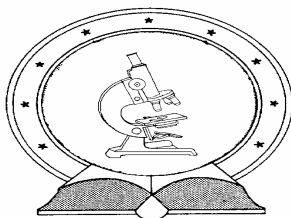


DE TTK



1949

***A *Penicillium chrysogenum* által termelt kis
molekulatömegű antifungális fehérje (PAF)
élettani szerepének a felderítése***

Egyetemi doktori (PhD) értekezés

Hegedűs Nikoletta

Témavezető: Dr. Pócsi István

Debreceni Egyetem
Természettudományi Doktori Tanács
Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola

Debrecen, 2011.

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

Debrecen, 2011.

a jelölt aláírása

Tanúsítom, hogy Hegedűs Nikoletta doktorjelölt 2005 - 2011 között a fent megnevezett Doktori Iskola Biológia doktori programjának keretében irányításommal végezte munkáját. Az értekezésben foglalt eredményekhez a jelölt önálló alkotó tevékenységével meghatározóan hozzájárult. Az értekezés elfogadását javasolom.

Debrecen, 2011.

a témavezető aláírása

**A *Penicillium chrysogenum* által termelt kis molekulatömegű
antifungális fehérje (PAF) élettani szerepének a felderítése**

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

Írta: Hegedűs Nikoletta okleveles környezetkutató

Készült a Debreceni Egyetem Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola doktori
iskolája
(biológia doktori programja) keretében

Témavezető: Dr Pócsi István

A doktori szigorlati bizottság:

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

A doktori szigorlat időpontja: 2009. szeptember 18..... . . .

Az értekezés bírálói:

Dr.	
Dr.	
Dr.	

A bírálóbizottság:

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

Az értekezés védésének időpontja: 2011.....

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	1
1. Bevezetés	2
2. Irodalmi előzmények.....	5
2.1. A <i>P. chrysogenum</i> egyedfejlődése	5
2.2. A konidiogenezis szabályozása fonalas gombákban	7
2.3. Autolízis gombákban.....	12
2.4. Kis móltömegű antifungális fehérjék	14
2.5. A PAF jellemzése	18
2.6. Az <i>A. nidulans</i> stresszválaszának a szabályozása.....	21
3. Eredmények	24
3.1. A PAF hatása a <i>P. chrysogenum</i> növekedésére	24
3.2. A <i>paf</i> gén expressziója sülttett kultúrában	27
3.3. A <i>paf</i> gén transzkripciója felületi tenyészetben.....	28
3.3.1. A <i>paf</i> gén transzkripciója különböző gombaképletekben	28
3.3.2. A <i>paf</i> gén transzkripciójának kinetikája.....	29
3.4. <i>P. chrysogenum paf</i> deléció mutáns létrehozása	32
3.5. A <i>paf</i> deléció hatásának tanulmányozása a <i>P. chrysogenum</i> csírázási képességére	35
3.6. A <i>paf</i> deléció hatása a <i>P. chrysogenum</i> felületi tenyészetére	36
3.6.1. A <i>paf</i> deléció csökkent konídium képzést eredményez.....	36
3.6.2. A Δpaf mutáns genetikai komplementációja helyreállítja a törzs csökkent sporulációs képességét	40
3.7. A PAF hatása a <i>P. chrysogenum</i> Δpaf törzs spórázási képességére	43
3.8. A <i>paf</i> gén expressziójának tanulmányozása a <i>P. chrysogenum</i> $\Delta brlA$ törzsben.....	45
3.9. Autolízis tanulmányozása a <i>P. chrysogenum</i> Δpaf mutáns sülttett kultúrájában	47
3.10. A PAF hatásmechanizmusának tanulmányozása	49
4. Az eredmények megtárgyalása	51
4.1. A PAF hatása a <i>P. chrysogenum</i> növekedésére	51
4.2. A <i>paf</i> gén transzkripciója a <i>P. chrysogenum</i> különböző tenyészeiben	52
4.3. A <i>paf</i> deléció hatása a <i>P. chrysogenum</i> konidiogenezisére.....	55

4.4.	A PAF termelése nincs hatással a <i>P. chrysogenum</i> süllyesztett kultúrájának autolízisére	58
4.5.	A PAF SrrA-val kapcsolt jelátviteli rendszeren keresztül fejt ki antifungális hatását	58
5.	Anyagok és módszerek	61
5.1.	Gének és fehérjék jelölése a különböző fajokban	61
5.2.	A dolgozatban vizsgált törzsek és alkalmazott tápközegek	61
5.3.	Tenyésztési körülmények	64
5.4.	A molekuláris biológiai munka során felhasznált oldatok, plazmidok, és primerek	65
5.5.	Alapvető DNS módszerek	67
5.6.	Baktériumsejtek transzformálása, plazmid DNS preparálása	68
5.7.	RNS izolálása különböző gombaképletekből	69
5.8.	Génexpressziós vizsgálatok Northern blot analízissel	70
5.9.	<i>P. chrysogenum</i> genomi DNS izolálása	71
5.10.	<i>P. chrysogenum</i> fonalas gomba transzformációja és a transzformánsok szelektálása	72
5.11.	A transzformánsok genetikai analízise Southern hibridizációval ..	73
5.12.	A csírázási képesség tanulmányozása	74
5.13.	A PAF fehérje detektálása SDS PAGE-sel	74
5.14.	Autolitikus markerek nyomonkövetése	75
5.15.	Spórázási képesség meghatározása	76
5.16.	Felhasznált fehérjék és vegyszerek	76
5.17.	Bioinformatikai módszerek	76
5.18.	Statisztikai módszerek	77
6.	Összefoglalás	78
7.	Summary	82
8.	Köszönetnyilvánítás	87
9.	Irodalomjegyzék	88
10.	Függelék	102
11.	Publikációs lista	105

Rövidítések jegyzéke

AcAFP	<i>Aspergillus clavatus</i> antifungális fehérjéje
AFP	<i>Aspergillus giganteus</i> által termelt antifungális fehérje
Anafp	<i>Aspergillus niger</i> antifungális fehérjéje
CM	komplex táptalaj (complex medium)
DCM	szárazanyag-tartalom (dry cell mass)
ECF	extracelluláris tényező (extracellular factor)
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav
GDP	guanozin-difoszfát
GTP	guanozin-trifoszfát
HK	hisztidin kináz
HPt	hisztidin tartalmú foszfortranszmitter (histidine-containing phosphotransmitter)
KCM	KCl, CaCl ₂ és MOPS tartalmú oldat
LB	Luria broth táptalaj
MM	minimál táptalaj (minimal medium)
MOPS	3-(N-morfolino)-propánszulfonsav
Mpk	mitogén aktivált protein kináz
NAF	<i>Penicillium nalgiovense</i> antifungális fehérjéje
NTR	nem transzlálódó régió
PAF	<i>Penicillium chrysogenum</i> antifungális fehérjéje
PAGE	poliakrilamid gélelektroforézis
PCM	PEG, CaCl ₂ és MOPS tartalmú oldat
PEG	polietilén-glikol
PgAFP	<i>P. chrysogenum</i> RP42C antifungális fehérjéje
Pka	Protein kináz A
Pkc	Protein kináz C
ROS	reaktív oxigén részecske (reactive oxygen species)
RR	válasz regulátor (response regulator)
SAR	SfgA által aktivált represszorok
SDS	nátrium-lauril-szulfát
TBE	Tris, borát és EDTA tartalmú puffer
TF	transzkripció faktor

1. Bevezetés

A *Penicillium chrysogenum* fonalas gomba termel egy kis molekulatömegű, bázikus, ciszteinben gazdag fehérjét a PAF-ot, amely számos humán- és növénypatogén gomba, valamint az *Aspergillus nidulans* fonalas modellszervezet növekedését is gátolja (Kaiserer és mtsai. 2003, Galgóczy és mtsai. 2005, 2008, Barna és mtsai. 2008). Az elmúlt másfél évtizedben széles ismeretanyag gyűlt össze a PAF szenzitív mikroorganizmusokra kifejtett hatásáról (Marx és mtsai 1995, Kaiserer és mtsai. 2003, Leiter és mtsai. 2005, Binder és mtsai 2010 a,b). A fehérje termelő szervezetben betöltött élettani szerepe azonban feltáratlan maradt. Új kutatási irányként **célul tűztük ki a *P. chrysogenum* - PAF kapcsolat megvilágítását.**

A PAF-hoz hasonló bázikus, ciszteinben gazdag antifungális hatású fehérjét mára több fonalas Ascomycotában (*Aspergillus giganteus*, *A. niger*, *A. clavatus*, *Penicillium nalgiovense*) azonosítottak (Wnendt és mtsai. 1994, Gun Lee és mtsai. 1999, Geisen 2000, Theis és mtsai. 2003, Skouri-Gargouri és Gargouri 2008). A legtöbb ismeretanyag eddig, a PAF- ról és az *A. giganteus* tápközegéből izolált AFP-ről gyűlt össze. Mindkét antifungális fehérje a 70-90 órás stationer fázisú süllyesztett tenyészetben detektálható a legnagyobb mennyiségben (Meyer és mtsai 2002, Marx 2004). Meyer és munkatársai kimutatták, hogy az *afp* gén szigorú tér- és időbeli szabályozás alatt áll az *A. giganteus* aszexuális sporulációja folyamán (Meyer és mtsai. 2002). Doktori munkám központi kérdése, hogy az *afp*-hez hasonlóan köthető-e a *paf* expressziója a termelő szervezet aszexuális differenciálódási folyamataihoz, illetve, hogy a PAF termelődése befolyásolhatja-e a *P. chrysogenum* mitospórafejlődését. Ezért célul tűztük ki:

- A PAF hatásának vizsgálatát a *P. chrysogenum* felületi tenyészetének növekedésére
- A *paf* transzkripciójának vizsgálatát a *P. chrysogenum* süllyesztett és felületi tenyészetekben.
- Ezzel párhuzamosan a *P. chrysogenum* felületi tenyészetének mitospóra fejlődését jelző markergének (*brlA*, *rodA*, *rodB*) transzkripciójának a tanulmányozását illetve a sporulációt jelző markerek (konidiofórumok megjelenése, egységnyi felületen termelődött konídiumok száma) nyomon követését.
- A *paf* gén delécióját a *P. chrysogenum* Q176 törzsben, és a deletált gén visszaültetését a hiánymután genomjába.
- Az általunk létrehozott Δpaf törzs fenotipikus jellemzését (különös tekintettel a differenciálódási folyamatokra).
- A *P. chrysogenum* $\Delta brlA$ törzs *paf* transzkripciójának a vizsgálatát.

Mivel a PAF bőségesen szekretálódik az öregedő *P. chrysogenum* süllyesztett tenyészetében, felvetődött a kérdés, hogy van-e hatása a fehérje termelődésének a tenyészet autolítikus sejtpusztulási folyamataira. Ezért célul tűztük ki:

- A *paf* deléció hatásának tanulmányozását a szénéhező, süllyesztett *P. chrysogenum* tenyészetek autolízisére.

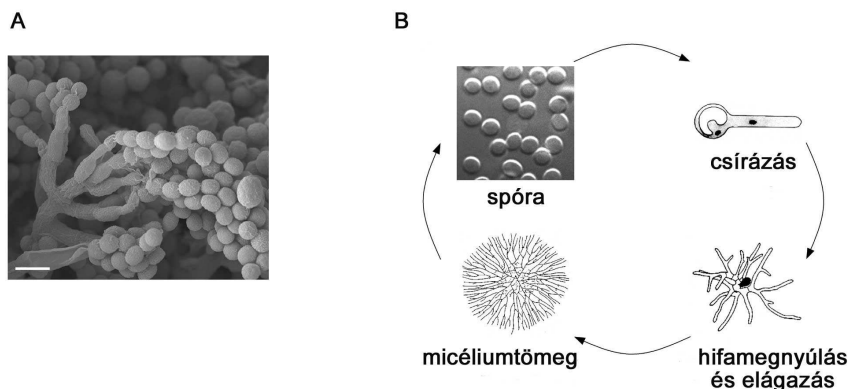
Doktori munkám keretében lehetőségem nyílt a PAF, szenzitív mikroorganizmusokra gyakorolt hatásmechanizmusának a tanulmányozására is. Mivel a PAF oxidatív stresszt vált ki *A. nidulans*ban, feltételeztük, hogy aktiválja a gomba valamely stresszválasz szabályozó elemét, ezért célul tűztük ki:

- Stressz jelátviteli útvonalakban sérült *A. nidulans* mutánsok ($\Delta sskA$, $\Delta srrA$, $\Delta napA$, $\Delta nikA$, $\Delta hogA$, $\Delta sskA/srrA$, $\Delta srrA/hogA$) növekedésének a vizsgálatát PAF kezelés hatására.

2. Irodalmi előzmények

2.1. A *P. chrysogenum* egyedfejlődése

A *P. chrysogenum* a fonalas Ascomycota taxon Plectomycetes osztályának Eurotiales rendjébe tartozik (Jakucs és Vajna 2003). Az aszkuszos gombák többsége mind ivaros, mind ivartalan úton képes szaporodni. Ugyanakkor, számos fajnak beleértve a *P. chrysogenumot* is, csak az aszexuális formája ismert (Hoff és mtsai. 2008), éppen ezért egy külön csoportban, a Deuteromycota vagy Fungi Imperfecti mesterséges taxonban is nyilvántartották (Jakucs és Vajna 2003). A fonalasan nöövő Ascomycoták a természetben többnyire a talajban és növényi maradványokon fordulnak elő, de megfertőzhetnek gyömolcsöket, zöltségeket, egyéb élelmiszereket és takarmánynövényeket is, melyhez a fonalas növekedésük kiváló lehetőséget biztosít (Hill 1972, Dalcero és mtsai. 1997). A vegetatív növekedés a **gombaspórák** csírázásával kezdődik (**1. ábra**). Maga a csírázás két fázisra osztható: a konídium duzzadására és a csíratömlő megjelenésére (Oh és mtsai. 1996). A fonalas gombákra a polarizált, egy irányba történő növekedés a jellemző, melyet az apikális (csúcsi) régió folyamatos megnyúlása vezérel. Ennek eredményeként jön létre a **hifa**. Az Ascomycoták körülbelül 2-10 µm átmérőjű hifái szeptumok által válnak „többsejtűvé”. A hifasejtek képesek kommunikálni egymással a szeptumok falán található egyszerű pórusokon át, ahol a citoplazma elemei közül a sejtmagok is képesek áthatolni. Az aszkuszos fonalas gombák, valamint imperfekt rokonaik sejtjei többnyire többmagvúak és általában a csúcsi sejtek sejtmagszáma a legnagyobb (Jakucs és Vajna 2003). A fonalas gombák képesek kiterjedt felületeket beborítani és viszonylag kompakt struktúrát létrehozni **micéliumot** alkotva.



1. ábra. A *P. chrysogenum* (A) szkennning elektronmikroszkóppal készített konidiofóruma képe (Hoff és mtsai. 2010a) és (B) életciklusa. A skála 5 μ m szimbolizál

A micélium a gombahifák szövedékét jelenti, amelynek a növekedését nemcsak a hifák egyirányú megnyúlása jellemzi, hanem elágazások létrejötte, továbbá a hifák között fellépő sejtfúzió, a hifaanasztomózis kialakulása is. A szilárd táptalaj felületén a vegetatív gombamicélium gyakorlatilag egy síkban növekszik (szubsztrát micélium). A legtöbb fonalas gombafaj folyadékfázisban is tenyésztethető. Rázatott, süllyesztett tenyészetben a micélium a folyadék belsejében kisebb-nagyobb gömbszerű képleteket, úgynevezett pelleteket képez (Nielsen és mtsai. 1995). A süllyesztett tenyészet általában a vegetatív növekedést segíti elő és viszaszorítja az aszexuális differenciálódási folyamatokat (Adams és mtsai. 1998 García-Rico és mtsai. 2008a).

Meghatározott növekedési periódust követően a micélium alkalmassá válik a differenciálódási folyamatok elindítására. Az ún. **differenciálódási képesség** elérése, a gombaspórák leoltását követően fajtól és tenyésztési körülményektől függően, körülbelül 18-20 órát vehet igénybe (Adams és mtsai. 1998, Roncal és mtsai. 2002). Különböző környezeti stimulusok

(például a hifák levegővel való érintkezése- Morton 1961) hatására a differenciálódási képességgel rendelkező micéliumokban a hifák egyes sejtjei megállnak a növekedéssel, és soksejtes struktúrákat hoznak létre, amelyeken ivartalan szaporítóképletek, konídiumok keletkeznek (Adams és mtsai. 1998). A konídiumok tulajdonképpen a spóratartókról (**konidiofórum**) exogén módon lefűződő mitospórák. A **spórák** belsejében tartalék tápanyagok halmozódnak fel, ezzel párhuzamosan kialakul a vastag és ellenálló spórafal, amely képes megvédeni a sejtet a kiszáradástól és más külső károsodásoktól (Jakucs és Vajna 2003, Roncal és Ugalde 2003).

2.2. A konidiogenezis szabályozása fonalas gombákban

A mitospórák hatékony propagációs mechanizmust biztosítanak a faj számára. A folyamatot, amely során a konídiumok termelődnek (konidiogenezis) az utóbbi évtizedekben intenzíven tanulmányozták különböző modellorganizmusok, mint például az *Aspergillus nidulans* (Boylan és mtsai. 1987, Mirabito és mtsai. 1989, Yu és mtsai. 1996, Adams és mtsai. 1998) és a *Neurospora crassa* (Springer 1993, Alex és mtsai. 1996) felhasználásával. Az utóbbi időben egyre több tanulmány született a *P. chrysogenum* sporulációjának a szabályozásáról is (Prade és Timberlake 1994, García-Rico és mtsai. 2007, 2008a, Hoff és mtsai. 2010a, Sigl és mtsai. 2010). A fonalas gombák konidiogenezisét meghatározó genetikai és biokémiai mechanizmusokról eddig az *Aspergillus* tanulmányozásakor gyűlt össze a legszerteágazóbb ismeretanyag, s ez lényegében megegyezik a *Penicillium* nemzetségben eddig feltárt szabályozási folyamatokkal.

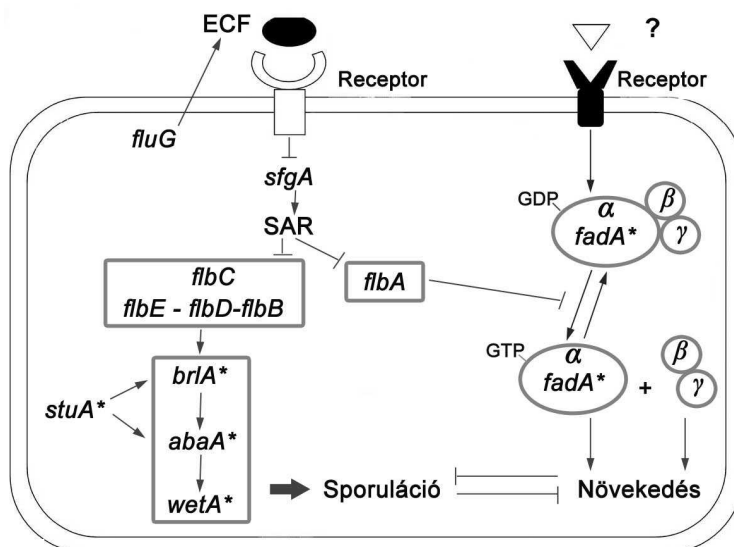
*A. nidulans*ban két antagonistá jelátviteli útvonal szabályozza a növekedést és a mitospórafajlódást. A fonalas növekedést a három alegységből álló, FadA($G\alpha$)-SfaD($G\beta$)-GpgA($G\gamma$) heterotrimer G-protein

segíti elő. A G-proteinek a GTP-ázok csoportjába tartoznak és egy sejtfelszíni receptort kapcsolnak össze egy effektor fehérjével. GDP (guanozin-difoszfát) kötött állapotukban inaktívak. Ha egy ligandum aktiválja a G-protein kapcsolt receptort, akkor az α -alegységről távozik a GDP, majd ezt követően GTP (guanozin-trifoszfát) kötődik hozzá (2. ábra). A GTP kapcsolódása után az α -alegység leválik a heterotrimer másik két tagjáról és aktiválja az effektor fehérjét. A β - és a γ -alegység ez idő alatt nem válik el egymástól, de az α -alegység távozása után a $G_{\beta\gamma}$ komplex maga is képes jelátviteli útvonalak aktiválására. A GTP-t a fehérje a saját GTP-áz aktivitása révén hasítani képes, és így újra inaktív állapotba kerül (Gilman 1987, Voet és mtsai. 1995, Lodish és mtsai. 2000).

A G-protein mediálta útvonalak jelentős szerepet játszanak az *A. nidulans* vegetatív növekedésének a fenntartásában és a sporuláció gátlásában, de közreműködnek az askospóra képzés és a szterigmatocisztin szintézis szabályozásában is (Yu és mtsai. 1996, Adams és mtsai. 1998, Rosén és mtsai. 1999, Molnár és mtsai. 2004, Seo és mtsai. 2005).

A. nidulansban egy másik heterotrimer G-protein, a GanB($G\alpha$)-SfaD($G\beta$)-GpgA($G\gamma$) is részt vesz a sporuláció gátlásában. Ez a G-protein szerepet játszik a konídiumok csírázásának szénforrás függő szabályozásában, valamint a hő és oxidatív stresszre adott sejtválaszok kialakításában is. Mivel az *A. nidulans* genomban csupán egy $G\beta$ és egy $G\gamma$ alegység található a FadA és a GanB osztoznak a $G_{\beta\gamma}$ alegységeken (Chang és mtsai. 2004, Han és mtsai. 2004, Lafon és mtsai. 2005, Molnár és mtsai. 2006).

A *Penicillium*okban a G-proteineket kódoló gének közül eddig csak *fadA* ortológokat azonosítottak, nevezetesen a *gasA*-t *Penicillium marneffe*iben (Zuber és mtsai. 2002) és a *pga1*-et a *P. chrysogenum*ban (García-Rico és mtsai. 2007, 2008a,b) (2. ábra).



2. ábra. Az *A. nidulans* sporulációjának szabályozása Roncal és Ugalde (2003), valamint Seo és munkatársai (2006) nyomán. A *-gal jelölt gének ortológjait a *Penicillium*okban is azonosították.

A G-protein mediálta jelátviteli utak negatív regulátorai az úgynevezett RGS (regulator of G-protein signaling) fehérjék, amelyek a GTP-G α -alegység GTPáz aktivitását képesek növelni, és így a jelátvitelt megszakítani (Chidiac és Roy 2003, McCudden és mtsai. 2005), ezért kulcsfontosságú szerepet játszanak a fonalas gombák alapvető biológiai folyamatainak regulálásában. A FadA RGS párja az FlbA fehérje (**2. ábra**) (Yu és mtsai. 1996, Rosén és mtsai. 1999, Shimizu és Keller 2001), a GanB pedig az RgsA szabályozása alatt áll (Han és mtsai. 2004).

Míg a G-proteinek által mediált útvonalak az *Aspergillus*ok és a *Penicillium*ok növekedésének a fenntartásáért felelősek, addig a vegetatív növekedésről az aszexuális sporulációra való áttérést a BrlA, az AbaA és a WetA transzkripció faktorok által alkotott központi szabályozási út vonal

biztosítja (2. ábra). Az útvonal minden olyan gént indukál, amely a mitospóra fejlődéshez szükséges (Adams és mtsai. 1998, Roncal és Ugalde 2003).

A *brlA* gén egy Cys₂-His₂ „zinc finger” típusú DNS kötő fehérjét kódol, ami az *abaA* és a *wetA* gének transzkripció szintű aktivátora. A BrlA hiányában elmarad a fent említett gének expressziója és emiatt a sporuláció is (Clutterbuck 1969, Boylan és mtsai. 1987, Stringer és mtsai. 1991, Chang és Timberlake 1993, Prade és Timberlake 1993). *brlA* ortológokat a *Penicillium*ok közül a *P. marneffe*iben (Zuber és mtsai. 2002, Roncal és Ugalde 2003), a *P. camemberti*ben (Boualem és mtsai. 2008) és a *P. chrysogenum*ban (Sigl és mtsai. 2010) is leírtak már.

Az *abaA* transzkripció faktor működése nélkülözhetetlen a konidioforumok képződéséhez, a fialid sejtek differenciálódásához és funkciójuk megtartásához. (Aramayo és Timberlake 1993, Andrianopoulos és Timberlake 1994). *abaA* ortológot a *P. marneffe*iben is azonosítottak (Borneman és mtsai. 2000).

A *wetA* gén termékének funkcióvesztése működésképtelen, éretlen konidioforumok képződésével jár, amelyeken pigmentálatlan és éretlen spórák jönnek létre (Marshall és Timberlake 1991). *wetA* ortológot a *Penicillium*ok közül a *P. camemberti*ben (Boualem és mtsai. 2008) és a *P. chrysogenum*ban (Prade és Timberlake 1994) is azonosítottak.

A *stuA* gén szintén egy transzkripció faktort kódol (Dutton és mtsai. 1997). A *stuA* expressziója a differenciálódási képesség megszerzésével indul el és az aszexuális sporuláció teljes szakaszában tart (Miller és mtsai. 1991). A *stuA* a *brlA* és az *abaA* gének transzkripcióját aktiválja és a szekunder metabolitok termelést szabályozza (Miller és mtsai. 1991, Coyle és mtsai. 2007, Twumasi-Boateng és mtsai. 2009a). *stuA* ortológokat a *Penicillium*ok

közül a *P. marneffe*-ben (Borneman és mtsai. 2002) és *P. chrysogenum*-ban (Sigl és mtsai. 2010) is azonosítottak.

A mitospóra-fejlődésben további fontos szerepet töltenek be, és a BrlA-szabályozása alatt állnak a kis molekulatömegű hidrofób fehérjéket kódoló *rodA* és *rodB* gének. Míg a RodA hidrofób jelleget kölcsönöz a konídiumoknak, addig a RodB a konídiumok sejtfalának a felépítésében működik közre (Stringer és mtsai. 1991, Chang és Timberlake 1993, Paris és mtsai. 2003, Boualem és mtsai. 2008). *rodA* ortológot a *P. camemberti*-ben (Boualem és mtsai. 2008) is leírtak már, *rodB* ortológot még részletesen nem jellemeztek *Penicillium*-okban. Sigl és munkatársai (2010) azonban feltárták, hogy az említett gének feltételezett ortológjai *P. chrysogenum*-ban is a BrlA szabályozása alatt állnak.

A *brlA* gén aktiválása a *stuA*-n kívül legalább hat regulátor géntől függ: *fluG*, *flbB*, *flbC*, *flbD*, *flbE* és az *sfgA*. Ezen gének bármelyikének hiánya „fluffy” fenotípust, azaz intenzív légmicélium képzést és a *brlA* indukció elmaradását, így a konidiogenezis hiányát eredményezi (**2. ábra**) (Adams és mtsai. 1998, Seo és mtsai. 2006).

Az *flbB*, *flbC*, *flbD* és *flbE* gének szekvenciájuk alapján feltehetőleg transzkripciós faktorokat kódolnak. Pontos hatásmechanizmusuk nem ismert, de közvetett módon a *brlA* gén működését szabályozzák (Adams és mtsai. 1998).

