



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

Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

Molnár Zsolt

**Debreceni Egyetem
Természettudományi Kar
Debrecen, 2007.**

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 a 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, 1994; Hicks és munkatársai, 1997; Adams és munkatársai, 1998; Rosen és munkatársai, 1999; Chang és munkatársai, 2004; Han és munkatársai, 2004*a, 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, nem ismerjük eléggé a szénéhező tenyészetek morfológiai és fiziológiai változásait, és a mögöttük álló szabályozó mechanizmusokat. Nem tisztázott a G-proteinek által mediált útvonalak szerepe a gomba szénéhező, autolizáló tenyészetek anyagcsere változásainak szabályozásában, és bár gyakorlati szempontból is fontos, eddig kevésbé feltérképezett terület az autolízis és az apoptózis regulációja és a két folyamat kapcsolata.

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.

2. Módszerek

Kísérleteinkben az alábbi törzseket használtuk:

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

Vizsgálatainkhoz élesztőkivonattal és szükség szerint biotinnal, piridoxinnal és p-aminobenzoésavval kiegészített minimál táplevest és tápagart használtunk fel. A tápleves 100 ml-ét 50 millió spórával oltottuk be és a tenyészeteket rázóinkubátorban 37 °C-on 180 rpm-mel rázattuk (Barrat és munkatársai, 1965).

Az intracelluláris enzimek aktivitásának méréséhez zsugorított üvegszűrőn átszűrt tenyészetből nyert micéliumokat használtunk. A fagyott mintákat X-press (AB Biox, Göteborg, Svédország) segítségével tártuk fel. Az enzimaktivitásokat: glükóz-6-foszfát dehidrogenáz (G6PD), NADP-specifikus izocitrát dehidrogenáz (NADP-ID), kataláz, szuperoxid diszmutáz (SOD), glutation reduktáz (GR), glutation peroxidáz (GPx) – a γ -glutamil-transzpeptidáz (γ GT) aktivitások kivételével - „rate assay” módszerekkel fotometriásan határoztuk meg (Roggenkamp és munkatársai, 1974; Chiu és munkatársai, 1976, Pinto és munkatársai, 1984; Oberley és munkatársai, 1984; Bruinenberg és munkatársai, 1983; Emri és munkatársai, 1994). A γ GT esetében az enzim jelenlétében a γ -glutamil-*p*-nitroanilidből 1 óra alatt felszabadult *p*-nitroanilid mennyiségét mértük meg fotometriásan (Emri és munkatársai, 1997). A minták fehérjetartalmát a Peterson által módosított (1983) Folin reakció segítségével határoztuk meg, és a mért enzimaktivitásokat a fehérjetartalomra vonatkoztattuk.

A sejtek glutation (GSH) és glutation-diszulfid (GSSG) tartalmának mérésekor a sejteket 5% (w/v) 5'-szulfoszalicilsav oldatban tártuk fel. A sejtek oxidált glutation (GSSG) tartalmának méréséhez az Anderson (1985) által kidolgozott „rate assay” eljárást használtuk. A DTNB redukálódását 412 nm-en, fotometrikus úton követtük nyomon. A minták GSH tartalmát 2-vinilpiridines kezeléssel reagáltattuk el (Emri és munkatársai, 1997). 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 (Emri és munkatársai, 1997).

A sejtek szuperoxid termelésének vizsgálatánál a tenyészetekhez dihidroetidint, peroxid tartalmának méréséhez 2',7'-diklorofluorescein-diacetátot adtunk és az egy óra alatt képződő etidium (Et), illetve 2',7'-diklorofluorescein (DCF) koncentrációját fluorimetriásan határoztuk meg (Carter és munkatársai, 1994), a sejtek szulfoszalicilsavas feltárását követően.

A tenyészetek életképességét, azok MTT redukáló képességével jellemeztük. A micéliumokat 5 mg/ml MTT (metil-tiazoltetrazolium) koncentrációjú friss tápoldatban szuszpendáltuk fel és 4 órán át 37 °C-on inkubáltuk, majd a sejtekben képződött MTT-formazán mennyiségét fotometriásan határoztuk meg (Lee és munkatársai, 1999).

A tenyészetek légzését oxinográfiás cellában, OXY 320 típusú polarográfiás oxigén elektróddal határoztuk meg. A cián-rezisztens légzés (alternatív légzés) mérésekor a citokrom-c függő utat KCN-dal gátoltuk és a megmaradó aktivitást tekintettük cián-rezisztens légzésnek (Bahr és Bonner, 1973).

