

**Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei**  
**Thesis of PhD dissertation**

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

**Investigation of the physiological function of the  
*Penicillium chrysogenum* antifungal protein (PAF)**

Hegedűs Nikoletta

Témavezető/Supervisor: Dr. Pócsi István



**DEBRECENI EGYETEM**  
**Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola**

**Debrecen, 2011**

## 1. Bevezetés

A *Penicillium chrysogenum* fonalas gomba termel egy 6,25 kDa molekulatömegű, bázikus, ciszteinben gazdag fehérjét a PAF-ot, amely számos humán- és növénypatogén gomba, valamint az *Aspergillus nidulans* fonalas modell szervezet 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.

Antimikrobiális fehérjék széles körben termelődnek az élővilágban a prokariótáktól a egészen a gerincesekig (Tao és mtsai. 1990, Ganz 1994, Dimarcq és mtsai. 1998, García-Olmedo és mtsai. 1998, Tossi és mtsai. 2000, Raj és Dentino 2002). Magasabb rendű eukariótákban az immunrendszer részét képezik (Baker és mtsai. 1997, Fritig és mtsai. 1998, Lehrer és Ganz 1999, Raj és Dentino 2002). Prokariótákban és alacsonyabb rendű eukariótákban szerepük kevésbé tanulmányozott, nagy valószínűséggel szelekciós előnyt biztosítanak a termelő szervezetnek a táplálékért folytatott harcban (Marx 2004, Meyer és mtsai. 2005). Antimikrobiális hatású, ciszteinben gazdag, bázikus proteineket mára több fonalas Ascomycotában (*Aspergillus giganteus*, *P. chrysogenum*, *A. niger*, *P. nalgiovense*, *A. clavatus*) izoláltak (Wnendt és mtsai. 1994, Gun Lee és mtsai. 1999, Geisen 2000, Theis és mtsai. 2003, Skouri-Gargouri és Gargouri 2008). Eddig a legtöbb ismeretanyag 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). A fonalas gombák többsége a természetben valamilyen felülethez kötötten fordul elő (Hill 1972, Dalceró és mtsai. 1997), ahol a gombahifák spóráképzésre irányuló differenciálódási folyamatai is megfigyelhetők. Meyer és munkatársai (2002) kimutatták, hogy az *A. giganteus* *afp* génje az aszexuális sporuláció folyamán, szigorú térbeli és időbeli szabályozás alatt áll. Arra kerestünk választ, hogy az *afp*-hez hasonlóan a *P. chrysogenum* felületi tenyészetében a *paf* géntermék megjelenése köthető-e a termelő szervezet, aszexuális differenciálódási folyamataihoz illetve, hogy a fehérje termelése befolyásolja-e a *P. chrysogenum* mitospóra fejlődését.

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 nyomon követtük a felületi tenyészet mitospóra fejlődését különböző markerek (konidioforumok megjelenése, egységnyi felületen termelődött konídiumok száma) és markergének (*brlA*, a *rodA* és a *rodB*) segítségével.

Létrehoztunk egy *paf* deléciós mutánst a *P. chrysogenum* Q176 törzsben, és tanulmányoztuk a  $\Delta paf$  törzs differenciálódási folyamatait. Visszaültettük a deletált gént a hiánymutáns genomjába és vizsgáltuk a  $\Delta paf::\Delta paf$  törzs mitospóra termelését. Tanulmányoztuk a tápagarhoz adagolt PAF hatását a  $\Delta paf$  törzs spórázási képességére, ezen kívül megvizsgáltuk a *P. chrysogenum*  $\Delta brlA$  törzs *paf* transzkripcióját.

Mivel fonalas gombákban a sporuláció, a szabályozását és a funkcióját tekintve is szorosan kapcsolódik az autolízishez (Emri és mtsai. 2005, Pócsi és mtsai. 2009), valamint a PAF bőségesen szekretálódik a *P. chrysogenum* öregedő süllyesztett tenyészetében, felvetődött a kérdés, hogy lehet-e hatása a fehérje termelődésének a tenyészet autolitikus sejtpusztulási folyamataira. Ezért tanulmányoztuk a *P. chrysogenum*  $\Delta paf$  törzs szénéhező, süllyesztett tenyészetének autolízisét.