A *fluG* egy kisméretű, diffúzibilis, az extracelluláris térbe ürülő, eddig még nem azonosított molekula („extracellular factor”; ECF) szintéziséhez szükséges. Az ECF egy receptorhoz kötődve végső soron az SfgA-t inaktiválja (Lee és Adams 1994).

Az *sfgA* egy 601 aminosavból álló fehérjét kódoló transzkripciós faktor (Seo és mtsai. 2003, Seo és mtsai. 2006). A fehérje feltehetőleg különböző represszorok (SfgA által Aktivált Represszorok; **SAR**)

aktiválásában vesz részt, és ezeken keresztül gátolja az FlbA-E fehérjék működését, mindaddig, amíg a FluG közreműködésével meg nem termelődik az ECF. A FluG elsődleges szerepe a sporuláció iniciálásában az lehet, hogy az SfgA represszáló hatását feloldja (Seo és mtsai. 2006).

Mindezek alapján összegezhetjük, hogy az *A. nidulans*-ban a növekedést és a konidiogenezist két antagonistá jelátviteli útvonal irányítja. Maga a konidiogenezis a növekedést irányító szabályozási útvonal legalább részleges gátlását igényli. A teljes folyamat komplex genetikai kontroll alatt áll: ebben a FluG és az FlbA kulcsfontosságú szabályozó faktorok. A FluG az SfgA-t inaktíválja, feloldva annak az FlbA-E fehérjék működésére kifejtett gátló hatását. Így az Flb fehérjék közül az FlbA is aktív állapotba kerül, amely a FadA GTPáz aktivitását képes növelni, amely megszakítja a vegetatív növekedési szignált. Az aktív állapotba került FlbB-E fehérjék pedig a *brlA* gén aktiválásán keresztül indukálják az aszexuális sporuláció központi szabályozási útvonalát. Ennek köszönhetően kifejlődnek a spóratartókról láncokban lefűződő érett mitosporák. Az aszexuális sporulációs mechanizmus feltehetően ehhez hasonlóan működik a *Penicillium*-okban is, mivel a felvázolt jelátviteli útvonalon már számos ortológ gént azonosítottak a nemzetségben (2. ábra).

2.3. Autolízis gombákban

Az autolízis a gombák életciklusához szorosan hozzátartozó aktív, energiaigényes és genetikailag szabályozott természetes sejtpusztulási folyamat. Autolíziskor hidrolitikus enzimek (pl. kitinázok, glükánázok, proteinázok, ribonukleázok, dezoxi-ribonukleázok) indukálódnak, kiterjedt vakuolizációt, a sejtorganellumok szétesését, a hifák kiürülését és a sejtfal lebomlását eredményezve (White és mtsai. 2002).

Az autolízis energiaigényes voltát támasztja alá az a tény, hogy az ATP szintézis megzavarásával (2,4-dinitrofenollal), illetve a fehérjeszintézis gátlásával (cikloheximiddel) fékezni lehet (Emri és mtsai. 2004). Az extracelluláris hidrolázok génjei (pl. *chiB* és *prtA*) valóban az autolízis alatt indukálódnak, azaz a megnövekedett autolítikus hidroláz aktivitások mögött nem valamilyen passzív folyamat (pl. a növekedési fázisban megtermelt hidrolázok tápközegbe ürülése a sejtek szétesésekor), hanem aktív fehérjeszintézis áll (Emri és mtsai. 2006, Molnár és mtsai. 2006). Az autolízis stressz hatására (pl. menadionnal, *terc*-butil hidroperoxiddal indukált oxidatív stressz) gátlódik (Emri és mtsai. 2004). A stressz elleni védekezés egyrészt energiát von el a sejtetől, másrészt jelentősen gátolja a fehérjeszintézist (Pócsi és mtsai. 2005).

Az autolízissel kapcsolt proteináz és kitináz aktivitások főleg a FluG általt közvetített jelátviteli útvonalon indukálódnak az *A. nidulans*-ban (Molnár és mtsai. 2004, 2006, Emri és mtsai. 2005, 2008). A BrlA részt vesz a szénéhező tenyészetek ChiB endokitináz és az EngA β -1,3 endoglükánáz termelésének a szabályozásában (Pócsi és mtsai. 2009, Szilágyi és mtsai. 2010). A GanB/RgsA útvonal szerepet játszik az extracelluláris proteináz termelésében, de nem befolyásolja az extracelluláris kitináztermelést és nincs hatással az autolítikus biomasszaveszteségre sem (Molnár és mtsai. 2006). A hidrolitikus enzimaktivitás ugyanakkor szénforrás represszió alatt áll, de ez csak részben függ a fonalas gombák fő karbon katabolikus transzkripció faktorától a CreA-tól (Lockington és Kelly 2001, Emri és mtsai. 2006, 2008).

Az autolízis számos külső tényezővel előidézhető fonalas gombákban, ilyenek a hő, nagy alkohol koncentráció, szén- és/vagy nitrogénéhezés, valamint oxigén limitáció (McNeil és mtsai. 1998). A fonalas gombák körében a legelterjedtebb autolízismarkerek a szárazanyag- csökkenés, a vakuolizáció, üres és fragmentált hifák létrejötte, a pelleték átmérőjének

csökkenése, az intra- és az extracelluláris hidrolitikus enzimek (például, proteinázok, kitinázok, glükánázok, ribonukleázok, dezoxi-ribonukleázok) termelődése, valamint az ammónia felszabadulása (McNeil és mtsai. 1998, McIntyre és mtsai. 2000, White és mtsai. 2002, Emri és mtsai. 2008).

2.4. Kis móltömegű antifungális fehérjék

Antimikrobiális fehérjék széles körben termelődnek az élővilágban, meggátolva a baktériumok, élesztők és fonalas gombák növekedését. Ismerünk termelő szervezeteket a filogenetikai fa minden ágáról. Az első, növényből izolált antimikrobiális fehérje után találtak hasonló szerepű fehérjéket baktériumokban, gombákban, ízeltlábúakban, madarakban, kétéltűekben és emlősökben (Tao és mtsai. 1990, Ganz 1994, Dimarcq és mtsai. 1998, García-Olmedo és mtsai. 1998, Tossi és mtsai. 2000, Raj és Dentino 2002). Prokariótákban és alacsonyabb rendű eukariótákban az antimikrobiális fehérjék ökológiai előnyt biztosítanak a termelő szervezetnek a táplálékért folytatott harcban. Magasabb rendű eukariótákban az immunrendszer részét képezik (Baker és mtsai. 1997, Fritig és mtsai. 1998, Lehrer és Ganz 1999, Raj és Dentino 2002). Habár ezek az antimikrobiális fehérjék változatos aminosav szekvenciát és másodlagos-harmadlagos szerkezetet mutatnak, többségükre jellemző a kis molekulatömeg és a bázikus jelleg. A gerincesekben talált antimikrobiális proteinek nagy részét a 3-6 kDa móltömegű, bázikus, ciszteinben gazdag, 3 diszulfid híddal rendelkező **defenzinek** alkotják (Ganz és Lehrer 1994).

A növényekben is többféle védekezési mechanizmus alakult ki a patogén mikrobákkal szemben, melyek között a kis móltömegű (45-54 aminosav), bázikus, ciszteinben gazdag **növényi defenzinek** igen változatos csoportot alkotnak. Aminosav-sorrendjüket tekintve, csupán a 8 db szerkezet

stabilizáló cisztein mutatkozik konzerváltnak. Valószínűleg ez a változatosság tehető felelőssé a különböző növényi defenzinek különféle biológiai aktivitásáért. Néhányuk alig mutat antimikrobiális hatást, más részük viszont antifungális és/vagy antibakteriális aktivitással is bír (Thevissen és mtsai. 2003).

Antimikrobiális hatású, ciszteinben gazdag, bázikus proteineket **fonalas Ascomycoták** is termelnek, melyeket az **1. táblázatban** foglaltam össze.

1. táblázat. A fonalas Ascomycotákból izolált bázikus, ciszteinben gazdag antifungális fehérjék, és szekvencia-homológiája a PAF-val

Fehérje	Termelő szervezet	Szekvencia-homológia a PAF-val (%)	Hivatkozás
AFP	<i>A. giganteus</i>	42	Wnendt és mtsai. 1994
PAF	<i>P. chrysogenum</i> Q176	-	Marx és mtsai. 1995
Anafp	<i>A. niger</i>	37	Gun lee és mtsai. 1999
NAF	<i>P. nalgiovense</i>	100	Geisen és mtsai. 2000
AcAFP	<i>A. clavatus</i>	39	Skouri-Gargouri és Gargouri, 2008
PgAFP	<i>P. chrysogenum</i> RP 42C	34	Rodríguez-Martin és mtsai. 2010

Az **1. táblázatban** felsorolt antifungális fehérjék közül, a dolgozat alapjául szolgáló PAF mellett az *A. giganteus* antifungális fehérjéjéről, az **AFP**-ről gyűlt össze a legtöbb ismeretanyag. A fehérje móltömege 6000 Da, 51 aminosavból áll és nyolc ciszteint tartalmaz, melyek 4 diszulfid hidat

alkotnak (Nakaya és mtsai. 1990, Wnendt és mtsai. 1994). Az AFP nem mutat antimikrobiális hatást baktériumokkal és élesztőkkel szemben, ugyanakkor már mikromólos koncentrációban gátolja számos fonalas gomba növekedését. Ezek között több oportunista humán patogén (*A. fumigatus*, *A. niger*) és növénypatogén (*Fusarium oxysporum*, *F. moniliforme*, *Magnaporthe grisea*, *Erysiphe graminis*, *Phytophthora infestans*) faj is szerepel (Lacadena és mtsai. 1995, Oldach és mtsai. 2001, Vila és mtsai. 2001, Theis és mtsai. 2003, Moreno és mtsai. 2006).

Az AFP az *A. giganteus* 70-90 órás stacioner fázisú süllyesztett tenyészetének fermentlevében detektálható legnagyobb mennyiségben. Az *afp* gén a termelő szervezet felületi tenészeteiben is expresszáldódik. Az *uidA* (*Eserichia coli* β -glükuronidáz génje) riporterrendszer segítségével feltárták, hogy az expresszió akkor következik be, amikor a gobatelep képes légmicéliumok képzésére. A gén kizárólag a vegetatív micéliumokban expresszáldódik konidiofórumokban és a konídiumokban nem detektálták a gén expresszióját, amely arra utal, hogy az *afp* transzkripciója szigorú tér és időbeli szabályozás alatt áll az *A. giganteus* konidiogenezise alatt (Meyer és mtsai. 2002).

Az *A. niger*ből származó antimikrobiális hatású fehérje az **Anafp** 58 aminosavból áll és 6 ciszteint tartalmaz. Az Anafp antifungális hatást mutat fonalas és élesztő gombákkal szemben, de nincs antibakteriális hatása (Gun Lee és mtsai. 1999).

A *P. chrysogenum*mal közeli rokonságban álló *P. nalgiovense* hordoz egy a *paf*-vel nagy szekvencia-homológiát mutató gént a **naf**-ot. Mivel magát a fehérjét nem izolálták, a rendelkezésre álló aktivitás adatok csupán a *P. nalgiovense* tenyészet antimikrobiális hatását tükrözik. A *P. nalgiovense* felületi tenészete hatástalannak bizonyult élesztőkkel szemben, de több

fonalas gomba (*Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor* sp.) növekedését gátolta (Geisen 2000).

Az 5773 Da molekulatömegű **AcAFP** fehérjét nemrégiben izolálták *A. clavatus*ból (Skouri-Gargouri és Gargouri 2008, Skouri-Gargouri és mtsai. 2009, 2010), amely 92 %-os aminosav azonosságot mutat az AFP-vel és 39 %-os szekvencia homológiát a PAF-vel (Skouri-Gargouri és Gargouri 2008, 10.1. függelék). Az 51 aminosavból álló fehérje térszerkezetét szintén 4 diszulfidhíd stabilizálja. A fehérje aktív számos humán- és növénypatogén gomba ellen (*Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *A. niger*, *Botrytis cinerea*, *Alternaria solani*), de baktériumok és élesztők ellen hatástalan (Skouri-Gargouri és mtsai. 2010).

A *P. chrysogenum* RP42C törzsből izolált **PgAFP** (Acosta és mtsai. 2009, Rodríguez-Martín és mtsai. 2010) a fonalas Ascomycoták által termelt ciszteinben gazdag, bázikus, antimikrobiális hatású fehérjék családjának legújabb tagja. A 6494 Da molekulásúlyú fehérje, 58 aminosavból áll, amely 6 ciszteint tartalmaz. A PgAFP aktívnak bizonyult a hústermékeken megjelenő nemkívánatos mikotoxin-termelő *Penicillium echinulatum*, *Penicillium commune* (Núñez és mtsai. 1996), illetve *A. niger* törzsek ellen (Acosta és mtsai. 2009). A *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 törzs genomszekvencia-analízise (van den Berg és mtsai. 2008) feltárt egy *pgafp*-hez hasonló (11 nukleotidos eltérés) nukleotidszekvenciát (Génbank ID: CAP80456). Az ebből származót érett fehérje szekvenciája megegyezik a PgAFP-vel, de a szignálszekvencia tartalmaz egy, a proszekvencia pedig két aminosavcserét. Ugyanakkor a *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 törzs PgAFP-termeléséről nincs elérhető irodalmi adat (Rodríguez-Martín és mtsai. 2010). Ezzel összhangban nem izoláltak PgAFP-t a *P. chrysogenum* Q176 törzs tenyészetéből sem.

2.5. A PAF jellemzése

1995-ben Marx és munkatársai sikeresen klónozták a *paf* gént a *P. chrysogenum* Q176 (ATCC 10002) törzs tápközegéből izolált kis molekulatömegű bázikus fehérje aminosavszekvenciája alapján. Az általuk azonosított 423 bp hosszúságú genomi DNS-t két (egy 76 és egy 68 bp hosszúságú) intron szakít meg (Marx és mtsai. 1995). Az időközben közzétett *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 teljes genom szekvencia tartalmaz egy a *paf*-vel azonos génszekvenciát az AM920439 lókuszt azonosító szám alatt (van den Berg és mtsai. 2008). A *paf* cDNS egy 92 aminosav hosszúságú prekurzor fehérjét kódol, amely magában foglal egy 18 aminosav hosszúságú szignál szekvenciát. Ezt követi egy 19 aminosav hosszúságú proszekvencia, amely az érett PAF (55 aminosav) szekréciója közben hasad le. A proszekvencia eltávolítása után az érett fehérje elnyeri a végleges térszerkezetét, és teljes biológiai aktivitását is (Marx és mtsai. 1995, 2005, 2008). A fehérje a prepro-szekvencia lehasításán kívül nem módosul további poszt-transzlációs (pl. foszforiláció, glikoziláció) mechanizmusokkal (Batta és mtsai. 2009).

A PAF aktív számos opportunistá humán patogén gombával szemben, beleértve a tüdőaszpergillózist kiváltó *A. fumigatus* és több, bőrbetegséget okozó dermatofita gombafajt. Számos növényi betegségért felelős gomba növekedését gátolja és aktív a fonalas modellorganizmusok, az *A. nidulans* és a *Neurospora crassa* ellen is. A fehérje minimális gátló koncentrációi (MICs) mikromólos tartományba sorolhatók, ugyanakkor a baktériumok és élesztők növekedésére nincs hatással (Kaiserer és mtsai. 2003, Marx 2004, Galgóczy és mtsai. 2005, 2007, Barna és mtsai. 2008, Marx és mtsai. 2008).

A 6,25 kDa molekulatömegű fehérje 6 db ciszteint tartalmaz, melyek diszulfidhidak kialakítására képesek. A PAF feltehetőleg ennek köszönheti

kiváló pH-, hő-, és proteázokkal szembeni stabilitását (Marx és mtsai. 2008Batta és mtsai. 2009). A PAF az érzékeny gombafajok (*A. niger*, *A. fumigatus*, *A. nidulans*) citoplazmájában lokalizálódik, de nem jut be a rezisztens fajok (*A. terreus*) sejtjeibe. A fehérje célsejtbe való bejutása aktív transzporttal történik (Oberparleiter és mtsai. 2003). A PAF gátolja az érzékeny fonalas gombák csírázását és torzult morfológiai formákat - a hifacsúcsok megduzzadását, illetve hifa elágazásokat okoz (Leiter és mtsai. 2005, Marx és mtsai. 2008).

A PAF, a **hatásmechanizmusát** tekintve többszinten károsítja a szenzitív sejteket:

- Az érzékeny fajokban- *A. niger*, *A. fumigatus*, *A. nidulans*- és rekombináns PAF-ot expresszáló transzgénikus *A. nidulans* törzsben **ROS felhalmozódást** vált ki (Leiter és mtsai. 2005, Marx és mtsai. 2005).
- **Programozott sejthalált** indukál *A. nidulansban* (Leiter és mtsai. 2005).
- **Csökkenti** az *A. nidulans* hifák **kitin-tartalmát**, és a hifacsúcsokban felhalmozódó **aktin mennyiségét** (Binder és mtsai. 2010b).
- **Szelektív K⁺-ion kiáramlást** okoz és **Hiperporazizációt** vált ki az *A. nidulans* membránjában (Leiter és mtsai. 2005).
- **Megzavarja** a *Neurospora crassa* **Ca²⁺-ion homeosztázisát** (Binder és mtsai. 2010a).

A PAF FadA-SfaD-GpgA heterotrimer G-protein által közvetített **jelátviteli útvonalon** fejt ki antifungális hatását *A. nidulansban* (Leiter és mtsai. 2005). A heterotrimer G-proteinek minden bizonnyal a ciklikus-AMP/protein kináz A (cAMP/PkaA) jelátviteli kaszkádra továbbítják a jelet, amely apoptózist indukál a gombasejtben (Binder és mtsai. 2010b). Ezzel egyidejűleg a protein kináz C/mitogén-aktivált-protein kináz (PkcA/Mpk)

sejtfal integritás útvonal alapszintű rezisztenciát biztosít a sejtnak a PAF-al szemben (Binder és mtsai. 2010b).

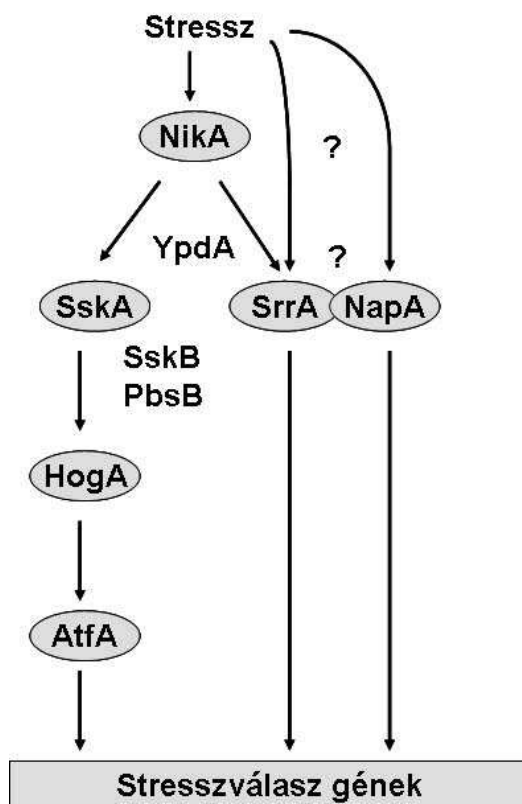
A PAF, az érzékeny gombákra kifejtett sejtpusztító hatása ellenére nincs károsító hatással az emlőssejtekre, amit *in vitro* kísérletekben igazoltak (Szappanos és mtsai. 2005). Ugyanakkor az a tény, hogy a PAF antifungális hatása a vele együttesen alkalmazott flukonazollal, valamint sztatinokkal (lovasztatin, rosuvasztatin, és atorvasztatin) szinergikusnak bizonyult, tovább növeli a fehérje felhasználási lehetőségeit humán antifungális terápiákban (Galgóczy és mtsai. 2007, 2008, Galgóczy és Vágvölgyi 2009). Ráadásul az *in vivo* PAF-kezelés nem váltott ki toxikus hatást árpa- (*Hordeum vulgare*), illetve a búzaleveleken (*Triticum aestivum*), de a kártevők (*Blumeria graminis* és *Puccinia recondita*) által okozott fertőzési tüneteket jelentősen visszaszorította (Barna és mtsai. 2008). Ezen megfigyelések növelik a PAF mezőgazdasági hasznosíthatóságának a lehetőségeit is.

A PAF potenciális felhasználási lehetőségeinek kiaknázása miatt a fehérje termelésének optimalizálása elsőrendű feladat. A *paf* promotere több jellegzetes szabályozó elemet is tartalmaz, melyek részt vehetnek a fehérje termelődésének a szabályozásában. A gén előtti 5'-régióban négy CREA-kötő motívum található, ami karbon katabolikus represszióra utal: a *paf* expressziója limitált glükóz koncentráció, illetve másodlagos szénforrások (pl. szacharóz, keményítő, xilán) alkalmazása esetén indukálódik (Marx és mtsai. 1995, Marx 2004). A promoter régióban található két GATA-faktor kötőhelynek szerepe lehet a *paf* gén nitrogén metabolit repressziójában: a glutamin represszálja, a NaNO₃ indukálja a *paf* mRNS-szintézist (Marx 2004).

A PAF az AFP-hez hasonlóan a 70-90 órás stacioner fázisú süllyesztett tenyészetek fermentlévében detektálható a legnagyobb mennyiségben (Marx 2004).

2.6. Az *A. nidulans* stresszválaszának a szabályozása

A hisztidin-aszpartát foszforelé egy igen elterjedt stresszválaszközvetítő rendszer az élővilágban, a prokariótáktól a magasabb rendű növényekig (Catlett és mtsai. 2003, Mizuno 2005, Zhang és Shi 2005, Ashby és Houmard 2006, Pareek és mtsai. 2006, Hagiwara és mtsai. 2011). Eukariótákban alapvetően három egységre tagolható: a hisztidin kináz (HK) szenzorra, a hisztidin tartalmú foszfortranszmitterre (histidine-containing phosphotransfer-HPT) és az aszpartát tartalmú válasz regulátorra (response regulator- RR) (Vargas-Pérez és mtsai. 2007, Hagiwara és mtsai. 2009a). Az *A. nidulans* genomjában 15 féle HK-t, 1 HPT-t és 4 RR-t azonosítottak (Hagiwara és mtsai. 2009a). A hisztidin kinázok (pl. TcssA, TcsB, FphA és NikA) közül a NikA-t jellemezték a legrészletesebben, amely a fungicidek „érzékelésében” is szerepet játszik (**3. ábra**) (Hagiwara és mtsai. 2007b, 2009b). Az YpdA az egyetlen *A. nidulans*-ban leírt hisztidin tartalmú foszfortranszmitter (Hagiwara és mtsai. 2009a). Az *A. nidulans* válasz regulátorai közül eddig az SskA-t és az SrrA-t jellemezték részletesen (Hagiwara és mtsai. 2007a, 2009b, 2011). Az SskA a *Saccharomyces cerevisiae* Ssk1p (Posas és mtsai. 1996) homológja, az SrrA pedig a sarjadzó élesztő Skn7p-jével (Lu és mtsai. 2003) mutat homológiát. Az YpdA-SskA útvonal az SskB-PbsB-HogA/SakA mitogén aktivált protein kináz kaszkádon keresztül aktiválja a sejt stresszválasz elemeit (oxidatív-, ozmotikus-, fungicid stressz) (Kawasaki és mtsai. 2002, Furukawa és mtsai. 2007, Hagiwara és mtsai. 2007a, 2009a). Az útvonal több transzkripciósfaktort is aktivál, ezek közül az AtfA (a *Schizosaccharomyces pombe* Atf1 homológja) a gomba oxidatív és ozmotikus stresszválaszait szabályozza (Hagiwara és mtsai. 2008, Balázs és mtsai. 2010).



3. ábra. Az *A. nidulans* stresszválaszának szabályozása Asano és munkatársai (2007), Hagiwara és munkatársai (2007ab, 2009ab, 2011), Vargas-Pérez és munkatársai (2007) Miskei és munkatársai (2009) valamint Balázs és munkatársai (2010) nyomán. Az SrrA-nak a foszforelé komponensektől független aktiválása, illetve az SrrA-NapA komplex kialakulása további bizonyításra szorul, amit kérdőjelek szimbolizálnak.

Az YpdA-SrrA útvonal szintén fontos szerepet tölt be a különféle környezeti szignálokra adott válaszreakciók kialakításában (ozmotikus adaptáció, oxidatív stressz válasz, fungicid érzékenység) (Vargas-Pérez és mtsai. 2007, Hagiwara és mtsai. 2009b, 2011). Itt fontos megemlíteni a NapA transzkripciós faktort (Asano és mtsai. 2007), amely oxidatív stressz alatt az SrrA-hoz kapcsolódhat. Az így létrejött komplex YpdA foszforilációtól

függetlenül is közvetíthet jelet, bár ennek igazolása még további bizonyításra szorul (Hagiwara és mtsai. 2011). Vargas-Pérez és munkatársai (2007) azt feltételezik, hogy a H_2O_2 által kiváltott oxidatív stressz a NikA-tól, illetve a foszforelé egységektől függetlenül is aktiválhatja az SrrA-t.

3. Eredmények

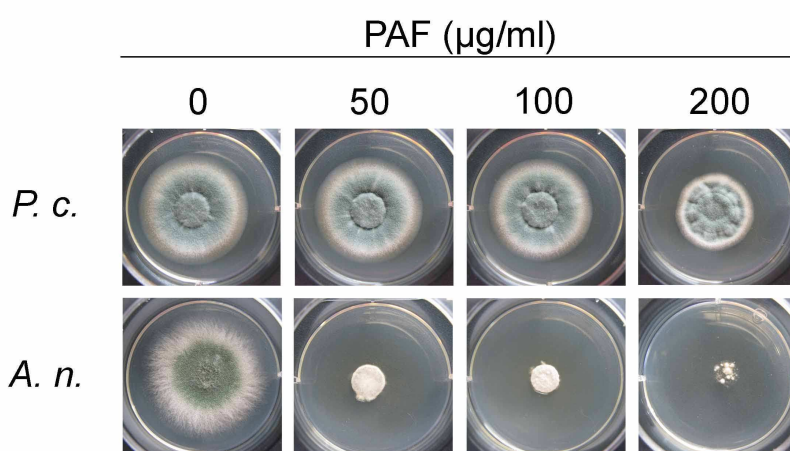
3.1. A PAF hatása a *P. chrysogenum* növekedésére

A PAF számos fonalas Ascomycota, köztük az *A. nidulans* modellszervezet növekedését is gátolja (Kaiserer és mtsai. 2003, Marx 2004, Barna és mtsai. 2008, Galgóczy és mtsai. 2008, Marx és mtsai. 2008). A fehérje bőségesen termelődik a *P. chrysogenum* Q176 törzs stacioner fázisú süllyesztett tenyészetébe. Szacharóz szénforráson és nitrát nitrogénforráson fenntartott *P. chrysogenum* Q176 törzs tenyészeiben a PAF termelési hozama körülbelül 10 mg literenként (Dr. Leiter Éva személyes közlése). Irodalmi adatok szerint a termelő szervezet növekedését a PAF 50 µg/ml-es koncentrációban adagolva nem gátolta mikrotiter lemezen (Kaiserer és mtsai. 2003).

