinaemia. Proc. Natl Acad. Sci. U S A, 92, 9132-9136.

Fröhlich, K. U. and Madeo, F. 2000. Apoptosis in yeast - a monocellular organism exhibits altruistic behaviour. FEBS Letters, 473, 6-9.

Galagan, J. E., Calvo, S. E., Borkovich, K. A., Selker, E. U., Read, N. D. and Jaffe, D. *et al.* 2003. The genome sequence of the filamentous fungus *Neurospora crassa*. Nature, 422, 859-868.

Gechev, T. S., Van Breusegem, F., Stone, J. M., Denev, I. and Laloi, C. 2006. Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death. Bioessays., 28(11),1091-101.

Gyetzai, A., Emri, T., Takacs, K., Dergez, T., Fekete, A., Pesti, M., Pocsi, I. and Lenkey, B. 2006. Lovastatin possesses a fungistatic effect against *Candida albicans*, but does not trigger apoptosis in this opportunistic human pathogen. FEMS Yeast Res., 6(8),1140-8.

Gilman, A. 1987. G-proteins: transducers of receptor-generated signals. Annu. Rev. Biochem., 56, 615-49.

Greenhalf, W., Stephan, C. and Chaudhuri, B. 1996. Role of mitochondria and C-terminal membrane anchor of Bcl-2 in Bax induced growth arrest and mortality in *Saccharomyces cerevisiae*. FEBS Lett., 12;380, 169-75.

Gronover, C.S., Kasulke, D., Tudzynski, P. and Tudzynski, B. 2001. The role of G protein alpha subunits in the infection process of the gray mold fungus *Botrytis cinerea*. Mol. Plant. Microbe. Interact., 14, 1293-1302.

Gourlay, C. W., Carpp, L. N., Timpson, S. J. and Ayscough, K. R. 2004. A role for the actin cytoskeleton in cell death and ageing in yeast. J. Cell Biol., 164, 803-809.

Gourlay, C. W., and Ayscough, K. R. 2005. Identification of an upstream regulatory pathway controlling actin-mediated apoptosis in yeast. J. Cell Sci., 118, 2119-2132.

Han, S. and Adams, T. H. 2001. Complex control of the developmental regulatory locus *brlA* in *Aspergillus nidulans*. Mol. Genet. Genomics, 266, 260-70.

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

Han, K. H., Soe, J. A. and Yu J. H. 2004b. Regulators of G-protein signalling in *Aspergillus nidulans*: RgsA downregulates stress response and stimulates asexual sporulation through attenuation of GanB (G $\alpha$ ) signalling. *Mol. Microbiol.*, 53, 529-540.

Hannun, Y. A., Loomis, C. R., Merrill, A. H. Jr. and Bell, R. M. 1986. Sphingosine inhibition of protein kinase C activity and of phorbol dibutyrate binding in vitro and in human platelets. *J. Biol. Chem.*, 261, 12604-9.

Hannun, Y. A. and Luberto, C. 2000. Ceramide in the eukaryotic stress response. *Trends Cell Biol.*, 10, 73-80.

Hannun, Y. A., Luberto, C. and Argraves, K. M. 2001. Enzymes of sphingolipid metabolism: from modular to integrative signaling. *Biochemistry*, 40, 4893-903.

Hansberg, W. and Aguirre, J. 1990. Hyperoxidant states cause microbial cell differentiation by cell isolation from dioxygen. *Journal of Theoretical Biology*, 142, 201-221.

Hansberg, W. 1996. A hyperoxidant state at the start of each developmental stage during *Neurospora crassa* conidiation. *Free Rad. Res. Latin America*, 48, 68-75.

Harman, D. 1993. Free radical involvement in aging. *Drug. Aging*, 3, 60-80.

Herker E, Jungwirth H, Lehmann KA, Maldener C, Frohlich KU, Wissing S, Buttner S, Fehr M, Sigrist S, Madeo F. 2004. Chronological aging leads to apoptosis in yeast. *J. Cell. Biol.*, 16;164, 501-7.

Hicks, J. K., Yu, J. H., Keller, N.P. and Adams, T. H. 1997. *Aspergillus* sporulation and mycotoxin production both require inactivation of the FadA G $\alpha$  protein-dependent signaling pathway. *EMBO J.*, 16, 4916-23.

Hoff, B., Schmitt, E.K. and Kück, U. 2005. CPC1, but not its interacting transcription factor AcFKH1, controls fungal arthrospore formation in *Acremonium chrysogenum*. *Mol. Microbiol.*, 56, 1220-1233.

Jakubowski. W., Bilinski, T. and Bartosz, G. 2000. Oxidative stress during aging of stationary cultures of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Free Radic. Biol. Med.*, 28, 659-64.

James, C., Gschmeissner, S., Fraser, A. and Evan, G. I. 1997. CED-4 induces chromatin condensation in *Schizosaccharomyces pombe* and is inhibited by direct physical association with CED-9. *Curr. Biol.*, 7, 246-52.

Jürgensen, C.W., Jacobsen, N.R., Emri, T., Eriksen, S.H. and Pócsi, I. 2001. Glutathione metabolism and dimorphism in *Aureobasidium pullulans* *J. Basic Microbiol.*, 41, 131-137.

Jurgensmeier, J. M., Krajewski, S., Armstrong, R. C., Wilson, G. M., Oltersdorf, T., Fritz, L. C., Reed, J.C. and Otilie, S. 1997. Bax- and Bak-induced cell death in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol. Biol. Cell.*, 8, 325-39.

Kagedal, K., Zhao, M., Svensson, I. and Brunk, U. T. 2001. Sphingosine-induced apoptosis is dependent on lysosomal proteases. *Biochem. J.*, 359, 335-43.

