

**A KITINOLÍTIKUS ENZIMEK ÉS A
SZABADGYÖKÖK SZEREPE A
PENICILLIUM CHRYSOGENUM GOMBA
AUTOLÍZISÉBEN**

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

KÉSZÍTETTE: Sámi László (biológus – biotechnológus)

TÉMAVEZETŐ: Dr. Pócsi István (habilitált egyetemi docens)

**Debreceni Egyetem
Orvos- és Egészségtudományi Centrum
Mikrobiológiai és Biotechnológiai Tanszék**

2003

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretném őszinte köszönetemet és nagyrabecsülésemet kifejezni

- témavezetőmnek, Dr. Pócsi Istvánnak szakmai irányításáért, az évek során tanúsított emberi támogatásáért, segítségéért és türelméért;
- a Mikrobiológiai és Biotechnológiai Tanszék vezetőjének, Dr. Lenkey Béla egyetemi docensnek, valamint a Tanszék korábbi vezetőinek: Dr. Szentirmai Attila egyetemi tanárnak és Dr. Biró Sándor egyetemi docensnek, hogy lehetővé tették és támogatták munkámat a Tanszéken;
- Dr. Emri Tamás egyetemi tanársegédnek és Dr. Mádiné Dr. Pusztahelyi Tünde OTKA posztdoktori ösztöndíjasnak, akik szakmai segítsége és felkészültsége nagyban hozzájárult az itt bemutatott kísérletek eredményes elvégzéséhez;
- Pócsi Imre vegyésztechnikusnak a munka során nyújtott értékes segítségéért és őszinte jóindulatáért.

Köszönettel tartozom továbbá:

- Dr. Karaffa Levente egyetemi adjunktusnak a légzési aktivitások mérésében nyújtott segítségéért;
- Varcza Zoltán szakdolgozónak a mikroszkópi vizsgálatokban való részvételéért;
- a Tanszék valamennyi dolgozójának segítőkészségükért és türelmükért;
- a DOTE „Mikrobiológia és Farmakológia” doktori programnak (vezetője: Dr. Gergely Lajos intézetigazgató egyetemi tanár, DEOEC Mikrobiológiai Intézet) és a Soros alapítványnak, hogy ösztöndíjaikkal anyagilag is lehetővé tették értekezésem megírását;
- Dr. Jens Nielsen egyetemi tanárnak és Dr. Mhairi McIntyre tanársegédnek, hogy hozzájárultak az image-analízissel kapcsolatos és az ipari fermentációs kísérletek elvégzéséhez;
- Dr. Gyémánt Gyöngyi egyetemi tanársegédnek az allózamidines kísérletekben nyújtott önzetlen segítségéért;
- a Genetika Tanszék dolgozóinak és kutatóinak jóindulatukért, és a derűs légköréért;
- és végül családomnak, akik szerető támogatása nélkül ez a dolgozat nem jöhetett volna létre.

TARTALOMJEGYZÉK

	<i>Oldalszám</i>
Köszönetnyilvánítás	2
Tartalomjegyzék	3
Rövidítések	5
1. BEVEZETÉS	7
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	8
3. CÉLKITŰZÉSEK	27
4. ANYAGOK ÉS VIZSGÁLATI MÓDSZEREK	28
4.1. Törzsfenntartás és tenyésztés	28
4.2. Mintavétel és mintaelőkészítés	30
4.3. Szárastömeg mérés	32
4.4. Fehérjetartalom mérés	32
4.5. Enzimaktivitás mérések	33
4.5.1. Kataláz	33
4.5.2. SOD	33
4.5.3. GR	33
4.5.4. GPx	33
4.5.5. GST	34
4.5.6. GOX	34
4.5.7. γ GT	34
4.5.8. Extracelluláris HexAm	34
4.5.9. Extracelluláris kitinázok	35
4.6. Cukortartalom mérése fermentléből	36
4.6.1. Glükóz meghatározás	36
4.6.2. Glükonát meghatározás	36
4.6.3. Szacharóz meghatározás	36
4.7. Az oxidált és redukált glutation meghatározása	37
4.8. Az intracelluláris peroxid és szuperoxid meghatározása	37
4.9. Allóزامidines kezelés	38
4.10. A fragmentáció kvantifikálása és a sejtek túlélő-képessége	38
4.11. A sejtfalban lévő kitin-glükán elegy kinyerése és elem-analízise	39
4.12. A hifák festése fluoreszcens festékekkel	39
4.13. Image Analízis	40
4.14. Teljes és alternatív légzés mérése	41

4.15.	Penicillin V termelés becslése	41
4.16.	Kitináz-tisztítás affinitás-kromatográfiával	42
4.17.	Kitináz izoenzim-analízis és M_r meghatározása	42
4.18.	Statisztikai elemzés	43
4.19.	Felhasznált vegyszerek	43
5.	EREDMÉNYEK	44
5.1.	A <i>P. chrysogenum</i> tenyésztése és növekedési fázisai	44
5.2.	Allóزامidin és morfológiai változások	45
5.3.	Fragmentáció, sejtlízis, sejt-vitalitás	51
5.4.	Autolítikus hidrolázok	57
5.5.	Az extracelluláris kitináz aktivitás gátlása allóزامiddin	57
5.6.	Kitináz izoenzim-analízis és M_r meghatározása	57
5.7.	A sejtfal kitintartalma	60
5.8.	Redox állapotok változása allóزامiddin jelenlétében	60
5.9.	Szabadgyök-halmozódás, és az ellenük való védekezés	66
5.10.	GOX aktivitások és légzési ráták	70
5.11.	A GSH-függő detoxifikáció vizsgálata β -laktám termelés során	75
6.	ÉRTÉKELÉS	78
6.1.	A gomba növekedése	78
6.2.	A kitinázok szerepe a morfológiai változásokban	78
6.3.	Szabadgyök-képződés és redox változások öregedő tenyészetekben	83
6.4.	A GOX és légzés-aktivitások változásai	86
6.5.	A GSH-függő detoxifikáció kihasználásának lehetőségei	89
7.	EREDMÉNYEIM ÖSSZEFOGLALÁSA	92
8.	IRODALMI HIVATKOZÁSOK	93
9.	SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE	106
9.1.	Cikkek	106
9.2.	Posztterek, előadások	107

RÖVIDÍTÉSEK

ACV	δ -(L- α -aminoadipil)-L-ciszteinil-D-valin
ACVS	ACV szintáz
AOX	alternatív (cianid rezisztens) oxidáz
BSA	szarvasmarha szérum albumin (bovine serum albumin)
CDNB	1-kloro-2,4-dinitrobenzol
CDW	szárastömeg (cellular dry weight)
CFW	Calcofluor White
DCF	2',7'-diklorofluoreszcein
DCFDA	2',7'-diklorofluoreszcin-diacetát
DETAPAC	dietilén-triamin-pentaecetsav
DiOC ₆	3,3'-dihexilokarbocianin
DTNB	5,5'-ditio-bisz(2-nitrobenzoesav)
Et	Etidium (oxidált)
EtH ₂	Dihidro-etidium (redukált)
GDH	glükonát dehidrogenáz
GOX	glükóz oxidáz
GPx	glutation peroxidáz
GR	glutation reduktáz
GSH	glutation (γ -L-glutamil-L-ciszteinil-glicin), redukált forma
GSSG	glutation, oxidált forma
GST	glutation S-transzferáz
γ GT	γ -glutamiltranszpeptidáz
HexAm	N-acetil- β -D-hexózaminidáz
HRP	torma peroxidáz (horse radish peroxidase)
IPNS	izopenicillin N szintetáz
LB	laktofenolkék (Lactophenol Blue)
LMW	kis móltömeg(ű) (Low Molecular Weight)
M _r	relatív móltömeg
NBT	Nitro Blue Tetrazolium
NADPH	nikotin-adenin-dinukleotid-foszfát, redukált forma
NAG	N-acetil- β -D-glükózamin
(NAG) ₂	N,N'-diacetil-kitobióz

NCAIM	National Collection of Agricultural and Industrial Microorganisms
PA	fenil-ecetsav
PAGE	poliakrilamid-gélelektroforézis
PBS	foszfát-só puffer (phosphate buffer saline)
PMSF	fenilmetilszulfonil-fluorid
PNP	<i>p</i> -nitrofenol
PNP-NAG	<i>p</i> -nitrofenil- <i>N</i> -acetyl- β -D-glükózamin
POA	fenoxi-ecetsav
RBV	Remazol Brilliant Violet
ROS	reaktív oxigén részecskék (reactive oxygen species)
rpm	percenkénti fordulatszám (revolution per minute)
RT	szobahőmérséklet (room temperature)
SD	standard deviancia
SDS	nátrium-lauril-szulfát (sodium-dodecyl-sulphate)
SOD	szuperoxid dizmutáz
TNB	5-tio-2-nitrobenzoesav
Trx	tioredoxin
tBOOH	<i>terc</i> -butilhidroperoxid

1. BEVEZETÉS

Az ipari mikrobiológiában kezdettől fogva jelentős szerepet kaptak a fonalas gombák, hisz süllyesztett tenyészetek megfelelő, a vegyi szintézist gazdaságosan kiváltó enzim- és szekunder metabolit termelő rendszerek. A *Penicillium chrysogenum* az egyik legfontosabb, a mai napig nagy tömegben előállított β -laktám antibiotikum, a penicillin V felfedezése óta a fonalas gombák között is kiemelt fontosságú ipari törzs. A több évtizedre tekintő ipari felhasználása és számottevő gazdasági jelentősége ellenére ezen mikroorganizmus anyagcseréje és számos élettani folyamata mind a mai napig csak részben feltárt. A gomba primer metabolizmusa és penicillint szintetizáló apparátusa már jórészt felderített, génszinten ismert, és a szakirodalomban részletesen leírt. Ugyanakkor azonban – annak ellenére, hogy a fermentációs iparban a mai napig komoly gondot jelent a tenyészetek kontrollálatlan fragmentációja, autolízise és öregedése, ami hátrányosan befolyásolja mind a produktivitást, mind a termékkinyerést – ezen folyamatok, illetve ezek szabályozottsága, mint például a sejtek differenciálódása és öregedése során zajló redox változások, csak az utóbbi években kerültek a mikológiai kutatások élvonalába. Ezen kutatásoktól egyrészt olyan új stratégiák kidolgozását remélik, melyek hatékonyabbá tehetik a gombák biotechnológiai alkalmazását, és a gombafertőzésekkel szembeni védekezést. Ugyanakkor, a gombák jól tanulmányozható, ideális modellszervezetek; ezért morfológiai és fiziológiai vizsgálatokkal értékes információkhoz juthatunk a magasabbrendű eukarióta élőlények sejtjeinek differenciálódásával és öregedésével kapcsolatban is.

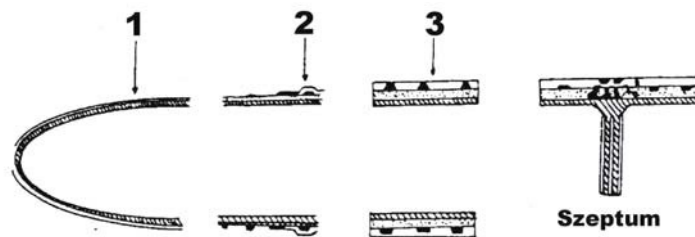
A Debreceni Egyetem Mikrobiológiai és Biotechnológiai Tanszékén évek óta folynak kísérletek egy β -laktám termelő, korábban a gyógyszeriparban is használt *P. chrysogenum* törzssel. Ezen élettani kutatások célja többek között a tenyészetek öregedésekor megfigyelhető morfológiai és élettani változások (például autolízis és hidroláz-produkció), valamint a sejtek glutation metabolizmusának és antibiotikum-termeléssel való kapcsolatának részletes feltérképezése volt. Ezen kutatások eredményeként az elmúlt években számos közlemény született (Pusztahelyi *et al.*, 1996, 1997a, 1997b; Pócsi *et al.*, 1993, 1999; Emri *et al.*, 1997a, 1997b, 1998, 1999, 2000, 2001). Jelen dolgozat – szerzője szándéka és reménye szerint – az öregedő *P. chrysogenum* tenyészetekkel kapcsolatos eddigi vizsgálatokra szervesen épülő, azokat kiegészítő és újabb adatokkal, összefüggésekkel gazdagító megfigyeléseket és kísérleti eredményeket, illetve következtetéseket tartalmaz.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

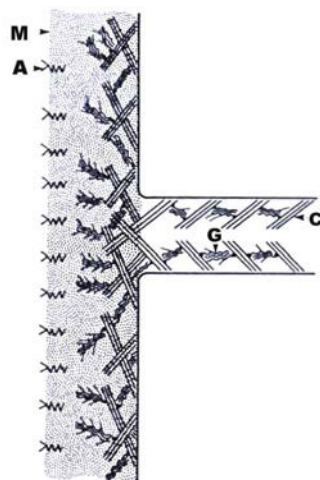
Fonalas gombák szinte mindenütt előfordulnak. Nemcsak humánpatológiai, de környezeti és gazdasági jelentőségük is óriási az ember számára. Ezek az organizmusok részt vesznek a bioszféra szerves anyagainak a visszaforgatásában, és számos értékes termékkel (pl. antibiotikumok, szerves savak, enzimek, heterológ proteinek, vagy akár táplálékkiegészítők, pl. Quorn®) szolgálnak (White *et al.*, 2002).

A fonalas gombák autolízise az öregedő tenyészetek „önemésztésének” összetett, többfázisú folyamata, melynek része a sejtburrok részleges permeabilizációja, és (előrehaladottabb fázisban) az intracelluláris anyag szivárgása, illetve elvesztése (White *et al.*, 2002). A sejthalál eme formája analóg az amfotericin B nevű antibiotikum hatásával, ami - pórusképző ágensként - növeli az intracelluláris savasodást és az ionvesztést, ami végül lízishez vezet (Cohen, 1998). Az ipari fermentációk során a fonalas gombák süllyesztett tenyészeteiben ez az általános sejtleépülés a stationer fázis végén veszi kezdetét, amit jól detektálhatóan jelez például a pelleték szétesése, a biomassa-csökkenés és ammónia-felszabadulás (McNeil *et al.*, 1998, Harvey *et al.*, 1998). Ekkor az autolízisben kulcsszerepet játszó hidrolázok (proteázok, glükánázok és kitinolitikus enzimek) kerülnek a tápközegbe, melyek – a sejtorganellumok, illetve sejtfalat felépítő biopolimerek bontása révén – gyengülő sejtstruktúrát és vakuolarizációt eredményeznek. Ennek következményeként pedig csökken a hifák mechanikai stressz-tűrése, és fokozódik a fragmentáció, azaz a pelleték és fonalak szétesése (White *et al.*, 2002). A fragmentáció a bioreaktorokban a kevertetéskor fellépő mechanikai stresszel arányos, ugyanakkor a kevertetés intenzitása is jelentős mértékben visszahat mind a vakuolarizációra (Jüsten *et al.*, 1998b), mind a hidroláz termelésre (Harvey *et al.*, 1998). A hifák integritását és morfológiáját befolyásoló intracelluláris élettani folyamatokat szintén figyelembe kell venni a fonalas tenyészetet érő fizikai stressz mellett (Harvey *et al.*, 1998; Jüsten *et al.*, 1998a). A tenyészetek fragmentációját, az egyes hifák feldarabolódását és törési pontjait azok kora, fiziológiai állapota és hossza (mérete) is befolyásolja (Paul *et al.*, 1994). Lényeges lehet ugyanakkor a genetikailag meghatározott szeptumszám, és -elhelyezkedés is (McIntyre *et al.*, 2001). Például az *Aspergillus nidulans* sepA (a szeptum-képzésért felelős gének egyike) negatív mutáns törzse (sepA4ΔBm) a növekedése első óráiban egyáltalán nem, később pedig kevesebb, szabálytalanul elhelyezkedő szeptumot hozott létre; ezzel párhuzamosan jóval nagyobb specifikus fragmentációs ráta és jelentősen kisebb növekedési ráta jellemezte a vad törzshöz képest (McIntyre *et al.*, 2001).

A tömlősgombák apikális növekedésűek. A gombafonalak növekedése és differenciálódása a csúcsi irányú citoplazmikus áramlások eredménye, ami fiziológiai „kor-gradienst” hoz létre a hifa hossza mentén és a sejtfalban (1. Ábra). A hifacsúcsnál frissen szintetizálódó naszcens kitin amorf, képlékeny állapotú, és csak később, a sejtfal egyéb alkotóelemeivel létrejövő kémiai kötések következtében nyeri el az ismert mikrokristályos szerkezetet (2. Ábra).



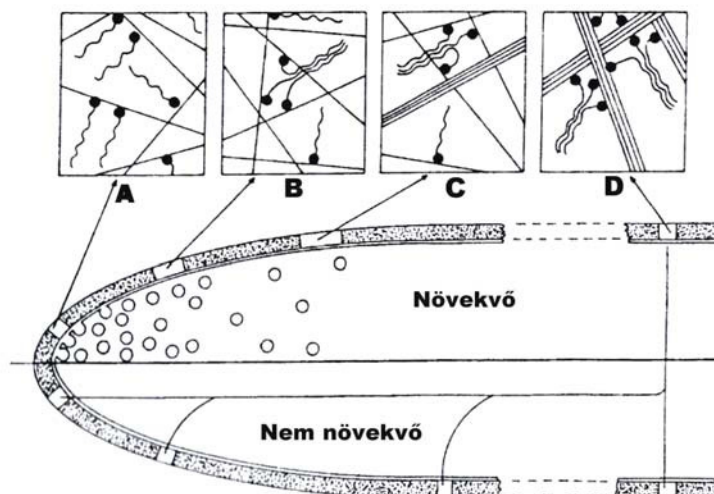
1. Ábra. A fonalgombák hifa csúcsi részének sejtfal szerveződése (Kevei & Kucsera, 2002). 1: A megnyúlási zónában a fal plasztikus, a belső kitin réteg mellett fehérjét tartalmaz, 2: a szubapikális részben a fal vastagodik, megszilárdul, β -(1-3)-glükánba ágyazódik, 3: „érett” sejtfal.



2. Ábra. Egy tipikus fonalgomba érett sejtfalának vázlatos szerkezete (Gooday, 1995b). A falat és szeptumot belső oldalukon a plazmamembrán határolja (folytonos vonal). A mikrofibrillumokba rendeződő kitin (C) és β (1-3), β (1-6) glükán (G) elsősorban a fal belső oldalán található, tömör réteget alkot, illetve a szeptum fő komponense. A lágyabb, géles mannoprotein (M) réteg alkotja a fal mátrixát és külső rétegét. A külső felületen glükoprotein jellegű antigének, agglutininek és adhezinek (A) találhatóak.

A növekedéshez szükséges, hogy a kitinszálak képlékeny állapotúak legyenek, és ezen állapot fenntartásában szerepet kaphatnak különféle kitinolitikus enzimek. Bartnicki-García növekedési elmélete szerint a hifacsúcsnál a kitinszálak lízise és szintézise egymással érzékeny egyensúlyban van, és ez biztosítja a növekedés lehetőségét (Bartnicki-García, 1973). Ugyanakkor a Wessels által kidolgozott 'steady state' növekedési elmélet szerint a folytonos polarizált növekedés a sejtfal-bioszintézis állandósult (steady state) egyensúlyi állapotát feltételezi (Wessels, 1986, 1993). Az elmélet alapján a kitinázoknak nincs szerepe az apikális növekedésben; a frissen

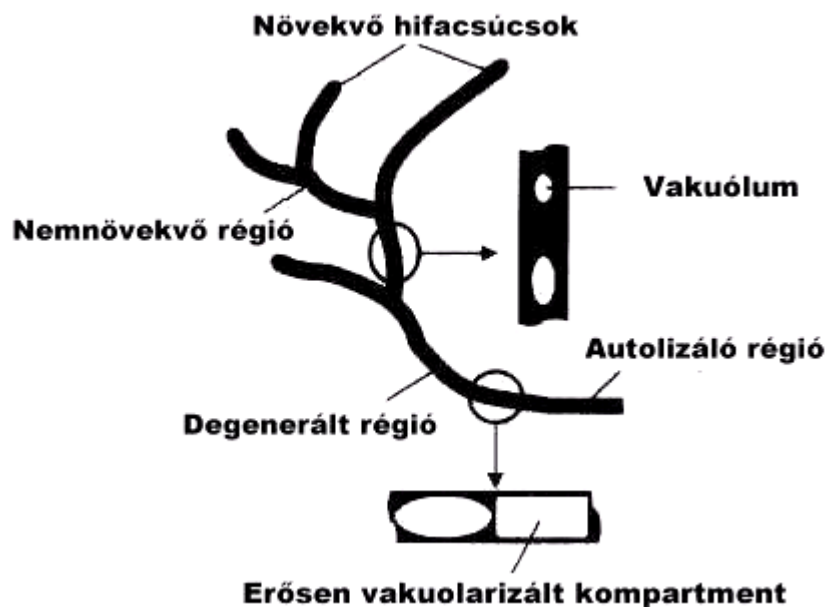
szintetizálódott kitinszálak ugyanis viszkoelasztikusak, és csak a hifacsúctól távolabb nyerik el végső, mikrokristályos szerkezetüket, így nem gátolhatják a növekedést (3. Ábra). Rast és munkatársai hipotézise alapján a sejtfal-szintézis és –bontás térben jól szabályozott módon, egy háromtagú enzimkomplex (kitináz-hexóزامinidáz-kitin szintáz) segítségével, egyidőben megy végbe, ahol a bontás végtermékeként keletkező *N*-acetyl- β -D-glükózamin (NAG) a kitin szintáz allosztérikus aktivátora (Rast *et al.*, 1991).



3. Ábra. Az apikális sejtfal-bioszintézis „*steady state*” modellje (Wessels, 1986). A növekvő, nyúlásban lévő hifacsúcs vezikulumokkal telt, melyek sejtfal-szintetizáló és sejtfal-lítikus enzimeket, kész sejtfal-alkotóelemeket (például mannoproteinek), és monomereket (NAG, stb.) szállítanak (Deacon, 1997). **A:** a csúcsi szegmensben a kitin (egyenes vonal) és az (1 \rightarrow 3) β -glükán (hullámos vonal) monomerek formájában van jelen, a sejtfal plasztikus, képlékeny; **B:** szubapikális megnyúlási zóna, megindul a polimerizáció (kitin mikrofibrillumok képződése), a β -glükán tripla hélixet alkot, kialakulnak az első kitin-glükán keresztkötések; **C:** a polimerizáció fokozódik, a fal rigiddé válik, feltöltődik; **D:** érett, erősen keresztkötött sejtfal; ebben a zónában megszűnik a növekedés „*steady state*” állapota. Mikor a hifanövekedés leáll (az ábra alsó fele), nem találhatóak vezikulumok a csúcsi részben, ekkor minden pontban a **D** szakaszra jellemző a falszerkezet (Kevei & Kucsera, 2002).

A tápanyag-limitáció vakuólum-képződéshez vezet a hifákban (Paul *et al.*, 1996, 1998). A vakuólumok mérete minden fonal-kompartimentben nő a korrallal, és általánosan elmondható, hogy a disztális régiókban kiterjedt vakuolarizáció előzi meg az autolízist (Smith *et al.*, 1990; Bainbridge *et al.*, 1971; Paul *et al.*, 1998; 4. Ábra); ez ugyanakkor csökkent(heti) a növekedési rátát, az apikális nyúlást és a fonalak elágazási frekvenciáját (Agger *et al.*, 1998). A vakuolarizációval az organizmus igyekszik fenntartani a turgornyomást a növekvő hifacsúcs irányába áramló citoplazma számára (Paul *et al.*, 1994, Cui *et al.*, 1998). Egyes szerzők szerint a hifák sejtfal-erőssége

konstans (Johansen *et al.*, 1998), mások szerint azonban a fal összetétel változik a fonal mentén (Trinci, 1979; 3. Ábra). Fragmentáció azonban ettől függetlenül elsősorban az idős, vakuolarizált hifa-régiókban történik (Paul *et al.*, 1994, 1998; 4. Ábra).



4. Ábra. A *P. chrysogenum* micéliumok differenciálódása süllyesztett tenyészetben (Paul *et al.*, 1998)

P. chrysogenum-ban már régóta feltételezett a tenyészetek fiziológiai állapota és fragmentációja közti kapcsolat (Righelato *et al.*, 1968). *P. chrysogenum* kemosztát kultúráiban a hifák töredezése spontán, a kevertetés intenzitásától függetlenül zajlott (Christensen *et al.*, 1995). A közelmúltban született tanulmányok alapján (Jüsten *et al.*, 1998a, 1998b; Paul *et al.*, 1994, 1996) ezzel szemben közvetlen kapcsolat feltételezhető a morfológia, az alkalmazott keverőlapát típusa és geometriája, az erőátvitel és a micéliumok fragmentációjának kinetikája között. A kevert (McNeil *et al.*, 1998) és rázatott (Pusztahelyi *et al.*, 1997a) *P. chrysogenum* tenyészetek proteolízise, autolízise és fragmentációja között szintén valószínűsíthető összefüggés. A fragmentáció megértésére és becslésére több elsőrendű kinetikájú matematikai modell is született (Paul *et al.*, 1996; Shamlou *et al.*, 1994).

Az autolízis szabályozása egyelőre szintén csak részben tisztázott, de az mára világos, hogy – a korai elképzelésekkel ellentétben – dinamikus, energiaigényes, és igen magas fokon, génszinten szabályozott jelenségről van szó, melyet számos külső és belső tényező kiválthat, illetve befolyásol (McIntyre *et al.*, 1999, 2000). Utóbbiakhoz tartoznak többek között a mikroorganizmus genetikailag kódolt differenciálódási,

öregedési és sejthalál-programjai, és a korfüggő hidrolázok termelése. Mind ezek, mind a külső tényezők (O₂- és tápanyag-limitációk, fizikai-, hő-, oxidatív és egyéb stressz-faktorok, oldallánc-prekurzorok, nehézfém-ionok, etanol, stb.) szignifikáns, egymástól többnyire nem elkülöníthető hatással bírnak a fermentációs folyamatokra (Harvey *et al.*, 1998; White *et al.*, 1999, 2002). Az autolízissel kapcsolatos eddigi vizsgálatok két fő kategóriába sorolhatóak: fiziológiai-enzimológiai (Reyes *et al.*, 1989a, 1989b; Santamaria & Reyes, 1988), illetve morfológiai (McNeil *et al.*, 1998; Harvey *et al.*, 1998; Vanhoutte *et al.*, 1995) tanulmányokra; ez utóbbiakhoz ma már főként számítógépes image analízis technikát alkalmaznak.

A fonalas gombák süllyesztett tenyészetei pellettek, összetapadt és szabadon álló, diszperz hifák heterogén morfológiáját mutatják (Paul *et al.*, 1998; Jüsten *et al.*, 1998a; 5. Ábra).

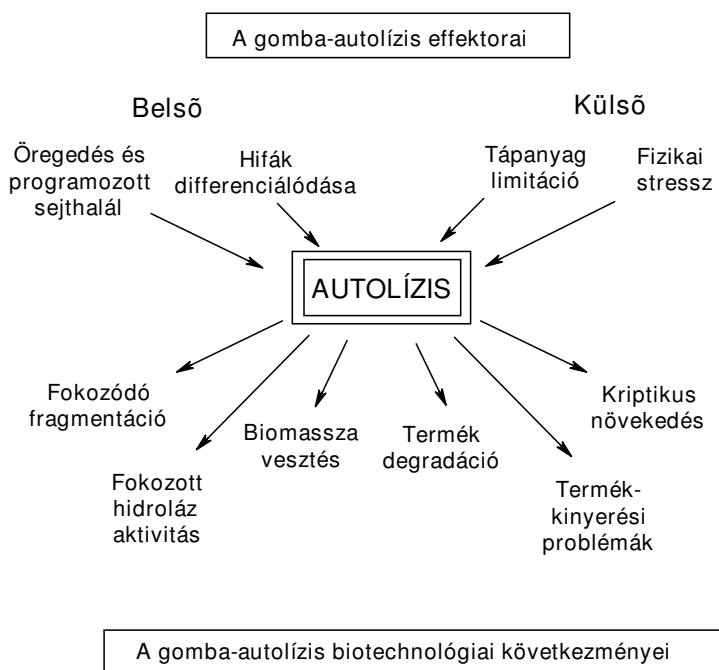


5. Ábra. Diszperz morfológiájú süllyesztett *P. chrysogenum* tenyészet összetapadt („clump”) és szabad („dispersed”) micéliumai (Jüsten *et al.*, 1998a).

A komputerezált image-analízis sok szempontból számszerűsítheti ezeket a kultúrákat, többek között az autolízis folyamata szempontjából (Krabben *et al.*, 1998), hiszen lehetőséget nyújt akár egyetlen, önálló hifaelem fiziológiai állapotának meghatározására is (Cox *et al.*, 1998; Paul *et al.*, 1993). Például, különböző festési technikák, fáziskontraszt mikroszkópia és image analízis kombinálásával *P. chrysogenum* tenyészetekben megkülönböztethetővé tették a vakuolarizált és halott hifaelemeket (Vanhouvette *et al.*, 1995). A holt régiók aránya az összes mért szabad hifák mintegy 50%-át tette ki. Az újabb vizsgálatok is hasonló arányokról számolnak be (McNeil *et al.*, 1998; Harvey *et al.*, 1998). Az image analízis lehetőséget nyújt a különféle folyamatok morfológiai modellezésére is (White *et al.*, 2002). Bár léteznek növekedési modellek a fonalas gombák süllyesztett tenyészeire, a sejtpusztulás még a legfrissebb tanulmányokban sincs figyelembe véve (Krabben *et al.*, 1998; King, 1998). Paul és munkatársai modelljében (Paul *et al.*, 1994), amely az autolízist és fragmentációt együttesen „biomassza-veszteség”-ként kezelte, a megjósolt és valós értékek jól

korreláltak; az autolizált, illetve fizikai fragmentációnak kitett hifák aránya azonban továbbra is tisztázásra vár.

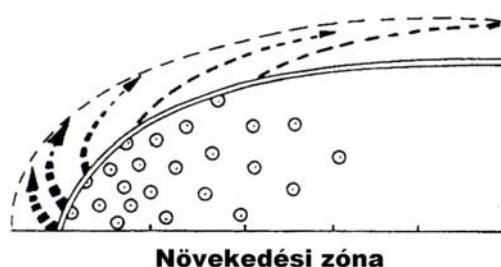
Az autolízist irányító mechanizmusok és az azokat befolyásoló tényezők megismerése és jobb megértése fokozott irányítási lehetőséget kínál az autolízis megakadályozására – vagy épp előidézésére (White *et al.*, 2002). Az ipari fermentációk esetében a cél általában az autolízis elkerülése, vagy késleltetése (6. Ábra), hiszen ezzel akár az antibiotikum-termelés folyamatossá tétele, akár a heterológ proteinek – az autolítikus proteázok általi – degradációjának megakadályozása elérhetővé válik (Archer *et al.*, 1992).



6. Ábra. A fonalgombák autolízisének áttekintése (White *et al.*, 2002).

Néhány ipari folyamatban azonban épp az autolízis lehet előnyös. Például a penicillin és cefalosporin-C termeléskor fellépő autolízis során nő az extracelluláris aciláz-aktivitás is (Reyes *et al.*, 1990b; Alfonso *et al.*, 1995). Bár ez az enzim mindkét fent említett antibiotikumot bontja, a keletkező termékek (6-aminopenicillinsav, illetve 7-cefalosporánsav) prekürzorként szolgálnak a félszintetikus antibiotikum-termelés számára. Olyan esetekben is előnyös lehet az autolízis, mikor egy intracelluláris termék (például a fusidin-savat tartalmazó lipid-granulák) kinyerésének fokozása a cél (Bartoshevich *et al.*, 1984). Megjegyzendő azonban, hogy bár az ilyen lízis elősegítheti a termékkinyeréssel kapcsolatos „downstream” munkálatokat, ugyanakkor a micéliumok szűrésének és eltávolításának jelentősen megnő(het) az időigénye, ami jelentős problémát okoz érzékeny, könnyen degradálódó termékek esetében (McNeil *et*

al., 1998). A tenyészet morfológiája többféleképpen is összefügg(het) az adott törzs termelőképességével; egyrészt a makro- és mikromorfológia egyértelműen befolyásolja a fermentációs közeg reológiai tulajdonságait, és így szignifikáns hatással bír a kevertetésre, a bioreaktoron belüli oxigén- és tápanyag-eloszlásra – amik pedig jelentős mértékben befolyásolják a proteintermelést (vagy egyéb termékképződést) (Bocking *et al.*, 1999; Pedersen *et al.*, 1993). Másrészt, újabb megfigyelések szerint a mikromorfológia önmagában is jelentősen befolyásolhatja a termelőképességet (Bocking *et al.*, 1999). Különös hangsúlyt kapott a hifacsúcsok száma és a protein-szekréciónak közötti lehetséges kapcsolat felderítése (Peberdy, 1994), mivel a szekréciónak túlnyomóan a hifák csúcsi régióiban zajlik (Gordon *et al.*, 2000; Wessels, 1993; 7. Ábra).

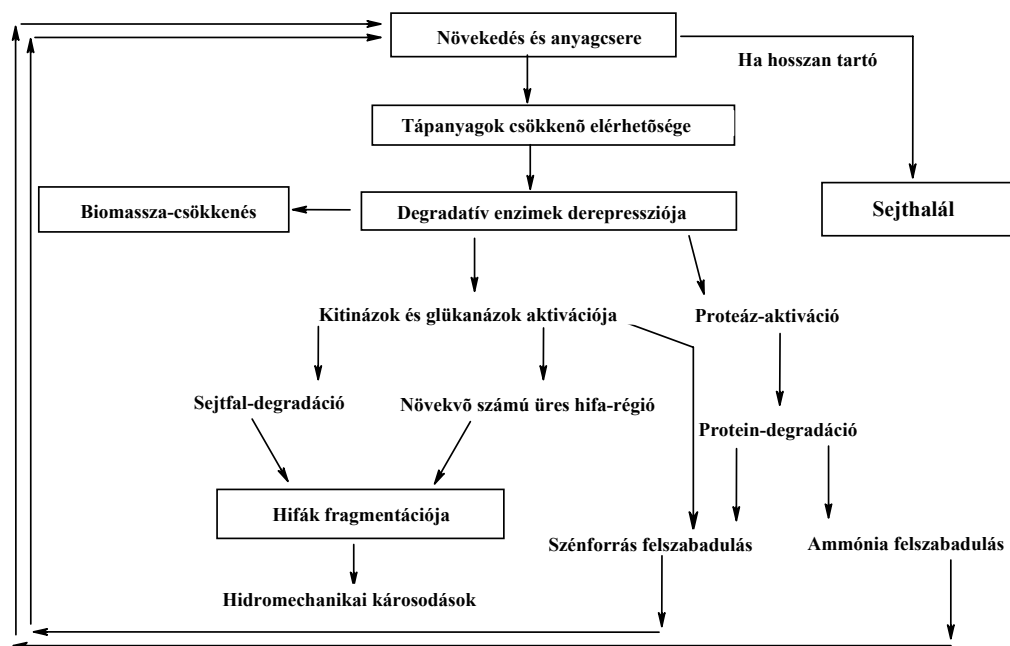


7. **Ábra.** Növekvő hifa extracelluláris fehérje szekréciónak modellje (Kevei & Kucsera, 2002). A nyílak erőssége utal a szekréciónak intenzitására.

Igen előnyös volna a morfológiát meghatározó, ill. befolyásoló gének meghatározása és klónozása; ezzel ugyanis lehetőség nyílna az adott célnak legmegfelelőbb, ideális morfológiájú törzsek létrehozására. Ezen kutatások tehát nagy gyakorlati jelentőséggel bírnak az ipari termelőképesség és termékkinyerés fokozásában (White *et al.*, 2002).

A. nidulans törzsek genetikai vizsgálatai alapján feltételezhető, hogy az autolítikus fázis aktivációját kémialilag definiált tápközegben több, különböző tápanyag szintje együttesen befolyásolja (Archer *et al.*, 1992). Megjegyzendő, hogy a csökkent tápanyag-hozzáférés miatt beinduló autolízis nemcsak a diszperz hifákban, hanem a pelleték belsejében is játszódhat, ami a tenyészet jelentős hányadát érinti (Paul & Thomas, 1998; Schügerl *et al.*, 1998). Sok esetben maga az autolízis a túlélést elősegítő folyamat is lehet, amikor a tenyészet bizonyos része a pusztuló sejtek lítikus tápanyagainak újra-hasznosítása révén marad fenn, miáltal új egyensúly alakul ki a sejtpusztulás és növekedés között. Ez a jelenség az úgynevezett kriptikus növekedés (Righelato *et al.*, 1968), ahol a sejtek szén- és nitrogénigényét az aminosav-lebontás fedezi (Pusztahelyi *et al.*, 1997a, 1997b). Ezt a jelenséget *P. chrysogenum* (Osiewacz,

1990) és *A. niger* (Schrickx *et al.*, 1993) kemosztát tenyésztéseiben is megfigyelték, ahol sikerült a protein-termelést a biomassza növekedése nélkül fenntartani. Minthogy a gombák autolízisét legkönnyebben szénéhezéssel válthatjuk ki (Pusztahelyi *et al.*, 1997b), könnyen elképzelhető, hogy a karbon-represszióban fontos gének valamilyen módon közreműködnek az autolízis szabályozásában. A tápanyag-limitáció következtében fellépő autolítikus folyamatokat a 8. Ábra szemlélteti.



8. Ábra. A tápanyag-limitációkor megfigyelhető fiziológiai és morfológiai események (White *et al.*, 2002).

Az autolízisben kulcsszerepet játszanak a gombák által termelt, a stacioner fázistól kezdve egyre nagyobb mennyiségben tápközegbe jutó különböző hidrolítikus enzimek. Az autolítikus hidrolázok specifikus szubsztrátjaik alapján az alábbi főbb csoportokba sorolhatóak:

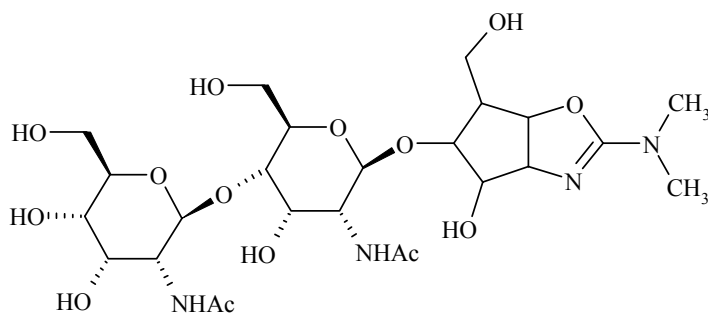
1. Proteázok. A gomba-proteázok fontos szerepet játszanak a hibás fehérjék lebontásában, a protein-foldingban, a zimogén enzimek aktiválásában, valamint autolízis közben az aminosavak felszabadítása által lehetővé teszik a kriptikus növekedést (McNeil *et al.*, 1998; Pusztahelyi *et al.*, 1997b). *A. nidulans*-nál a proteázaktivitás kis molekulatömegű C, N, S, P források jelenlétében gátolt (Cohen *et al.*, 1975); a proteolítikus lebontás eme termékei valószínűleg negatív visszacsatolással hatnak a proteáz bioszintézisre. Ugyanez érvényes a fiatal tenyészetekre is, ahol csak kismértékű az intracelluláris proteindegradáció tápanyagbőség esetén (Cohen, 1973). *P. chrysogenum*-ban az intracelluláris proteolízis derepressziója szénéhezés hatására

figyelhető meg (Trinci & Righelato, 1970); a glükóz vagy laktóz szénforrások ugyanis gátolják a proteolízist *P. chrysogenum*-ban (Chrzanowska *et al.*, 1993). Annak ellenére, hogy hasonló intracelluláris proteolitikus aktivitásokat figyeltek meg exponenciálisan növekvő és autolizáló *P. chrysogenum* tenyészetekben (McNeil *et al.*, 1998), a folyamatban részt vevő proteázok valószínűleg különböztek: míg főleg szeril és aszpartil proteázok vettek részt a tenyészetek degradálásában és az autolízis korai fázisaiban (McIntyre *et al.*, 2000), addig a kriptikus növekedést metalloproteázok tartották fenn (Pusztahelyi *et al.*, 1997b). Ugyanakkor, a specifikus extracelluláris proteolitikus aktivitások a tenyészetek lítikus degradációjával párhuzamosan – az enzimek tápközegbe kerülésének, valamint aktív termelésének eredményeként – jelentős növekedést mutatnak (Pusztahelyi *et al.*, 1997b), ezért a kor-függő proteázok az autolízis markereiként szolgálhatnak (White *et al.*, 2002).