A fehérje hatását a *P. chrysogenum* pontoltásos felületi tenyészeinek (5.3. fejezet) a növekedésére olyan koncentráció értékeken vizsgáltuk meg, amelyek többszörösen (körülbelül 5x, 10x, és 20x) meghaladják a PAF termelődési hozamát. Kontrollként a PAF-ra érzékeny *A. nidulans* (FGSC 4A) törzset használtuk. Mindkét törzset növekvő PAF-koncentráció (0, 50, 100, 200 µg/ml) mellett inkubáltuk.

Ahogy a **4. ábrán** látható, a PAF-nak a termelő organizmus növekedésére kifejtett hatása csekély. Az alkalmazott 50 és 100 µg/ml-es PAF koncentrációknál a tenyészet telepátmérője csupán $2\pm 2,0\%$ -kal és $6,7\pm 1,2\%$ -kal csökkent a kezeletlen kontrollhoz viszonyítva (**2. táblázat**). A *P. chrysogenum* telepátmérője csak a 200 µg/ml-es PAF-koncentráció esetén csökkent $28\pm 2,0\%$ -kal a kezeletlen tenyészetéhez képest. Ugyanakkor a PAF-szenzitív *A. nidulans* esetén már az 50 µg/ml-es PAF koncentráció is komoly növekedés csökkenést (a telepátmérő $70,4\pm 1,9\%$ -al csökkent a kezeletlen

kontrollhoz képest) okozott. A milliliterenként 100 µg PAF-ot tartalmazó tápagaron a telep növekedése ettől is kisebb mértékű volt ($73,1 \pm 1,9\%$ -kal csökkent a telepátmérő a kezeltlen tenyészethez viszonyítva) és 200 µg/ml-es PAF-koncentrációt alkalmazva nem fejlődött ki összefüggő telep a tápagar felszínén.



4. ábra. A PAF növekedésgátló hatása *P. chrysogenum* Q176 (**P.c.**) és *A. nidulans* (FGSC 4A) (**A.n.**) törzsekre. Pontleoltással 10^4 spórát juttattunk (5.3 fejezet) CM tápagar (5.2 fejezet) felületére, amely emelkedő koncentrációkban (0-200 µg/ml) tartalmazott PAF-ot. A *P. chrysogenum* telepeket 25 °C-on 96 óráig, *A. nidulans* tenyészeteket 37 °C-on 48 óráig inkubáltuk 6 lyukú sejtenyésztő lemezen (Nunclon™).

2. táblázat. *P. chrysogenum* Q176 és *A. nidulans* (FGSC 4A) törzsek telepátmérői a tápagar növekvő PAF-koncentrációja esetén.

PAF($\mu\text{g/ml}$) ^a	0	50	100	200
<i>P. chrysogenum</i> (96 óra) ^b				
Telepátmérő ^d (mm)	25,0 $\pm$ 0,5 (100 $\pm$ 2,0%)	24,5 $\pm$ 0,5 (98,0 $\pm$ 2,0%)	23,3 $\pm$ 0,3 (93,3 $\pm$ 1,2%)	18,0 $\pm$ 0,5 (72,0 $\pm$ 2,0%)
<i>A. nidulans</i> (48 óra) ^c				
Telepátmérő ^{d,e} (mm)	27,0 $\pm$ 0,5 (100 $\pm$ 1,9%)	8,0 $\pm$ 0,5 (29,6 $\pm$ 1,9%)	7,0 $\pm$ 0,5 (26,9 $\pm$ 1,9%)	- -

^a A PAF-ot emelkedő (0-200 $\mu\text{g/ml}$) koncentrációban tartalmazó CM tápagar felületére minden esetben 10^4 spórát juttattunk pontleoltással (5.3. fejezet).

^b A *P. chrysogenum* telepeket 25 °C-on 96 óráig inkubáltuk.

^c Az *A. nidulans* tenyészeteket 37 °C-on 48 óráig inkubáltuk.

^d A kezeletlen kontrollhoz viszonyított százalékos átmérőadatok zárójelben vannak feltüntetve.

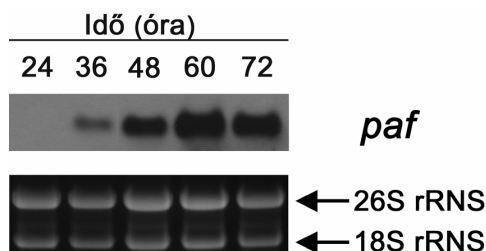
^e A 200 $\mu\text{g/ml}$ -es PAF-koncentráción az *A. nidulans* törzs nem növesztett összefüggő telepet, ezért a telepátmérő nincs feltüntetve

3.2. A *paf* gén expressziója süllyesztett kultúrában

A PAF a *P. chrysogenum* Q176 törzs 70-90 órás süllyesztett tenyészetének fermentlevében mutatható ki a legnagyobb mennyiségben (Marx 2004). Annak érdekében, hogy bővebb képet kapjunk a *paf* expressziójáról, megvizsgáltuk a gén transzkripcióját a *P. chrysogenum* süllyesztett tenyészetében (5.3. fejezet). Arra voltunk kíváncsiak, hogy mikor jelenik meg az mRNS a tenyészetekben.

A gombaspórák leoltását követő 24., 36., 48., 60. és 72. órában begyűjtött micéliumból RNS-t izoláltunk (5.7. fejezet) és az 5.8. fejezetben ismertett módon Northern blot analízissel detektáltuk a *paf* mRNS-t.

A **5. ábrán** látható, hogy a *paf* mRNS már a *P. chrysogenum* 36 órás süllyesztett tenyészetének micéliumában detektálható, és a transzkripció a tenyésztés 60. órájában éri el a maximumát.



5. ábra. A *paf* génexpresszió Northern blot analízise *P. chrysogenum* Q176 süllyesztett tenyészetében. A süllyesztett tenyészetéből (5.3. fejezet) származó RNS-t *paf* specifikus digoxigenin próbával hibridizáltuk. Az etidium bromiddal festett 26S és 18S riboszómális RNS (rRNS) futtatási kontrollként szolgált.

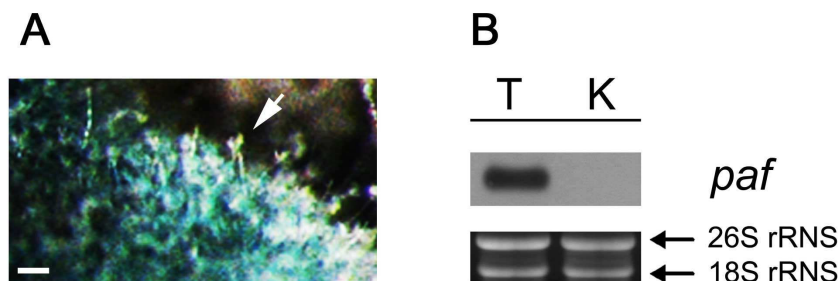
3.3. A *paf* gén transzkripciója felületi tenyészetben

A továbbiakban a *P. chrysogenum* felületi tenyészeiben vizsgáltuk a *paf* expresszióját és a gomba mitospórafejlődését. Annak érdekében, hogy a szinkronizáltan indukálhassuk a *P. chrysogenum* aszexuális differenciálódási folyamatait (Mah és Yu 2006), a gomba 19 órás rázatott tenyészetét oltottuk át tápagarra az 5.3. fejezetben ismertett módon. Az így létrehozott felületi tenyészeteket szinkronizált felületi tenyészetnek nevezem a dolgozatban.

3.3.1. A *paf* gén transzkripciója különböző gombaképletekben

Az átoltást követő 36. órában a *P. chrysogenum* Q176 tenyésze már erősen differenciálódott volt, a gombahifák mellett konidiofórumokat (**6. ábra, A**) és konídiumokat is tartalmazott. Ezért a tenyészet transzkripciós analízise mellett külön vizsgáltuk a tenyészetről begyűjtött konídiumok *paf* mRNS szintjét is. Az RNS izolálásra előkészített konídiumminta az alapos tisztítási lépéseknek köszönhetően nem tartalmazott a tenyészetből származó micélium-törmelékeket és ügyeltünk arra is, hogy a begyűjtött spórákból a tisztítást követően azonnal elvégezzük az RNS izolálást (5. 7. fejezet). A *paf* mRNS-t az 5.8. fejezetben ismertett módon Northern blot analízissel detektáltuk.

Az analízis (**6. ábra, B**) feltárta, hogy a *paf* gén erősen expresszálódik a *P. chrysogenum* felületi tenyészetében, de *paf* mRNS nem mutatható ki a tenyészet spóráiban. Ez arra enged következtetni, hogy a *paf* gén expressziója térbelileg szabályozott a mitospórafejlődés alatt. A *paf* gén nem expresszálódik a *P. chrysogenum* konídiumaiban, csak a felületi tenyészet egyéb részeiben, amely gombahifákat és konidiofórumokat is tartalmaz (**6. ábra**).



6. ábra. *paf* expresszió tanulmányozása a *P. chrysogenum* felületi tenyészetében. **A**, A tenyészet sztereomikroszkópra (Leica MZ16) szerelt kamerával (Zeiss, AxioCam, MRm) készített fényképe. Az alkalmazott skála 75 μm -t szimbolizál, a nyíl az egyik konidiofórumra mutat rá. **B**, A *paf* expresszió Northern blot analízise. Az össz-RNS a *P. chrysogenum* Q176 36 órás szinkronizált felületi (5.3. fejezet) tenyészetéből (T) és konídiumaiból (K) származik. Blottolás után az RNS-t *paf* specifikus digoxigenin próbával hibridizáltuk. Az etidium bromiddal festett 26S és 18S riboszómális RNS (rRNS) futtatási kontrollként szolgált

3.3.2. A *paf* gén transzkripciójának kinetikája

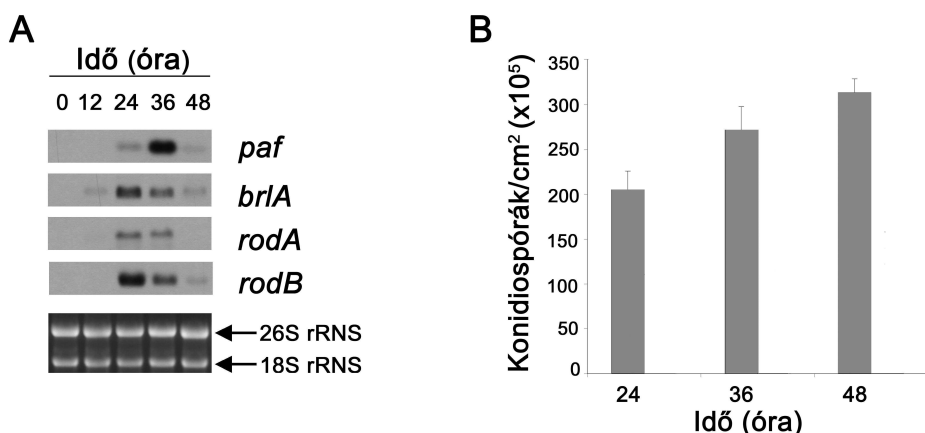
Megvizsgáltuk a *paf* transzkripciójának a kinetikáját a *P. chrysogenum* Q176 szinkronizált felületi tenyészetében. Ezzel párhuzamosan tanulmányoztuk a kultúrák mitospóráfejlődését. Sztereomikroszkóp (Leica MZ16) segítségével nyomon követtük a konidiofórumok megjelenési idejét. Időről időre meghatároztuk a tenyészetek spórázási képességét (5.15. fejezet). Emellett a transzkripció analízisbe bevontuk a *brlA*, a *rodA* és a *rodB* mitospóráfejlődést jelző géneket (ld. a 2.2. fejezetben) is.

A *rodA* és a *rodB* géneket még részletesen nem jellemezték *P. chrysogenum*-ban. A sporuláció specifikus gének evolúciósan jól konzerváltak a fonalas gombák körében, így ezek a gének a többi Ascomycotához hasonló

funkciót tölthetnek be a *P. chrysogenum*ban is. Az említett gének ortológjait az 5.17. fejezetben ismertett módon kerestük. Az *A. nidulans* RodA, illetve az *A. fumigatus* RodB fehérjék szekvencia-hasonlóságát a *P. chrysogenum* feltételezett homológjaival 10. 2. függelék szemlélteti. Kutatásainkkal egy időben Sigl és munkatársai (2010) feltárták, hogy a *rodA* és *rodB* ortológok BrlA szabályozás alatt állnak *P. chrysogenum*ban.

A transzkripció analízis céljából mintát vettünk az előtenyészetből (0 óra) és 12 óránként a felületi kultúrából. Az RNS izolálást az 5.7., a Northern blot analízist az 5.8. fejezetben ismertett módon hajtottuk végre.

Az analízis kimutatta, hogy a *paf* mRNS az átoltás után 24 órával jelent meg a felületi tenyészetben, az expresszió 36 óra után érte el a maximumát majd újra lecsökkent (**7. ábra, A**). Ez az expressziós mintázat jól korrelált a *brlA*, a *rodA* és a *rodB* gének transzkripciójával (**7. ábra, A**) és a mitospóratermeléssel (**7. ábra, B**). A sztereomikroszkópos megfigyelések alapján az első konídiumtartók megjelenése az átoltást követő 16- 18. órára tehető.



7. ábra. A *paf*, a *brlA*, a *rodA* és a *rodB* gének expressziója és a mitospóratermelés nyomonkövetése a *P. chrysogenum* Q176 felületi tenyészeiben. **A**, A *paf*, a *brlA*, a *rodA* és a *rodB* génexpresszió Northern blot analízise *P. chrysogenum*ban. Az RNS-t a 19 órás előtenyészetből (0 óra), valamint MM agaron (5.2. fejezet) tovább inkubált szinkronizált felületi tenyészetből (5.3 fejezet) vontuk ki az átoltás után 12, 24, 36 és 48 órával. Blottolást követően az RNS-t a megfelelő génspecifikus digoxigenin próbával hibridizáltuk. Az etidium bromiddal festett 26S és 18S riboszómális RNS (rRNS) futtatási kontrollként szolgált. **B**, A 24, 36, és 48 órás szinkronizált tenyészetek spóraszám (x10⁵) négyzetcentiméterre vonatkoztatva. Az átoltás után 12 órával a tenyészetek még nem képeztek konidiofórumokat, ezért a konídiumszám nincs feltüntetve.

3.4. *P. chrysogenum paf* deléció mutáns létrehozása

A PAF, termelő szervezetben betöltött élettani szerepének részletesebb tanulmányozása céljából létrehoztunk egy *paf* deléció mutánt a *P. chrysogenum* Q176 törzsben. A gén delécióját úgy hajtottuk végre, hogy a *paf*-ot kódoló génszakaszt nourseothricin-rezisztenciát biztosító génnel (*nat1*) (Krügel és mtsai. 1993) cseréltük ki. Mivel a homológ rekombináció kis gyakorisággal játszódik le *P. chrysogenumban*, a deléció létrehozására a „split-marker” módszert (Nielsen és mtsai. 2006) választottuk. A *P. chrysogenum* Q176 törzset két db PCR termékkel transzformáltuk. Mindkét transzformáló elem tartalmazott egy *nat1* génrészletet, melyeket a *paf* gén 5'-NTR (nem transzlálódó régió) illetve 3'-NTR - jával egyenként fúzionáltattunk (8. ábra, A). A transzformáló elemek létrehozásához szükséges PCR reakciókat, valamint a restriktós emésztéseket és ligálásokat az 5.5. fejezetben ismertett módon hajtottuk végre. A felhasznált primerek szekvenciáit a 8. táblázatban (5.4. fejezet) foglaltam össze.

P. chrysogenum Q176 törzsből genomi DNS-t izoláltunk (5.9. fejezet), amelyet templátként alkalmazva PCR technikával felszaporítottuk a *paf* gén mindkét NTR-ját. Az *paf* 5'-NTR (2,1 kb, a továbbiakban 5'-NTR) felszaporításához az o5pafA1 és o5pafArev primerpárt, míg a *paf* 3'-NTR-hoz (2,2 kb, a továbbiakban 3'-NTR) az o3pafAse és o3pafA2 primereket használtuk. A génszakaszokat *Bam*HI (5'-NTR esetén) és *Sal*I (3'-NTR esetén) restriktós enzimekkel emésztettük. A *nat1* szelekciós markert a pDnat1 plazmidból (5.4. fejezet) nyertük *Bam*HI és *Sal*I -gyel való emésztés után. Ezt követően a *nat1* gént külön-külön ligáltuk az 5'-NTR és a 3'-NTR-hoz. A Δpaf mutáns létrehozásához két átfedő PCR elemet amplifikáltunk a megfelelő ligációs termékekből (A és B transzformáló elemek).

rekombinációs helyként szolgált a transzformáció közben. A *P. chrysogenum* Q176 törzset e két átfedő transzformáló elemmel („A” és „B”) transzformáltuk (5.10. fejezet). Csak azon transzformánsok rendelkeztek nourseothricin-rezisztenciával, melyek az ép *nat1* gént hordozták. Az „A” és „B” transzformáló elemek *paf* lókuszon bekövetkező homológ rekombinációja elősegítette a hiányos *nat1* gén rekombinációját is, így a nourseothricin rezisztencia gén helyspecifikusan épült fel (a *paf* lókuszon). Ugyanakkor a marker összeszerelődése homológ rekombinációval folytonos transzformáló elemet is eredményezhetett, de a már egyszer szükségszerűen lezajlott homológ rekombináció növeli a homológ helyen történő integráció esélyét a gombasejtben (Nielsen és mtsai. 2006).

A transzformánsok szelektálását nourseothricinnel (Jena Bioscience, Németország) kiegészített minimál táptalajon végeztük (5.10.fejezet). A géndeléciót Southern hibridizációval (5.11. fejezet) ellenőriztük **(8. ábra, B)**.

3.5. A *paf* deléció hatásának tanulmányozása a *P. chrysogenum* csírázási képességére

Megvizsgáltuk a géndeléció a hatását a *P. chrysogenum* spórák csírázására. Összehasonlítottuk a vad típusú és a Δpaf törzsek frissen begyűjtött, illetve 7 napon át 4 °C-on inkubált konídiumainak a csírázási képességét (5.12. fejezet).

Megállapítottuk, hogy a minimál tápoldaton (5. 2.) növesztett *P. chrysogenum* Q176 és Δpaf tenyészetek spórái egyszerre kezdtek el csírázni. A legelső csíratömlők mindkét törzs esetében 9 órás inkubációt követően jelentek meg a megduzzadt konídiumokon és ezt a 7 napos, 4°C-on történő inkubáció sem befolyásolta. A tenyészeteket 11-12 óráskorban tekintettük csírázottnak.

A törzsek csírázási képességét tizenkét óráskorban határoztuk meg. Csírázási képesség alatt a kicsírázott spórák össz-spóraszámhoz viszonyított %-os arányát értjük, melyet az 5.12. fejezetben ismertett módon határoztunk meg. Az eredményeket a **3. táblázat** foglalja össze.

3. táblázat A *P. chrysogenum* Q176 (vt) és Δpaf törzsek csírázási képessége

Spórák tárolási ideje 4 °C-on (nap)	Csírázási képesség (%)	
	vt	Δpaf
0	95,0 $\pm$ 1,7	96,0 $\pm$ 1,4
7	88,3 $\pm$ 1,6	89,1 $\pm$ 2,3

A **3. táblázat**ban feltüntetett adatok alapján megállapíthatjuk, hogy *P. chrysogenum* Δpaf törzs csírázási képessége nem mutatott szignifikáns eltérést a vad típushoz képest.

3.6. A *paf* deléció hatása a *P. chrysogenum* felületi tenyészetére

3.6.1. A *paf* deléció csökkent konídium képzést eredményez

Megvizsgáltuk *P. chrysogenum* Q176 és a Δpaf törzsek pontleoltásos felületi tenyészetének (5.3. fejezet) spórázási képességét (5.15. fejezet).

A Δpaf mutáns 48 órás inkubációs idő eltelte után $2,3 \times 10^7 \pm 1,3 \times 10^6$ konídiumot termelt négyzetcentiméterenként (**4. táblázat**), míg a vad típus spórázási képessége $4,9 \times 10^7 \pm 4,5 \times 10^6$ konídium/cm² volt. Ez a mutáns törzs tekintetében 53±3%-os csökkenést jelent a kontrollhoz képest. A Δpaf törzs spórázási képessége 6 napos tenyésztési időszakot követően még tovább csökkent a vad típushoz viszonyítva. Ekkor a mutáns törzs telepein $2,1 \times 10^7 \pm 6,0 \times 10^5$ konídiumot számoltunk négyzet centiméterenként, amely 70±1%-os visszaesést jelent a vad típusú törzshöz képest ($7,0 \times 10^7 \pm 7,9 \times 10^6$ spóra /cm²). Eredményeink arra utalnak, hogy a *paf* deléció csökkentette a *P. chrysogenum* spórázási képességét.

4. táblázat *P. chrysogenum* Q176 (vt) és Δpaf törzsek pontoltásos tenyészetének spórázási képessége

Inkubációs idő	^a Konídiumok száma /cm ²	
	vt ^b	Δpaf ^b
48 óra	$4,9 \times 10^7 \pm 4,5 \times 10^6$	$2,3 \times 10^7 \pm 1,3 \times 10^6$ (-53±3%)
6 nap	$7,0 \times 10^7 \pm 7,9 \times 10^6$	$2,1 \times 10^7 \pm 6,0 \times 10^5$ (-70±1%)

^aA Δpaf törzs spórázási képességének %-os eltérése a vad típushoz képest (100%) zárójelben van feltüntetve.

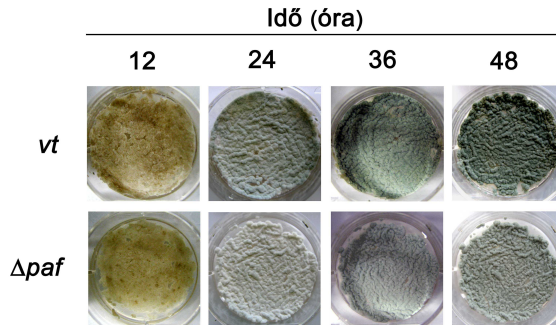
^bPontleoltással (5. 3. fejezet) 10^5 konídiumot juttattunk MM agar (5.2. fejezet) felszínére. A tenyészeteket 25 °C-on inkubáltuk.

Itt fontos megjegyezni, hogy a *paf* gén deléciója nem volt hatással a pontleoltásos felületi tenyészet növekedésére. A telepátmérő 48 órás inkubációs idő eltelte után a vad típusú törzsnél $7,0 \pm 0,4$ mm, a Δpaf esetén pedig $7,1 \pm 0,3$ mm volt. Hat nap után a vad típusú törzset illetően $26,1 \pm 0,5$ mm-t a Δpaf mutánsnál pedig $26,1 \pm 0,4$ mm-t mértünk.

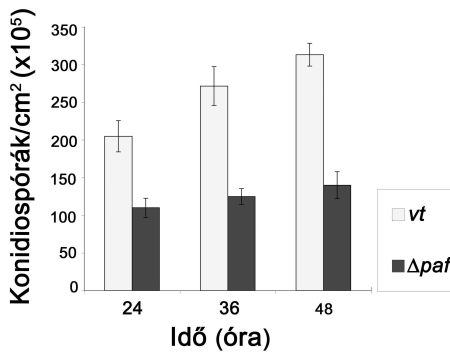
A következő lépésben összehasonlítottuk a *P. chrysogenum* Q176 és Δpaf törzsek szinkronizált felületi tenyészeinek (5.3.fejezet) mitospóra fejlődését. Ennek érdekében az átoltást követően sztereomikroszkóp (Leica MZ16) segítségével követtük nyomon a konídifórumok megjelenési idejét, 12 óránként meghatároztuk a tenyészetek spórázási képességét (5.15. fejezet), valamint a *paf*, a *brlA*, a *rodA* és a *rodB* gének expressziós profilját (5.8. fejezet).

A sztereomikroszkópos megfigyelések alapján az első konídiofórumok megjelenése mindkét törzs esetén a szinkronizálást követő 16-18. órára tehető. A termelődött konídiumok számában viszont jelentős különbséget mutatott a két törzs. A Δpaf törzs spórázási képessége szignifikánsan gyengébb volt a vad típuséhoz képest. Már, az átoltást követő 24. órában szemmel látható volt a deléciós mutáns elégtelen spóráképzése ($1,1 \times 10^7 \pm 1,3 \times 10^6$ konídium/cm²), amely 48 ± 6 %-al alatta maradt a vad típus spórázásási képességének ($2,1 \times 10^7 \pm 2,1 \times 10^6$ konídium/cm²) **(9. ábra A, B, és 5. táblázat)**. Ez a különbség 36 óra elteltével még nagyobbra (-52 ± 4 %-ra) nőtt, amikor a mutáns törzs csupán $1,3 \times 10^7 \pm 1,1 \times 10^6$ spórát termelt négyzetcentiméterenként, a vad típus pedig már $2,7 \times 10^7 \pm 2,6 \times 10^6$ -t. A különbség a szinkronizálást követő 48. órában vált a legszembetűnőbbé, hiszen ekkor a vad típus $3,1 \times 10^7 \pm 1,5 \times 10^6$ spórát termelt négyzetcentiméterenként a Δpaf törzs tenyészetén pedig 55 ± 6 %-al kevesebb spórát számoltunk ($1,4 \times 10^7 \pm 1,8 \times 10^6$ konídium/cm²).

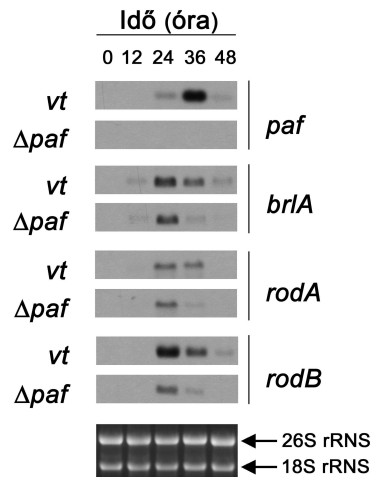
A



B



C



9. ábra. A *paf* deléció hatása *P. chrysogenum* konídiumképzésére, valamint a *brlA*, a *rodA* és a *rodB* gének expressziójára. **(A)** *P. chrysogenum* Q176 (*vt*) és Δpaf törzsek MM agaron (5.2. fejezet) felnövesztett 12, 24, 36 és 48 órás szinkronizált felületi tenyészetek (5.3. fejezet). **(B)** A 24, 36, és 48 órás tenyészetek spóraszámát ($\times 10^5$) négyzetcentiméterre vonatkoztatva. A szinkronizálás után 12 órával a tenyészetek még nem képeztek konidiofórumokat, ezért a konídiumszám nincs feltüntetve. **(C)** *paf*, *brlA*, *rodA*, *rodB* génexpresszió Northern blot analízise *P. chrysogenum* vad típusú, és Δpaf törzsekben. Az össz-RNS-t az előtenyészetből (0 óra), valamint szinkronizált felületi tenyészetekből (5.3. fejezet) vontuk ki az átoltás után 12, 24, 36 és 48 órával. Blottolás után az RNS-t a megfelelő génspecifikus digoxigenin próbával hibridizáltuk. Az etidium bromiddal festett 26S és 18S riboszómális RNS (rRNS) futtatási kontrollként szolgált.