Kandel, E. R., Schwartz, J. H. and Jessell, T. M. 2000. Principles of neural science., McGraw-Hill, New York.

Karaffa, L., Vaczy, K., Sandor, E., Biro, S., Szentirmai, A. and Pocsi, I. 2001. Cyanide-resistant alternative respiration is strictly correlated to intracellular peroxide levels in *Acremonium chrysogenum*. *Free Radic. Res.*, 34, 405-16.

Kasahara, S., Wang, P. and Nuss, D. L. 2000. Identification of *bdm-1*, a gene involved in G-protein  $\beta$ -subunit function and  $\alpha$ -subunit accumulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 412-417.

Katz, M. E., Rice, R. N. and Cheetham, B. F. 1994. Isolation and characterization of an *Aspergillus nidulans* gene encoding an alkaline protease. *Gene*, 150, 287-92.

Katz, M. E., Masoumi, A., Burrows, S. R., Shirliff, C. G. and Cheetham, B. F. 2000. The *Aspergillus nidulans xprF* gene encodes a hexokinase-like protein involved in the regulation of extracellular proteases. *Genetics*. 156, 1559-71.

Kawasaki, L., Wysong, D., Diamond, R. and Aguirre, J. 1997. Two divergent catalase genes are differentially regulated during *Aspergillus nidulans* development and oxidative stress. *J. Bacteriol.*, 179, 3284-92.

Kawasaki, L. and Aguirre, J. 2001. Multiple catalase genes are differentially regulated in *Aspergillus nidulans*. *J. Bacteriol.*, 183, 1434-40.

Keyhani, E. and Keyhani, J. 2004. Plasma membrane alteration is an early signaling event in doxorubicin-induced apoptosis in the yeast *Candida utilis*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1030,369-76.

Khan, M. A. S., Boon Chock, P. and Stadtman, E. R. 2005. Knockout of caspase-like gene, YCA1, abrogates apoptosis and elevates oxidized proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *PNAS*, 102, 17327-17331.

King, C. C., Zenke, F. T., Dawson, P. E., Dutil, E. M., Newton, A. C., Hemmings, B. A. and Bokoch, G. M. 2000. Sphingosine is a novel activator of 3-phosphoinositide-dependent kinase 1. *J. Biol. Chem.*, 275, 18108-13. Kolesnick, R. N. and Kronke, M. 1998. Regulation of ceramide production and apoptosis. *Annu. Rev. Physiol.*, 60, 643-65.

Knol, J. C., Engel, R., Blaauw, M., Visser, A. J. and van Haastert, P. J. 2005. The phosphatidylinositol-like protein PhLP1 is essential for G $\beta\gamma$  dimer formation in *Dictyostelium discoideum*. *Mol. Cell. Biol.*, 25, 8393-8400.

Kolesnick, R. N and Kronke, M. 1998 Regulation of ceramide production and apoptosis. *Annu. Rev. Physiol.*, 60, 643-65.

Komatsu, K., Miyashita, T., Hang, H., Hopkins, K. M., Zheng, W., Cuddeback, S., Yamada, M., Lieberman, H. B. and Wang, H. G. 2000. Human homologue of *S. pombe* Rad9 interacts with BCL-2/BCL-x<sub>L</sub> and promotes apoptosis. *Nat. Cell Biol.*, 2, 1-6.

Kraakman, L., Lemaire, K., Ma, P., Teunissen, A. W., Donaton, M. C., Van Dijck, P., Winderickx, J., de Winde, J. H. and Thevelein, J. M. 1999. A *Saccharomyces cerevisiae* G-protein coupled receptor, Gpr1, is specifically required for glucose activation of the cAMP pathway during the transition to growth on glucose. *Mol. Microbiol.* 32, 1002-12.

Kropper, L. and Fésüs, L. 2002. Apoptózis., Medicina, Budapest.

Kües, U. and Fischer, R. 2006 *The Mycota*, Vol. 1., 2<sup>nd</sup> edition, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.

Lafon, A., Seo, J. A., Han, K. J., Yu, J. H. and D'enfert, C. 2005. The heterotrimeric G-protein GanB( $\alpha$ )-SfaD( $\beta$ )-GpgA( $\gamma$ ) is a carbon source sensor involved in early cAMP-dependent germination in *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, 171, 71-80.

Lafon, A., Han, K. H., Soe, J. A., Yu, J. H. and d'Enfert, C. 2006 . G-protein and cAMP mediated signaling in aspergilli: a genomicperspective. *Fungal Genet. Biol.*, In press.

Lafuente, M.J. and Gancedo, C. 1999. Disruption and basic functional analysis of six novel ORFs of chromosome XV from *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 15, 935-943.

Lahoz, R., Reyes, F. and Perez-Leblic, M. I. 1976. Lytic enzymes in the autolysis of filamentous fungi. *Mycopathologia*, 60, 45-49.

Lara-Ortiz, T., Riveros-Rosas, H. and Aguirre J. 2003. Reactive oxygen species generated by microbial NADPH oxidase NoxA regulate sexual development in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol.*, 50, 1241-1255.

Laun, P., Pichova, A., Madeo, F., Fuchs, J., Ellinger, A., Kohlwein, S., Dawes, I., Fröhlich, K. U. and Breitenbach, M. 2001. Aged mother cells of *Saccharomyces cerevisiae* show markers of oxidative stress and apoptosis. *Mol. Microbiol.*, 39, 1166-1173.

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

Lee, B. N. and 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, 323-34.

Lee, B. N. and Adams, T. H. 1994b. The *Aspergillus nidulans fluG* gene is required for production of an extracellular developmental signal and is related to prokaryotic glutamine synthetase I. *Genes Dev.*, 8, 641-51.