A PAF antibiózisban betöltött szerepe fontos fegyvernek bizonyulhat az élőlények természetes kiválasztódását eredményező versenyben. Doktori munkám keretében lehetőségem nyílt a PAF, szenzitív organizmusokban kifejtett hatásmechanizmusának a tanulmányozására is. 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 (Hagiwara és mtsai. 2007b, 2009, 2011, Vargas-Pérez és mtsai. 2007). A két rendszer közvetlen összekapcsoltsága hatékonyan segíti a modellszervezet adaptációját a különféle környezeti stresszhatásokhoz. Mivel a PAF már mikromólos koncentrációban oxidatív stresszt vált ki *A. nidulansban* (Kaiserer és mtsai. 2003, Leiter és mtsai. 2005), azt feltételeztük, hogy aktiválja az SskA-HogA/SakA- és/vagy az SrrA-val kapcsolt jelátviteli útvonalakat. Ezért megvizsgáltuk a következő *A. nidulans* mutánsok növekedését PAF kezelés hatására:  $\Delta sskA$ ,  $\Delta srrA$ ,  $\Delta napA$ ,  $\Delta nikA$ ,  $\Delta hogA$ ,  $\Delta sskA/srrA$ ,  $\Delta srrA/hogA$ .

## 2. Módszerek

A plazmidépítéshez *Escherichia coli* **DH5a** törzset használtunk. A *paf* deléció mutáns létrehozásához a *Penicillium chrysogenum* **Q176** (ATCC 10002) törzset használtunk vad típusként (vt). A *Penicillium chrysogenum*  $\Delta$ *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*  $\Delta$ *Pcku70* (*niaD*, *Pcku70::nat1*) (Hoff és mtsai. 2010) 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 (1. táblázat) *A. nidulans* mutáns törzseken tanulmányoztuk. A mutánsokat Daisuke Hagiwara (Tohoku University, Japan) biztosította számunkra.

1. 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)
$\Delta$ <i>sskA</i>	<i>biA1, pyrG89, wA3, argB2, pyroA4, sskA::argB</i>	(Hagiwara és mtsai. 2007a)
$\Delta$ <i>srrA</i>	<i>biA1, pyrG89, wA3, argB2, pyroA4, srrA::argB</i>	(Hagiwara és mtsai. 2007a)
$\Delta$ <i>napA</i>	<i>biA1, pyrG89, wA3, argB2, pyroA4, napA::argB</i>	(Asano és mtsai. 2007)
$\Delta$ <i>nikA</i>	<i>biA1, pyrG89, wA3, argB2, pyroA4, nikA::argB</i>	(Hagiwara és mtsai. 2007b)
$\Delta$ <i>hogA</i>	<i>biA1, pyrG89, wA3, argB2, pyroA4, hogA::argB</i>	(Hagiwara és mtsai. 2007b)
$\Delta$ <i>sskA/srrA</i>	<i>biA1, pyrG89, wA3, argB2, pyroA4, sskA::argB, srrA::argB</i>	(Hagiwara és mtsai. 2007a)
$\Delta$ <i>srrA/hogA</i>	<i>biA1, pyrG89, wA3, argB2, pyroA4, srrA::argB, hogA::argB</i>	(Hagiwara és mtsai. 2007b)

Az *E. coli*-t LB táptalajon növesztettük, amit szükség esetén ampicillinnel egészítettünk ki (100 µg/ml).

*P. chrysogenum* törzsek esetén a minimál táptalajt (MM) Marx és munkatársai (1995) nyomán készítettük el. A *P. chrysogenum*  $\Delta Pcku70$  valamint a  $\Delta brlA$  törzsek esetében a MM-t 2,5 g/l argininnel egészítettük ki.

A PAF *P. chrysogenum* Q176 növekedésére kifejtett hatását és a fehérje hatásmechanizmusát komplex táptalaj felhasználásával (CM) tanulmányoztuk (Kaiserer és mtsai. 2003). 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 egészítettük ki.

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

Annak érdekében, hogy az aszexuális differenciálódási folyamatokat szinkronizáltan indukálhassuk (Mah és Yu 2006) *P. chrysogenum*-ban, 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 felületén egyenletesen eloszlattuk, majd 25 °C-on inkubáltuk. A micélium begyűjtésének elősegítésére a tápagart előzőleg steril dialízis-membránnal (Spectra/Por4 – 12-14 kD MWCO Spectrumlabs-Németország) borítottuk.

A pontoltásos kísérletekhez a megfelelő tenyészetek frissen termelődött spóráit gyűjtöttük be. A pontoltáshoz 5 µl spóraszuszpenziót pipettáztunk a megfelelő tápagar felületére. A spóraszuszpenzió a kísérletektől függően  $10^5$ ,  $10^4$  illetve  $2 \times 10^3$  gombaspórát tartalmazott.