5. táblázat. *P. chrysogenum* Q176 (vt) és *Δpaf* törzsek szinkronizált tenyészetekének spórázási képessége

Inkubációs idő (óra)	^a Konídiumok száma /cm ²	
	<i>vt</i>	<i>Δpaf</i>
12 ^b	n.m.	n.m.
24	$2,1 \times 10^7 \pm 2,1 \times 10^6$	$1,1 \times 10^7 \pm 1,3 \times 10^6$ (-48±6%)
36	$2,7 \times 10^7 \pm 2,6 \times 10^6$	$1,3 \times 10^7 \pm 1,1 \times 10^6$ (-52±4%)
48	$3,1 \times 10^7 \pm 1,5 \times 10^6$	$1,4 \times 10^7 \pm 1,8 \times 10^6$ (-55±6%)

^a A *Δpaf* törzs spórázási képességének %-os eltérése a vad típushoz képest (100%) zárójelben van feltüntetve.

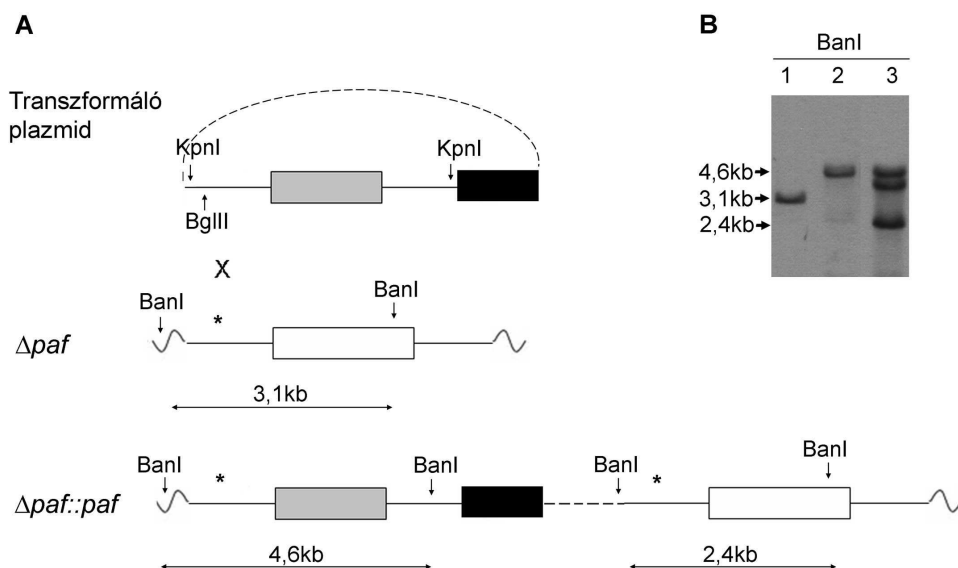
^b Az áttöltés után 12 órával a tenyészetek még nem képeztek konidiofórumokat, ezért a spóraszám nincs meghatározva (n.m.).

Az aszexuális sporuláció szabályozásában központi szerepet betöltő *brlA*, valamint a mitospórafejlődésben fontos szerepet játszó *rodA* és *rodB* gének transzkripciós analízise alátámasztotta az észlelt fenotípust. A sporulációt jelző gének transzkripciója repressziót mutatott a *Δpaf* törzsben. Az mRNS-ek megjelenési ideje azonos volt a két törzsben, de a mutáns törzsben kevesebb mRNS-t detektáltunk, mint a vad típusban (**9. ábra, C**). Ez arra utal, hogy a PAF transzkripciós szinten fokozza a *P. chrysogenum* mitospóra fejlődését.

3.6.2. A Δpaf mutáns genetikai komplementációja helyreállítja a törzs csökkent sporulációs képességét

Annak igazolására, hogy az észlelt fenotípus valóban a *paf* deléciónak köszönhető, visszaültettük a gént a *P. chrysogenum* Δpaf törzs genomjába. A transzformáló elem létrehozásához szükséges PCR reakciókat, valamint a restrikciós emésztéseket és ligálásokat az 5.5. fejezetben ismertett módon hajtottuk végre. A felhasznált primerek szekvenciáit a **8. táblázatban** (5.4. fejezet) foglaltam össze. Az *Escherichia coli* DH5 α sejtek transzformálása, valamint a plazmid DNS preparálása az 5.6. fejezetben olvasható.

A transzformációs elem elkészítéséhez a pSK275 vektort (5.4. fejezet) használtuk fel, amely hordoz egy pirithyamin rezisztenciát biztosító gént (*ptrA*) (Kubodera és mtsai. 2000) a transzformált *P. chrysogenum* törzsek szelektálásához. PCR technikával egy körülbelül 4400 bázispár hosszúságú génszakaszt szaporítottunk fel a *P. chrysogenum* genomi DNS-éből (5.9. fejezet) az o5pafcomp és o3pafcomp primerpárt alkalmazva. Az így kapott PCR termék tartalmazta a *paf* gént (422bp), valamint a *paf* gén körülbelül 2050 bp hosszúságú 5'- NTR-ját és 1950 bp méretű 3'-NTR-ját. A szóban forgó génszakaszt KpnI restrikciós emésztés után ligáltuk a pSK275 vektorba. Az így kapott plazmidot *E. coli*-ban szaporítottuk fel, majd BglII restrikciós enzimmal linearizáltuk a *paf* 5' NTR-ján. A linearizált plazmid és a Δpaf allél között homológ rekombináció játszódik le a *paf* 5'-NTR szakaszán, $\Delta paf::paf$ lókuszt eredményezve (**10. ábra, A**).



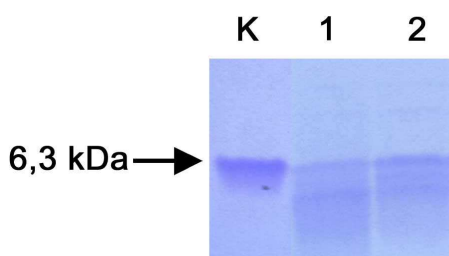
10. ábra. *P. chrysogenum* Δpaf törzs (A) genetikai komplementációja és (B) a $\Delta paf::paf$ törzs vizsgálata Southern-blot analízissel. A, A fehér téglalap a noursheotricin-acetiltranszferáz markergént (*nat1*), a szürke a *paf* gént, míg a fekete téglalap a pyrithiamin-rezisztenciagént (*ptrA*) szimbolizálja. A folytonos vonalak a *paf* gén körülbelül 2 kb méretű 5'-NTR-ját, és 3'-NTR-ját jelölik. A szaggatott vonal a plazmid háttérét szimbolizálja. A nagy X a homológ rekombinációban résztvevő régiót jelöli. A klónozáshoz, illetve a Southern-blot analízishez használt restrikciós emésztési helyeket nyilak mutatják. A Southern analízissel detektálendő génszakaszokat kétvégű nyilakkal tüntettük fel. A *paf* - 5' NTR- specifikus hibridizációs próba pozícióját csillaggal (*) jelöltük. (B) BanI restrikciós enzimmel emésztett genomi DNS Southern blot analízise *paf*-5'-NTR-specifikus digoxigenin próbával hibridizálva. Az 1. oszlop a Δpaf , a 2 oszlop a vad típusú (*vt*), 3. oszlop a $\Delta paf::paf$ törzseket szimbolizálja.

A *P. chrysogenum* Δpaf törzs transzformációját az 5.10. fejezetben ismertett módon hajtottuk végre. A transzformánsok szelektálását pyrithiamin-hydrobromiddal kiegészített minimál táptalajon végeztük (5.10. fejezet). A transzformációs elem Δpaf genomba történő integrálódását Southern hibridizációval (5.11. fejezet) ellenőriztük, melyhez *paf* - 5' NTR-

specifikus digoxigenin jelölt hibridizációs próbát (10. táblázat-5.11. fejezet) állítottunk elő.

A $\Delta paf::paf$ törzs genomja a várt helyspecifikus beépülés mellett, egy Δpaf lókuszon (*paf* 5'-NTR, *nat1*, *paf* 3'-NTR) kívüli beépülést is tartalmaz (10. ábra,B).

A $\Delta paf::paf$ törzs szekretál PAF-ot (11. ábra), amit a törzs 72 órás süllyesztett kultúrájának felülúszójában detektáltunk SDS-PAGE-sel (5.13. fejezet).



11. ábra A PAF termelésének detektálása *P. chrysogenum* Q176 (1) és a $\Delta paf::paf$ (2) törzsek 72 órás rázatott tenyészeiben (5.3.fejezet) SDS - PAGE-sel (5.13. fejezet). Futtatási kontrollként 2 μ g tisztított PAF-ot használtunk fel (K).

Megvizsgáltuk, hogy a $\Delta paf::paf$ törzs sporulációs képessége eléri-e a vad típusét. Ezért létrehoztuk a *P. chrysogenum* $\Delta paf::paf$ és a vad típusú (*P. chrysogenum* Q 176) törzsek szinkronizált felületi tenyészeit és 48 órás inkubációs idő eltelte után meghatároztuk az egységnyi területen termelődött konídiumok számát.

A $\Delta paf::paf$ törzs sporulációs képessége $2,9 \times 10^7 \pm 2,1 \times 10^6$ konídium/cm² volt a vad típus pedig $3,2 \times 10^7 \pm 1,6 \times 10^6$ spórát termelt négyzetcentiméterenként. Így megállapíthatjuk, hogy a Δpaf mutáns genetikai komplementációja helyreállította a *P. chrysogenum* Δpaf törzs csökkent spórázási képességét ($1,4 \times 10^7 \pm 1,9 \times 10^6$ konídium/cm²).

3.7. A PAF hatása a *P. chrysogenum* Δpaf törzs spórázási képességére

Mivel a PAF egy szekretált protein, arra kerestünk választ, hogy a tápagarba juttatott fehérje képes-e helyreállítani a *P. chrysogenum* Δpaf törzs csökkent sporulációs képességét. A kérdés megválaszolására PAF-vel (0, 2, 4, 8, 16, 32 és 64 $\mu\text{g/ml}$) kiegészített MM agaron (5.2. fejezet) vizsgáltuk a *P. chrysogenum* Δpaf mutáns pontleoltásos tenyészeinek (5.3. fejezet) spórázási képességét (5.15. fejezet). Emellett a *P. chrysogenum* Q176 törzs pontoltásos tenyészetét is vizsgáltuk a PAF tápagarhoz adagolása nélkül. Az egységnyi területen termelődött konídiumok számát a 25 °C-on, hat napig inkubált tenyészeteken határoztuk meg.

A Δpaf törzs telepein PAF hozzáadása nélkül a $2,2 \times 10^7 \pm 5,6 \times 10^5$ konídiumot számoltunk cm^2 -enként. Ezt az értéket a tápagarhoz adagolt PAF nem változtatta meg jelentősen, az eltérések kevesebbet mutattak $\pm 12,2\%$ -nál (**6. táblázat**). Mindeközben a *P. chrysogenum* vad típusú törzs spórázási képessége ($7,1 \times 10^7 \pm 2,1 \times 10^6$) $69,0 \pm 0,8\%$ -kal volt magasabb a *paf* deléciós mutáns kezeletlen tenyészetéhez képest.

Megállapíthatjuk, hogy az általunk tesztelt körülmények között a tápagarhoz adagolt PAF hatására jelentős változás nem mutatkozott a *P. chrysogenum* Δpaf törzs spórázóképeségében.

6. táblázat. *P. chrysogenum* Δpaf törzs pontleoltásos^a tenyészeinek spórázási képessége a tápagarhoz adagolt PAF hatására.

A tápagarhoz adagolt PAF (µg/ml)	^b Konídiumok száma /cm ²
0	2,2x10⁷±5,6x10⁵
2	2,1x10 ⁷ ±1,9x10 ⁵ (-5±0,9%)
4	2,2x10 ⁷ ±4,3x10 ⁵ (0±2,0%)
8	2,3x10 ⁷ ±3,8x10 ⁵ (+5±1,7%)
16	2,0x10 ⁷ ±3,8x10 ⁵ (-9±1,7%)
32	2,0x10 ⁷ ±7,0x10 ⁵ (-9±3,2%)
64	2,0x10 ⁷ ±6,5x10 ⁵ (-9±3,0%)

^a Pontleoltással (5.3. fejezet) 10⁵ konídiumot juttantunk MM agar (5.2.fejezet) felszínére. A tenyészeteket 25 °C-on 6 napig inkubáltuk.

^bA Δpaf törzs spórázási képességének %-os eltérése a kezeletlen kontrollhoz képest (100±2,5%) zárójelben van feltüntetve.

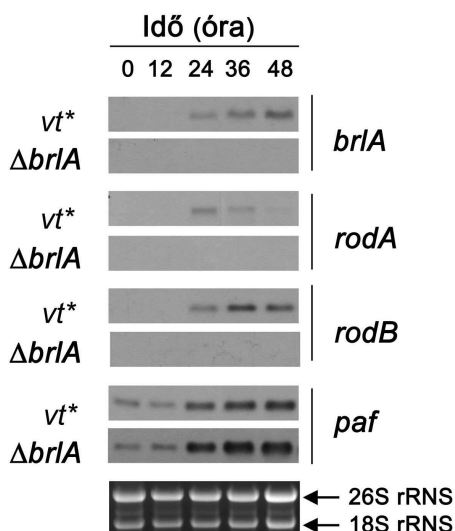
3.8. A *paf* gén expressziójának tanulmányozása a *P. chrysogenum* $\Delta brlA$ törzsben

Általában azok a gének, amelyek BrlA szabályozás alatt állnak, BrlA kötőhelyeket (5'-(C/A)(G/A)AGGG(G/A)-3') tartalmaznak (Chang és Timberlake 1993) a promoter régiójukban. A *paf* gén 5'- NTR régiójának *in silico* analízise feltárt két, vélhető BrlA-kötőhelyet (5'-CAAGGG-3' a -784. bp-nál és 5'-AAAGGG-3' a -1138 bp-nál a start kodonhoz viszonyítva) a *paf* promoter régiójában. Ez felveti annak a lehetőségét, hogy PAF termelődése BrlA szabályozás alatt áll. Ezért megvizsgáljuk a *paf* transzkripció profilját a *P. chrysogenum* $\Delta brlA$ törzsben (Sigl és mtsai. 2010). A $\Delta brlA$ törzset egy *Pcku70* deléziós törzsből hozták létre. A *Pcku70* deléció hatékony homológ rekombinációs képességet eredményez (Hoff és mtsai. 2010b). Itt fontos megjegyezni, hogy a *paf* transzkripciót nem érinti a *Pcku70* gén deléciója, mivel nincs szignifikáns különbség a $\Delta Pcku70$ és a szülői törzs (P2niaD18) *paf* transzkripciója között (microarray adatok - Hoff és mtsai. 2010b). A *P. chrysogenum* $\Delta brlA$ törzs fenotípusa hasonló az *A. nidulans* $\Delta brlA$ törzs megjelenéséhez -„bristle (sörte) fenotípus” (Clutterbuck 1969, Adams és mtsai. 1998), amely nem termel konídiumot (Sigl és mtsai. 2010).

A *paf* transzkripció mintázatát a *P. chrysogenum* $\Delta brlA$ törzs, szinkronizált felületi tenyészeiben (5. 3. fejezet) vizsgáltuk. RNS izolálás (5.7. fejezet) céljából mintát vettünk az előtenyészetből és 12 óránként a felületi kultúrákból. A transzkripció analízisbe (5. 8. fejezet) a *paf* mellett bevontuk a *brlA*, *rodA*, *rodB* sporulációt jelző géneket is.

A vad típusú ($\Delta Pcku70$) törzs Northern blot analízise megerősíti azt a tényt, hogy a *brlA* és a *paf* gének transzkripciója egymáshoz hasonló mintázatot mutat (12. ábra), bár a kapott expressziós mintázat eltér a *P. chrysogenum* Q176 vad típusú törzsnél észleltektől (7. ábra, A- 3.3.2.

fejezet). A $\Delta Pcku70$ törzsben a *brlA* később kezd el expresszálni, a *paf* mRNS pedig már az előtenyésztésben (12. ábra) megjelenik. Ez azzal magyarázható, hogy az alkalmazott kísérleti körülmények között a $\Delta Pcku70$ és a $\Delta brlA$ törzsek kisebb proliferációs rátát értek el, mint a Q176 törzs, ezért előtenyésztésüket hosszabb ideig kellett növeszteniük (19 óra helyett 36 óráig - 5.3.fejezet). Ilyen körülmények között a *paf* már az „előtenyésztés” végén expresszálni kezd (0 óra, 12. ábra). Ez a megfigyelés összhangban van a *P. chrysogenum* Q176 törzs süllyesztett kultúrájának *paf* transzkripciójával (36 óra, 5. ábra - 3. 2. fejezet).



12. ábra. A *brlA*, *rodA*, *rodB* és *paf* génexpresszió Northern blot analízise *P. chrysogenum* $\Delta brlA$ törzsben. Az össz-RNS-t a *P. chrysogenum* $\Delta Pcku70$ (*vt**) és $\Delta brlA$ törzsek 36 órás előtenyésztéseiből (0 óra), valamint a MM agarron (5.2. fejezet) inkubált szinkronizált felületi tenyésztéseiből (5. 3. fejezet) vontuk ki az átoltás után 12, 24, 36 és 48 órával. Blottolás után az RNS-t a megfelelő génspecifikus digoxigenin próbával hibridizáltuk. Az etidium bromiddal festett 26S és 18S riboszómális RNS (rRNS) futtatási kontrollként szolgált.

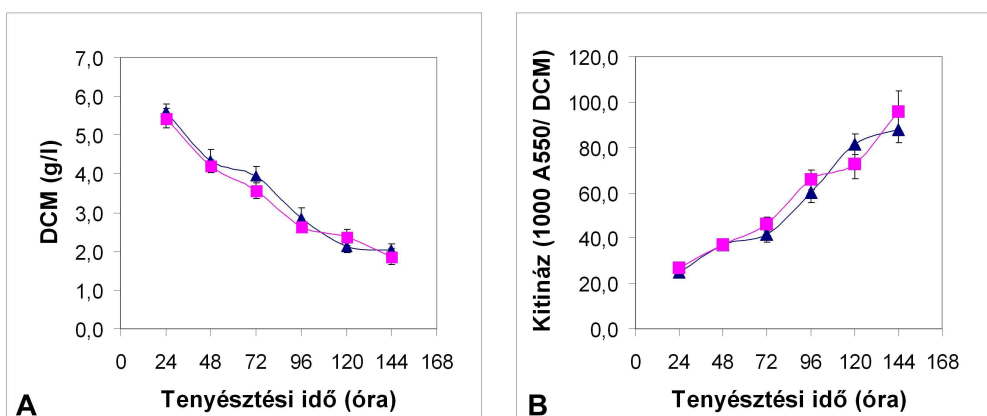
A $\Delta brlA$ törzs felületi tenyészetében a *rodA* és *rodB* gének expressziójával ellentétben, a *paf* gén transzkripciója hasonló volt a vad típusú törzshöz ($\Delta Pcku70$) (12. ábra). Ráadásul, a *paf* kisfokú transzkripció fokozódása figyelhető meg a $\Delta brlA$ törzsben. Ezen expressziós fokozódás precízebb tanulmányozására további vizsgálatokat tervezünk kvantitatív real-time PCR technika felhasználásával.

3.9. Autolízis tanulmányozása a *P. chrysogenum* Δpaf mutáns süllyesztett kultúrájában

A PAF nagy mennyiségben termelődik a *P. chrysogenum* Q176 törzs stacioner fázisú süllyesztett kultúrájában (Marx 2004). Felvetődik a kérdés, hogy van-e hatása a fehérje termelődésének a *P. chrysogenum* autolízisére. Ennek a megválaszolására összehasonlítottuk a *P. chrysogenum* Q176 és Δpaf törzsek süllyesztett tenyészeinek autolítikus sejtpusztulási tendenciáját.

Vizsgálatainkban az autolízist a szénforrás megvonásával indukáltuk úgy, hogy a kultúrákat szénforrást tartalmazó (2 % szacharóz) tápoldaton (MM- 5.2 fejezet) neveltük elő, majd szénforrásmentes MM-ra mostuk és tovább inkubáltuk (5.14. fejezet).

Az autolízis jellemzésére a szénéhező tenyészetek szárazanyag-tartalom (DCM), illetve az autolítikus kitináz aktivitás változását vizsgáltuk (5.14. fejezet). Ezen markerekkel mérhető a leghitelesebben az autolízis, mert kifejezetten a sejtfallebontással kapcsolatosak. A gomba tenyészetek szárazanyag-tartalmának döntő hányadát ugyanis a sejtfal alkotja és ennek a lebontása extracelluláris hidroláztermelést, ezen belül is az autolízissel szorosan kapcsolt kitináz-aktivitást igényel (Sándor és mtsai. 1998, McIntyre és mtsai. 2000, Sámi és mtsai. 2001, Emri és mtsai. 2008).



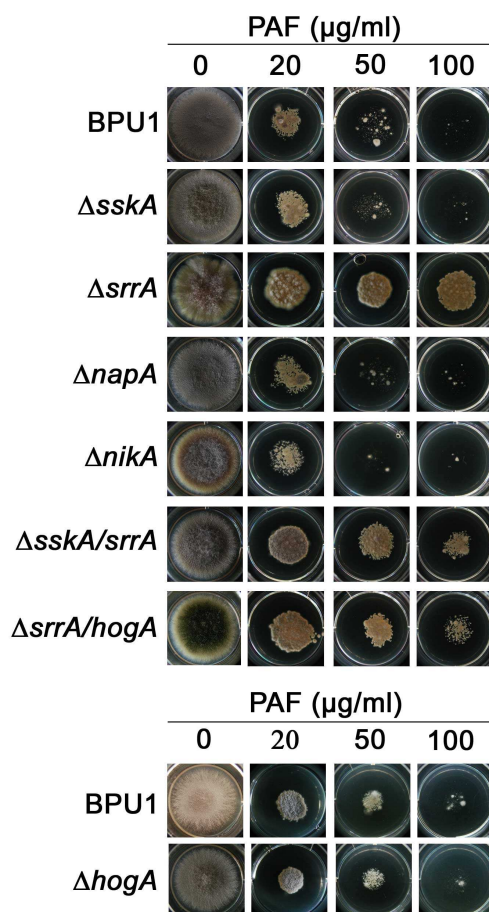
13. ábra. Autolítikus markerek nyomon követése *P. chrysogenum* Q 176 (▲) és *P. chrysogenum* Δpaf (■) törzsek süllyesztett szénéhező tenyészeiben (5.14. fejezet). **(A)** A DCM (szárazanyag-tartalom) változása. **(B)** Az extracelluláris kitináz aktivitás változása.

Eredményeink arról tanúskodnak, hogy nincs szignifikáns különbség sem a *P. chrysogenum* vad típus és Δpaf törzsek szénéhező tenyészeinek szárazanyag-tartalom változása (**13. ábra, A**), sem pedig azok extracelluláris kitináz aktivitás változása között (**13. ábra, B**). Megállapíthatjuk, hogy a két törzs süllyesztett kultúrája egymáshoz hasonló ütemben autolizált. Tehát a PAF termelése nincs hatással a *P. chrysogenum* süllyesztett szénéhező tenyészetének autolízisére.

3.10. A PAF hatásmechanizmusának tanulmányozása

A PAF oxidatív stresszt vált ki *A. nidulans*-ban (2.5. fejezet), ezért azt feltételeztük, hogy aktiválja az SskA HogA, és vagy az SrrA-val kapcsolt stressz jelátviteli rendszerek valamely elemét (2.6. fejezet). Ennek kiderítésére megvizsgáltuk a következő *A. nidulans* mutánsok növekedését PAF kezelés hatására: $\Delta sskA$, $\Delta srrA$, $\Delta napA$, $\Delta nikA$, $\Delta hogA$, $\Delta sskA/srrA$, $\Delta srrA/hogA$. A törzsek spóráit pontoltással (5.3. fejezet) juttatuk a PAF-vel kiegészített (0, 20, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$) CM agar (5.2. fejezet) felületére és 72 órán át 37 °C -on inkubáltuk.

Megállapíthatjuk, hogy a $\Delta sskA$, a $\Delta napA$, a $\Delta nikA$, illetve a $\Delta hogA$ mutánsok növekedése a vizsgált PAF koncentrációkon hasonló volt a kontroll törzshöz (BPU1) (**14. ábrán**). Az *srrA*, *sskA/srrA*, illetve a *srrA/hogA* gén deléciója viszont PAF toleráns fenotípust eredményezett. Ez arra utal, hogy a PAF SrrA-val kapcsolt jelátviteli útvonalon fejti ki hatását.



14. ábra. A PAF hatása az *A. nidulans* stressz jelétviteli útvonalaira. A BPU1-törzset kontrollként használtuk (7. táblázat - 5.2. fejezet). Az *A. nidulans* mutáns törzsek spóráiból pontleotással (5.3. fejezet) 2×10^3 darabot juttattunk CM agar (5.2. fejezet) felületére. A tápagar emelkedő koncentrációkban (0-100 μg/ml) tartalmazott PAF-ot. A telepeket 37 °C-on 72 óráig inkubáltuk 12 lyukú sejtenyésztő lemezen (Nunclon™).

4. Az eredmények megtárgyalása

4.1. A PAF hatása a *P. chrysogenum* növekedésére

A *P. chrysogenum* által termelt kis molekulatömegű, bázikus, ciszteinben gazdag fehérje, a PAF számos humán- és növénypatogén fonalas gomba, valamint az *A. nidulans* modellszervezet növekedését gátolja (Kaiserer és mtsai. 2003, Galgóczy és mtsai. 2005, 2008, Barna és mtsai. 2008, Marx és mtsai. 2008). Megvizsgáltuk a fehérje *P. chrysogenum* növekedésére kifejtett hatását, olyan koncentrációértékeken, amelyek többszörösen (körülbelül 5, 10 és 20-szorosan) meghaladják a PAF termelődési hozamát (körülbelül 10 µg/ml – 3.1. fejezet). A PAF 200 µg/ml koncentrációban adagolva is, csupán körülbelül 28 %-kal csökkentette a *P. chrysogenum* telepek átmérőjét. A kontrollként alkalmazott *A. nidulans* viszont már 50 µg/ml-es PAF-koncentrációt alkalmazva is komoly növekedéskárosodást szenvedett. Körülbelül 70 %-kal kisebb átmérőjű telepeket képzett az agarlemezek felszínén a kezeletlen kontrollhoz képest. Megállapíthatjuk, hogy a termelő organizmus jól tolerálja a PAF-kezelést (4. ábra, 2. táblázat - 3. 1. fejezet).

Kísérleti eredményeink összeegyeztethetőek a Kaiserer és munkatársai (2003) által kapott adatokkal. A munkacsoport mikrotiter lemezen vizsgálta a PAF növekedésgátló hatását. Az általuk alkalmazott 50 µg/ml-es PAF-koncentráció csupán 18,5 %-kal csökkentette a *P. chrysogenum* Q176 tenyészetek növekedését, ugyanakkor az *A. nidulans* tenyészetek növekedése 93,6%-kal csökkent a kezeletlen kontrollhoz viszonyítva.