A tenyészetek szárazanyagtartalmának (DCM) mérésekor 5 ml tenyészetet zsugorított üvegszűrőn szűrtünk át, a kiszűrt micéliumokat súlyállandóságig szárítottuk. A szűrletet a tápközeg glükóz, ammónia tartalmának, illetve kitináz és proteináz aktivitásának meghatározásához használtuk fel (Pusztahelyi és munkatársai, 1997). A tápközeg glükóz tartalmának meghatározása a Leary és munkatársai (1992) által kidolgozott “rate assay” segítségével történt. A tápközeg ammónia koncentrációját OP-NH3-7113-S típusú ammónia-szenzitív elektróddal mértük meg (Pusztahelyi és munkatársai, 1997). A kitináz aktivitások mérésénél CM-Chitin-RBV kromofór csoporttal jelölt szubsztrátoldatot adtunk a szűrlethez. A felszabaduló színes termék mennyiségét fotometriásan határoztuk meg (Emri és munkatársai, 2004). Az extracelluláris proteináz aktivitások mérésénél azokazein oldatot használtunk, mint szubsztrátot. A proteináz aktivitás hatására felszabaduló színes termékek mennyiségét fotometriásan határoztuk meg (Pusztahelyi és munkatársai, 1997).

A sejtek, hifák, pelletek morfológiájának vizsgálatához OLYMPUS BH-2, SPlan 20NH fáziskontraszt objektívvel felszerelt mikroszkópot, illetve Carl Zeiss Labovar4-es fáziskontraszt mikroszkópot használtuk (Sipiczki és munkatársai, 1998). A sejtmag morfológiájának nyomon követése céljából etanolos fixálást és permeabilizálást követően DAPI (4',6'-diamidino-2-phenylindole) festést alkalmaztunk (Moreno és munkatársai, 1991). A DNS fragmentálódásának és a foszfatidil-szerin oldalláncok externalizációjának vizsgálatához szükséges protoplasztokat csigaenzimes emésztés segítségével hoztuk létre. A protoplasztokon (Tilburn és munkatársai, 1983; Vágvölgyi és Ferenczy, 1991) Vybrant Apoptosis Kit (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) segítségével tettük láthatóvá a foszfatidil-szerin oldalláncokat (Leiter és munkatársai, 2005). Az Annexin V pozitív és propidium jodid negatív sejteket tekintettük „apoptotikus” sejteknek. A DNS fragmentációt Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-mediated dUTP Nick End Labelling (TUNEL) „assay” segítségével követtük nyomon, APO-BrdUTM TUNEL Assay Kit (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) felhasználásával. A maggal rendelkező sejtek számát DAPI festéssel határoztuk meg, és a TUNEL pozitív és DAPI pozitív sejtek arányát adtuk meg (Mousavi és munkatársai, 2003; Leiter és munkatársai, 2005).

Az RNS izolálást fagyasztva szárított micéliumból TRISOL (Invitrogen, Lofar, Austria) reagenssel végeztük a gyártó ajánlása szerint (Chomczynski 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 RT-PCR reakciókat QuantiTectTM SYBR[®] Green RT-PCR kittel (Qiagen, Hilden, Germany) végeztük el, a gyártó által megadott protokoll alapján. Minden reakcióelegy 400 ng totál RNS-t, 2,5 mmol/l Mg²⁺-t és 0,5 μ mol/l génspecifikus primert tartalmazott. Az alábbi oligonukleotid PCR primereket használtuk az egyes gének transzkripciójának nyomon követésére:

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.

3. Új tudományos eredmények

Aspergillus nidulans vad típusú törzseinek tenyésztésében a stacioner fázist követően is sokáig megmaradt a pelletes morfológia. Hasonlóan a korábban *Penicillium chrysogenum*-nál tapasztaltakkal, hosszabb-rövidebb fonaldarabok jelentek meg, majd ezekből „élesztő-szerű” képletek jöttek létre, amik a tenyészet élő részét képezték.

Mivel az *Aspergillus nidulans*-nál tapasztalt morfológiai változások a vad típusú *Penicillium chrysogenum* és számos *Penicillium* és *Aspergillus* fajban is megfigyelhetőek, az *Aspergillus nidulans* esetében tapasztalt morfológiai változásokat tekinthetjük általánosnak, míg az ipari *Penicillium* törzs kultúráiban, nagy mennyiségben kialakuló „élesztő-szerű” sejtek valószínűleg csak a törzsnemesítés melléktermékei.