Az autolízis vizsgálatokhoz szükséges szénéhező tenyészetet úgy állítottuk elő, hogy a *P. chrysogenum* (MM-ba leoltott) süllyesztett kultúráját 48 óráig rázattuk, majd a teljes biomasszát szacharózmentes MM-ra mostuk és 25 °C, 220 rpm-en rázattuk.

Az alapvető molekuláris biológiai módszereket, mint a baktériumsejtek transzformálása és a plazmid DNS preparálása Sambrook és munkatársai (1989) szerint hajtottuk végre. A restriktációs emésztéseket és ligálásokat a gyártó (Promega) javaslatai alapján végeztük. A DNS mintákat agaróz gélen (0,8 – 1 % agaróz 1x TBE pufferben)

ellenőriztük gélelektroforézissel. A nukleinsav koncentrációkat a Pharmacia Biotech Gene Quant II spektrofotométerrel határoztuk meg.

A *P. chrysogenum paf* deléciós mutáns létrehozásához a „Split-marker” módszert (Nielsen és mtsai. 2006) használtuk.

A *P. chrysogenum* genomi DNS izolálását Zadra és mtsai. (2000) szerint végeztük. A gomba transzformációját Tilburn és munkatársai (1995) nyomán hajtottuk végre. A transzformációhoz szükséges protoplasztokat Cantoral és munkatársai (1987), valamint Kolar és munkatársai (1988) nyomán állítottuk elő.

Az RNS izolálás TRISOL (Sigma Aldrich) reagenssel történt a folyékony nitrogénben eldörzsölt gombaszövetekből Chomczynski (1993) leírása alapján.

A Southern blot és a Northern blot analíziseket Sambrook és munkatársai (1989) nyomán végeztük. A Hybond-N<sup>+</sup> (Amersham Bioscience) membránra blottolt nukleotid mintákat digoxigenin-jelölt próbákkal (Boehringer Mannheim) hibridizáltuk. A hibridizációs próbákat PCR amplifikációval állítottuk elő.

A dolgozatban felhasznált primereket a 2. táblázat foglalja össze. A primereket a Microsynth (Ausztria) biztosította számunkra.

A *P. chrysogenum* csírázási képességét Oh és munkatársai (1996) szerint határoztuk meg.

Az autolízis nyomon követésére sülyesztett szénéhező tenyészetek szárazanyag-tartalom (Pusztahelyi és mtsai. 1997) és a kitináz aktivitás (Emri és mtsai. 2004) változását vizsgáltuk.

A mikroszkópos vizsgálatokat Leica MZ16 sztereomikroszkóp és Olympus CK40 fénymikroszkóp segítségével végeztük.

A spórázási képességet úgy határoztuk meg, hogy a pontleoltással létrehozott felületi tenyészetek esetén megmértük a kialakult telep átmérőjét, a szinkronizált felületi tenyészetekből egy meghatározott területet vágunk ki dugófúróval (d=8mm). Az ismert felületű telepekről, ismert térfogatú „spóramosó oldatban” (9 g/l NaCl, 0,01 % (v/v) Tween 80), vortexeléssel távolítottuk el a spórákat. Bürker-kamra segítségével megszámoltuk az így kapott spóraelegy spóraszámát, és elosztottuk a telep felületével, megkapva a spóraszám/cm<sup>2</sup> értéket.

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.

2. táblázat. A dolgozatban felhasznált primerek

<b>primer</b>	<b>szekvencia (5' → 3')</b>
opaf1	GGTACCATCGCCCAAATCACCACAGTTG
opafrev	GATCGGATCCCTAGTCACAATCGACAGC
obr1Afw	TCCTACTCCCACGCCTAC
obr1Arev	CCTGGCTCCTTGCACTTG
orodAfw	CTTACGCTCTTCCCCCTG
orodArev	GCTGGAAGGAGAGTTCTGG
orodBfw	ATGCAGTTCACTCTCTCCG
orodBrev	ACGAGGTCGTTGTTGGCC
opaf5	CGAAAAGGCAAAGGCAC
o5pafA1	CGATGCTACGTCACTTGTTAGCG
o5pafArev	ACGTGGATCCTATGAAGGGCTTGAGATGATG
o3pafAse	ACGTGTCGACATGGTCTCTGCGATCACCAGG
o3pafA2	CACAACCTTACGCATGCGGAG
o3pafArev	ACGTTCTAGACCAAAGGCTTCCCCGTCATC
o5pafAse	ACGTGGTACCGACAGCTTAGTGGACCGGCAG
o5pafcomp	GATGGTACCACTTGCGTAATAACCGGG
o3pafcomp	CACGGTACCCTTCCTTGACTTACTCCC
onat1	CGCCGGTACGCGTGGATCGC
onat2	AGGCACTGGATGGGTCCCTCAC