A PAF-nak a *P. chrysogenum* Q176 növekedésére kifejtett hatása hasonlóságot mutat az AFP fehérje *A. giganteus* gyakorolt hatásával. Az

AFP még 400 µg/ml-es koncentráció esetén sem okozott teljes növekedésgátlást a termelő szervezet rázatott tenyészeiben, ugyanakkor az *A. nidulans* már 200 µg/ml-es AFP-koncentrációt alkalmazva sem képes növekedni (Theis és mtsai. 2003). Agarhígításos tesztet alkalmazva (0-1133 µg/ml-es AFP koncentráció sorozat) sem váltott ki az AFP növekedésgátló hatást az *A. giganteus* tenyszein (Lacadena és mtsai. 1995). Így elmondhatjuk, hogy mindkét antifungális fehérje ellen védelemmel élve az azt termelő fonalas gomba. Megjegyzendő, hogy amíg az *A. giganteus* érzékeny a PAF-ra (Kaiserer és mtsai. 2003), addig a *P. chrysogenum* AFP rezisztens (Lacadena és mtsai. 1995, Theis és mtsai. 2003).

Kísérleti eredményeink összhangban vannak azzal a megfigyeléssel, hogy a *paf* gén deléciója nincs hatással a *P. chrysogenum* növekedésére. A deléció ugyanis nem érintette a pontoltásos felületi tenyészetek telepátmérőjét (3.6.1. fejezet).

4.2. A *paf* gén transzkripciója a *P. chrysogenum* különböző tenyszeiben

A PAF a *P. chrysogenum* Q176 törzs 70-90 órás stationer fázisban lévő sülyesztett tenyészetének fermentlevében mutatható ki a legnagyobb mennyiségben (Marx 2004).

Megvizsgáltuk a *paf* transzkripció mintázatát a *P. chrysogenum* különböző tenyszeiben. A *paf* mRNS már a 36 órás sülyesztett tenyészet micéliumában dektektálható (5. ábra - 3. 2. fejezet), s a transzkripció maximum kb. a 60. óránál figyelhető meg. A *paf* expresszió mintázata hasonló képet mutat az ortológ *A. giganteus* *afp* sülyesztett tenységben mért adatokkal, ahol a transzkripció szintén a tenység 24-48. órájában

kezdődik, s a 70-90 órás stationer fázisú tenyészetben érhető el a legmagasabb fehérjehozam (Meyer és mtsai. 2002, Marx 2004, Meyer 2008).

Ezt követően a gomba felületi tenyészetében vizsgáltuk a *paf* expresszióját és a gomba mitospóra fejlődését. Annak érdekében, hogy szinkronizáltan indukálhassuk a *P. chrysogenum* aszexuális differenciálódási folyamatait, a gomba 19 órás süllyesztett tenyészetét oltottuk át tápagarra. A *P. chrysogenum* exponenciális fázisú rázatott kultúrája mitospórafejlődés szempontjából közel azonos stádiumban van. García-Rico és munkatársai (2008) feltárták, hogy a *P. chrysogenum* süllyesztett tenyészetében az aszexuális differenciálódási folyamatok represszió alatt állnak. Ugyanakkor, a tenyészet 19 órás korban már elérte a differenciálódási képességet (2.1. fejezet), ezért különféle környezeti stimulusokkal (pl. a levegővel való érintkezés) indukálni tudjuk az aszexuális differenciálódási folyamatokat (Adams és munkatársai 1998, Roncal és Ugalde, 2003). Ezért, ha ebből a tenyészetből hozunk létre felületi kultúrát, annak differenciálódási folyamatai a teljes tenyészetre kiterjedően egyszerre (szinkronizáltan) indukálhatók (Adams és mtsai 1998, Mah és mtsai 2006).

Az utóbbi néhány évtizedben igen sok olyan gént és fehérjét azonosítottak, amelyek közvetlenül, vagy közvetve részt vesznek a fonalas gombák sporulációjának szabályozásában (Mirabito és mtsai. 1989, Prade és Timberlake 1994, Adams és mtsai. 1998, Paris és mtsai. 2003, Roncal és Ugalde 2003). Kísérleteinkben a *brlA*, a *rodA* és a *rodB* sporulációt jelző gének detektálásával tanulmányoztuk a *paf* transzkripciója és a sporulációs szabályozás közötti kapcsolatokat a termelő szervezetben.

A *P. chrysogenum* felületi tenyészetének Northern-blot analízise feltárta, hogy a *paf* gén expressziója térben és időben szabályozott a mitospórafejlődés alatt. A *paf* mRNS nem mutatható ki a *P. chrysogenum* konídiumaiban, csupán a differenciálódott tenyészet egyéb részében, a

gombahifákban és/vagy a konidiofórumokban (**6. ábra** - 3.3.1. fejezet). A *paf*, *brlA*, *rodA* és *rodB* gének expressziós profilját vizsgálva kiderült, hogy a négy gén szimultán expresszálódik, jól korrelálva a *P. chrysogenum* tenyészetek mitospórafejlődésével (**7. ábra**- 3.3.2. fejezet).

A *paf* *P. chrysogenum* felületi tenyészetében detektált expressziós mintázata hasonlóságot mutat az ortológ *A. giganteus afp* gén expressziójával (2.4. fejezet), amely az aszexuális sporuláció folyamán, meghatározott fejlődési stádiumokhoz kötve szintén szigorú térbeli és időbeli szabályozás alatt áll (Meyer és mtsai. 2002, Meyer 2008). Az AFP termelődése nagy valószínűséggel a StuA által szabályozott, mivel az *afp* promoter régiója tartalmaz egy StuA-válaszelemet, és az *A. nidulansba* ültetett *afp::lacZ* riporterrendszer represszálódik a *stuA* null mutánsban (Meyer 2008). A StuA a szekunder anyagcsere termelés és az aszexuális sporuláció fontos szabályozója fonalas Ascomycotákban. A *stuA* expressziója már a differenciálódási képességgel rendelkező vegetatív micéliumokban elindul, és a *brlA* valamint az *abaA* gének transzkripcióját szabályozza (Coyle és mtsai. 2007, Twumasi-Boateng és mtsai. 2009b). A *paf* gén 5'- NTR régiójának *in silico* analízise során kiderült, hogy az *afp*-hez hasonlóan a *paf* promoter-régiója is tartalmaz egy vélhető StuA- válaszelemet (5'-CGCGAA-3' a -681. bp-nál nál a start kodonhoz viszonyítva - Dutton és mtsai. 1997). Sigl és munkatársai (2010) részletesen vizsgálták a *P. chrysogenum* penicillin V termelése és az aszexuális sporuláció szabályozása közötti kapcsolatot, ezért létrehozták a *P. chrysogenum* $\Delta stuA$ és $\Delta brlA$ mutáns törzseket. Nemrégiben közölt munkájuk feltárta, hogy a StuA esszenciális a penicillin V termeléséhez, de a BrlA nincs hatással annak szabályozására. A $\Delta stuA$ és $\Delta brlA$ törzsek microarray analízise szerint a *paf* gén szabályozásában egyik transzkripciós faktor sem vesz részt (Sigl és mtsai. 2010).

A *P. chrysogenum* szekunder metabolit termelésének, és konidiogenezisének másik központi szabályozója az úgynevezett velvet-komplex, melynek fontos komponsei a PcVelA, PcVelB és a PcLaeA. A Hoff és munkatársai (2010a) által végzett $\Delta PcvelA$, illetve $\Delta PclaeA$ törzsek microarray analízise feltárta, hogy a *paf* gén expressziója erős PcVelA szabályozás alatt áll. Az adatok szerint a *paf* gén expressziója erősen visszaszorul $\Delta PcvelA$ mutánsban, de érintetlen marad a $\Delta PclaeA$ törzsben. Bár a kapott microarray adatok megerősítése Northern-blot analízissel fontos jövőbeni feladat, annak a lehetősége, hogy a *paf* expressziójának szabályozásában olyan regulátor vehet részt, mint a PcVelA, alátámasztja eredményeinket, és azt sugallja, hogy a PAF termelésének szabályozása kapcsolatban áll a *P. chrysogenum* mitospóra fejlődésével, illetve felveti annak a lehetőségét is, hogy a PAF hatással lehet arra.

4.3. A *paf* deléció hatása a *P. chrysogenum* konidiogenezisére

A PAF termelő szervezetben betöltött élettani szerepének tanulmányozására, létrehoztunk egy *paf* deléciós mutánt *P. chrysogenum* Q176 törzsben (**8. ábra** - 3. 4. fejezet). A Δpaf törzsben a *brlA*, a *rodA* és a *rodB* gének expressziós mintázata szignifikánsan eltért a vad típusban detektáltaktól. A sporulációt jelző gének transzkripciója repressziót mutatott a Δpaf törzsben, amely együtt járt a törzs spórázási képességének szembetűnő gyengülésével is (**4. táblázat, 9. ábra, 5. táblázat** - 3.6.1. fejezet). Itt fontos megjegyezni, hogy a deléció nem érintette a törzs vegetatív növekedését (3.6.1. fejezet) és a csírázási képességét (**3. táblázat** - 3.5. fejezet). A Δpaf törzs csökkent mértékű konídium termelését sikeresen komplementálta a deletált gén visszaültetése a hiánymutáns genomjába (3.6.2. fejezet).

Ugyanakkor a tápagarhoz adagolt PAF-vel nem voltunk képesek helyreállítani a vad fenotípust a Δpaf törzsben (6. táblázat - 3. 7. fejezet). Erre egy lehetséges magyarázat az, hogy a gombák mitospóra fejlődése olyannyira pontosan szabályozott folyamat - befolyásolja a tápanyag-ellátottság, a sejtciklus, a tenyészet kora, a jelátviteli kaszkádok együttműködési képessége (Adams és mtsai. 1998, Roncal és Ugalde 2003) – hogy az adott kísérleti feltételek mellett, a tápagarhoz adagolt PAF nem bizonyult hatékonynak. A másik lehetséges magyarázat a PAF fehérje redoxállapot-változásában rejlik. A PAF diszulfidhidakat képező ciszteinjei kiváló lehetőséget szolgáltatnak egy redox állapottól függő konformáció változásra, amely felléphet akár a szekréció folyamán is. A PAF térszerkezetének a megváltozása befolyásolhatja a fehérje aktivitását. (Batta és mtsai. 2009). A redox állapottól függő aktivitás-növekedés/-csökkenés nem ismeretlen a konidiogenezist szabályozó endogén faktorok körében, pl. a *Penicillium cyclopium* által termelt sporulációt indukáló diterpén (konidiogenol) oxidatív transzformációt igényel az aktív forma (konidiogenon) kialakulásához (Roncal és mtsai. 2002). Az éretlen PAF a szignálszekvencián kívül tartalmaz egy N-terminális pro-szekvenciát, amelynek „intracelluláris chaperon” funkció tulajdonítható, s ennek szekréció alatti lehasítása után nyeri el a fehérje a jellegzetes térszerkezetét és aktivitását (Marx és mtsai. 2005). Ugyanakkor nem zárható ki, hogy maga a proszekvencia is közvetíthet jelet.

Eredményeink arról tanúskodnak, hogy a PAF termelése növeli a *P. chrysogenum* spórázási képességét a *brlA* (ezen keresztül a *rodA* és *rodB*) expressziójának a fokozásával. Ugyanakkor, a *paf* gén promoter régiója tartalmaz BrlA kötőhelyeket (Chang és Timberlake 1993), ami felveti annak a lehetőségét, hogy a *paf* transzkripciója BrlA-szabályozás alatt áll. A *P. chrysogenum* $\Delta brlA$ törzs microarray analízise szerint a *paf* expressziója a

BrlA-tól függetlennek bizonyult (Sigl és mtsai. 2010). Várakozásainkkal ellentétben a *pafl* expressziójának Northern blot analízise a gén kisfokú transzkripció fokozódására világít rá a *P. chrysogenum* $\Delta brlA$ törzsben, amely utalhat arra, hogy a gén bizonyos fokú BrlA represszió alatt áll (12. ábra - 3. 8. fejezet). Ennek a precízebb tanulmányozására további vizsgálatokat tervezünk kvantitatív real-time PCR technika felhasználásával a *P. chrysogenum* $\Delta brlA$ törzsben.

Bár a fonalas gombák aszexuális sporulációját szabályozó molekuláris mechanizmusokat behatóan tanulmányozták az elmúlt évtizedekben (Springer 1993, Adams és mtsai. 1998, Roncal és Ugalde 2003), a sporulációt serkentő tényezőkről még keveset tudunk. A hifák levegővel való érintkezésén (Morton 1961) kívül az éhezést (Skromne és mtsai. 1995), a fényt (Mooney és Yager 1990), a nagy ozmolaritást (Alex és mtsai. 1996, Virginia és mtsai. 2000) tartják a legfontosabb spórázást serkentő folyamatoknak. Ezek mellett endogén extracelluláris molekulák is modulálhatják a fonalas gombák aszexuális sporulációját. Például az *A. nidulans* által termelt eddig még nem azonosított „extracelluláris faktor” (ECF) fontos szerepet tölt be a termelő szervezet sporulációjának indukálásában. Az ECF termelődését a FluG fehérje szabályozza (Lee és Adams 1994, Adams és mtsai. 1998). A gomba eredetű, szintén szekretált oxilipinek a szexuális és aszexuális folyamatokat egyaránt szabályozzák (Champe és el-Zayat 1989, Tsitsigiannis és mtsai. 2004, Tsitsigiannis és Keller 2007). A már említett, *P. cyclopium* által termelt konidiogén (Roncal és mtsai. 2002) felfedezése is arra utal, hogy az endogén, extracelluláris spórázást serkentő faktorok elterjedtek a gombavilágban.

4.4. A PAF termelése nincs hatással a *P. chrysogenum* sülyesztett kultúrájának autolízisére

Az *A. nidulans* fonalas gombában a sporuláció a szabályozását és a funkcióját tekintve is szorosan kapcsolódik az autolízishez. A BrIA mindkét folyamat szabályozásában résztvesz (Emri és mtsai. 2008, Pócsi és mtsai. 2009, Szilágyi és mtsai. 2010). Feltehetőleg az autolízis egyik legfontosabb feladata, hogy a szénéhező tenyészetekben lehetővé tegye a sejtek anyagainak újrahasznosítását, és ezáltal segítse a konidiogenezist a tartalék tápanyagok elfogyását követően is (Skromne és mtsai. 1995, Emri és mtsai. 2008). Megvizsgáltuk a *paf* delécio hatását a *P. chrysogenum* sülyesztett tenyészeinek autolitikus sejtpusztulási folyamataira. Arra kerestünk választ, hogy a PAF termelődésése fokozza-e a *P. chrysogenum* folyadék kultúrájának autolitikus sejtpusztulási folyamatait.

Vizsgálatainkban a *P. chrysogenum* vad típusú és Δpaf törzsek szénéhező, folyadék kultúrái egymáshoz hasonló ütemben autolizáltak (**13. ábra** - 3.9. fejezet), ami arra utal, hogy a PAF termelődése nem játszik szerepet a sülyesztett tenyészet autolízisének a szabályozásában. Azt feltételezzük, hogy a PAF termelésének élettani szerepe felületi tenyészetekre korlátozódik, ahol megfelelő környezeti szignálok hatására a termelő szervezet differenciálódási folyamatai is érvényesülnek.

4.5. A PAF SrrA-val kapcsolt jelátviteli rendszeren keresztül fejt ki antifungális hatását

A PAF termelése a differenciálódási folyamatok serkentésével kétségtelenül szelekciós előnyhöz juttatja a *P. chrysogenumot*, hatékony

propagációs mechanizmust biztosítva a termelő szervezet számára. Ugyanakkor, nem szabad figyelmen kívül hagyni a PAF antibiózisban betöltött szerepét, amely fontos fegyvernek bizonyulhat az élőlények természetes kiválasztódását eredményező versenyben (Marx 2004). A PAF-ra érzékeny *A. nidulans*-ban a fehérje már mikromólos koncentrációban oxidatív stresszt vált ki, illetve apoptózist indukál (Kaiserer és mtsai. 2003, Leiter és mtsai. 2005).

Az *A. nidulans* stresszválaszának szabályozásában központi szerepet játszik az SskB-PbsB-HogA/SakA mitogén aktivált protein kináz rendszer (Kawasaki és mtsai. 2002, Furukawa és mtsai. 2005, Hagiwara és mtsai. 2009a, Miskei és mtsai. 2009). A rendszerhez a stresszignálok jelentős része (oxidatív-, ozmotikus- és fungicidstressz) a NikA-SskA-YpdA hisztidin-aszpartát foszforelén (Hagiwara és mtsai. 2007a, 2007b, 2009b, Vargas-Pérez és mtsai. 2007) keresztül érkezik (**3. ábra** – 2.6. fejezet). A HogA/SakA kináz transzkripció faktorokat aktivál, melyek közül az AtfA egy globális stresszválasz szabályozó elem (Hagiwara és mtsai. 2008, Balázs és mtsai. 2010). Az SskA mellett az SrrA szintén részt vesz az oxidatív ozmotikus, valamint a fungicid-stressz közvetítésében (Hagiwara és mtsai. 2007a, 2011, Vargas-Pérez és mtsai. 2007). Az AtfA mellett a NapA transzkripció faktor is fontos szerepet játszik az oxidatív stresszválasz szabályozásában (Asano és mtsai. 2007). A legújabb kutatási eredmények szerint a NapA az SrrA-val komplexet alkotva stimulálhatja az SrrA működését a hisztidin aszpartát foszforelétől független úton (Hagiwara és mtsai. 2011). Mivel a PAF oxidatív stresszt vált ki *A. nidulans*-ban, azt feltételeztük, hogy aktiválja az SskA-HogA/SakA- és/vagy az SrrA-val kapcsolt jelátviteli útonalakat.

Az *A. nidulans* $\Delta sskA$, $\Delta srrA$, $\Delta napA$, $\Delta nikA$, $\Delta hogA$, $\Delta sskA/srrA$, $\Delta srrA/hogA$ törzsek közül csak a $\Delta srrA$, a $\Delta sskA/srrA$ illetve a $\Delta srrA/hogA$ mutánsok mutattak PAF-toleráns fenotípust a többi mutáns a kontroll

törzshöz (BPU1) hasonlóan növekedett (**14. ábrán** - 3. 10. fejezet). Ezért azt feltételezzük, hogy a PAF SrrA-val kapcsolt jelátviteli rendszeren keresztül fejt ki antifungális hatását a NikA-SskA foszforelé, illetve a HogA/SakA mitogén aktivált protein kináz rendszer közreműködése nélkül.

A szóban forgó stressz jelátviteli útvonalak vizsgálatába eddig bevont fungicidek (az iprodion és a fludioxonil) a NikA-SskA-HogA és a NikA-SrrA rendszerek aktiválásán keresztül fejtik ki antifungális hatásukat. Ennek megfelelően, $\Delta nikA$, a $\Delta sskA/srrA$ illetve a $\Delta srrA/hogA$ mutánsok jól tolerálták az iprodion és fludioxonil kezelést (Hagiwara és mtsai. 2007b).

Az *A. nidulans* genomja több (15 db) hisztidin kinázt is tartalmaz, ezért az SrrA foszforilációjában a NikA-tól eltérő hisztidinkináz (szenzor) is közreműködhet (Hagiwara és mtsai. 2009b). Egy másik lehetőség a PAF szignál közvetítésére, hogy az SrrA, a foszforelé komponensektől függetlenül kap jelet, ahogyan azt a H_2O_2 által kiváltott stressz esetén is feltételezik (**3. ábra** - 2. 6. fejezet)(Vargas-Pérez és mtsai. 2007).

Fontos megjegyezni, hogy sem a NapA (**14. ábra** - 3. 10. fejezet), sem pedig az AtfA (Balázs és mtsai. 2010) transzkripciós faktor nem vett részt a PAF-ra adott stresszválasz kialakításában, ami szintén közreműködhet a fehérje citotoxicitásában.

Kísérleteink jól példázzák, hogy a PAF ígéretes eszköze lehet a sejthalál szignálok feltérképezésének (**3. ábra** – 2. 6. fejezet), valamint új antifungális szerek kifejlesztésének. A PAF antifungális hatása a hatékonyabb konídium-termeléssel kombinálva, ugyanakkor elősegíti a *P. chrysogenum* alkalmazkodóképességét a változó környezeti feltételekhez, ökológiai előnyt biztosítva a konkurens mikroorganizmusokkal szemben.

5. Anyagok és módszerek

5.1. Gének és fehérjék jelölése a különböző fajokban

A gének általánosan elfogadott írásmódja a három kisbetű és egy szám vagy nagybetű, melyek dőlt írásmódban vannak (pl.: *abc1*).

A fehérjék esetében a legelfogadottabb mód a nem dőlt jelölésű, megfelelő génnévvel azonos elnevezés, ahol az első betű mindenképp nagy (pl.: *Abc1*).

A mutánsokat dőlt génnévvel írjuk, ahol minden betű kicsi (pl.: *abc1*), miközben egyértelművé tesszük a szövegben, hogy mutánsról és nem génnévről van szó.

5.2. A dolgozatban vizsgált törzsek és alkalmazott tápközegek

A genetikai munkában a klónozási kísérleteknél *Escherichia coli* **DH5α** törzset használtunk.

A *paf* deléciós mutáns létrehozásához a *Penicillium chrysogenum* **Q176 (ATCC 10002)** törzset használtunk vad típusként (vt).

A *Penicillium chrysogenum* Δ *brlA* (*niaD*, *Pcku70::nat1*, *brlA::ergA*) mutáns (Sigl és mtsai. 2010) (Sandoz GmbH törzsgyűjtemény, Kundl, Austria) szülői törzse egy hatékony homológ rekombinációt elősegítő *Penicillium chrysogenum* Δ *Pcku70* (*niaD*, *Pcku70::nat1*) (Hoff és mtsai. 2010b) törzs volt.

A PAF hatását a *P. chrysogenum* növekedésére az *Aspergillus nidulans* **FGSC 4A** (Glasgow vad-típus) kontroll törzs felhasználásával tanulmányoztuk.

A PAF hatásmechanizmusát az alábbi ***A. nidulans*** mutáns törzseken vizsgáltuk (7. táblázat). A mutánsokat Daisuke Hagiwara (Tohoku University, Japan) biztosította számunkra.

7. táblázat. *A. nidulans* stressz jelátviteli útvonalban sérült mutáns törzsek

Törzs	Genotípus	Forrás
ABPU1 (vad típus)	<i>biA1, pyrG89, wA3, argB2, pyroA4</i>	(Hagiwara és mtsai. 2007a)
BPU1 (kontroll)	<i>biA1, pyrG89, wA3, argB2, pyroA4, argB+</i>	(Hagiwara és mtsai. 2007a)
Δ <i>sskA</i>	<i>biA1, pyrG89, wA3, argB2, pyroA4, sskA::argB</i>	(Hagiwara és mtsai. 2007a)
Δ <i>srrA</i>	<i>biA1, pyrG89, wA3, argB2, pyroA4, srrA::argB</i>	(Hagiwara és mtsai. 2007a)
Δ <i>napA</i>	<i>biA1, pyrG89, wA3, argB2, pyroA4, napA::argB</i>	(Asano és mtsai. 2007)
Δ <i>nikA</i>	<i>biA1, pyrG89, wA3, argB2, pyroA4, nikA::argB</i>	(Hagiwara és mtsai. 2007b)
Δ <i>hogA</i>	<i>biA1, pyrG89, wA3, argB2, pyroA4, hogA::argB</i>	(Hagiwara és mtsai. 2007b)
Δ <i>sskA/srrA</i>	<i>biA1, pyrG89, wA3, argB2, pyroA4, sskA::argB, srrA::argB</i>	(Hagiwara és mtsai. 2007a)
Δ <i>srrA/hogA</i>	<i>biA1, pyrG89, wA3, argB2, pyroA4, srrA::argB, hogA::argB</i>	(Hagiwara és mtsai. 2007b)

Az *E. coli*-t **LB** (10g/l tripton, 5g/l élesztőkivonat, 10g/l NaCl, pH 7,0) táptalajon tartottuk fenn.

A minimál tápagaron felnövesztett gomba törzseket 4 °C-on tároltuk és a kísérleteinkhez az 1 hétnél nem öregebb tenyészetek spóráit használtuk fel.

P. chrysogenum törzsek esetén a minimál táptalajt (**MM**) Marx és munkatársai (1995) nyomán készítettük el, melynek összetétele a következő volt: 3 g/l NaNO₃, 0,5 g/l KCl, 0,5 g/l MgSO₄·7H₂O, 0,1g FeSO₄·7H₂O, 20g/l szaharóz, 25 mM foszfát-pufferben (KHPO₄) pH 5,8. A *P. chrysogenum* Δ*Pcku70* valamint a Δ*brlA* törzsek esetében a MM-t 2,5 g/l argininnel egészítettük ki, mivel ezen törzsek nitrát-reduktáz (*niaD*) génje mutációt hordoz.

A PAF, *P. chrysogenum* Q176 törzs növekedésére kifejtett hatását és a fehérje hatásmechanizmusát komplex táptalaj (**CM**) (Kaiserer és mtsai. 2003) felhasználásával tanulmányoztuk. A táptalaj összetétele: 20g/l glükóz, 2g/l pepton, 1g/l élesztő kivonat, 1g/l N-Z- amin 2 % (v/v) „sóoldat”, 0,1 % (v/v) nyomelem oldat, pH 6,5. A „sóoldat” (50x) összetétele a következő volt: 76g/l KH₂PO₄, 26g/l KCl, 26g/l MgSO₄·7H₂O. A **nyomelem oldat** összetétele: 8 g/l ZnSO₄·7H₂O, 0,4 g/l CuSO₄·5H₂O, 0,714 g/l MnSO₄·H₂O, 0,04 g/l Na₂B₄O₇·10H₂O, 0,8 g/l Na₂MoO₄·2H₂O, 1,4 g/l FeSO₄·7H₂O volt. Az *A. nidulans* stressz jelátviteli útvonalban sérült mutáns törzsek esetén a táptalajt 0,61 g/l uridinnel, 0,56 g/l uracillal 2,5 mg/l pyridoxinnal és 1 mg/l biotinnal egészítettünk ki.

5.3. Tenyésztési körülmények

P. chrysogenum **süllyesztett tenyészetét** úgy hoztuk létre, hogy a MM (5.2. fejezet) 200 ml-ét 6×10^8 spórával oltottuk be és a tenyészeteket rázóinkubátorban 25 °C-on 220 rpm-en rázattuk. A *P. chrysogenum* $\Delta brlA$ mutáns nem képez konídiumokat, ezért süllyesztett kultúráját úgy hoztuk létre, hogy a 200 ml (argininnel kiegészített) minimál tápoldatba 2 g (félszáraz tömeg) micéliumot mértünk, amelyet Petri csészén fenntartott 4 napos $\Delta brlA$ -tenyészetről nyertünk steril szike segítségével. A tenyészeteket rázóinkubátorban 25 °C-on 220 rpm-en rázattuk.

Annak érdekében, hogy az aszexuális differenciálódási folyamatokat szinkronizáltan indukálhassuk (Mah és Yu 2006) *P. chrysogenumban*, a gomba süllyesztett kultúráját 19 óráig (*P. chrysogenum* $\Delta Pcku70$ és $\Delta brlA$ törzsek esetén az alacsonyabb növekedési ráta miatt 36 óráig) rázattuk. Ezt követően a tenyészetet szűrtük és MM tápagar (5.2. fejezet) felületén egyenletesen eloszlattuk, majd 25 °C-on inkubáltuk. A micélium begyűjtésének elősegítésére a tápagart előzőleg steril dialízis-membránnal (Spectra/Por4 – 12-14 kD MWCO Spectrumbiolabs-Németország) borítottuk. Az így létrehozott felületi tenyészeteket **szinkronizált felületi tenyészetnek** nevezzük a dolgozatban.