Lee, B. N. and Adams, T. H. 1996. *FluG* and *flbA* function interdependently to initiate conidiophore development in *Aspergillus nidulans* through *brlA* beta activation. *EMBO J.* 15, 299-309.

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

Leiter, E., Szappanos, H., Oberparleiter, C., Kaiserer, L., Csernoch, L., Pusztahelyi, T., Emri, T., Pócsi, I., Salvenmoser, W. Marx, F. 2005. The antifungal protein PAF severely affects the integrity of the plasma of *Aspergillus nidulans* and induces an apoptosis-like phenotype. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 49, 2445-2453.

Leith, K. M. and Hazen, K. C. 1988. Paraquat induced thiol modulation of *Histoplasma capsulatum* morphogenesis. *Mycopathologia*, 103, 21-27.

Leberer, E., H Marcus, D., Dignard, D., Johnson, L., Ushinsky, S., Thomas, D. Y. and Schroppel, K. 2001. Ras links cellular morphogenesis to virulence by regulation of the MAP kinase and cAMP signalling pathways in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Mol Microbiol.*, 42(3), 673-87.

Ligr, M., Madeo, F., Frohlich, E., Hilt, W., Frohlich, K.U. and Wolf, D. H. 1998. Mammalian Bax triggers apoptotic changes in yeast. *FEBS Lett.*, 438, 61-5.

Lodish, H., Berk, A., Zipursky, L., Matsudaira, P., Baltimore, D. and Darnell, J. 2000. *Molecular Cell Biology* 4th ed., W.H. Freeman and Company, New York.

Longo, V. D., Liou, L. L., Valentine, J. S. and Gralla. E. B. 1999. Mitochondrial superoxide decreases yeast survival in stationary phase. *Arch. Biochem. Biophys.*, 365, 131-42.

Ludovico, P., Sousa, M. J., Silva, M. T., Leao, C. and Corte-Real, M. 2001. *Saccharomyces cerevisiae* commits to a programmed cell death process in response to acetic acid. *Microbiology*, 147, 2409-15.

- Lukov, G. L., Hu, T., Mclaughlin, J. N., Hamm, H. E. and Willardson, B.M. 2005. Phosducin-like protein acts as a molecular chaperone for G-protein  $\beta\gamma$  dimer assembly. *EMBO J.*, 24, 1965-1975.
- Madeo, F., Fröhlich, E. and Fröhlich, K. U. 1997 A yeast mutant showing diagnostic markers of early and late apoptosis. *J. Cell Biol.*, 139, 729-734.
- Madeo, F., Fröhlich E., Ligr, M., Grey, M., Sigrist, S. J., Wolf, D. H. and Fröhlich, K. U. 1999. Oxygen stress: a regulator of apoptosis in yeast. *J. Cell Biol.*, 145, 757-767.
- Manavathu, E., Duncan, C., Porte, Q. and Gunasekaran, M. 1996a. Inhibition of yeast-to mycelium conversion of *Candida albicans* by conjugated styryl ketones. *Mycopathologia*, 135, 79-83.
- Manavathu, M., Gunasekaran, S., Porte, Q., Manavathu, E. 1996b. and Gunasekaran, M. Changes in glutathione metabolic enzymes during yeast-to-mycelium conversion of *Candida albicans*. *C. J. Microbiol.*, 42, 76-79.
- Manon, S., Chaudhuri, B. and Guerin, M. 1997. Release of cytochrome c and decrease of cytochrome c oxidase in Bax-expressing yeast cells, and prevention of these effects by coexpression of Bcl-x<sub>L</sub>. *FEBS Lett.*, 22;415, 29-32.
- Marchetti, M. A., Weinberger, M., Murakami, Y., Burhans W. C. and Huberman, J. A. 2005. Production of reactive oxygen species in response to replication stress and inappropriate mitosis in fission yeast. *J. Cell Sci.*, 119, 124-131.
- Marek, S. M., Wu, J., Louise Glass, N., Gilchrist, D. G. and Bostock, R. M. 2003. Nuclear DNA degradation during heterokaryon incompatibility in *Neurospora crassa*. *Fungal Genet. Biol.*, 40(2),126-37.
- Marshall, M. A. and Timberlake, W. E. 1991. *Aspergillus nidulans wetA* activates spore-specific gene expression. *Mol. Cell. Biol.*, 11, 55-62.
- Mazzoni, C., Mancini, P., Madeo, F., Palermo, V. and Falcone, C. 2003. A *Kluyveromyces lactis* mutant in the essential gene KILSM4 shows phenotypic markers of apoptosis. *FEMS Yeast Res.*, 4(1),29-35.
- McCluskey, K. 2003. The Fungal Genetics Stock Center: from molds to molecules. *Adv. Appl. Microbiol.*, 52, 245-62.
- McCudden, C. R., Hains, M. D., Kimple, R. J., Siderovski, D. P. and Willard, F. S. 2005. G-protein signaling: back to the future. *Cell. Mol. Life. Sci.*, 62, 551-77.
- McIntyre, M., Berry, D. R. and McNeil, B. 1999. Response of *Penicillium chrysogenum* to oxygen starvation in glucose- and nitrogen-limited chemostat cultures. *Enzyme Microb. Tech.*, 25, 447-454.

Molnár, Z., Mészáros, E., Szilágyi, Z., Rosén, S., Emri, T. and Pócsi, I. 2004. Influence of *fadA*<sup>G203R</sup> and *AflbA* mutations on morphology and physiology of submerged *Aspergillus nidulans* cultures. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 118, 349-60.