### 3. Új tudományos eredmények

A *P. chrysogenum* jól tolerálja a PAF-kezelést. A „PAF-érzékeny” *A. nidulans* már 50 µg/ml-es PAF-koncentráció hatására 70 %-kal kisebb átmérőjű telepeket képzett az agarlemezek felszínén. Ugyanakkor a termelő szervezet telepeinek átmérője még 200 µg/ml-es PAF koncentrációt alkalmazva is csupán körülbelül 28 %-kal csökkent a kezeletlen telepekhez képest.

A *paf* mRNS már a *P. chrysogenum* 36 órás sülyesztett tenyészetének micéliumában detektálható, és a transzkripció a tenyésztés 60. órájában éri el a maximumát. A *paf* expressziós mintázata hasonló képet mutat az ortológ *A. giganteus* *afp* sülyesztett tenyésztésben mért adatokkal (Meyer és mtsai. 2002, Marx 2004)

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. A *paf*, valamint a *brlA*, a *rodA* és a *rodB* sporulációt jelző gének expressziós profilját vizsgálva kiderült, hogy a négy gén szimultán expresszálódik, jól korrelálva a *P. chrysogenum* tenyészetek mitospórafejlődésével.

Annak érdekében, hogy részletesebben tanulmányozhassuk a PAF termelő szervezetben betöltött élettani szerepét, létrehoztunk egy *paf* deléciós mutánst a *P. chrysogenum* Q176 törzsben. A gén delécióját úgy hajtottuk végre, hogy a *paf*-ot kódoló génszakaszt nourseothricin-rezisztenciát biztosító génnel (Krügel és mtsai. 1993, Kück 2006) cseréltük ki.

A  $\Delta paf$  törzs sporulációs képessége szignifikánsan csökkent a vad típushoz képest, amely együtt járt a *brlA*, a *rodA* és a *rodB* sporulációt jelző gének repressziójával. Megjegyzendő, hogy a deléció nem befolyásolta a termelő szervezet csírázásási képességét és nem érintette a tenyészetek növekedését sem.

A  $\Delta paf$  törzs csökkent mértékű konídium termelését sikeresen komplementálta a deletált gén visszaültetése a hiánymutáns genomjába. Ugyanakkor a tápagarhoz adagolt PAF-vel nem voltunk képesek helyreállítani a vad fenotípust a  $\Delta paf$  törzsben, ami felveti annak a lehetőségét is, hogy a fehérje élettani szerepét a szekréció folyamán fejt ki.



A *P. chrysogenum* vad típusú és  $\Delta paf$  törzsek szénéhező folyadék kultúrái egymáshoz hasonló ütemben autolizáltak, ami arra utal, hogy a PAF termelődése nem játszik szerepet a süllyesztett tenyészet autolízisének a szabályozásában. Azt feltételezhetjük, hogy a PAF termelésének élettani szerepe felületi tenyészetekre korlátozódik, ahol megfelelő környezeti szignálok hatására a termelő szervezet differenciálódási folyamatai is érvényesülnek.

A PAF-kezelt  $\Delta sskA$ ,  $\Delta srrA$ ,  $\Delta napA$ ,  $\Delta nika$ ,  $\Delta hogA$ ,  $\Delta sskA/srrA$ ,  $\Delta srrA/hogA$  mutáns törzsek növekedésének vizsgálata alapján azt feltételezzük, hogy a PAF SrrA-val kapcsolt jelátviteli rendszeren keresztül fejt ki antifungális hatását a NikA hisztidin kináz, illetve az SskA-HogA/SakA 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 hatékonyabb konídium-termeléssel kombinálva, ugyanakkor elősegíti a *P. chrysogenum* alkalmazkodóképességét a változó környezeti feltételekhez, szelekciós előnyt biztosítva a konkurens mikroorganizmusokkal szemben.

## 1. Introduction

The filamentous fungus *Penicillium chrysogenum* secretes a low molecular mass (6,25 kDa), cysteine-rich and cationic protein PAF, which exhibits cytotoxic activity towards a variety of filamentous fungi, among them zoo- and plant pathogens and the model organism *Aspergillus nidulans* (Kaiserer, et al. 2003, Galgóczy, et al. 2005, 2008, Barna, et al. 2008). Our research group is working with PAF for 15 years. Growth inhibition spectrum and mechanism of action of the protein were studied assiduously, but the significance of its production in *P. chrysogenum* cultures remained unclear. Our aim was to investigate the physiological role of PAF production in *P. chrysogenum* cultures.