2. *Glükanázok.* A glükanáz-aktivitások a gomba egész életciklusa alatt megfigyelhetők (McNeil *et al.*, 1998, Lahoz *et al.*, 1976). A hifacsúcsok növekedésében a β -glükanázok és β -glükán szintázok összehangoltan működnek, és építenek glükán oligomereket a sejtfalba (Gooday, 1995b; Polacheck & Rosenberg, 1975). A glükanázok a sejtfalban és a citoplazmában is lokalizálódhatnak, szekréciójuk után pedig szerepet kapnak a szénforrások elő-emésztésében, illetve a sejtfal-lízisben is (McNeil *et al.*, 1998; Wessels, 1986; Pitson *et al.*, 1997). Ezen enzimek lehetnek exo- és endoglükanázok (Paul *et al.*, 1994), ami révén nagy határfokkal képesek a komplex glükánok bontására, és különálló glükózmolekulák felszabadítására. Ezzel a gomba kriptikus növekedéséhez is aktívan hozzájárulhatnak (Pitson *et al.*, 1997). A proteázokhoz hasonlóan, a szénéhezés hatására a *Neurospora* és *Botrytis* törzsek glükanáz-aktivitása is növekedett, közvetlenül az autolízis megindulása előtt (Nuero *et al.*, 1993). Karbon katabolikus represszió alatt állnak *P. italicum* és *Acremonium* törzsek (Pitson *et al.*, 1991, 1997) glükanázai is. Aktivitásuk hatására közvetlenül az autolízis kezdete előtt glükán oligomerek jelentek meg a tápközegben (McNeil *et al.*, 1998; Perez-Leblic *et al.*, 1982). Rövid féléletidejük ellenére ezek az oligomerek is fokozták a glükanáz aktivitást (Pitson *et al.*, 1993). A glükán-monomerek, a glükanáz aktivitások végtermékei, feltételezések szerint az autolízis indikátorai lehetnek (Lahoz *et al.*, 1976; Santamaria & Reyes, 1988), azonban rövid félélet-idejük miatt ennek a kihasználhatósága nem valószínű (White *et al.*, 2002). Fontos megjegyezni, hogy *de novo* enzimszintézis felelős az autolízis közben tapasztalt magas glükanázaktivitásokért, nem pedig egyszerűen az intracelluláris enzimek kiszabadulása (Reyes *et al.*, 1981; Pitson *et al.*, 1997), ami szintén a tápanyag-limitációra adott válasz koordináltságára utal.

katabolikus represszió alatt áll (Rodriguez *et al.*, 1993), amit feltételezhetően az autolíziskor felszabaduló kito-oligomerek oldanak fel, koncentráció-függő módon (Alfonso *et al.*, 1991; Harman & Kubicek, 1998). A kitinázok indukciója, illetve derepressziója sok esetben *de novo* transzkripciót és translációt jelent (Lorito, 1998). *P. chrysogenum*-ban a HexAm a citoszolban lokalizálódik és akkumulálódik a stacioner fázisban. Ennek az enzimnek nem sikerült igazolni a sejtfalszintézisben való részvételét (Pusztahelyi *et al.*, 1996); feltételezhetően az endo-kitinázok működésüként keletkező kito-oligomerek újrahasznosításában játszik kulcsszerepet.

A hidrolázok más lítikus enzimekre is hatással lehetnek; pl. a kitinázok aktivitása csökkenhet a proteolitikus hasítások révén, vagy épp ellenkezőleg: a kitinázok proteolitikus zimogén-aktivációja is ismert (Pusztahelyi *et al.*, 1997b; Sámi *et al.*, 2001b). Az autolitikus enzimek további vizsgálata alapvető fontosságú, mivel a fent tárgyalt hidrolázok képződése és szabályozási mechanizmusa az autolízis alatt több esetben is faj-specifikusnak mutatkozott (Chrzanowska *et al.*, 1993; Rodriguez *et al.*, 1995; Vessey & Peg, 1973). Az enzimek fiziológiai szerepének vizsgálatához ideális lehetőséget kínál a különféle inhibitorok *in vitro* és *in vivo* alkalmazása. A kitinázok gátlószerei (Hg⁺⁺, ciklo{Arg-Pro}, argifin, argadin, stb.; Izumida *et al.*, 1995; Shiomi *et al.*, 2000) közül az egyik leghatásosabb ma ismert vegyület a *Streptomyces* törzsek által termelt allóزامidin (Sakuda *et al.*, 1986, 1987; 1997; Brameld *et al.*, 1998; 10. Ábra).



10. Ábra. A pszeudo-triszacharid allóزامidin szerkezeti képlete (Sakuda, 1986).

Ez a pszeudo-triszacharid, valamint félszintetikus származékai, {például 9-demetil-allóزامidin, 6-*o*-fenilacetyl-allóزامidin, C3'', C4''-allóزامidinol} (Rast *et al.*, 2000; Sakuda *et al.*, 1998) – szubsztrát-analóg szerkezetük révén (10. Ábra) – a glükózil-hidrolázok 18. családjának igen potens, specifikus, átmenetiállapot inhibitorai (Brameld *et al.*, 1998; Cabib *et al.*, 1992; Dickinson *et al.*, 1989; Escott *et al.*, 1998; Gooday *et al.*, 1992). Az allóزامiddinrel gátolható kitinázok – a sejtfal kitin tartalmának hasítása révén – bizonyítottan fontos szerepet játszanak az *Acremonium chrysogenum* β-laktám

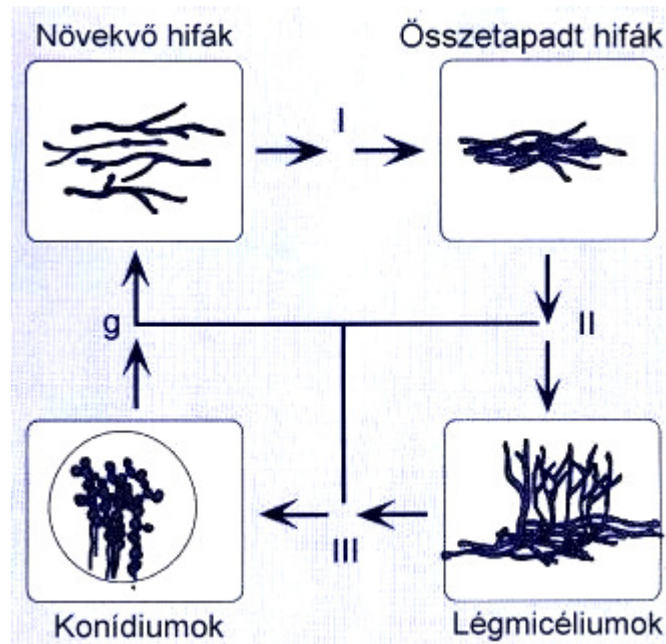
termelő fonalas gomba kor-függő fragmentációs folyamataiban és autolízisében (Sándor *et al.*, 1998), továbbá az élesztő sarjsejtek anyasejtről való leválásában is mind a *C. albicans* (Gooday, 1992), mind a *S. cerevisiae* (Izumida *et al.*, 1995) esetében. Ismeretes továbbá, hogy bizonyos fonalas gombák, például az *A. nidulans* spóráinak duzzadása és csírázása szintén allóزامidin-szenzitív (Gooday *et al.*, 1992, 1997; Takaya *et al.*, 1998). A *C. albicans* kitinolitikus enzimszere jól felderített, és a gomba kitinázai allóزامidinrel igen effektíven gátolhatók *in vitro* (Dickinson *et al.*, 1989). A kitinázok szelektív gátlása *in vivo* azonban nem befolyásolta a növekedést (Dickinson *et al.*, 1989), ami valószínűleg azzal magyarázható, hogy a plazmamembrán közelében, illetve sejt falban lokalizálódó kitinázok sztérikus okok miatt védettek az allóزامidin gátló hatásával szemben (Rast *et al.*, 1991; Gooday, 1995a; Horsch *et al.*, 1997).

A morfológia befolyásolására hatásos stratégia lehet a kitináz gének elrontása, azaz enzimhiány mutánsok létrehozása. Azonban sok kitináz multifunkciós (Takaya *et al.*, 1998) illetve egy enzim hiányát a sejt más kitináz(ok) indukciójával, illetve túltermelésével pótolhatja (Reichard *et al.*, 2000). A fungális autolízis és fragmentáció gátlása a kitinázok blokkolásán át jól kihasználható az iparban (White *et al.*, 2002) és a fonalas gombák, illetve dimorf patogének okozta emberi mikózisok kezelésében (Cooper & Haycocks, 2000; Walsh *et al.*, 2000). Definíció szerint dimorfnak nevezhetők mindazok a gombák, amelyek legalább kétféle, eltérő morfológiájú állapotban is képesek növekedni (Cannon *et al.*, 1994). Az irodalomban a „dimorf” kifejezés ennél jóval tágabb értelemben használatos. Például bizonyos fonalas gombák lekerekedett végű fragmentumait sok esetben írják le teljesen különálló, úgynevezett „élesztőszerű” morfológiai formaként, holott ezek a sejtek mindig csak fonalas növekedést mutatnak (Bartoshevich *et al.*, 1990). Rendszertani hovatartozásuktól függetlenül, számos humán-, rovar- és növénypatogén faj, illetve néhány szaprofita gomba mutat valódi dimorf növekedést (Deacon, 1997; Jürgensen *et al.*, 2001). Bár egyes fajok esetében részletesen ismertek a morfológiai változást kiváltó környezeti tényezők (pl. hőmérséklet-, pH-, redox potenciál-, CO₂ tenzió- és tápközeg összetétel-változások), általánosságban elmondható, hogy ezek hatásmechanizmusáról jelenleg még keveset tudunk (Orlowski, 1994; Gow, 1995). A dimorf patogén gombák patogenezisét vizsgálva megállapítható, hogy általában a hifák rendelkeznek a szöveteken való áthatolási képességgel, ugyanakkor a gazdaszervezetek edényrendszereiben az élesztősejtek a dominánsak (Deacon, 1997). A *C. albicans* esetében például egyértelműen a fonalas forma a felelős a gomba szöveti inváziójáért

(Lo *et al.*, 1997). Egy, a közelmúltban publikált tanulmány szerint viszont a *P. marneffei* humánpatogén gomba szöveti inváziójakor élesztőszerű sejteket képzett (Cooper & Haycocks, 2000). A dimorf patogén gombák jelentős részénél a fonalas ↔ élesztő átalakulás a patogenezis szempontjából nagy fontosságú és igen bonyolult folyamat, amely gondosan szabályozott enzim- és génszinten. Például a *C. albicans* esetében, egyéb tényezők mellett, az intracelluláris glutation (GSH) koncentráció csökkenésének igen fontos szerepe lehet a micéliális morfológia létrejöttében (Thomas *et al.* 1991; Manavathu *et al.* 1996a, 1996b). Ugyanakkor, az élesztősejtek, éppen nagy GSH koncentrációjuknak köszönhetően, eredményesen állnak ellen a gazdaszervezet immunsejtjei által generált szabadgyökök károsító hatásának (Jamieson *et al.*, 1996). Egy másik nevezetes humánpatogén faj, a *H. capsulatum* esetében azt tapasztalták, hogy bár az intracelluláris GSH szintek közvetlenül nem határozták meg az észlelt sejt morfológiát, kéntartalmú aminosavak, (cisztein vagy cisztein) adagolásával ebben az esetben is elő lehetett segíteni az élesztő típusú sejtek kialakulását (Leith *et al.*, 1988; Maresca & Kobayashi 1989). Bár ezek az eredmények alátámasztják a GSH és/vagy más, kis molekulatömegű tiolok jelentőségét a dimorf gombák morfológiájának szabályozásában, a jelenség mögött meghúzódó molekuláris események még igen kevésbé ismertek.

A gombák morfológiai változásaiért – többek között az autolízisért és dimorf átalakulásért – felelős gének expresszióját nagy valószínűséggel különböző környezeti stressz-folyamatok is befolyásolhatják. Az oldott oxigén-tenzió és az extracelluláris ROS változásai kétségkívül kiemelkedő fontosságú környezeti stresszt képviselnek, ami mélyrehatóan befolyásolja az aerob fonalas gombák metabolizmusát és morfológiáját (Toledo *et al.*, 1995; Henriksen *et al.*, 1997; Priede *et al.*, 1997; Ruijter *et al.*, 2002). Az intracelluláris ROS akkumuláció például elindíthatja a spórák csírázását (Lledías *et al.*, 1999), és akár az autolízist (Hansberg & Aguirre 1990). Újabb vizsgálatok alapján az átmeneti hiperoxidáns állapotok igen fontos korai szignál-transzdukciós eseményeknek tekinthetők. Hansberg „a sejt differenciálódás dioxid kizárási elmélete”-nek megfelelően (Hansberg & Aguirre, 1990) lehetséges, hogy az észlelt morfológiai változások mozgatója az instabil hiperoxidáns állapotokban a molekuláris oxigén kizárására való törekvés, ami által a mikroorganizmus új, a környezeti körülményeknek megfelelő, stabil morfológiai és élettani állapotba jut. Megfigyelték ugyanis, hogy a *Neurospora crassa* aszexuális életciklusának minden stabil állapotát (növekvő és összetapadt hifák, légmicéliumok és konídiumok képzése; 11. Ábra) megelőzte egy GSH/GSSG redox egyensúlyvesztéssel, növekvő proteolízissel és mRNS instabilitással

párosuló átmeneti hiperoxidáns állapot (Hansberg *et al.*, 1993, 1995; Toledo *et al.*, 1995).



11. Ábra. A *Neurospora crassa* aszexuális életciklusa (Toledo *et al.*, 1995). A konídiumok képződéséig az exponenciálisan növekvő hifákból a stabil állapotok között három átmenet figyelhető meg. (Az ábrán **I-III** jelöléssel.) Elegendő tápanyag jelenlétében bármely stabil differenciálódott állapotból történhet átmenet a növekvő stádiumba, egy csírázási (**g**) folyamat révén.

A szabadgyök-halmozódás mellett más stressz-faktorok, pl a CO₂ tenziók változása, vagy a már említett tápanyag-limitációk szintén jól ismert inducerei a morfológiai változásoknak (Ho *et al.*, 1986; Ju *et al.*, 1991). A gombák morfológiai átalakulásaiért felelős genomi expressziós programok tehát számos környezeti stressz-szignál által aktiválódhatnak. A közelmúltban “DNS microarray” transzkriptom analízissel megállapították, hogy a *Saccharomyces cerevisiae* környezeti stresszekre adott válasza hasonló volt az összes tesztelt stressz-tényezőre, azonban ez a válasz – a stressz típusától függően – más és más regulációs rendszer által kontrollált (Gasch *et al.* 2000). Magasabbrendű eukariótákban szabadgyökök főként a citokróm-függő mitokondriális légzés során, valamint bizonyos enzimrendszerek, például plazma-membrán NADPH-oxidáz, citoplazmikus xantin-oxidáz, illetve organelumokhoz kapcsolt struktúrák, mint a peroxisómális citokróm P450 oxidáz működésekként keletkeznek (Gamaley & Klyubin, 1999). A sejtek többféle védelmi rendszerrel is rendelkeznek a káros szabadgyökök eliminálására. Az elsődleges védelemhez tartoznak a különféle antioxidáns molekulák, mint GSH, tioredoxin (Trx), koenzim Q, E vitamin, trehalóz;

valamint az antioxidáns enzimek, például a szuperoxid dizmutáz (SOD), kataláz, glutation-peroxidáz (GPx), glutation-reduktáz (GR), glutation S-transzferáz (GST), tioredoxin-peroxidáz és tioredoxin-reduktáz (Davis *et al.*, 2001). A másodlagos védelemhez sorolhatók a molekulák károsodását javító enzimek (protein diszulfid izomeráz, Met szulfoxid reduktáz, DNS bázis és nukleotid excíziós javító rendszerek), valamint az oxidálódott molekulák (pl vakuoláris proteázok általi) degradációja (Davis *et al.*, 2001).

A sejtek redox állapota elsősorban a ROS szintek és az oxidatív károsodástól védő endogén tiol puffer rendszerek (GSH és Trx), mint redukáló ekvivalensek közti finom egyensúly következménye (Davis *et al.*, 2001). Ha ez az egyensúly felbillen – azaz a ROS szintje meghaladja a sejt pufferkapacitását és az ezért felelős enzimek aktivitását – az potenciálisan citotoxikus „oxidatív stresszt” generál. Ilyen körülmények között a ROS nagymértékben károsíthatja a DNS, RNS, fehérjék és lipid-komponensek szerkezetét, ami csökkenő sejtfunkciókhoz, vagy akár sejthalálhoz is vezethet (Cheeseman & Slater, 1993). A mitokondriális DNS különösen érzékeny az oxidatív sérülésekkel szemben. A nukleinsavak oxidációja bázis- és cukor-károsodáshoz, száltöréshez és DNS-protein keresztkötésekhez vezet. A többszörösen telítetlen zsírsavak lipid-peroxidációja epoxidokat és aldehideket generálhat, amelyek némelyike igen toxikus, és tovább fokozza az eredeti szabadgyök-károsodást. Ezzel kapcsolatban említést érdemel, hogy a *P. chrysogenum* – konstitutívan termelődő, igen aktív katalázának és az indukálható GPx enzimjeinek köszönhetően – kivételesen jól tolerálta a magas peroxid szinteket (Emri *et al.*, 1997a). A tioredoxin-függő redox enzimek valószínűleg szintén fontos szerepet játszottak az antioxidáns védelemben, különösen GSH/GSSG redox egyensúlyvesztés esetén (Emri *et al.*, 1997a, 1999). A *P. chrysogenum* SOD génjének magasabb kópiaszáma pedig megnövelte a gomba élettartamát (Diez *et al.*, 1998). A *S. cerevisiae* esetében a GSH/GSSG redox arány változása – főként a nem megfelelő diszulfid-hidak képződésének köszönhetően – protein szerkezeti változást és funkcióvesztést, a protein-szekréció defektusát, valamint sejtfal-károsodást eredményezett (Gasch *et al.*, 2000). Magasabbrendű eukariótákban a ROS időleges megemelkedése proliferációt vonhat maga után (Davis *et al.*, 2001), a GSH/GSSG redox arányok felborulása és a tartós oxidatív stressz pedig igazoltan fontos szerepet játszanak az apoptózist iniciáló szignál-transzdukciós folyamatokban (Kane *et al.*, 1993; Esteve *et al.*, 1999; Coppola & Ghibelli, 2000).

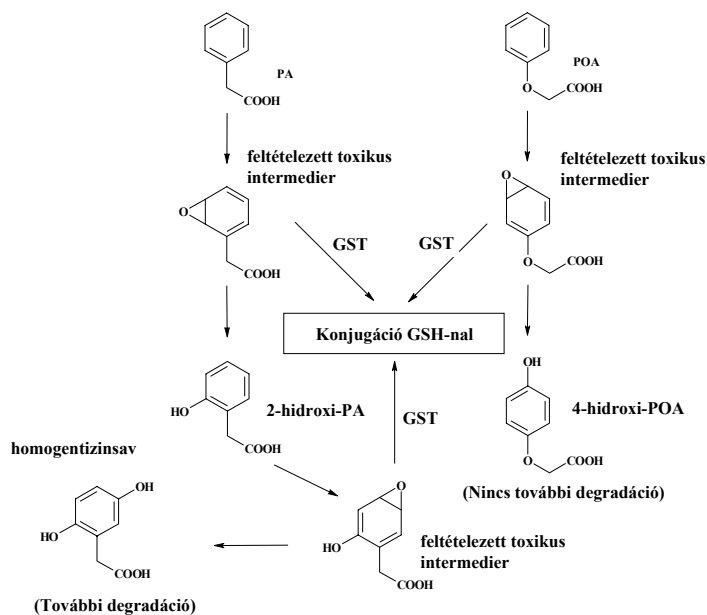
Az apoptózis a metazoonokra jellemző, jól szabályozott, genetikailag kódolt lépésekből álló sejthalási folyamat, melynek célja a fertőzött, mutáns, vagy egyszerűen csak

feleslegessé vált sejtek eltávolítása (Johansen *et al.*, 1998). Az emlőssejt-apoptózis jellemzői a megnagyobbodott nukleolusz, a citoplazma és kromatin kondenzációja, magfelbomlás és DNS fragmentálódás, a foszfatidil-szerin komponensek megjelenése a membrán külső oldalán, és a széttöredezett kromatint tartalmazó apoptotikus testek megjelenése, amiket aztán a sejt exocitózissal eltávolít (Johansen *et al.*, 1998). Ezek a folyamatok hasonlóak a gombákban megfigyelt jelenségekhez, ami alapján joggal feltételezhető, hogy a gomba-sejtek pusztulása a magasabb rendű eukarióta szervezetek apoptózisához hasonló, vagy azzal egyenértékű folyamat (McIntyre *et al.*, 1999). Például az egyik legjellemzőbb, általános apoptotikus markert, a DNS fragmentálódását megfigyelték a *Phytophthora infestans*, a *Neurospora crassa* és *Rhizoctonia solani* esetében is (White *et al.*, 2002). A *A. nidulans*-nál a DNáz és RNáz aktivitások növekedése kapcsolatba hozható a szénforrás kimerülésével (Reyes *et al.*, 1990a). A gomba-apoptózis molekuláris háttere egyelőre csak kevésé feltárt. A közelmúltban demonstrálták egy jól szabályozott sejthalál-program jelenlétét *S. cerevisiae*-ben (Fröhlich & Madeo, 2000; Laun *et al.*, 2001; Madeo *et al.*, 2002). Apoptózis-szerű folyamatokat provokált (1) az intracelluláris GSH készlet kimerülése; (2) exogén forrásból származó H₂O₂, (3) a *CDC48* gén pont-mutációja (a gén terméke szerepet játszik a homotipikus membrán-fúzióban); és (4) az emlős *bax* gén heterológ expressziója (ami mai tudásunk szerint egy apoptotikus inducer) (Ligr *et al.*, 1998; Madeo *et al.*, 1999; Fröhlich & Madeo, 2000). Ezekben az esetekben ROS akkumulálódott a *S. cerevisiae* sejtekben (Madeo *et al.*, 1999). Fonalas gombákban a lovastatin (Roze & Linz, 1998) és viszkozinamid (Thrane & Olsson, 1998) indukálhat apoptózis-szerű jelenségeket. Továbbá, a *P. chrysogenum* autolízise egy aktív, energiaigényes folyamat, ennél fogva szintén mutat bizonyos hasonlóságokat a magasabbrendű eukarióták apoptózisával (McIntyre *et al.*, 1999). Például, a korfüggő hidrolázok bioszintézise és poszttranszlációs érése jól kontrollált a gomba decelerációs és stacioner fázisában (Pócsi *et al.*, 1993; Pusztahelyi *et al.*, 1997b). Ezen megfigyelések tovább erősítik a nézetet, miszerint a gomba-autolízis határozottan különbözik a nekrotikus sejthaláltól, ahol a sejtek metabolikus aktivitása (valamely külső tényező, pl. xenobiotikumok vagy sejtmérgek hatására) megszűnik (McIntyre *et al.*, 1999). Az élesztők apoptózis-kutatásainak legfrissebb eredményei (Nestelbacher *et al.* 2000, Laun *et al.* 2001, Madeo *et al.* 2002) alapján valószínűleg molekuláris szintű kommunikáció zajlik az öregedés és apoptózis között (Zhang & Herman, 2002). Az apoptózis tehát felfogható úgy is, mint egy altruista sejtválasz a súlyos(odó) oxidatív károsodásokra, ami eredetileg az egysejtű élőlényekben fejlődött ki (Fröhlich & Madeo, 2000).

Bár az öregedés jelenségének leírására ez idáig igen nagyszámú modellt dolgoztak ki, egyikük sem általánosan elfogadott (Medvedev, 1990); közülük az egyik legismertebb az öregedés szabadgyökös elmélete („Free radical theory of ageing”). Az elmélet lényege, hogy az eukarióta sejtek életük során folyamatosan szabadgyököket generálnak, és e gyökök által okozott sérülések halmozódása okozza azokat a változásokat, amiket öregedésként érzékelünk (Harman, 1993). Az öregedés a sejtek funkcióvesztésével párhuzamosan megnöveli a programozott sejthalál lehetőségét; illetve maga az öregedés nem más, mint az akkumulálódó károsodások összességének eredménye, amiket az organizmus – igyekezvén fenntartani homeosztázisát – egyre csökkenő képességgel hárít el az antioxidáns rendszerei segítségével (Nohl, 1993; Harman, 1999). Számos adat támasztja alá ezt a hipotézist (Wickens, 2001): (1) Az élőlények élettartama és metabolikus aktivitása, valamint antioxidáns kapacitása között szoros kapcsolat van. (2) Kísérleti állatokban az antioxidáns enzimek túltermeltetése fokozza az élettartamukat. (3) Öregedés alatt nő a sejtek oxidatív károsodásának mértéke (Harman, 1993). Ezen elmélet segítségével jól magyarázható az öregedési pigmentek képződése, az öregedő sejtekben megfigyelhető lipidperoxidáció, a DNS és a fehérjék oxidatív károsodása, valamint a mitokondriumok működésének leromlása is. A fenti megfigyelések és kísérleti adatok ellenére azonban nincs direkt bizonyíték arra, hogy a ROS, illetve az általuk okozott károsodások ténylegesen felelősek lennének a sejtek öregedéséért. Alternatív magyarázatok - például, hogy a megfigyelt oxidatív változások nem okai, csak következményei az öregedésnek - sem zárhatóak ki. Éppen ezért az öregedést inkább egy komplex, sok tényező által kiváltott folyamatnak tekintik, amelyben a ROS és az általuk okozott károsodások fontos, de nem kizárólagos szerepet játszanak (Wickens, 2001).

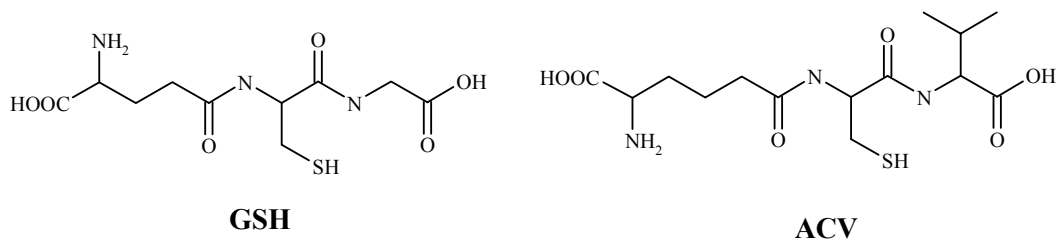
Az oxidatív stressz és autólízis kapcsolatát kereső kutatások eredményei igen fontosak lehetnek a süllyesztett ipari fermentációkban, mivel a legtöbb ipari folyamatban alkalmazott mikroorganizmus magas oldott O₂ koncentrációt igényel; az oxigén nemcsak terminális elektron-akceptorként nélkülözhetetlen (ATP termelés), de számos biokémiai folyamatban (például glükonát és β-laktám termelés) szubsztrátként is szerepel (Bainbridge *et al.*, 1992). Ilyen körülmények között ezek a mikrobák folyamatosan magas szintű oxidatív stressznek lehetnek kitéve (White *et al.*, 2002). A penicillin termelésben alkalmazott PA és POA protonofór oldallánc-prekurzorok szintén generálhatnak oxidatív stresszt (Emri *et al.*, 1997b; White *et al.*, 1999). Az epoxidok citokróm P450 monooxigenázok általi képződése alkénekből és aromás vegyületekből, és a mérgező intermedierek GST pumparendszer és γGT általi eliminációja régóta

ismert (Saxena *et al.*, 1991; Ishikawa, 1992; Sheehan *et al.*, 1993, 2001). A GSH-függő detoxifikáció pontos molekuláris folyamata egyelőre nem felderített. Az oldallánc-prekursorok toxicitásához a membránpotenciált szétkapcsoló hatásukon kívül (Henriksen *et al.*, 1998a, 1998b) feltételezések szerint az aromás monooxigenázok által katalizált hidroxilációs reakciók során hipotetikusán keletkező, toxikus epoxid intermedierek is hozzájárulhatnak (Emri *et al.*, 2001; 12. Ábra), és valószínűleg szerepet játszanak a GSH-függő detoxifikáló rendszer indukálásában is.



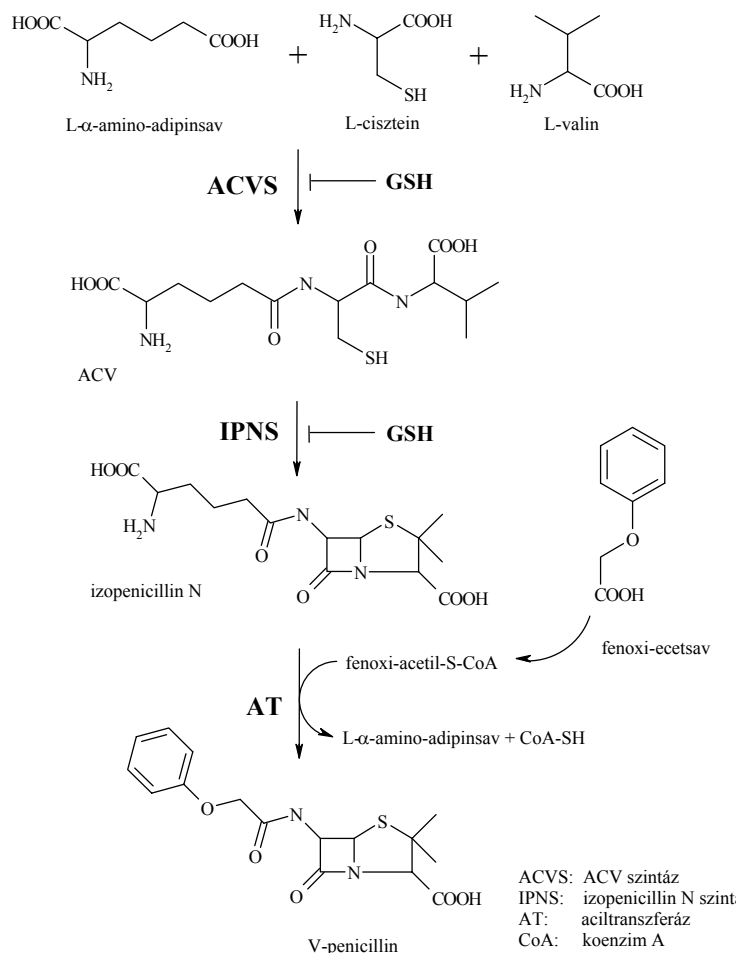
12. Ábra. A PA és POA GSH-függő detoxifikációjának lehetséges magyarázata (Emri *et al.*, 2000).

A PA és a POA ezért megfelelő koncentrációban kiürítheti a sejtek GSH készletét (Emri *et al.*, 1997b). A GSH ugyanakkor a β -laktám bioszintézis egyik legfontosabb intermediér vegyülete, az $\{\delta\text{-(L-}\alpha\text{-aminoadipil)-L-ciszteinil-D-valin}\}$ (ACV) szerkezeti analógja (13. Ábra). Ennélfogva a GSH igen erősen gátolja a penicillin termelést a szintézis két kulcsenzime, az ACV szintáz (ACVS) és izopenicillin N szintáz (IPNS) inhibíciója révén (Van de Kamp *et al.*, 1999; 14. Ábra). Ezért kézenfekvő és célszerű volna csökkenteni a sejtek intracelluláris GSH koncentrációját anélkül, hogy ez negatívan befolyásolná az idiofázisú micéliumok fiziológiai állapotát – és ezáltal remélhetőleg növelni tudnánk az ipari penicillin-termelést (Van de Kamp *et al.*, 1999). A Tanszéken végzett korábbi kísérletek alapján megállapítható, hogy az intracelluláris GSH szintek nem csökkenthetők a szén, nitrogén és kénforrások minőségének és mennyiségének a változtatásával (Emri *et al.*, 1998). Minden olyan változtatás a tápközeg összetételében, amely hátrányos volt a gomba glutation-anyagcseréjére nézve,



13. Ábra. A GSH és ACV szerkezeti hasonlósága

egyben az antibiotikum bioszintézisét is csökkentette (Sánchez *et al.*, 1988). Ezért az egyetlen lehetőség a GSH szintek alacsonyan tartására szelektív módon az oldallánc-prekursorok indukálta GSH-függő detoxifikáció kihasználásában rejlik (Emri *et al.*, 1997a, 2000 2001). A PA és POA protonofór tulajdonságára alapozva, (Henriksen *et al.*, 1998a), egy jól kontrollált, átmeneti pH csökkentéssel a termelő fázis kezdetén, az oldallánc-prekursorok a tápközegből bejuthatnak a sejtbe, és – mint xenobiotikumok, detoxifikációt indukálva – kiüríthetik a gomba GSH tartalékait (Emri *et al.*, 2000).



14. Ábra. A penicillin V bioszintézise és kapcsolata a GSH-nal.

3. CÉLKITŰZÉSEK

A fenti bevezetés és irodalmi áttekintés alapján munkám célkitűzéseit az alábbiakban foglaltam össze:

I. Az ipari *Penicillium chrysogenum* NCAIM 00237 törzs öregedő tenyészetének morfológiai és fiziológiai jellemzése.

1. Dolgozatom első részében választ keresek arra a kérdésre, milyen szerepet játszanak a gomba kitinolitikus enzimei a csírázó, aktívan növekvő, illetve a szénlimitált, öregedő tenyészetek morfológiai változásaiban, különös hangsúllyal az autolízis és fragmentáció folyamataira. Megvizsgálom továbbá a kitinázok *in vivo* gátlásának fiziológiai következményeit.

2. Bemutatom az öregedő tenyészetek vitalitásának, illetve metabolikus aktivitásának és légzés-intenzitásának változásait szénlimitáció alatt, illetve ennek megszűnése után. Megvizsgálom a gomba glükóz-hasznosítását és annak hatását a fenti paraméterekre.

3. Nyomon követem a fiatal és öregedő tenyészetek redox-státuszának, illetve glutation anyagcseréjének változásait (enzim- és metabolit-szinten), különös tekintettel a megfigyelt morfológiai változásokkal való lehetséges kapcsolatukra.

4. Bemutatom a szabadgyökképződést, illetve a fiatal és öregedő tenyészetek reaktív oxigénformák elleni védelmi rendszereit és lehetséges védekező stratégiáit. Elemzem a dioxigén kizárási elmélet alkalmazhatóságát a megfigyelt jelenségekre.

II. Egy ipari *Penicillium chrysogenum* törzs glutation-metabolizmusa és β -laktám termelése közötti kapcsolat vizsgálata.

1. A dolgozat második részében választ keresek arra a kérdésre, vajon indukálhat-e a tápközeg pH-jának változtatása az oldallánc-prekursorok által előidézett GSH-függő detoxifikációt ipari körülmények között? Amennyiben igen, milyen hatással van ez a gomba GSH metabolizmusára, illetve β -laktám termelésére?

4. ANYAGOK ÉS VIZSGÁLATI MÓDSZEREK

4.1. Törzsfenntartás és tenyésztés

A *Penicillium chrysogenum* NCAIM 00237 számú ipari, β -laktám termelő törzsét rizses Czapek-Dox táptalajon spóráztattam. 1kg B (fényezetlen) rizshez 100 g mogyorólisztet és 200 ml táptalajt adtam, majd 120 °C-on 120 percig steriliztem. A steril rizset Erlenmeyer lombikokba mértem szét (45-50 g/lombik), és kihűlés után spóraszuszpenzióval (10^8 spóra/lombik) oltottam, majd 25 °C-on 6-8 napig tenyésztettem. Ekkorra a rizsszemek felületén egységes konidiospóra réteg jelent meg. 25 °C-on, vákuumszekrényben (foszforpentoxid jelenlétében) csörgősre szárítottam, majd a kész lombikokat parafinnal lezártam, és 4 °C-on tároltam.

A Czapek-Dox táptalaj összetétele:

0,3 % (w/v) NaNO_3

0,1 % (w/v) K_2HPO_4

0,05 % (w/v) KCl

0,05 % (w/v) $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$

0,001 % (w/v) $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$

3 % (w/v) szacharóz

2 % (w/v) agar

pH=6,6

A fermentációs kísérletekhez használt ipari *Penicillium chrysogenum* NN P-8 törzset (Novo Nordisk A/S, Dánia) szintén rizses táptalajon spóráztattam: 27 g rizshez 6 ml YPG táptalajt adtam, majd – sterilizés után – lombikonként 10^8 spórával oltottam. A 25 °C-os, 14 napig tartó inkubálás alatt képződött vastag, sötétzöld konidiospóra-réteget 0,1 %-os (v/v) Tween oldattal mostam le, és a kapott spóraszuszpenziót –70 °C-on tároltam további oltásokhoz, illetve közvetlenül felhasználtam a fermentorok inokulálására.

A YPG táptalaj összetétele:

1 % (w/v) kazein-pepton (Merck, Darmstadt, Németország)

0,3 % (w/v) élesztőkivonat (Oxoid, Basingstake, UK)

2 % (w/v) glükóz
0,0001 % (w/v) nacinamid
0,0001 % (w/v) triamin klorid
pH=7,4

A NCAIM 00237 törzs süllyesztett tenyészeinek előállításához 500 ml-es Erlenmeyer lombikonként 100 ml komplex táptalajt 10^7 spórával oltottam (max. 4 ml szuszpenzióval), majd a lombikokat 25°C-on, 200 rpm fordulatszámmal rázattam (Pusztahelyi *et al.*, 1997a, 1997b). A spórák felnevesztéséhez használt komplex inokulum táptalaj összetétele:

1 % (w/v) (51 mM) glükóz
0,4 % (w/v) kazein pepton (Merck, Darmstadt, Németország)
0,4 % (w/v) élesztőkivonat (Oxoid, Basingstake, Nagy Britannia)
0,8 % (w/v) $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$
0,2 % (w/v) KH_2PO_4
0,05 % (w/v) $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$
7,27 ml 33% (w/v) kukoricalékvar (Ászári Termelőszövetkezet, Ászár)
pH=7,4

A *Penicillium chrysogenum* NN P-8 jelű ipari törzsével kapcsolatos összes fermentációs kísérlet a dán műszaki egyetemen, Dr. Jens Nielsen laboratóriumában került kivitelezésre (Technical University of Denmark, Biocentrum, Center for Process Biotechnology; Dánia, Lyngby). A gombát 25 °C-on, négy torlóval ellátott, két hatlapátos Rushton-turbinával kevert, 5 l munkatérfogató fermentorokban tenyésztettem (Henriksen *et al.*, 1998a, 1998b; Theilgaard & Nielsen, 1999). A fermentorok fém aljaihoz hűtő és fűtőelemek, hőmérő, fedelükhöz pH-mérő, pH szabályozó pumpák és levegőztető vezetékek voltak csatlakoztatva. Minden fermentort 25 ml spóraszuszpenzióval (2×10^7 spóra/ml) oltottam. A gomba felnevesztéséhez használt komplex táptalaj összetétele (4 l/fermentor, literenként):

5 ml kukoricalékvar (Sigma; 50 % szilárdanyag-tartalmú),
2 g KH_2PO_4
10 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
0,06 g $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$
0,2 ml habzástgátló (Pleuran; Fluka, Buchs, Svájc)
30 g szacharóz

1 g glükóz

pH=6,4

A tenyészetekhez 45 órák korán, egy lépésben az alábbi összetevőket tartalmazó termelő táptalajt adtam (1 l/fermentor):

25 g POA

2 g KH_2PO_4

10 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

0,06 g $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$

0,2 ml habzásgátló (Pleuran)

15 g szacharóz

pH=6,4

A fermentorokban a pH-t 2M NaOH, ill. HCl segítségével, egy automatikus pumpa-rendszer kontrollálta. A tenyészetek pH értékeit a kísérletek során a következőképpen szabályoztam:

Fermentor	0-45 óra	45-50 óra	50-81 óra
1	6,4	4,6 és 4,8	6,4
2	6,4	5,0	6,4
3	6,4	5,4	6,4
4	6,4	5,9	6,4
5	6,4	6,4	6,4

A tenyészetek kevertetését és levegőztetését a keletkezett biomasszának megfelelően az alábbiak szerint változtattam:

Idő (óra)	Levegőztetés (liter/perc)	Kevertetés (rpm)
0-20	2	200
20-40	5	300
40-81	8	500

4.2. Mintavétel és mintaelőkészítés

A rázott lombikos kísérletek során az intracelluláris enzimaktivitás méréseknél és a sejtek fehérjetartalmának meghatározásánál 10 ml tenyészetet zsugorított üvegszűrőn

átszűrtem, desztillált vízzel mostam, majd a szeparált sejtömeget azonos térfogatú, 4 °C-os, 0,1 M K-foszfát pufferben (pH=7,5) szuszpendáltam fel. A mintákat –20 °C-on történő fagyasztást követően X-press X-25 (AB Biox, Göteborg, Svédország) segítségével, illetve – a PP N-08 törzs esetében – dörzsmozsár és folyékony nitrogén alkalmazásával tártam fel. A kapott sejtmentes törmelékét 1,44 mM α -toluil-szulfonil-fluorid (fenilmetilszulfonil fluorid; PMSF) proteázgátlóval kezeltem, majd centrifugáltam (10000 g, 10 perc, 4 °C). Az így nyert felülúszót használtam az enzimaktivitások és a fehérjetartalom meghatározásához.

A glutation, peroxid, illetve szuperoxid koncentrációk meghatározásához 10 ml tenyészetet zsugorított üvegszűrőn átszűrtem, majd a micéliumot desztillált vízzel mostam és 4 °C-os, 5 % (w/v) 5'-szulfoszalicilsav oldatban tártam fel (alapos keverés után 30 perc inkubáció 0 °C-on). A feltárt mintákat centrifugáltam (20000 g, 10 perc, 4 °C) és a felülúszót trietanolammal (GSH, GSSG), illetve 0,5 M NaOH oldattal (peroxid, szuperoxid) való közömbösítés után használtam fel a mérésekhez.

Az extracelluláris N-acetil β -D-hexózaminidáz (HexAm) aktivitások, a pH, és a penicillin-, glükóz- illetve glükonátkoncentrációk meghatározásához a szűrt, majd centrifugált (10000 g, 0 °C, 10 perc) fermentlét közvetlenül felhasználtam (Pócsi *et al.*, 1993, 1999; Pusztahelyi *et al.*, 1997b).

A gomba légzési aktivitásának meghatározásához steril körülmények között, a tenyészet korától és állapotától függően 2-5 ml mintát vettem a vizsgált időpontokban, és az előzetesen kalibrált O₂-elektrodával azonnal mértem a sejtek oxigén-fogyasztását.

A glükóz-pótlásos kísérletekben 88, 115, 120 és 133 órakor annyi 50%-os glükózt adtam a kiválasztott lombikokhoz, hogy a végkoncentrációjuk 57 mM legyen.

A rázottlombikos kísérletek során a mintavételek időpontjai az alábbiak voltak (0 óra jelenti az inokulációt): 20, 24, 26, 28, 36, 45, 67, 88, 90, 94, 98, 110, 115, 120, 133, 146, 169 és 189 óra. A légzés-intenzitás vizsgálatoknál a glükóz-pótlások után 1 órával (azaz 89, 116 és 134 órakor) is történt mintavétel.

A mintavételeknél a legtöbb esetben párhuzamosan több (általában 2-4) lombikot használtam egyszerre. Így egyrészt az egyes tenyészetek esetleges kisebb eltérései átlagolódtak, másrészt ily módon elkerültem a lombikok tápfolyadék-térfogatának túlzott mértékű csökkenését, ami jelentősen befolyásolhatta volna a kapott

eredményeket. Az adott lombikból való utolsó mintavétel előtt a tenyészet térfogata sohasem csökkent a kiindulási érték 55%-a alá.