Az autolízisre jellemző volt, többek között, az extracelluláris hidrolitikus enzimek indukciója. A kitináz aktivitás folyamatos növekedése, párhuzamba állítható a biomassza csökkenésével, valamint a pelleték és a hifák fragmentálódásával. A szénéhező tenyészetek autolízisében a *chiB* gén terméke vett részt.

A kitináz termelés fokozódása mellett az ammónia koncentráció, illetve az extracelluláris proteínáz aktivitás szintje is megemelkedett, ez arra utal, hogy a glükóz elfogyását követően a sejtek aminosavakat, aminocukrokat használtak energiaforrásként. A proteínáz aktivitás-változások hátterében a *prtA* gén állhat.

Az extracelluláris proteínáz aktivitások és a tenyészetek autolízise között nincs szoros korreláció. Ez azzal magyarázható, hogy a proteínázok a tápanyagok mobilizálásában is szerepet játszanak szénéhező körülmények között.

A hidrolázok génjeinek indukciója fontos bizonyíték arra, hogy az autolizáló tenyészetek *de novo* termelik meg az autolízishez szükséges enzimeket.

A szénforrás éhező kultúrák légzése gyorsan csökkent, és a sejtek szuperoxid valamint peroxid tartalma egyenletesen növekedett, miközben a tenyészet specifikus MTT redukáló aktivitása csökkent.

A stacioner és a korai autolitikus fázisban csökkent a cián-rezisztens légzés aránya, majd a kései autolitikus fázisban ismét emelkedni kezdett, ami arra utal, hogy a mitokondriumban, mint a legfontosabb gyökgeneráló sejt szervben jelentős fiziológiai változások történtek.

A G6PD aktivitása egyenletesen csökkent, míg egy másik NADPH termelő enzim, a NADP-ID indukálódott. Úgy tűnik tehát, hogy öregedő tenyészetekben a pentóz-foszfát

útvonal aránya jelentősen csökkent a NADPH termelésben, míg az aminosavak lebontásához metabolikusan szorosabban kapcsolódó NADP-ID szerepe megnőtt.

A gyökök akkumulálódását a specifikus CuZn- és Mn-SOD, valamint GPx és kataláz aktivitások indukciója követte. Az autolizáló tenyészetek kataláz aktivitás változásainak hátterében a *catB* gén állhat. A szénéhező, öregedő tenyészetekben igen jelentős redox változások játszódnak le.

Autolizáló *Aspergillus nidulans* tenyészetekben a GSH/GSSG arány gyors csökkenése figyelhető meg. A GSH/GSSG arány csökkenését nem elsősorban a GSH GSSG-vé történő oxidálódása, vagy glutation S-konjugátumokba történő beépülése okozhatta. A GSH koncentráció gyors csökkenésének okai lehetnek: 1. a GSH γ GT révén tartalék tápanyagként történő mobilizálása, 2. a sejtmembránon, esetleg a vakuoláris membránon keresztül zajló aminosav transzport elősegítése.

A GSH/GSSG arány olyan transzkripciós programok indukálásában is fontos szerepet tölthet be, amelyek megváltozott morfológia például „élesztő-szerű” képletek kialakulásához és stabilizálásához vezetnek.

A stacioner és a korai autolitikus fázisban a sejtek apoptózis-szerű pusztulása volt megfigyelhető, amit a biomassza és a sejtek életképességének csökkenése kísért.

A *fadA*^{G203R}, *AflbA* valamint a Δ *ganB*, Δ *argsA* és Δ *ganB* Δ *argsA* mutációk nem okoztak jelentős változást az autolízis ütemében. Bár a FadA és GanB útvonalak hatása az autolízisre elhanyagolhatóan bizonyult, a FadA út mutációi számottevő változásokat okozott a gomba morfológiájában, és mindkét jelátviteli út lényegesen befolyásolta a tenyészetek fiziológiáját.

Mindkét G-protein útvonal mutációi jelentős változásokat okoztak a proteináz termelésben. A változások transzkripció szintű hátterében legalábbis részben a *prtA* gén expressziójának megváltozása állt.