Antimicrobial proteins are widely distributed in nature including prokaryotes and vertebrate (Tao, et al. 1990, Ganz 1994, Dimarcq, et al. 1998, García-Olmedo, et al. 1998, Tossi, et al. 2000, Raj and Dentino 2002). In higher eucaryotes many antimicrobial proteins accomplish an important function in innate immunity (Baker, et al. 1997, Fritig, et al. 1998, Lehrer and Ganz 1999, Raj and Dentino 2002). 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 (Marx 2004, Meyer, et al. 2005). Antimicrobial cysteine-rich and cationic proteins were isolated from numerous filamentous Ascomycetes (*Aspergillus giganteus*, *P. chrysogenum*, *A. niger*, *P. nalgiovense*, *A. clavatus*) to date (Wnendt, et al. 1994, Gun Lee, et al. 1999, Geisen 2000, Theis, et al. 2003, Skouri-Gargouri and Gargouri 2008). PAF is the best characterized antifungal protein of fungal origin in addition to the ortholog 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 (Hill 1972, Dalcero, et al. 1997). Meyer et al (2002) revealed that expression of *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.

We examined the effect of PAF on the growth of *P. chrysogenum* Q176 surface culture and transcriptional profile of *paf* in submerged and surface cultures of the producing organism was investigated. In parallel the asexual development of the surface cultures was monitored applying developmental markers (first appearance of conidiophores, conidial number

produced by one square centimetres of surface culture), and marker genes (*brlA*, a *rodA* és a *rodB*).

To further analyze the function of PAF in the developmental process we deleted the *paf* gene in *P. chrysogenum* Q176 and mitospore development of the  $\Delta paf$  strain was examined. We retransformed the wild type copy of *paf* gene into *P. chrysogenum*  $\Delta paf$  genome and mitospore production of  $\Delta paf::\Delta paf$  strain was examined. The effect of external administration of purified PAF protein into the agar medium was investigated on the conidiation efficiency of  $\Delta paf$  strain, as well. Therewith we examined the *paf* transcription profile of *P. chrysogenum*  $\Delta brlA$  strain.

Conidiogenesis and autolysis are tightly coupled processes in filamentous fungi and the regulatory networks behind these phenomena share common elements (Emri, et al. 2005, Pócsi, et al. 2009). 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. Therefore we examined the autolysis rate of the carbon-starving submerged culture of *P. chrysogenum*  $\Delta paf$  strain.

The role played by PAF in antibiosis might confer advantage for *P. chrysogenum* in the process of natural selection. I had the opportunity to investigate the antifungal mode of action of PAF, as well. 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* (Hagiwara, et al. 2007b, 2009, 2011, Vargas-Pérez, et al. 2007). The direct linkage between the above mentioned systems plays important role in adaptation of the model organism to different stress factors. Considering that PAF treatments (in micromolar concentrations) cause oxidative stress in *A. nidulans* (Kaiserer, et al. 2003, Leiter, et al. 2005) it was reasonable to assume 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. Therefore we examined the effect of PAF on the growth of the following *A. nidulans* mutant strains:  $\Delta sskA$ ,  $\Delta srrA$ ,  $\Delta napA$ ,  $\Delta nikA$ ,  $\Delta hogA$ ,  $\Delta sskA/srrA$ ,  $\Delta srrA/hog$ .

## 2. Materials and methods

*Escherichia coli* DH5 $\alpha$  strain was used for plasmid construction. For generating *paf* deletion mutant we used *Penicillium chrysogenum* Q176 (ATCC 10002) strain as a wild type (wt). *Penicillium chrysogenum*  $\Delta$ *brlA* (*niaD*, *Pcku70::nat1*, *brlA::ergA*) mutant (Sigl, et al. 2010) (Sandoz GmbH strain collection, Kundl, Austria) derived from *Penicillium chrysogenum*  $\Delta$ *Pcku70* (*niaD*, *Pcku70::nat1*) (Hoff, et al. 2010) strain which allows efficient disruption of any target gene via homologous recombination. The *Aspergillus nidulans* FGSC 4A (Glasgow wild type) was used as a control strain for studying the effect of PAF on the growth of *P. chrysogenum*. Mode of action of PAF was studying on different *A. nidulans* mutant strains (Table 1) The strains were provided by Daisuke Hagiwara (Tohoku University, Japan).

