



**A γ -GLUTAMIL TRANSZPEPTIDÁZ FIZIOLÓGIAI SZEREPÉNEK
VIZSGÁLATA AZ *ASPERGILLUS NIDULANS* FONALAS
GOMBÁBAN**

Egyetemi doktori (PhD) értekezés

SPITZMÜLLER ZSOLT

Témavezető

Dr. Emri Tamás egyetemi docens

DEBRECENI EGYETEM

Természettudományi Doktori Tanács

Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola

Debrecen, 2016

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

Debrecen, 2016.

.....
Spitzmüller Zsolt

Tanusítom, hogy **Spitzmüller Zsolt** doktorjelölt **2011-2014.** között a fent megnevezett Doktori Iskola **Biológia Doktori Programjának** keretében irányításommal végezte munkáját. Az értekezésben foglalt eredményekhez a jelölt önálló alkotó tevékenységével meghatározóan hozzájárult. Az értekezés elfogadását javaslom.

Debrecen, 2016.

.....
Dr. Emri Tamás

**A γ -glutamil transzpeptidáz fiziológiai szerepének vizsgálata az
Aspergillus nidulans fonalas gombában**

**An investigation of the physiological role of γ -glutamyl transpeptidase in
the filamentous fungus *Aspergillus nidulans***

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

a Biológia tudományágban

Írta: Spitzmüller Zsolt okleveles molekuláris biológus

Készült a Debreceni Egyetem Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola
(Biológia Doktori Program) keretében

Témavezető: Dr. Emri Tamás

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Borbély György

tagok: Dr. Gazdag Zoltán

Dr. Szabó Judit

.....
.....
.....

A doktori szigorlat időpontja: 2015. március 26.

Az értekezés bírálói:

.....
.....

A bírálóbizottság:

elnök:

tagok:

.....
.....
.....
.....

Az értekezés védésének időpontja: 2017.

Tartalomjegyzék

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

1. BEVEZETÉS	1
2. SZAKIRODALMI ÁTTEKINTÉS	5
2.1 AZ <i>ASPERGILLUS</i> TAXON ÉS AZ <i>A. NIDULANS</i> JELLEMZÉSE.....	5
2.2 A GLUTATION ANYAGCSERE	14
2.2.1 <i>A glutation és tulajdonságai</i>	14
2.2.2 <i>A glutation anyagcsere fontosabb reakciói</i>	17
2.3 A γ -GLUTAMIL TRANSZPEPTIDÁZ FIZIOLÓGIAI SZEREPE	25
3. EREDMÉNYEK	34
3.1 AZ <i>A. NIDULANS</i> γ GT AKTIVITÁSÁÉRT FELELŐS GÉN AZONOSÍTÁSA	34
3.2 A γ GT KÉPZŐDÉSÉNEK SZABÁLYOZÁSA	36
3.3 A γ GT EXTRACELLULÁRIS KÉPZŐDÉSÉNEK VIZSGÁLATA	40
3.4 A <i>GGTA</i> GÉN DELÉCIÓJÁNAK FIZIOLÓGIAI KÖVETKEZMÉNYEI	42
3.5 AZ EXTRACELLULÁRIS γ GT IZOLÁLÁSA ÉS JELLEMZÉSE	48
3.6 AZ INTRACELLULÁRIS GLUTATION LEBONTÁSÁBAN POTENCIÁLISAN RÉSZTVEVŐ GÉNEK VIZSGÁLATA	54
4. EREDMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE.....	57
4.1 A γ GT-T KÓDOLO GÉN AZONOSÍTÁSA	57
4.2 A <i>GGTA</i> SZEREPE AZ INTRACELLULÁRIS GSH ANYAGCSERÉBEN.....	58
4.3 A <i>GGTA</i> EXTRACELLULÁRIS LOKALIZÁCIÓJA	59
4.4 A <i>GGTA</i> LEHETSÉGES FIZIOLÓGIAI JELENTŐSÉGE	61
5. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	64
5.1 A VIZSGÁLT TÖRZSEK ÉS TENYÉSZTÉSÜK.....	64
5.2 MINTAVÉTEL ÉS A MINTA ELŐKÉSZÍTÉSE	67
5.3 ANALITIKAI VIZSGÁLATOK	67
5.3.1 <i>Az intracelluláris és extracelluláris γGT aktivitás mérése</i>	67
5.3.2 <i>Az extracelluláris proteináz termelés detektálása</i>	68

5.3.3 A szárazanyag-tartalom meghatározása.....	69
5.3.4 A RS tartalom meghatározása	69
5.3.5 A sejtek oxidált és redukált glutation tartalmának mérése	69
5.4 TRANSZKRIPCIÓS VIZSGÁLATOK	70
5.4.1 RNS izolálás	70
5.4.2 Génexpresszó vizsgálata RT-qPCR segítségével	71
5.5 AZ EXTRACELLULÁRIS γ GT IZOLÁLÁSA ÉS JELLEMZÉSE	72
5.5.1 Az enzim tisztítása ioncsere kromatográfiával	72
5.5.2 Az extracelluláris γ GT hőmérséklet és pH optimumának meghatározása	73
5.5.3 Az extracelluláris γ GT szubsztrát specifitásának jellemzése	74
5.6 A FEHÉRJE AZONOSÍTÁSA 2D PAGE ALKALMAZÁSÁVAL	74
5.7 A SPÓRASZÁM ÉS A KLEISZTOTÉCIUM MENNYISÉGÉNEK VIZSGÁLATA ...	75
5.8 STATISZTIKAI VIZSGÁLATOK.....	75
5.9 FELHASZNÁLT VEGYSZEREK	76
6. ÖSSZEFOGLALÁS.....	77
7. SUMMARY	80
8. IRODALOMJEGYZÉK.....	83
9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	117
10. TUDOMÁNYOS KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE	118

Rövidítések jegyzéke

ACV	δ -L- α -aminoadipil-L-ciszteinil-D-valin
BSA	borjú szérum albumin
CHAPS	kolamidopropil-dimetilammónium-propánszulfonát
DCM	száraztömeg (dry cell mass)
DCF	2',7'-diklórfluoreszcin
DEAE	dietil-aminoetil
DTNB	5,5'-ditio- <i>bis</i> (2-nitrobenzoesav)
DUG	az élesztők citoszolikus glutation lebontó útvonala (deficient in utilization of glutathione)
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav
FaDH	formaldehid-dehidrogenáz
FGH	formil-glutation-hidroláz
GgtA	Az <i>Aspergillus nidulans</i> AN10444 génje által kódolt fehérje
<i>ggtA</i>	Az <i>Aspergillus nidulans</i> AN10444 génje
GLO	glioxaláz
GPx	glutation-peroxidáz
GR	glutation-reduktáz
GSH	glutation (redukált forma)
GSHS	glutation-szintetáz
GSO•	glutation-szulfinil szabadgyök
GSSG	glutation-diszulfid (oxidált forma)
GS-R	glutation-S-konjugátum
GST	glutation-S-transzferáz
γ GCS	γ -glutamilcisztein-szintetáz

γ GCT	γ -glutamil-ciklotranszferáz
γ GpNA	γ -glutamil-p-nitroanilid
γ GT	γ -glutamil-transzpeptidáz
MOPS	3-(N-morfolino)-propánszulfonsav
ROS	reaktív oxigénformák (reactive oxygen species)
RS	reaktív részecske (reactive species)
SDS	nátrium-dodecil-szulfát
TAE	Tris-acetát-EDTA puffer
TRIS	tris-hidroximetil-aminometán