Vizsgálataink, valamint a *fadA*, az *sfaD* (G β) és a *gpgA* (G γ) deléciós mutánsaival végzett kísérletek eredményei azt sugallják, hogy a FadA útvonal közvetlenül vesz részt az extracelluláris proteinázok képződésének gátlásában, míg a GanB útvonal hatását csak közvetve G β γ -alegységek révén fejt ki.

A γ GT aktivitás-változása a mutáns törzsekben jelentősen eltért a kontroll törzsekétől. A γ GT aktivitás-változásában megfigyelhető különbségek nem vagy alig voltak nyomon követhetők a GSH és a GSSG sejten belüli koncentrációjának változásában. A γ -glutamil transzpeptidáz képződését a közös SfaD-GpgA komplex, azaz a heterotrimer G proteinekről disszociált G β γ -alegység aktiválhatja.

A kataláz termelés a Δ rgsA mutáns tenyészetekben lassabban csökkent, mint a kontroll törzsében, a Δ ganB Δ rgsA törzs átmeneti viselkedést mutatott. Az RgsA fehérje, legalábbis részben a *catB* gén transzkripciójának gátlásán keresztül fejtheti ki hatását.

A GPx aktivitása a Δ rgsA mutáns törzs tenyészetekben alacsonyabb, a két másik mutánsnál magasabb volt, mint a kontroll törzs esetében. A Δ flbA mutáció csökkentette, a *fadA*^{G203R} pedig növelte a GPx termelés mértékét. A két RGS alegység indukálja a GPx termelést, az α -alegységek gátolják azt.

A gyök akkumuláció mértéke, az antioxidáns enzimaktivitásokban mért eltérések ellenére, a kontroll és a mutáns törzseknel nagyon hasonló volt. Az antioxidáns mechanizmusok aktív, heterotrimer G-protein útvonalak által szabályozott folyamatoknak bizonyultak.

A *brlA* és a *fluG* génben sérült mutánsok nem autolizáló fenotípust mutattak. A FluG útvonal nemcsak a sporuláció, de az autolízis iniciálásához is nélkülözhetetlen. Az autolízis egyik legfontosabb fiziológiai jelentősége az, hogy a sejtek egy részének lebontásával tápanyagokat szabadít fel. A Δ brlA mutáns magas proteínáz termelést mutat, ami összefügg a FluG útvonal és a FadA útvonal közötti kapcsolattal.

Az általunk vizsgált két mutánsra jellemző nem autolizáló fenotípus ipari szempontból is előnyös, és alátámasztja azt a feltételezést, miszerint a fonalak darabolódása egy aktív, enzimatikus folyamat és nem pusztán a rázatás, illetve kevertetés következtében fellépő mechanikai nyíróerők következménye.

A nem autolizáló fenotípus ellenére a „loss of function” *fluG* és a Δ brlA törzs sejtpusztulási folyamatai és életképességének változása a kontroll törzsekhez nagyon hasonlatos. Az apoptózis szfingozin származékokkal idős tenyészeteknél is jól indukálhatónak bizonyult. A stacioner fázisban alkalmazott szfingozin kezelést, bár megduplázta az apoptotikus sejtek számát, nem kísérte az autolitikus markerek szintjének emelkedése. Vagyis az autolizáló tenyészetekben két folyamat zajlik: 1. a sejtek pusztulása, 2. az elhalt sejtek anyagainak lebontása.

4. Összefoglalás

Annak ellenére, hogy a szénforrás éhezés az egyik leggyakoribb stresszhelyzet a természetben, és ipari körülmények között egyaránt, ez idáig viszonylag kevés tanulmány vizsgálta a szénéhező kultúrák morfológiai-fiziológiai változásait és azok szabályozását. Szénéhező tenyészetekben számos gyakorlati jelentőséggel bíró enzim és metabolit termelődik, illetve a szénéhezés során megfigyelhető sejtpusztulási folyamatok jobb megértése a gombák elleni védekezésben is jól hasznosítható eredményekre vezethet.