A fermentációs kísérletek során 45, 48, 51, 57, 69 és 81 órás tenyészeteket analizáltam. A fermentorokból minden vizsgált időpontban 100-100 ml mintát vettem. Ebből 5x10 ml-t szűrtem át zsugorított üvegszűrőn a GSH, GSSG, γ GT, GST és száraztömeg meghatározásokhoz. A micéliumot azonos térfogatú, 4 °C-os fiziológiás sóoldattal mostam. A minták szűrletét a penicillin V és cukortartalom meghatározásokhoz használtam fel. A micéliumot és a fermentlevet 2 ml-es Eppendorf csövekbe gyűjtöttem, és azonnal folyékony nitrogénbe mártottam; így a minta pillanatok alatt megfagyott. Egy fermentorra számolt teljes mintavételi idő nem haladta meg a 10 percet. A mintákat a feldolgozásig –80 °C-on tároltam.

4.3. Száraztömeg mérés

A szárazanyag-tartalom mérésénél a zsugorított üvegszűrőn, valamint előre lemért MN 640m szűrőpapíron (Macherey-Nagel, Düren, Németország) átszűrt és desztillált vízzel mosott tenyészeteket szobahőmérsékleten, súlyállandóságig (2-3 nap) szárítottam. A 88 órásnál idősebb tenyészetekből vett mintákat (a túl hosszú nyúló szűrés elkerülése miatt) előbb centrifugáltam, (4000 g, 3 perc, 4 °C), majd 1-2 ml desztillált vízbe vettem vissza, és azt szűrtem át a filteren (Pusztahelyi *et al.*, 1997a, 1997b). A szűrőpapírok és minták tömegének meghatározásához 4 tizedes jegyig pontos Sartorius mérleget használtam. A száraztömeget a fermentlé egy ml-ére vonatkoztattam.

4.4. Fehérjetartalom mérés

A minták fehérjetartalmának meghatározásához a Peterson által (1983) módosított Folin reakciót alkalmaztam. A kalibrációhoz BSA törzsoldatot (0,1-2 mg/ml tartományban) használtam.

4.5. Enzimaktivitás mérések

A kitináz, HexAm és γ -glutamil transzpeptidáz (γ GT) enzimek aktivitását végpont-reakciókkal, míg a kataláz, szuperoxid-dizmutáz (SOD), glutation-reduktáz (GR), glutation-peroxidáz (GPx), glutation S-transzferáz (GST), és glükóz oxidáz (GOX) specifikus enzimaktivitásokat "rate assay" módszerrel határoztam meg, és mintánként 3-4 párhuzamos mérés átlagából számolva a minták fehérjetartalmára vonatkoztattam. A specifikus aktivitásokat mkat/kg protein (a kataláz esetében kat/kg); az extracelluláris hidrolázok (kitinázok és HexAm) aktivitását pedig pkat/ml dimenzióban adtam meg. Az egyes enzimeknél a reakcióidő általában 1 perc, a reakcióelegy végtérfogata pedig 1 ml volt, amely 10 % (v/v) minta mellett az alábbi komponenseket tartalmazta:

4.5.1. Kataláz

20 mM Hepes (pH=7,6), 0,1 mM H₂O₂, λ =240 nm (Roggenkamp *et al.*, 1974).

4.5.2. SOD

A teljes SOD {SOD(CuZn) + SOD(Mn)} aktivitás meghatározásánál 50 mM Na-foszfát puffer (pH=7,8), 1,4 mM DETAPAC, 70 μ M Nitro Blue Tetrazolium (NBT), 0,2 mM xantin, 10 U/l xantin oxidáz (tehén tej; 1 U az az enzim-mennyiség, amely 1 perc alatt 1 μ mol xantint alakít át ureává), 1000 U/l kataláz (marha máj; 1 U az az enzim-mennyiség, amely 1 perc alatt 1 μ mol H₂O₂-t bont el). λ =560 nm (Oberley & Spitz, 1984). A SOD aktivitását egységekben (U/mg protein) tüntettem fel; 1 U az az enzim-mennyiség, amely az NBT redukációjában 50%-os gátlást okoz.

4.5.3. GR

0,1 M Na-foszfát puffer (pH=7,6), 0,1 mM NADPH, 1,5 mM oxidált glutation (GSSG), λ =340 nm (Pinto *et al.*, 1984).

4.5.4. GPx

50 mM Tris-HCl (pH=7,6), 0,091 mM EDTA, 0,12 mM NADPH, 0,25 mM GSH, 440 U/l GR (*Saccharomyces cerevisiae*; 1 U az az enzim-mennyiség, amely 1 perc alatt 1 μ mol GSSG-t redukál), 0,1 mM kumén hidroperoxid, λ =340 nm (Chiu *et al.*, 1976).

4.5.5. GST

0,1 M Na-foszfát puffer (pH=6,5), 1mM EDTA, 1 mM GSH, 1mM CDNB, $\lambda=340$ nm (Warholm *et al.*, 1985). A reakciót mindig a GSH-val indítottam.

4.5.6. GOX

A glükóz koncentráció meghatározásához használt reakció (Leary *et al.*, 1992) (4.6.1.) módosításával végeztem. A reakcióelegy tartalmazott 900 μ l reagenst {11 mM fenol, 0,76 mM 4-amino-antipirin, 1 kU/l torma peroxidáz (HRP) és 50 mM glükóz Na-K foszfát pufferben (0,1 M; pH=6,6) oldva} és 100 μ l mintát. A reakciót ekkor az *Aspergillus* GOX segédenzim helyett a mintában jelenlévő *Penicillium* GOX katalizálta. Az extracelluláris és oldott intracelluláris enzimaktivitások mellett a teljes sejthez kötött GOX aktivitást is vizsgáltam (Emri *et al.*, 1999; Sándor *et al.*, 1998). Ebben az esetben az X-press-el feltárt mintát nem centrifugáltam le, hanem a sejtfal-törmeléket is tartalmazó szuszpenziót közvetlenül felhasználtam az aktivitás-méréshez. Az oldott intracelluláris és teljes sejthez kötött aktivitások különbségét a sejtfalhoz kötött GOX aktivitásának tulajdonítottam. A *P. chrysogenum* GOX aktivitásokat az *Aspergillus* GOX kalibrációja alapján becsültem meg (0,39-5 U/l *Aspergillus* GOX, Sigma G7141; 1 U definíció szerint 1,0 μ mol D-glükózt alakít át D-glükonáttá és H₂O₂-dá 1 perc alatt).

4.5.7. γ GT

A γ GT esetében a reakcióelegy 0,1 M Tris-HCl-t (pH=8,0), 20 mM glicil-glicint, 1 mM γ -glutamil-*p*-nitroanilidet és 10 % (v/v) mintát tartalmazott. A méréshez közvetlenül az X-press-el feltárt és PMSF-el kezelt, de még nem centrifugált sejtmentes törmeléket használtam. 1 órás, szobahőmérsékleten (RT) történő inkubációt követően a mintákat centrifugáltam (20000 g, 10 perc, 4 °C) és a felszabadult *p*-nitroanilid mennyiségét a $\lambda=410$ nm-en mért abszorbancia változásból határoztam meg (Emri *et al.*, 1997).

4.5.8. Extracelluláris HexAm

Az N-acetil- β -D hexózaminidáz aktivitások meghatározásánál *p*-nitrofenil N-acetil- β -D-glükózamint (PNP-NAG) használtam szubsztrátként. A reakció menete: 700 μ l 0,1 M Na-citrát puffer (pH=4,5) és 100 μ l enzimminta (szűrlet) 5 perces előinkubációját követően (37 °C) 200 μ l szubsztrát-oldatot (5,5 mM PNP-NAG 0,1 M citrát pufferben oldva) adtam az elegyhez, majd további 10 percig inkubáltam 37 °C-on. A reakciót 2 ml 0,2 M Na-borát pufferrel (pH=10,0) állítottam le. A keletkezett PNP-t $\lambda=400$ nm-en detektáltam. A kalibrációhoz 0,1 M citrát és 0,2 M borát pufferek 1:2 arányú

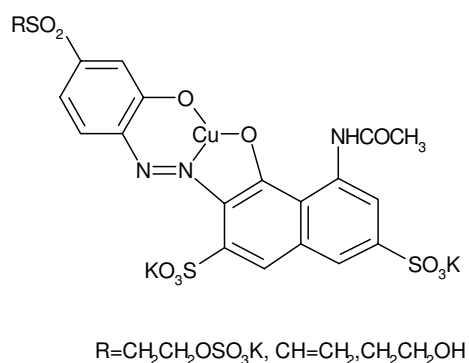
keverékével hígított PNP-t használtam (0-100 nM). (Pócsi *et al.*, 1993, 1999; Pusztahelyi *et al.*, 1997b).

4.5.9. Extracelluláris kitinázok

Az extracelluláris kitináz-aktivitások méréséhez a szűrt, centrifugált fermentlét (az allóزامidin eltávolítása érdekében) kétszer dializáltam (24 órán át) 250-szeres térfogatú, 0,1 M Na-citrát (pH=5,5) pufferben (Pócsi *et al.*, 1999; Sándor *et al.*, 1998). A minták kitinolitikus aktivitását kétféle módszerrel határoztam meg:

1. A kitináz mérésnél tisztított kolloid rákkitint (0.15 %, w/v) oldottam 0,1 M Na-citrát pufferben (pH=5,5). A 2 ml-es reakcióelegyhez 0,6 nkat *P. chrysogenum*-ból tisztított HexAm-t adtam segédenzímként (Pócsi *et al.*, 1999; Sándor *et al.*, 1998). 1 óráss, 37 °C-on történő rázatott inkubálás után a reakciót forralással állítottam le, és a felszabaduló *N*-acetil-D-glükózamin mennyiségét spektrofotometriásan határoztam meg (Pócsi *et al.*, 1999; Sándor *et al.*, 1998).

2. A kitinázok gyors, kvalitatív (csak relatív, egymással összevethető, de nem számszerűsített aktivitások) detektálása CM-kitin-RBV (karboximetil-kitin-Remazol Brilliant Violet; Loewe Biochemica GmbH, Sauerlach, Németország) (15. Ábra) mesterséges szubsztrát segítségével történt. A reakcióelegy ez esetben tartalmazott 0,1 ml CM-kitin-RBV szubsztrátot (2mg/ml); 0,2 ml 0,1 M Na-citrát puffert (pH=5,5) és 0,1 ml mintát (ez lehetett szűrt fermentlé vagy gélszűréssel és affinitás-oszlopon tisztított frakció). A reakciót (5 perc, RT) 0,1 ml 2M HCl segítségével állítottam le, majd az Eppendorf-csöveket 10 percig 0 °C-on inkubáltam. A savas közegben kicsapódó szubsztrát-polimert centrifugálással (10000 g, 0 °C, 4 perc) távolítottam el. A felülúszó enzimátikus hasítás során felszabaduló RBV koncentrációját fotometriásan határoztam meg, $\lambda=550$ nm-en.



15. **Ábra.** Az RBV szerkezeti képlete. A kitin pontos kapcsolódási helye nem meghatározott (Den Tandt & Scharpé, 1997).

4.6. Cukortartalom mérése fermentléből

4.6.1. Glükóz meghatározás

A fermentlé glükóz-koncentrációját Leary módszere szerint határoztam meg. A reakcióelegy tartalmazott 900 μ l reagenst {11 mM fenol, 0,76 mM 4-amino-antipirin, 4 kU/l *Aspergillus niger* GOX és 1 kU/l torna-peroxidáz (HRP) segédenzimek 0,1 M Na-K foszfát pufferben (pH=6,6) oldva; definíció szerint 1 kU az az enzim-mennyiség, amely pirogallolból 20 másodperc alatt 1 g purpurogallint állít elő} és 100 μ l szűrt, centrifugált fermentlét. A reakció során $\lambda=500$ nm-en, 3 percig detektáltam az abszorbancia-változást (Leary *et al.*, 1992). A kalibrációhoz steril, szűrt inokulum táptalajban oldott glükózt használtam (2,5-50 mM tartományban).

4.6.2. Glükonát meghatározás

Az extracelluláris glükonát-koncentrációk meghatározását a glükonát-dehidrogenáz assay módosításával (Matsushita *et al.*, 1979) végeztem. A reakcióelegy 900 μ l reagenst {100 μ M fenazin metosulfát és 100-150 μ M 2,6-diklorofenol-indolfenol K-foszfát pufferben (33 mM, pH=6,0) oldva}, 100 μ l szűrt, sejtmentes médiumot és (a 33 mM glükonát helyett) 20 μ l (0,5 U/reakció) *Pseudomonas sp.* GDH segédenzimet (D-glükonát oxidoreduktáz, EC 1.1.99.3; GDH; Sigma G7275) tartalmazott. (Definíció szerint 1 Unit enzim 1 perc alatt 1 μ mol diklorofenol-indolfenolt redukál). A reakció során $\lambda=600$ nm-en detektáltam az abszorbancia-csökkenést 1 perc alatt. A kalibrációt steril, centrifugált inokulum táptalajban oldott 0-25 mM glükonát törzsoldattal végeztem.

4.6.3. Szacharóz meghatározás

A fermentlé szacharóz-tartalmát egy Cobas Mira automata pipettáló és fotometrálo készülék segítségével (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Németország) határoztam meg. A reakcióhoz szükséges enzimeket és reagenseket tartalmazó kit a Böhringer Mannheim (R-Biopharm GmbH, Németország) terméke volt. A reakció lényege: egy β -fruktozidáz (invertáz) enzim segítségével történő hidrolízis után a felszabadult glükóz hexokináz és glükóz-6-foszfát dehidrogenáz jelenlétében D-glükonát-6-foszfáttá alakul; a folyamat során ekvivalensen keletkező NADPH $\lambda=340$ nm-en detektálható.

4.7. Az oxidált és redukált glutation mennyiségének meghatározása

A sejtek oxidált glutation (GSSG) tartalmának méréséhez az Anderson (1985) által kidolgozott "rate assay" eljárást használtam. A reakcióelegy az alábbi összetételű volt: 900 μ l reagens {115 mM Na-foszfát puffer (pH=7,5); 50 mM EDTA; 0,6 mM 5,5'-ditio-bisz(2-nitrobenzoészav) (DTNB); 0,2 mM NADPH; 1,5 kU/l GR (*Saccharomyces cerevisiae*; 1 kU az az enzim-mennyiség amely 1 perc alatt 1 mmol GSSG-t redukál)} és 100 μ l minta. A reakció $\lambda=412$ nm-en, 1 percig zajlott. A minták redukált glutation (GSH) tartalmát 2-vinilpiridines kezeléssel (185 mM, 1 óra, pH=6,0-7,0) reagáltattam el.

A GSH tartalom meghatározása az Anderson (1985) féle módszer alapján történt oly módon, hogy a minták teljes glutation (GSH+GSSG) tartalmát mértem meg (a 2-vinilpiridines kezelés elhagyásával) és a GSSG tartalom ismeretében határoztam meg a GSH mennyiségét. A mért GSH és GSSG mennyiségeket a sejtek száraztömegére vonatkoztattam és nmol/mg CDW dimenzióban adtam meg.

4.8. Az intracelluláris peroxid és szuperoxid koncentrációk meghatározása

Az intracelluláris peroxid és szuperoxid szinteket a 2',7'-diklorofluoreszcein (DCF) 2',7'-diklorofluoreszcein diacetátból (DCFDA) és etidium (Et) dihidroetidiumból (EtH₂) való képződésével jellemeztem (Royall és Ischiropoulos, 1993; Carter *et al.*, 1994; Emri *et al.*, 1997, 1999a, 1999b). Minden vizsgált időpontban 10 μ M DCFDA-t vagy 10 μ M EtH₂-t (100 μ l etil-alkoholban oldva) adtam 20 ml tenyészethez és további egy órán keresztül inkubáltam 100 ml-es Erlenmeyer lombikban (25 °C, 240 rpm). Ezután a micéliumot összegyűjtöttem, és a sejteket feltártam (4.2.). Az egy óra alatt képződött DCF és Et koncentrációját egy Jasco 821-FP típusú spektrofluoriméterrel ($\lambda_{\text{ext,Et}}=488$ nm, $\lambda_{\text{em,Et}}=610$ nm; $\lambda_{\text{ext,DCF}}=502$ nm, $\lambda_{\text{em,DCF}}=523$ nm) határoztam meg (Emri *et al.*, 1997, 1999a, 1999b). A kalibrációhoz NaOH-val (2M) semlegesített 5'-szulfoszalicilsavban (5 w/v %) oldott DCF (0-100 nM), illetve Et (0-100 nM) hígítási sort használtam.

4.9. Allóزامidines kezelés

Az előzetesen (7 tizedes jegyig pontos analitikai mérleggel) kimért allóزامidint 5,0 mM ecetsavban oldottam fel; a törzsoldat koncentrációja 2,0 mg/ml volt. A kitináz inhibítort 9,6 μ M végkoncentrációban a kései exponenciális/decelerációs fázisú, 35 órás tenyészetekhez adtam hozzá; ekkorra az összes kiindulási glükózt elfogyasztotta a gomba (Pócsi *et al.*, 2000; Pusztahelyi *et al.*, 1997a, 1997b; Sándor *et al.*, 1998). Az allóزامidin csírázást befolyásoló hatásának vizsgálatakor a 9,6 μ M inhibítort az inokuláció időpontjában (0 óra), és az intenzív csírázás kezdetén (20 óra) adtam a tápközegbe.

Az *in vitro* enzim inhibíciós kísérletekben 115 órás, centrifugált (allóزامidin-mentes, kontroll tenyészetből származó) fermentlét használtam extracelluláris kitináz-mintaként. Az allóزامidin törzsoldatot 0,1 M Na citrát pufferben (pH=5,5) oldottam, és adtam a kitináz reakció-elegyhez (4.5.9.) 0-20 μ M koncentráció-tartományban. Az IC₅₀ érték meghatározását egy GraFit grafikus adat-analizáló programmal (Erithacus Software Ltd.; Verziószám: 2.10) végeztem.

4.10. A fragmentáció kvantifikálása és a sejtek túlélő-képességének vizsgálata

A kontroll és allóزامidin-kezelt tenyészetek 116, 134 és 165 órás tenészeteteiből vett minták egysejtű képleteinek, lekerekedett végű, két sejtből álló fragmentumainak és egyéb (legalább két szeptumot tartalmazó) hifaelemeinek számát négy független kísérletből, minden vizsgált időpontban mintánként 900-1800 hifa-elem analízisével határoztam meg. A sejtek mikromorfológiai vizsgálatához egy SPlan 20NH fázis-kontraszt objektívvel felszerelt OLYMPUS BH-2 mikroszkópot használtam (Pócsi *et al.*, 2000).

A 116, 134 és 165 órás tenyészetek alakos elemeinek a számát élőcsírá-számlálással is meghatároztam. Ehhez deszillált vízben hígítási sorozatot készítettem a tenyészetek mintáiból, majd Petri-csészénként 100-100 μ l megfelelő koncentrációjú sejtuszpenziót pipettáztam a 2,0 %-os agar-tartalmú szilárd táptalajra, aminek összetétele megegyezett a rázottlombikos kísérletekben használt inokulum táptalajával. A Petri-csészéket 25 °C-on inkubáltam egy héten át, majd megszámláltam a kinőtt telepeket.

Az allóزامidinnel kezelt és kontroll tenyészetek vitalitásának, illetve túlélőképességének vizsgálatát 88, 115, 120 és 133 órás tenyészetekkel végeztem. A tenyészetek 30 ml-ét szűrtem vagy centrifugáltam (2500 rpm, 3 perc), majd a micéliumokat 30 ml friss, allóزامidin-mentes, 1% glükózt tartalmazó inokulum-táptalajra mostam át, és a lombikokat tovább inkubáltam (25 °C, 200 rpm). Az atmoszféra követően 35-50 óráig figyeltem a száraztömeg változásait (Emri *et al.*, 1997a, 1999). A fragmentumok kinövési frekvenciáinak detektálását (nem növekvő, egy vagy két végén csírázó, illetve elágazó fonalat képző fragmentumok) 15 órás rázatás után végeztem. Minden vizsgált időpontban (88, 115 és 133 órákor) mintánként 100-130 alakos elemet regisztráltam, és a kapott eredményeket dolgoztam fel.

4.11. A sejtfalban lévő kitin-glükán elegy kinyerése és elem-analízise

A kriptikus növekedés fázisú (165 órás), kontroll és allóزامidin-kezelt tenyészetekből származó szűrt, mosott micélium 1 g-ját (nedves tömeg) 20 ml 0,5 M NaOH-ban, 100 °C-on főztem 60 percig. A főzés után maradó kitin-alkálioldhatatlan glükán elegyet desztillált vízzel mostam ismételtelen (a semleges pH eléréséig), majd liofilizáltam. A sejtfal-preparátum szén és nitrogén elemvizsgálására a Biogal Rt. Analitikai Laboratóriumában került sor, egy GC-MS tömegspektrométerrel. A csapadék elemvizsgálata után következtettem annak százalékos kitintartalmára (Pócsi *et al.*, 1999; Sándor *et al.*, 1998).

4.12. A hifák festése fluoreszcens festékekkel

Az image analízissel történő vitalitási és morfológiai vizsgálatok a dán műszaki egyetemen, Dr. Jens Nielsen laboratóriumában kerültek kivitelezésre (Technical University of Denmark, Biocentrum, Center for Process Biotechnology; Dánia, Lyngby). A kísérletekhez kétféle fluoreszcens festéket használtam (McIntyre *et al.*, 2001; Mauss *et al.*, 1997):

1. DiOC₆ (3,3'-dihexilokarbocianin)-t (Molecular Probes, Leiden, Hollandia) az aktív mitokondriumok és endoplazmatikus retikulum festéséhez (sárgás színű, a mitokondriumokban akkumulálódik).

2. CFW (Calcofluor White) M2R-t (Molecular Probes, Leiden, Hollandia) a sejtfa- és szeptumok festéséhez (ezüstkék színű, a sejtfa kitin-glükán vázához kötődik).

A vizsgálat során a következő oldatokat használtam fel:

- PBS oldat (Phosphate buffer saline) 0,1 M-os: 4,623 g KH_2PO_4 , 4,414 g Na_2HPO_4 és 4,5 g NaCl 500 ml desztillált vízben oldva (pH=7,4).
- DiOC₆ (3,3'-dihexilokarbocianin) törzsoldat (1,0 µg/ml etanol), 4 °C-on, alufóliával fedett üvegben tárolva; a festéshez használt oldat ennek ötszörös hígítása volt (0,2 µg/ml).
- Calcofluor White M2R törzsoldat (0,3 µg/ml desztillált víz), 4 °C-on, alufóliával fedett üvegben tárolva.

A morfológiai mérésekhez friss és 5 °C-on tárolt, Lactophenol Blue-val (LB) kezelt (500 µl minta + 10 µl LB) mintákat egyaránt felhasználtam. A vitalitás-vizsgálatokat közvetlenül a mintavétel után azonnal, a lehető legkisebb késedelemmel végeztem. A mintákat analízis előtt ~ 0,5-1 mg micélium/ml-es koncentrációra hígítottam, hogy elkerüljem a tárgylemezen az alakos elemek esetleges átfedéseit.

A vitalitásfestés során alufóliával borított 1,5 ml-es Eppendorf-csőbe a következő reakcióelegyet mértem össze: 200 µl PBS + 200 µl minta + 10 µl DiOC₆ + 10 µl CFW. Ezt óvatosan összekevertem, és 5 percig inkubáltam szobahőmérsékleten, majd azonnal mikroszkópi metszetet készítettem és analizáltam a mintákat.

4.13. Image Analízis

Az image analízis vizsgálatokat egy Leica Quantimet 600-S Image Analyzer rendszer (Leica Quantimet 5501W számítógép; Leica-Qwin képfeldolgozó szoftver, Leica, UK), egy Nikon (Optiphot 2) epi-fluoreszcens mikroszkóp, és az ehhez szerelt Kappa CF-8/1 FMC monokróm videokamera (Kappa Messtechnik) segítségével végeztem (McIntyre *et al.*, 2001). A hifák vizsgálatánál alkalmazott teljes nagyítás 160-szoros volt.

A mintákról az „élő kép”-eket a CCD (charge coupled device) félvezető chippel ellátott monokróm kamerán keresztül a számítógép digitalizálta. A fényforrásként szolgáló higanylámpa csak addig világította meg a mintát, míg a képdigitalizálás tartott (néhány

másodperc), majd egy blokk segítségével azonnal elzártam a fény útját, hogy a festékek kioltódása („fotobleach”) a lehető legkisebb legyen. Minden kiválasztott objektumot kétszer mértem meg, először a DiOC₆-nak (483/501 nm), majd a CFW-nak (437/490 nm) megfelelő szűrőblokkok alkalmazásával. A kapott képek feldolgozása egy, a Leica-szoftveren belül kifejlesztett, félautomatikus Quips-rutin segítségével történt. A képen az objektum kijelölését és a 256 színű skálán (0: teljesen fekete; 255: teljesen fehér) a színhatárérték-beállítást (vagyis azt, hogy mit tekintsen a program jelnek) manuálisan végeztem. A beállított képen a világos régióból kapott képpont (pixel)-szám arányos volt a hifák, illetve a metabolikusan aktív régiók területével (méretével). Mintánként 100 hifát, illetve fragmentumot elemeztem, és a program ezek adatait átlagolta. A tenyészetek relatív vitalitását az adott időpontban mért átlagos aktív régiók (képpont) és teljes hifa-területek (képpont) arányszámával fejeztem ki.

4.14. Teljes és alternatív légzés mérése

A tenyészetek légzését egy, a Tanszéken készített oxigrafikus cellában (V=10 ml), Clark-típusú oxigén-elektroda segítségével mértem (Karaffa *et al.*, 1996). A citokróom-függő légzést 1 mM KCN hozzáadásával állítottam le, az ezután fennmaradó légzési aktivitást cianid-rezisztensnek vettem. Az oxigén-elektrod kalibrációjához 0,1 M K-foszfát puffert (pH=6,8; RT) és Na₂S₂O₃-t használtam (Karaffa *et al.*, 1996, 1999).

4.15. Penicillin V termelés becslése

A penicillin-V termelés becsléséhez standard agardiffúziós módszert alkalmaztam; egy penicillin-hiperszenzitív *Micrococcus luteus* törzs sejtsuszpenzióját szélesztettem 2,35 % (w/v)-os telepszámláló agarlemezre, melybe előzőleg lyukakat fúrtam, és 30 µl szűrletet, illetve referenciaként különböző koncentrációjú penicillin-V törzsoldatot pipettáztam. 48 órás, 25 °C-on történő inkubációt követően a lyukak körül tisztán látható, szabályos gátlási gyűrűk jelentek meg, melyek átmérőjét vonalzóval határoztam meg.

4.16. Kitináz-tisztítás affinitás-kromatográfiával

A 115 órás tenyészetek fermentlevéből (PMSF kezeléssel vagy anélkül) 70 %-os ammónium-szulfátos precipitációt végeztem. A kapott csapadékot 12 órán át 4 °C-on kevertetem, majd centrifugáltam (4 °C, 10000 rpm, 10 perc), és újraoldottam annyi 0,1 M Na-citrát pufferben (pH=5,5), hogy 10-szeres töményedést érjek el (20 ml fermentlé csapadéka → 2 ml pufferben). Ezt dializáltam 24 órán át 4 °C-on, 2x2 liter Na-citrát pufferben (pH=5,5). A dializált mintákból 2-5 ml-t vittem fel a saját készítésű kitináz-affinitás oszlopra (hossza 20 cm; átmérője 1 cm), amely töltetként kvarchomok : tisztított rákkitin = 20 g : 1 g elegyét tartalmazta. Az oszlopot előzetesen egy éjszakán át mostam Na-citrát pufferrel, RT-n. A mintát, felvitele után 90 percig inkubáltam, majd 5-5 ml-es frakciókat szedtem, 1 ml/perc átfolyási sebességgel. Az alábbi eluenseket használtam fel:

1. 0,1 M Na-citrát puffert (pH=5,5) a nem kötődött fehérjék lemosására;
2. 80 mM ecetsavat a nem specifikusan kötődött fehérjék lemosására;
3. 50 %-os etilén-glikoltelített sóoldatban a specifikusan kötődő fehérjék eluálására.

A frakciók kitináz-aktivitását a **4.5.9.** alapján, CM-kitin-RBV szubsztrát segítségével követtem nyomon. Egy minta felvitele után eluensenként 10-12 frakciót szedtem. Egy oszloptöltetet alapos mosás után 2-3 alkalommal újra felhasználtam.

4.17. Kitináz izoenzim-analízis és M_r meghatározása SDS-PAGE segítségével

A kitináz izoenzim-profil 115 órás kontroll, illetve allóزامidin-kezelt, dializált fermentléből tisztított mintákból (**4.16.**), nem redukáló, 12,5 %-os akrilamid tartalmú SDS-PAGE segítségével határoztam meg. A gélelektroforézishez egy Mini-Protean II elektroforizáló készüléket (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA) használtam. A fehérjecsíkokat Coomassie Blue R-250 festéssel tettem láthatóvá. Az M_r értékeket Laemmli (1970) módszerével határoztam meg. Móltömeg-standardként az Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Svédország) termékét, az LMW kalibrációs kitet ($M_r=14400-94000$) használtam.

4.18. Statisztikai elemzés

A statisztikai elemzésekhez 3-6 független mérés átlagát és azok szórását (SD) határoztam meg. Az egyes fiziológiai paraméterekben (szárztömeg, hidroláz-termelés, élőcsíra-szám, stb.) történt változások szignifikancia vizsgálatához a Student-féle t-tesztet használtam. Csak a $p < 5\%$ valószínűségi szinteken jelentkező különbségeket tekintettem szignifikánsnak. A fragmentáció statisztikai analízisét a „SAS for Windows system” (6.12 verziószámú) programmal végeztük. Ebben az esetben az alakos elemek számának időbeli, és allóزامidin-függő változási szignifikanciáját a „two-way analysis of variance” módszerrel számoltuk (Sándor *et al.*, 1998).

4.19. Felhasznált vegyszerek

A kísérletekhez felhasznált finomvegyszerek, ha másként nem jelöltem, a Sigma-Aldrich Kft-től (Budapest) származtak. A tápanyag-összetevők és egyéb vegyszerek analitikai tisztaságúak voltak, és a Reanal-tól (Budapest) kerültek beszerzésre. Az allóزامidint az Eli-Lilly Research Lab & Company (Indianapolis, IN, USA) bocsájtotta rendelkezésünkre.

5. EREDMÉNYEK

A *Penicillium chrysogenum* NCAIM 00237 törzsének növekedését és az öregedő tenyészetek morfológiai, illetve fiziológiai változásait komplex táptalajon, 1% (51 mM) glükóz szénforráson nevelt, rázottlombikos tenyészetek felhasználásával tanulmányoztam (4.1. fejezet). A tenyészetekhez 35 órákor adott 9,6 μ M allóزامidin és/vagy 115 órákor pótolta 57 mM glükóz hatására megfigyelt morfológiai és fiziológiai változásokat, valamint a szabadgyök-szintek változásait és a gomba ROS elleni védekezését a 16-43. Ábrákon és az 1-3. Táblázatokban foglaltam össze.

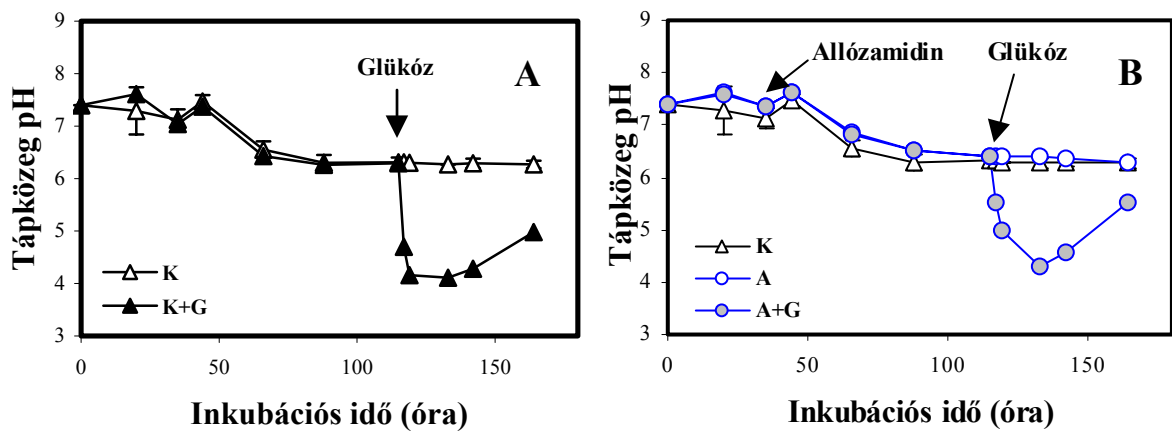
5.1. A *P. chrysogenum* tenyésztése és növekedési fázisai

A tápközeg pH-ja a fermentáció során a kiindulási pH=7,4 értékről az exponenciális növekedési szakaszban kismértékben csökkent (pH=6,8-ra), azonban a stacioner fázisban újra pH=7,4 fölé emelkedett, majd a sejtlízis kezdete után pH=6,6-6,7 körüli értéken stabilizálódott (16. Ábra). A tenyészetek száraztömege az exponenciális fázisban (20-34 óra) meredeken növekedett (18. Ábra). Ezt a szakaszt a hifák intenzív nyúlása valamint elágazása jellemezte, ami végül jellegzetes, pelletes morfológia kialakulásához vezetett (Nielsen & Krabben, 1995; 19. Ábra). A kiindulási glükózt a gomba már a 34. órára teljesen elfogyasztotta (17. Ábra), ám a tenyészetek száraztömege ezt követően lassuló ütemben tovább növekedett (decelerációs fázis), és végül 40 óra körül elérte a maximumot (8-9 mg/ml). A rövid, mindössze néhány óras stacioner fázist követően erőteljes vakuolarizáció, majd intenzív autólízis és fragmentáció indult meg a tenyészetekben (20/A. Ábra), amit a száraztömeg gyors, 100 óra után pedig egyre lassuló csökkenése is jelzett (18. Ábra). Ezzel párhuzamosan a pelleték szétestek, és egyre rövidebb, soksejtes micéliumokká darabolódtak. Az inkubáció 115. órájára a fonalas elemek gyakorlatilag teljesen eltűntek a tenyészetekből, és – a korábbi megfigyeléseknek megfelelően (Pusztahelyi *et al.*, 1997a, 1997b) – főként 9-11 μ m átmérőjű, 20-28 μ m hosszú, lekerekedett végű, két sejtből álló élesztőszerű fragmentumok váltak domináns túlélő képletekké (21/A. Ábra). Mellettük kisebb számban jellegzetes, egy sejtből álló formák is létrejöttek.

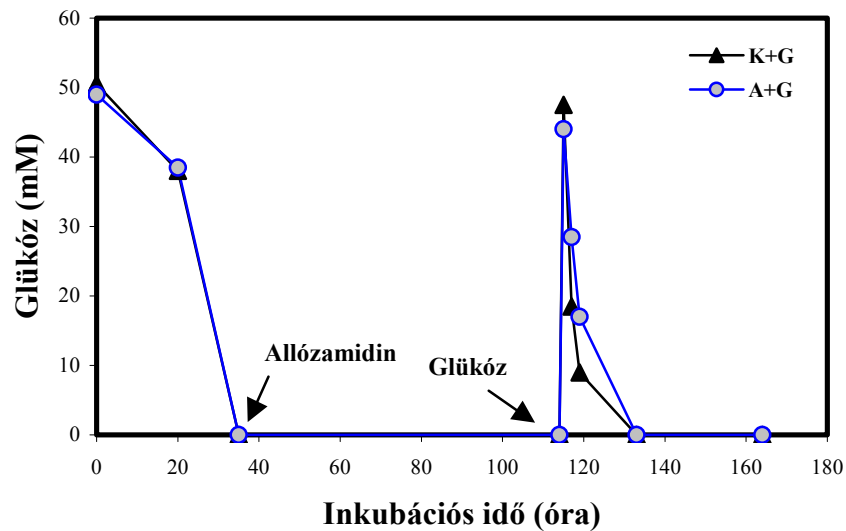
5.2. Allóزامidin és morfológiai változások

Előkísérleteinkkel és irodalmi adatokkal (Sándor *et al.*, 1998) jó egyezést mutatva, az allóزامidin szignifikánsan gátolta az autolítikus biomassza-vesztést az autolizáló tenyészetekben (18. Ábra). Ez a hatás a legszembetűnőbb az inkubáció 66-88. órája között volt (20/B. Ábra); ekkor az inhibitor jelenlétében a sejtek száraztömege csaknem másfélszerese volt a kontrollénak (18. Ábra). Ez az arány később ugyan csökkent, azonban (szénlimitáció esetén) a kezelt tenyészetek száraztömege a kísérletek egész ideje alatt szignifikánsan nagyobb maradt (18. Ábra). Az allóزامidin-kezelt micéliumok feldarabolódása az autolítikus fázis végére ugyanakkor a kontroll tenyészetekéhez teljesen hasonló, lekerekedett végű, kétsejtes fragmentumokat eredményezett (21/A és 21/B Ábra).

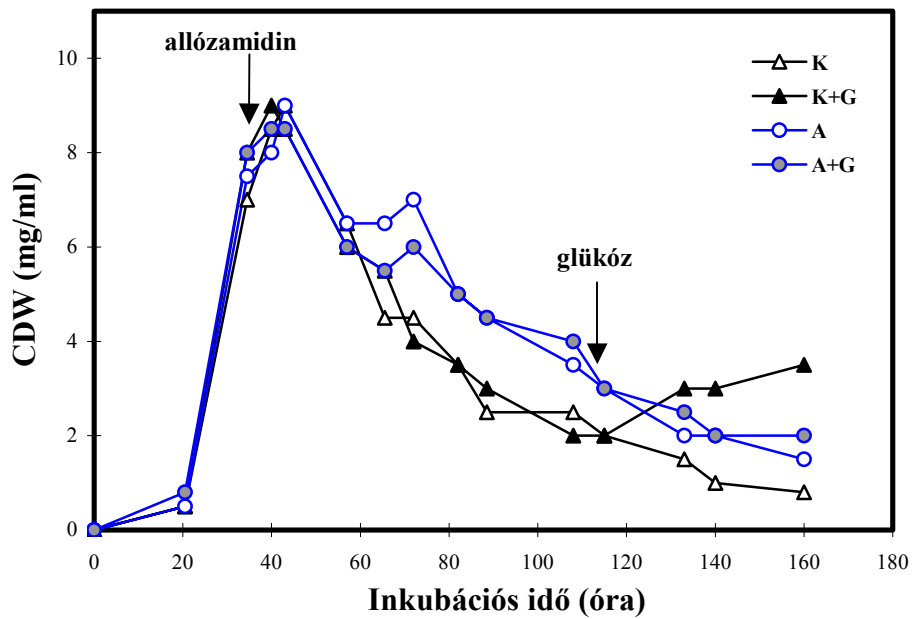
Hangsúlyozandó, hogy a kontroll tenyészetekkel ellentétben, ahol intenzív csírázás és biomassza-gyarapodás ($2,0 \Rightarrow 3,5$ mg/ml 115 és 166 óra között) volt megfigyelhető (22/A. Ábra), az allóزامidin jelenlétében extra adag glükóz hozzáadására egyáltalán nem történt száraztömeg-növekedés (18. és 22/B. Ábrák). A kitináz-inhibitor tehát az autólízis mellett a kriptikus növekedést, illetve az újrainduló vegetatív hifaképződést is igen látványosan gátolta. Ugyanakkor a 17. Ábra alapján egyértelműen elmondható, hogy mind az allóزامidin-kezelt, mind a kontroll tenyészetek effektíven felhasználták a 115 órás korban a tápközeghez adott friss szénforrást. Azonban a glükóz-fogyasztás (17. Ábra) és az ezzel járó extracelluláris pH-csökkenés (16. Ábra) 115 és 117 óra között jóval kisebb mértékű volt allóزامidin jelenlétében, mint nélküle ($\Delta c_{\text{glükóz,allóزامidin}}=15,5$ mM; $\Delta c_{\text{glükóz,kontroll}}=29,0$ mM illetve $\Delta \text{pH}_{\text{allóزامidin}}=0,87$; $\Delta \text{pH}_{\text{kontroll}}=1,59$).



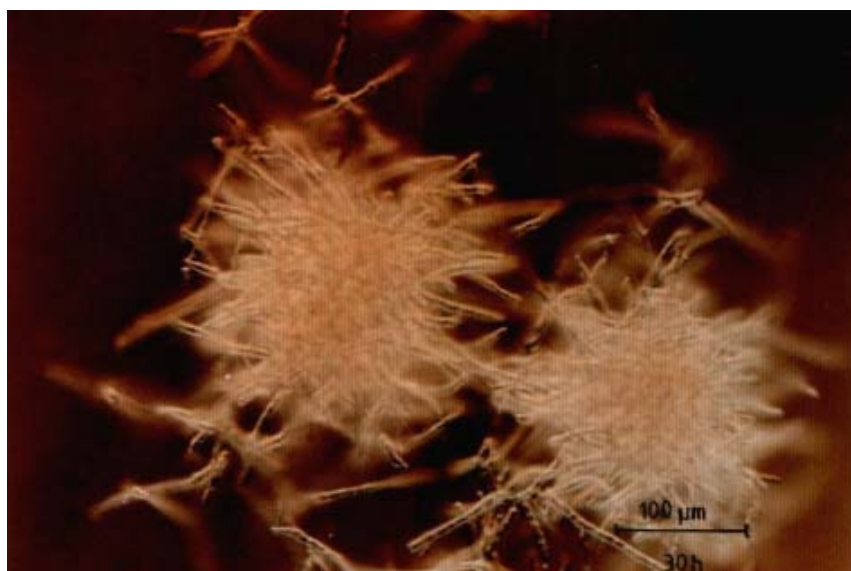
16. Ábra. Csökkenő mértékű tápközeg-savasodás kontroll tenyészetekben (A), és allóزامidin jelenlétében (B). A 16. és 17. Ábrák jelmagyarázata: **K:** kontroll; **K+G:** kontroll+glükóz; **A:** allóزامidin; **A+G:** allóزامidin+glükóz. Az értékek 4 független kísérlet eredményeit reprezentálják, átlag \pm szórásként kifejezve.