1. Bevezetés

A fonalas felépítésű, többsejtű mikroszkopikus gombák élettanának vizsgálata (beleértve a sejtpusztulási folyamatoknak, a telep differenciálódásának, a tenyészetek abiotikus és biotikus stresszhez való alkalmazkodásának, extracelluláris enzim és szekunder metabolit termelésének vizsgálatát is) hosszú ideje a mikológiai kutatások fontos részét képezik. Mindez egyáltalán nem rendkívüli, figyelembe véve, hogy a gombák kiterjedt biotechnológiai felhasználása okán élettani folyamataik alaposabb megértése hasznosítható információkat nyújthat e mikroorganizmusokat alkalmazó, primer és szekunder metabolitokat, valamint enzimeket előállító biotechnológiai vállalatok számára (Glazer és Nikaido 2007, Varga és Samson 2008). Másrészt e kutatások új antifungális szerek és módszerek kifejlesztéséhez vezethetnek el, melyek alkalmasak lehetnek a mezőgazdaságban a növénypatogén és toxinogén gombák okozta tekintélyes termékvesztés mérséklésére (Razzaghi-Abyaneh és munkatársai 2014), az egészségügyben az egyre gyakrabban előforduló humán mikózisok leküzdésére (Alcazar-Fuoli és Mellado 2014), vagy az épített környezetünket károsító gombák visszaszorítására (Mihinova és Pieckova 2012) is.

A szénstressz, azaz a szénforrás éhezés (a szénforrás minősége és mennyisége nem elegendő a növekedés fenntartásához) és a szénforrás limitáció (a szénforrás minősége és/vagy mennyisége csak lassú növekedést tesz lehetővé) az egyik leggyakoribb stressz a természetben (Winderickx és munkatársai 2003, McArthur 2006). A szén stresszválasz fiziológiájának megismerése nem csak a mikroorganizmusok természetes élőhelyükhöz való alkalmazkodásának jobb megértését teszi lehetővé, de segíthet megérteni a humánfertőzések kialakulását (Dagenais és Keller 2009), a mikotoxin termelés szabályozását (Jiao és munkatársai 2008, Bouras és Strelkov 2010)

és a mikrobák ipari fermentációk alatt mutatott viselkedését (Glazer és Nikaido 2007) is. A Debreceni Egyetem Biotechnológiai és Mikrobiológiai Tanszékén hosszú ideje folynak kutatások fonalas gombák szénéhező tenyészeivel kapcsolatban (Pusztahelyi és munkatársai 1997, Sámi és munkatársai 2001, Emri és munkatársai 2008, Szilágyi és munkatársai 2013). E vizsgálatok egyik érdekes megfigyelése, hogy szénéhezés hatására, mind a *Penicillium chrysogenum*, mind az *Aspergillus nidulans* tenyészetekben megnő a γ -glutamil transzpeptidáz (γ GT) enzim aktivitása. Mindez együtt jár a tenyészetek glutation (GSH) tartalmának csökkenésével és a reaktív oxigénformák (ROS) mennyiségének a növekedésével (Sámi és munkatársai 2001, Emri és munkatársai 2004). A γ GT-t, a GSH lebontásának kulcsfontosságú enzimeként tartják számon (Penninckx és Elskens 1993). Így jogosnak tűnik az a feltételezés, hogy szénéhező körülmények között a sejtek a megnövekedett γ GT segítségével lebontják és energiaforrásként hasznosítják GSH raktáraikat, ami egy idő után a ROS akkumulálódásához vezet. Az irodalmi adatok ellenben óvatosságra intenek. Sok élőlényben a γ GT nem vesz részt a (citoszolikus) GSH lebontásában (Kumar és munkatársai 2003, Ohkama-Ohtsu és munkatársai 2008, Kumar és munkatársai 2012). Sőt, a legtöbb élőlény esetében a γ GT konkrét fiziológiai szerepe egyáltalán nem ismert. Valószínűleg többféle folyamatban is közreműködik, melyek magukba foglalják az extracelluláris, illetve vakuoláris GSH és más γ -glutamil vegyületek lebontását (Springael és Penninckx 2003, Kimura és munkatársai 2004, Heisterkamp és munkatársai 2008, Bello és munkatársai 2013), az oxidált glutation (GSSG) lebontását (Ohkama-Ohtsu és munkatársai 2008, Li és munkatársai 2012), illetve a glutation S-konjugátumok metabolizmusát (GSH-függő detoxifikáció) (Agblor és Josephy 2013). Tervezett vizsgálataink célja az *A. nidulans*, mint

modell organizmus γ GT-ának jobb megismerése, lehetséges fiziológiai szerepének feltérképezése volt szénéhező tenyészetekben. Célul tűztük ki továbbá a GSH tartalom csökkenésért felelős gének/enzimek azonosítását és a γ GT e folyamatban betöltött szerepének tisztázását. Célkitűzésünk megvalósítása érdekében az alábbi vizsgálatok elvégzését terveztük:

1. Az *A. nidulans* γ GT aktivitásáért felelős gén azonosítása.

Az *Aspergillus* Genome Database (www.aspgd.org) adatbázis segítségével a potenciális γ GT gének kigyűjtése, majd az adott génhez tartozó deléciós törzsek γ GT aktivitásának tesztelése.

2. A sejtek γ GT termelését befolyásoló körülmények azonosítása.

A szénéhezés és a szénforrás limitáció hatásának vizsgálata a tenyészetek γ GT aktivitására és a potenciális γ GT gének transzkripciójára vad típusú, valamint a nitrogén és szén anyagcserében fontos *meaB* (Wong és munkatársai 2007) és *creA* (Shroff és munkatársai 1997) géneket tekintve inaktív törzsekben.

3. A γ GT aktív szekretálódásának alátámasztása.

Aspergillus fajok ismert, vagy feltételezett γ GT génjeinek bioinformatikai elemzése különös tekintettel a szignálszekvencia meglétére, illetve hiányára.

Szénforrás éhező és szénforrás limitált *A. nidulans* tenyészetek fermentlevelei γ GT aktivitásának vizsgálata.

Szénforrás limitált (növekvő, de nem autolizáló) *A. nidulans* tenyészetek szekretomának tanulmányozása.

4. A γ GT néhány enzimológiai paraméterének meghatározása.

A γ GT izolálása a fermentléből.

A γ GT preparátum pH és hőmérséklet optimumának meghatározása, valamint hidroláz és transzferáz aktivitásának mérése különböző szubsztrátok jelenlétében.

5. A γ GT potenciális fiziológiai szerepének feltérképezése.

A γ GT-t kódoló génben deletált *A. nidulans* törzsek fiziológiai vizsgálata a növekedés, a proteáz termelés, a reaktív részecskék (RS) képződésének, valamint a konidium és kleisztotécium képzés detektálásán keresztül.

A tenyészetek GSH tartalmának és γ GT aktivitásának vizsgálata vad típusú és a γ GT-t kódoló génben sérült törzsekben.

Reményeink szerint eredményeink hozzájárulnak a szénéhező tenyészetek élettanának jobb megismeréséhez és ezen keresztül ipari fermentációs célú alkalmazásuk hatékonyabbá tételéhez. Vizsgálataink értékes adatokkal szolgálnak továbbá a γ GT-ok biotechnológiai célú felhasználásához (Suzuki és munkatársai 2003, 2007), valamint a γ GT-hoz kapcsolódó egészségügyi problémák (Shibayama és munkatársai 2007, Celik és munkatársai 2014, Hanigan 2014, Ndrepepa és munkatársai 2016) jobb megértéséhez is.