Vizsgálataim középpontjában az *Aspergillus nidulans*, mint modell organizmus szénéhező tenyészeinek vizsgálata, 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 tenyészeinek morfológiája nagymértékben eltért a tanszékünkön ipari *Penicillium chrysogenum* törzsnél korábban tapasztaltaktól (Pusztahelyi és munkatársai 1997; Pócsi és munkatársai, 2007). Az *Aspergillus nidulans* esetében a szénforrás elfogyása után a pelletek csak lassan estek szét és a tenyészetek mindvégig megőrizték fonalas morfológiájukat. A *Penicillium chrysogenum* törzseknél megfigyelt „élesztő-szerű” 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, 2001), sőt a fenti jelenségek egyes elemeit sok más gombából is kimutatták korábban (Munkres és Minssen, 1976; Dufour és munkatársai, 2000; Jakubowski és munkatársai, 2000; Gyetvai és munkatársai, 2006). Mindezen eredmények azt sugallják, hogy a gombákban szénéhező körülmények között igen komplex, jól szabályozott fiziológiai változások zajlanak. Azaz, a szénéhező tenyészetek nem hanyatló, nekrotikus sejtek összessége, hanem a stressz helyzettel szemben aktívan védekező és azt túlélni képes kultúrák (Winderickx és munkatársai, 2003).

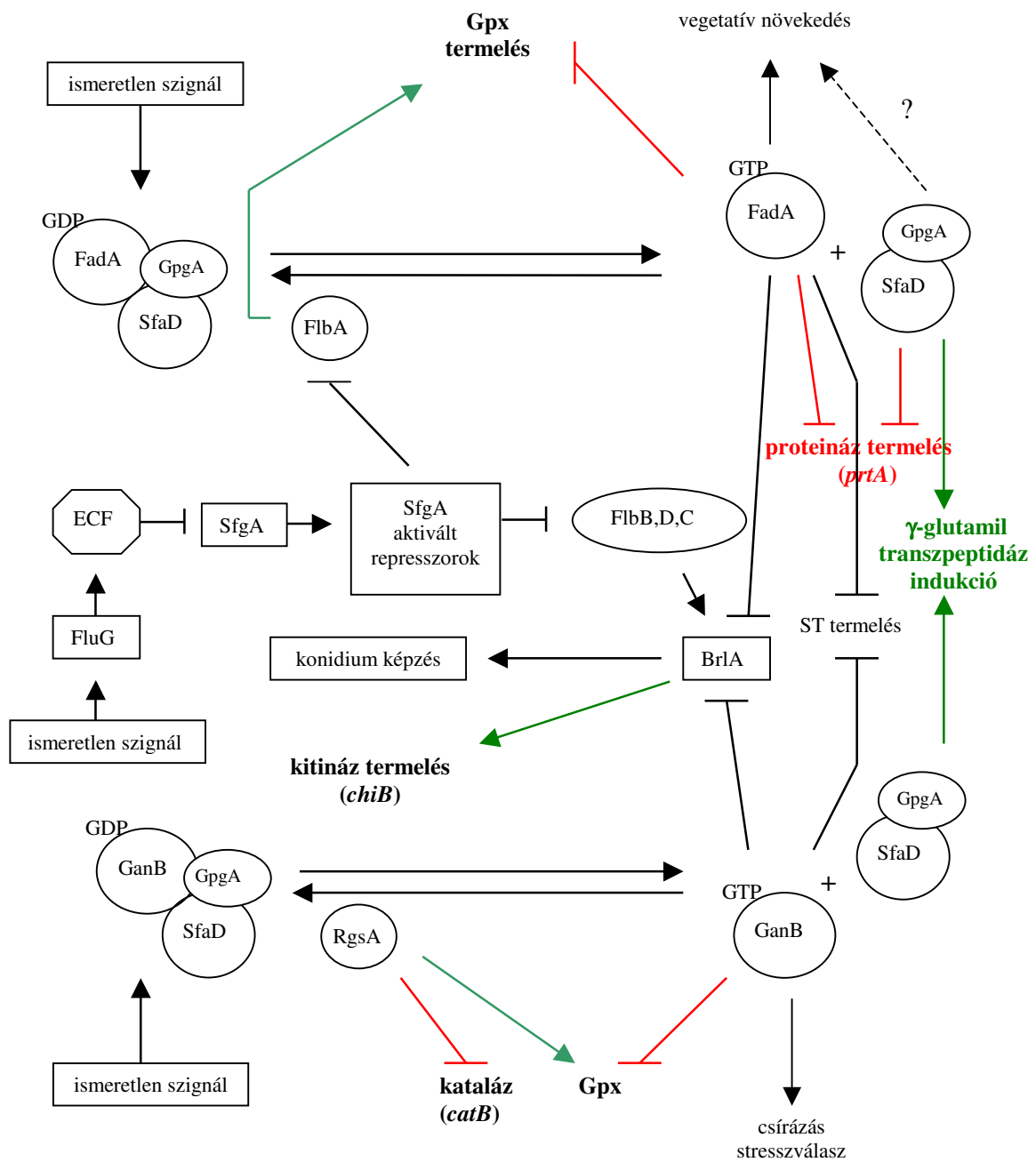
Vizsgálataink alapján a FadA/FlbA és GanB/RgsA útvonalak nem csak a csírázó spórák, illetve a növekedő hifák fiziológiáját (Adams és munkatársai, 1998; Chang és munkatársai, 2004; Lafon és munkatársai, 2005), de a szénéhező tenyészetek működését is alapvetően befolyásolták. Szabályozó szerepük jelentős volt az extracelluláris proteínáz (*prtA*) termelésben, a γ 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 (Adams és munkatársai, 1988; Lee és Adams, 1994, 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 (pelletek szétesése, „élesztő-szerű” 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 valószínűleg az, hogy a sejtek egy részének lebontásával tápanyagokat szabadít fel, amelyeket a nem autolizáló sejtek a külső szénforrás elfogyását követően konidiumok előállítására tudnak felhasználni. E folyamat eredményeképpen akár a teljes vegetatív biomassza felhasználódhat konidiumok képzésére. A konidiumok, mint propagáló képletek segítségével a gomba új termőterületekre juthat el, illetve a konidiumok 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 sejtfal lebomlásával, a gomba hatékonyabban tudja intracelluláris anyagait újrahasznosítani.