Molnár, Z., Emri, T., Zavaczki, E., Pusztahelyi, T. and Pócsi I. 2006. Effects of mutations in the GanB/RgsA G-protein mediated signalling on the autolysis of *Aspergillus nidulans*. *J. Basic Microbiol.*, In press.

Monreno, S., Klar, A. and Nurse, P. 1991. Molecular genetics analysis of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods Enzymol.*, 194, 795-823.

Mousavi, S. A. and Robson, G.D. 2003 Entry into the stationary phase is associated with a rapid loss of viability and an apoptotic like phenotype in the opportunistic pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Fungal Genet. Biol.*, 39, 221-229.

Munkres, K. D., and M. Minssen. 1976. Aging of *Neurospora crassa*. I. Evidence for the free radical theory of aging from studies of a natural death mutant. *Mech. Aging Dev.*, 5, 79-98.

Nagy, M., Emri, T., Fekete, E., Sándor, E., Springael, J. Y., Penninckx, M. J., Pócsi, I. 2003. Glutathione metabolism of *Acremonium chrysogenum* in relation to cephalosporin C production: Is  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase in the centre? *Folia Microbiol.*, 48, 149-155.

Nugent, C. I., Hughes, T. R., Lue, N. F. and Lundblad, V. 1996. Cdc13p: a single-strand telomeric DNA-binding-protein with a dual role in yeast telomere maintenance. *Science*, 11;274, 249-52.

Oberley, L. W. and Spitz, D. R. 1984. Assay of superoxide dismutase activity in tumour tissue. *Method. Enzymol.*, 105, 457-464.

Olivera, A. and Spiegel, S. 1993. Sphingosine-1-phosphate as second messenger in cell proliferation induced by PDGF and FCS mitogens. *Nature*, 365, 557-60.

Patidar, S. K and Tare, V. 2005. Effect of molybdate on methanogenic and sulfidogenic activity of biomass. *Bioresour Technol.* 2005 96, 1215-22.

Penninckx, M. J. 2000. A short review on the role of glutathione in the response of yeasts to nutritional, environmental, and oxidative stresses. *Enzyme Microb. Tech.*, 26, 737-742.

Perez-Leblic, M. I., Reyes, F., Martinez, M. J. and Lahoz, R. 1982. Cell wall degradation in the autolysis of filamentous fungi. *Mycopathologia*, 80, 147-155.

Peterson, G. L. 1983. Determination of total protein. *Method. Enzymol.*, 91, 86-105.

Phillips, A. J., Crowe, J. D. and Ramsdale, M. 2006. Ras pathway signaling accelerates programmed cell death in the pathogenic fungus *Candida albicans*. Proc Natl Acad Sci USA., 17;103(3), 726-31.

Pinto, M. C., Mata, A. M. and López-Barea, J. 1984. Reversible inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* glutathione reductase under reducing conditions. Archives of Biochem. Biophys., 228, 1-12.

Pócsi, I., Emri, T., Sámi, L., Leiter, É. And Szentirmai, A. 2001. The glutathione metabolism of the  $\beta$ -lactam producer filamentous fungus *Penicillium chrysogenum*. Acta Microbiol. Immun. Hung. 48, 393-411.

Pócsi, I., Pusztahelyi, T., Sámi, L. and Emri, T. 2003. Autolysis of *Penicillium chrysogenum* - a holistic approach. Ind. J. Biotechnol., 149, 3121-3127.

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

Pócsi, I., Miskei, M., Karányi, Z., Emri, T., Ayoubi, P., Pusztahelyi, T., Balla, G. and Prade, R. A. 2005. Comparison of gene expression signatures of diamide, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and menadione exposed *Aspergillus nidulans* cultures – linking genome-wide transcriptional changes to cellular physiology. BMC Genomics 6(182).

Pócsi, I., Molnár, Zs., Pusztahelyi, T., Varcza, Z. and Emri, T. 2007. Yeast-like cell formation and glutathione metabolism in autolysing cultures of *Penicillium chrysogenum*. ACTA biol. Hung. (in press).

Puryer, M. A. and Hawkins, C. J. 2006. Human, insect and nematode caspases kill *Saccharomyces cerevisiae* independently of YCA1 and Aif1p. Apoptosis, 11, 509-17.

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

Pusztahelyi, T., Pócsi, I. and Szentirmai, A. 1997b. Aging of *Penicillium chrysogenum* cultures under carbon starvation: II. protease and *N*-acetyl- $\beta$ -D-hexosaminidase production. Biotechnol. Appl. Biochem., 25, 87-93.

Pusztahelyi, T., Molnar, Z., Emri, T., Klement, E., Miskei, M., Kerekgyarto, J., Balla, J. and Pócsi, I. 2006. Comparative studies of differential expression of chitinolytic enzymes encoded by *chiA*, *chiB*, *chiC* and *nagA* genes in *Aspergillus nidulans*. Folia Microbiol. (Praha), 51, 547-54.

Reyes, F., Villanueva, P. and Alfonso, C. 1990. Nucleases in the autolysis of filamentous fungi. FEMS Microbiol. Lett., 57, 67-72.

Ribeiro ,G. F., Corte-Real, M. and Johansson, B. 2006. Characterization of DNA damage in yeast apoptosis induced by hydrogen peroxide, acetic acid and hyperosmotic shock. *Mol. Biol. Cell*, In press.

Rocha, C. R., Schroppel, K., H Marcus, D., Marcil, A., Dignard, D., Taylor, B. N., Thomas, D. Y., Whiteway, M. and Leberer, E. 2001. Signaling through adenylyl cyclase is essential for hyphal growth and virulence in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Mol Biol Cell.*, 12, 3631-43.

Rodriguez-Menocal, L. and D'Urso, G. 2004. Programmed cell death in fission yeast. *FEMS Yeast Research*, 5, 111-117.