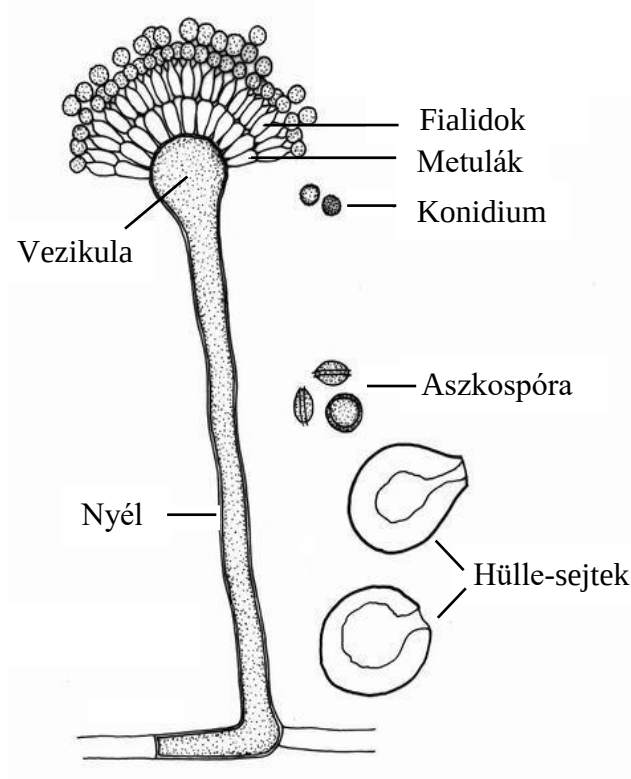
2. Szakirodalmi áttekintés

2.1 Az *Aspergillus* taxon és az *A. nidulans* jellemzése

Az *Aspergillus* fajok az *Ascomycota* törzs, *Plectinomycetes* osztály, *Eurotiales* rendjének *Trichocomaceae* családjába tartoznak (Webster 1986). A több mint 300 fajt számláló *Aspergillus* nemzetség, ipari, illetve élelmiszer-egészségügyi szempontból az egyik legintenzívebben vizsgált fonalas gomba csoport (Gugnani 2003). A 18S, 28S rDNS, illetve parciális kalmodulin, β -tubulin és RNS polimeráz II szekvenciák alapján monofiletikus eredetű taxon (Peterson 2008; Houbroken és munkatársai 2014). A szekvencia adatok ismeretében 8 alnemzetségbe sorolhatóak: *Aspergillus*, *Candidi*, *Circumdati*, *Fumigati*, *Nidulantes*, *Ornati*, *Terrei*, *Warcupi* (Masayuki és Katsuya 2010). Az *A. nidulans* a *Nidulantes* alnemzetségbe tartozik. Általában bomló növényi maradványokon fordulnak elő. Megtalálhatóak a talajban, beleértve a rizoszférát is, az avarban, a komposztban, a takarmányozásra szánt szénában és a szalmában is, de egyes képviselőik, pl. *A. sydowii* tengeri korall fajok fontos patogénje (Bruno és munkatársai 2011).

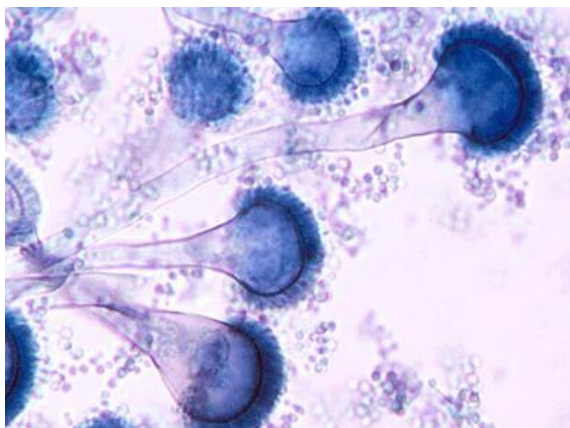
Megjelenésükre a szeptált hifákból álló fonalas telepek jellemzőek. Az interszeptumok közötti kapcsolatot a szeptumokon kialakuló egyszerű pórusok biztosítják. Interszeptumaik sok magvúak; jellemzően a csúcsi sejtek sejtmagszáma a legnagyobb (Jakucs és Vajna 2003). Ivartalan szaporodásukat biztosító konidiumaik jellegzetes morfológiájú konidioforokon képződnek. A konidiofor alapját a talpsejt oldalelágazásán kifejlődő vezikulum képezi. Ehhez vagy közvetlenül kapcsolódnak a konidiogén sejtek (fialidok), vagy a vezikulum és a fialid réteg között egy konidiumot nem termelő sejtsor (metulák) helyezkedik el (1. ábra). Az előbbi típust uniseriat (2. ábra), míg az utóbbit biseriat (3. ábra) típusnak nevezzük

(Kevei és Kucsera 2010). Egyes *Aspergillus* fajok ettől eltérő, akár *Penicillium* fajokra emlékeztető konidioforokkal is rendelkezhetnek (pl. „*P. inflatum*”), vagy egyáltalán nem képeznek konidioforokat (pl. *A. monodii*) (Samson és munkatársai 2014). Érdemes megemlíteni, hogy egyes *Aspergillus*sokra jellemző konidioforral rendelkező fajok (pl. „*A. paradoxus*”, „*A. malodoratus*” és „*A. crystallinus*”) ugyanakkor nem az *Aspergillus* nemzetségbe tartoznak, mint ahogy azt korábban vélték, hanem a *Penicillium* genuszba (Samson és munkatársai 2014).

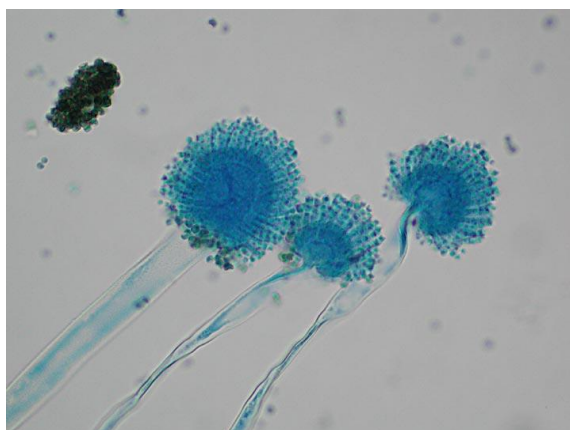


1. ábra Az *Aspergillus* konidiofor felépítése.

(<http://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/ps06/mikroorg/web/eme.htm>)



2. ábra Az *A. fumigatus* uniseriat konidiofor felépítése.
(<http://www.mycology.adelaide.edu.au/virtual/2008/ID2-Sep08.html#top>)