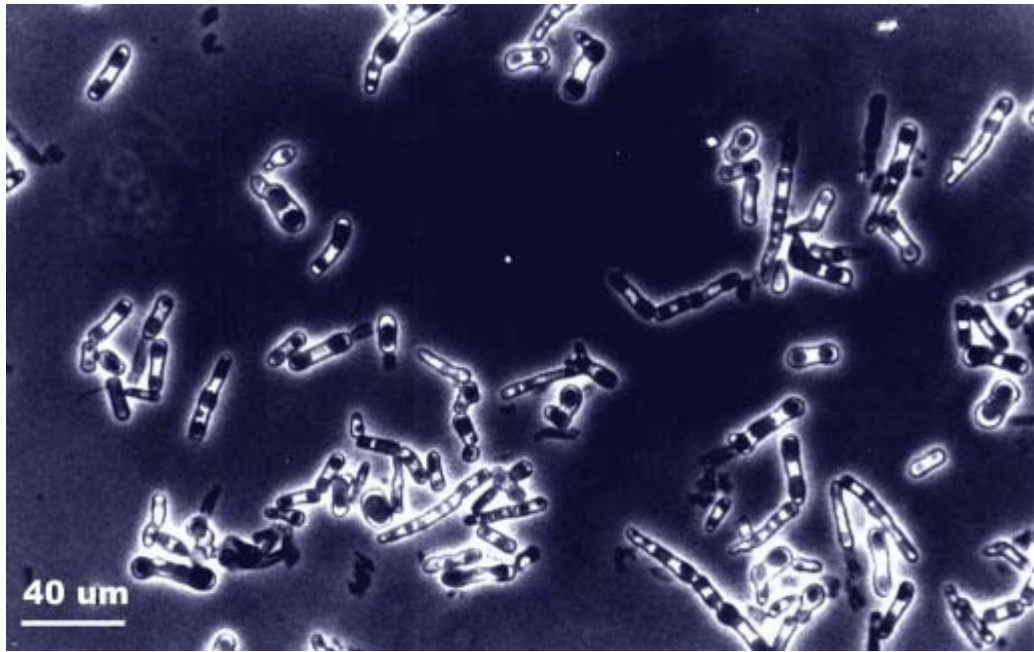
17. Ábra. Csökkenő mértékű glükózfogyás allóزامidin jelenlétében. Az értékek 4 független kísérlet eredményeinek átlagát reprezentálják; a szóráshoz nem haladta meg a 10 %-ot.



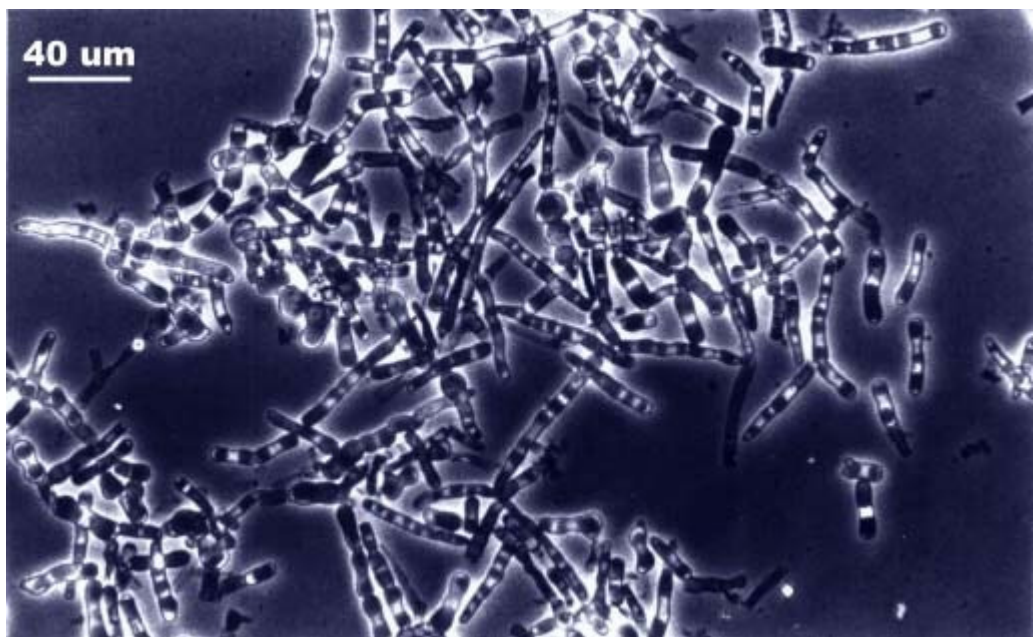
18. Ábra. *P. chrysogenum* tenyészetek száraztömegének változásai 9,6 μ M allóزامidin (35 órai) és/vagy 57 mM glükóz (115 órai) hozzáadása mellett. A jelölések megfelelők: **K**: kontroll; **K+G**: kontroll+glükóz; **A**: allóزامidin; **A+G**: allóزامidin+glükóz. Az értékek 6 független kísérlet eredményeinek átlagát reprezentálják; a szórás a 35 és 44 órás értékeket leszámítva sehol nem haladta meg a 10 %-ot.



19. Ábra. Jellemző, pelletes morfológia exponenciálisan növekvő (30 órás) *P. chrysogenum* tenyészetben (Pusztahelyi, 1997c).

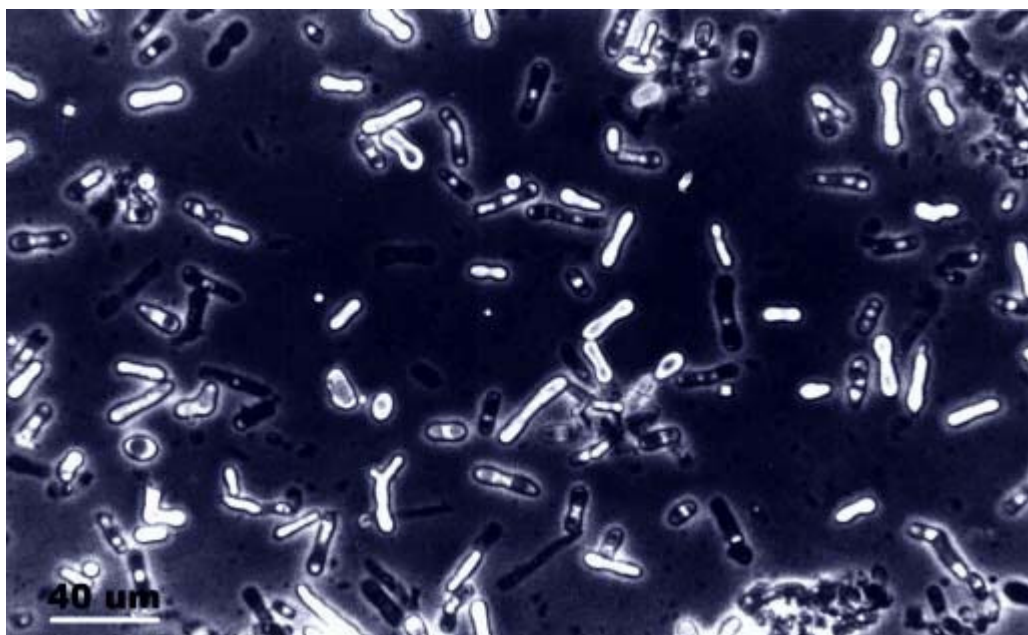


20/A Ábra. Öregedő (72 órás) *P. chrysogenum* (kontroll) tenyészet előrehaladó autolízise és fragmentációja.

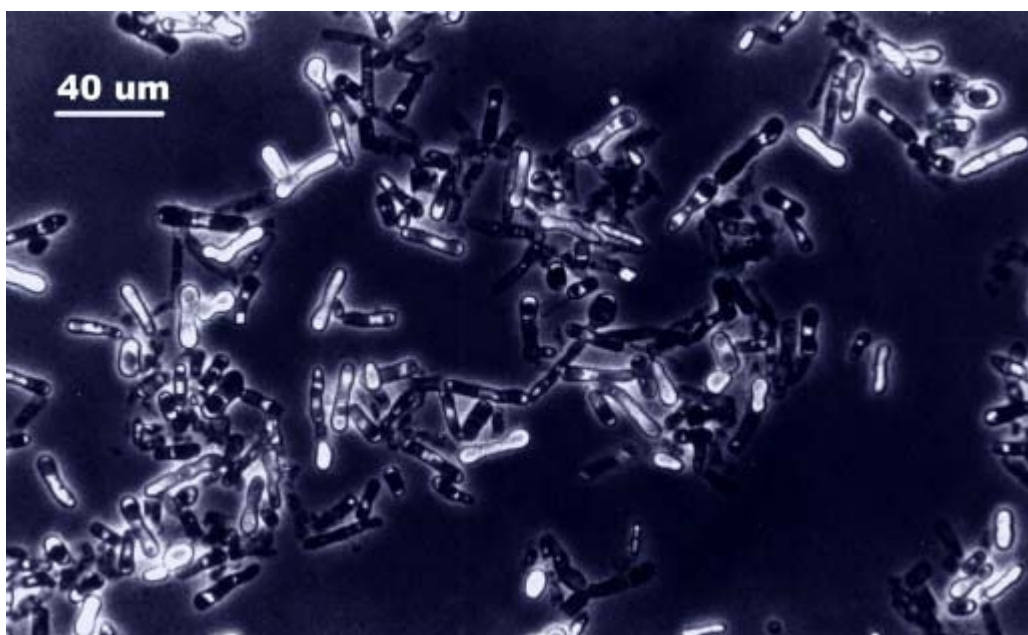


20/B Ábra. Öregedő (72 órás), autolízisben gátolt *P. chrysogenum* tenyészet 9,6 μM allorhamdin (35 óra) hozzáadása után.

20. Ábra. Autolizáló *P. chrysogenum* tenyészetek

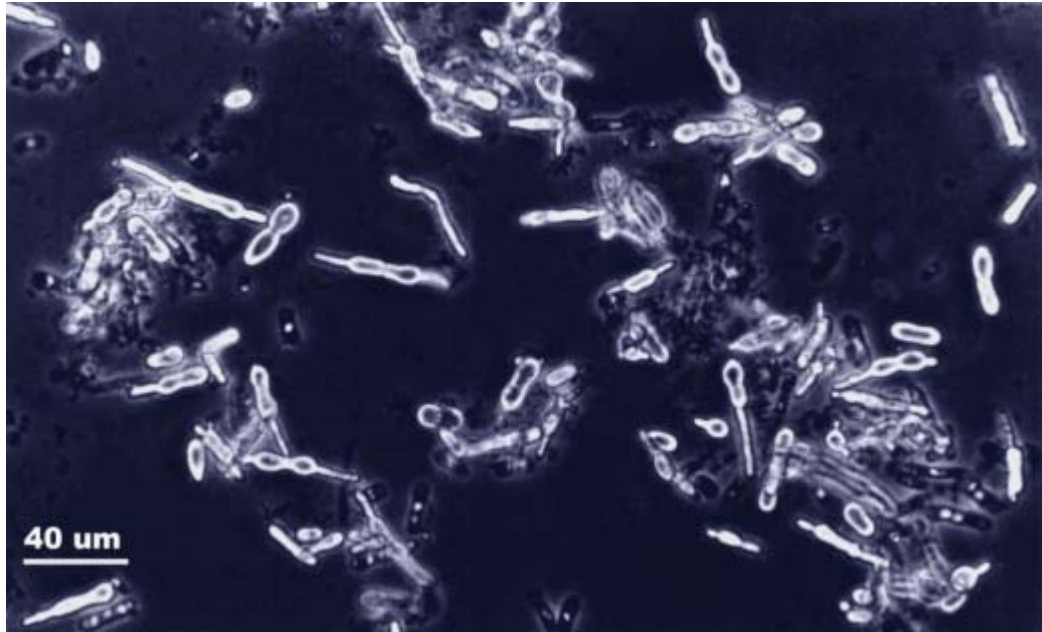


21/A Ábra. 115 órás, poszt-autolitikus (kontroll) tenyészet.

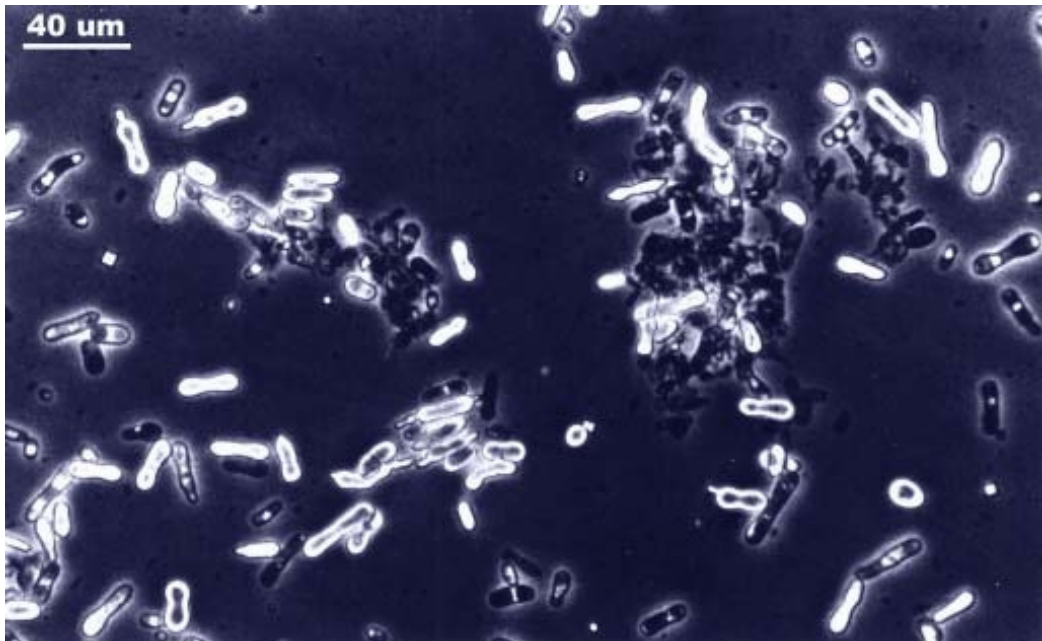


21/B Ábra. 115 órás tenyészet, 9,6 μM allorhamidin (35 óra) hozzáadása után.

21. Ábra. Autolizált *P. chrysogenum* tenyészetek



22/A Ábra. Újra-csírázó fragmentumok 160 órás *P. chrysogenum* kontroll tenyészetekben 57 mM glükóz-pótlást (115 óra) követően.



22/B Ábra. 160 órás *P. chrysogenum* tenyészet 9,6 μM allzamidin (35 óra) és 57 mM glükóz (115 óra) hozzáadása után.

22. Ábra. A *P. chrysogenum* kriptikus növekedése

5.3. Fragmentáció, sejtlízis, sejt-vitalitás

A morfológiai vizsgálatok adatainak statisztikai analízise alapján elmondható, hogy az összes alakos elem, valamint a kétsejtes fragmentumok száma – a száraztömeg változásával arányos képet mutatva – szignifikánsan csökkent a tenyésztés 115-166. órája között (23-24. Ábrák). Hangsúlyoznom kell, hogy ezeket a változásokat – a statisztikai analízis alapján – az allóزامidin jelenléte kismértékben ugyan, de szignifikánsan csökkentette. A minimum két szeptumot tartalmazó képletek (ezekre “hifák”-ként hivatkozom) száma szintén csökkent, az egysejtes fragmentumoké pedig nőtt az idő függvényében; ezek a változások azonban statisztikailag általában nem voltak szignifikánsak. Ezen morfológiai elemek számát és arányát az allóزامidin jelenléte sem befolyásolta érdemlegesen (24. Ábra). Az öregedő tenyészetek élőcsíraszám-lálással nyert eredményei – a 116 órás, allóزامiddal kezelt minták kivételével – minden vizsgált esetben szignifikánsan alacsonyabbak voltak, mint a mikroszkópos alakoselem-számlálással nyert adatok (1. Táblázat). Érdekes módon, az allóزامidin-kezelt és kontroll tenyészetek élőcsíraszámjai között nem találtunk szignifikáns eltérést. Ezzel jól egyezően, az allóزامidin-kezelt és kezeletlen micéliumok friss, allóزامidin-mentes tápközegbe való átmosásakor minden tesztelt időpontban (88, 115, 120 és 133 órákor) nagyon hasonló csírázási frekvencia (25. Ábra) és növekedési profil (26. Ábra) volt megfigyelhető. Ez egyben demonstrálta, hogy az allóزامidin csírázást gátló hatása reverzibilis.

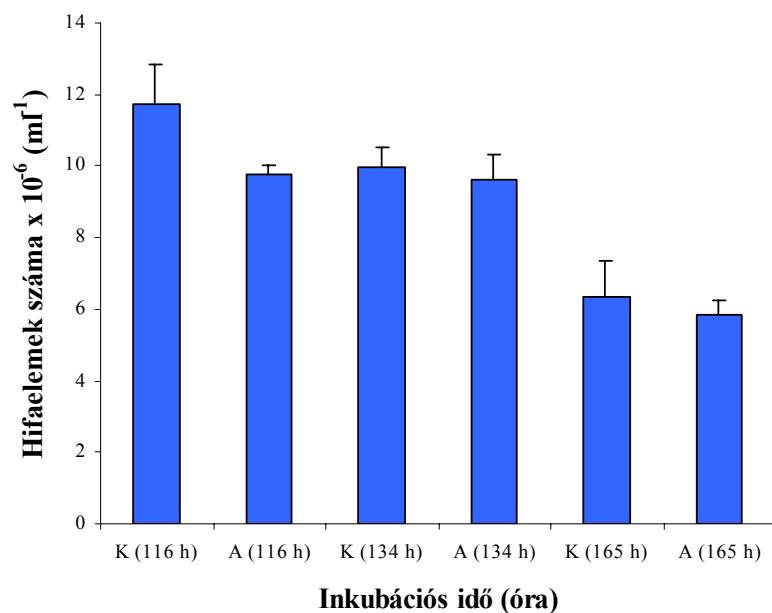
Lényegi, szignifikáns eltérést a vitalitás-festés és image analízis kombinálásával (27. Ábra) nyert adatok alapján sem sikerült kimutatni a kontroll, illetve az allóزامidin-kezelt tenyészetek metabolikus aktivitása között (28. Ábra). Az inkubáció 100. órája után – a várttal ellentétben – minden vizsgált időpontban némileg nagyobb volt az allóزامidin-kezelt tenyészetek vitalitása; az adatok statisztikai analízise alapján (a mérések nagy szórású átlaga miatt) azonban ezt egy esetben sem vehettem szignifikáns eltérésnek. A változások tendenciája ettől függetlenül informatív. A stacioner fázist követően a sejtek vitalitása előbb látszólag növekedett (allóزامidin-kezelt), illetve kisebb mértékben csökkent (kontroll), hiszen a hifák elhalt, metabolikusan inaktív részei töredezték szét, és a továbbiakban csak az ép, aktív fragmentumok festődtek. Az autolízis előrehaladtával pedig – az élőcsíraszám-meghatározás eredményével jó összhangban – a túlélő képletek vitalitása (28. Ábra), valamint a fragmentumok mérete (29. Ábra) folyamatosan csökkent.

Az allóزامidin *P. chrysogenum* spórák csírázására kifejtett hatását a 30. Ábra szemlélteti. Az eddigi kísérleti eredményekkel (Escott *et al.*, 1998; Gooday *et al.*, 1992; Sándor *et al.*, 1998) egyező módon, az autolitikus tenyészeteket látványosan befolyásoló inhibitor a gomba csírázását, valamint exponenciális növekedését egyáltalán nem gátolta.

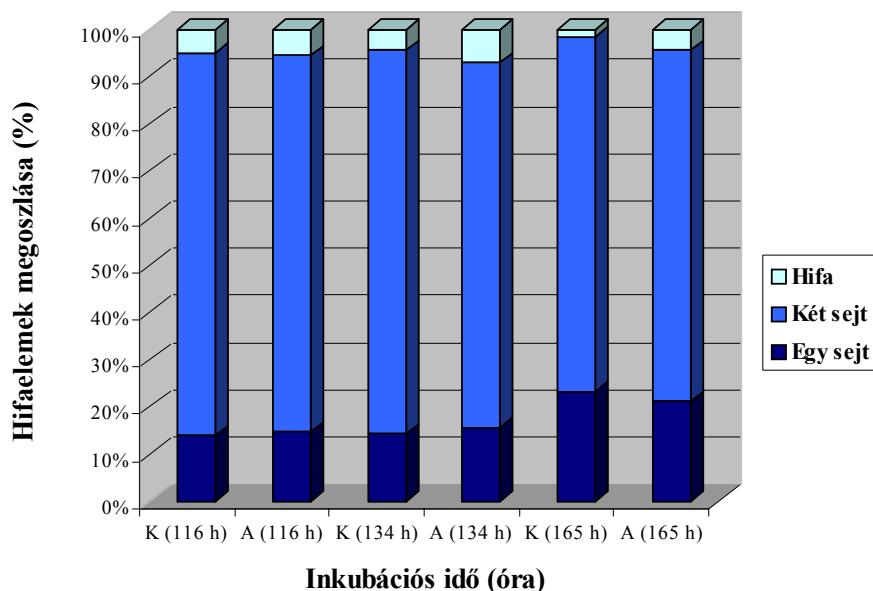
1. Táblázat. A *P. chrysogenum* mikroszkóposan (A) és élőcsíra-számlálással (B) meghatározott sejtszámainak összehasonlítása.

Módszer és minta	Sejtszám*	
	Kontroll	Allóزامidin-kezelt
A. Mikroszkópos számolás {10 ⁻⁶ x alakos elem (ml) ⁻¹ }		
116 órás tenyészet	11,7±1,1	9,8±0,3
134 órás tenyészet	10,0±0,6	9,6±0,7
165 órás tenyészet	6,4±1,0	5,9±0,4
B. Élőcsíra-számlálás {10 ⁻⁶ x „telep-képző egység” (ml) ⁻¹ }		
116 órás tenyészet	9,0±0,1	7,7±2,7
134 órás tenyészet	6,9±1,1	7,1±0,7
165 órás tenyészet	2,1±0,1	2,4±0,3

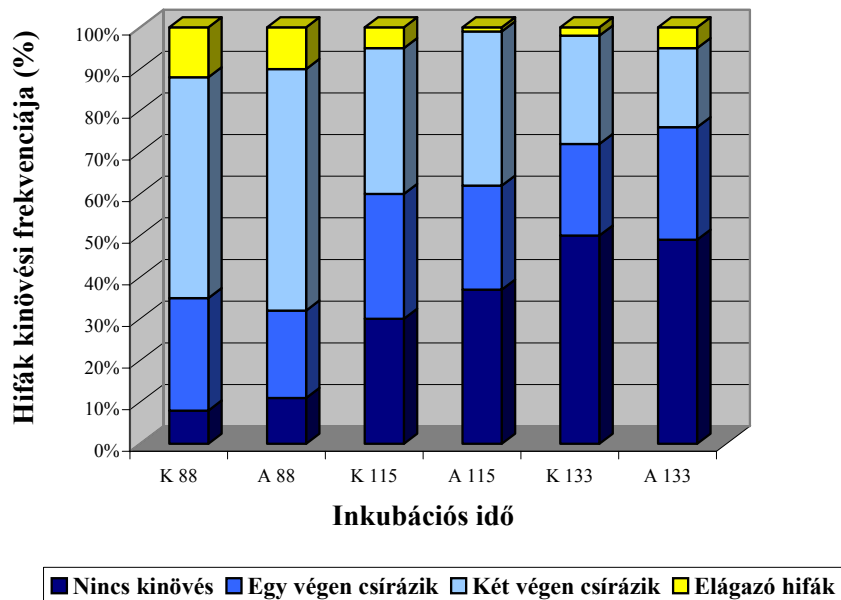
* – A sejtszámok 4 független kísérletből, átlag ± szórás-ként vannak feltüntetve.



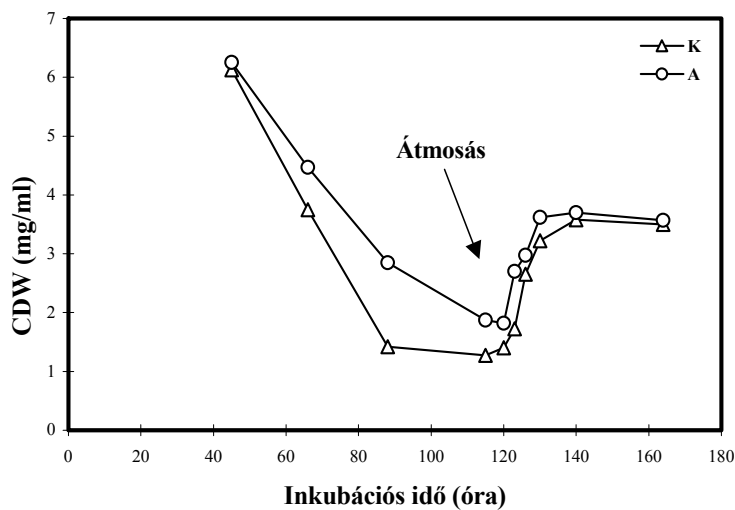
23. Ábra. Változások a *P. chrysogenum* összes alakos elemei (fragmentumai) számában az idő függvényében és 9,6 μ M allzamidin (35 óra) hatására. Az értékek 4 független kísérlet eredményei; a szórásokat feltüntettem. Jelmagyarázat: K=kontroll; A=allzamidin-kezelt; zárójelben a minták korát jelöltem.



24. Ábra. Változások a *P. chrysogenum* alakos elemeinek (egysejtes, kétsejtes, illetve minimum két szeptumot tartalmazó hifák) százalékos eloszlásában az idő függvényében és 9,6 μ M allzamidin (35 óra) hatására. Az értékek 4 független kísérlet átlagát reprezentálják. A jelmagyarázat ugyanaz, mint a 23. Ábrán.



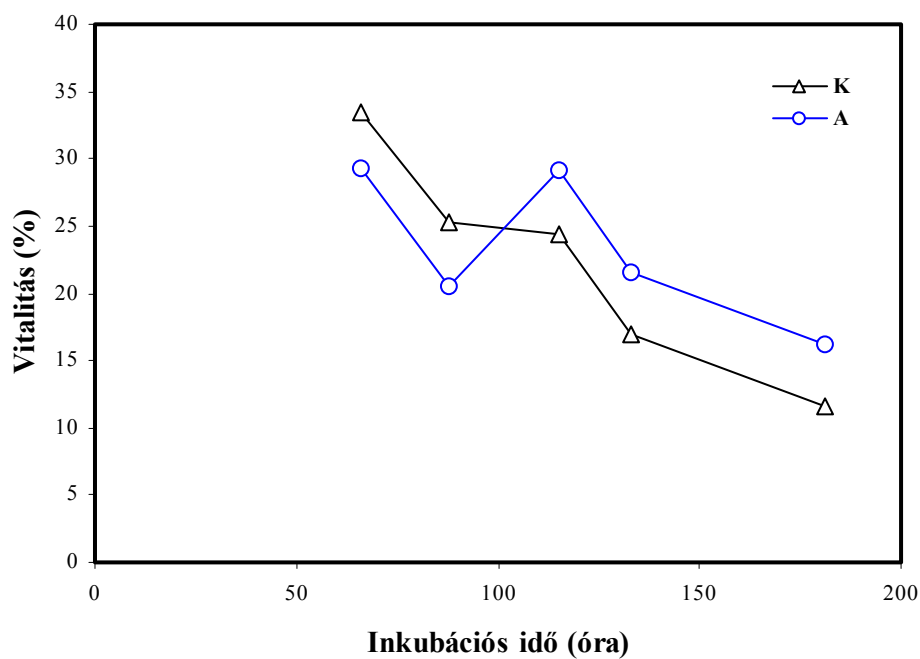
25. Ábra. Új hifák kinövési frekvenciája kontroll (K) és 9,6 μM (35 óra) allóزامидinnel kezelt (A) *P. chrysogenum* tenyészetekben friss, 1% glükóz szénforrást tartalmazó inokulum táptalajra való átmosás (88, 115 és 133 óra) után 15 órával. Az értékek tipikus eloszlást reprezentálnak, 3 független kísérletből számolva. Jelmagyarázat: K=kontroll; A=allóزامидин-kezelt; a számok az átmosás idejét jelzik.



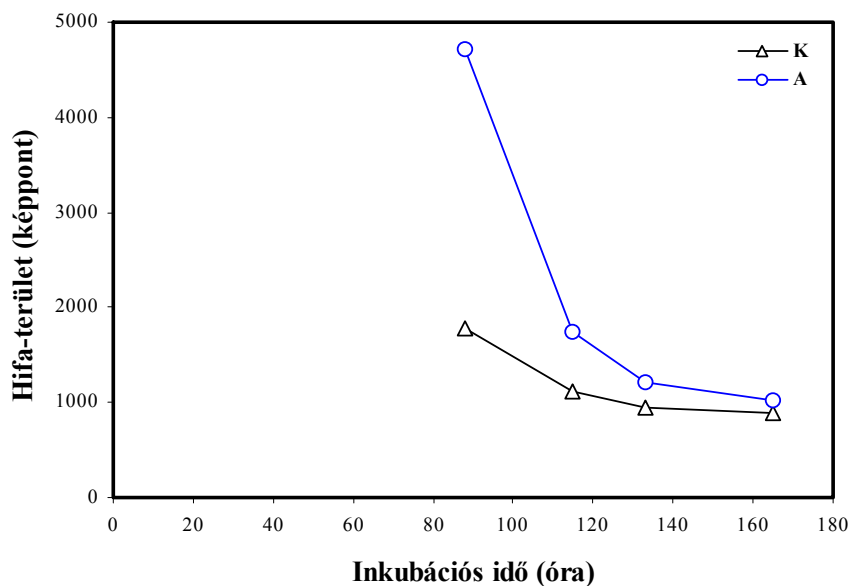
26. Ábra. A száraztömeg (CDW) változása kontroll (K) és 9,6 μM (35 óra) allóزامидinnel kezelt (A) *P. chrysogenum* tenyészetekben friss, 1% glükóz szénforrást tartalmazó inokulum táptalajra való átmosást (115 óra) követően.



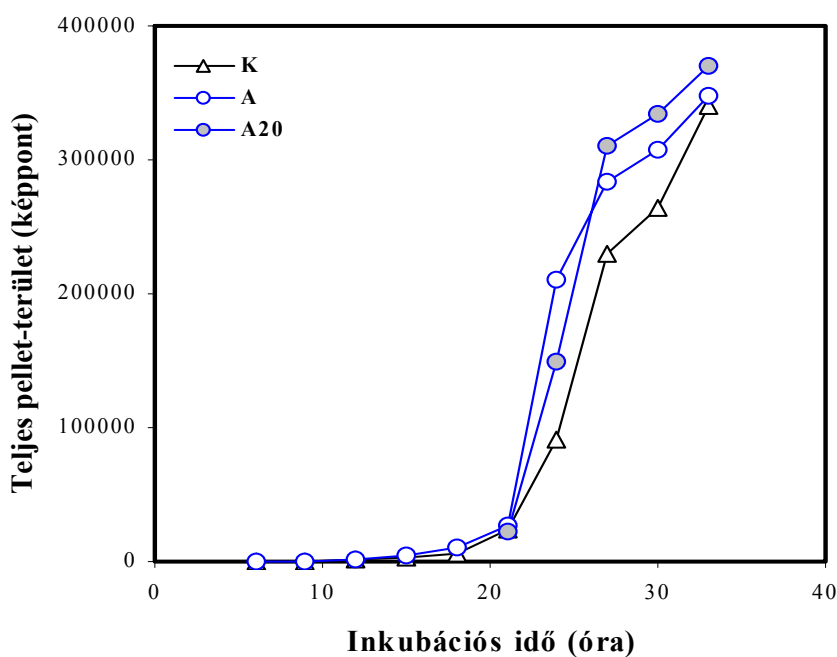
27. **Ábra.** 115 órás glükóz-pótlást (57 mM) követően újra-csírázó *P. chrysogenum* fragmentumok metabolikus aktivitása sejtfal- és vitalitás-festéssel vizsgálva (160 óra). A két képen ugyanaz a minta látható CFW, illetve DiOC₆ festék detektálásával.



28. **Ábra.** Öregedő kontroll (K) és allorhamadin-kezelt (A) *P. chrysogenum* tenyészetek vitalitása (aktív régió/teljes hifarégió) image analízissel meghatározva. Az értékek tipikus eloszlást reprezentálnak, három független kísérletből számolva (a 20-35% szórások feltüntetése nélkül).



29. Ábra. Öregedő kontroll (**K**) és allzamidin-kezelt (**A**) *P. chrysogenum* tenyészetek fragmentumainak mérete image analízissel meghatározva. Az értékek tipikus eloszlást reprezentálnak, három független kísérletből számolva (a 20-35% szórások feltüntetése nélkül).



30. Ábra. Az allzamidin hatása a *P. chrysogenum* spórák csírázására, image analízissel meghatározva. Az értékek két független kísérlet átlagait reprezentálják. A szórás sehol nem haladta meg a 15 %-ot. Jelmagyarázat: kontroll tenyészet (**K**); allzamidines kezelés 0 (**A**) és 20 (**A20**) órákor.

5.4. Autolítikus hidrolázok

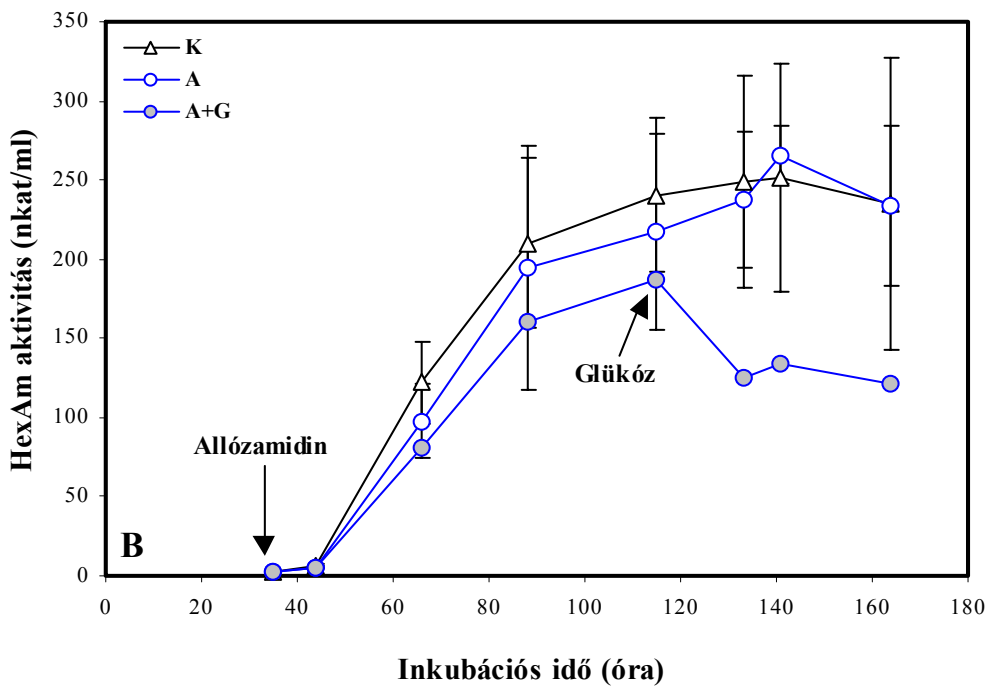
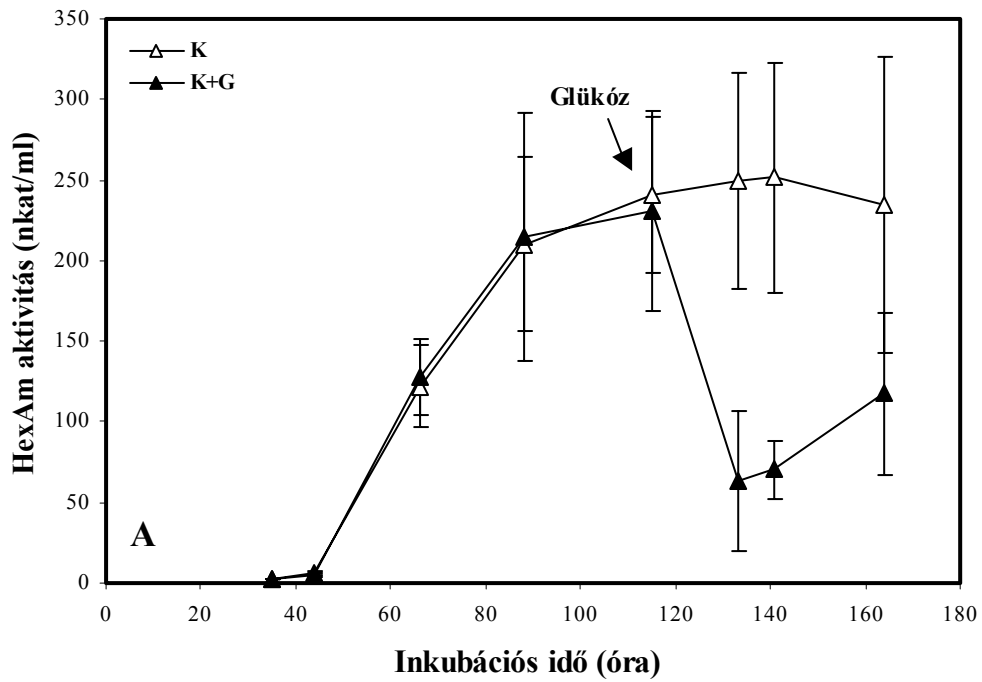
A 31. és 32. Ábrák alapján az autolítikus hidrolázok aktivitásával kapcsolatban megállapítható, hogy mind az extracelluláris HexAm, mind pedig a kitináz aktivitások gyakorlatilag elhanyagolhatóak voltak az exponenciálisan növekvő tenyészetekben, majd növekedni kezdtek a stacioner fázisban, és a 115. órára elérték maximumukat (~ 420 pkat/ml kitináz és 250 nkat/ml HexAm). Ezután, a poszt-autolítikus fázisban további érdemleges aktivitás-növekedés nem volt megfigyelhető. Glükóz hozzáadására mindkét enzim aktivitása lezuhant (31-32. Ábrák), ami egyértelműen karbon-katabolit represszióra utalt. Érdekes módon az allóزامidin nem befolyásolta szignifikánsan az extracelluláris hidroláz termelést. Ugyanakkor azonban az allóزامidin-kezelt tenyészeteknél glükóz-pótlás után az extracelluláris kitináz és HexAm aktivitások – bár szignifikánsan – sokkal kisebb mértékben csökkentek, mint a kitináz inhibitor nélkül.

5.5. Az extracelluláris kitináz aktivitás gátlása allóزامiddal

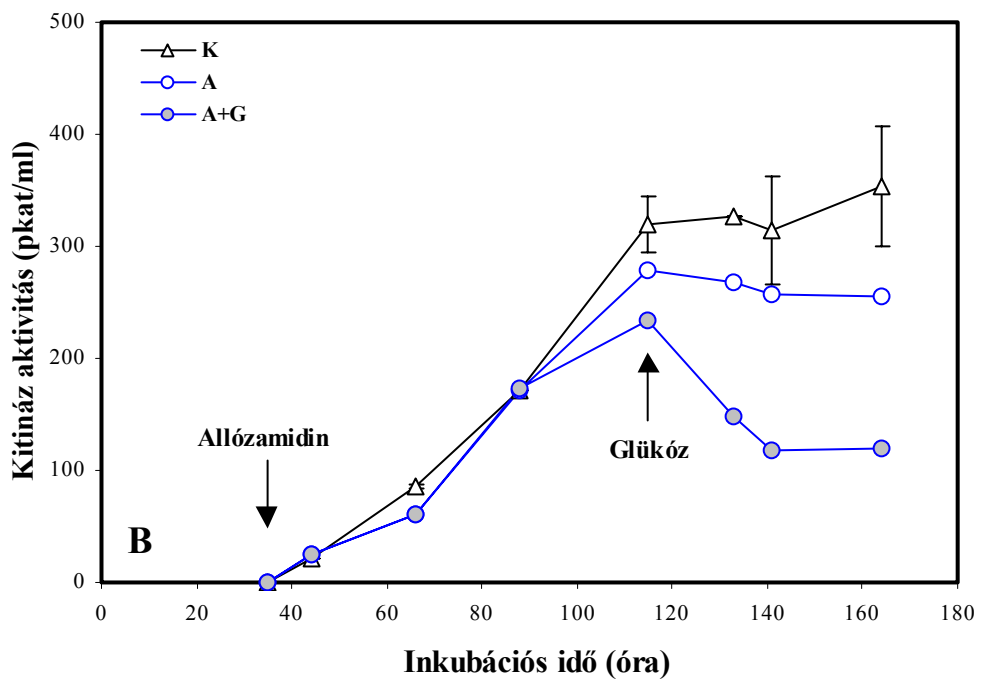
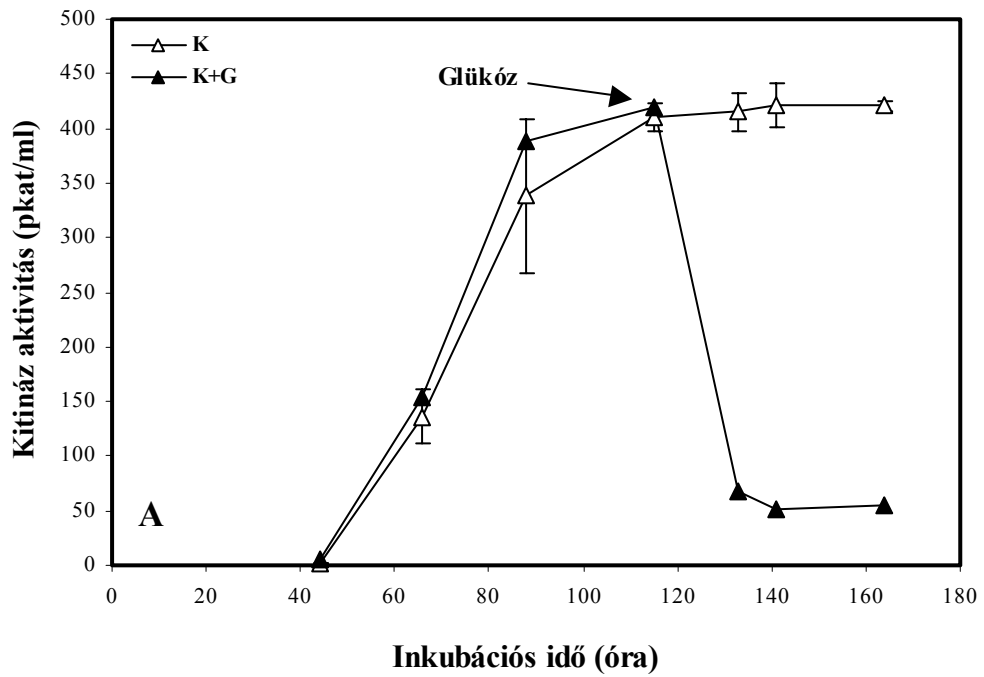
A fiziológiai kísérletekben a fermentlé-szűrletből kitináz aktivitásokat minden esetben csak 0,1 M citromsav-Na citrát (pH=5,5) pufferrel történő többszörös dialízis után mértem. Az olyan minták, amelyeket dialízis, vagy PD-10 oszlopon (Pharmacia Biotech, Uppsala, Svédország) történő puffercsere nélkül analizáltam, az allóزامidin gátló hatása miatt gyakorlatilag semmilyen kitináz-aktivitást nem mutattak, még 165 órás tenyészetek esetében sem. Az *in vitro* enzim-gátlási kísérletekben az allóزامidin az extracelluláris kitinázok potens inhibitoraként viselkedett (33. Ábra); az IC₅₀ értéke ezen autolítikus hidrolázokkal szemben 1,4 μM volt. A fiziológiai kísérletekben általam alkalmazott 9,6 μM allóزامidin koncentráció tehát gyakorlatilag teljes kitináz-gátlást okozott.