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

Rosen, S., Yu, J. H. and Adams, T. H. 1999. The *Aspergillus nidulans* *sfaD* gene encodes a G-protein beta subunit that is required for normal growth and repression of sporulation. *EMBO J.*, 18, 5592-600.

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

Roze, L. V. and Linz, J. E. 1998. Lovastatin triggers an apoptosis-like cell death process in the fungus *Mucor racemosus*. *Fungal Genet. Biol.*, 25(2),119-33.

Ryser, S., Vial, E., Magnenat, E., Schlegel, W. and Maundrell, K. 1999. Reconstitution of caspase-mediated cell-death signalling in *Schizosaccharomyces pombe*. *Curr. Genet.*, 36, 21-8.

Saavedra, A. P., Tsygankova, O. M., Prendergast, G. V., Dworet, J. H., Cheng, G. and Meinkoth, J. L. 2002. Role of cAMP, PKA and Rap1A in thyroid follicular cell survival. *Oncogene*, 24;21(5), 778-88.

Sámi, L., Emri, T. and Pócsi I. 2001a. Autolysis and ageing of *Penicillium chrysogenum* cultures under carbon starvation: glutathione metabolism and formation of reactive oxygen species. *Mycol. Res.*, 105, 1246-1250.

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

Sami L, Karaffa L, Emri T, Pocsi I. 2003. Autolysis and ageing of *Penicillium chrysogenum* under carbon starvation: respiration and glucose oxidase production. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.*, 50, 67-76.

Saupe, S. J., Clave, C. and Begueret, J. 2000. Vegetative incompatibility in filamentous fungi: *Podospora* and *Neurospora* provide some clues. *Curr. Opin. Microbiol.*, 3, 608-612.

Sato, T., Hanada, M., Bodrug, S., Irie, S., Iwama, N., Boise, L. H., Thompson, C. B., Golemis, E., Fong, L. and Wang, H. G. 1994. Interactions among members of the Bcl-2 protein family analyzed with a yeast two-hybrid system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 27;91, 9238-42.

Sato, T. K., Overduin, M. and Emr, S. D. 2001. Location, location, location: membrane targeting directed by PX domains. *Science*, 294, 1881-1885.

Schafer, F.Q. and Buettner, G. R. 2001. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radical Biology and Medicine* 30, 1190-1212.

Scherer, M., Huijun, W., Liese, R. and Fisher, R. 2002. *Aspergillus nidulans* catalase-peroxidase gene (*cpeA*) is transcriptionally induced during sexual development through the transcription factor StuA. *Eukaryot. Cel.*, 1, 725-35.

Seo, J. A., Guan, Y. and Yu, J. H. 2003. Suppressor mutations bypass the requirement of *fluG* for asexual sporulation and sterigmatocystin production in *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, 165, 1083–1093.

Seo, J. A., Han, K. H. and Yu, J. H. 2004. The *gprA* and *gprB* genes encode putative G-protein-coupled receptors required for self-fertilization in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol.*, 53, 1611-1623.

Seo, J. A., Han, K. H. and Yu, J. H. 2005. Multiple roles of a heterotrimeric G-protein  $\gamma$ -subunit in governing growth and development of *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, 171, 81-89.

Seo, J. A. and Yu, J. H. 2006. The phosducin-like protein PhnA is required for Gbetagamma-mediated signaling for vegetative growth, developmental control, and toxin biosynthesis in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot Cell.*, 5, 400-10.

Seo, J. A., Guan, Y. and Yu, J. H. 2006. FluG-dependent asexual development in *Aspergillus nidulans* occurs via derepression. *Genetics*, 172, 1535-44.

Shimizu, K. and 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.

Simon, V. R., Karmmon, S. L. and Pon L. A. 1997. Mitochondrial inheritance cell cycle and actin dependence of polarised mitochondrial movements in *Saccharomyces cerevisiae* *Cell Motil. Cytoskeleton*, 37, 199-210.

Sipiczki, M., Takeo, K. and Grallert, A. 1998. Growth polarity transitions in a dimorphic fission yeast. *Microbiology* 144, 3475-85.

Smith, A., Ward, M. P. and Garrett, S. 1998. Yeast PKA represses Msn2p/Msn4p-dependent gene expression to regulate growth, stress response and glycogen accumulation. *EMBO J.*, 17, 3556-3564.

Strasser. A., O'Connor, L. and Dixit, V.M. 2000. Apoptosis signaling. *Annu. Rev. Biochem.*, 69, 217-45.

Takaya, N., Yamazaki, D., Horiuchi, H., Ohta, A. and Takagi, M. 1998. Cloning and characterization of a chitinase-encoding gene (*chiA*) from *Aspergillus nidulans*, disruption of which decreases germination frequency and hyphal growth. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 62, 60-5.

Tao, W., Kurschner, C. and Morgan, J. I. 1997. Modulation of cell death in yeast by the Bcl-2 family of proteins. *J. Biol. Chem.*, 13;272, 15547-52.

Thomas, D., Klein, K., Manavathu, E., Dimmock, J. R. and Mutus, B. 1991. Glutathione levels during thermal induction of the yeast-to-mycelial transition in *Candida albicans*. *FEMS Microbiology Letters*, 77, 331-334.

Thrane, C., Kaufmann, U., Stummann, B. M. and Olsson, S. 2004. Activation of caspase-like activity and poly (ADP-ribose) polymerase degradation during sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet. Biol.*, 41, 361-8.

Theilgaard, H. A. and Nielsen, J. 1999. Metabolic control analysis of the penicillin biosynthetic pathway: the influence of the LLD-ACV:bisACV ratio on the flux control. *Antonie van Leeuwenhoek*, 75, 145-154.