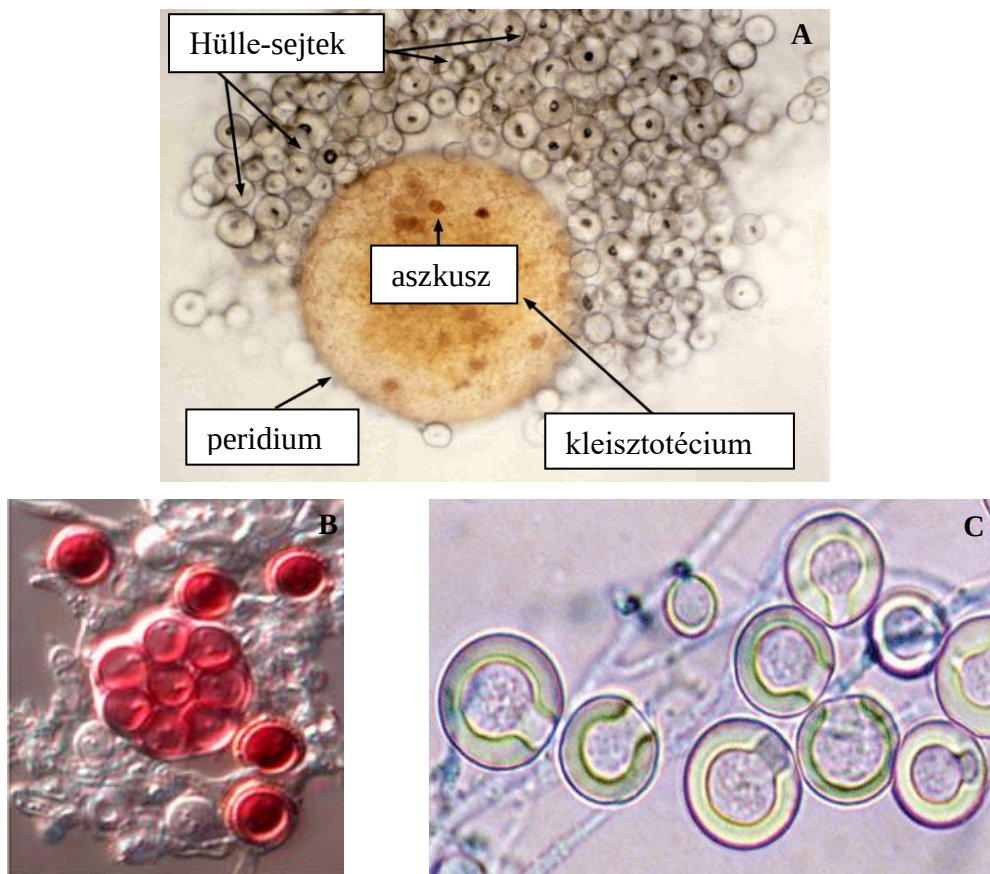
3. ábra Az *A. flavus* biserial konidiofor felépítése.
(http://labmed.ucsf.edu/education/residency/fung_morph/fungal_site/subpages/aspergillusflavussp.html)

Az *A. nidulans* esetében a biserial típusú konidioforok képzésének folyamata a megvastagodott falú lábsejt képződésével indul, majd a lábsejtből kialakul a nyél. A nyél csúcsán jön létre a globuláris vezikulum, amelyben a többszörös osztódás következtében létrejövő sejtmagok egyenletesen szétszóródnak a felszín alatt. Ezt követően bimbózással metulák képződnek. Miután egy-egy sejtmag belép a metulába, szeptum képződik, ami elválasztja a metulát a

vezikulumtól. A metulák egy speciális osztódáson mennek keresztül, melynek eredményeképp kialakulnak a hosszú konidium láncolatokat létrehozó fialidok (Boylan és munkatársai 1987; Mirabito és munkatársai 1989; Adams és munkatársai 1998; Etxebeste és munkatársai 2008). A folyamat szabályozásában a BrlA, az AbaA és a WetA transzkripciós faktorok által alkotott központi szabályozási útvonal vesz részt. E három transzkripciós faktor indukál minden olyan gént, amely a konidioforok és a konidiumok képződéséhez szükséges (Adams és munkatársai 1998; Roncal és Ugalde 2013).

Ivaros szaporodásuk askospórák képzésével valósul meg. *Aspergillus* fajok többségének nem ismert az ivaros ciklusa. A legtöbb ivarosan is szaporodó faj az *Eurotium*, *Emericella*, *Neosartorya* és *Petromyces* nemzetségbe tartozik. Többségük homotallikus, heterotallikus fajok elvéve fordulnak csak elő (pl. *A. heterotallicus*, egyes *Neosartorya* és *Petromyces* fajok) (Dyer és O’Gorman 2011). Az askospórákat termelő askuszkok jellemzően ovoid alakúak és kleisztotécium típusú zárt, gömbszerű termőtestekben jönnek létre (4a. és 4b. ábra). Egyedüli kivételt az *A. thecius* képezi, ahol az askuszkok szabadon fejlődnek; nem alakul ki kleisztotécium (Dyer és O’Gorman 2011). Az *A. (Emericella) nidulans* esetében (a többi *Emericella* fajhoz hasonlóan) a kleisztotécium fala („peridium”) kétrétegű, lapos, egymáshoz szorosan tapadó sötétlila színű sejtekből áll. A tapadást egy ismeretlen összetételű „cleistin” nevű anyag biztosítja. A kleisztotécium belsejét szintén ez az anyag tölti ki. A kleisztotécium falához kívülről speciális sejtek, Hülle-sejtek kapcsolódnak (4a. és 4c. ábra). Ezen sejtek jellegzetes morfológiájú, mikroszkóposan erősen fénytörő, vastag falú sejtek. Feltételezhetően a kleisztotéciumok védelmében és „táplálásában” vesznek részt (Dyer és O’Gorman 2011). Az ivaros folyamatban jellemzően nem ivarszervek, hanem nem differenciálódott sejtek vesznek részt. A folyamat

szabályozása igen komplex, számos jelátviteli út és transzkripciós faktor közreműködésével valósul meg (Hoffmann és munkatársai 2000; Han és munkatársai 2001, 2008a; Kim és munkatársai 2002; Seo és munkatársai 2004; Scazzocchio 2006; Vienken és Fischer 2006; Han 2009; Dyer és O’Gorman 2011).



4. A ábra Az *A. nidulans* ivaros képletei. (https://atrium.lib.uoguelph.ca/xmlui/bitstream/handle/10214/6939/Emericella_nidulans_cleistothecium_with_hulle_cells.jpg?sequence=1); 4. B ábra Aszkuszok és aszkospórák. (<http://www.genetics.unimelb.edu.au/research/hd/>); 4. C ábra Hülle-sejtek. (<http://www.mycology.adelaide.edu.au/virtual/2007/ID2-Sep07.html#top>).

Az *Aspergillus*ok jelentős gazdasági károkat okozhatnak, mint raktári kártevők, különösen magas páratartalmú körülmények között (Christensen és Kaufmann 1969) és mint a szántóföldi növénykultúra opportunistá kórokozói (Cotty és munkatársai 1994). Széleskörű mikotoxin termelő képességgel rendelkeznek (Cole és Cox 1981). A legtoxikusabb és legkarcinogénebb *Aspergillus* toxinok a többek között az *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. nomius* és *A. pseudotamarii* által termelt aflatoxinok (Eaton és Groopman 1993; Bennett és Klich 2003). Az aflatoxinok hőstabil difurán-kumarin származékok. Legnagyobb mennyiségben gabonanövényeken (pl. kukorica, rizs, búza, köles) és olajos magvakon megtelepedő *Aspergillus* fajokban (mogyoró, napraforgó, szója, gyapotmag) termelődnek (Weidenborner 2001). Szintén jelentősek a karcinogén, mutagén, teratogén, immunszuppresszív, nefrotoxikus hatású ochratoxinok, melyek β -fenilalaninhoz amid kötéssel kapcsolódó dihidro-izokumarin származékok (Barkai-Golan 2008b). Az *A. ochraceus*ból izolálták először, de ismert *A. parasiticus*, *A. cretensis*, *A. flocculosus*, *A. lacticoffeatus*, *A. sclerotioniger*, *A. wentti*, *A. alliaceus*, *A. albertensis*, *A. alutaceus* és *A. auricomus* törzsekből, sőt bizonyított az *A. niger* ochratoxin termelő képessége is (Abarca és munkatársai 1994). Általában a száraz élelmiszereken (pl. kávé, mogyoró, száraz gyümölcsök) lehet jelentős a jelenlétük. A karcinogén patulin erősen mérgező, elsősorban az emésztőszerveket, a májat, vesét és lépét károsító vegyület; mutagén és karcinogén. Többek között az *A. nominus*, *A. clavatus*, *A. giganteus* és *A. terreus* termeli. Elsősorban gyümölcsökből és zöldségfélékből, illetve a belőlük előállított termékekből mutatták ki (Barkai-Golan 2008a). A citrinin vesekárosító toxin, ami általában gabonaféleségeken fordul elő, de húskészítményekből is kimutatták már. Többek között az *A. niveus* és *A. terreus* termeli (Turner és Aldridge 1983; Dame és munkatársai 2015). *Aspergillus* fajokból izolált további jelentős mikotoxin az aflatoxin

bioszintetikus prekurzora a hepatokarcinogén szterigmatocisztin (pl. *A. versicolor*, *A. ustus*, *A. nidulans*, *A. flavus*), a ciklopiazonsav (pl. *A. flavus*, *A. versicolor*), az aszpertoxin (*A. flavus*) és a fumagillin (*A. fumigatus*) (Eble és Hanson 1951; Rodricks és munkatársai 1968; Rabie és munkatársai 1977; Richard és munkatársai 1992; Yu és Leonard 1995; Cai és munkatársai 2011).