Table 1 . *A. nidulans* strains mutated in stress response genes

Strain	Genotype	Source
ABPU1 (wild-type)	<i>biA1</i> , <i>pyrG89</i> , <i>wA3</i> , <i>argB2</i> , <i>pyroA4</i>	(Hagiwara, et al. 2007a)
BPU1 (control)	<i>biA1</i> , <i>pyrG89</i> , <i>wA3</i> , <i>argB2</i> , <i>pyroA4</i> , <i>argB+</i>	(Hagiwara, et al. 2007a)
$\Delta$ <i>sskA</i>	<i>biA1</i> , <i>pyrG89</i> , <i>wA3</i> , <i>argB2</i> , <i>pyroA4</i> , <i>sskA::argB</i>	(Hagiwara, et al. 2007a)
$\Delta$ <i>srrA</i>	<i>biA1</i> , <i>pyrG89</i> , <i>wA3</i> , <i>argB2</i> , <i>pyroA4</i> , <i>srrA::argB</i>	(Hagiwara, et al. 2007a)
$\Delta$ <i>napA</i>	<i>biA1</i> , <i>pyrG89</i> , <i>wA3</i> , <i>argB2</i> , <i>pyroA4</i> , <i>napA::argB</i>	(Asano, et al. 2007)
$\Delta$ <i>nikA</i>	<i>biA1</i> , <i>pyrG89</i> , <i>wA3</i> , <i>argB2</i> , <i>pyroA4</i> , <i>nikA::argB</i>	(Hagiwara, et al. 2007b)
$\Delta$ <i>hogA</i>	<i>biA1</i> , <i>pyrG89</i> , <i>wA3</i> , <i>argB2</i> , <i>pyroA4</i> , <i>hogA::argB</i>	(Hagiwara, et al. 2007b)
$\Delta$ <i>sskA/srrA</i>	<i>biA1</i> , <i>pyrG89</i> , <i>wA3</i> , <i>argB2</i> , <i>pyroA4</i> , <i>sskA::argB</i> , <i>srrA::argB</i>	(Hagiwara, et al. 2007a)
$\Delta$ <i>srrA/hogA</i>	<i>biA1</i> , <i>pyrG89</i> , <i>wA3</i> , <i>argB2</i> , <i>pyroA4</i> , <i>srrA::argB</i> , <i>hogA::argB</i>	(Hagiwara, et al. 2007b)

*E. coli* was grown on LB, supplemented with ampicillin (100 µg/ml).

*P. chrysogenum* strains were grown on minimal (MM - Marx, et al. 1995). In the case of *P. chrysogenum*  $\Delta Pcku70$  and a  $\Delta brlA$  strains 2.5 g/l arginine was added to MM.

The effect of PAF on the growth of *P. chrysogenum* Q176 strain and the mode of action of the protein was studied on complex medium (CM - Kaiserer, et al. 2003). In the case of *A. nidulans* strains mutated in stress response genes, CM was supplemented with 0.61 g/l uridine, 0.56 g/l uracil, 2.5 mg/l pyridoxine and/or 1 mg/l biotine.

For submerged cultivation of *P. chrysogenum*  $6 \times 10^8$  spores were grown at 25°C on 220 rpm for 19 h in 200 ml MM. Because *P. chrysogenum*  $\Delta brlA$  mutant does not form conidia, 2 g of semidry mycelia were measured into MM. Mycelia were gained from four days old surface culture applying a sterile scalpel.

For synchronized asexual developmental induction, submerged cultures of *P. chrysogenum* were cultivated for 19 h in 200 ml MM (The  $\Delta Pcku70$  and  $\Delta brlA$  strains, however were cultivated longer -36 h- because of lower proliferation rates). Then the mycelia were harvested by filtration and transferred to solid MM, and were further incubated for various cultivation times. To facilitate harvesting surface mycelia, MM agar was covered with sterile dialysis membrane (Spectra/Por4 – 12-14 kD MWCO Spectrumlabs-Germany) in advance.

For point inoculation, conidia were harvested freshly from the appropriate cultures. According to the experiments  $10^5$  and  $10^4$  illetve  $2 \times 10^3$  conidia were point inoculated onto MM or CM agar surface.

To get carbon-starving submerged culture for autolysis study, mycelia from 48 h old submerged culture of *P. chrysogenum* (cultivated on MM) was transferred to saccharose free MM and cultivated further on 25 °C and 220 rpm.

Basic molecular methods, like transformation of bacterial cells and preparation of plasmid DNA were carried out as described previously (Sambrook, et al. 1989). Restriction digestion and ligation were done as manufactures (Promega) suggested. DNA samples were analysed by gelelectrophoresis on agarose gel (0.8 – 1 % agarose, 1 x TBE buffer). Nucleic acid concentrations were measured with Pharmacia Biotech Gene Quant II spectrophotometer.