A **pontoltásos** kísérletekhez a megfelelő tenyészetek frissen termelődött spóráit „spóramosó oldat” (9 g/l NaCl, 0,01 % (v/v) Tween 80) segítségével gyűjtöttük be. Az így kapott spóraszuszpenziót háromszor mostuk (centrifugálás 2700 rpm, 7 perc, 22 °C), hogy megszabaduljunk az esetleges agar- vagy micélium-törmelékektől. A pontoltáshoz 5 μ l

spóraszuszpenziót pipettáztunk a megfelelő tápagar felületére. A spóraszuszpenzió a kísérletektől függően 10^5 , 10^4 illetve 2×10^3 gombaspórát tartalmazott. A keletkezett cseppet hagytuk megszáradni, majd megfelelő hőmérsékleten inkubáltuk.

5.4. A molekuláris biológiai munka során felhasznált oldatok, plazmidok, és primerek

DNS izolációs puffer: Tris-HCl (7,8 g/l pH 8), NaCl (14,6 g/l), EDTA (29,2 g/l) SDS (50 g/l).

Lízispuffer: 0,7 M KCl, 50mM KHPO₄ pufferben pH 5,8

KCM oldat: 52,2g/ KCl, 8 g/l CaCl₂, 2 g/l MOPS pH 5,8

PCM oldat: 500g/l PEG 8000, 8g/l CaCl₂, 2 g/l MOPS pH 5,8

A *P. chrysogenum paf* deléciós transzformáló elem létrehozásához a **pDnat1**- plazmidot (Kück 2006) használtuk fel, amelyet Ulrich Kück (Bochum, Germany) bocsátott rendelkezésünkre. A plazmid nourseothricin rezisztenciát biztosító nourseothricin acetyltranszferáz (*nat1* - Krügel és mtsai. 1993) markergént hordoz.

A *P. chrysogenum paf* deléció genetikai komplementációjához a **pSK275**-plazmidot (Krappmann és mtsai. 2006) használtuk fel, amely Sven Krappmann (Göttingen, Németország) kutatóintézetéből származik. A plazmid pyrithiamin rezisztenciát biztosító markergént (*ptrA* - Kubodera és mtsai. 2000) hordoz.

8. táblázat. A dolgozatban felhasznált primerek

primer	szekvencia (5' → 3')
opaf1	GGTACCATCGCCCAAATCACCACAGTTG
opafrev	GATCGGATCCCTAGTCACAATCGACAGC
obrlAfw	TCCTACTCCCACGCCTAC
obrlArev	CCTGGCTCCTTGCACTTG
orodAfw	CTTACGCTCTTCCCCCTG
orodArev	GCTGGAAGGAGAGTTCTGG
orodBfw	ATGCAGTTCACCTCTCTCCG
orodBrev	ACGAGGTCGTTGTTGGCC
opaf5	CGAAAAGGCAAAGGCAC
o5pafA1	CGATGCTACGTCACCTTGTTAGCG
o5pafArev	ACGTGGATCCTATGAAGGGCTTGAGATGATG
o3pafAse	ACGTGTCGACATGGTCTCTGCGATCACCAGG
o3pafA2	CACAACCTTACGCATGCGGAG
o3pafArev	ACGTTCTAGACCAAAGGCTTCCCCGTCATC
o5pafAse	ACGTGGTACCGACAGCTTAGTGGACCGGCAG
o5pafcomp	GATGGTACCACTTGCGTAATAACCGGG
o3pafcomp	CACGGTACCCTTCCTTGACTTACTCCC
onat1	CGCCGGTACGCGTGGATCGC
onat2	AGGCACTGGATGGGTCCTTCAC

A felhasznált primereket a Microsynth (Ausztria) biztosította számunkra.

5.5. Alapvető DNS módszerek

Az alapvető DNS módszereket Sambrook és munkatársai (1989) nyomán alkalmaztuk. A DNS mintákat agaróz gélen (0,8 – 1 % agaróz 1x TBE pufferben) ellenőriztük gélelektroforézissel. A restrikciós emésztéseket és ligálásokat a gyártó (Promega) javaslatai alapján végeztük. A nukleinsav koncentrációkat a Pharmacia Biotech Gene Quant II spektrofotométerrel határoztuk meg.

A tanulmány során többféle PCR (polimeráz láncreakció) reakcióparamétert használtunk. Az alkalmazott primereket a **8. táblázat** (5.4. fejezet) foglalja össze. Minden reakcióban a primerpárok gyártó által megadott T_m -jét vettük figyelembe, és ha körülbelül azonosak voltak, akkor $T_m - 3$ °C-on volt a kapcsolási hőmérséklet. Bizonyos esetekben a primerpárok között több °C-os különbség is volt, ilyenkor ilyenkor egy köztes megoldást kerestünk. Valamennyi esetben a *pfu* DNS polimeráz rendszert (promega) használtuk 500-1000 ng templátot alkalmazva. A reakciókhoz az Eppendorf Mastercycler personal készüléket használtuk.

PCR reakció paraméterei:

1. lépés: 94 °C 1'
2. lépés: 30 ciklus – 94 °C 30'', primer $T_m - 5$ °C 30'', 72 °C 0,5-4' (az amplikon méretétől függően)
3. lépés: 72°C 5'

Reakcióelegy összetétele:

5 µl *pfu* DNS polimeráz puffer $MgCl_2$ -dal, 2 µl 10mM dNTP, 1 µl templát (~1µg DNS), 2-2 µl 10 µM forward és reverse primer, 1 µl *pfu* DNS polimeráz a 37 µl DNáz mentes víz.

Felhasználásig -20 °C-on tároltuk a mintákat.

5.6. Baktériumsejtek transzformálása, plazmid DNS preparálása

Az *E. coli* DH5 α sejtek transzformálása, valamint a plazmid DNS preparálása Sambrook és munkatásai (1989) szerint történt:

Baktériumsejtek transzformálása:

Fagyasztva tárolt (-80°C) 200 μl térfogatú Ca-kompetens sejtet jégen felolvasztottunk, majd 10 μl ligátumot adtunk hozzá. Inkubálás után (20 perc, jégen) 1 percig 42°C -on tartottuk (hősokk) majd 0,5 ml LB (5.2. fejezet) hozzáadását követően 37°C -on 1 órán keresztül rázattuk. A sejteket ampicillin tartalmú (100 $\mu\text{g/ml}$) LB táptalajra szélesztettük.

A plazmid DNS preparálása az alábbi módon történt:

Az ampicillin tartalmú (50 $\mu\text{g/ml}$) LB tápoldatban (5.2. fejezet) nevelt transzformáns baktérium sejteket centrifugáltuk (6000 rpm, 5 perc), majd a tápoldat eltávolítása után a sejteket 300 μl P1 (50 mM Tris/HCl, 10 mM EDTA, 0,5 mg/ml RN-áz pH 8) oldatban szuszpendáltuk. A mintákhoz 300 μl P2 (0,2 M NaOH, 1% SDS) oldatot adtunk, majd 5 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk. A sejtek szétesését követően a fehérjék 300 μl P3 (2,5 M K-acetát pH 4,8) oldat hozzáadásával kicsapódnak (15 perc, jégen), így centrifugálással ülepíthetők (12000 rpm, 10 perc). A minták felülúszójából a plazmid DNS alkoholos tisztítást és szárítást követően vízben oldható volt.

5.7. RNS izolálása különböző gombaképletekből

RNS kivonáshoz *P. chrysogenum* fagyasztott (- 80 °C) micéliumát, vagy tisztított spóráit használtuk fel. Spórák esetében úgy jártunk el, hogy a tenyészetekről frissen lemosott konídiumokat nylon-filteren (40 µm, BD Biosciences) szűrtük, hogy megszabaduljunk az esetleges micéliumtörmelékektől. Ezt követően centrifugálással (2700 rpm, 7 perc, 4 °C) koncentráltuk, és azonnal elvégeztük az RNS izolálást.

Az RNS kivonását Chomczynski (1993) leírása alapján hajtottuk végre az alábbiak szerint. A TRISOL (Sigma-Aldrich) reagenst a folyékony nitrogénben eldörzsölt gombaképletekhez adtuk (1 ml reages/ ~ 0,5 g porított minta). Centrifugálás (14000 rpm, 10 perc, 4 °C) után a felülúszót 200 µl kloroformmal ráztuk össze, szobahőmérsékleten 15 percig inkubáltuk és újra centrifugáltuk. A színtelen felső (vizes) fázishoz egyenlő térfogatú PCI-t (fenol/kloroform/izoamil alkohol, 25:24:1) kevertünk, majd centrifugáltuk (14000 rpm, 10 perc, 4 °C). Ezt a lépést megismételtük kloroformmal is. Az így kapott felülúszóhoz 250 µl 0,8 M Na-citrát/1,2 M NaCl oldatot, valamint 250 µl izopropanolt adtunk és 10 perces inkubáció (22 °C) után centrifugáltuk (14000 rpm, 10 perc, 4 °C). Az RNS pelletet 70%-os etanollal mostuk (centrifugálás: 14000 rpm, 5 perc, 4 °C). A megszáradt pelletet ribonukleáz-mentes vízben feloldottuk. A minták RNS koncentrációját és tisztaságát spektrofotométerrel határoztuk meg ($\lambda=260/280$).

5.8. Génexpressziós vizsgálatok Northern blot analízissel

Az elektroforézist és a Northern blot analízist Sambrook és munkatársai (1989) nyomán végeztük úgy, hogy 10 µg *P. chrysogenum* RNS mintát szeparáltunk 1,2 % agaróz – 2,2 M formaldehid tartalmú gélen. Ezt blottoltuk Hybond-N⁺ (Amersham Bioscience) membránra, és digoxigenin-jelölt próbákkal hibridizáltuk. A hibridizációs próbákat PCR amplifikációval állítottuk elő (5.5. fejezet) digoxigenin jelölt dNTP (Boehringer Mannheim) és a **9. táblázat**ban szemléltetett primerpárokat használva. A detektáláshoz anti-digoxigenin- alkalikus foszfatázt (Roche) és CSPD kemilumineszcens szubsztrátot (Roche) használtunk fel, és a gyártó ajánlása szerint jártunk el.

9. táblázat. A Northern hibridizációban alkalmazott próbák és az előállításukhoz felhasznált primerek

Primer pár ^a	Gén	A gén lókuszt azonosító száma
opaf1- opafrev	<i>paf</i>	AM920439
obrlAfw - obrlArev	<i>brlA</i>	AM920421
orodAfw - orodarev	<i>rodA</i>	AM920437
orodBfw - orodBrev	<i>rodB</i>	AM920436

^a Az primerek szekvenciáit a **8. táblázat** tartalmazza (5.4. fejezet)

5.9. *P. chrysogenum* genom DNS izolálása

P. chrysogenum genom DNS izolálását Zadra és munkatársai (2000) szerint hajtottuk végre. A gomba 48 órás süllyesztett kultúráját szűrtük, a micéliumot desztillált vízzel átmostuk, folyékony nitrogénben fagyasztottuk, és mozsártörővel porítottuk. Az így előkészített micélium kb. 0,5 g -ját mikrocentrifuga csőbe helyeztük, amelyhez 700 µl DNS izolációs puffert (5.4. fejezet), 300 µl PCI-t (fenol:kloroform:izoamilalkohol; 25:24:1) és 1 db volfrám-acél golyót adtunk. A mintákat 4 percig 15 Hz, majd 30 másodpercig 20 Hz frekvencián homogenizáltuk (Mixer Mill; Retsch MM 300). Centrifugálás (14000 rpm, 10 perc, 22 °C) után a felülúszóhoz 20 µl ribonukleáz A oldatot (10mg/ml) adtunk és előbb 15 percig 65 °C-on, majd 30 percig- 37 °C-on inkubáltuk. Inkubáció után 1/3 térfogatnyi PCI (fenol/kloroform/izoamil alkohol, 25:24:1) hozzáadása után vortexeltük és centrifugáltuk (14000 rpm, 10 perc, 22 °C). A felülúszóhoz most 1/3 térfogatnyi kloroformot adtunk és az előző lépés szerint centrifugáltuk. A felülúszót azonos térfogatú izopropanollal szobahőmérsékleten 30 percig inkubáltuk. Centrifugálást (14000 rpm, 10 perc, 22 °C) követően óvatosan eltávolítottuk a felülúszót a pelletről, és 100 µl 70 %-os etanollal mostuk (centrifugálás 14000 rpm, 10 perc, 4 °C). Az etanol elávolítása után a pelletet szárítottuk és 50-100 µl desztillált vízben feloldottuk. A DNS-t -20 °C-on tároltuk.

5.10. *P. chrysogenum* fonalas gomba transzformációja és a transzformánsok szelektálása

A transzfomációhoz szükséges protoplasztokat Cantoral és munkatársai (1987), valamint Kolar és munkatársai (1988) nyomán állítottuk elő néhány módosítással.

A *P. chrysogenum* 48 órás süllyesztett tenyészetét szűrtük, desztillált vízzel mostuk és a micéliumról szűrőpapírral leitattuk a felesleges nedvességet. A gomba sejtfalát Glükánexszel (Novozymes, Dánia) emésztettük le, ehhez 300 mg Glükánexet oldottunk fel 15 ml lízispufferben (5.4. fejezet) és ebben szuszpendáltuk el az előkészített micélium 2 g-ját. A szuszpenziót 2-3 órán át 25°C-on 60 rpm-mel ráztattuk. A protoplasztok képződését mikroszkóppal követtük nyomon.

A protoplasztokat papírfilterrel (595^{1/2}, Schleicher&Schuell, Németország) szűrtük, centrifugáltuk (1500 rpm, 10 perc, 4°C) és 40 ml 0,7 M KCl oldattal mostuk, majd újabb centrifugálás után 2 ml KCM (5.4. fejezet) oldatban oldottuk fel és Bürker-kamra segítségével megszámoztuk.

A transzformációt Tilburn és munkatársai (1995) nyomán hajtottuk végre úgy, hogy 2×10^8 db protoplaszthoz 10-15 µg DNS-t adtunk 25 µl PCM oldatban feloldva. Az elegyet 30 percen át jégen inkubáltuk, majd 250 µl PCM oldat (5.4. fejezet) hozzáadása után 20 percig 22°C-on tartottuk. A transzformált protoplasztokat 1 ml 0,7 M KCl oldattal elegyítettük, és 40 ml 45 °C-ra előmelegített transzformációs fedőagarhoz (1% agar) adtuk, majd transzformációs tápagarra szélesztettük. A transzformációs tápagar 35g/l NaCl-dal és 200 mg/l nourseothricin (Jena Bioscience, Németország), vagy 0,6 mg/l pyritiamin-hydrobromid (Sigma Aldrich) szelektáló ágenssel kiegészített MM (5.2. fejezet) volt. A transzformációs tápagaron kinőtt

telepek spóráit szelektáló ágenssel kiegészített MM tápagarra szélesztettük. A genetikai analízishez az telepeket használtuk fel.

5.11. A transzformánsok genetikai analízise Southern hibridizációval

A *P. chrysogenum*ban végrehajtott genetikai manipulációkat (3.4. és 3.6.2. fejezet) Southern blot analízissel ellenőriztük Sambrook és munkatársai (1989) nyomán. A *P. chrysogenum* Q176 vad típusú és mutáns törzsek genomi DNS-ét a **10. táblázatban** szemléltett restriktációs enzimekkel emésztettük az 5.5. fejezetben ismertett módon. A kapott fragmenseket agaróz gélelektroforézissel szeparáltuk, és Hybond- N⁺ (Amersham Bioscience) membránra történt blottolás után a megfelelő digoxigenin jelölt próbával hibridizáltuk (**10. táblázat**). A hibridizációs próbákat PCR amplifikációval állítottuk elő (5.5. fejezet) digoxigenin jelölt dNTP (Boehringer Mannheim) és a **10. táblázatban** szemléltetett primerpárokat használva. A detektáláshoz anti-digoxigenin-alkalikus foszfatázt (Roche) és CSPD kemilumineszcens szubsztrátot (Roche) használtunk fel, és a gyártó ajánlása szerint jártunk el.

10. táblázat A Southern blot analízishez alkalmazott restriktációs enzimek, próbák és az előállításukhoz felhasznált primerek

Alkalmazás	Restriktációs enzim	Próba specifikusság	Primer pár ^a
<i>P. chrysogenum</i> Q176 <i>paf</i> feláció	NheI	<i>paf</i> gén	opaf1- opafrev
<i>P. chrysogenum</i> Q176 <i>paf</i> feláció	KpnI	<i>nat1</i> gén	onat1- onat2
<i>paf</i> visszaültetése a <i>P. chrysogenum</i> Δpaf törzsbe	BanI	<i>paf</i> 5' NTR	o5pafcomp- opaf5

^a A primerek szekvenciáit a **8. táblázat** (5.4. fejezet) tartalmazza

5.12. A csírázási képesség tanulmányozása

Ötnapos *P. chrysogenum* Q176 és *P. chrysogenum* Δpaf törzsek szélesztéssel létrehozott felületi tenyészeteiről begyűjtöttük a frissen termelődött spóratömeget „spóramosó oldat” (9 g/l NaCl, 0,01 % (v/v) Tween 80) segítségével. Az így kapott spóraelegyet háromszor mostuk (centrifugálás 2700 rpm, 7 perc 23 °C), hogy megszabaduljunk az esetleges agar- vagy micélium-törmelékektől. A tisztított spóraelegyet kihígítottuk: 10^5 spóra/ml MM (5.2. fejezet), és ebből pipettáztunk 200-200 μ l-t mikrotiter lemezre. A kultúrákat 25 °C-on inkubáltuk. A tenyészeteket fénymikroszkóp (Olympus CK40, 400x) segítségével folyamatosan megfigyeltük és 12 órás inkubációt követően meghatároztuk a csírázási képességet. Csírázási képesség alatt az egy látómezőben leszámolt kicsírázott spórák összpóraszámhoz viszonyított %-os arányát értjük. Akkor tekintettünk egy spórát csírázottnak, amikor a kicsírázott tömlő hossza elérte vagy meghaladta a spóraátmérő másfélszeresét (Oh és mtsai. 1996). A teljes kísérletet megismételtük úgy, hogy leoltás előtt a spóraelegyet egy hétig 4 °C-on inkubáltuk.

5.13. A PAF fehérje detektálása SDS PAGE-sel

A PAF detektálásához a *P. chrysogenum* Q176 és a *P. chrysogenum* $\Delta paf::paf$ törzs 72 órás rázatott tenyészetéből származó fermentlét 10000 rpm-en, 30 percig, 4 °C-on centrifugáltuk, majd YM-30 membránon szűrtük (Amicon Stirred Cell, 50 ml; Biomax PBTK ultrafiltration disc, polyethersulfone, MWCO 30000 Da, Millipore, Billerica, MA, USA). Az azonos térfogatú mintákat redukáló pufferrel elegyítettük (Tris-Glycine 2x mintapuffer, L2676, Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, California,

USA) és 5 percig, 95 °C-on hőkezeltük. A PAF detektálása SDS-PAGE-sel 16 %-os gélen (Novex, San Diego, California, USA) történt. A gél Comassie-Blue oldattal festettük meg (0.1% Coomassie Brilliant Blue, 45% metanol, 10% ecetsav), majd tintamentesítettük (10% metanol, 10% ecetsav, H₂O).

5.14. Autolitikus markerek nyomonkövetése

Az autolízis nyomon követésére szénéhező tenyészetek szárazanyag-tartalom változását és a kitináz aktivitását vizsgáltuk.

Szénéhező tenyészetet úgy hoztunk létre, hogy a *P. chrysogenum* MM-ba leoltott (5. 2. fejezet) sülyesztett kultúráját (5. 3. fejezet) 48 óráig rázattuk, majd a teljes biomasszát szacharózmentes MM-ra mostuk és 6 napig inkubáltuk (25 °C, 220 rpm), miközben 24 óránként mintát vettünk a tenyészekből.

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

A kitináz aktivitások mérésénél 100 µl mintához 600 µl 0,1 M citrát puffert (pH 5,0) és 100 µl CM-Chitin-RBV (Loewe Biochemica GmbH, Sauerlach, Germany) kromofór csoporttal jelölt szubsztrátoldatot adtunk. A 10 perces inkubáció (25°C) után, a reakciót 300 µl 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 használtuk fel az enzimaktivitás jellemzésére (Emri és mtsai. 2004).

5.15. Spórázási képesség meghatározása

A pontleoltással létrehozott felületi tenyészetek esetén megmértük a kialakult telep átmérőjét, a szinkronizált felületi tenyészetekből egy meghatározott területet vágunk ki dugófúróval ($d=8\text{mm}$). Az ismert felületű telepekről, ismert téfogatú „spóramosó oldatban” (9 g/l NaCl, 0,01 % (v/v) Tween 80) vortexeléssel távolítottuk el a spórákat. (A pontleoltásos felületi tenyészetek esetén a spórákat a telep teljes felületéről eltávolítottuk) Bürker-kamra segítségével megszámoltuk az így kapott spóraelegy spóraszámát, és elosztottuk a telep felületével, megkapva a spóraszám/ cm^2 értéket.

5.16. Felhasznált fehérjék és vegyszerek

A dolgozatban felhasznált, ioncserés kromatográfiával (Kaiserer és mtsai. 2003) tisztított PAF-ot Florentine Marx és kutatócsoportja biztosította (Innsbrucki Orvosi Egyetem, Ausztria) számomra.

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

5.17. Bioinformatikai módszerek

A nukleotid szekvencia kereséseket az NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) adatbázisban hajtottuk végre. A szekvenciák kereséséhez a *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 (van den Berg és mtsai. 2008) genomszekvencia szolgált forrásként.

Az *A. nidulans* RodA (Stringer és mtsai. 1991), illetve az *A. fumigatus* RodB (Paris és mtsai. 2003) fehérjék homológjainak keresése *P. chrysogenum*-ban az NCBI BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (Altschul és mtsai. 1997) programmal történt. Az adatokat az E érték alkalmazásával (Ayoubi és mtsai. 2002, Joshi és Xu 2007) szűrtük. A feltételezett homológok szekvenciáját a Multiple Sequence Alignment-ClustalW programmal (Thompson és mtsai. 1994) hasonlítottuk össze.

5.18. Statisztikai módszerek

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

6. Összefoglalás

A *Penicillium chrysogenum* Q176 törzs termel egy 6,25 kDa molekulatömegű, bázikus, ciszteinben gazdag fehérjét a PAF-ot. A fehérje számos humán és növénypatogén fonalas gomba növekedését gátolja, valamint aktív a fonalas modellorganizmus, az *Aspergillus nidulans* ellen is. Az immár másfél évtizede folyó intenzív PAF-kutatás jelentős eredményeket tárt fel a fehérje szenzitív mikroorganizmusokra kifejtett hatásáról, a termelő szervezetben betöltött élettani szerepe azonban feltáratlan maradt. Antimikrobiális fehérjék széles körben termelődnek az élővilágban a prokariótáktól egészen a gerincesekig. Magasabb rendű eukariótákban az immunrendszer részét képezik. Prokariótákban és alacsonyabb rendű eukariótákban szerepük kevésbé tanulmányozott, nagy valószínűséggel szelekciós előnyt biztosítanak a termelő szervezetnek a táplálékért folytatott harcban. Antimikrobiális hatású, ciszteinben gazdag, bázikus proteineket mára több fonalas Ascomycotában (*Aspergillus giganteus*, *P. chrysogenum*, *A. niger*, *P. nalgiovense*, *A. clavatus*) izoláltak. Eddig a legtöbb ismeretanyag a PAF-ról és az *A. giganteus* tápközegéből izolált AFP-ról gyűlt össze. Mindkét antifungális fehérje a 70-90 órás stacioner fázisú süllyesztett tenyészetben detektálható a legnagyobb mennyiségben. A fonalas gombák többsége a természetben valamilyen felülethez kötötten fordul elő, ahol a gombahifák spóráképzésre irányuló differenciálódási folyamatai is megfigyelhetők. Az *A. giganteus* *afp* génje az aszexuális sporuláció folyamán, szigorú térbeli és időbeli szabályozás alatt áll. Felvetődött a kérdés, hogy az *afp*-hez hasonlóan köthető-e a *paf* géntermék megjelenése a termelő szervezet aszexuális differenciálódási folyamataihoz, illetve, hogy a fehérje termelése befolyásolja-e a *P. chrysogenum* mitospóráfejlődését.

Mivel fonalas gombákban a sporuláció, a szabályozását és a funkcióját tekintve is szorosan kapcsolódik az autolízishez, valamint a PAF bőségesen szekretálódik a *P. chrysogenum* öregedő süllyesztett tenyészetében, megfogalmazódott a kérdés, hogy lehet-e hatása a fehérje termelődésének a tenyészet autolitikus sejtpusztulási folyamataira.

A PAF antibiózisban betöltött szerepe fontos fegyvernek bizonyulhat az élőlények természetes kiválasztódását eredményező versenyben. A PAF-ra érzékeny *A. nidulans*ban a fehérje már mikromólos koncentrációban oxidatív stresszt vált ki. A NikA-YpdA-SskA és a NikA-YpdA-SrrA hisztidin-aszpartát foszforelé-, valamint az SskB-PbsB-HogA/SakA mitogén aktivált protein kináz rendszer fontos szerepet játszanak az *A. nidulans* stresszre adott válaszreakcióinak a közvetítésében. A két rendszer közvetlen összekapcsoltsága hatékonyan segíti a modellszervezet adaptációját a különféle környezeti stresszhatásokhoz, ezért azt feltételeztük, hogy a PAF aktiválja az SskA-HogA/SakA- és/vagy az SrrA-val kapcsolt jelátviteli útonalakat.

Doktori munkám keretében megvizsgáltuk PAF hatását a *P. chrysogenum* Q176 felületi tenyészetének a növekedésére. Tanulmányoztuk a *paf* transzkripció mintázatát a termelő szervezet süllyesztett és felületi tenyészeiben. Ezzel párhuzamosan tanulmányoztuk a felületi tenyészetek mitospórafejlődését. Nyomon követtük a konidiofórumok megjelenési idejét. Meghatároztuk az egységnyi területen termelődött konídiumok számát. A transzkripció analízisbe bevontuk a *brlA*, a *rodA* és a *rodB* mitospórafejlődést jelző géneket. Létrehoztuk egy *paf* deléció mutánst a *P. chrysogenum* Q176 törzsben és tanulmányoztuk a Δpaf törzs differenciálódási folyamatait. Visszaültettük a deletált gént a hiánymutáns genomjába és vizsgáltuk a $\Delta paf::\Delta paf$ törzs mitospóratermelését.

Tanulmányoztuk a tápagarhoz adagolt PAF hatását a Δpaf törzs spórázási képességére. Megvizsgáltuk a *P. chrysogenum* $\Delta brlA$ törzs *paf* transzkripcióját. Tanulmányoztuk a *P. chrysogenum* Δpaf törzs szénéhező, süllyesztett tenyészetének autolízisét. A PAF antifungális hatásmechanizmusának tanulmányozása érdekében megvizsgáltuk a következő, stressz jelátviteli útvonalakban sérült *A. nidulans* mutánsok növekedését PAF kezelés hatására: $\Delta sskA$, $\Delta srrA$, $\Delta napA$, $\Delta nikA$, $\Delta hogA$, $\Delta sskA/srrA$, $\Delta srrA/hogA$.