Az *A. nidulans* genomja több mint 70 szekunder metabolit génklaszterét tartalmazza (Inglis és munkatársai 2013). Ismertebb szekunder metabolitjai - a szterigmatocisztin mellett - az asperthecin, aspyridone, austinol, monodichthyphenon, emericellamide, terriquinone és a penicillin (Yin és munkatársai 2013). Az *A. nidulans* bár gyakran izolálható a takarmányozásra szánt szénáról (és az alomként használt szalmáról), mikotoxin termelésének gyakorlati (állategészségügyi) vonatkozásai alig ismertek (Anzai és munkatársai 2000).

Az utóbbi években számos *Aspergillus* fajt izoláltak humán fertőzésekből. Nemcsak a bőr (dermatitis), a köröm (onychomycosis), a külső hallójárat (otomycosis), vagy a szem (keratitis) fertőzéseiből mutatták ki jelenlétüket (Papouli és munkatársai 1996; Kredics és munkatársai 2007; Aneja és munkatársai 2010; Moreno és Arenas 2010; Manikandan és munkatársai 2013), de szisztémás fertőzéseket is okozhatnak. A leggyakoribb humán oportunista kórokozó az *A. fumigatus* (Latgé 1999). Legyengült immunállapotban (pl. transzplantációt követő gyógyszeres kezelés, kemoterápia, nagy mennyiségű kortikoszteroid fogyasztása, leukémia, limfóma, tuberkulózis, AIDS) a tüdőbe jutott konidiumok kicsírázva a tüdőt, illetve a légutakat fertőzik, de súlyosabb esetben a szervezet egésze fertőzötté válik, s a gombasejtek a vesében, agyban is megjelenhetnek. Az *A. fumigatus* konidiospórák szenzibilizáció útján a légzőhám túlérzékenységet, hosszabb idő után allergiás asztmát is okozhatnak. Az *A. fumigatus* mellett az *A. flavus*

a második leggyakoribb humán fertőzést okozó *Aspergillus* faj (Hedayati és munkatársai 2007), de igen sokféle *Aspergillus* fajt izoláltak már emberi fertőzésekből, többek között *A. versicolor*, *A. niger*, *A. brasiliensis*, *A. tubingensis*, *A. nomi*, *A. tamarii*, *A. pseudonominis*, *A. sydowii*, *A. luchuensis*, *A. terreus*, *Eurotium amstelodami* (Aneja és munkatársai 2010; Moreno és Arenas 2010; Manikandan és munkatársai 2013).

Az *A. nidulans* humán patogén jelentősége nem számottevő. A gyengén patogén fajok között tartják számon. Ennek ellenére izolálták már emberi körömről és másodlagos fertőzésekből is (Fassatióvá 1984). A Bridges-Good szindrómában szenvedő betegeknél esetenként tüdő aszpergillózist is okozhat (Segal és munkatársai 1998). Sőt, broncocentrikus granulomatózisban szenvedő beteg hörgőjéből is kimutatták már (Segal és munkatársai 1998). Állatorvosi jelentősége lényegesen nagyobb: Lovaknál a légzsák (guttural pouch) egyik legfontosabb kórokozója (Anzai és munkatársai 2000).

Az élelmiszeriparban az *A. oryzae*, *A. sojae* és *A. tamari* fajok töltenek be kiemelkedő szerepet (Gugnani 2003). Jelentőségük a tradicionális ázsiai fermentációs ételek, italok (pl. rizsbor, rizsecet, szójaszós, szaké és szójabab paszta) gyártásában van (Sasa és Takagi 2004; Abe és Gomi 2008; Machida 2008). Európában *Aspergillus* fajokat használnak egyes penészérlelésű kolbászok/szalámik gyártásánál (Gugnani 2003).

Az *Aspergillus*okat a fermentációs iparban szerves savak, különféle szekunder metabolitok és enzimek előállítására, illetve különféle biokonverziós folyamatokban használják. A teljesség igénye nélkül néhány példa: citromsav és glükonsav gyártás (*A. niger*) (Bentley és Bennett 2008), itakonsav és cisz-akonitsav előállítása (*A. itaconicus*, *A. terreus*) (Okabe és munkatársai 2009), lovasztatin (*A. terreus*) (Manzoni és Rollini 2002; Patil és munkatársai 2011), echinocandin B (*A. rugulosus*) (Emri és munkatársai 2013), alkaloidok és szteroidok biokonverziója (*A. ochraceus*, *A.*

sclerotiorum) (Hill és Johnson 1969; Petroski és munkatársai 1983; Chen és munkatársai 1994). Számos *Aspergillus* fajt igen sokféle enzim (pl. amiláz, lipáz, celluláz, pektináz, kataláz, proteináz, glükóz oxidáz) (Godfrey és West 1996; Pedersen és munkatársai 2000; Fleissner és Dersch 2010) gyártására használnak.

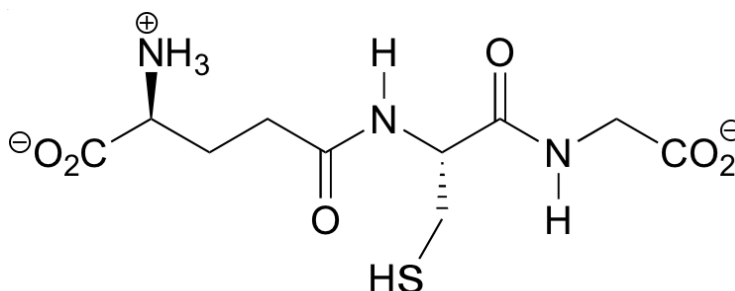
Intenzív fehérje szekréciós képességük miatt, a csak kevés proteázt termelő törzseket humánterápiás fehérjék heterológ expressziójára is fel szeretnék használni a jövőben (*A. japonicus*, *A. oryzae*, *A. niger*) (Archer 2000; Abe és munkatársai 2006; Archer és Turner 2006). A sejtfaluk nagy mennyiségben képes nehézfémeket megkötni, így bioszorpciós folyamatokban (pl. szennyvíztisztítás) is lehet jelentőségük (Ahluwalia és Goyal 2007).

Az *A. nidulans* ipari jelentősége kicsi. Elsősorban, mint modell organizmus ismert az ipari szakemberek számára is. Pontecorvo és munkatársa (1953) vizsgálatainak köszönhetően vált a mikológiai kutatások egyik legismertebb alanyává. Gyakran használják a fonalas gombák stressz válaszainak vizsgálatára, a mikrotubulusok, motorfehérjék (pl. kinezin, dinein), valamint a génműködés szabályozásának tanulmányozására (Timberlake 1990; Martinelli 1994; David és munkatársai 2008). Felhasználják az eukarióta sejtbiológiában a rekombináció, DNS repair és a sejtciklus szabályozásának tanulmányozására (Oakley és Morris 1981; Kafer és Chae 2008) is. Ipari jelentőségű folyamatok például heterológ expresszió és extracelluláris enzimtermelés vizsgálatára (Emri és munkatársai 2008; Spröte és munkatársai 2009), a penicillin és szterigmatocisztin termelés szabályozásának megértésére (Brakhage 1998; Shimizu és Keller 2001) is alkalmas. Emellett eredményesen alkalmazták emberi örökletes metabolikus betegségek (pl. alkaptonuria) molekuláris biológiai hátterének felderítésére (Fernandez-Canon és Penalva 1995).