“Split-marker” technique (Nielsen, et al. 2006) was used for generating *P. chrysogenum paf* deletion mutant.

Isolation of *P. chrysogenum* genomic DNA was performed on the basis of descripton of Zadra, et al (2000). Transformation of the fungus was carried out according to the method

of Tilburn, et al (1995). Protoplasts were generated on the basis of descriptions of Cantoral, et al (1987) and Kolar, et al (1988).

RNA-isolation was performed by TRISOL treatment (Sigma Aldrich) as recommended by Chomczynski (1993).

Southern blot and Northern blot analysis was carried out according to Sambrook, et al (1989). Nucleic acid samples were blotted to Hybond-N<sup>+</sup>-membranes (Amersham, Bioscience) were hybridized with digoxigenin-labeled probes (Boehringer Mannheim). Hybridization probes were generated by PCR amplification.

Primers used in this study are listed in Table 2. Primers were provided from Microsynth (Austria).

Germination efficiency of *P. chrysogenum* was determined on the base of descriptions of Oh, et al (1996).

To determine autolytic rate we examined the decrement of dry cell mass (Pusztahelyi, et al. 1997) and chitinase activity (Emri, et al. 2004).

Microscopy was performed with Leica MZ16 stereo microscope, and Olympus CK40 light microscope.

To determine conidial counts the colony diameter of point inoculated *P. chrysogenum* surface cultures was determined before the conidia were harvested. From synchronized surface cultures a defined area (8 mm diameter) was cut out. Conidia were harvested by vortexing the excised surface culture in spore suspension (0.9% NaCl and 0.01% tween), conida were counted in Bürker chamber and the counts were divided by the colony area to obtain the number of conidiospores/cm<sup>2</sup>.

Nucleotide sequences were obtained from the public database NCBI Entrez (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). The genomic sequence of *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 (van den Berg, et al. 2008) served as a source for the sequences used.

Table 2. Primers used in this study

<b>primers</b>	<b>sequence (5' → 3')</b>
opaf1	GGTACCATCGCCCAAATCACCACAGTTG
opafrev	GATCGGATCCCTAGTCACAATCGACAGC
obr1Afw	TCCTACTCCCACGCCTAC
obr1Arev	CCTGGCTCCTTGCACTTG
orodAfw	CTTACGCTCTTCCCCCTG
orodArev	GCTGGAAGGAGAGTTCTGG
orodBfw	ATGCAGTTCACTCTCTCCG
orodBrev	ACGAGGTCGTTGTTGGCC
opaf5	CGAAAAGGCAAAGGCAC
o5pafA1	CGATGCTACGTCACTTGTTAGCG
o5pafArev	ACGTGGATCCTATGAAGGGCTTGAGATGATG
o3pafAse	ACGTGTCGACATGGTCTCTGCGATCACCAGG
o3pafA2	CACAACCTTACGCATGCGGAG
o3pafArev	ACGTTCTAGACCAAAGGCTTCCCCGTCATC
o5pafAse	ACGTGGTACCGACAGCTTAGTGGACCGGCAG
o5pafcomp	GATGGTACCACTTGCGTAATAACCGGG
o3pafcomp	CACGGTACCCTTCCTTGACTTACTCCC
onat1	CGCCGGTACGCGTGGATCGC
onat2	AGGCACTGGATGGGTCCCTCAC

### 3. Results and discussion

Our results indicate that *P. chrysogenum* Q176 tolerates PAF-treatment. When surface culture of *A. nidulans* PAF-sensitive control strain was exposed to 50 µg/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 µg/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. Expression pattern of *paf* gene in liquid culture resembled to that of the orthologous gene *afp* detected in *A. giganteus* cultures (Meyer et al. 2002, Marx 2004).

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.

To further analyze the function of PAF in the developmental process of *P. chrysogenum* we deleted the *paf* gene in *P. chrysogenum* Q176 strain and replaced by the nourseothricin-acetyltransferase gene *nat1* (Krügel, et al. 1993, Kück 2006) which confers nourseothricin-resistance to the transformants.

The number of conidia produced by  $\Delta paf$  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. It is noteworthy that neither the germination efficiency, nor the growth rate of the producing strain was influenced by the deletion of *paf* gene.