Eredményeinket a következő pontokban foglalom össze:

- A *P. chrysogenum* jól tolerálja a PAF-kezelést a termelési kihozatalát többszörösen (~20x) meghaladó koncentráció értéken is.
- A *paf* mRNS már a *P. chrysogenum* 36 órás süllyesztett tenyészetének micéliumában detektálható, és a transzkripció a tenyésztés 60. órájában éri el a maximumát.
- A *P. chrysogenum* felületi tenyészetében a *paf* expressziója térben és időben szabályozott a mitospóra fejlődés alatt
- A *P. chrysogenum* Q176 törzsben sikeresen deletáltuk a *paf* gént.
- A Δpaf törzs sporulációs képessége szignifikánsan csökkent a vad típushoz képest, amely együtt járt a *brlA*, a *rodA* és a *rodB* sporulációt jelző gének repressziójával
- A Δpaf törzs csökkent konídium termelését sikeresen komplementálta a deletált gén visszaültetése a hiánymutáns genomjába.
- Ugyanakkor a tápanyaghoz adagolt PAF nem állította helyre a vad fenotípust a Δpaf törzsben, ami felveti annak a lehetőségét is, hogy a fehérje élettani szerepét a szekréció folyamán fejt ki.

- A PAF termelődése nem játszik szerepet a *P. chrysogenum* szénéhező süllyesztett tenyészetének autolitikus sejtpusztulási folyamataiban. A fehérje élettani szerepe feltehetőleg felületi tenyészetekre korlátozódik, ahol megfelelő környezeti szignálok hatására a termelő szervezet aszexuális differenciálódási folyamatai is érvényesülnek.
- A PAF SrrA-val kapcsolt jelátviteli rendszeren keresztül fejt ki antifungális hatását a NikA hisztidin kináz és az SskA-HogA útvonal közreműködése nélkül.

Kísérleteink arról tanúskodnak, hogy a PAF ígéretes eszköze lehet a sejthalál szignálok feltérképezésének, valamint új antifungális szerek kifejlesztésének. A PAF antifungális hatása a hatékony konídiumtermeléssel kombinálva ugyanakkor növeli a *P. chrysogenum* alkalmazkodóképességét a változó környezeti feltételekhez, szelekciós előnyt biztosítva a konkurens mikroorganizmusokkal szemben.

7. Summary

The low molecular mass (6,25 kDa), cysteine-rich and cationic protein PAF from *Penicillium chrysogenum* exhibits cytotoxic activity towards a variety of filamentous fungi, among them zoo- and plant pathogens and the model organism *Aspergillus nidulans*. Growth inhibition spectrum and mechanism of action of the protein were studied assiduously in the last 15 years, but the significance of its production in *P. chrysogenum* cultures remained unclear. Antimicrobial proteins are widely distributed in nature including prokaryotes and vertebrates. In higher eukaryotes many antimicrobial proteins accomplish an important function in innate immunity. In contrast, the benefit of the expression of antimicrobial proteins from prokaryotes and lower eukaryotes is less well studied. They might confer ecological advantage for the producing organisms in the competition for nutrients. Antimicrobial cysteine-rich and cationic proteins were isolated from numerous filamentous Ascomycetes (*Aspergillus giganteus*, *P. chrysogenum*, *A. niger*, *P. nalgiovense*, *A. clavatus*) to date. PAF is the best characterized antifungal protein of fungal origin in addition to the orthologously produced by *Aspergillus giganteus* (AFP) so far. The maximum protein yield is reached during the stationary growth phase after 70-90 h of cultivation in the case of both antifungal protein (Meyer, et al. 2002, Marx 2004). Filamentous fungi usually exist on different surfaces in nature, where developmental processes take place. The *afp* gene of *A. giganteus* is spatially and temporally regulated during asexual sporulation. This raises the interesting questions if the expression of *paf* is associated with asexual development of *P. chrysogenum*, and whether the production of the protein can influence the mitospore development of the producing organism.

Conidiogenesis and autolysis are tightly coupled processes in filamentous fungi and the regulatory networks behind these phenomena share common elements. BrlA is a crucial early regulator of conidiogenesis and also regulates the age-dependent appearance of autolysis markers in carbon-depleted *A. nidulans* cultures, including the production of cell-wall-degrading hydrolases like ChiB endochitinase and EngA β -1,3-endoglucanase. PAF is abundantly secreted into stationary growth phase liqued cultures of *P. chrysogenum*, which raises the exciting question, if the production of PAF can influence the autolytic process of the producing organism.

The role played by PAF in antibiosis might confer advantage for *P. chrysogenum* in the process of natural selection. PAF treatments cause oxidative stress in *A. nidulans*. There is an increasing body of evidence supporting the view that the NikA-YpdA-SskA and the NikA-YpdA-SrrA histidine-to-aspartate phosphorelay systems and the SskB-PbsB-HogA/SakA mitogen-activated protein kinase system are the centerpiece of stress signaling in *A. nidulans*. The direct linkage between the above mentioned systems plays important role in adaptation of the model organism to different stress factors. Therefore we assumed that either the SskA-HogA/SakA-dependent or the SrrA-dependent (or both) stress signaling pathway should be activated to cope with the deleterious effects of PAF-exposures.

In this PhD study we examined the effect of PAF on the growth of *P. chrysogenum* Q176 surface culture applying different protein concentrations (0-200 μ g/l), which exceeded the production yield (approximately 10 μ g/l) of PAF in submerged cultures. We investigated the transcriptional profile of *paf* in submerged and surface cultures of the producing organism. We also tended to examine the asexual development of the surface cultures. Therefore we monitored the first appearance of conidiophores. Conidial number produced

by one square centimetres of surface culture was also determined. We used *brlA*, and *rodA/rodB* as conidiation specific marker genes to investigate PAF dependent regulation of conidiation in *P. chrysogenum*.

We deleted the *paf* gene in *P. chrysogenum* Q176 strain and replaced by the nourseothricin-acetyltransferase gene *nat1* which confers nourseothricin-resistance to the transformants. Mitospore development of the Δpaf strain was also examined. We retransformed the wild type copy of *paf* gene into *P. chrysogenum* Δpaf genome using pyrithiamine resistance gene (*ptrA*). Mitospore production of $\Delta paf::\Delta paf$ strain was examined. The conidiation efficiency of Δpaf strain was investigated in the presence of external administration of purified PAF protein into the agar **medium**, as well. Therewith we examined the *paf* transcription profile of *P. chrysogenum* $\Delta brlA$ strain. We determined the autolysis rate of the carbon-starving submerged culture of *P. chrysogenum* Δpaf strain. To investigate antifungal mechanism of PAF we examined the effect of the protein on the growth of the following *A. nidulans* mutant strains: $\Delta sskA$, $\Delta srrA$, $\Delta napA$, $\Delta nika$, $\Delta hogA$, $\Delta sskA/srrA$, $\Delta srrA/hog$.

Our results indicate that *P. chrysogenum* Q176 tolerates PAF-treatment. When surface culture of *A. nidulans* PAF-sensitive control strain was exposed to 50 $\mu\text{g/ml}$ PAF, the colony diameter formed by the fungus was 70 % shorter compared to the untreated control. In the same time PAF exposure had only minor effect on the colonies formed by the producing organism even if we applied the protein up to 200 $\mu\text{g/ml}$ concentration (only 28% shorter colony diameter compared to the untreated control).

paf mRNA is detectable in *P. chrysogenum* Q176 mycelia after 36 h submerged cultivation. Transcription reached a maximum at 60 h before it decreased again.

Northern blot analysis of *P. chrysogenum* surface cultures revealed that expression of the *paf* gene is spatially and temporally regulated during asexual development. The *paf* gene was not transcribed in conidia but in the other parts of the surface culture which contain hyphae and conidiophores. *paf* and the conidiation specific genes, *brlA*, *rodA*, and *rodB* were simultaneously expressed in *P. chrysogenum* surface culture. Furthermore the accumulation of the respective gene transcripts correlated with the onset of conidiation.

We generated a *paf* deletion mutant in *P. chrysogenum* Q176 strain. The number of conidia produced by Δpaf strain was significantly reduced compared to the wild type. Furthermore gene expression pattern of *brlA*, *rodA*, and *rodB*, were significantly reduced in the *paf* deletion strain.

Retransformation of the *paf* wild type copy into *P. chrysogenum* Δpaf genome restored the reduced conidia production of the mutant strain.

Unexpectedly, we were not able to restore the wild-type phenotype of the Δpaf strain by external administration of purified PAF protein, which can suggest that secretion process of PAF might have regulatory potential.

There was no significant difference in the autolysis rates recorded in carbon-starving submerged culture of *P. chrysogenum* wild-type and Δpaf mutant strains. This observation may indicate that the physiological function of PAF is limited to surface cultures or is overridden by environmental conditions blocking the conidiogenesis of filamentous fungi under submerged cultivation.

The antifungal effect of PAF is transmitted by an SrrA-dependent system other than NikA-SrrA phosphorelay and without the involvement of SskA-HogA/SakA signaling.

Our results indicate that PAF is a valuable tool in mapping novel cell death signaling pathways in filamentous fungi, which may lead eventually to the development of new-type antifungals. In the same time the antifungal effect of PAF in combination with a highly efficient propagation of conidia undoubtedly provides a fitness mechanism to *P. chrysogenum* and an ecological advantage over concurring organisms.

8. Köszönetnyilvánítás

Hálás köszönettel tartozom témavezetőmnek Prof. Dr. Pócsi Istvánnak, aki lehetővé tette és a mindenben támogatta a doktori értekezésem elkészítését a Debreceni Egyetem, TEK Mikrobiális Biotechnológiai és Sejtbiológiai Tanszéken. Külön köszönettel tartozom hasznos szakmai tanácsaiért és türelméért.

Hálás köszönet illeti Prof. Dr. Florentine Marxot (Innsbrucki Orvosi Egyetem, Ausztria) aki szívesen fogadott innsbrucki kutatócsoportjában és minden feltételt biztosított a szakmai előrehaladásomért.

Köszönetemet fejezem ki Dr. Leiter Évának az útmutatásért, a számtalan hasznos szakmai tanácsért és segítségért.

Köszönettel tartozom Dr. Emri Tamásnak az ösztöndzéséért, valamint a jelentős szakmai és gyakorlati tanácsaiért.

Köszönet illeti Szilágyi Judit és Csiha Sára lelkes és kitartó szakdolgozói munkáját, valamint Pócsi Imre technikusai segítségét.

Köszönetemet szeretném kifejezni a Debreceni Egyetem, TEK Mikrobiális Biotechnológiai és Sejtbiológiai Tanszék többi dolgozójának is a sok segítségért és ösztöndzésért, amellyel munkámat támogatták.

Hálámat szeretném kifejezni Ulrike Binder és Andrea Eigentler innsbrucki kollégáimnak a tanító támogatásért, valamint Renate Weiler-Görznek és Doris Bratshunnak a technikusai segítségükért.

Hálás köszönettel tartozom Prof. Hubertus Haasnak, Markus Schrettlnek és Christoph Jöchlnek (Innsbrucki Orvosi Egyetem, Ausztria) a hasznos szakmai diszkusszióikért.

Kutatásaim az Országos Tudományos Kutatási Alapprogramok (OTKA-CK-77515) és az Osztrák Tudományos Alapok (FWF, P19970-B11) támogatásával valósultak meg.

Az Innsbrucki Orvosi Egyetemen töltött kutató ösztöndíjakat az ERASMUS diákcsere programnak, és az Osztrák-Magyar Akció Alapítványnak (ÖAD) köszönhetem.

Szeretném megköszönni a családomnak és a barátomnak a gondoskodó támogatást.

9. Irodalomjegyzék

- Acosta R, Rodríguez-Martín A, Martín A, Núñez F, Asensio MA (2009) Selection of antifungal protein-producing molds from dry-cured meat products. *Int J Food Microbiol* 135: 39-46
- Adams T, Wieser J, Yu J (1998) Asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Microbiol Mol Biol Rev* 62: 35-54
- Alex L, Borkovich K, Simon M (1996) Hyphal development in *Neurospora crassa*: involvement of a two-component histidine kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 3416-3421
- Altschul S, Madden T, Schäffer A, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman D (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25: 3389-3402
- Andrianopoulos A, Timberlake W (1994) The *Aspergillus nidulans* *abaA* gene encodes a transcriptional activator that acts as a genetic switch to control development. *Mol Cell Biol* 14: 2503-2515
- Aramayo R, Timberlake W (1993) The *Aspergillus nidulans* *yA* gene is regulated by *abaA*. *EMBO J* 12: 2039-2048
- Asano Y, Hagiwara D, Yamashino T, Mizuno T (2007) Characterization of the bZip-type transcription factor NapA with reference to oxidative stress response in *Aspergillus nidulans*. *Biosci Biotechnol Biochem* 71: 1800-1803
- Ashby MK, Houmard J (2006) Cyanobacterial two-component proteins: structure, diversity, distribution, and evolution. *Microbiol Mol Biol Rev* 70: 472-509
- Ayoubi P, Jin X, Leite S, Liu X, Martajaja J, Abduraham A, Wan Q, Yan W, Misawa E, Prade R (2002) PipeOnline 2.0: automated EST processing and functional data sorting. *Nucleic Acids Res* 30: 4761-4769
- Baker B, Zambryski P, Staskawicz B, Dinesh-Kumar S (1997) Signaling in plant-microbe interactions. *Science* 276: 726-733
- Balázs A, Pócsi I, Hamari Z, Leiter E, Emri T, Miskei M, Oláh J, Tóth V, Hegedus N, Prade RA, Molnár M (2010) AtfA bZIP-type transcription factor regulates oxidative and osmotic stress responses in *Aspergillus nidulans*. *Mol Genet Genomics* 283: 289-303

- Barna B, Leiter E, Hegedus N, Bíró T, Pócsi I (2008) Effect of the *Penicillium chrysogenum* antifungal protein (PAF) on barley powdery mildew and wheat leaf rust pathogens. *J Basic Microbiol* 48: 516-520
- Batta G, Barna T, Gáspári Z, Sándor S, Kövér K, Binder U, Sarg B, Kaiserer L, Chhillar A, Eigentler A, Leiter E, Hegedüs N, Pócsi I, Lindner H, Marx F (2009) Functional aspects of the solution structure and dynamics of PAF--a highly-stable antifungal protein from *Penicillium chrysogenum*. *FEBS J* 276: 2875-2890
- Binder U, Chu M, Read N, Marx F (2010a) The antifungal activity of the *Penicillium chrysogenum* protein PAF disrupts calcium homeostasis in *Neurospora crassa*. *Eukaryot Cell* 9: 1374-1382
- Binder U, Oberparleiter C, Meyer V, Marx F (2010b) The antifungal protein PAF interferes with PKC/MPK and cAMP/PKA signalling of *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* 75: 294-307
- Borneman A, Hynes M, Andrianopoulos A (2000) The *abaA* homologue of *Penicillium marneffe* participates in two developmental programmes: conidiation and dimorphic growth. *Mol Microbiol* 38: 1034-1047
- Borneman A, Hynes M, Andrianopoulos A (2002) A basic helix-loop-helix protein with similarity to the fungal morphological regulators, Phd1p, Efg1p and StuA, controls conidiation but not dimorphic growth in *Penicillium marneffe*. *Mol Microbiol* 44: 621-631
- Boualem K, Waché Y, Garmyn D, Karbowiak T, Durand A, Gervais P, Cavin J (2008) Cloning and expression of genes involved in conidiation and surface properties of *Penicillium camemberti* grown in liquid and solid cultures. *Res Microbiol* 159: 110-117
- Boylan M, Mirabito P, Willett C, Zimmerman C, Timberlake W (1987) Isolation and physical characterization of three essential conidiation genes from *Aspergillus nidulans*. *Mol Cell Biol* 7: 3113-3118
- Cantoral JM, Diez B, Barredo JL, Alvarez EaM, J E (1987) High frequency transformation of *Penicillium chrysogenum*. *Biotechnol* 5: 494-497
- Catlett NL, Yoder OC, Turgeon BG (2003) Whole-genome analysis of two-component signal transduction genes in fungal pathogens. *Eukaryot Cell* 2: 1151-1161
- Champe S, el-Zayat A (1989) Isolation of a sexual sporulation hormone from *Aspergillus nidulans*. *J Bacteriol* 171: 3982-3988

- Chang Y, Timberlake W (1993) Identification of *Aspergillus brlA* response elements (BREs) by genetic selection in yeast. *Genetics* 133: 29-38
- Chang M, Chae K, Han D, Jahng K (2004) The GanB Galpha-protein negatively regulates asexual sporulation and plays a positive role in conidial germination in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* 167: 1305-1315
- Chidiac P, Roy A (2003) Activity, regulation, and intracellular localization of RGS proteins. *Receptors Channels* 9: 135-147
- Chomczynski P (1993) A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques* 15: 532-534, 536-537
- Clutterbuck A (1969) A mutational analysis of conidial development in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* 63: 317-327
- Coyle C, Kenaley S, Rittenour W, Panaccione D (2007) Association of ergot alkaloids with conidiation in *Aspergillus fumigatus*. *Mycologia* 99: 804-811
- Dalcero A, Magnoli C, Chiacchiera S, Palacios G, Reynoso M (1997) Mycoflora and incidence of aflatoxin B1, zearalenone and deoxynivalenol in poultry feeds in Argentina. *Mycopathologia* 137: 179-184
- Dimarcq J, Bulet P, Hetru C, Hoffmann J (1998) Cysteine-rich antimicrobial peptides in invertebrates. *Biopolymers* 47: 465-477
- Dutton J, Johns S, Miller B (1997) StuAp is a sequence-specific transcription factor that regulates developmental complexity in *Aspergillus nidulans*. *EMBO J* 16: 5710-5721
- Emri T, Molnár Z, Pusztahelyi T, Pócsi I (2004) Physiological and morphological changes in autolyzing *Aspergillus nidulans* cultures. *Folia Microbiol (Praha)* 49: 277-284
- Emri T, Molnár Z, Pusztahelyi T, Varecza Z, Pócsi I (2005) The fluG-BrIA pathway contributes to the initialisation of autolysis in submerged *Aspergillus nidulans* cultures. *Mycol Res* 109: 757-763
- Emri T, Molnár Z, Veres T, Pusztahelyi T, Dudás G, Pócsi I (2006) Glucose-mediated repression of autolysis and conidiogenesis in *Emericella nidulans*. *Mycol Res* 110: 1172-1178
- Emri T, Molnár Z, Szilágyi M, Pócsi I (2008) Regulation of autolysis in *Aspergillus nidulans*. *Appl Biochem Biotechnol* 151: 211-220
- Fritig B, Heitz T, Legrand M (1998) Antimicrobial proteins in induced plant defense. *Curr Opin Immunol* 10: 16-22

- Furukawa K, Hoshi Y, Maeda T, Nakajima T, Abe K (2005) *Aspergillus nidulans* HOG pathway is activated only by two-component signalling pathway in response to osmotic stress. *Mol Microbiol* 56: 1246-1261
- Furukawa K, Yoshimi A, Furukawa T, Hoshi Y, Hagiwara D, Sato N, Fujioka T, Mizutani O, Mizuno T, Kobayashi T, Abe K (2007) Novel reporter gene expression systems for monitoring activation of the *Aspergillus nidulans* HOG pathway. *Biosci Biotechnol Biochem* 71: 1724-1730
- Galgóczy L, Papp T, Leiter E, Marx F, Pócsi I, Vágvölgyi C (2005) Sensitivity of different Zygomycetes to the *Penicillium chrysogenum* antifungal protein (PAF). *J Basic Microbiol* 45: 136-141
- Galgóczy L, Papp T, Lukács G, Leiter E, Pócsi I, Vágvölgyi C (2007) Interactions between statins and *Penicillium chrysogenum* antifungal protein (PAF) to inhibit the germination of sporangiospores of different sensitive Zygomycetes. *FEMS Microbiol Lett* 270: 109-115
- Galgóczy L, Papp T, Pócsi I, Hegedus N, Vágvölgyi C (2008) In vitro activity of *Penicillium chrysogenum* antifungal protein (PAF) and its combination with fluconazole against different dermatophytes. *Antonie Van Leeuwenhoek* 94: 463-470
- Galgóczy L, Vágvölgyi C (2009) Antifungal peptides secreted by filamentous fungi as promising new agents in human therapy. *Future Microbiol* 4: 261-263
- Ganz T (1994) Biosynthesis of defensins and other antimicrobial peptides. *Ciba Found Symp* 186: 62-71; discussion 71-66
- Ganz T, Lehrer R (1994) Defensins. *Curr Opin Immunol* 6: 584-589
- García-Olmedo F, Molina A, Alamillo J, Rodríguez-Palenzuela P (1998) Plant defense peptides. *Biopolymers* 47: 479-491
- García-Rico R, Martín J, Fierro F (2007) The *pga1* gene of *Penicillium chrysogenum* NRRL 1951 encodes a heterotrimeric G protein alpha subunit that controls growth and development. *Res Microbiol* 158: 437-446
- García-Rico R, Fierro F, Martín J (2008a) Heterotrimeric Galpha protein Pga1 of *Penicillium chrysogenum* controls conidiation mainly by a cAMP-independent mechanism. *Biochem Cell Biol* 86: 57-69
- García-Rico R, Fierro F, Mauriz E, Gómez A, Fernández-Bodega M, Martín J (2008b) The heterotrimeric Galpha protein pga1 regulates biosynthesis of penicillin, chrysogenin and roquefortine in *Penicillium chrysogenum*. *Microbiology* 154: 3567-3578

- Geisen R (2000) *P. nalgiovense* carries a gene which is homologous to the *paf* gene of *P. chrysogenum* which codes for an antifungal peptide. *Int J Food Microbiol* 62: 95-101
- Gun Lee D, Shin S, Maeng C, Jin Z, Kim K, Hahm K (1999) Isolation and characterization of a novel antifungal peptide from *Aspergillus niger*. *Biochem Biophys Res Commun* 263: 646-651
- Hagiwara D, Asano Y, Marui J, Furukawa K, Kanamaru K, Kato M, Abe K, Kobayashi T, Yamashino T, Mizuno T (2007a) The SskA and SrrA response regulators are implicated in oxidative stress responses of hyphae and asexual spores in the phosphorelay signaling network of *Aspergillus nidulans*. *Biosci Biotechnol Biochem* 71: 1003-1014
- Hagiwara D, Matsubayashi Y, Marui J, Furukawa K, Yamashino T, Kanamaru K, Kato M, Abe K, Kobayashi T, Mizuno T (2007b) Characterization of the NikA histidine kinase implicated in the phosphorelay signal transduction of *Aspergillus nidulans*, with special reference to fungicide responses. *Biosci Biotechnol Biochem* 71: 844-847
- Hagiwara D, Asano Y, Yamashino T, Mizuno T (2008) Characterization of bZip-type transcription factor AtfA with reference to stress responses of conidia of *Aspergillus nidulans*. *Biosci Biotechnol Biochem* 72: 2756-2760
- Hagiwara D, Asano Y, Marui J, Yoshimi A, Mizuno T, Abe K (2009a) Transcriptional profiling for *Aspergillus nidulans* HogA MAPK signaling pathway in response to fludioxonil and osmotic stress. *Fungal Genet Biol* 46: 868-878
- Hagiwara D, Mizuno T, Abe K (2009b) Characterization of NikA histidine kinase and two response regulators with special reference to osmotic adaptation and asexual development in *Aspergillus nidulans*. *Biosci Biotechnol Biochem* 73: 1566-1571
- Hagiwara D, Mizuno T, Abe K (2011) Characterization of the conserved phosphorylation site in the *Aspergillus nidulans* response regulator SrrA. *Curr Genet* 10.1007/s00294-010-0330-2
- Han K, Seo J, Yu J (2004) Regulators of G-protein signalling in *Aspergillus nidulans*: RgsA downregulates stress response and stimulates asexual sporulation through attenuation of GanB (Galpha) signalling. *Mol Microbiol* 53: 529-540
- Hill P (1972) The production of penicillins in soils and seeds by *Penicillium chrysogenum* and the role of penicillin β -lactamase in the ecology of soil bacillus. *J Gen Microbiol* 70: 243-252

- Hoff B, Pöggeler S, Kück U (2008) Eighty years after its discovery, Fleming's *Penicillium* strain discloses the secret of its sex. *Eukaryot Cell* 7: 465-470
- Hoff B, Kamerewerd J, Sigl C, Mitterbauer R, Zadra I, Kürsteiner H, Kück U (2010a) Two components of a velvet-like complex control hyphal morphogenesis, conidiophore development and penicillin biosynthesis in *Penicillium chrysogenum*. *Eukaryot Cell* 9:1236-1250
- Hoff B, Kamerewerd J, Sigl C, Zadra I, Kück U (2010b) Homologous recombination in the antibiotic producer *Penicillium chrysogenum*: strain *DeltaPcku70* shows up-regulation of genes from the HOG pathway. *Appl Microbiol Biotechnol* 85: 1081-1094
- Jakucs E, Vajna L (2003) Mikológia, Agroinform Kiadó and Nyomda Kft. Budapest
- Joshi T, Xu D (2007) Quantitative assessment of relationship between sequence similarity and function similarity. *BMC Genomics* 8: 222
- Kaiserer L, Oberparleiter C, Weiler-Görz R, Burgstaller W, Leiter E, Marx F (2003) Characterization of the *Penicillium chrysogenum* antifungal protein PAF. *Arch Microbiol* 180: 204-210
- Kawasaki L, Sánchez O, Shiozaki K, Aguirre J (2002) SakA MAP kinase is involved in stress signal transduction, sexual development and spore viability in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* 45: 1153-1163
- Kolar M, Punt P, van den Hondel C, Schwab H (1988) Transformation of *Penicillium chrysogenum* using dominant selection markers and expression of an *Escherichia coli lacZ* fusion gene. *Gene* 62: 127-134
- Krappmann S, Jung N, Medic B, Busch S, Prade R, Braus G (2006) The *Aspergillus nidulans* F-box protein GrrA links SCF activity to meiosis. *Mol Microbiol* 61: 76-88
- Krügel H, Fiedler G, Smith C, Baumberg S (1993) Sequence and transcriptional analysis of the nourseothricin acetyltransferase-encoding gene *nat1* from *Streptomyces noursei*. *Gene* 127: 127-131
- Kubodera T, Yamashita N, Nishimura A (2000) Pyrithiamine resistance gene (*ptrA*) of *Aspergillus oryzae*: cloning, characterization and application as a dominant selectable marker for transformation. *Biosci Biotechnol Biochem* 64: 1416-1421
- Kück UaH, B (2006) Application of the nourseothricin acetyltransferase gene (*nat1*) as dominant marker for the transformation of filamentous fungi. *Fungal Genet Newsl* 53: 9-11