2.2 A glutation anyagcsere

2.2.1 A glutation és tulajdonságai

A GSH (γ -L-glutamil-L-ciszteinil-glicin; γ -L-Glu-L-Cys-Gly) egy kis molekulatömegű, Cys-je révén SH-csoportot tartalmazó antioxidáns molekula (Fahey és munkatársai 1984, 5. ábra).



5. ábra A GSH szerkezete.

(<http://chem.libretexts.org/@api/deki/files/4080/=image151.png?revision=1>)

Filogenetikailag az egyik legősibb peptid. A prokarióták nagy részében (elsősorban a Gram negatív fajokban, de néhány Gram pozitív baktériumban is - pl. *Streptococcus agalactiae* (Janowiak és Griffith 2005), vagy *Lactobacillus fermentum* (Kullisaar és munkatársai 2010)) és szinte az összes eukariótában előfordul (Meister és Anderson 1983; Penninckx és Elskens 1993; Hell 1997; Fahey és munkatársai 2001; Pócsi és munkatársai 2004; Smirnova és Oktyabrsky 2005). Megtalálható a citoszolban, a sejtmagban és a mitokondriumban egyaránt, akár 10 mM-os koncentrációban is (Meister és Anderson 1983; Hwang és munkatársai 1992; Penninckx és Elskens 1993). Jelen van az extracelluláris térben; növényeknél az apoplast fontos eleme (Vanacker és munkatársai 1998). Nagy koncentrációjából adódóan fontos S és N raktár, de mint tartalék tápanyag is funkcionálhat éhezés alatt (Pócsi és munkatársai 2004). Azon fajokban ahol nincs jelen a GSH, a GSH-t más tiol-

tartalmú molekulák helyettesítik. Halobaktériumokban a fő tiol a γ -glutamil-Cys (Sundquist és Fahey 1989), míg a Lyme-kór kórokozója a *Borrelia burgdorferi* koenzim A-t akkumulál a GSH funkciójának helyettesítésére (Boylan és munkatársai 2006). A *Mycobacterium tuberculosis* és számos *Streptomyces* faj GSH helyett egy Cys tartalmú molekulát, a mikotiolot tartalmazza nagy mennyiségben (Newton és munkatársai 2005). A GSH-t nem tartalmazó eukarióták közül, a humán patogén *Entamoeba histolytica*-ban Cys akkumulálódik különböző stressz hatásokra (Ariyanayagam és Fairlamb 1999), míg a *Crithidia fasciculata* és a *Trypanosoma brucei* GSH helyett tripanotiont (N1, N6-bisz-glutationil-spermidin) termel (Fairlamb és munkatársai 1985; Ariyanayagam és Fairlamb 1999; Krauth-Siegel és munkatársai 2005). Egyes magasabb rendű növények GSH mellett γ -glutamil-ciszteinil-alanin (homoglutation) szintézisére is képesek (Tausz és munkatársai 2004).

SH-csoportja révén számos redox folyamatban vehet részt. Spontán elreagálhat a szuperoxiddal, peroxidokkal, szinglet oxigénnel, hidroxil szabadgyökkel, hipoklórossavval, peroxinitrittel, vagy akár a nitrogén-dioxid szabadgyökkel és számos redox reakciót katalizáló enzim kofaktoraként is működik (Izawa és munkatársai 1995; Stephen és Jamieson 1996; Halliwell és Gutteridge 1999; Kuzniak és Sklodowska 2001). Oxidált formája a glutation diszulfid (GSSG), mely két GSH molekula SH-csoportjának oxidálása révén, diszulfid kötés kialakításával jön létre. Vegyes diszulfidok kialakítására is képes; koenzim A-hoz, Cys-hez, sőt fehérjék Cys oldalláncához is hozzákapcsolódhat (Meister és Anderson 1983; Penninckx és Elskens 1993; Hell 1997; Vuilleumier és munkatársai 1997; Fahey és munkatársai 2001; Pócsi és munkatársai 2004). A fehérje-GSH vegyes diszulfidok kialakulásának (a fehérjék glutationilációjának) fontos szerepe van a fehérjék SH-csoportjainak védelmében erős oxidatív stressz alatt,

illetve a kiszáradás okozta oxidatív károsodások megelőzésekor (Dalle-Donne és munkatársai 2009), de részt vehet jelátviteli folyamatok szabályozásában is (Dalle-Donne és munkatársai 2009). Stresszmentes körülmények között a GSSG arányát <10 %-ra becsülik (Penninckx és Elskens 1993; Pócsi és munkatársai 2004).

Az SH-csoportja segítségével enzimkatalizált, vagy akár spontán nukleofil szubsztitúciós és addíciós reakciókban egyaránt részt vehet. Halogénezett telített, telítetlen és aromás szerves vegyületekkel, szulfonátokkal, szubsztitúciós, míg keton-, aldehid- és észter-csoportokkal, nitrilezett szerves vegyületekkel, telítetlen aldehidekkel, epoxidokkal addíciós reakcióba léphet (Armstrong 1994; Townsend és Tew 2003; Anders 2004; Hayes és munkatársai 2005).

A GSH, γ -glutamil-csoportjának köszönhetően transzpeptidációs reakciókban, mint γ -glutamil donor is közreműködhet (Penninckx és Elskens 1993; Pócsi és munkatársai 2004).

Komplexxépző tulajdonsága miatt a GSH stabil komplexbe tudja zárni a Cd^{2+} -ot ($\text{GSH}_2\text{Cd}^{2+}$), így hatékonyan részt tud venni a Cd^{2+} detoxifikációjában - pl. a *S. cerevisiae* esetében (Mendoza-Cózatl és munkatársai 2005). (A $\text{GSH}_2\text{Cd}^{2+}$ komplex megfelelő transzporter rendszerek segítségével szekretálódik, illetve a vezikulumban akkumulálódik (Mendoza-Cózatl és munkatársai 2005)). Érdeemes megjegyezni, hogy növényekben, de a *Schizosaccharomyces pombe* esetében is a GSH-ból képződő fitokelatinok, *S. pombe* esetében $(\gamma\text{Glu-Cys})_n\text{-Gly}$, látnak el hasonló funkciót Cd^{2+} stressz alatt (Mendoza-Cózatl és munkatársai 2005).

A GSH szerkezete hasonló az ACV tripeptid (δ -L- α -aminoadipil-L-ciszteinil-D-valin) szerkezetéhez, ami a penám és cefém vázas β -laktám antibiotikumok szintézisének intermediere (van de Kamp és munkatársai 1999). Nem meglepő módon a GSH gátolja az ACV szintáz és az ACV-t

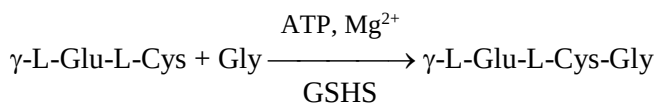
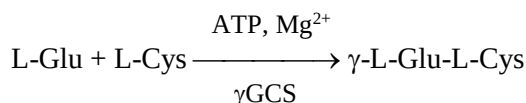
izopenicillinné alakító izopenicillin N szintáz működését, ami jelentősen befolyásolhatja ezen antibiotikumok képződését (Ramos és munkatársai 1985; Theilgaard és Nielsen 1999; van de Kamp és munkatársai 1999; Emri és munkatársai 2000; Pócsi és munkatársai 2001; Nagy és munkatársai 2003).