Tilburn, J., Scazzocchio, C., Taylor, G. G., Zabicky-Zissman, J. H., Lockington, R. A. and Davies, R. W. 1983. Transformation by integration in *Aspergillus nidulans*. *Gene*, 26, 205-211.

Tomarelli, R. M., Charney, J. and 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.

Umar, M. H. and Van Griensven, L. J. L. D. 1997. Morphogenetic cell death in developing primordia of *Agaricus bisporus*. *Mycologia*, 89, 247-277.

Umar, M. H. and Van Griensven, L. J. L. D. 1998. The role of morphogenetic cell death in the histogenesis of the mycelial cord of *Agaricus bisporus* and in the development of macrofungi. *Mycol. Res.*, 102, 719-735.

Uren, A. G., Beilharz, T., O'Connell, M. J., Bugg, S. J., van Driel, R., Vaux, D. L and Lithgow, T. 1999. Role for yeast inhibitor of apoptosis (IAP)-like proteins in cell division. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96, 10170-5.

Váchová, L. and Palková, Z. 2006. Caspases in yeast apoptosis-like cell death: facts and artefacts. *FEMS Yeast Res.*, XX, 1-10.

Vágvölgyi, Cs. and Ferenczy, L. 1991. Isolation of nuclei from *Aspergillus nidulans* protoplasts. *FEMS Microbiol. Lett.*, 66, 247-251.

vanKuyk, P. A., Cheetham, B. F. and Katz, M. F. 2000. Analysis of two *Aspergillus nidulans* genes encoding extracellular proteases. *Fungal. Genet. Biol.*, 29, 201-10.

Versele, M., de Winde, J. H. and Thevelein, J. M. 1999. A novel regulator of G-protein signalling in yeast, Rgs2, downregulates glucose-activation of the cAMP pathway through direct inhibition of Gpa2. *EMBO J.*, 18, 5577-5591.

Voet, D. and Voet, J. G. 1995. *Biochemistry* 2nd ed., John Wiley & Sons, New York.

Warholm, M., Guthenberg, C., Von Bahr, C. and Mannervik, B. 1985. Glutathione transferases from human liver. *Method. Enzymol.*, 113, 499-504.

Weinberger, M., Ramachandran, L., Feng, L., Sharma, K., Sun, X., Marchetti, M., Huberman, J. A. and Burhans W. C. 2005. Apoptosis in budding yeast caused by defects in initiation of DNA replication. *J. Cell Sci.*, 118, 3543-3553.

Weis, R., Luiten, R., Skranc, W., Schwab, H., Wubbolts, M. and Glieder, A. 2004. Reliable high-throughput screening with *Pichia pastoris* by limiting yeast cell death phenomena. *FEMS Yeast Res.*, 5(2),179-89.

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

Wieser, J., Yu, J. H. and Adams, T. H. 1997. Dominant mutations affecting both sporulation and sterigmatocystin biosynthesis in *Aspergillus nidulans*. *Curr. Genet.*, 32, 218-24.

Winderickx, J., Holsbeeks, I., Lagatie, O., Giots, F., Thevelein, J. and de Winde H. 2003. From feast to famine; adaptation to nutrient availability in yeast. In: *Yeast stress*

responses, Edd.: Hohman, S. and Mager, W.H., Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany pp.:305-387.

Wissing, S., Ludovico, P., Herker, E., Buttner, S., Engelhardt, S. M., Decker, T., Link, A., Proksch, A., Rodrigues, F., Corte-Real, M., Frohlich, K. U., Manns, J., Cande, C., Sigrist, S. J., Kroemer, G. and Madeo, F. 2004. An AIF orthologue regulates apoptosis in yeast. *J Cell Biol.*, 27;166, 969-74.

Wysocki, R. and Kron, S. J. 2004. Yeast cell death during DNA damage arrest is independent of caspase or reactive oxygen species. *J. Cell Biol.*, 166, 311-6.

Yamaki, M., Umehara, T., Chimura, T and Horikoshi, M. 2001. Cell death with predominant apoptotic features in *Saccharomyces cerevisiae* mediated by deletion of the histone chaperone ASF1/CIA1. *Genes Cells.*, 6,1043-54.

Yamazaki, H., Yamazaki, D., Takaya, N., Takagi, M., Ohta, A. and Horiuchi, H. 2007. A chitinase gene, *chiB*, involved in the autolytic process of *Aspergillus nidulans*. *Curr. Genet.*, 51(2):89-98.

Yu, J. H., Wieser, J. and Adams, T. H. 1996a. The *Aspergillus* FlbA RGS domain protein antagonizes G-protein signaling to block proliferation and allow development. *EMBO J.*, 15, 5184-90.

Yu, J. H., Butchko, R. A. E., Fernandes, M., Keller, N. P., Leonard, T. J. and Adams, T. H. 1996b Conservation of structure and function of the aflatoxin regulatory gene *aflR* from *Aspergillus nidulans* and *A. flavus*. *Curr. Genet.*, 29, 549-555.

Yu, J. H., Rosen, S. and 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. and Keller, N. P. 2005. Regulation of secondary metabolism in filamentous fungi. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 43, 437-458.

Yu, J. H. 2006. Heterotrimeric G-protein signaling and RGSs in *Aspergillus nidulans*. *J. Microbiol.*, 44, 145-54.

Zhang, Q., Chieu, H. K., Low, CP., Zhang, S., Heng, C. K. and Yang, H. 2003. *Schizosaccharomyces pombe* cells deficient in triacylglycerols synthesis undergo apoptosis upon entry into the stationary phase. *J. Biol. Chem.*, 278, 47145-55.

## Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni, témavezetőmnek, Dr. Emri Tamás egyetemi adjunktusnak, hogy végtelenül türelmes volt velem szemben és hasznos tanácsokkal segítette munkámat, Dr. Pócsi István tanszékvezető egyetemi docensnek, hogy a Mikrobiális Biotechnológiai és Sejtbiológiai Tanszéken lehetővé tette számomra értekezésem elkészítését. Köszönettel tartozom Dr. Pusztahelyi Tündének, valamint Dr. Scholtz Beátának és a Debreceni Klinikai Genomika Központnak, hogy segítették, illetve lehetővé tették a kvantitatív PCR mérések elvégzését. Köszönet illeti Zavaczki Erzsébet és Dudás Gábor szakdolgozókat, akik sokszor voltak segítségemre. Végül, de nem utolsó sorban meg kell köszönnöm a Mikrobiális Biotechnológiai és Sejtbiológiai Tanszék, valamint a Genetikai és Alkalmazott Mikrobiológiai Tanszék dolgozóitól kapott támogatást.

## Az értekezés alapjául szolgáló tudományos munkák

### Közlemények:

1. Emri, T., Oláh, B., Sámi, L., **Molnár, Zs.**, Nagy, M., Pusztahelyi, T. and Pócsi, I. (2002) Investigation of glutathion metabolism in filamentous fungi. *Acta Microbiol et Immunol. Hung.* 49, 267-276. (**IF: -**)
2. **Molnár, Z.**, Mészáros, E., Szilágyi, Zs., Rosén, S., Emri, T., and Pócsi, I. (2004) Influence of *fadA* and *flbA* mutations on the morphology and physiology of submerged *Aspergillus nidulans* cultures. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 118(1-3):349-60. (**IF: 0,907**)
3. Emri, T., **Molnár, Z.**, Pusztahelyi, T. and Pócsi, I. (2004) Physiological and morphological changes in ageing *Aspergillus nidulans* cultures. *Folia Microbiologica*. 49(3):277-84. (**IF: 1,034**)
4. Emri, T., **Molnár, Z.**, Pusztahelyi, T., Varcza, Z. and Pócsi, I. (2005) The *fluG*-BrlA pathway contributes to the initialisation of autolysis in submerged *Aspergillus nidulans* cultures. *Mycol Res.* 109(Pt 7):757-63. (**IF: 1,572**)
5. Emri, T., **Molnár, Z.** and Pócsi, I. (2005) The appearances of autolytic and apoptotic markers are concomitant but differently regulated in carbon-starving *Aspergillus nidulans* cultures. *FEMS Microbiol Lett.* 251(2):297-303. (**IF: 2,057**)
6. Molnár, Z., Emri, T., Zavaczki, E., Pusztahelyi, T. and Pócsi, I. (2006) Effects of mutations in the GanB/RgsA G protein mediated signalling on the autolysis of *Aspergillus nidulans*. *J. Basic Microbiol.* 46(6):495-503. (**IF: 1,000**)
7. Pusztahelyi, T., Molnár, Z., Emri, T., Klement, É., Miskei, M., Kerékgyártó, J., Balla, I. and 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(6):547-54. (**IF: 1,059**)
8. Pócsi, I., Molnár, Zs., Pusztahelyi, T., Varcza, Z. and Emri, T. (2007) Yeast-like cell formation and glutathione metabolism in autolysing cultures of *Penicillium chrysogenum*. *ACTA biol. Hung.* (in press)
9. Emri, T., **Molnár, Zs.**, Szilágyi, M. and Pócsi, I. (2008) Regulation of autolysis in *Aspergillus nidulans*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* (közlésre benyújtva)

### Előadások és poszterek:

1. **Molnár, Zs.**, Emri, T. and Pócsi, I. Molnár, Zs., Emri, T. és Pócsi, I. Az *Aspergillus nidulans* autolízisét kísérő morfológiai és redox változások vizsgálata. II. Magyar Mikológiai Konferencia, Szeged 2002. (a poszter elnyerte a "rendezvény legjobb posztere címet")
2. Emri, T., **Molnár, Zs.** és Pócsi, I. Morfológiai és fiziológiai változások vizsgálata öregedő *Aspergillus nidulans* tenyészetekben. A Magyar Mikrobiológiai Társaság 19. Nagygyűlése, Balatonfüred 2002.