5.6. Kitináz-tisztítás és M_r meghatározás SDS-PAGE segítségével

A 115 órás fermentléből az affinitás-kromatográfiával végzett enzimtisztítás során három jelentősebb aktivitáscsúcsot figyeltem meg: a 2-6., 16-18. és 22-23. frakcióknál, a fehérjecsúcsok közelében (34. Ábra). Az etilén-glikolos frakciók aktivitást veszítettek a dialízis közben (35. Ábra).



31. Ábra. Az extracelluláris HexAm aktivitások változása glükózpótlás (57 mM, 115 óra) (A) és/vagy allorizamidin (9,6 μ M, 35 óra) (B) hatására. A K és K+G értékek 4 független kísérlet átlag \pm szórás eredményeit jelzik. Jelmagyarázat: K: kontroll; K+G: kontroll+glükóz; A: allorizamidin; A+G: allorizamidin+glükóz.



32. Ábra. Az extracelluláris kitináz aktivitások változása glükózpótlás (57 mM, 115 óra) (A) és/vagy allorhamdin (9,6 μ M, 35 óra) (B) hatására. A K és K+G értékek 4 független kísérlet átlag \pm szórás eredményeit jelzik. Jelmagyarázat: K: kontroll; K+G: kontroll+glükóz; A: allorhamdin; A+G: allorhamdin+glükóz.

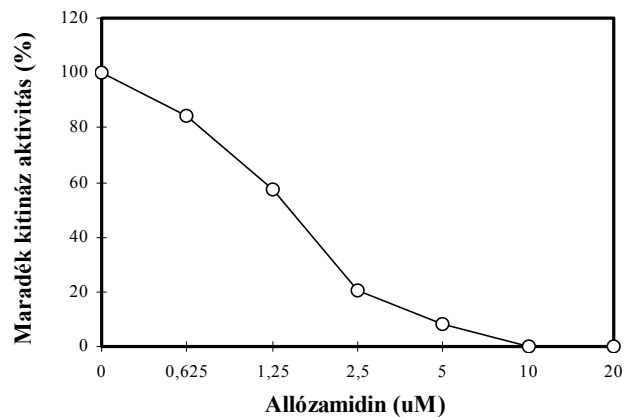
A legjellemzőbb kitináz M_r -ek az alábbiak voltak (kDa): **91**; 87; **57**; **45**; 33; 20,8. A 45 kDa izoenzim mindegyik mintában jól detektálható volt. A 33 kDa feltételezhetően a 91 kDa (trimer) enzim alegysége lehetett (Pusztahelyi, 1997c). A kontroll, illetve allóزامidin-kezelt, majd dializált minták azonos izoenzim-profil mutattak.

5.7. A sejtfa kitintartalma

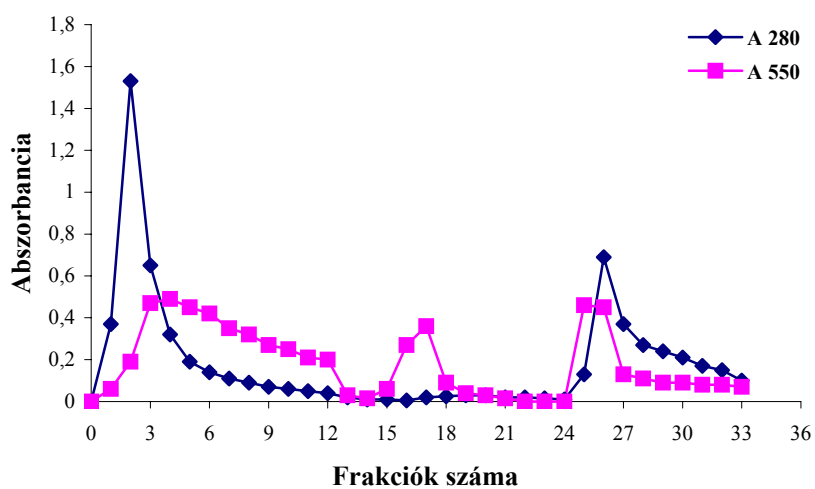
Az alkáli-oldhatatlan sejtfa-alkotók (kitin-glükán elegy) elem-analízise alapján elmondható, hogy a 165 órás allóزامidin-kezelt és kontroll tenyészetek száraztömegének kitintartalma megközelítőleg 7,0 illetve 2,6 % volt. A kriptikus növekedési fázisú (148 óránál idősebb; Pusztahelyi *et al.*, 1997a, 1997b) allóزامidin-kezelt tenyészetek sejtfaának lényegesen (mintegy 170 %-al) magasabb kitintartalma semmilyen, fázis-kontraszt mikroszkóppal megfigyelhető morfológiai változással nem járt (22/A és 22/B Ábrák). Ugyanakkor figyelemre méltó, hogy az image analízis technikával meghatározott hifa- és fragmentum-méretetek között szinte mindvégig mutatkozott (kezdetben jelentős, később csekély) eltérés a kezelt tenyészetek javára (29. Ábra).

5.8. Redox állapotok változása allóزامidin jelenlétében

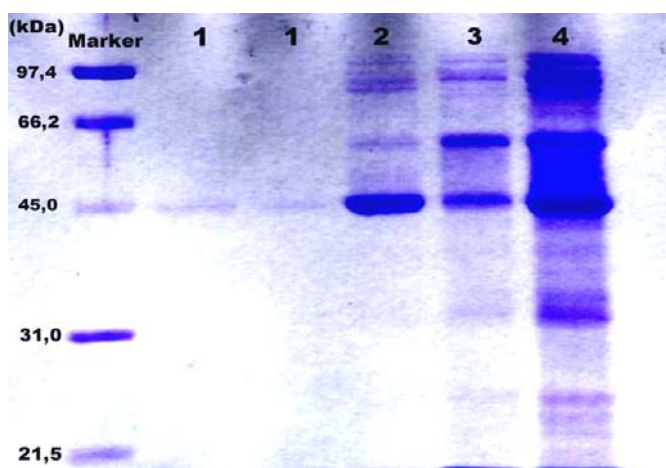
Az allóزامidin glutation szintekre és arányaikra gyakorolt hatását a 36-38. ábrák mutatják be. A kitináz inhibitor jelenlétében a kontroll tenyészetekhez képest mind a specifikus GSH, mind pedig a GSSG koncentrációk csökkentek autólízis és kriptikus növekedés alatt. Hangsúlyoznom kell, hogy ezek a változások az allóزامidin okozta nagyobb száraztömeg-értékek következményeként jelentkeztek, és egyetlen vizsgált időpontban sem voltak szignifikánsak (36. Ábra). Az allóزامidin hozzáadása nem befolyásolta a GSH/GSSG redox egyensúlyt sem – a 164 órás minta kivételével, ahol ez az érték szignifikánsan kisebb volt az allóزامidin-kezelt tenyészetekben (38. Ábra). A 115 órás glükózpótlást követően, a specifikus GSH koncentrációk nem csökkentek a kitináz inhibitor jelenlétében, míg a kontroll tenyészetekben figyelemreméltó GSH szint esés volt megfigyelhető (36. Ábra). Mivel azonban allóزامidin jelenlétében az intracelluláris GSSG koncentrációk a kontrollhoz képest jelentősen csökkentek (37/B. Ábra), a GSH/GSSG redox arányok ekkor szignifikánsan megnöttek. Ugyanakkor, a kontroll tenyészetek GSH/GSSG redox egyensúlya csökkent.



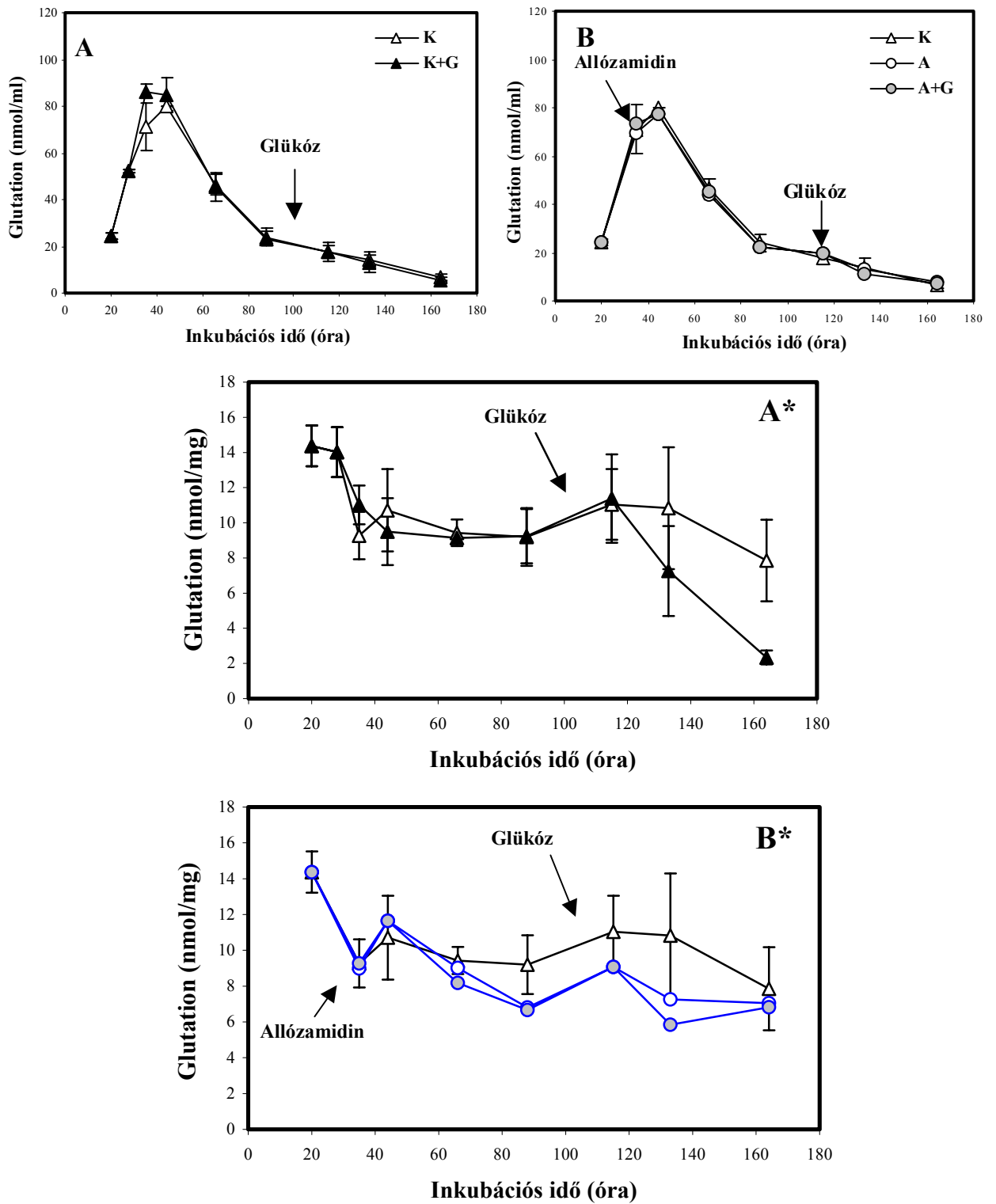
33. Ábra. Az extracelluláris kitinázok *in vitro* gátlása allóزامидинnel.



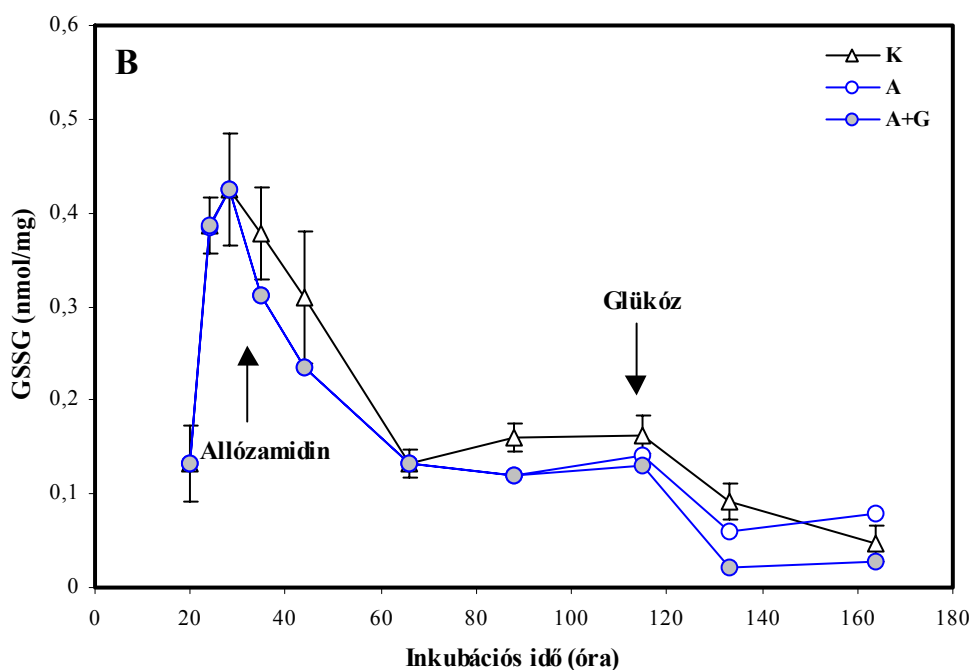
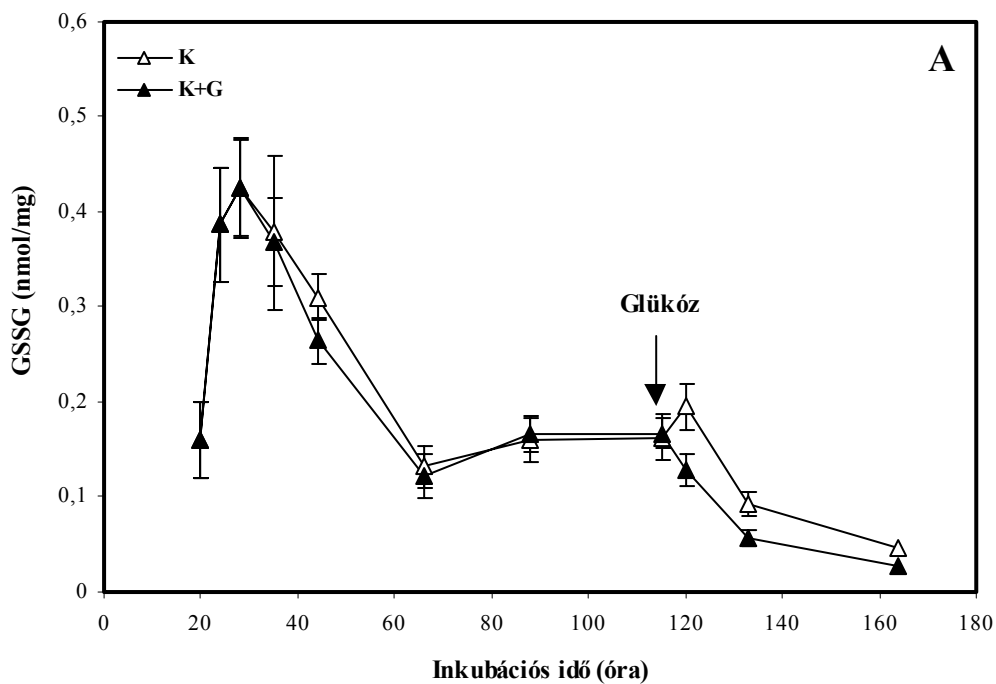
34. Ábra. Kitináz-aktivitások affinitás-kromatográfiával tisztított, 115 órás fermentléből. Eluensek: 1-12: 0,1M Na-citrát; 13-22: 80 mM ecetsav; 23-33: 50% etilénlglikol.



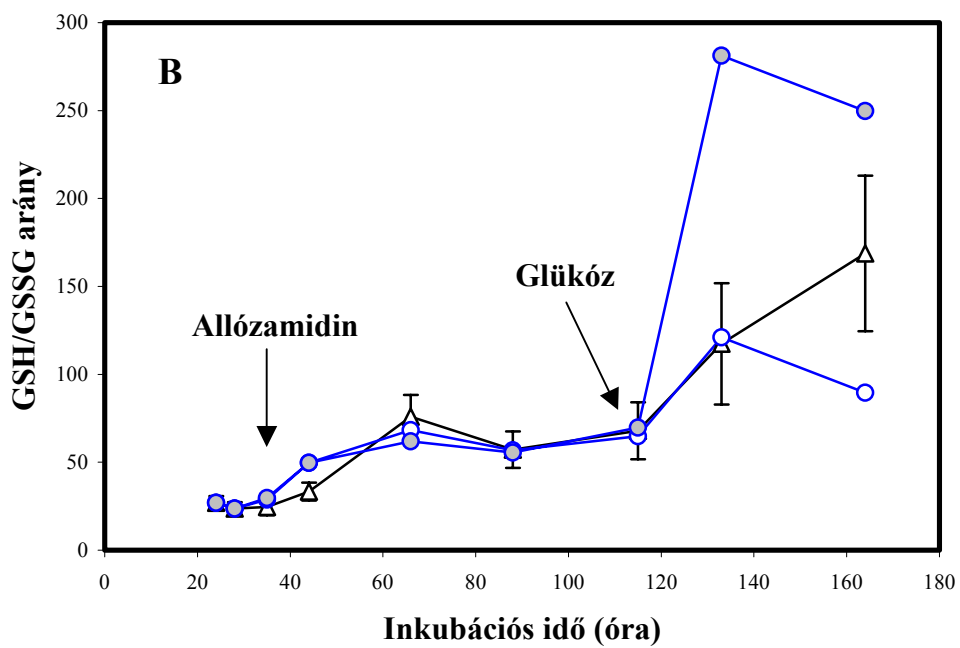
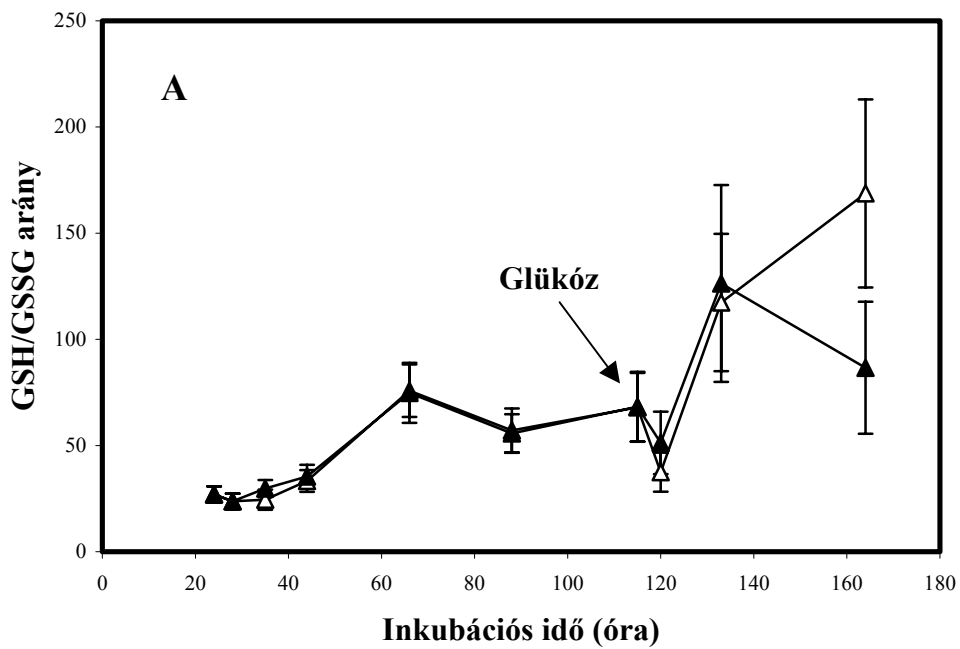
35. Ábra. 115 órás extracelluláris kitináz izoenzim-profil 12% SDS-PAGE-el meghatározva. A számok magyarázata: 1. Specifikusan kötődő; 2. Nem specifikusan kötődő; 3. Nem kötődő enzim; 4. Fermentlé (teljes minta) 70%-os ammónium-szulfátos precipitációt és dialízist követően.



36. Ábra. A teljes (nmol/ml) és specifikus (nmol/mg CDW) intracelluláris GSH koncentrációk változása kontroll tenyészetekben (A és A*) és allóزامidin-kezelés (9,6 μ M, 35 óra; B és B*) és/vagy glükóz-pótlás (57 mM, 115 óra) hatására. Az értékek 6 független kísérlet eredményeit reprezentálják, átlag \pm szórás-ként kifejezve. A szimbólumok az A-A*, illetve B-B* ábrákon megegyeznek. Jelmagyarázat: K: kontroll; K+G: kontroll+glükóz; A: allóزامidin; A+G: allóزامidin+glükóz.



37. Ábra. A specifikus (nmol/mg CDW) intracelluláris GSSG koncentrációk változása kontroll tenyészetekben (A) és allorhamdin-kezelés (9,6 μ M, 35 óra) (B) és/vagy glükóz-pótlás (57 mM, 115 óra) hatására. Az értékek 6 független kísérlet eredményeit reprezentálják, átlag \pm szórás-ként kifejezve. Jelmagyarázat: K: kontroll; K+G: kontroll+glükóz; A: allorhamdin; A+G: allorhamdin+glükóz.



38. Ábra. A GSH/GSSG redox arányok változása allóزامidin-kezelés (9,6 μM , 35 óra) és/vagy glükózpótlás (57 mM, 115 óra) hatására. Az értékek a 36. és 37. Ábrák (62-63. o) adatai alapján, azonos szimbólumokkal vannak feltüntetve.

2. Táblázat. Az allóزامidin öregedő *Penicillium chrysogenum* tenyészetekre gyakorolt fiziológiai és morfológiai hatásainak összefoglalása.

Jellemző	Hatás*
Autolítikus biomassza-vesztés	Csökkent
Hifák és alakos elemek száma	Kismértékben csökkent
Alakos elemek mérete	Kismértékben nőtt
Sejtfal kitin-tartalma	Nőtt
Autolítikus HexAm enzim aktivitása	Nem változott
Autolítikus kitinázok aktivitása	(reverzibilisen) gátolt
Új hifák kinövése glükóz-pótlás után	(reverzibilisen) gátolt
Vitalitás, élőcsíraszám (sejtszámlálással)	Nem változott
Vitalitás, száraztömeg és kinövési frekvencia (átmosással)	Nem változott
Vitalitás (fluoreszcens festékkel)	Nem változott
Intracelluláris GSH, GSSG szintek és redox arányaik	Nem változott
Glükózfelhasználás mértéke és sebessége glükóz-pótlás után	Kismértékben csökkent
A tápközeg-savasodás mértéke és sebessége glükóz-pótlás után	Kismértékben csökkent
Intracelluláris glutation-tartalékok felhasználása glükóz-pótlás után	Csökkent

* – Változások 9,6 μ M allóزامidin (35 óra) és/vagy 57 mM glükóz (115 óra) hozzáadása után, 80 és 167 órás fermentációs idő között (autolítikus, poszt-autolítikus és kriptikus növekedési fázisokban).

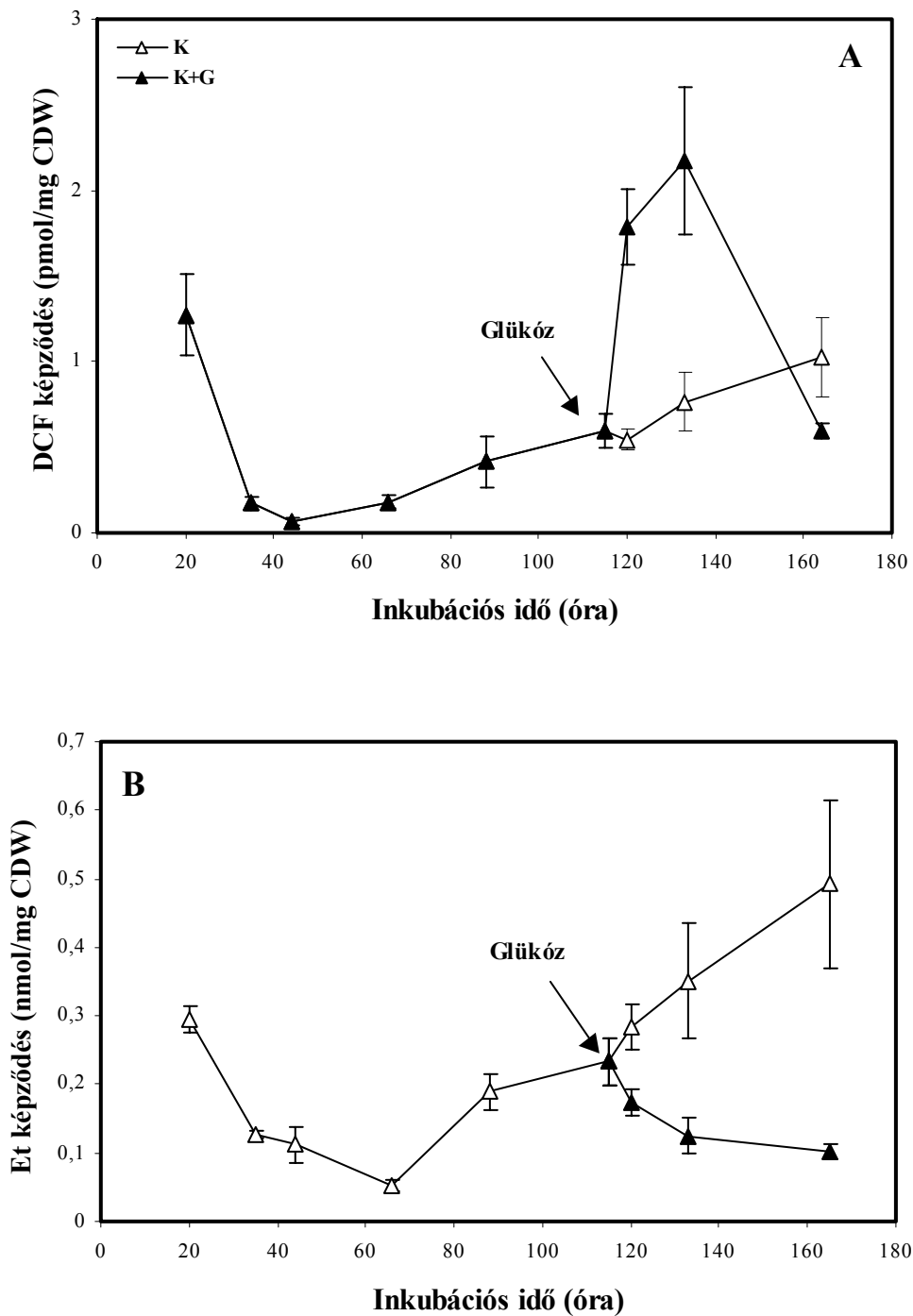
5.9. Szabadgyök-halmozódás, és az ellenük való védekezés

A kísérletek során a sejtekben képződő szuperoxid ($O_2^{\bullet-}$) és peroxid szintek változásait a 39. Ábra szemlélteti. Figyelemreméltó, hogy a gomba exponenciális növekedési fázisa intenzív szabadgyök-generálással járt együtt. Azonban a glükóz elfogyása után (a decelerációs, illetve korai autolítikus fázisban) a ROS szintje is csökkent; a peroxid-szint 44, a szuperoxid valamivel később, 66 órakor mutatott minimális értéket. Meglepő módon tehát, az intracelluláris ROS szintek – a várttal ellentétben – a stacioner (pre-autolítikus) és korai autolítikus fázisokban átmeneti emelkedés helyett egyértelműen csökkentek (39. Ábra). Erre a megfigyelésre magyarázatul szolgálhat, hogy az autolízis kezdetét jelentős GSH/GSSG redoxarány-eltolódás (növekedés) és néhány antioxidatív enzim (GPx, kataláz, GR) kimagasló aktivitása (40. Ábra) előzte meg. Később, az autolízis előrehaladtával, a peroxid és szuperoxid képződése folyamatosan, egyenletesen nőtt a túlélő képletekben. Ennek ellenére, az exponenciális fázisban igen magas specifikus GPx, kataláz és GR aktivitások a szénlimitáció alatt drasztikusan csökkentek (GPx: 0,13→0,01 mkat/kg protein; GR: 1,3→0,3 mkat/kg protein; kataláz: 0,9→0,3 kat/kg protein). Ugyanakkor lényeges, hogy az intracelluláris ROS akkumulációt a 66-115. óra között nem kísérte szignifikáns GSH és GSSG szint-csökkenés vagy GSH/GSSG redox-arány változás.

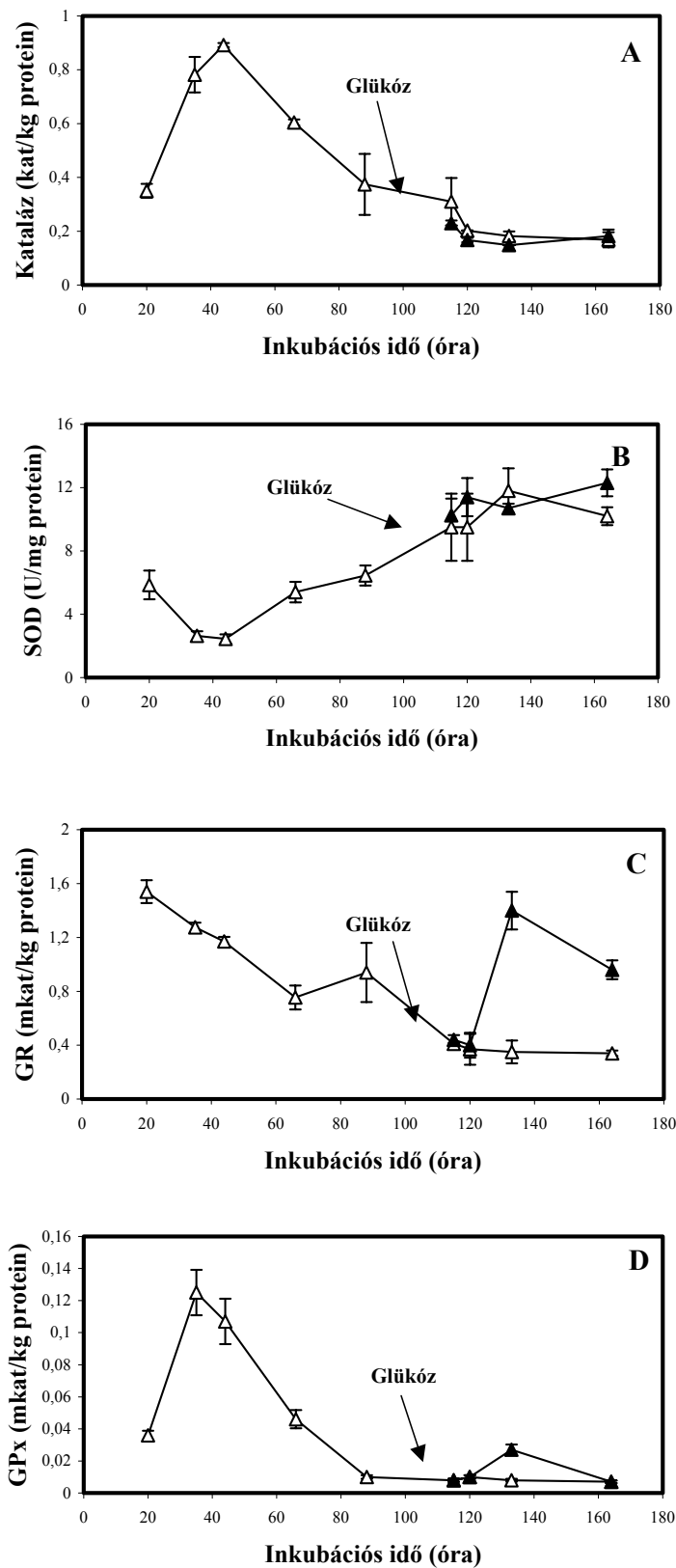
A tenyészetek intracelluláris GSH szintjeinek változását már bemutattam a 36. és 37. Ábrákon. A tenyészetek specifikus intracelluláris GSH koncentrációi gyakorlatilag az egész inkubáció ideje alatt változatlanul magas értéken (9-11 mmol/g CDW) maradtak; ez alól az egyedüli kivételt a 165 órás minta képviselte, ahol – a tenyészet rohamosan romló élettani állapotát tükrözve – a GSH szint is alacsonyabb volt (6-9 mmol/g CDW). A 115 órás glükózpótlást követő GSH csökkenésről már esett szó. Ekkor a sejtek GSH tartalékai rohamosan fogytak, és – a tenyészet biomassza gyarapodásával fordított arányban – 165 órás korra egészen alacsony értékre csökkentek (2 mmol/g CDW). A specifikus GSSG koncentrációk az exponenciális fázis relatíve nagy értékei (0,4 mmol/g CDW) után, a decelerációs, stacioner és korai autolítikus fázisokban (34-66. óra) szignifikánsan csökkentek, majd az autolízis további szakaszában konstans értéken (~0,17 mmol/g CDW) maradtak. Ezt követően pedig az öreg, poszt-autolítikus tenyészetekben – a ROS akkumuláció ellenére – további GSSG csökkenés volt tapasztalható. Ennek következményeként a GSH/GSSG redox arányok a kezdeti, alacsony értékről 133 órás korra mintegy ötszörösükre növekedtek (25→125) (38. Ábra).

A 115 órás glükózpótlást követően fordított sejtdifferenciálódási folyamat, a *P. chrysogenum* túlélő fragmentumainak újra-csírázása indult meg (22/A. ábra). Ezt jelentős átmeneti peroxid-akkumuláció (0,5→2,2 pmol/mg CDW; 39. Ábra) és néhány antioxidáns enzim (GR, GPx) erőteljes aktivációja kísérte (40/C és 40/D. Ábra). Érdekes módon ugyanakkor – a peroxidokkal ellentétben – a szuperoxid-szintek glükózpótlás után szignifikánsan csökkentek. A specifikus SOD aktivitások a poszt-autolitikus tenyészetekben minden esetben nagyok voltak; láthatólag sem ezt, sem a kataláz aktivitást nem befolyásolta szignifikánsan a glükózpótlás. Lényeges, hogy az intracelluláris kataláz aktivitások nem reagáltak a poszt-autolitikus peroxid-halmozódásra; az inkubáció 115. órájától konstans, relatíve alacsony szinten maradtak (~2 mkat/kg protein).

A szénéhezés megszűnte után 133 óras korig a tenyészetek GSH/GSSG aránya sem tért el a kontrollétól (38. Ábra). Ezt követően azonban – mikor a többi vizsgált oxidatív paraméter (peroxid szint, specifikus GPx és GR aktivitások) ismét megközelítette a kontroll tenyészetek értékeit – jelentős csökkenés volt tapasztalható a GSH koncentrációkban, illetve a GSH/GSSG arányokban.



39. Ábra. A specifikus DCF (A) és etidium (Et) (B) képződés változása az idő függvényében *P. chrysogenum* tenyészetekben. A DCF a H_2O_2 és egyéb peroxidok, az Et a szuperoxid ($O_2^{\bullet-}$) intracelluláris szintjeit jelzi. Az értékek 6 független kísérlet eredményei, átlag \pm szórás formában kifejezve. Jelmagyarázat: K: kontroll; K+G: kontroll+glükóz. A szimbólumok jelentése megegyező az A és B ábrán.



40. Ábra. A specifikus intracelluláris kataláz (A), SOD (B), GR (C) és GPx (D) aktivitások változása az idő függvényében *P. chrysogenum* tenyészetekben. Az értékek 4-6 független kísérlet eredményei, átlag \pm szórás formában kifejezve. A jelmagyarázat megegyezik a 39. Ábrával (Δ : kontroll; \blacktriangle : kontroll+glükóz).

5.10. GOX aktivitások és légzési ráták

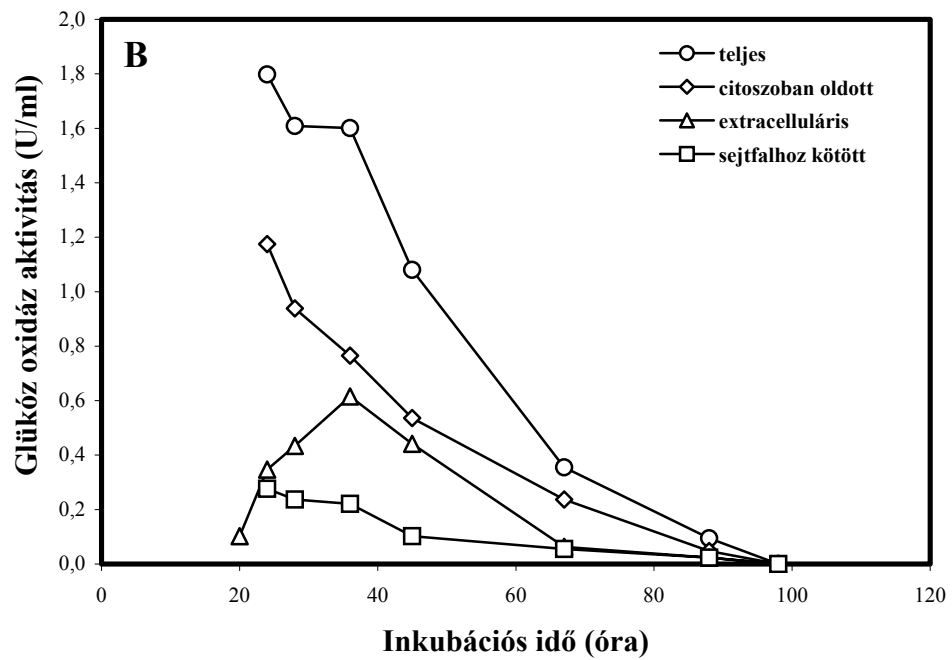
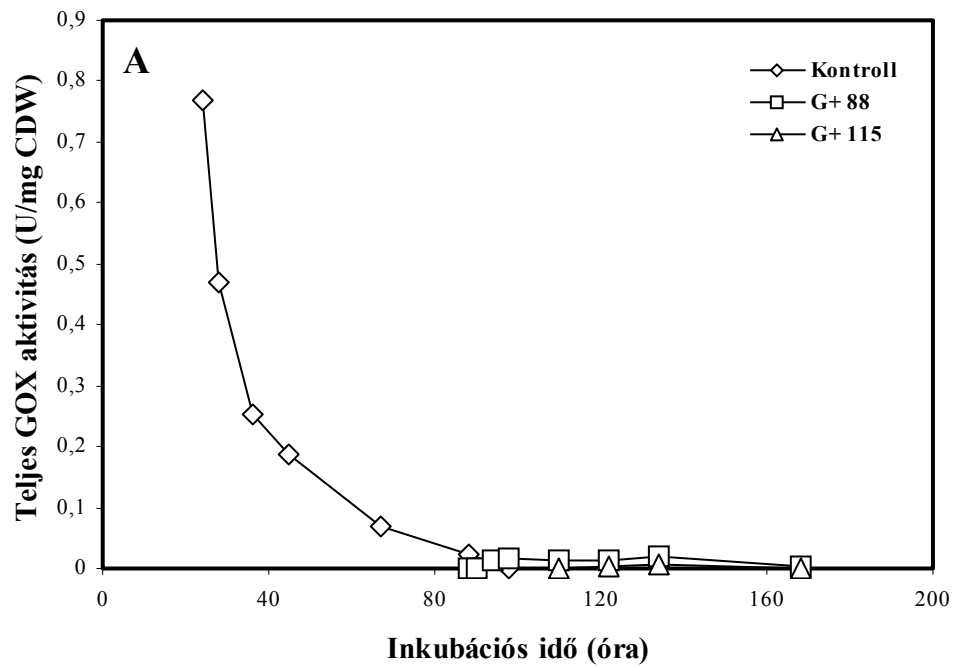
A megfigyelt szabadgyök-generálódás eredetét kiderítendő, megvizsgáltam a tenyészetek GOX aktivitását és légzési intenzitását. Ennek eredményét a 41-43. Ábrák szemléltetik. A teljes GOX aktivitás (összes sejthez kötött + extracelluláris) az exponenciális és decelerációs növekedési fázisokban (24-36. óra között) igen intenzív volt, állandó értéken maradt (41/A. Ábra), míg a specifikus aktivitások a növekvő biomassza miatt csökkentek (41/B. Ábra). Az enzim aktív szekrécióval kikerült a tápközegbe; ezt jelezte, hogy az oldott intracelluláris (1,18→0,77 U/ml; 24-36 óra között) specifikus aktivitások csökkenésével szinkronban növekedett az extracellulárisan mérhető specifikus aktivitás (0,10→0,62 U/ml; 20-36. óra között) (41/B. Ábra). Lényeges, hogy a sejtfalhoz kötött enzim-aktivitások eközben megközelítőleg konstansak maradtak (0,22-0,28 U/ml). A stacioner és autolítikus növekedési fázisokban a GOX aktivitások meredeken csökkenni kezdtek minden vizsgált sejt-frakcióban, és teljesen eltűntek 98 óras korra (41. Ábra).