A GSH-t nagy mennyiségben állítja elő a fermentációs ipar, mint primer metabolitot elsősorban *S. cerevisiae* és *Candida utilis* mutáns törzseinek segítségével (Li és munkatársai 2004; Bachhawat és munkatársai 2009). Felhasználják a humán terápiában (pl. kemoterápiát és sugárterápiát követően, mint antioxidánst), valamint az élelmiszeriparban (funkcionális élelmiszerek készítése) és a kozmetikai iparban (antioxidánsként, illetve ráncatlanító és hidratáló készítmények összetevőjeként) is (Wei és munkatársai 2003; Li és munkatársai 2004).

2.2.2 A glutation anyagcsere fontosabb reakciói

1.) Bioszintézis

A GSH két lépésben, γ -Glu-Cys köztitermék képződése közben, szintetizálódik L-Glu, L-Cys és Gly aminosavakból. A két lépést a γ -Glu-Cys ligáz/szintáz (γ GCS) és a GSH szintáz (GSHS) enzimek katalizálják:

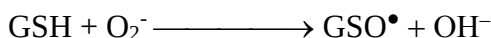


A *Streptococcus agalactiae* esetében a szintézisért egy bifunkcionális γ GCS és GSHS aktivitással rendelkező fehérje felelős (Janowiak és Griffith 2005). A legtöbb fajban a GSH feed back gátolja a GSH szintézis folyamatát

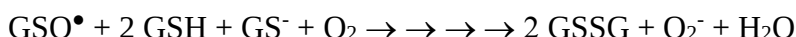
(leggyakrabban a γ GCS működését) (Pócsi és munkatársai 2004). A három GSH alkotó aminosav közül leggyakrabban a Cys mennyisége a limitált. Nem meglepő módon a GSH szintézis indukciója gyakran együtt jár a Cys transzportjának, szintézisének, illetve a Met - Cys átalakulásnak az aktiválódásával (Pócsi és munkatársai 2004). A γ GCS-t kódoló *gsh1/gshA* gén deléciója a *S. cerevisiae* (Grant és munkatársai 1996; Sharma és munkatársai 2000), a *S. pombe* (García-Santamarina és munkatársai 2013) és az *A. nidulans* esetében (Leiter Éva, Debreceni Egyetem személyes közlése) is GSH auxotrófiához vezet. Azaz, a GSH esszenciális e gombák számára stresszmentes körülmények között is. Meglepően kevés GSH is elegendő a sejtek normál működéséhez: A *S. cerevisiae* esetében például a stresszmentes körülmények között mért koncentráció százada már képes fenntartani a sejtek normál növekedését (Lee és munkatársai 2001). A GSH esszencialitását leginkább azzal magyarázzák, hogy a GSH kis mennyiségben ugyan, de szükséges a membránintegritás megőrzéséhez és a mitokondriumok stabilitásához is (Pócsi és munkatársai 2004). A GSHT-t kódoló *gsh2* gén deléciója nem eredményezett GSH auxotrófiát sem *S. cerevisiae*-ben, sem *S. pombe*-ben. Feltehetőleg ebben az esetben a felhalmozódó γ -glutamil-Cys részben átvette a GSH funkcióit (Grant és munkatársai 1997; Sideri és munkatársai 2014). Érdeemes megemlíteni, hogy szemben a fent említett gombákkal, *Escherichia coli* esetében sem a γ GCS, sem a GSHT, sem mindkettőnek a hiánya nem okozott GSH auxotrófiát, de - a gombáknál tapasztaltakhoz hasonlóan - jelentősen megnövelte a baktérium oxidáló szerekkel szembeni érzékenységét (Fuchs és munkatársai 1983).

2.) Redox reakciók

- A GSH képes spontán elreagálni a szuperoxiddal, bár a folyamat nem annyira gyors, mint azt korábban gondolták (Winterbourn és Metodiewa 1994):

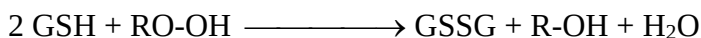
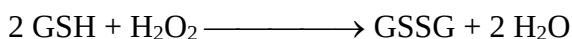


A képződött GSH-szulfínil szabadgyök (GSO[•]) több lépésben GSSG-vé alakul (Winterbourn és Metodiewa 1994):



Mint ahogy ez utóbbi folyamat szuperoxid képződésével jár, így a GSH szerepe a szuperoxid elleni védelemben kétséges (Winterbourn és Metodiewa 1994). Sőt, inkább úgy tartják, hogy a fenti folyamatok kifejezetten veszélyesek a sejtek számára a képződő reaktív köztitermékek miatt és a szuperoxid dizmutáz egyik fontos feladata, hogy a szuperoxid koncentráció alacsonyan tartásával megakadályozza a GSH szuperoxid általi oxidációját a mitokondriumban (Jones és munkatársai 2003). A GSH és a szuperoxid reakciójában képződő reaktív GSH formáknak ugyanakkor fontos szerepe lehet az S-nitrozoglutation (NO anyagcsere fontos eleme) képződésében (Schrammel és munkatársai 2003).

- A GSH peroxidokkal szintén spontán elreagál (Pócsi és munkatársai 2004):



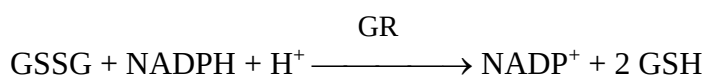
E folyamatot a glutation peroxidáz (GPx) és egyes peroxidáz aktivitást mutató glutation-S-transzferázok (GST) is katalizálhatják (Pócsi és munkatársai 2004). (*S. pombe* esetében például a sokféle GST közül csak a

GST3 rendelkezik peroxidáz aktivitással; Veal és munkatársai 2002.) A peroxiredoxinok szintén képesek a peroxidok redukálására. Egyes típusaik tioredoxin helyett glutaredoxint, illetve GSH-t használnak redukáló erőként (Rouhier és Jacquot 2005; Dayer és munkatársai 2008). Érdemes megemlíteni, hogy sok GPx viszont tioredoxinnal (is) működik (Rouhier és Jacquot 2005; Dayer és munkatársai 2008; Kim és munkatársai 2010). A fenti enzimek lokalizációjukban, stabilitásukban és szubsztrát specificitásukban is eltérnek egymástól, illetve más peroxidokat bontó enzimektől (pl. kataláz, citokróm c, peroxidáz stb.) (Pócsi és munkatársai 2004; Dayer és munkatársai 2008).

- A GSH szükséges a glutaredoxin redukált állapotban tartásához (az eloxidálódott glutaredoxin visszaredukálásához) is. A glutaredoxin (a tioredoxin rendszerrel együttműködve) sokféle biokémiai reakcióban vesz részt (Grant 2001), melyek közül oxidatív stressz alatt a fehérjék diszulfid hídjainak visszaredukálása (Grant 2001; Pócsi és munkatársai 2004), míg stresszmentes körülmények között a dezoxiribonukleotidok szintézise a legjelentősebb (Grant 2001).

- A GSH, a GSH-függő dihidroaszcorbinsav reduktáz közvetítésével részt vesz a C-vitamin és azon keresztül az E vitamin regenerálásában (Gille és Sigler 1995; Rahman 2007).