Retransformation of the *paf* wild type copy into *P. chrysogenum*  $\Delta paf$  genome restored the reduced conidia production of the mutant strain. Unexpectedly, we were not able to restore the wild-type phenotype of the  $\Delta paf$  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  $\Delta paf$  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 effect of PAF-treatments on the growth of the  $\Delta sskA$ ,  $\Delta srrA$ ,  $\Delta napA$ ,  $\Delta nika$ ,  $\Delta hogA$ ,  $\Delta sskA/srrA$  and  $\Delta srrA/hogA$  *A. nidulans* mutant strains indicates, that the antifungal effect of the protein 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.

## Irodalomjegyzék / References

- 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
- Baker B, Zambryski P, Staskawicz B, Dinesh-Kumar S (1997) Signaling in plant-microbe interactions. *Science* 276: 726-733
- 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
- Cantoral JM, Diez B, Barredo JL, Alvarez EaM, J E (1987) High frequency transformation of *Penicillium chrysogenum*. *Biotechnol* 5: 494-497
- Chang Y, Timberlake W (1993) Identification of *Aspergillus brlA* response elements (BREs) by genetic selection in yeast. *Genetics* 133: 29-38
- 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
- Dalcero A, Magnoli C, Chiacchiera S, Palacios G, Reynoso M (1997) Mycoflora and incidence of aflatoxin B<sub>1</sub>, 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
- 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-BrlA pathway contributes to the initialisation of autolysis in submerged *Aspergillus nidulans* cultures. *Mycol Res* 109: 757-763
- Fritig B, Heitz T, Legrand M (1998) Antimicrobial proteins in induced plant defense. *Curr Opin Immunol* 10: 16-22
- 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, 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

- Ganz T (1994) Biosynthesis of defensins and other antimicrobial peptides. *Ciba Found Symp* 186: 62-71; discussion 71-66
- García-Olmedo F, Molina A, Alamillo J, Rodríguez-Palenzuela P (1998) Plant defense peptides. *Biopolymers* 47: 479-491
- Geisen R (2000) *P. nalgiovense* carries a gene which is homologous to the *pag* 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, Marui J, Yoshimi A, Mizuno T, Abe K (2009) 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 (2011) Characterization of the conserved phosphorylation site in the *Aspergillus nidulans* response regulator SrrA. *Curr Genet* 10.1007/s00294-010-0330-2
- Hill P (1972) The production of penicillins in soils and seeds by *Penicillium chrysogenum* and the role of penicillin -lactamase in the ecology of soil bacillus. *J Gen Microbiol* 70: 243-252
- Hoff B, Kamerewerd J, Sigl C, Zadra I, Kück U (2010) 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
- 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

- 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
- 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
- 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
- Mah JH, Yu JH (2006) Upstream and downstream regulation of asexual development in *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryot Cell* 5: 1585-1595
- 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
- Meyer V, Wedde M, Stahl U (2002) Transcriptional regulation of the Antifungal Protein in *Aspergillus giganteus*. *Mol Genet Genomics* 266: 747-757
- Meyer V, Spielvogel A, Funk L, Tilburn J, Arst HJ, Stahl U (2005) Alkaline pH-induced up-regulation of the *afp* gene encoding the antifungal protein (AFP) of *Aspergillus giganteus* is not mediated by the transcription factor PacC: possible involvement of calcineurin. *Mol Genet Genomics* 274: 295-306
- 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
- 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

- 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
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 2nd edition Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York
- Sigl C, Haas H, Specht T, Pfaller K, Kürnsteiner H, Zadra I (2010) Among developmental regulators StuA but not BrlA is essential for Penicillin V production in *Penicillium chrysogenum*. *Appl Environ Microbiol* 77:972-82
- Skouri-Gargouri H, Gargouri A (2008) First isolation of a novel thermostable antifungal peptide secreted by *Aspergillus clavatus*. *Peptides* 29: 1871-1877
- 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
- Tilburn J, Sarkar S, Widdick D, Espeso E, Orejas M, Mungroo J, Peñalva M, Arst HJ (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
- 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
- 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
- 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

**A dolgozat alapjául szolgáló publikációk / List of publications related to the subject of the dissertation**

**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 / Other publications in the subject**

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 / Other publications**

**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

#### **Előadások, poszterek / Presentations and posters**

**Hegedűs N**, Emri T, Nagy I, Pócsi I. Investigation on heavy metal accumulation in different ectomycorrhizal *Paxillus involutus* strains. 3<sup>th</sup> 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. 4<sup>th</sup> 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. 4<sup>th</sup> 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. 4<sup>th</sup> Hungarian Conference on Mycology, Debrecen, Hungary, May 2008 - Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica 55 (2): 217



**Hegedús 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

**Hegedús 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