A növekedés korai exponenciális fázisában (az inkubáció első 20 órájában) a *P. chrysogenum* sejtek a kiindulási glükóz-koncentráció mintegy 30,8 %-át (52→36 mM) hasznosították, glükonát-konverzió nélkül (42/A. és 42/B. Ábra). Az inkubáció első 20 órája csak kismértékű biomassza-növekedést eredményezett (18. Ábra); a sejtek intenzív növekedése csak ez után indult meg. Később, a 20-26. óra között, a maradék glükóz (36 mM) pontosan fele alakult át glükonáttá (18 mM), ami megfelel a kiindulási glükóz 34,6 %-ának, míg a másik felét a gomba felhasználta (42. Ábra). A száraztömeg elérte a 4-5 mg/ml-t a 28. órára; ekkor megkezdődött az extracelluláris glükonát felhasználása is (42/B. Ábra). A 36. órára az összes glükonát is eltűnt a tápközegből (42/B), ezzel párhuzamosan a száraztömeg tovább növekedett (8 mg/ml; 18. Ábra).

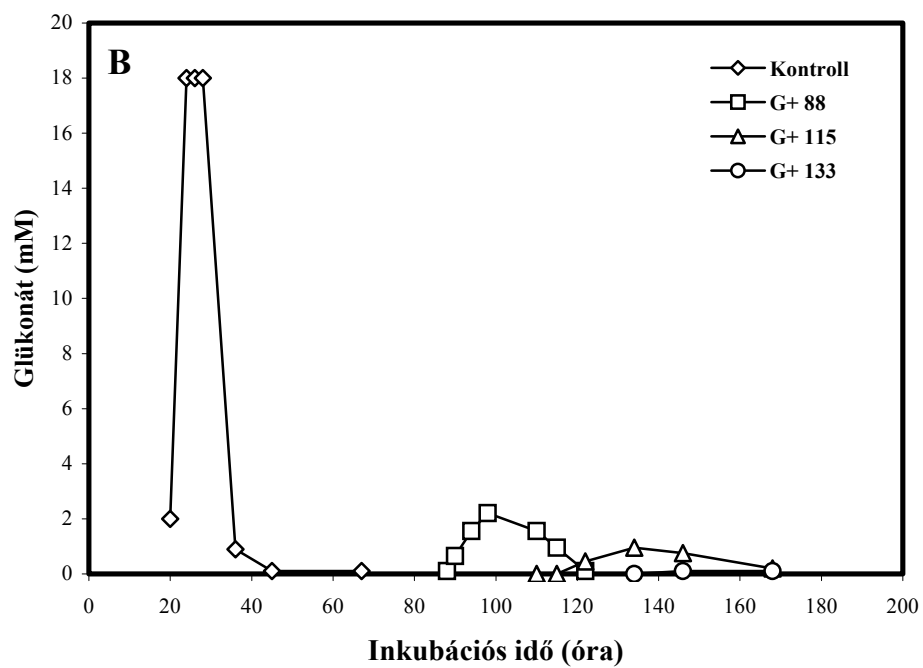
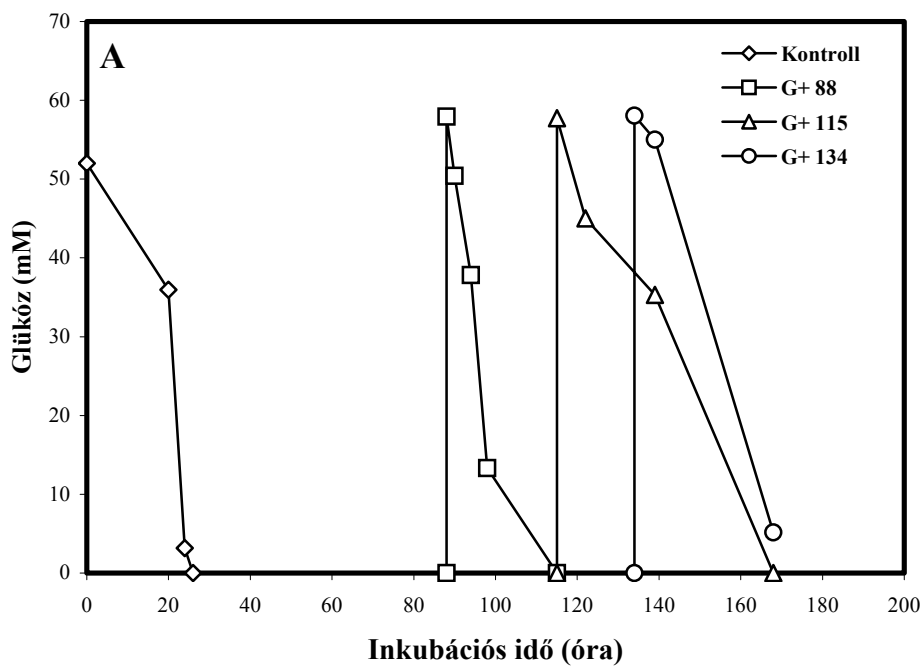
Fontos kihangsúlyozni, hogy az autolítikus tenyészetekben glükóz-pótlást követően semmilyen érdemleges glükonát keletkezés nem volt tapasztalható, és a GOX aktivitások is elhanyagolhatóak maradtak (41. és 42/B. Ábrák) – annak ellenére, hogy a tenyészetek aktívan felhasználták a kapott szénforrást.

Ami a légzést illeti, a teljes és a cián-rezisztens légzési intenzitások is emelkedtek az exponenciális növekedés alatt, a tenyészet 28 óras korára érve el maximumukat (45,5 és 20,1 $\mu\text{M O}_2/\text{min/g CDW}$), majd csökkenni kezdtek a decelerációs fázisban (43. Ábra). A teljes sejtlégzés beállt egy relatíve kicsi konstans értékre ($\sim 5-7 \mu\text{M O}_2/\text{min/g CDW}$) 88 óras inkubáció után, miközben a cián-rezisztens légzés aránya folyamatosan növekedett a stacioner, autolítikus és kriptikus fázisokban, a

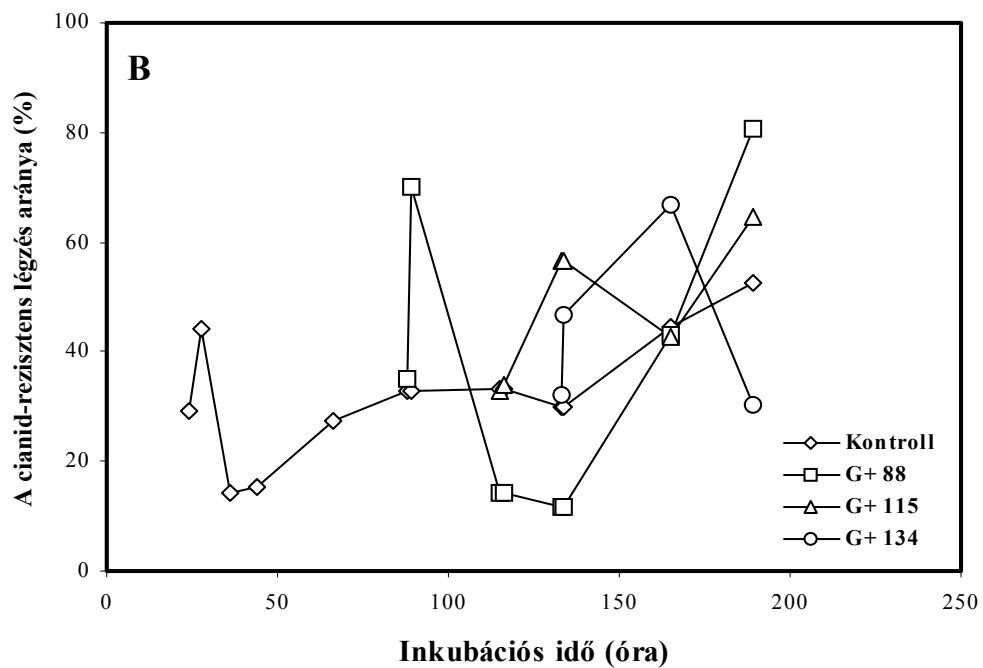
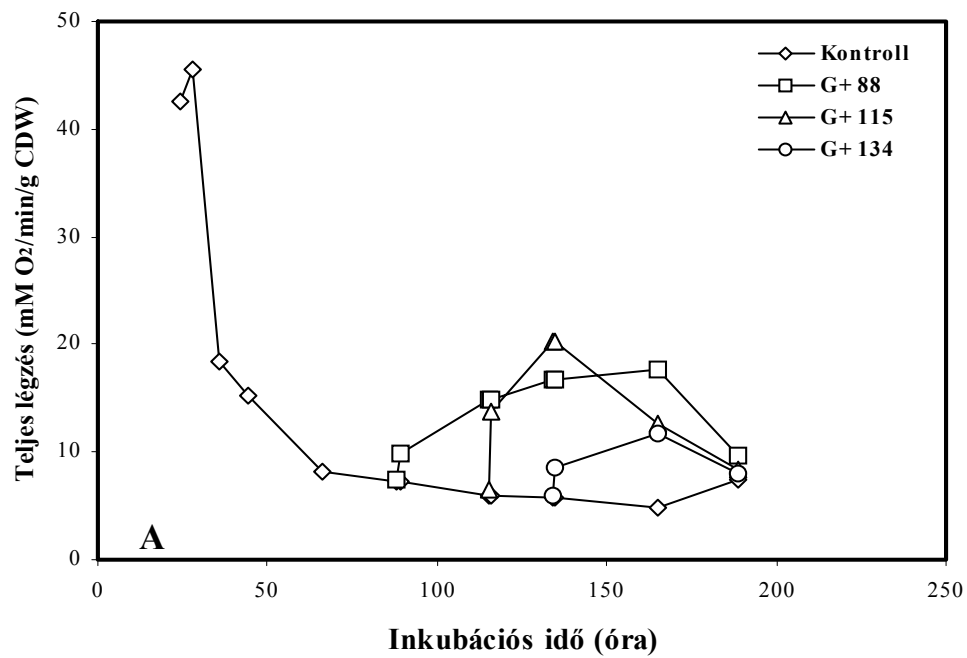
189. órákor elérve az 52,4 %-ot (43/B. Ábra). Glükóz-pótlást követően minden vizsgált időpontban a teljes és cián-rezisztens légzési ráták jelentős mértékben növekedni kezdtek (43/A. Ábra). A teljes légzés ekkor elérte az exponenciális tenyészetekben megfigyelt lézés 26-44 %-át ($12-20 \mu\text{M O}_2/\text{min/g CDW}$), aminek nem kevesebb, mint 57-70 %-át a cián-rezisztens légzés tette ki (43/A. és 43/B. Ábra). Az exponenciális növekedéshez hasonlóan, az extra adag glükóz elfogyása után csökkent a teljes respiráció és a cián-rezisztens légzés aránya – ez utóbbi azonban ismét növekedni kezdett, mikor a tenyészetek egy második autolitikus fázishoz értek (amit a biomassza csökkenése jelzett) (43/B. Ábra).



41. Ábra. A teljes (extracelluláris és összes sejthez kötött) GOX aktivitások (A), valamint ezek megoszlása kontroll *P. chrysogenum* tenyészetekben (B) az inkubációs idő függvényében. Az értékek három független kísérlet eredményei; a szórás sehol nem haladta meg a 10 %-ot. Jelmagyarázat (A): a 'G+' melletti számok a szénforrás pótlásának idejét jelentik (óra).



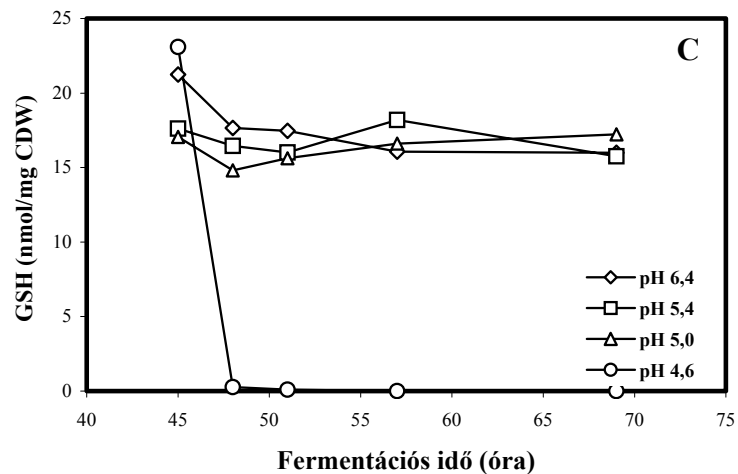
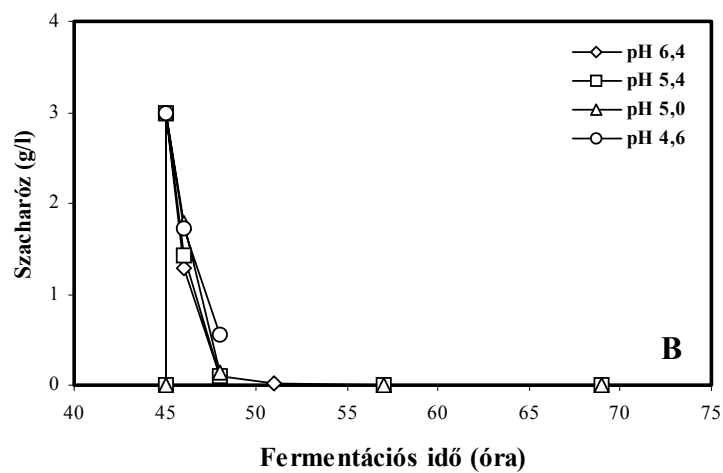
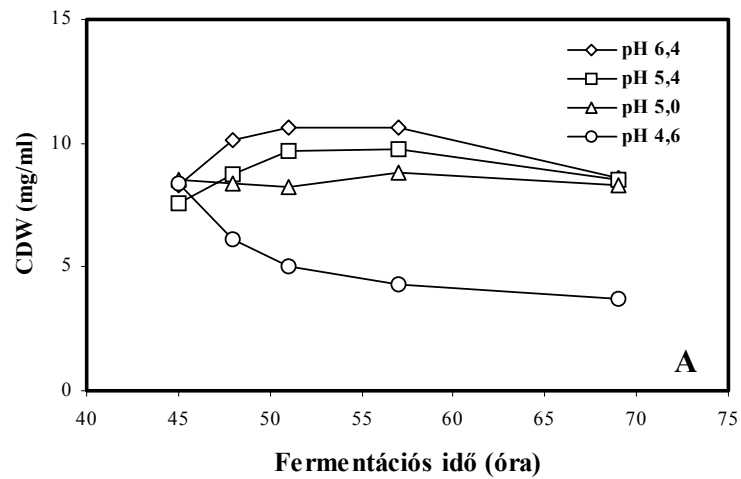
42. Ábra. A tápközeg glükóz (A) és glükonát (B) koncentrációinak változása az idő függvényében *P. chrysogenum* tenyészetekben. Az értékek három független kísérlet eredményei. A szórás sehol nem haladta meg a 10 %-ot. Jelmagyarázat: a 'G+' melletti számok a szénforrás pótlásának idejét jelentik (óra).



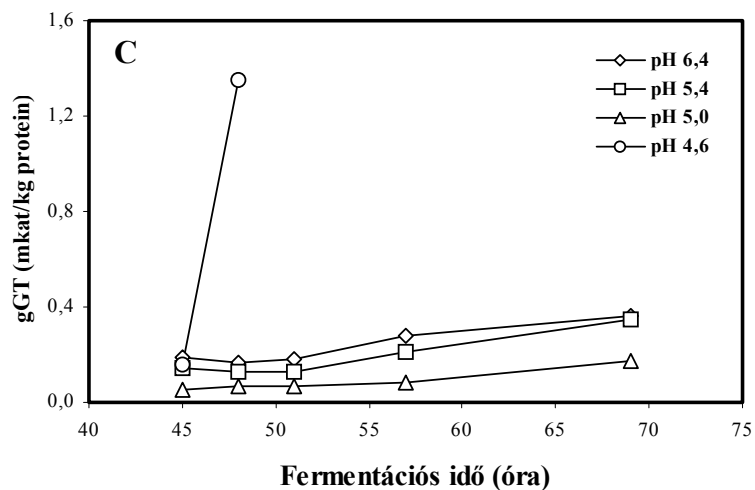
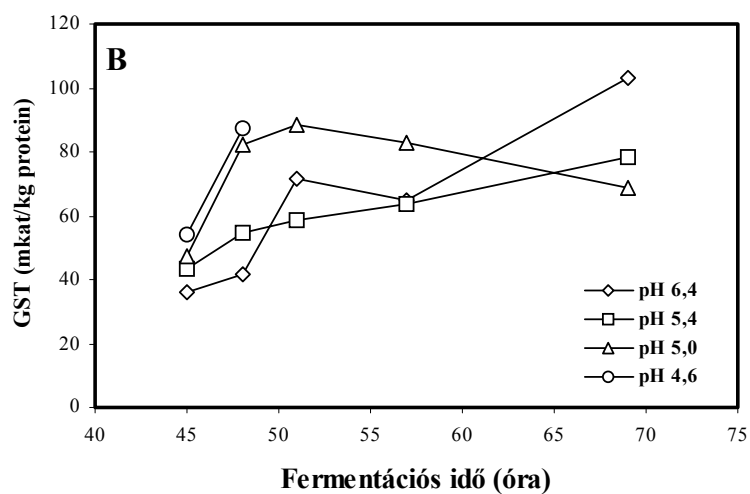
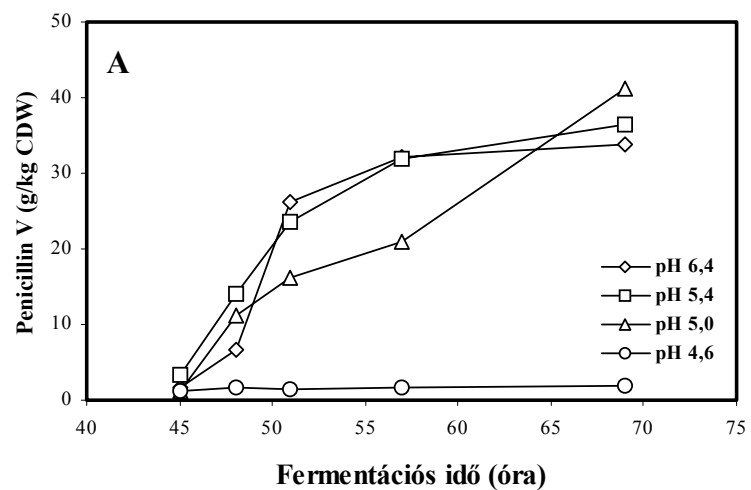
43. Ábra. A teljes légzési ráták (A) és az alternatív (cianid-rezisztens) légzés százalékos aránya (B) *P. chrysogenum* tenyészetekben, az inkubációs idő függvényében. Az értékek három független kísérlet eredményei. A szórás sehol nem haladta meg a 10 %-ot. Jelmagyarázat: a 'G+' melletti számok a szénforrás pótlásának idejét jelentik (óra).

5.11. A GSH-függő detoxifikáció vizsgálata β -laktám termelés során

A *P. chrysogenum* NN-08 törzssel végzett kísérleteimben ipari, antibiotikum-termelő fed-batch fermentációt modelleztem, mely során igyekeztem a pH átmeneti, jól kontrollált csökkentésével a termelő fázis elején (45-50 óra között) előidézni a β -laktám oldallánc-prekurzor POA glutation-függő detoxifikációját. A fermentációs kísérletek eredményeit a 44-45. Ábrák foglalják össze. A tápközeg pH-jának csökkenésekor (4.2.) a POA beáramlott a sejtekbe (Henriksen *et al.*, 1998a,b). A GSH-függő detoxifikáció két kulcsenzime, a GST és γ GT specifikus aktivitásai ennek következtében 2-3-szorosukra emelkedtek ugyan a fermentáció 45-69. órája között (45/B. és 45/C. Ábra), azonban az intracelluláris GSH szintek ettől függetlenül változatlanok maradtak – még pH=5,0-n is (44/C. Ábra). Minden esetben elhanyagolható maradt továbbá a GSSG koncentrációja (<0,01 mmol/mg CDW). Ezek alapján megállapítható, hogy a pH csökkentésével nem sikerült érdemben befolyásolni a sejtek redox-állapotát (GSH/GSSG arányát); ennek megfelelően a glutation-arányokra érzékeny GR enzim sem aktiválódott (az ábrán nincs feltüntetve). A tenyészetek penicillin-V ekvivalens β -laktám termelése nagyon hasonló volt az egyes tenyészetekben; a 69. órára elérte a 40 mg/g CDW értéket. A sejtek a nagy mennyiségben jelenlévő (5 g/l) toxikus oldallánc-prekurzor ellenére igen effektíven hasznosították az adagolt szacharózt (3 óra alatt csaknem teljesen elfogyasztották; 44/B. Ábra). A pH csökkenésével azonban a gomba cukor-hasznosítása (illetve biomassza-gyarapódása) gyengült. Míg a kontroll (pH=6,4) tenyészet 6 óra alatt 2,35 mg/ml CDW gyarapodást mutatott (8,28→10,63 mg/ml), addig pH=5,0-n a száraztömeg nem változott. Ugyanakkor, amennyiben 5,0 alá csökkentettem a pH-t (4,6 illetve 4,8), a sejtek GSH készlete gyorsan kimerült, és a többi esetben megfigyelt antibiotikum-termelés is elmaradt (45/A. Ábra). Figyelemre méltó, hogy a legsavasabb pH-nak kitett sejtek a 45 órakor beadott tápfolyadék szacharóz tartalmának 82 %-át felhasználták 45 és 48 óra között, ami jól összevethető a magasabb pH értékeken megfigyelttel (körülbelül 95 % szacharóz fogyasztás; 44/B. Ábra). Továbbá ugrásszerűen (8,5-szörösére) megnőtt a specifikus γ GT aktivitás ugyanebben az időszakban, és a GST aktivitások is jelentős mértékben (1,9-szeresükre) növekedtek. Ám mindezen változások együttesen sem voltak képesek megakadályozni az ezt követő fokozott autolízist és sejtpusztulást (44-45. Ábrák). Ebből kifolyólag a 48-69. óra között a biomassza rohamos csökkenése volt megfigyelhető a tenyészetekben. A 4,8-5,0 pH tartomány tehát az adott kísérleti feltételek mellett kritikusnak mutatkozott – nem csupán az antibiotikum termelés, hanem a gomba pusztaság túlélése szempontjából is.



44. Ábra. A száraztömeg (CDW) (A), a tápközeg szacharóz koncentrációi (B), és az intracelluláris GSH szintek (C) változásai a 45 órakor a fermentorokhoz adagolt, 0,5% POA tartalmú, kémiaiilag definiált termelő táptalaj hatására. A feltüntetett pH értékek a 45-50 óra közötti fermentációs időben értendők. A kontroll tenyészet pH-ja változatlan maradt a fermentáció egész ideje alatt (pH=6,4). Minden érték két független kísérlet eredményeinek átlagát jelzi. A szórás értéke sehol nem haladta meg az átlagok 15 %-át, ezért – az áttekinthetőség miatt – nincs az ábrákon feltüntetve.



45. Ábra. A penicillin termelés (A) és a specifikus GST (B) illetve γ GT (C) aktivitások változása a 45 órakor a fermentorokhoz adagolt, 0,5% POA tartalmú, kémiaiailag definiált termelő táptalaj hatására. A jelölések és kísérleti körülmények megegyeznek a 44. Ábrával.

6. ÉRTÉKELÉS

6.1. A gomba növekedése

A kísérleteimben használt, β -laktám termelő *Penicillium chrysogenum* NCAIM 00237 törzs süllyesztett tenyészeinek növekedése hat, jól elkülönülő fázissal volt jellemezhető. Ezek sorrendben a következők: lag (0-20. óra), exponenciális (20-34. óra), decelerációs (34-40. óra), stacioner (40-50. óra), autolítikus (50-148. óra) és kriptikus vagy poszt-autolítikus (a 148. órától) növekedési fázisok (Pusztahelyi *et al.*, 1997a, 1997b; 18. Ábra). Az exponenciális növekedés alatt a sejtek igen aktívan metabolizálták a glükózt (17. Ábra), ami szén- és energiaforrásként effektíven támogatta a hifák gyors növekedését és elágazását; ez – az adott tenyésztési körülmények között – az inkubáció 28-30. órájára pelleték képződéséhez vezetett (19. Ábra). Bár a pelletes morfológia fed-batch és folyamatos tenyészetekben általában hosszan fenntartható, szénlimitáció alatt a pelleték hamarosan széttöredeztek, és intenzív hifa-feldarabolódás és sejtlízis vette kezdetét. A közelmúltban bizonyították, hogy a fonalas gombák autolízise egy dinamikus, energia-igényes eseménysorozat, amely több szempontból is emlékeztet a magasabbrendű eukarióta szervezeteknél megfigyelt apoptotikus folyamatokra (McIntyre *et al.*, 1999). A fungális autolízist számos belső és külső tényező indíthatja el, illetve befolyásolhatja; például tápanyag-limitáció (Pusztahelyi *et al.*, 1997a; Harvey *et al.*, 1998; White *et al.*, 2002), és az autolítikus hidrolázok (például kitinázok) tápközegbe kerülése. Az *in vivo* enzim-gátlásos kísérleteimben én is ezt igyekeztem igazolni.

6.2. A kitinázok szerepe a morfológiai változásokban

A kitinázoknak jelentős szerepet tulajdonítanak a kitint tartalmazó gombák morfogenezisében és alakváltozásaiban, beleértve ebbe a spórák duzzadási és csírázási folyamatait, a növekvő hifák csúcsi megnyúlását és elágazását, az élesztő sarjsejtek leválását az anyasejtről csakúgy, mint a tenyészetek korfüggő autolízisét és fragmentációját (Gooday, 1997; Gooday *et al.*, 1992). A Bartnicki-García féle általános hifa-növekedési modell (1973 és 1999) kulcslépésként feltételezi a hifák csúcsi régiójának növekedésében a sejtfal enzimátikus fellazítását; Rast hipotézise pedig valószínűsíti a {kitináz – kitin szintáz – N-acetil- β -D-glükózaminidáz} enzimkomplex

jelenlétét és aktív szerepét mind a gombafonalak elágazásainak létrejöttében, mind a hifacsúcsok apikális növekedésekor (Rast *et al.*, 1991). Ugyanakkor megjegyzendő, hogy a vizsgálat tárgyát képező törzsben a HexAm aktivitások specifikus inhibitorokkal történő *in vivo* gátlása nem okozott fiziológiai vagy morfológiai változást (Pusztahelyi *et al.*, 1997a, 1997b); ez arra engedett következtetni, hogy a hexózaminidázok vagy nem játszottak érdemi szerepet a gomba növekedésében, vagy – sztérikus okok miatt – nem sikerült őket gátolni.

Valójában, a kitinázok feltételezett szerepét a fent említett folyamatokban a legtöbb esetben szintén az enzim (allózamidinnel vagy egyéb kitináz-inhibítorral történő) *in vivo* gátlásával (Gooday *et al.*, 1992; Sándor *et al.*, 1998), illetve a kitináz-gének elrontásával, azaz mutáns törzsek vizsgálatával (Gooday, 1995; Kuranda & Robbins, 1991; Takaya *et al.*, 1998) igazolták.

Az allózamidint és félszintetikus származékait a nyolcvanas évek vége óta igen potens antifungális szerként tartják számon (Dickinson *et al.*, 1989; Gooday, 1989; Rast *et al.*, 2000). Sajnos azonban minden eddigi próbálkozás, amely a – fonalas, vagy élesztő – gombák exponenciális növekedésének allózamidinnel történő gátlására irányult, sikertelen maradt (Dickinson *et al.*, 1989; Escott *et al.*, 1998; Gooday *et al.*, 1992; Pócsi *et al.*, 2000; Sándor *et al.*, 1998). Az általam vizsgált törzs csírázó és exponenciálisan növekvő tenyészeiben ez a kitináz-inhibitor szintén hatástalannak bizonyult (30. Ábra). Bár kitinázok és kitin szintázok mindig megtalálhatóak az aktívan növekvő micéliumokban (Gooday *et al.*, 1986; Hearn *et al.*, 1997; Rast *et al.*, 1991), könnyen elképzelhető, hogy – sztérikus, vagy egyéb okokból – védettek voltak az allózamidin gátló hatásával szemben (Gooday, 1995; Gooday *et al.*, 1997). Egy másik lehetséges magyarázat – a Wessels-féle “steady state” hifanövekedési modellnek (1984, 1986 és 1999) megfelelően – az lehet, hogy ezek a hidrolázok talán mégsem játszottak olyan jelentős (esetleg semmilyen?) szerepet az apikális sejtfal-nyúlásban. Ennek megfelelően, az allózamidin segítségével nem sikerült egyértelműen igazolnom a kitinázok szerepét a fiatal hifák csúcsi növekedésében.

Kísérleteimben az allózamidint ezért a növekedés decelerációs fázisában (35 óra inkubáció után) adtam a tenyészetekhez, amivel lehetőség nyílt feltérképezni eme potens inhibitor öregedő *P. chrysogenum* tenyészetekre – a kor-függő kitinázok gátlása révén – gyakorolt élettani hatásait.

A szénlimitált tenyészetekben ekkor a fragmentáció és autolízis látványos gátlása (illetve jelentős késleltetése; 18. és 20. Ábrák) mellett a gomba-sejtfal kitintartalmának szignifikáns növekedését (2,6 %_{kontroll} → 7,0 %_{allózamidin-kezelt}) is

megfigyelhettem. A beépült kitin mennyiségének fokozódása (és ebből következőleg valószínűsíthető a sejtfal kitin-rétegének megvastagodása is) több, egymástól független folyamat eredménye lehetett. Egyrészt, a sejtfal szintézise és lízise közötti egyensúly (Bartnicki-Garcia, 1973, 1999; Peter & Schweikart, 1990) felborulhatott, másrészt a kitináz inhibitor megakadályoz(hat)ta a sejtfal mátrixot alkotó polimerek autolitikus degradációját (Harvey *et al.*, 1998; Reyes *et al.*, 1988, 1989). Az extracelluláris kitinázok effektív inhibíciója ($IC_{50}=1,4 \mu M$ *in vitro*; 33. Ábra) és a sejtek növekvő kitintartalma között mindenesetre valószínűleg ok-okozati kapcsolat volt.

Az izoenzim-vizsgálatok alapján a lítikus fázisban több, különböző méretű kitináz került az extracelluláris térbe. A nemredukáló SDS-PAGE gélben három nagy intenzitású sáv ($M_r=91$ kDa; 57 kDa; 45 kDa) mellett több, kisebb erősségű (87; 33; 20 kDa) sávot is megfigyeltem (35. Ábra). Korábbi vizsgálatok alapján ezen gomba exponenciális növekedési fázisában az intracelluláris szolubilis minták egyetlen, $M_r=91$ kDa móltömegű kitinázt tartalmaztak (Pusztahelyi, 1997c), ami később az autolitikus fázisban a mikroszomális mintákban is megfigyelhető volt, a $M_r=33$ kDa (lehetséges, hogy az előbbi alegysége) enzimmel együtt. Az autolitikus szakaszban kimutatható különböző izoenzim jelenlétére többféle magyarázat adható. Egyrészt valószínű, hogy több kitináz gén van jelen a sejtekben (De la Cruz *et al.*, 1992); másrészt a részleges proteolitikus degradáció sem kizárható (Pusztahelyi, 1997c). Ugyanakkor a legtöbb esetben az egyes izoenzim specális szerepe egyelőre nem felderített (Cabib *et al.*, 1992). A vizsgált *P. chrysogenum* törzs esetében mind a kontroll és allóزامidin-kezelt tenyészetek hasonló izoenzim-profilja, mind az *in vitro* enzim-inhibíciós kísérletek arra engedtek következtetni, hogy a gomba autolitikus kitinázai allóزامidin-szenzitívek.

Az allóزامidin jelenlétében és hiányában végzett mikroszkópi vizsgálatunk, a tenyészetek biomassza-változása, valamint a különböző alakos elemek átlagos számának és morfológiai megoszlásának statisztikai analízise kísérleteinkben egyértelműen igazolták a kitinázok *P. chrysogenum* autolízisében és fragmentációjában játszott szerepének fontosságát (23-24. Ábrák). Mivel a folyamatot a szinkronitás hiánya jellemezte, ami megakadályozta az autolízis fokának pontos mikroszkópos megállapítását, annak előrehaladtáról csak a száraztömeg-csökkenés mértéke, illetve az alakos elemek számainak és méretének változása tájékoztatható.

Az exponenciálisan növekvő tenyészetekkel szemben, ahol a lítikus enzimek apikális nyúlásában játszott szerepe vitatott, a kitinázok elfogadottan nagy jelentőséggel bírnak a hifa-elágazási és a csírázási folyamatokban, ahol a merev sejtfal lokális és időleges fellazítása alapvető fontosságú lehet (Gooday *et al.*, 1997; Wessels, 1984).

Eredményeim teljesen alátámasztják eme nézetet. A 88, 115 és 133 órai glükózpótlást követően az allóزامiddinzel kezelt kultúrákban – még hosszú inkubálás esetén is – csak elvétve jelentek meg új hifa-kinövések (vagy egyáltalán azok kezdeményei), míg ugyanezen túlélő képletek kontroll tenyészetekben intenzíven, rendszerint mindkét végükön csíráztak (22/A. és 22/B. Ábra). Ez egyértelműen jelezte az autolitikus kitinázok szerepét a fiatal, vegetatív hifák megjelenésében. Ugyanakkor megjegyzendő, hogy az öreg tenyészetek kriptikus növekedésének fenntartásában ezzel szemben valószínűleg nem játszottak olyan lényeges szerepet a sejtlízis során tápközegbe jutott kitinolitikus enzimek; a gomba ugyanis nem mutatott növekedést kitin szénforráson, és feltehetőleg nem volt képes a fermentlébe kerülő sejtfalmaradványok kitintartalmának a hidrolízisére sem (Pusztahelyi *et al.*, 1997b).

Az allóزامiddin fiziológiai hatása nem volt kedvező a mikroorganizmus számára. Ennek jeleként például a 115 órai glükózpótlást követően az extracelluláris kitináz és HexAm aktivitások (31-32. Ábrák), glükóz koncentrációk (17. Ábra) és a tápközeg pH-jának (16. Ábra) csökkenései egyértelműen mérsékeltebbek voltak a kontroll tenyészetekben megfigyelhetőknél. Továbbá, az intracelluláris GSH koncentráció nem változott az allóزامiddin-kezelt kultúrában szénpótlást követően (36. Ábra), míg a kontroll tenyészetekben a GSH szint nagymértékben csökkent a növekedés újraindulásával párhuzamosan, hiszen a glutation ekkor a sejtek számára könnyen hasznosítható nitrogén- és kénforrásként szolgálhatott. Ugyanakkor a GSH/GSSG redox arányok jelentősen növekedtek az allóزامiddin-kezelt és glükóz-pótlott tenyészetekben, míg a kontroll tenyészetekben ez az arány csökkent (38. Ábra), mikor az új szénforrás jelenlétében az autolízis helyett ismét biomassza-gyarapodás volt megfigyelhető. A tény, hogy az allóزامiddin nem befolyásolta szignifikánsan az intracelluláris GSH és GSSG szinteket és arányokat a szénlimitáció során (36-38. Ábrák) valószínűtlenné teszi, hogy az allóزامiddin súlyos károkat okozott volna a sejteknek. Ezzel teljes összhangban, az allóزامiddin-kezelt és kezeletlen micéliumok (illetve fragmentumok) minden vizsgált időpontban nagyon hasonló növekedési mintázatot és csírázási frekvenciát mutattak friss, allóزامiddin-mentes tápközegbe való átmosást követően (25-26. Ábrák), és nem volt érdemi különbség a tenyészetek különböző időpontokban megfigyelt élőcsíra-számai között sem (1. Táblázat). A vitalitásfestési vizsgálatok (28. Ábra) szintén arra engedtek következtetni, hogy a megfigyelt fiziológiai különbségek ellenére az allóزامiddin-kezelt és kontroll sejtek hasonló átlagos metabolikus aktivitással rendelkeztek. Ugyanakkor már esett szó az autolitikus tenyészetek aszinkronitásáról. Az egyes hifaelemek aktuális mérete, vakuolarizáltsága, életképessége, stb. adott

pillanatban jelentős mértékben eltérhetett ugyanazon tenyészetben belül is. A vitalitás-festési kísérletek során egyértelműen meggyőződtem erről; például az egy sejtből álló, látszatra egyforma fragmentumok jelentős hányada egyáltalán nem mutatott metabolikus aktivitást, míg a kétsejtes fragmentumok általában jól festődtek DiOC₆-al. Természetesen ez magyarázattal szolgálhat arra is, miért voltak szignifikánsan alacsonyabbak az élőcsíra-számlálással nyert adataink a mikroszkópi számlálások értékeinél (1. Táblázat). A fenti megfigyeléseket összegezve tehát megállapítható, hogy az allózamidin általános hatása az autolizáló *P. chrysogenum* micéliumokra fungisztatikus volt, nem pedig fungicid.

A korábbi megfigyelésekhez hasonlóan (Dickinson *et al.*, 1991; Humphreys & Gooday, 1984; Manocha & Balasubramanian, 1988), a vizsgált *P. chrysogenum* mikroszomális kitináza(i) – legalábbis az exponenciális növekedés alatt – membrán-kötött zimogén formában voltak jelen (Sámi *et al.*, 2001b). Ez természetesen szintén hozzájárulhatott az allózamidin gátló hatása elleni védekezéshez *in vivo* (Dickinson *et al.*, 1991). Később, az autolízis során, tripszines kezelésre semmiféle további aktiváció nem volt megfigyelhető (Sámi *et al.*, 2001b), ekkorra tehát feltehetőleg az összes kitináz aktiválódott és érzékennyé vált az allózamidin jelenlétére. Mindez jól magyarázhatja eme kitináz-inhibitor korfüggő, csak az autolizáló *P. chrysogenum* tenyészetekre kifejtett fungisztatikus hatását.

Az itt bemutatott eredmények további bizonyítékul szolgálhatnak ahhoz, hogy a kitinázok valóban fontos szerepet játszhatnak a hifák korfüggő feldarabolódásában és a fragmentumok növekedésének újra-iniciálásában, ami adott esetben hozzájárulhat például a fonalas patogén gombák gazdaszöveti inváziójához is (Cooper & Haycocks, 2000). Ezen hidrolázok, és az élesztősejtek szeparációját és szétterjedését elősegítő kitinolitikus enzimek éppen ezért a jövőbeni gyógyszerkutatás kiváló célpontjai lehetnek. A *P. chrysogenum* extracelluláris kitináz-gátlási kísérleteinek *in vitro* eredményeként kapott 1,4 μM IC₅₀ inhibíciós koncentráció érték jól illeszkedik az irodalomban közölt adatokhoz; gyakorlatilag köztes értéket képvisel a gombakitinázok allózamiddal való *in vitro* gátlásakor megfigyelt 0,010-67 μM IC₅₀ tartományában (Cabib *et al.*, 1992; Dickinson *et al.*, 1989; Hodge *et al.*, 1996; McNab & Glover, 1991; Rast *et al.*, 2000). Az új, remények szerint még effektívebb félszintetikus allózamidin-származékok tervezése, szintézise és tesztelése jelenleg is folyamatban van (Rast *et al.*, 2000; Sakuda & Sakurada, 1998). Ez azt jelenti, hogy a gombák kitinolitikus enzimjeit támadó gyógyszerek antifungális hatása a közeljövőben tovább növekedhet.

6.3. Szabadgyök-képződés és redox változások öregedő tenyészetekben

Bár az autolízis molekuláris háttere még nem kellőképpen feltárt (White *et al.*, 2002), a ROS átmeneti akkumulációja és a GSH/GSSG redox egyensúly időleges felborulása egyes hipotézisek szerint fontos szignál-transzdukciós események lehetnek a gombasejtek elhalási folyamataiban. A sejtdifferenciálódás Hansberg-féle “dioxigén kizárási elmélete” alapján (Hansberg & Aguirre, 1990) a növekvő hifák és a lekerekedett végű, élesztőszerű fragmentumok a mikroorganizmus fiziológiailag stabil, differenciált állapotát képviselték. Továbbá, az élesztőszerű formákat eredményező autolízis igen fontos részét képezte a sejtdifferenciálódási folyamatoknak, hiszen az életben maradó, növekedő vagy differenciálódó sejtek számára új tápanyagforrást biztosított a lizált sejtek anyagainak újrahasznosítása révén (Pusztahelyi *et al.*, 1997a). Ezt a folyamatot több tényező is kiválthatja, amik közül az egyik legfontosabb a szén- (úgy is mint energia)-forrás limitációja. Az elmélet szerint a differenciálódást átmeneti hiperoxidáns állapot előzi meg a decelerációs és stacioner növekedési fázisokban, azaz közvetlenül az autolízis megindulása előtt (Hansberg & Aguirre, 1990; Hansberg *et al.*, 1993).