Vizsgálataim több, gyakorlati szempontból is érdekes 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 sejtfalbontó 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.



G-protein mediált útvonalak és a FluG-BrlA útvonal szerepe *Aspergillus nidulans* életciklusában és metabolizmusában (Seo és munkatársai, 2006; Yu, 2006).

Irodalomjegyzék / References

- Adams, T. H., Wieser, J. K. and Yu, J. H. 1998. Asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Microbiol Mol. Biol. Rev.*, 62, 35-54.
- 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.
- Chang, M. H., Chea, K. S., Han, D. M. and Jahng, K. Y. 2004. The GanB G α -protein negatively regulates asexual sporulation and plays a positive role in conidial germination in *Aspergillus nidulans*. *Genetics.*, 167, 1305-15.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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., Molnár, Z., Pusztahelyi, T. and Pócsi, I. 2004a. Physiological and morphological changes in autolyzing *Aspergillus nidulans* cultures. *Folia Microbiol.*, 49, 277-284.
- Gyetzvai, A., Emri, T., Takacs, K., Dergez, T., Fekete, A., Pesti, M., Pócsi, 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.
- 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 α) signalling. *Mol. Microbiol.*, 53, 529-540.

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 α protein-dependent signaling pathway. *EMBO J.*, 16, 4916-23.

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.

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

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. 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.

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.

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.

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

- Peterson, G. L. 1983. Determination of total protein. *Method. Enzymol.*, 91, 86-105.
- 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., Molnár, Zs., Pusztahelyi, T., Varecza, Z. and Emri, T. 2007. Yeast-like cell formation and glutathione metabolism in autolysing cultures of *Penicillium chrysogenum*. *ACTA biol. Hung.* (in press).
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Sipiczki, M., Takeo, K. and Grallert, A. 1998. Growth polarity transitions in a dimorphic fission yeast. *Microbiology* 144, 3475-85.
- 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.
- Vágvölgyi, Cs. and Ferenczy, L. 1991. Isolation of nuclei from *Aspergillus nidulans* protoplasts. *FEMS Microbiol. Lett.*, 66, 247-251.
- 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.
- Yu, J. H. 2006. Heterotrimeric G-protein signaling and RGSs in *Aspergillus nidulans*. *J. Microbiol.*, 44, 145-54.

A tézisek alapjául szolgáló tudományos munkák / Publications relevant in the thesis

Közlemények/Publications:

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, Zs.**, 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, Zs.**, 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, Zs.**, 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, Zs.** 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, Zs., 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, Zs.**, 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/Presentations and posters:

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 génexpressziójának 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 transzkripció 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 transzkripció 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*. 16th 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

A tézisekhez nem kapcsolódó tudományos munkák / Other Publications:

Közlemények/Publications:

1. Emri, T., **Molnar, Z.**, 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, Z.**, 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/Presentations and posters:

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* .14th 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.