3. Emri, T., **Molnár, Zs.** and Pócsi, I. Morphological and physiological changes in ageing *Aspergillus nidulans* cultures. VIII. International Fungal Biology Conference, Guanajuato, Mexico, 2002.
4. Pócsi, I., **Molnár, Zs.**, Mészáros, E. and Emri, T. Influence of *fadA* and *flbA* mutations on the morphology and physiology of submerged *Aspergillus nidulans* cultures. International Conference on Emerging Frontiers at the Interface of Chemistry and Biology, Trivandrum, India 2003. (a poszter elnyerte a "rendezvény legjobb posztere címet")
5. Emri, T., **Molnár, Zs.**, Pusztahelyi, T., Leiter, É. and Pócsi, I. Az autolízis és az apoptózis kapcsolatának vizsgálata *Aspergillus nidulans* fonalas gombákban. A Magyar Mikrobiológiai Társaság 21. Nagygyűlése, Keszthely 2004.
6. Emri, T., Pusztahelyi, T., **Molnár, Zs.** és Pócsi, I. A FluG fehérje nélkülözhetetlen az *Aspergillus nidulans* autolízisének iniciálásában. A Magyar Mikrobiológiai Társaság 21. Nagygyűlése, Keszthely 2004.
7. Pusztahelyi, T., Emri, T., **Molnár, Zs.**, Balla, J. és Pócsi, I. *Aspergillus nidulans* kitináz gének expressziójának változása szénlimitált öregedő tenyészetekben és oxidatív stressz hatására. A Magyar Mikrobiológiai Társaság 21. Nagygyűlése, Keszthely 2004.
8. Pusztahelyi T., Emri, T., **Molnár, Zs.** és Pócsi, I. *Aspergillus nidulans* hidrolitikus enzimek génextpressziójának változása szénlimitált öregedő tenyészetekben és oxidatív stressz hatására. A Magyar Mikrobiológiai Társaság 21. Nagygyűlése, Keszthely 2004.
9. Varcza, Z., Emri, T., **Molnár, Zs.**, Pusztahelyi, T. és Pócsi, I. Élesztőszerű sejtek képződése és glutation metabolizmus *Penicillium chrysogenum* és *Aspergillus nidulans* gombákban. A Magyar Mikrobiológiai Társaság 21. Nagygyűlése, Keszthely 2004.
10. **Molnár Zs.**, Zavaczki E., Dudás G., Emri T. és Pócsi I. A G-protein mediált jelátviteli útvonalak szerepe az *Aspergillus nidulans* autolízisének szabályozásában. A Magyar Mikológiai Társaság 3. Nagygyűlése, Mátraháza 2005.
11. Emri, T., **Molnár, Zs.**, Veres, T., Pusztahelyi, T. and Pócsi, I. (2005) Az autolízis és a sporuláció szénforrás-függő szabályozása az *Aspergillus nidulans* fonalas gombában III. Magyar Mikológiai Konferencia, Mátraháza 2005
12. Pusztahelyi, T., **Molnár, Zs.**, Kelemen, Zs., Emri, T. and Pócsi, I. (2005) A *chiB* gén expresszióját a BrlA transzkripciós faktor szabályozza az *Aspergillus nidulans* fonalas gombában. III. Magyar Mikológiai Konferencia, Mátraháza 2005.
13. Pusztahelyi, T., **Molnár, Zs.**, Kelemen, Zs., Emri, T. and Pócsi, I. (2005) A *chiB* gén expresszióját a BrlA transzkripciós faktor szabályozza az *Aspergillus nidulans* fonalas gombában. III. Magyar Mikológiai Konferencia, Mátraháza 2005
14. **Molnár, Zs.**, Zavaczki, E., Dudás, G., Emri, T. and Pócsi, I. Involvement of G protein mediated signalling pathways in the regulation of autolysis in *Aspergillus nidulans*. 16<sup>th</sup> International Congress of the Hungarian Society for Microbiology, Keszthely 2005.

15. Pócsi, I., **Molnár, Zs.** and Emri, T. Regulation of autolysis in *Aspergillus nidulans*. 8th European Conference on Fungal Genetics. Austria, Vienna 2006

### **Az értekezéshez nem kapcsolódó tudományos munkák:**

#### **Közlemények:**

1. Emri, T., **Molnar, Zs.**, Pusztahelyi, T., Rosén, S. and Pócsi, I. (2004) Effect of vitamin E on the autolysis and sporulation of *Aspergillus nidulans*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 118(1-3):337-48. (**IF: 0,907**)
2. Emri, T., **Molnar, Zs.**, Veres, T., Pusztahelyi, T., Dudas, G. and Pócsi I. (2006) Glucose repression of autolysis and conidiogenesis in *Emericella nidulans*. *Mycol. Res.* 110(Pt 10):1172-8. (**IF: 1,572**)

#### **Előadások és poszterek:**

1. Pócsi, I., **Molnár, Zs.** and Emri, T. Effect of vitamin E on the autolysis and sporulation of *Aspergillus nidulans*. International Conference on Emerging Frontiers at the Interface of Chemistry and Biology, Trivandrum, India 2003.
2. Emri, T., **Molnár, Zs.**, Pócsi, I. Effect of vitamin E and menadion on the autolysis and sporulation of *Aspergillus nidulans*. 14<sup>th</sup> International Congress of the Hungarian Society for Microbiology, Balatonfüred 2003.
3. **Molnár Zs.**, Emri T., Veres T., Pusztahelyi T., Dudás G. és Pócsi I. A 2-dezoxi-D-glükóz és az E-vitamin hatása *Aspergillus nidulans* tenyészetek autolízisére és sporulációjára. A Magyar Mikrobiológiai társaság 15. Nagygyűlése, Keszthely 2004.

**A doktori fogadalom szövege**

Én, .....fogadom,  
hogy a Debreceni Egyetem doktoraihoz méltó magatartást tanúsítok.  
Legjobb tudásom szerint munkálkodom  
az egyetem hírnevének öregbítésén.  
A tudományos etika tiszteletben tartásával  
szolgálom a tudományos haladást,  
az egyetemes emberi kultúrát  
és a nemzeti értékek megőrzését.

**Szénéhező *Aspergillus nidulans* tenyészetek morfológiai és fiziológiai változásai G-protein mediált jelátvitelben defektes mutánsokban**

Értekezés a doktori (Ph.D.) fokozat megszerzése érdekében  
a biológia tudományágban

Írta: Molnár Zsolt okleveles biológus

Készült a Debreceni Egyetem biológia doktori iskolája  
(A bioregulációs molekuláris és fiziológiai szerveződése és biotechnológiai vonatkozásai  
programja) keretében

Témavezető: Dr. Emri Tamás

A doktori szigorlati bizottság:

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

A doktori szigorlat időpontja: 200... ..

Az értekezés bírálói:

|          |       |
|----------|-------|
| Dr. .... | ..... |
| Dr. .... | ..... |
| Dr. .... | ..... |

A bírálóbizottság:

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

Az értekezés védésének időpontja: 200... ..