Kísérleteim alapján több érv is szól az elmélet mellett és ellen is. A *P. chrysogenum* exponenciális növekedési fázisát meglepően magas intracelluláris peroxid, szuperoxid és GSSG koncentrációk, és ennek következményeként relatíve alacsony GSH/GSSG redox arányok jellemezték (36-39. Ábrák). Ennek tulajdonítható, hogy az autolízis megindulását a vizsgált törzsnél valóban megelőzte néhány antioxidatív enzim (GPx, kataláz, GR) aktivációja, illetve nagy aktivitása (40. Ábra). Továbbá, a lízis kezdeti szakaszán (a 66-88. óra között) egy számottevő GSH/GSSG redox egyensúlyvesztés is megfigyelhető volt. Az intracelluláris ROS szintek azonban – a várttal ellentétben – a pre-autolítikus fázisban egyértelműen csökkentek (39. Ábra). Később, az autolízis előrehaladtával, az intracelluláris ROS koncentrációja ugyan jelentős, folyamatos növekedésnek indult, azonban mindeközben a GSH/GSSG arányok is emelkedtek (38-39. Ábrák). Azaz, valódi oxidatív stresszről (amit többek között éppen ezen arány határozott csökkenése jelzett volna) ebben az esetben nem beszélhetünk. Az összehasonlítás kedvéért ismételten megemlítendő, hogy a *N. crassa* konidiogenezisét hiperoxidáns állapot előzte meg, és jelentős GSH/GSSG egyensúlyvesztés (Toledo *et al.*, 1995), valamint oxidatív stresszválasz (Hansberg *et al.*, 1993; Toledo *et al.*, 1994) volt megfigyelhető. Újabb kutatási eredmények szerint szinglet oxigén képződött *N. crassa* konídiumok csírázása közben, és ezt a

differentiálódási folyamatot el lehetett indítani exogén H_2O_2 -val is, argon atmoszférában (Lledias *et al.*, 1999). Egy, az autolízissel ellentétes sejtdifferentiálódási folyamat, a túlélő fragmentumok glükózpótlást követő újra-csírázása az általam tanulmányozott *P. chrysogenum*-ban is átmeneti peroxid-akkumulációval és néhány antioxidáns enzim (GPx, GR) aktivációjával járt együtt (39-40. Ábrák). Azonban mindezt nem kísérte GSH/GSSG redox arány változás (38. Ábra).

A glutation a leggyakoribb kis molekulatömegű tiolvegyület a gombákban, ami köztudottan számos igen fontos fiziológiai folyamatban vehet részt (Penninckx & Elskens, 1993). Például a GSH/GSSG rendszer központi helyet foglal el a sejtek redox státuszának fenntartásában, a ROS elleni antioxidatív védelmi rendszerben (Emri *et al.*, 1997, 1999a; Jamieson, 1998), részt vesz a nehézfémek, ártalmas metabolitok (például formaldehid, metil-glioxál) valamint xenobiotikumok detoxifikációjában és eliminációjában (Stephen & Jamieson, 1996), az aminosavak és peptidek felvételében, illetve intracelluláris transzportjában is (Penninckx & Elskens, 1993). Ezen kívül könnyen hasznosítható és mobilizálható endogén kén- és nitrogéntartalékként szolgál a gombasejtek számára (Elskens *et al.*, 1991; Mehdi & Penninckx, 1997; Emri *et al.*, 1998; Stevens *et al.*, 1953). Az intracelluláris GSH szinteket ezért igen sok tényező befolyásolhatta (Emri *et al.*, 1998, 2001). A Tanszéken végzett korábbi kísérletek alapján (Pusztahelyi *et al.*, 1997a) a peptidek szénforrásként való felvétele és hasznosítása már a *P. chrysogenum* decelerációs növekedési fázisában megkezdődött. A növekedés re-iniciálódása a 115 órás glükóz-pótlást követően megfordította a biomassza autolítikus csökkenését, ami magától értetődően megnövelte a N és S igényt is, és maga után vonta az endogén nitrogén és kénforrások mobilizációját (36. Ábra). Ennélfogva, a GSH készlet jelentős csökkenése ebben az esetben a komplex metabolikus stresszválasz részének volt tekinthető a hasznosítható szénforrás jelenlétében (Penninckx, 2000).

Az intracelluláris ROS szinteket szintén számos tényező befolyásolhatta, beleértve a sejtek metabolikus aktivitását (hiszen a peroxid képződése a legintenzívebb az exponenciálisan növekvő tenyészetekben és a glükóz-pótlást követően volt), az antioxidáns enzimek kor-függő regulációját és minden jel szerint a túlélő fragmentumok öregedését (39. Ábra). Hasonlóan az öregedő, stacioner fázisú *S. cerevisiae* tenyészetekhez (Jakubowski *et al.*, 2000), a peroxid és szuperoxid képződése folyamatosan nőtt a túlélő képletekben az autolízis és a kriptikus növekedés alatt. Mindazonáltal – amint már hangsúlyoztam – a mi esetünkben az intracelluláris ROS akkumulációt nem kísérte szignifikáns GSH szint-csökkenés vagy GSH/GSSG redox-

arány változás. Valójában, az intracelluláris GSSG szintek még inkább csökkenő tendenciát mutattak, és ebből kifolyólag, a GSH/GSSG arányok növekedtek a stacioner fázist követően (38. Ábra).

Az antioxidáns enzimek, pl. kataláz, GR, GPx aktivitásának változását vizsgálva megállapítható, hogy az autolíziskor valószínűleg GSH-független, míg a csírázáskor GSH-függő enzimrendszerek játszottak főszerepet a keletkező oxidatív stressz kivédésében. Az antioxidáns enzimek aktivitását szintén több tényező befolyásolhatta *P. chrysogenum*-ban. Például a GPx-t az intracelluláris peroxid szintek regulálták (Emri *et al.*, 1997, 1999a), valamint a szénéhezés és -pótlás befolyásolta (40. Ábra); a GR pedig minden oxidatív jellegű stresszre reagált (Emri *et al.*, 1997, 1998, 1999a), GSH/GSSG redox változásokra éppúgy (Emri *et al.*, 1997, 1999a), mint a szénforrás minőségére, limitációjára és újbóli megjelenésére a tápközegben (Emri *et al.*, 1999b; 40. Ábra). Meglepő módon, a kataláz aktivitásokat egyedül a szénéhezés, a SOD aktivitásokat pedig csak az intracelluláris szuperoxid szintek befolyásolták (Emri *et al.*, 1997, 1999a; 40/A. és 40/B. Ábra). Érdeemes megjegyezni, hogy amikor a *S. cerevisiae* sejtek elérték a késő exponenciális vagy stacioner fázist, illetve szén-limitációnak voltak kitéve, megfigyelések szerint egész sor antioxidáns enzim indukálódott (Jamieson, 1998), többek között a GR (Grant *et al.*, 1996) és mangán-SOD (Flattery-O'Brien *et al.*, 1997). Az élesztők citoszolikus kataláza – más típusú stresszek mellett – szintén éhezésszabályozott (Jamieson, 1998). Ezzel összhangban a kataláz és SOD aktivitások átmeneti növekedését figyelték meg kései stacioner fázisú *A. niger* B1-D tenyészetekben (Kreiner *et al.*, 2000, 2003), ami jelezhetett egy autolízist megelőző, átmeneti hiperoxidáns állapotot (Hansberg & Aguirre, 1990). Ezzel szemben azonban, az intracelluláris ROS és GSSG szintek csakúgy, mint a legtöbb általunk vizsgált antioxidatív enzim aktivitása, a *P. chrysogenum* tenyészetek exponenciális és decelerációs fázisaiban voltak a legmagasabbak, és az autolízist ebben az esetben nem előzte meg hiperoxidáns állapot. Következésképp annak a valószínűsége, hogy a ROS mediálta szignál-transzdukció szerepet játszott volna az autolízis megindításában, ebben az esetben igen csekély. Mindazonáltal, ezen megfigyelések semmiképp nem zárják ki az autolízis és az apoptózis közti valós fiziológiai analógia lehetőségét (McIntyre *et al.*, 1999), mivel ismeretes, hogy a magasabbrendű eukariótákban egy oxidatív stressz-független apoptotikus útvonal is létezik az oxidatív sérülések indukálta mitokondriális út mellett (Coppola & Ghibelli, 2000).

Összefoglalva a fentieket, a *P. chrysogenum* tenyészetekben a GSH metabolizmust és a ROS képződését számos külső és belső faktor befolyásolhatta az

inkubáció során. A rendszer szabályozottságának összetettsége magyarázatul szolgálhat arra, miért csak bizonyos limitációkkal volt érvényes a dioxigén kizárási elmélet, hogy összefüggő, koherens magyarázatot adjon a vizsgált törzsben megfigyelt differenciálódási és fiziológiai változásokra (3. Táblázat).

Tenyészet fázisa	Pre-autolitikus fázis		Autolízis		Autolizált, glükóz-pótlás után	
	Várt	Kapott	Várt	Kapott	Várt	Kapott
I. GSH/GSSG	+*	-	?	+	+*	-
II. ROS	+*	-	?	+	+	+
III. Enzimek	+	+	?	-	+	+

3. Táblázat. A Hansberg-féle dioxigén kizárási elmélet és kísérleti eredményeink összevetése. Jelmagyarázat: I. A GSH/GSSG arány csökkenése (38. Ábra); II. Intracelluláris ROS akkumuláció (39. Ábra); III. Antioxidáns enzimek aktiválódása (40. Ábra). A „*” jelzi, hol nem volt egyezés az elmélet és a megfigyelt jelenségek között.

6.4. A GOX és légzés-aktivitások változásai

Ismeretes, hogy a két fő ROS generáló metabolikus útvonal *P. chrysogenum*-ban a glükóz GOX általi direkt oxidációja, valamint a NAD⁺ és FAD koenzimek citokróm-függő, (ciánnal igen hatásosan blokkolható) regenerációja a mitokondriális légzési láncon keresztül. Az utóbbi folyamatot a sejt az ún. cianid-rezisztens, vagy alternatív oxidázai (AOX) segítségével kiválthatja, illetve csökkentheti; ekkor ugyanis a légzés során nem keletkezik ROS. Ezért – a szabadgyök-képződés tendenciájának ismeretében – megvizsgáltam a *P. chrysogenum* tenyészetek GOX és AOX aktivitásainak, valamint légzés-intenzitásának változását az inkubáció és a szénforrás függvényében (41-43. Ábrák).

Az exponenciálisan növekvő *P. chrysogenum* tenyészetekben nagy GOX aktivitás és az enzim aktív szekréciója volt megfigyelhető (41. Ábra); ennek következményeként effektív glükóz→glükonát konverzió folyt (42. Ábra). Bár a *P.*

chrysogenum potens GOX termelő mikroorganizmusként ismert (Eriksson *et al.*, 1987), és 60 % glükóz→glükonát konverziós arányokat is leírtak definiált táptalajon (Nielsen *et al.*, 1994; Nielsen, 1995), tudomásunk szerint ez az első olyan eredmény, ami szignifikáns glükonát keletkezést igazolt kukoricalekvárt tartalmazó komplex táptalajon. Míg az enzim a legfontosabb ipari GOX termelő *A. niger* törzsekben főleg a sejt falban lokalizálódik, illetve ahhoz kapcsolódik, (Witteveen *et al.*, 1992) az általunk vizsgált *P. chrysogenum* GOX túlnyomó többségben szolubilis (akár extracelluláris, akár intracelluláris) formában volt jelen, és az aktivitás csupán elenyésző hányada származott a sejt fal-kötött enzimtől (41/B. Ábra). A szolubilis enzimek lokalizációja (esetleges kompartmentalizációja) egyelőre nem ismert, de feltételezhetően főként a periplazmikus térben akkumulálódtak (Nielsen, 1995).

A korábbi megfigyelésekkel összhangban (Nielsen *et al.*, 1994), a glükonát addig nem kezdett metabolizálódni, míg az összes glükóz el nem fogyott a tápközegből (42. Ábra). Ezt követően azonban igen gyorsan hasznosult (18→0,9 mM, azaz 95% a 28-36. óra között). A GOX aktivitások eredményeként a maximális glükonát koncentráció az extracelluláris térben elérte a 18 mM-t (az elméletileg lehetséges érték 34,6 %-át), ami azt jelenti, hogy a glükóz-fogyasztás által generált legnagyobb lehetséges extracelluláris H₂O₂ koncentrációt is ennyire (18 mM) lehet becsülni. Bár az exponenciális fázisú *P. chrysogenum* tenyészetek – intenzív kataláz-termelésüknek köszönhetően – a H₂O₂-t kivételesen jól (egészen 700 mM-ig) tolerálták (Emri *et al.*, 1997), sajnos nincs megbízható információnk a lag, illetve korai exponenciális fázisú micéliumok oxidatív stressz iránti toleranciájáról, mivel a 24 óránál fiatalabb tenyészetekről reprodukálható fiziológiai adatok szerzése nem elhanyagolható nehézségekbe ütközött. Ugyanakkor elmondható, hogy a későbbi, exponenciális fázisban (24-28. óra) megfigyelt nagy (vagy növekvő) antioxidatív enzimaktivitások (kataláz, GR, GPx) nagy valószínűség szerint a GOX működése során előzetesen keletkezett H₂O₂ okozta oxidatív stressz következményei voltak. Az antioxidatív enzimek indukciója a korai exponenciális fázisban kielégítő magyarázattal szolgálhat a *P. chrysogenum* micéliumok késő exponenciális fázisban megfigyelt figyelemreméltó oxidatív stressztűrésére (Emri *et al.*, 1997, 1999).

Érdeemes megemlíteni, hogy a H₂O₂ igazoltan kiemelkedő szerepet játszik az *A. niger* glükóz oxidáló rendszerének (GOX, laktonázok és katalázok; Witteveen *et al.*, 1993) aktiválásában és a cianid-rezisztens légzés stimulálásában (Karaffa *et al.*, 2001). Ez utóbbi szintén fontos szerepet játszhat a gombák antioxidatív védekezésében, hiszen a citokróm-út kikerülésével akadályozhatja a ROS felhalmozódást a metabolikusan aktív

mitokondriumokban (Galiazzo *et al.*, 1994; Karaffa *et al.*, 2001) – különösen mikor a sejtek teljes légzési rátája nagy (43. Ábra). A specifikus AOX korfüggő aktivációja a kriptikus növekedésű *P. chrysogenum*-ban emlékeztet a szeneszenciát mutató *Podospora anserina* kultúrákban megfigyelt változásokra, ahol a citokróm C függő útvonalat az alternatív légzés váltotta fel (Frese & Stahl, 1992).

Meglepő módon, a glükóz-pótlást követő ROS halmozódás az autolizáló tenyészetekben nem (vagy csak kis részben) volt a GOX aktivitásoknak tulajdonítható; ezt jelezték az elhanyagolható enzimaktivitások (41. Ábra) és az igen kicsi glükóz→glükonát átalakulási arányok (42. Ábra). Ilyen körülmények között a széteső, részben dezorganizált membrán-szerkezetű mitokondriumok (Trinci & Righelato, 1970) lehetnek a legvalószínűbb forrásai a halmozódó ROS-nak (Dufour *et al.*, 2000; Karaffa *et al.*, 2001). A mitokondriumok csökkent működését tisztán jelezték a szignifikánsan kisebb (a 133. óra után már csak ~25 %) teljes légzési ráták glükóz-pótlást követően (43. Ábra). Ekkor a növekvő arányú cián-rezisztens légzés (Lorin *et al.*, 2001) és a növekvő GPx és GR, valamint a SOD aktivitások lehetnek az oxidatív stressz elleni védelem legfontosabb elemei. Az intracelluláris ROS akkumuláció, a csökkenő mitokondriális funkciók és sejt-vitalitás, valamint a túlélő képletek csökkenő képessége, hogy glükóz-pótlást követően vegetatív növekedésre váltsanak (Pusztahelyi *et al.*, 1997a) jó egyezést mutattak a dioxién kizárási elmélet feltételezéseivel (Hansberg *et al.*, 1990; Harman, 1993).

Lényeges hangsúlyozni, hogy bár az intracelluláris peroxid szintek nagyok voltak és a glükóz jelen volt a tápközegben, sem a GOX, sem a kataláz aktivitások nem indukálódtak glükóz-pótlást követően (39-41. Ábrák). Ebből arra következtettünk, hogy *P. chrysogenum*-ban a glükóz oxidáló rendszer szinkronizált regulációja (aktivizálása) glükóz és H₂O₂ jelenlétében valószínűleg kor-függő. Annak a lehetőségét is fontolóra vettük, hogy a tápközeg glükóz-pótlást követő pH-csökkenése (Pusztahelyi *et al.*, 1997a; 16. Ábra) esetleg inaktíválhatta a GOX enzimeket, ahogy arról *A. niger* tenyészeteknél pH < 3,5 esetében beszámoltak (Mischak *et al.*, 1985; Roukas & Harvey, 1988). Az általunk vizsgált törzsnél glükóz adagolást követően a fermentlé pH-ja minden esetben átmenetileg 4,2-4,5 értékre esett (Pusztahelyi *et al.*, 1997a; 16. Ábra); ugyanakkor irodalmi adatok szerint a GOX stabilitását még a pH=3,5-ös érték sem befolyásolta lényegesen (Eriksson *et al.*, 1987). A fentiek alapján a GOX savas pH általi inaktivációja ebben az esetben nem tűnt valószínűnek.

Hasonlóan a száraztömeg és az extracelluláris pH értékeihez, az NH₃ és aminos-nitrogén koncentrációkhoz, extracelluláris kitináz és HexAm, valamint az intracelluláris

GPx, GR és kataláz aktivitásokhoz, a teljes légzési ráta szintén konstans értéket ért el a kriitikus növekedési fázis beállta előtt (43. Ábra; Pusztahelyi *et al.*, 1997a, 1997b). Ezt a dinamikus poszt-autolítikus fázist *P. chrysogenum*-ban a sejthalál és növekedés között kialakuló új egyensúlyi állapot, a ROS intracelluláris akkumulációja (39. Ábra), növekvő SOD aktivitások (40/B. Ábra), csökkenő sejt-vitalitás és emelkedő intenzitású/arányú cianid-rezisztens légzés (43. Ábra) jellemezte. A túlélő képletekben megfigyelt eme fiziológiai változások nagymértékű hasonlóságot mutattak az öregedő stacioner fázisú *S. cerevisiae* tenyészetekével (Jakubowski *et al.*, 2000) és az élesztő-anyasejtek apoptózishoz vezető, sejtspecifikus öregedési folyamataival (Nestelbacher *et al.*, 2000; Laun *et al.*, 2001).

Hasonlóan a magasabbrendű eukarióták programozott sejthalál folyamataihoz (Skulachev, 2001), a mitokondriális dezorganizáció a fonalas gombák öregedő tenyészeiben is kiválthat hasonló sejtelhalást (Trinci & Righelato, 1970). Mikor a ROS koncentrációk – az emelkedő SOD aktivitás és cianid-rezisztens légzés (43. Ábra) ellenére – tovább növekedtek a sejtekben, az egyetlen fennmaradó lehetséges megoldás a sejtek számára a mitokondriumok eliminációja (a mitoptózis), és ennek következményeként a légzés csökkentése, illetve leállítása lehetett (Skulachev, 2001; 43. Ábra). Azaz, a súlyosan károsodott mitokondriális funkciójú sejtek – a Biológia “Szamuráj-Törvényének” engedelmessé válva – bizonyos értelemben öngyilkosságot követtek el (Skulachev, 2000, 2001). Elképzelhető, hogy a gombák mitoptotikus folyamatai olyan szignál-proteineket szabadítanak fel, melyek aztán aktiválhatják a sejthalál programokat (Skulachev, 2001). Ennek igazolására azonban további bizonyítékokra van szükség. A vizsgált törzsnél megfigyelt intracelluláris ROS akkumuláció, a csökkenő mitokondriális funkciók és sejt-vitalitás (a vegetatív növekedésre váltás időben csökkenő képessége), illetve növekvő cianid-rezisztens légzés, jó egyezést mutattak az öregedés szabadgyökös elméletével (Harman, 1993). Ezen jelenségek leírására ezért joggal alkalmazhattuk az „öregedés” kifejezést.

Összefoglalva a fentieket elmondható, hogy – a stacioner fázisú hifákkal ellentétben – a *P. chrysogenum* túlélő “élesztőszerű” képleteinél könnyen lehetséges, hogy oxidatív stressz-indukált apoptózis zajlott, ezáltal ideális szervezetekként szolgálhatnak a további gomba-öregedési kutatásokhoz.

6.5. A GSH-függő detoxifikáció kihasználásának lehetőségei az ipari β -laktám termelésben

A *P. chrysogenum* citoszolikus és mikroszomális GST enzimei fontos szerepet játszanak a szuperoxid-generáló menadion (2-metil-1,4-nafto-kinon; Emri *et al.*, 1999a; Żadziński *et al.*, 1998), a CDNB (a GST egyik inducere; Emri *et al.*, 1997a) és a penicillin oldallánc-prekurzorok (Emri *et al.*, 1997a, 2000, 2001) detoxifikációjában. Az általunk vizsgált törzsből a teljes GST aktivitás megközelítőleg 75 %-áért a mikroszomális GST (mGST) volt a felelős, és egyedül ez az enzim indukálódott POA jelenlétében (Emri *et al.*, 2003). Bár az mGST számára szolgáló szubsztrátok jó része továbbra is hipotetikus (epoxidok és nem-specifikusan hidroxileződött, GSH-konjugált toxikus intermedierek; Emri *et al.*, 2000, 2001; Monks *et al.*, 1990; 12. Ábra), fed-batch fermentációkkal teszteltem annak a lehetőségét, hogy a POA GSH-függő detoxifikációjával az intracelluláris GSH szintek alacsonyan tarthatóak-e (Emri *et al.*, 2000); hiszen ez igen kedvezően befolyásolhatná a penicillin-termelést (Van de Kamp *et al.*, 1999; 14. Ábra). A vártak megfelelően, válaszként a sejtekben növekvő POA koncentrációkra és influxra, mind a GST, mind a γ GT aktivitások jelentősen növekedtek (Jaspers & Penninckx, 1984; 45/B. és 45/C. Ábra). Az intracelluláris GSH szintek azonban nem csökkentek szignifikánsan, hacsak az extracelluláris pH nem esett 5,0 alá (44/C. Ábra).

Mikor a β -laktám termelő *P. chrysogenum* NCAIM 00237 törzs tenyészeit komplex tápközegben való felnevelése után definiált táptalajra mostuk át, ami nitrogénforrásként 10 g/l Na-glutamátot tartalmazott, a sejtek GSH tartalma – a médium pufferkapacitásától függően – szignifikánsan csökkent (Emri *et al.*, 1997, 2000). A Na-glutamát helyett a fermentációk során N-forrásként használt 10 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ valószínűleg jelentősen gátolta a γ GT aktivitás POA általi indukcióját (Emri *et al.*, 1997).

A fungális γ GT számos GSH-függő detoxifikációban és vakuoláris transzport-folyamatban vesz részt (Penninckx *et al.*, 1980; Penninckx & Elskens, 1993; Emri *et al.*, 1998; Mehdi *et al.*, 2001). A GSH katabolizmus ezen kulcsenzimének nitrogén-repressziója valószínűleg döntő fontosságú volt a nagy intracelluláris GSH koncentrációk fenntartásában POA jelenlétében (Schwartz *et al.*, 1988; Emri *et al.*, 1997; Pócsi *et al.*, 2001). A GSH szintek stabilizálásához hozzájárulhatott továbbá a viszonylag nehezebben hasznosuló szénforrás is. Korábbi megfigyelések szerint ugyanis például laktóz jelenlétében mindig nagyobb volt a sejtek GSH koncentrációja (Emri *et*

al., 1998). A fed-batch tenyészetekben a γ GT $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ általi nitrogén repressziója megszűnt és a GSH tartalékok gyorsan kimerültek $\text{pH} < 5.0$ értékeken 0,5 % POA jelenlétében (44/C. és 45/C. Ábrák). A felvett cukrot azonban ilyen körülmények között valószínűleg főleg arra fordította a sejt, hogy a nagy mennyiségben keletkező ROS ellen próbáljon védekezni, és kijavítsa az oxidatív károkat (Emri *et al.*, 1999b, 2000) az antibiotikum-termelés (45/A. Ábra), vagy biomassza-gyarapodás (44/A. Ábra) támogatása helyett. Ám a sejtek ezen erőfeszítése is elégtelennek bizonyult az intenzív, pár óra alatt gyakorlatilag teljessé váló sejtpusztulás kivédésére.

Ezen nemkívánt változások elkerülésére a kísérleti pH tartomány rendkívül szűknek mutatkozott, ami – figyelembe véve a nagy volumenű fermentorok reológiai sajátosságait – leküzdhetetlen gyakorlati akadályokat támaszthat. A tápközeg nitrogénforrásának megváltoztatása természetesen gazdaságilag nem volna kifizetődő. Nyitva maradt ugyan a nagyobb oldallánc-prekurzor koncentrációkkal kombinált, kisebb mértékű pH csökkentés lehetősége. Azonban – a POA toxicitásának ismeretében (Emri *et al.*, 1999; Eriksen *et al.*, 1995) ezzel a megközelítéssel szintén komoly akadályokba ütközhetünk. Mindezeket figyelembe véve, az oldallánc-prekurzorok GSH függő detoxifikációs mechanizmusának kihasználhatósága, illetve kivitelezhetősége az ipari méretű penicillintermelésben nem tűnik valószínűnek.

7. EREDMÉNYEIM ÖSSZEFOGLALÁSA

- *In vivo* enzim-gátlással igazoltam, hogy a szénlimitált, öregedő *P. chrysogenum* tenyészetekben a kor-függő kitinázok jelentős szerepet játszhattak a gomba autolízisében és fragmentációjában. Az allózamidin nemcsak a pelletek szétesését és az autolízist késleltette, de megakadályozta a túlélő képletek glükózpótlást követő újracsírázását is.
- A kitináz-inhibitor jelenlétében a sejtek kitintartalma nőtt, metabolikus aktivitása és vitalitása pedig változatlan maradt. Az allózamidin antifungális hatása az autolizáló *P. chrysogenum* tenyészetekre fungisztikus volt, nem pedig fungicid.
- Az exponenciálisan növekvő és öregedő tenyészetek eltérő allózamidin-érzékenységgel rendelkeztek, ami korral változó (állapotú és lokalizációjú) kitinolitikus enzim(ek) jelenlétére utalhat.
- Feltérképeztem az öregedő tenyészetek redox státuszának, és GSH anyagcseréjének változásait. A különböző növekedési fázisok alatt mind a glutation metabolizmust, mind a reaktív oxigén formák (ROS) képződését számos endogén és exogén faktor befolyásolhatta. A dioxién kizárási elmélet ezért csak korlátozottan volt érvényes a vizsgált törzs esetében, és nem lehetett szilárd, egyértelmű ok-okozati kapcsolatba hozni a tenyészetekben megfigyelt redox állapotokat, ROS szinteket és morfológiai változásokat.
- A *P. chrysogenum* exponenciális növekedési fázisát intenzív légzés, magas intracelluláris ROS szintek és jelentős antioxidatív enzim-aktivitások jellemezték. A képződő szabadgyökök fő forrása ekkor a légzés mellett a GOX aktivitása lehetett. Az öregedő, glükóz-pótolttal tenyészetekben az intracelluláris ROS emelkedése viszont főként a citokróm-függő mitokondriális légzésnek volt tulajdonítható. A GOX és kataláz aktivitások indukálhatósága kor-függőnek mutatkozott.
- Az exponenciális fázisban a magas kataláz, GR és GPx aktivitások, az öreg, kriptikus növekedési fázisú tenyészetekben pedig a SOD és cianid-rezisztens légzés voltak az antioxidatív védelem fő elemei.
- A *P. chrysogenum* poszt-autolitikus tenészeiben megfigyelt, Harman szabadgyökös öregedési elméletével („Free radical theory of ageing”) jó egyezést mutató jelenségek alapján elsőként használtuk ezen folyamatokra az „öregedés” fogalmát.
- Ipari méretű fermentációkban a sejten belüli GSH-készlet csökkentése, és ezáltal a β -laktám szintézis fokozása a penicillin-prekurzor POA glutation-függő detoxifikációja révén gyakorlatilag kivitelezhetetlennek tűnt.

8. IRODALMI HIVATKOZÁSOK

- Agger, T., Spohr, A.B., Carlsen, M., Nielsen, J. (1998) Growth and product formation of *Aspergillus oryzae* during submerged cultivations: verification of a morphologically structured model using fluorescent probes. *Biotechnol. Bioeng.*, **57**, 321–329.
- Alfonso, C., Martinez, M. J., and Reyes, F. (1991) Degradation of chitosan in the autolysis of *Mucorales* spp. *Mycol. Res.*, **95**, 217–219.
- Alfonso, C., Martinez M. J., and Reyes, F. (1992) Purification and properties of two endochitinases from *Mucor rouxii* implicated in its cell wall degradation. *FEMS Microbiol. Lett.*, **95**, 187–194.
- Alfonso, C., Santamaria, F., Nuero, O. M., Prieto, A., Leal, J. A., Reyes, F. (1995) Biochemical studies on the cell wall degradation of *Fusarium oxysporum* f.sp. lycopersici race 2 by its own lytic enzymes for its biocontrol, *Lett. Appl. Microbiol.*, **20**, 105–109.
- Anderson, M. E. (1985) Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. *Methods Enzymol.*, **113**, 548-555.
- Archer, D.B., MacKenzie, D.A., Jeenes, D.J., Roberts, I.N. (1992) Proteolytic degradation of heterologous proteins expressed in *Aspergillus niger*. *Biotechnol. Lett.*, **14**, 357-362.
- Bainbridge, B.W., Bull, A.T., Pirt, S.J., Rowley, B.I., Trinci, A.P.J. (1971) Biochemical and structural changes in non-growing maintained and autolysing cultures of *Aspergillus nidulans*. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, **56**, 371–385.
- Bainbridge, Z.A., Scott, R.I., Perry, D. (1992) Oxygen utilisation by isopenicillin N synthase from *P. chrysogenum*. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* **55**, 233-238.
- Barnicki-García, S. (1973) Fundamental aspects of hyphal morphogenesis. In *Microbial Differentiation*, ed. by Ashworth, J. M. and Smith, J. E., Cambridge University Press, Cambridge, pp. 245-267.
- Barnicki-García, S. (1999) Glucans, walls, and morphogenesis: On the contributions of J. G. H. Wessels to the golden decades of fungal physiology and beyond. *Fungal Genet. Biol.*, **27**, 119-127.
- Bartoshevich, Y.E. and Zaslavskaya, P.L. (1984) Morphological and functional characteristics of the growth of *Fusidium coccineum* strains with different antibiotic activity during their submerged cultivation. *Mikrobiologiya*, **53**, 266-270.
- Bartoshevich, Yu. E., Zaslavskaya, P.L., Novak, M.J., Yudina, O.D. (1990) *Acremonium chrysogenum* differentiation and biosynthesis of cephalosporin. *J. Basic Microbiol.*, **30**, 313-320.
- Bocking, S.P., Wiebe, M.G., Robson, G.D., Hansen, K., Christiansen, L.H., Trinci, A.P.J. (1999) Effect of branch frequency in *Aspergillus oryzae* on protein secretion and culture viscosity. *Biotechnol. Bioeng.*, **65**, 638-648.
- Brameld, K. A., Shrader, W. D., Imperiali, B., and Goddard, W. A. III. (1998) Substrate assistance in the mechanism of family 18 chitinases: Theoretical studies of potential intermediates and inhibitors. *J. Mol. Biol.*, **280**, 913–923.
- Cabib, E. (1987) The synthesis and degradation of chitin. *Adv. Enzymol.*, **59**, 59–101.
- Cabib, E., Silverman, S. J. and Shaw, J. A. (1992) Chitinase and chitin synthase 1: counterbalancing activities in cell separation of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.*, **138**, 97-102.

- Cannon, R.D., Timberlake, W.E., Gow, N.A.R., Bailey, D., Brown, A., Gooday, G.W., Hube, B., Monod, D., Nombela, C., Navarro, F., Perez, R., Sanchez, M., Pla, J. (1994) Molecular and biochemical aspects of fungal dimorphism. *J. Med. Vet. Mycol.*, **32**, 53-64.
- Carter, W.O., Narayanan, P.K. and Robinson, J.P. (1994) Intracellular hydrogen peroxide and superoxide anion detection in endothelial cells. *J. Leukoc. Biol.*, **55**, 253-258.
- Cheeseman, K.H. and Slater, T.F. (1993) An introduction to free radical biochemistry. *Br. Med. Bull.*, **49**, 481-493.
- Chiu, D.T.Y., Stults, F.H., Tappel, A.L. (1976) Purification and properties of rat lung soluble glutathione peroxidase. *Biochem. Biophys. Acta* **445**, 558-566.
- Christensen, L.H., Henriksen, C.M., Nielsen, J., Villadsen, J., Egel-Mitani, M. (1995) Continuous cultivation of *Penicillium chrysogenum*. Growth on glucose and penicillin production. *J. Biotechnol.*, **42**, 95-107.
- Chrzanowska, J., Kolaczowska, M., and Polanowski, A. (1993) Production of extracellular proteolytic enzymes by various species of *Penicillium*. *Enzyme Microb. Technol.*, **15**, 140-143.
- Cohen, B. L. (1973) Regulation of intracellular and extracellular neutral and alkaline proteases in *Aspergillus nidulans*. *J. Gen. Micro.*, **79**, 311-320.
- Cohen, B. L., Morris, J. E. and Drucker, H. (1975) Regulation of two extracellular proteases of *Neurospora crassa* by induction and by carbon-, nitrogen- and sulfur-metabolite repression. *Arch. Biochem. Biophys.*, **169**, 324-330.
- Cohen, B.E. (1998) Amphotericin B toxicity and lethality: a tale of two channels. *Int. J. Pharmaceutics*, **162**, 95-106.
- Cooper, C. R. and Haycocks, N. G. (2000) *Penicillium marneffei*: an insurgent species among the penicillia. *J. Eukar. Microbiol.*, **47**, 24-28.
- Coppola, S. & Ghibelli, L. (2000) GSH extrusion and the mitochondrial pathway of apoptotic signalling. *Biochemical. Soc. Trans.*, **28**, 56-61.
- Cox, P.W., Paul, G.C., and Thomas, C.R. (1998) Image analysis of the morphology of filamentous microorganisms. *Microbiology*, **144**, 817-827.
- Cui, Y.Q., Van der Lans, R.G.J.M., and Luyben, K.C.A.M. (1998) Effects of dissolved oxygen tension and mechanical forces on fungal morphology in submerged fermentation. *Biotechnol. Bioeng.*, **57**, 409-419.
- Davis, W., Ronai, Z. and Tew, K.D. (2001) Cellular thiols and reactive oxygen species in drug-induced apoptosis. *J. Pharm. Experim. Therap.*, **296**, 1-6.
- Deacon, J.W. (1997) pp 29-46. In *Modern Mycology*, Blackwell Science, Oxford.
- De la Cruz, J., Hidalgo-Gallego, A., Lora, J.M., Benítez, T., Pintor-Toro, J.A., Llobell, A. (1992) Isolation and characterization of three chitinases from *Trichoderma harzianum*. *Eur. J. Biochem.*, **159**, 316-322.
- Den Tandt, W.R. and Scharpé, R. (1997) Plasma methylumbelliferyl-tetra-N-acetyl-chitotetraoside hydrolase: further study of its characteristics as a chitinase and comparison with its activity on Remazol Brilliant Violet carboxymethyl chitin. *Clin. Chim. Acta*, **268**, 107-120.
- Dickinson, K., Keer, V., Hitchcock, C. A. and Adams, D. J. (1989) Chitinase activity from *Candida albicans* and its inhibition by allosamidin. *J. Gen. Microbiol.*, **135**, 1417-1421.

- Dickinson, K., Keer, V., Hitchcock, C. A. and Adams, D. J. (1991) Microsomal chitinase activity from *Candida albicans*. *Biochim. Biophys. Acta*, **1073**, 177-182.
- Diez, B., Schleissner, C., Moreno, M.A., Rodriguez, M., Collados, A., Barredo, J.L. (1998) The manganese superoxide dismutase from the penicillin producer *Penicillium chrysogenum*. *Curr. Genet.* **33**, 387-394.
- Dufour E, Boulay J, Rincheval V & Sainsard-Chanet A (2000) A causal link between respiration and senescence in *Podospora anserina*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 4138-4143.
- Elskens, M.T., Jaspers, C.J., Penninckx, M.J. (1991) Glutathione as an endogenous sulphur source in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.*, **137**, 637-644.
- Emri, T., Pócsi, I. and Szentirmai, A. (1997a) Glutathione metabolism and protection against oxidative stress caused by peroxides in *Penicillium chrysogenum*. *Free Rad. Biol. Med.*, **23**, 809-814.
- Emri, T., Pócsi, I. and Szentirmai, A. (1997b) Phenoxyacetic acid induces glutathione-dependent detoxification and depletes the glutathione pool in *Penicillium chrysogenum*. *J. Basic Microbiol.*, **37**, 181-186.
- Emri, T., Pócsi, I. and Szentirmai, A. (1998) Changes in the glutathione (GSH) metabolism of *Penicillium chrysogenum* grown on different nitrogen, sulphur and carbon sources. *J. Basic Microbiol.* **38**, 3-8.
- Emri, T., Pócsi, I. and Szentirmai, A. (1999) Analysis of the oxidative stress response of *Penicillium chrysogenum* to menadione. *Free Rad. Res.*, **30**, 125-132.
- Emri, T., Leiter, É., Pócsi, I. (2000) Effect of phenoxyacetic acid on the glutathione metabolism of *Penicillium chrysogenum*. *J. Basic Microbiol.* **40**, 93-104.
- Emri, T., Leiter, É., Farkas, E., Pócsi, I. (2001) Penicillin productivity and glutathione-dependent detoxification of phenylacetic and phenoxyacetic acids in *Penicillium chrysogenum*. *J. Basic Microbiol.* **41**, 67-73.
- Eriksen, S.H., Jensen, B., Schneider, I., Kaasgaard, S., Olsen, J. (1995) Uptake of phenoxyacetic acid by *Penicillium chrysogenum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **42**, 945-950.
- Eriksson K.O., Kourteva I., Yao K.Q., Liao J.L., Kilar F., Hjerten S., Chaga G. (1987) Application of high-performance chromatographic and electrophoretic methods to the purification and characterization of glucose oxidase and catalase from *Penicillium chrysogenum*. *J. Chromatogr.* **397**, 239-249.
- Escott, G. M. and Adams, D. J. (1995) Chitinase activity in human serum and leukocytes. *Infect. Immun.*, **63**, 4770-4773.
- Escott, G. M., Hearn, V. M. and Adams, D. J. (1998) Inducible chitinolytic system of *Aspergillus fumigatus*. *Microbiology*, **144**, 1575-1581.
- Esteve, J. M., Mompo, J., Garcia de la Asuncion, J., Sastre, J., Asensi, M., Boix, J., Viña, J. R., Viña, J. & Pallardó, F. V. (1999) Oxidative damage to mitochondrial DNA and glutathione oxidation in apoptosis: studies *in vivo* and *in vitro*. *The FASEB Journal* **13**, 1055-1064.
- Flattery-O'Brien, J. A., Grant, C. M. & Dawes, I. W. (1997) Stationary-phase regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* *SOD2* gene is dependent on additive effects of HAP2/3/4/5- and STRE-binding elements. *Molecular Microbiology* **23**, 303-312.
- Frese, D. and Stahl, U. (1992) Oxidative stress and ageing in the fungus *Podospora anserina*. *Mech. Ageing Dev.*, **65**, 277-288.

- Fröhlich, K.-U. & Madeo, F. (2000) Apoptosis in yeast - a monocellular organism exhibits altruistic behaviour. *FEBS Letters* **473**, 6-9.
- Galiazzo F., Carri M.T., Ciriolo M.R. and Rotilio G. (1994) Superoxide dismutases in *Saccharomyces cerevisiae*, pp. 361-390 in G. Winkelmann, D.R. Winge (Eds): *Metal Ions in Fungi*. Marcel Dekker, New York 1994.
- Gamaley, I.A. & Klyubin, I.V. (1999) Roles of reactive oxygen species: Signaling and regulation of cellular functions. *Int. Rev. Cytol.*, **188**, 203-238.
- Gasch, A.P., Spellman, P.T., Kao, C.M., Carmel-Harel, O., Eisen, M.B., Storz, G., Botstein, D., Brown, P.O. (2000) Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol. Biol. Cell*, **11**, 4241-4257.
- Gooday, G.W., Humphreys, A. M. and McIntosh, W. H. (1986) Roles of chitinases in fungal growth. in Chitin in Nature and Technology, ed. by Muzzarelli, R. A. A., Jeuniaux, C. and Gooday, G. W., Plenum Press, New York, pp. 83-91.
- Gooday, G.W. (1989) Chitin metabolism as a target for antifungal and antiparasitic drugs and agrochemicals. In Bioactive Metabolites from Microorganisms, ed. by Bushell, M. E. and Gräfe, U., Elsevier, Amsterdam , pp.139-150.
- Gooday, W. G. (1990) Physiology of microbial degradation of chitin and chitosan. *Biodegradation*, **1**, 177-190.
- Gooday, G.W., Zhu, W.-Y. and O'Donnell, R. W. (1992) What are the roles of chitinases in the growing fungus? *FEMS Microbiol. Lett.*, **100**, 387-392.
- Gooday, G.W. (1995a) The dynamics of hyphal growth. *Mycol. Res.*, **99**, 385-394.
- Gooday, G.W. (1995b) Cell walls. In: The Growing Fungus, Gow, N.A.R. and Gadd, G.M., Eds., Chapman and Hall, London, U.K., 1995, pp. 43-62.
- Gooday, G.W. (1997) The many use of chitinases in Nature. *Chitin Chitosan Res.*, **3**, 233-243.
- Gooday, G.W., Gow, N. A. R., Brown, A. J. P., Schofield, D., Munro, C., McCreath, K. and Hunter, L. (1997) Dynamics of chitin synthesis and breakdown in fungal walls. In Fungal Cells in Biodefense Mechanism, ed. by Suzuki, S. and Suzuki, M., Saiken Publishing Co., Tokyo, pp. 239-246.
- Gordon, L.J. and Lilly, W.W. (1995) Quantitative analysis of *Schizophyllum commune* metalloprotease ScPrB activity in SDS-gelatin page reveals differential mycelial localization of nitrogen limitation induced autolysis, *Curr. Microbiol.*, **30**, 337-343.
- Gow, N.A.R. (1995) Yeast-hyphal dimorphism. In: The Growing Fungus, Gow, N.A.R. & Gadd, G.M., Eds. Chapman and Hall, London, U.K., 1995, pp. 401-422.
- Grant, C.M., MacIver, F.H., Dawes, I.W. (1996) Glutathione is an essential metabolite required for resistance to oxidative stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* **29**, 511-515.
- Hansberg, W., Aguirre, J. (1990) Hyperoxidant states cause microbial cell differentiation by cell isolation from dioxygen. *J. Theor. Biol.*, **142**, 201-221.
- Hansberg, W., de Groot, H., Sies, H. (1993) Reactive oxygen species associated with cell differentiation in *Neurospora crassa*. *Free Rad. Biol. Med.* **14**, 287-293.
- Hansberg, W. (1996) A hyperoxidant state at the start of each developmental stage during *Neurospora crassa* conidiation. *C.C.J. Brazilian Association for Adv. Science*, **48**, 68-74.
- Harman, D. (1993) Free radical involvement in aging. *Drugs Aging*, **3**, 60-80
- Harman, D. (1999) Aging: minimizing free radical damage. *J. Anti-Aging Med.*, **2**, 15-36.