- Lacadena J, Martínez del Pozo A, Gasset M, Patiño B, Campos-Olivas R, Vázquez C, Martínez-Ruiz A, Mancheño J, Oñaderra M, Gavilanes J (1995) Characterization of the antifungal protein secreted by the mould *Aspergillus giganteus*. Arch Biochem Biophys 324: 273-281
- Lafon A, Seo J, Han K, Yu J, 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
- Lee B, Adams T (1994) 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: 641-651
- Lehrer R, Ganz T (1999) Antimicrobial peptides in mammalian and insect host defence. Curr Opin Immunol 11: 23-27
- Leiter E, Szappanos H, Oberparleiter C, Kaiserer L, Csernoch L, Pusztahelyi T, Emri T, Pócsi I, Salvenmoser W, Marx F (2005) Antifungal protein PAF severely affects the integrity of the plasma membrane of *Aspergillus nidulans* and induces an apoptosis-like phenotype. Antimicrob Agents Chemother 49: 2445-2453
- Lockington R, Kelly J (2001) Carbon catabolite repression in *Aspergillus nidulans* involves deubiquitination. Mol Microbiol 40: 1311-1321
- Lodish H, Berk A, Zipursky L, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J (2000) Molecular Cell Biology 4th edition, W.H. Freeman and Company, New York
- Lu JM, Deschenes RJ, Fassler JS (2003) *Saccharomyces cerevisiae* histidine phosphotransferase Ypd1p shuttles between the nucleus and cytoplasm for SLN1-dependent phosphorylation of Ssk1p and Skn7p. Eukaryot Cell 2: 1304-1314
- Mah JH, Yu JH (2006) Upstream and downstream regulation of asexual development in *Aspergillus fumigatus*. Eukaryot Cell 5: 1585-1595
- Marshall M, Timberlake W (1991) *Aspergillus nidulans wetA* activates spore-specific gene expression. Mol Cell Biol 11: 55-62
- Marx F, Haas H, Reindl M, Stöffler G, Lottspeich F, Redl B (1995) Cloning, structural organization and regulation of expression of the *Penicillium chrysogenum paf* gene encoding an abundantly secreted protein with antifungal activity. Gene 167: 167-171
- Marx F (2004) Small, basic antifungal proteins secreted from filamentous ascomycetes: a comparative study regarding expression, structure, function and potential application. Appl Microbiol Biotechnol 65: 133-142

- Marx F, Salvenmoser W, Kaiserer L, Graessle S, Weiler-Görz R, Zadra I, Oberparleiter C (2005) Proper folding of the antifungal protein PAF is required for optimal activity. *Res Microbiol* 156: 35-46
- Marx F, Binder U, Leiter E, Pócsi I (2008) The *Penicillium chrysogenum* antifungal protein PAF, a promising tool for the development of new antifungal therapies and fungal cell biology studies. *Cell Mol Life Sci* 65: 445-454
- McCudden C, Hains M, Kimple R, Siderovski D, Willard F (2005) G-protein signaling: back to the future. *Cell Mol Life Sci* 62: 551-577
- McIntyre M, Berry D, McNeil B (2000) Role of proteases in autolysis of *Penicillium chrysogenum* chemostat cultures in response to nutrient depletion. *Appl Microbiol Biotechnol* 53: 235-242
- McNeil B, Berry D, Harvey L, Grant A, White S (1998) Measurement of autolysis in submerged batch cultures of *Penicillium chrysogenum*. *Biotechnol Bioeng* 57: 297-305
- Meyer V, Wedde M, Stahl U (2002) Transcriptional regulation of the Antifungal Protein in *Aspergillus giganteus*. *Mol Genet Genomics* 266: 747-757
- Meyer V (2008) A small protein that fights fungi: AFP as a new promising antifungal agent of biotechnological value. *Appl Microbiol Biotechnol* 78: 17-28
- Miller K, Toennis T, Adams T, Miller B (1991) Isolation and transcriptional characterization of a morphological modifier: the *Aspergillus nidulans* stunted (*stuA*) gene. *Mol Gen Genet* 227: 285-292
- Mirabito P, Adams T, Timberlake W (1989) Interactions of three sequentially expressed genes control temporal and spatial specificity in *Aspergillus* development. *Cell* 57: 859-868
- Miskei M, Karányi Z, Pócsi I (2009) Annotation of stress-response proteins in the aspergilli. *Fungal Genet Biol* 46 Suppl 1: S105-120
- Mizuno T (2005) Two-component phosphorelay signal transduction systems in plants: from hormone responses to circadian rhythms. *Biosci Biotechnol Biochem* 69: 2263-2276
- Molnár Z, Mészáros E, Szilágyi Z, Rosén S, Emri T, Pócsi I (2004) Influence of fadAG203R and deltaflbA mutations on morphology and physiology of submerged *Aspergillus nidulans* cultures. *Appl Biochem Biotechnol* 118: 349-360

- Molnár Z, Emri T, Zavaczki E, Pusztahelyi T, Pócsi I (2006) Effects of mutations in the GanB/RgsA G protein mediated signalling on the autolysis of *Aspergillus nidulans*. J Basic Microbiol 46: 495-503
- Mooney J, Yager L (1990) Light is required for conidiation in *Aspergillus nidulans*. Genes Dev 4: 1473-1482
- Moreno A, Martínez Del Pozo A, San Segundo B (2006) Biotechnologically relevant enzymes and proteins. Antifungal mechanism of the *Aspergillus giganteus* AFP against the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. Appl Microbiol Biotechnol 72: 883-895
- Morton AG (1961) The induction of sporulation in mould fungi. Proc R Microscop Soc B 153: 548-569
- Nakaya K, Omata K, Okahashi I, Nakamura Y, Kolekenbrock H, Ulbrich N (1990) Amino acid sequence and disulfide bridges of an antifungal protein isolated from *Aspergillus giganteus*. Eur J Biochem 193: 31-38
- Nielsen J, Johansen C, Jacobsen M, Krabben P, Villadsen J (1995) Pellet formation and fragmentation in submerged cultures of *Penicillium chrysogenum* and its relation to penicillin production. Biotechnol Prog 11: 93-98
- Nielsen M, Albertsen L, Lettier G, Nielsen J, Mortensen U (2006) Efficient PCR-based gene targeting with a recyclable marker for *Aspergillus nidulans*. Fungal Genet Biol 43: 54-64
- Núñez F, Rodríguez MM, Bermúdez ME, Córdoba JJ, Asensio MA (1996) Composition and toxigenic potential of the mould population on dry-cured Iberian ham. Int J Food Microbiol 32: 185-197
- Oberparleiter C, Kaiserer L, Haas H, Ladurner P, Andratsch M, Marx F (2003) Active internalization of the *Penicillium chrysogenum* antifungal protein PAF in sensitive aspergilli. Antimicrob Agents Chemother 47: 3598-3601
- Oh K-B, Chen Y, Matsuoka H, Yamamoto A, Kurata H (1996) Morphological recognition of fungal spore germination by a computer-aided image analysis and its application to antifungal activity evaluation. Journal of Biotechnology 45: 71-79
- Oldach K, Becker D, Lörz H (2001) Heterologous expression of genes mediating enhanced fungal resistance in transgenic wheat. Mol Plant Microbe Interact 14: 832-838
- Pareek A, Singh A, Kumar M, Kushwaha HR, Lynn AM, Singla-Pareek SL (2006) Whole-genome analysis of *Oryza sativa* reveals similar architecture of two-component signaling machinery with *Arabidopsis*. Plant Physiol 142: 380-397

- Paris S, Debeaupuis J, Crameri R, Carey M, Charlès F, Prévost M, Schmitt C, Philippe B, Latgé J (2003) Conidial hydrophobins of *Aspergillus fumigatus*. Appl Environ Microbiol 69: 1581-1588
- Posas F, Wurgler-Murphy SM, Maeda T, Witten EA, Thai TC, Saito H (1996) Yeast HOG1 MAP kinase cascade is regulated by a multistep phosphorelay mechanism in the SLN1-YPD1-SSK1 "two-component" osmosensor. Cell 86: 865-875
- Prade R, Timberlake W (1993) The *Aspergillus nidulans brlA* regulatory locus consists of overlapping transcription units that are individually required for conidiophore development. EMBO J 12: 2439-2447
- Prade R, Timberlake W (1994) The *Penicillium chrysogenum* and *Aspergillus nidulans wetA* developmental regulatory genes are functionally equivalent. Mol Gen Genet 244: 539-547
- Pócsi I, Miskei M, Karányi Z, Emri T, Ayoubi P, Pusztahelyi T, Balla G, Prade R (2005) Comparison of gene expression signatures of diamide, H₂O₂ and menadione exposed *Aspergillus nidulans* cultures-linking genome-wide transcriptional changes to cellular physiology. BMC Genomics 6: 182
- Pócsi I, Leiter E, Kwon N, Shin K, Kwon G, Pusztahelyi T, Emri T, Abuknesha R, Price R, Yu J (2009) Asexual sporulation signalling regulates autolysis of *Aspergillus nidulans* via modulating the chitinase ChiB production. J Appl Microbiol 107: 514-523
- Pusztahelyi T, Pócsi I, Kozma J, Szentirmai A (1997) Aging of *Penicillium chrysogenum* cultures under carbon starvation: I. morphological changes and secondary metabolite production. Biotechnol Appl Biochem 25: 81-86
- Raj P, Dentino A (2002) Current status of defensins and their role in innate and adaptive immunity. FEMS Microbiol Lett 206: 9-18
- Rodríguez-Martín A, Acosta R, Liddell S, Núñez F, Benito M, Asensio M (2010) Characterization of the novel antifungal protein PgAFP and the encoding gene of *Penicillium chrysogenum*. Peptides 31: 541-547
- Roncal T, Cordobés S, Sterner O, Ugalde U (2002) Conidiation in *Penicillium cyclopium* is induced by conidiogenone, an endogenous diterpene. Eukaryot Cell 1: 823-829
- Roncal T, Ugalde U (2003) Conidiation induction in *Penicillium*. Res Microbiol 154: 539-546

- Rosén S, Yu J, Adams T (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: 5592-5600
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd edition Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York
- Sámi L, Pusztahelyi T, Emri T, Varecza Z, Fekete A, Grallert A, Karanyi Z, Kiss L, Pócsi I (2001) Autolysis and aging of *Penicillium chrysogenum* cultures under carbon starvation: Chitinase production and antifungal effect of allosamidin. J Gen Appl Microbiol 47: 201-211
- Sándor E, Pusztahelyi T, Karaffa L, Karányi Z, Pócsi I, Biró S, Szentirmai A (1998) Allosamidin inhibits the fragmentation of *Acremonium chrysogenum* but does not influence the cephalosporin-C production of the fungus. FEMS Microbiol Lett 164: 231-236
- Seo J, Guan Y, Yu J (2003) Suppressor mutations bypass the requirement of *fluG* for asexual sporulation and sterigmatocystin production in *Aspergillus nidulans*. Genetics 165: 1083-1093
- Seo J, Han K, Yu J (2005) Multiple roles of a heterotrimeric G-protein gamma-subunit in governing growth and development of *Aspergillus nidulans*. Genetics 171: 81-89
- Seo J, Guan Y, Yu J (2006) FluG-dependent asexual development in *Aspergillus nidulans* occurs via derepression. Genetics 172: 1535-1544
- Shimizu K, Keller N (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
- Sigl C, Haas H, Specht T, Pfaller K, Kürsteiner H, Zadra I (2010) Among developmental regulators StuA but not BrlA is essential for Penicillin V production in *Penicillium chrysogenum*. Appl Environ Microbiol AEM.01557-10 [pii]10.1128/AEM.01557-10
- Skouri-Gargouri H, Gargouri A (2008) First isolation of a novel thermostable antifungal peptide secreted by *Aspergillus clavatus*. Peptides 29: 1871-1877
- Skouri-Gargouri H, Ben Ali M, Gargouri A (2009) Molecular cloning, structural analysis and modelling of the AcAFP antifungal peptide from *Aspergillus clavatus*. Peptides 30: 1798-1804

- Skouri-Gargouri H, Jellouli-Chaker N, Gargouri A (2010) Factors affecting production and stability of the AcAFP antifungal peptide secreted by *Aspergillus clavatus*. Appl Microbiol Biotechnol 86: 535-543
- Skromne I, Sánchez O, Aguirre J (1995) Starvation stress modulates the expression of the *Aspergillus nidulans brlA* regulatory gene. Microbiology 141 (Pt 1): 21-28
- Springer M (1993) Genetic control of fungal differentiation: the three sporulation pathways of *Neurospora crassa*. Bioessays 15: 365-374
- Stringer M, Dean R, Sewall T, Timberlake W (1991) Rodletless, a new *Aspergillus* developmental mutant induced by directed gene inactivation. Genes Dev 5: 1161-1171
- Szappanos H, Szigeti GP, Pál B, Rusznák Z, Szucs G, Rajnavölgyi E, Balla J, Balla G, Nagy E, Leiter E, Pócsi I, Marx F, Csernoch L (2005) The *Penicillium chrysogenum*-derived antifungal peptide shows no toxic effects on mammalian cells in the intended therapeutic concentration. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 371: 122-132
- Szilágyi M, Kwon NJ, Dorogi C, Pócsi I, Yu JH, Emri T (2010) The extracellular β -1,3-endoglucanase EngA is involved in autolysis of *Aspergillus nidulans*. J Appl Microbiol 109: 1498-1508
- Tao J, Ginsberg I, Banerjee N, Held W, Koltin Y, Bruenn J (1990) *Ustilago maydis* KP6 killer toxin: structure, expression in *Saccharomyces cerevisiae*, and relationship to other cellular toxins. Mol Cell Biol 10: 1373-1381
- Theis T, Wedde M, Meyer V, Stahl U (2003) The antifungal protein from *Aspergillus giganteus* causes membrane permeabilization. Antimicrob Agents Chemother 47: 588-593
- Thevissen K, Ferket K, François I, Cammue B (2003) Interactions of antifungal plant defensins with fungal membrane components. Peptides 24: 1705-1712
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res 22: 4673-4680
- Tilburn J, Sarkar S, Widdick DA, Espeso EA, Orejas M, Mungroo J, Penalva MA, Arst Jr NH (1995) The *Aspergillus* PacC zinc finger transcription factor mediates regulation of both acid- and alkaline-expressed genes by ambient pH. Embo J 14: 779-790

- Tossi A, Sandri L, Giangaspero A (2000) Amphipathic, alpha-helical antimicrobial peptides. *Biopolymers* 55: 4-30
- Tsitsigiannis D, Kowieski T, Zarnowski R, Keller N (2004) Endogenous lipogenic regulators of spore balance in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot Cell* 3: 1398-1411
- Tsitsigiannis D, Keller N (2007) Oxylipins as developmental and host-fungal communication signals. *Trends Microbiol* 15: 109-118
- Twumasi-Boateng K, Yu Y, Chen D, Gravelat F, Nierman W, Sheppard D (2009a) Transcriptional profiling identifies a role for BrlA in the response to nitrogen depletion and for StuA in the regulation of secondary metabolite clusters in *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryot Cell* 8: 104-115
- Twumasi-Boateng K, Yu Y, Chen D, Gravelat FN, Nierman WC, Sheppard DC (2009b) Transcriptional profiling identifies a role for BrlA in the response to nitrogen depletion and for StuA in the regulation of secondary metabolite clusters in *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryot Cell* 8: 104-115
- van den Berg M, Albang R, Albermann K, Badger J, Daran J, Driessen A, Garcia-Estrada C, Fedorova N, Harris D, Heijne W, Joardar V, Kiel J, Kovalchuk A, Martín J, Nierman W, Nijland J, Pronk J, Roubos J, van der Klei I, van Peij N, Veenhuis M, von Döhren H, Wagner C, Wortman J, Bovenberg R (2008) Genome sequencing and analysis of the filamentous fungus *Penicillium chrysogenum*. *Nat Biotechnol* 26: 1161-1168
- Vargas-Pérez I, Sánchez O, Kawasaki L, Georgellis D, Aguirre J (2007) Response regulators SrrA and SskA are central components of a phosphorelay system involved in stress signal transduction and asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot Cell* 6: 1570-1583
- Vila L, Lacadena V, Fontanet P, Martinez del Pozo A, San Segundo B (2001) A protein from the mold *Aspergillus giganteus* is a potent inhibitor of fungal plant pathogens. *Mol Plant Microbe Interact* 14: 1327-1331
- Virginia M, Appleyard C, McPheat W, Stark M (2000) A novel 'two-component' protein containing histidine kinase and response regulator domains required for sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Curr Genet* 37: 364-372
- Voet D, Voet JG (1995) *Biochemistry* 2nd edition, John Wiley & Sons, New York.
- White S, McIntyre M, Berry D, McNeil B (2002) The autolysis of industrial filamentous fungi. *Crit Rev Biotechnol* 22: 1-14

- Wnendt S, Ulbrich N, Stahl U (1994) Molecular cloning, sequence analysis and expression of the gene encoding an antifungal-protein from *Aspergillus giganteus*. *Curr Genet* 25: 519-523
- Yu J, Wieser J, Adams T (1996) The *Aspergillus* FlbA RGS domain protein antagonizes G protein signaling to block proliferation and allow development. *EMBO J* 15: 5184-5190
- Zadra I, Abt B, Parson W, Haas H (2000) xylP promoter-based expression system and its use for antisense downregulation of the *Penicillium chrysogenum* nitrogen regulator NRE. *Appl Environ Microbiol* 66: 4810-4816
- Zhang W, Shi L (2005) Distribution and evolution of multiple-step phosphorelay in prokaryotes: lateral domain recruitment involved in the formation of hybrid-type histidine kinases. *Microbiology* 151: 2159-2173
- Zuber S, Hynes M, Andrianopoulos A (2002) G-protein signaling mediates asexual development at 25 degrees C but has no effect on yeast-like growth at 37 degrees C in the dimorphic fungus *Penicillium mameeffei*. *Eukaryot Cell* 1: 440-447

10. Függelék

10.1. *A. clavatus* által termelt AcAFP aminosav-szekvenciájának hasonlósága a *P. chrysogenum* törzs által termelt PAF-vel.

A fehérjék szekvenciáját a Multiple Sequence Alignment-ClustalW programmal (Thompson és mtsai. 1994) hasonlítottuk össze.

A. clavatus AcAFP, ID: ABR10398.1 (Skouri-Gargouri és mtsai. 2009)

P. chrysogenum PAF, ID: CAP86946.1 (Marx és mtsai. 1995)

	10	20	30	40	50	60
AcAFPx0	MKFVSLASLG	FALVAA	LVVSPVD	ADSLA	AGGLDAR	DES
PAFxxx1	MQITTV	ALF--L	FAAMGGV	ATPIES	---	VSNDLDAR
Prim.cons.	M22222	ASL2F	AL2AA	2G2VA	2P222	DSL2222
	70	80	90			
AcAFPx0	AQSGKTA	ICKC---	YVKVC	PRDGAK	CEFD	SYGKCYC-
PAFxxx1	NDAGKD	TFIKC	PKFDN	KKCTK	DNKC	TVDTYN
Prim.cons.	222GK	2222K	CPKF	22K2C	22D22K	22D2Y22222CD

Alignment data :

Alignment length : 98

Identity (*) : 39 is 39.80 %

Strongly similar (:) : 18 is 18.37 %

Weakly similar (.) : 13 is 13.27 %

Different : 28 is 28.57 %

Sequence 0001 : AcAFPx0 (94 residues).

Sequence 0002 : PAFxxx1 (92 residues).

10.2. *A. nidulans* RodA, illetve *A. fumigatus* RodB fehérjék szekvencia hasonlósága a *P. chrysogenum* feltételezett homológjaival

Az *A. nidulans* RodA (Stringer és mtsai. 1991), illetve az *A. fumigatus* RodB (Paris és mtsai. 2003) fehérjék homológjainak keresése *P. chrysogenum*ban az 5. 17. fejezetben ismertett módon történt. A feltételezett fehérjék szekvenciáját a Multiple Sequence Alignment-ClustalW programmal (Thompson és mtsai. 1994) hasonlítottuk össze.

RodA

A. nidulans rodA, ID: AAA33321 (Stringer és mtsai. 1991)

P. chrysogenum rodA, ID: Pc22g14290 E érték: 2e-50

	10	20	30	40	50	60
Anidulans	MKFSIAAAVVF	AASVAALPP	AHDSQFAGNG	--VGNKGN	SNVKFPVP	ENVTVKQASDKC
Pchrysogen	MQFSLSAIVL	GLAATAYALPP	GGPNAGGAGNG	VGNGKNTDVR	FAVPDNMTVKQA	AKC
Prim.cons.	M2FS22A2V222	AA222ALPPG222	222AGNGNGVG	NKGN22V2F2VP	2N2TVKQA22	KC
	70	80	90	100	110	120
Anidulans	GDQAQLSCCN	KATYAGDTT	TVDEGLLSG	ALSGALIGAG	SGAEGGLFD	QCSKLDVAV-LIG
Pchrysogen	GDQAQLSCCN	KATYAGDTT	DINSGLLGG	ALSNLIGSGS	GANGLFDQCS	KLDLQIPILIG
Prim.cons.	GDQAQLSCCN	KATYAGDTT222	22G2L2GALS2	LIG2GSGA2GL	GLFDQCSKLD	222P2IG
	130	140	150	160		
Anidulans	I--QDLVNQK	CKQNIACCQ	NSPSSADGN	LIGVGLPCV	ALGSIL	
Pchrysogen	IPLQDLVNQK	CKQNIACCQ	NSPSSANS	DLIGVGLPC	IALGSIL	
Prim.cons.	IPLQDLVNQK	CKQNIACCQ	NSPSSA222	LIGVGLPC2A	LGSIL	

Alignment data :

Alignment length : 163

Identity (*) : 116 is 71.17 %

Strongly similar (:) : 24 is 14.72 %

Weakly similar (.) : 9 is 5.52 %

Different : 14 is 8.59 %

Sequence 0001 : Anidulans (157 residues).

Sequence 0002 : Pchrysogen (163 residues).

RodB

***A. fumigatus* RodB, ID: XP_753093.1 (Paris és mtsai. 2003)**

***P. chrysogenum* RodB, ID: Pc21g18350 E érték: 6e-21**

	10	20	30	40	50	60
Afumigatus	MKFLAVVSLAATLALPN-	AGVVHPTFASADKYTLQQAQNKCGEHTT	LSCCNHVS	KVGD		
Pchrysogenum	MQFTLSAAVLAFAGLAAVPAQQAPRFSVPDSL	TVEQAQSKCGDQAQLSCCN	SATYAGD			
Prim.cons.	M2F222222LA222LA222PA2222P2F222D22T22QAQ2KCG2222LSCCN22222GD					
	70	80	90	100	110	120
Afumigatus	TTAFNYGLLNGLLGNAI--	SGPEGVGILSGCQKISVTALIG--	VDDL	LNKQCQ	QNVAC	
Pchrysogenum	TTDINSGLSGALSNLIGAGSGAKGLGIFDQCSKLD	QIPIIGIAAQDILNQCKQN	IAC			
Prim.cons.	TT22N2G2L2G2L2N2IGAGSG22G2GI222C2K222222I2GIA22D2LN22C2QN2AC					
	130	140				
Afumigatus	CQDNKSVATGGLINIATPACVALDSII					
Pchrysogenum	CANSPSEANNDLVGAGLP-CVALGSIL					
Prim.cons.	C2222S2A222L22222PACVAL2SI2					

Alignment data :

Alignment length : 147

Identity (*) : 60 is 40.82 %

Strongly similar (:) : 26 is 17.69 %

Weakly similar (.) : 24 is 16.33 %

Different : 37 is 25.17 %

Sequence 0001 : Afumigatus (140 residues).

Sequence 0002 : Pchrysogenum (146 residues).

11. Publikációs lista

A dolgozat alapjául szolgáló publikációk:

Hegedűs N, Sigl C, Zadra I, Pócsi I, Marx F (2011) The *paf* gene product modulates asexual development in *Penicillium chrysogenum*. Journal of Basic Microbiology doi: 10.1002/jobm.201000321

Impakt faktor:1,319

Hegedűs N, Leiter É, Kovács B, Tomori V, Kwon NJ, Emri T, Marx F, Batta G, Csernoch L, Haas H, Yu JH, Pócsi I (2011) The small molecular mass antifungal protein of *Penicillium chrysogenum* – a mechanism of action oriented review, Journal of Basic Microbiology - közlésre benyújtva /submitted for publication (revision is submitted)

Impakt faktor:1,319

A témában megjelent egyéb publikációk:

Galgózy L, Papp T, Pócsi I, **Hegedűs N**, Vágvölgyi C (2008) In vitro activity of *Penicillium chrysogenum* antifungal protein (PAF) and its combination with fluconazole against different dermatophytes. Antonie Van Leeuwenhoek 94(3): 463-470

Impaktfaktor: 1,673

Barna B, Leiter É, **Hegedűs N**, Bíró T, Pócsi I (2008) Effect of the *Penicillium chrysogenum* antifungal protein (PAF) on barley powdery mildew and wheat leaf rust pathogens. Journal of Basic Microbiology 48:1-5

Impakt faktor: 1,051

Batta G, Barna T, Gáspári Z, Sándor S, Kövér K, Binder U, Sarg B, Kaiserer L, Chhillar AK, Eigentler A, Leiter E, **Hegedűs N**, Pócsi, Lindner H, Marx F (2009) Functional aspects of the solution structure and dynamics of PAF, a highly stable antifungal protein from *Penicillium chrysogenum*. FEBS Journal 276: 2875–2890
Impakt faktor: 3,042

Balázs A, Pócsi I, Hamari Z, Leiter E, Emri T, Miskei M, Oláh J, Tóth V, **Hegedűs N**, Prade RA, Molnár M, Pócsi I (2010) AtfA bZIP-type transcription factor regulates oxidative and osmotic stress responses in *Aspergillus nidulans* Mol Genet Genomics 283: 289–303
Impakt faktor: 2,579

Egyéb publikációk:

Hegedűs N, Emri T, Szilágyi J, Karányi Z, Nagy I, Penninckx MJ, Pócsi I (2007) Effect of heavy metals on the glutathione status in different ectomycorrhizal *Paxillus involutus* strains. World J Microbiol Biotechnol 23: 1339-1343
Impakt faktor: 0,945

Konferencia előadások, poszterek:

Hegedűs N, Emri T, Nagy I, Pócsi I. Investigation on heavy metal accumulation in different ectomycorrhizal *Paxillus involutus* strains. 3th Hungarian Conference on Mycology, Matrahaza, Hungary, May 2005. - Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica 52(2): 247

Galgóczy L, Papp L, Pócsi I, **Hegedűs N**, Vágvölgyi C. Combination effect of *Penicillium chrysogenum* antifungal protein (PAF) with fluconazole on different dermatophytes. 4th Hungarian Conference on Mycology, Debrecen, Hungary, May 2008 - Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica 55 (2): 194

Hegedűs N, Pócsi I, Marx F: Analysis of the physiological function of the *Penicillium chrysogenum* antifungal protein PAF. 4th Hungarian Conference on Mycology, Debrecen, Hungary, May 2008 - Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica 55 (2): 197

Leiter E, Barna B, **Hegedűs N**, Szilágyi J, Bíró T, Pócsi I: Investigation on the effect of PAF on Barley powdery mildew and wheat leaf rust pathogens. 4th Hungarian Conference on Mycology, Debrecen, Hungary, May 2008 - Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica 55 (2): 217

Hegedűs N, Pócsi I, Marx F: The *Penicillium chrysogenum* antifungal protein PAF: a signalling molecule? 9th European Conference on Fungal Genetics, University of Edinburgh, Scotland, 5 - 8 April 2008

Hegedűs N, Sigl C, Zadra I, Pócsi I, Marx F: The antifungal protein PAF regulates conidiation in *Penicillium chrysogenum*, The Biology of Fungi - IMC9 Edinburgh, Scotland, 1 - 6 August 2010