- Harvey, L. M., McNeil, B., Berry, D. R. and White, S. (1998) Autolysis in batch cultures of *Penicillium chrysogenum* at varying agitation rates. *Enzyme Microb. Technol.*, **22**, 446-458.
- Hearn, V. M., Escott, G. M., Evans, E. G. V. and Adams, D. J. (1997) Intracellular and wall-associated chitinases of *Aspergillus fumigatus*. In *Fungal Cells in Biodefense Mechanism*, ed. by Suzuki, S. and Suzuki, M., Saiken Publishing Co., Tokyo, pp. 247-252.
- Henriksen, C.M., Nielsen, J. and Villadsen, J. (1997) Influence of the dissolved oxygen concentration on the penicillin biosynthetic pathway in steady-state cultures of *Penicillium chrysogenum*. *Biotechnol. Prog.*, **13**, 776-782.
- Henriksen, C.M., Nielsen, J. and Villadsen, J. (1998a) Modelling of the protonophoric uncoupling by phenoxyacetic acid of the plasma membrane potential of *Penicillium chrysogenum*. *Biotechnol. Bioeng.* **60**, 761-767.
- Henriksen, C.M., Nielsen, J. and Villadsen, J. (1998b) High exogenous concentration of phenoxyacetic acid are crucial for a high penicillin V productivity in *Penicillium chrysogenum*. *Microbiology*, **144**, 2001-2006.
- Ho CS & Smith MD, 1986. Morphological alterations of *Penicillium chrysogenum* caused by carbon dioxide. *J Gen Microbiol*, **132**, 3479-3484.
- Hodge, A., Gooday, G. W. and Alexander, I. J. (1996) Inhibition of chitinolytic activities from tree species and associated fungi. *Phytochemistry*, **41**, 77-84.
- Horsch, M., Mayer, C., Sennhauser, U., Rast D.M. (1997) β -N-Acetylhexosaminidase: A target for the design of antifungal agents. *Pharmacol. Ther.* **76**, 187-218.
- Humphreys, A. M. and Gooday, G. W. (1984) Properties of chitinase activities from *Mucor mucedo*: evidence for a membrane-bound zymogenic form. *J. Gen. Microbiol.*, **130**, 1359-1366.
- Ishikawa, T. (1992) The ATP-dependent glutathione S-conjugate export pump. *Trends Biochem. Sci.*, **17**, 463-468.
- Izumida, H., Nishijima, M., Takadera, T., Nomoto, A. M. and Sano, H. (1995) The effect of chitinase inhibitors, cyclo(Arg-Pro) against cell separation of *Saccharomyces cerevisiae* and the morphological change of *Candida albicans*. *J. Antibiot.*, **49**, 829-831.
- Jakubowski W., Biliński T., Bartosz G. (2000) Oxidative stress during aging of stationary cultures of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Free Rad. Biol. Med.* **28**, 659-664.
- Jamieson, D.J., Stephen, D.W.S., Terrière, E.C. (1996) Analysis of the adaptive oxidative stress response of *Candida albicans*. *FEMS Microbiol. Lett.* **138**, 83-88.
- Jamieson, D. J. (1998) Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **14**, 1511-1527.
- Jaspers, C.J., Penninckx, M.J. (1984) Glutathione metabolism in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Evidence that γ -glutamyltranspeptidase is a vacuolar enzyme. *Biochimie* **66**, 71-74.
- Johansen, C.L., Coolen, L., and Hunik, J.H. (1998) Influence of morphology on product formation in *Aspergillus awamori* during submerged fermentations. *Biotechnol. Prog.*, **14**, 233-240.
- Ju, L.K., Ho, C.S. and Shanahan, J.F. (1991) Effects of carbon dioxide on the rheological behavior and oxygen transfer in submerged penicillin fermentations. *Biotechnol. Bioeng.*, **38**, 1223-1232.
- Jürgensen, C.W., Jacobsen, N.R., Emri, T., Eriksen, S.H., Pócsi, I. (2001) Glutathione metabolism and dimorphism in *Aureobasidium pullulans*. *J. Basic Microbiol.*, **41**, 131-137.

- Jüsten, P., Paul, G.C., Nienow, A.W., Thomas, C.R. (1998a) A mathematical model for agitation-induced fragmentation of *Penicillium chrysogenum*. *Bioprocess Eng.*, **18**, 7–16.
- Jüsten, P., Paul, G.C., Nienow, A.W., Thomas, C.R. (1998b) Dependence of *Penicillium chrysogenum* growth, morphology, vacuolation, and productivity in fed-batch fermentations on impeller type and agitation intensity. *Biotechnol. Bioeng.*, **59**, 762-775.
- Kane, D. J., Sarafian, T. A., Anton, R., Hahn, H., Gralla, E. B., Valentine, J. S., Ord, T., Bredesen, D. E. (1993) Bcl-2 inhibition of neural death: decreased generation of reactive oxygen species. *Science* **262**, 1274-1277.
- Karaffa, L., Sándor, E., Kozma, J., Szentirmai, A. (1996) Cephalosporin-C production, morphology and alternative respiration of *Acremonium chrysogenum* in glucose-limited chemostat. *Biotechnol. Lett.* **18**, 701-706.
- Karaffa, L., Sándor, E., Kozma, J., Kubicek, C.P., Szentirmai, A. (1999) The role of the alternative respiratory pathway in the stimulation of cephalosporin C formation by soybean oil in *Acremonium chrysogenum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **51**, 633-638.
- Karaffa, L., Váczy, K., Sándor, E., Biro, S., Szentirmai, A., Pócsi, I. (2001) Cyanide-resistant alternative respiration is strictly correlated to intracellular peroxide levels in *Acremonium chrysogenum*. *Free Rad. Res.* **34**, 405-416.
- Kevei, F. & Kucsera, J. (2002) Mikrobiológia I. (JATE Press, 2002) pp 216-229.
- King, R. (1998) Mathematical modeling of the morphology of *Streptomyces* species. *Adv. Biochem. Eng. Biotech.*, **60**, 95–123.
- Krabben, P. and Nielsen, J. (1998) Modeling the mycelium morphology of *Pencillium* species in submerged cultures. *Adv. Biochem. Eng. Biotech.*, **60**, 125–152.
- Kreiner, M., McNeil B., Harvey L.M. (2000) "Oxidative stress" response in submerged cultures of a recombinant *Aspergillus niger* (B1-D). *Biotechnol. Bioeng.* **70**, 662-669.
- Kreiner M, Harvey LM & McNeil B, (2003) Morphological and enzymatic responses of a recombinant *Aspergillus niger* to oxidative stressors in chemostat cultures. *J. Biotechnol.* **100**, 251-260.
- Kuranda, M. J. and Robbins, P. W. (1991) Chitinase is required for cell separation during growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, **266**, 19758-19767.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature*, **227**, 680-685.
- Lahoz, R., Reyes, F., and Perez-Leblic, M. I. (1976) Lytic enzymes in the autolysis of filamentous fungi. *Mycopathologia*, **60**, 45–49.
- Laun P., Pichova A., Madeo F., Fuchs J., Ellinger A., Kohlwein S., Dawes I., Fröhlich K.-U., Breitenbach M. (2001) Aged mother cells of *Saccharomyces cerevisiae* show markers of oxidative stress and apoptosis. *Mol. Microbiol.* **39**, 1166-1173.
- Leary, N.O., Pembroke, A., Duggan, P.F. (1992) Improving accuracy of glucose oxidase procedure for glucose determinations on discrete analyzers. *Clin. Chem.*, **38**, 298-302.
- Leith, K.M., Hazen, K.C. (1988) Paraquat induced thiol modulation of *Histoplasma capsulatum* morphogenesis. *Mycopathologia* **103**, 21-27.
- Ligr, M., Madeo, F., Fröhlich, E., Hilt, W., Fröhlich, K.-U. & Wolf, D.H. (1998) Mammalian Bax triggers apoptotic changes in yeast. *FEBS Letters* **438**, 61-65.

- Lledias, F., Rangel, P. & Hansberg, W. (1999) Singlet oxygen is part of a hyperoxidant state generated during spore germination. *Free Rad. Biol. Med.* **26**, 1396-1404.
- Lo, H., Köhler, J.R., DiDomenico, B., Loebenberg, D., Cacciapuoti, A., Fink, G.R. (1997) Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. *Cell*, **90**, 939-949.
- Lorin, S., Dufour, E., Boulay, J., Begel, O., Marsy, S., Sainsard-Chanet, A. (2001) Overexpression of the alternative oxidase restores senescence and fertility in a long-lived respiration-deficient mutant of *Podospora anserina*. *Mol. Microbiol.*, **42**, 1259-1267.
- Lorito, M. (1998) Chitinolytic enzymes and their genes. In: *Trichoderma and Gliocladium Vol 2 – Enzymes, biological control and commercial applications*. Editors: Harman, G.E. & Kubicek C.P. pp 73-100.
- Madeo, F., Fröhlich, E., Ligr, M., Grey, M., Sigrist, S.J., Wolf, D.H. & Fröhlich, K.U. (1999) Oxygen stress: a regulator of apoptosis in yeast. *J. Cell Biol.*, **145**, 757-767.
- Madeo, F., Engelhardt, S., Herker, E., Lehmann, N., Maldener, C., Proksch, A., Wissing, S., Fröhlich, K.U. (2002) Apoptosis in yeast: a new model system with applications in cell biology and medicine. *Curr. Genet.*, **41**, 208-216.
- Manavathu, E., Duncan, C., Porte, Q., Gunasekaran, M. (1996a) Inhibition of yeast-to mycelium conversion of *Candida albicans* by conjugated styryl ketones. *Mycopathologia* **135**, 79-83.
- Manavathu, M., Gunasekaran, S., Porte, Q., Manavathu, E., Gunasekaran, M. (1996b) Changes in glutathione metabolic enzymes during yeast-to-mycelium conversion of *Candida albicans*. *Can. J. Microbiol.*, **42**, 76-79.
- Manocha, M. S. and Balasubramanian, R. (1988) *In vitro* regulation of chitinase and chitin synthase activity of two mucoraceous host of a mycoparasite. *Can. J. Microbiol.*, **34**, 1116-1121.
- Maresca, B. and Kobayashi, G.S. (1989) Dimorphism in *Histoplasma capsulatum*: a model for the study of cell differentiation in pathogenic fungi. *Microbiol. Rev.* **53**, 186-209.
- Matsushita K., Shinagawa E., Adachi O., Ameyama M. (1979) Membrane-bound D-gluconate dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*. Its kinetic properties and a reconstitution of gluconate oxidase. *J. Biochem. (Tokyo)* **86**, 249-256.
- Mauss, P. (1997) Location of respiration activity in filamentous bacteria by Image Analysis. *Biotech. Techn.*, **11**, 813-817.
- McIntyre, M., Berry, D. R. and McNeil, B. (1999) Response of *Penicillium chrysogenum* to oxygen starvation in glucose- and nitrogen-limited chemostat cultures. *Enzyme Microb. Technol.*, **25**, 447-454.
- McIntyre, M., Berry, D. R. and McNeil, B. (2000) Role of proteases on autolysis of *Penicillium chrysogenum* chemostat cultures in response to nutrient depletion. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **53**, 235-242.
- McIntyre, M., Dynesen, J. and Nielsen, J. (2001) Morphological characterization of *Aspergillus nidulans*: growth, septation and fragmentation. *Microbiology*, **147**, 239-246.
- McNab, R. and Glover, L. A. (1991) Inhibition of *Neurospora crassa* cytosolic chitinase by allosamidin. *FEMS Microbiol. Lett.*, **82**, 79-82.
- McNeil, B., Berry, D.R., Harvey, L.M., Grant, A., White, S. (1998) Measurement of autolysis in submerged batch cultures of *Penicillium chrysogenum*. *Biotechnol. Bioeng.*, **57**, 297-305.

- Medvedev, Z.A. (1990) An attempt at a rational classification of theories of aging. *Biol. Rev.*, **65**, 375-398.
- Mehdi, K. and Penninckx, M. J. (1997) An important role of glutathione and γ -glutamyltranspeptidase in the supply of growth requirements during nitrogen starvation of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* **143**, 1885-1889.
- Mehdi, K., Thiere, J. and Penninckx, M.J. (2001) γ -Glutamyl transpeptidase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and its role in the vacuolar transport and metabolism of glutathione. *Biochem. J.*, **359**, 631-637.
- Mischak H., Kubicek C.P., Röhr M. (1985) Formation and location of glucose oxidase by citric acid producing mycelia of *Aspergillus niger*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **21**, 27-31.
- Monks, T.J., Andres, M.W., Dekant, W., Stevens, J., Lau, S.S., van Bladern, P.J. (1990) Glutathione conjugate mediated toxicities. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **106**, 1-19.
- Nestelbacher R., Laun P., Vondráková D., Pichová A., Schüller C., Breitenbach M. (2000) The influence of oxygen toxicity on yeast mother cell-specific aging. *Exp. Gerontol.* **35**, 63-70.
- Nielsen, J., Johansen, C.L. and Villadsen, J. (1994) Culture fluorescent measurements during batch and fed-batch cultivations with *Penicillium chrysogenum*. *J. Biotechnol.* **38**, 51-62.
- Nielsen, J. (1995) *Physiological Engineering Aspects of Penicillium chrysogenum*. Polyteknisk Forlag, Lyngby, 1995.
- Nielsen, J. and Krabben, P. (1995) Hyphal growth and fragmentation of *Penicillium chrysogenum* in submerged cultures. *Biotechnol. Bioeng.*, **46**, 588-598.
- Nohl, H. (1993) Involvement of free radicals in aging: a consequence of senescence. *Br. Med. Bull.*, **49**, 653-667.
- Nuero, O. M., Alfonso, C., Del Amo, F., and Reyes, F. (1993) Study of $\beta(1, 3)$ -glucanase activity during autolysis of *Aspergillus nidulans* by FPLC ion-exchange chromatography, *Lett. Appl. Microbiol.*, **17**, 104-108.
- Oberley, L.W., Spitz, D.R. (1984) Assay of superoxide dismutase activity in tumour tissue. *Methods Enzymol.*, **105**, 457-464.
- Orlowski, M. (1994) Yeast/mycelium dimorphism. In Wessels, J.G.H., Meinhardt, F. (eds): *The Mycota I. Growth, Differentiation and Sexuality*, Springer-Verlag, Berlin, 1994. pp. 143-162.
- Osiewacz, H. D. (1990) Molecular analysis of aging processes in fungi. *Mut.Res.*, **237**, 1-8.
- Paul, G.C., Kent, C.A. and Thomas, C.R. (1993) An image processing method for the fully automatic measurement of vacuoles in filamentous fungi. *Binary Comput. Microbiol.*, **5**, 92-99.
- Paul, G.C., Kent, C.A. and Thomas, C.R. (1994) Hyphal vacuolation and fragmentation in *Penicillium chrysogenum*. *Biotechnol. Bioeng.*, **44**, 655-660.
- Paul, G.C. and Thomas, C.R. (1996) A structured model for hyphal differentiation and penicillin production using *Penicillium chrysogenum*. *Biotechnol. Bioeng.*, **51**, 558-572.
- Paul, G.C. and Thomas, C.R. (1998) Characterization of mycelial morphology using image analysis. *Adv. Biochem. Eng. Biotech.*, **60**, 1-59.
- Peberdy, J.F. (1994) Protein secretion in filamentous fungi – trying to understand a highly productive black box. *Trends Biotechnol.*, **12**, 50-57.
- Pedersen, A.G., Bundgaard-Nielsen, M., Nielsen, J., Villadsen, J., Hassager, O. (1993) Rheological characterisation of media containing *Penicillium chrysogenum*. *Biotechnol. Bioeng.*, **41**, 162-164.

- Penninckx, M.J., Jaspers, C.J., Wiame, J.M. (1980) Glutathione metabolism in relation to the amino-acid permeation systems of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.*, **104**, 119-123.
- Penninckx, M.J., Elskens, M.T. (1993) Metabolism and functions of glutathione in micro-organisms. *Adv. Microbial Physiol.*, **34**, 239-301.
- Penninckx, M.J. (2000) A short review on the role of glutathione in the response of yeasts to nutritional, environmental, and oxidative stresses. *Enz. Microb. Technol.*, **26**, 737-742.
- Perez-Leblic, M. I., Reyes, F., Lahoz, R., and Archer, S. A. (1982) Autolysis of *Penicillium oxalicum* with special reference to its cell walls, *Can. J. Microbiol.*, **28**, 1289–1295.
- Peter, M. G. and Schweikart, F. (1990) Chitin biosynthesis enhancement by the endochitinase inhibitor allosamidin. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, **371**, 471-473.
- Peterson, G.L. (1983) Determination of total protein. *Methods Enzymol.*, **91**, 86-105.
- Pinto, M.C., Mata, A.M., López-Barea, J. (1984) Reversible inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* glutathione reductase under reducing conditions. *Arch. Biochem. Biophys.*, **228**, 1-12.
- Pitson, S., Seviour, R. J., Bott, J., and Stasinopoulos, S. J. (1991) Production and regulation of β -glucanases in *Acremonium* and *Cephalosporium* isolates, *Mycol. Res.*, **95**, 352–356.
- Pitson, S. M., Seviour, R. J., and McDougall, B. M. (1993) Non-cellulolytic fungal β -glucanases: their physiology and regulation. *Enzyme Microb. Technol.*, **15**, 178–192.
- Pitson, S. M., Seviour, R. J., and McDougall, B. M. (1997) Effect of carbon source on extracellular $\beta(1\rightarrow3)$ and $\beta(1\rightarrow6)$ -glucanase production by *Acremonium persicinum*. *Can. J. Microbiol.*, **43**, 432–439.
- Pócsi, I., Pócsi, I. and Pusztahelyi, T. (1999) Physiological and enzymological characterization of the β -N-acetylhexosaminidase of *Penicillium chrysogenum*. *J. Basic Microbiol.*, **39**, 177-187.
- Pócsi, I., Pusztahelyi, T., Bogáti, T., Szentirmai, A. (1993) The formation of N-acetyl- β -D-hexosaminidase is repressed by glucose in *Penicillium chrysogenum*. *J. Basic Microbiol.*, **33**, 259-267.
- Polacheck, Y. and Rosenberger, R. F. (1975) Autolytic enzymes in hyphae of *Aspergillus nidulans*: their action on old and newly formed walls. *J. Bacteriol.*, **121**, 332–337.
- Priede, M.A., Krasnopolskaya, L.M. and Viesturs, U.E. (1997) Control of the production of individual fusicoicins at different dissolved oxygen concentrations. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **13**, 665-670.
- Pusztahelyi, T., Pócsi, I., Kozma, J., Szentirmai, A. (1996) In vitro and in vivo inhibition of the *Penicillium chrysogenum* N-acetyl- β -D-hexosaminidase. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.*, **43**, 252-257.
- Pusztahelyi, T., Pócsi, I., Kozma, J., Szentirmai, A. (1997a) Aging of *Penicillium chrysogenum* cultures under carbon starvation: I: morphological changes and secondary metabolite production. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **25**, 81-86.
- Pusztahelyi, T., Pócsi, I. and Szentirmai, A. (1997b) Aging of *Penicillium chrysogenum* cultures under carbon starvation: II: protease and N-acetyl- β -D-hexosaminidase production. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **25**, 87-93.
- Pusztahelyi, T. (1997c) Öregedő *Penicillium chrysogenum* tenyészetek élettani vizsgálata (Egyetemi doktori {PhD} értekezés).

- Rast, D. M., Horsch, M., Furter, R., Gooday, G. W. (1991) A complex chitinolytic system in exponentially growing mycelium of *Mucor rouxii*: properties and function. *J. Gen. Microbiol.*, **137**, 2797-2810.
- Rast, D. M., Merz, R. A., Jeanguenat, A. and Möisinger, E. (2000) Enzymes of chitin metabolism for the design of antifungals. *In Advances in Chitin Science*, Vol. 4, ed. by Peter, M. G., Domard, A. and Muzzarelli, R. A. A., University of Potsdam, Potsdam, pp. 479-505.
- Reichard, U., Hung, C.Y., Thomas, P.W., Cole, G.T. (2000) Disruption of the gene which encodes a serodiagnostic antigen and chitinase of the human fungal pathogen *Coccidioides immitis*. *Infect. Immun.*, **68**, 5830-5838.
- Reyes, F., Lahoz, R., and Moreno, A. V. (1981) Synthesis of 1,3- β -glucanase and β -N-acetylglucosaminidase during autolysis of *Neurospora crassa*, *J. Gen. Microbiol.*, **126**, 347-353.
- Reyes, F., Calatayud, J. and Martinez, M. J. (1988) Chitinolytic activity in the autolysis of *Aspergillus nidulans*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **49**, 239-243.
- Reyes, F., Calatayud, J., and Martinez, M. J. (1989a) Endochitinase from *Aspergillus nidulans* implicated in the autolysis of its cell wall. *FEMS Microbiol. Lett.*, **60**, 119-124.
- Reyes, F., Calatayud, J., Vazquez, C., and Martinez, M. J. (1989b) β -N-acetylglucosaminidase from *Aspergillus nidulans* which degrades chitin oligomers during autolysis. *FEMS Microbiol. Lett.*, **65**, 83-88.
- Reyes, F., Villanueva, P., and Alfonso, C. (1990a) Nucleases in the autolysis of filamentous fungi. *FEMS Microbiol. Lett.*, **69**, 67-72.
- Reyes, F., Martinez, J., Alfonso, C., Copa-Patiño, J.L., Soliveri, J. (1990b) Cephalosporin C acylase in the autolysis of filamentous fungi. *J. Pharm. Pharmacol.*, **42**, 128-131.
- Righelato, R., Trinci, C., A. P. J., and Pirt, S.J. (1968) The influence of maintenance energy and growth rate on the metabolic activity, morphology and conidiation of *Penicillium chrysogenum*. *J. Gen. Microbiol.*, **50**, 399-412.
- Rodriguez, J., Santos, M.J., Copa-Patiño, J.L., Pérez-Leblic, M.I. (1993) Chitinolytic activity produced by *Penicillium oxalicum* in different culture media, *Lett. Appl. Microbiol.*, **16**, 69-71.
- Rodriguez, J., Copa-Patino, J. L., and Perez-Leblic, M. I. (1995) Purification and properties of a chitinase from *Penicillium oxalicum* autolysates. *Lett. Appl. Microbiol.*, **20**, 46-49.
- Roggenkamp, R., Sahm, H., Wagner, F. (1974) Microbial assimilation of methanol induction and function of catalase in *Candida boidinii*. *FEBS Lett.*, **41**, 283-286.
- Roukas T. and Harvey L. (1988) The effect of pH on the production of citric acid and gluconic acid from beet molasses using continuous culture. *Biotechnol. Lett.* **10**, 289-294.
- Royall, J.A. and Ischiropoulos, H. (1993) Evaluation of 2',7'-dichlorofluorescein and dihydrorhodamine 123 as fluorescent probes for intracellular H₂O₂ in cultured endothelial cells. *Arch. Biochem. Biophys.*, **302**, 348-355.
- Roze, L. V. & Linz, J. E. (1998) Lovastatin triggers apoptosis-like cell death process in the fungus *Mucor racemosus*. *Fungal Gen. Biol.*, **25**, 119-133.
- Rozén, S., Yu, J.H. and Adams, T.H. (1999) The *Aspergillus nidulans* *sfaD* gene encodes a G protein β subunit that is required for normal growth and repression of sporulation. *EMBO J.*, **18**, 5592-5600.

- Ruijter, G.J.G., Kubicek, C.P. and Visser, J. (2002) Production of organic acids by fungi. *In* The Mycota, edited by K Esser & JW Bennett, Vol X, edited by HD Osiewacz, Springer-Verlag, Berlin, 2002. Pp 213-230.
- Sakuda, S., Isogai, A., Matsumoto, S., Suzuki, A. (1986) The structure of allosamidin, a novel insect chitinase inhibitor, produced by *Streptomyces sp.* *Tetrahedron Lett.*, **27**, 2475-2478.
- Sakuda, S., Isogai, A., Matsumoto, S., Suzuki, A. (1987) Search for microbial insect growth regulators II. Allosamidin, a novel insect chitinase inhibitor. *J. Antibiot.*, **40**, 296-300.
- Sakuda, S. & Sakurada, M. (1998) Preparation of biotinylated allosamidins with strong chitinase inhibitory activities. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **8**, 2987-2990.
- Sakurada, M., Morgavi, D.P., Komatani, K., Tomita, Y., Onodera, R. (1997) Purification and characteristics of an autolytic chitinase of *Piromyces communis* OTS1 from culture medium. *Curr. Microbiol.*, **35**, 48-51.
- Sánchez, S., Flores, M.E., Demain, A.L. (1988) Nitrogen regulation of penicillin and cephalosporin fermentations. *In* Sanchez-Esquivel, S. (ed): Nitrogen Source Control of Microbial Processes, CRC Press, Boca Raton. 1988. pp. 121-136.
- Sándor, E., Pusztahelyi, T., Karaffa, L., Karányi, Z., Pócsi, I., Biró, S., Szentirmai, A., Pócsi, I. (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.
- Santamaria, F. and Reyes, F. (1988) Proteases produced during autolysis of filamentous fungi. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, **91**, 217-220.
- Saxena, M., Allameh, A., Mukerji, K.G. and Raj, H.G. (1991) Epoxidation Of Aflatoxin B1 By *Aspergillus Flavus* Microsomes *In Vitro*: Interaction With Dna And Formation Of Aflatoxin B1- Glutathione Conjugate. *Chem. Biol. Interact.*, **78**, 13-22.
- Schrickx, J. M. Krave, A. S., Verdoes, J. C., Van den Hondel, C. A. M. J. J., Stouthamer, A. H., and van Verseveld, H. W. (1993) Growth and product formation in chemostat and recycling cultures by *Aspergillus niger* N402 and a glucoamylase over producing transformant, provided with multiple copies of the *gla A* gene. *J. Gen. Microbiol.*, **139**, 2801-2810.
- Schugerl, K., Gerlach, S. R., and Siedenberg, D. (1998) Influence of the process parameters on the morphology and enzyme production of *Aspergilli*. *Adv. Biochem. Eng. Biotech.*, **60**, 195-270.
- Schwartz, R., Lucas, M.T., Escalante, L., Vázquez, G., Sánchez, S. (1988) Glutathione formation in *Penicillium chrysogenum*: Stimulatory effect of ammonium. *J. Gen. Microbiol.*, **134**, 1117-1121.
- Shamlou, A.P., Makagiansar, H.Y., Ison, A.P., Lilly, M.D., Thomas, C.R. (1994) Turbulent breakage of filamentous micro-organisms in submerged culture in mechanically stirred bioreactors. *Chem. Engineer. Sci.*, **49**, 2621-2631.
- Sheehan, D. and Casey, J.P. (1993) Microbial Glutathione S-Transferases. *Comp. Biochem. Physiol.*, **104**, 1-6.
- Sheehan, D., Meade, G., Foley, V.M., Dowd, C.A. (2001) Structure, Function and Evaluation Of Glutathione Transferases: Implications For Classification Of Non-Mammalian Members Of An Ancient Enzyme Superfamily. *Biochem. J.*, **360**, 1-16.
- Shiomi, K., Arai, N., Iwai, Y., Turberg, A., Kölbl, H., Omura, S. (2000) Structure of argifin, a new chitinase inhibitor produced by *Gliocladium sp.* *Tetrahedron Lett.*, **41**, 2141-2143.

- Skulachev, V.P. (2000) Mitochondria in the programmed death phenomena; a principle of biology: "It is better to die than to be wrong". *IUBMB Life*, **49**, 365-373.
- Skulachev, V.P. (2001) The programmed death phenomena, aging, and the Samurai law of biology. *Exp. Gerontol.*, **36**, 995-1024.
- Smith, J.J., Lilly, M.D., and Fox, R.I. (1990) The effect of agitation on the morphology and penicillin production of *Penicillium chrysogenum*. *Biotechnol. Bioeng.*, **35**, 1011–1023.
- Stephen, D.W.S. and Jamieson, D.J. (1996) Glutathione is an important antioxidant molecule in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **141**, 207-212.
- Stevens, C.M., Vohra, P, Inamine, E., Roholt, O.H. (1953) Utilisation of sulfur compounds for penicillin biosynthesis. *J. Biol. Chem.*, **205**, 1001-1006.
- Takaya, N., Yamazaki, D., Horiuchi, H., Ohta, A., Takagi, M. (1998) Cloning and characterization of a chitinase-encoding gene (*chiA*) from *Aspergillus nidulans*, disruption of which decreases germination frequency and hyphal growth. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **62**, 60-65.
- Theilgaard, H.A. and Nielsen, J. (1999) Metabolic control analysis of the penicillin biosynthetic pathway: the influence of the LLD-ACV:bisACV ratio on the flux control. *Antonie van Leeuwenhoek* **75**, 145-154.
- Thomas, D., Klein, K., Manavathu, E., Dimmock, J.R., Mutus, B. (1991) Glutathione levels during thermal induction of the yeast-to-mycelial transition in *Candida albicans*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **77**, 331-334.
- Thrane, C. and Olsson, S. (1998) Do fungi die by controlled cell death? In *Abstracts of the 6th International Mycological Congress – Jerusalem*, p. 103. KENES, Organisers of Congresses and Tour Operators Ltd.: Tel Aviv
- Toledo, I., Aguirre, J. and Hansberg, W. (1994) Enzyme inactivation related to a hyperoxidant state during conidiation of *Neurospora crassa*. *Microbiology*, **140**, 2391-2397.
- Toledo, I., Rangel, P. and Hansberg, W. (1995) Redox imbalance at the start of each morphogenetic step of *Neurospora crassa*. *Arch. Biochem. Biophys.*, **319**, 519-524.
- Trinci A.P.J. & Righelato R.C. (1970) Changes in constituents and ultrastructure of hyphal compartments during autolysis of glucose-starved *Penicillium chrysogenum*. *J. Gen. Microbiol.*, **60**, 239-249.
- Trinci, A.P.J. (1979) The duplication cycle and branching in fungi, in *Fungal Walls and Hyphal Growth*, Burnett, J.H. and Trinci, A. P. J., Eds., Cambridge University Press, Cambridge, U.K., 319–357.
- Van De Kamp, M., Driessen, A.J.M. and Konings, W.N. (1999) Compartmentalization and transport in β -lactam antibiotic biosynthesis by filamentous fungi. *Antonie van Leeuwenhoek* **75**, 41-78.
- Vanhoutte, B., Pons, M. N., Thomas, C. R., Louvel, L., and Vivier, H. (1995) Characterization of *Penicillium chrysogenum* physiology in submerged cultures by colour and monochrome image analysis, *Biotechnol. Bioeng.*, **48**, 1–11.
- Vessey, J.C. and Pegg, G.F. (1973) Autolysis and chitinase production in cultures of *Verticillium albo-atrum*. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, **60**, 133-143.
- Warholm, M., Guthenberg, C., von Bahr, C., Mannervik, B. (1985) Glutathione transferases from human liver. *Methods Enzymol.*, **113**, 499-504.
- Wessels, J.H.G. (1984) Apical hyphal wall extension. Do lytic enzymes play a role? In *Microbial Cell Wall Synthesis and Autolysis*, ed. by Nombela, C., Elsevier, Amsterdam, pp. 31-42.
- Wessels, J.G.H. (1986) Cell wall synthesis in apical hyphal growth. *Int. Rev. Cytol.*, **104**, 37-79.

- Wessels, J.G.H. (1993) Wall growth, protein excretion and morphogenesis in fungi. *New Phytol.*, **123**, 397-413.
- Wessels, J.G.H. (1999) Fungi in their own right. *Fungal Genet. Biol.*, **27**, 134-145.
- Walsh, T.J., Viviani, M.A., Arathoon, E., Chiou, C., Ghannoum, M., Groll, A.H., Odds, F.C. (2000) New targets and delivery systems for antifungal therapy. *Med. Mycol.*, **38**, 335-347.
- White, S., Berry, D. R. and McNeil, B. (1999) Effect of phenylacetic acid feeding on the process of cellular autolysis in submerged batch cultures of *Penicillium chrysogenum*. *J. Biotechnol.*, **75**, 173-185.
- White, S., McIntyre, M., Berry, D.R., McNeil, B. (2002) The autolysis of industrial filamentous fungi. *Crit. Rev. Biotechnol.*, **22**, 1-14.
- Wickens, A.P. (2001) Ageing and the free radical theory. *Resp. Physiol.*, **128**, 379-391.
- Witteveen, C.F.B., Veenhuis, M. and Visser, J. (1992) Localization of glucose oxidase and catalase activities in *Aspergillus niger*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 1190-1194.
- Witteveen, C.F.B., van de Vondervoort, P.J.I., van den Broeck, H.C., van Engelenburg, F.A.C., de Graaff, L.H., Hillebrand, M.H.B.C., Schaap, P.J., Visser, J. (1993) Induction of glucose oxidase, catalase, and lactonase in *Aspergillus niger*. *Curr. Genet.*, **24**, 408-416.
- Żądziński, R., Fortuniak, A., Biliński, T., Grey, M., Bartosz, G. (1998) Menadione toxicity in *Saccharomyces cerevisiae* cells: activation by conjugation with glutathione. *Biochem. Mol. Biol. Int.*, **44**, 747-759.
- Zhang, Y. and Herman, B. (2002) Ageing and apoptosis. *Mech. Ageing Dev.*, **123**, 245-260.

9. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

9.1. Cikkek

1. Pócsi, I., Emri, T., Varecza, Z., Sámi, L. and Pusztahelyi, T. (1999) Allosamidin inhibits the fragmentation and autolysis of *Penicillium chrysogenum*. in: Advances in Chitin Sciences. Edd.: Peter, M.G., Domard, A. and Muzzarelli, R.A.A. Vol.4. pp.:558-564.

2. Emri, T., Sámi, L., Szentirmai, A. and Pócsi, I. (1999) Nitrate assimilation and oxidative stress responses in *Penicillium chrysogenum*. *J. Basic Microbiol.*, **39**(2), 109-115. **Impakt faktor: 0.421**

Hiv: 1. Theilgaard, H.A., van der Berg, M.A., Mulder, C.A., Bovenberg, A.L. and Nielsen, J. (2001) *Biotechnol. Bioeng.*, **72**, 379-388.

3. Pócsi, I., Sámi, L., Leiter, É., Majoros, L., Szabó, B., Emri, T. and Pusztahelyi, T. (2001) Searching for new-type antifungal drugs. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.*, **48**, 533-543.

4. Pócsi, I., Emri, T., Sámi, L., Leiter É. and Szentirmai, A. (2001) The glutathione metabolism of the β -lactam producer filamentous fungus *Penicillium chrysogenum*. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.*, **48**, 393-411.

5. Sámi, L., Emri, T. and Pócsi, I. (2001) Autolysis and aging of *Penicillium chrysogenum* cultures under carbon starvation: III: glutathione metabolism and formation of reactive oxygen species. *Mycol. Res.*, **105**, 1246-1250. **Impakt faktor: 1.346**

Hiv: 1. Madeo, F., Engelhardt, S., Herker, E., Lehmann, N., Maldener, C., Proksch, A., Wissing, S. and Fröhlich, K.-U. (2002) *Curr. Genet.*, **41**, 208-216.

2. Radman, R., Saez, T., Bucke, C. and Keshavarz, T. (2003) *Biotechnol. Appl. Biochem.* **37**, 91-102.

6. Sámi, L., Pusztahelyi, T., Emri, T., Varecza, Z., Fekete, A., Grallert, Á., Karányi, Zs., Kiss, L. and Pócsi, I. (2001) Autolysis and aging of *Penicillium chrysogenum* cultures under carbon starvation: IV: chitinase production and antifungal effect of allosamidin. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **47**, 201-211. **Impakt faktor: 0.512**

Hiv: 1. Fusetti, F., von Moeller, H., Houston, D., Rozeboom, H.J., Dijkstra, B.W., Boot, R.G., Aerts, J.M.F.G. and van Aalten, D.M.F. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 25537-25544.

2. Houston, D.R., Eggleston, I., Synstad, B., Eijsink, V.G. and van Aalten, D.M. (2002) *Biochem. J.* **368**, 23-27.

7. Emri, T., Oláh, B., Sámi, L., Molnár, Zs., Nagy, M., Pusztahelyi, T. and Pócsi, I. (2002) Investigation of glutathione metabolism in filamentous fungi. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.*, **49**, 267-276.

8. Sámi, L., Karaffa, L., Emri, T. and Pócsi, I. (2003) Autolysis and aging of *Penicillium chrysogenum* cultures under carbon starvation: V: respiration and glucose oxidase production. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.*, In Press.

9. Emri, T., Oláh, B., Sámi, L., Pócsi, I. (2003) Does the detoxification of penicillin side-chain precursors depend on microsomal monooxygenase and glutathione S-transferase in *Penicillium chrysogenum*? *J. Basic Microbiol.*, In Press. **Impakt faktor: 0.421**

10. Pócsi, I., Pusztahelyi, T., Sámi, L., Emri, T. (2003) Autolysis of *Penicillium chrysogenum* – A Holistic Approach. *Ind. J. Biotechnol.*, In Press.

9.2. Poszterek, előadások:

I. Hazai konferenciák:

1. Sámi, L., Emri, T., Pócsi, I. and Szentirmai, A. (1998) Nitrate assimilation and oxidative stress responses in *Penicillium chrysogenum*. A Magyar Mikrobiológiai Társaság 15. Nagygyűlése, Miskolc, 1998.

2. Sámi, L., Emri, T., Szentirmai, A. and Pócsi, I. (1999) Protection against oxidative stress in *Penicillium chrysogenum* cells grown on nitrate or nitrite. I. Magyar Mikológiai Konferencia, Budapest, 1999.

3. Pócsi, I., Emri, T., Sámi, L., Varcza, Z., Pusztahelyi, T., Grallert, Á. Kiss, L. (2000) Az allózamidin hatása öregedő *Penicillium chrysogenum* tenyészetek fragmentálódására, autolízisére és kriptikus növekedésére. A Magyar Kemoterápiai Társaság 15. Konferenciája, Hajdúszoboszló, 2000.

4. Sámi, L., Emri, T., Varcza, Z., Pusztahelyi, T., Pócsi, I. (2000) Fragmentation, autolysis and cryptic growth in ageing *Penicillium chrysogenum* cultures. A Magyar Mikrobiológiai Társaság 17. Nagygyűlése, Keszthely 2000.

5. Pócsi, I., Emri, T., Sámi, L. and Pusztahelyi, T. (2000) The glutathione metabolism of the filamentous fungus *Penicillium chrysogenum*. A Magyar Mikrobiológiai Társaság 17. Nagygyűlése, Keszthely, 2000.

6. Sámi L., Emri T. és Pócsi I. (2000) A dioxigén kizárási elmélet alkalmazhatósága a *Penicillium chrysogenum* autolízisekor és a túlélő morfológiai formák csírázásakor. IX. Fermentációs Kollokvium, Debrecen, 2000.

7. Pócsi, I., Sámi, L., Leiter, É., Majoros, L., Szabó, B., Emri, T., Pusztahelyi, T. (2001) Új típusú antifungális szerek kutatása. A Magyar Mikrobiológiai Társaság 18. Nagygyűlése, Balatonfüred, 2001.

8. Pócsi, I., Sámi, L., Pusztahelyi, T. és Emri, T. (2001) A *Penicillium chrysogenum* autolízise és öregedése. A Magyar Mikrobiológiai Társaság 18. Nagygyűlése, Balatonfüred, 2001.

9. Sámi, L., Karaffa, L., Emri, T. és Pócsi, I. (2002) Légzés és glükóz oxidáz termelés *Penicillium chrysogenum* tenyészetekben. A Magyar Mikrobiológiai Társaság 19. Nagygyűlése, Balatonfüred, 2002.

II. Külföldi konferenciák:

1. Pócsi, I., Emri, T., Varecza, Z., Sámi, L. and Pusztahelyi, T. (1999) Allosamidin inhibits the fragmentation and autolysis of *Penicillium chrysogenum*. Euchis'99 – 3rd International Conference of the European Chitin Society, University of Potsdam.

2. Pócsi, I., Sámi, L., Emri, T., Varecza, Z. and Pusztahelyi, T. (2001) Antifungal effect of allosamidin on autolysing *Penicillium chrysogenum* cultures. 3rd International Symposium on Chitin Enzymology and 4th Conference of the European Chitin Society, University of Ancona, Ancona, Italy.

3. Pócsi, I., Emri, T., Sámi, L. and Pusztahelyi, T. (2002) Autolysis of *Penicillium chrysogenum* - physiological characterization of the post-autolytic phase of growth. VIII. International Fungal Biology Conference, Guanajuato, Mexico.