- A fenti redox folyamatokban GSSG keletkezik. A GSSG NADPH segítségével tud redukálódni, egy a glutation reduktáz (GR) által katalizált folyamatban:

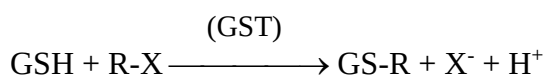


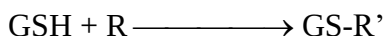
A GR génjének deléciója a *S. cerevisiae*-ben (Muller 1996), és az *A. nidulans*-ban (Sato és munkatársai 2009; Leiter Éva szóbeli közlése, Debreceni Egyetem) is növeli a törzs oxidatív stresszel szembeni érzékenységét és az *A. nidulans* esetében stresszmentes körülmények között is lassítja a gomba növekedését, de nem letális hatású. Feltehetőleg a tioredoxin rendszer veszi át a GSH anyagcsere helyét és/vagy intenzív GSH szintézis és a folyamatosan képződő GSSG lebontása ellensúlyozza a GR hiányát (Muller 1996; Sato és munkatársai 2009; Leiter Éva szóbeli közlése, Debreceni Egyetem). Meglepő módon a *S. pombe* esetében a GR génjének deléciója letális hatású (Song és munkatársai 2006; Kim és munkatársai 2010).

Redox tulajdonságaiból adódóan a GSH fontos antioxidáns molekula, amely más antioxidáns rendszerekkel együttműködve (pl. tioredoxin rendszer), esetenként azok működését segítve (C- és E-vitamin) részt vesz a reaktív oxigén és nitrogén formák (elsősorban a peroxidok) eliminálásában, az ezektől eltérő szabadgyökök hatástalanításában, a nem kívánt diszulfidok regenerálásában és ezen keresztül a sejtek redox egyensúlyának fenntartásában és az oxidatív stressz kivédésében (Penninckx és Elskens 1993; Pócsi és munkatársai 2004).

3.) Konjugációs reakciók

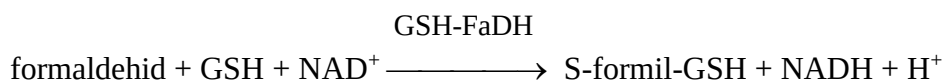
A GSH nukleofil szubsztitúciós és addíciós reakciókban igen sokféle molekulához képes kapcsolódni. E reakciók egy részét a GST transzferáz is katalizálja (Armstrong 1994; Townsend és Tew 2003; Anders 2004; Hayes és munkatársai 2005).



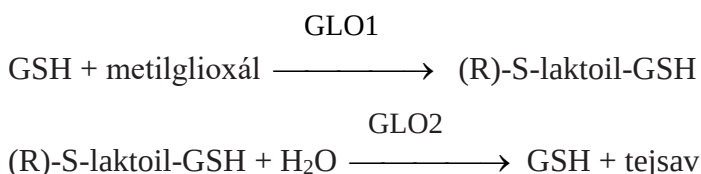


Az eukarióta sejtek igen sok és sokféle citoszolikus, mitokondriális és mikroszomális GST-t tartalmazhatnak, melyek nem csak lokalizációjukban, de szubsztrát specifitásukban is eltérnek egymástól (Armstrong 1994; Eaton és Bammler 1999; Strange és munkatársai 2001; Hayes és munkatársai 2005; Josephy 2010). Egyes GST-ok fontos jelátviteli feladatokat látnak el és többek között MAP kináz (MAPK) útvonalak működését szabályozzák (Laborde 2010). A GST által létrehozott, vagy spontán keletkező glutation-S-konjugátumokat (GS-R), illetve a belőlük képződő egyéb vegyületeket (legismertebb a merkaptursav útvonal: Zadzinski és munkatársai 1996; Hayes és munkatársai 2005; Prévéral és munkatársai 2009) különféle transzporter rendszerek az extracelluláris térbe, vagy a vakuólumba szállítják (Armstrong 1994; Li és munkatársai 1997; Eaton és Bammler 1999; Gomes és munkatársai 2002; Halliwell és Gutteridge 2007; Josephy 2010).

- A GSH részt vehet a formaldehid oxidálásában a GSH-függő formaldehid dehidrogenáz (GSH-FaDH) és az S-formil-glutation hidroláz (FGH) közreműködésével (Chasseaud 1979; Shen és munkatársai 1998; Baerends és munkatársai 2002). A GSH-FaDH a GSH és a formaldehid addíciós reakciójával keletkező S-hidroximetil-GSH-t oxidálja, majd a létrejövő tioészter a FGH segítségével hidrolizál:



- A glioxaláz rendszer részeként a GSH közreműködik a metilglioxál eliminálásában (Penninckx és Elskens 1993; Inoue és Kimura 1995). A glioxaláz rendszert a GSH-függő glioxaláz I (GLO1) és a glioxaláz II (GLO2) enzimek alkotják, melyek az alábbi reakciókat katalizálják:



A GSH ebben az esetben is spontán addicionálódik a metilglioxál formil-csoportjára, amit egy izomerizációs lépés (GLO1) és a létrejött tioészter hidrolízise (GLO2) követ.

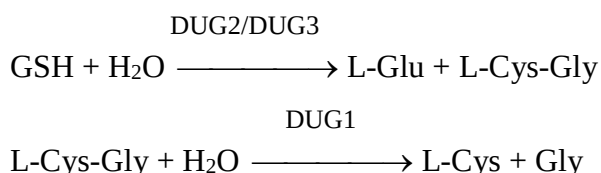
A fenti reakciók fontos detoxifikációs folyamatok alapját képezhetik a sejtekben, melyek nem csak a xenobiotikumokkal, de a sejtek normál anyagcseréje során képződő toxikus molekulákkal szemben is védelmet nyújtanak (Armstrong 1994; Fraser és munkatársai 2002; Townsend és Tew 2003; Anders 2004; Hayes és munkatársai 2005; Singh és munkatársai 2012).

4.) A GSH lebomlásával járó reakciók

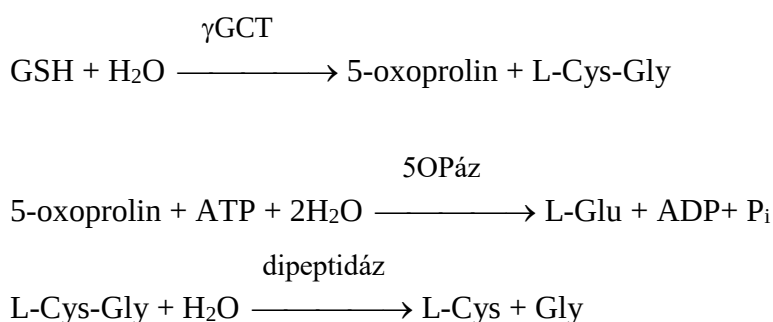
A (citoszolikus) GSH lebontása az egyes fajokban eltérő módon mehet végbe. Az első lépés minden esetben a γ -glutamil kötés megbontása, aminek következtében a GSH szintézise és lebontása eltérő közti termék képződésével jár, így a két folyamat egymástól függetlenül is szabályozható (Penninckx és Elskens 1993).

- Gombákban (pl. *S. cerevisiae*, *Candida albicans*) a DUG útvonal jelenlétét mutatták ki (Kumar és munkatársai 2003; Ganguli és munkatársai 2007;

Desai és munkatársai 2011; Kaur és munkatársai 2012). A DUG útvonalat egy Cys-Gly metallo-di-peptidázt kódoló *dug1* gén, valamint egy glutamin aminotranszferáz komplex kétféle alegységét kódoló *dug2* és *dug3* gének alkotják (Kaur és munkatársai 2012). A glutamin aminotranszferáz komplex a γ -glutamil csoportot, míg a dipeptidáz a felszabaduló Cys-Gly hidrolizálja.



- Növényekben és emlős sejtekben a DUG útvonaltól eltérő útvonal működik. Ezen sejtekben a citoszolikus GSH szerkezetét egy GSH-ra specifikus γ -glutamil ciklotranszferáz (γ GCT) bontja meg és a keletkező 5-oxoprolint egy 5-oxoprolináz (5OPáz), a Cys-Gly-t egy dipeptidáz hidrolizálja (Ohkama-Ohtsu és munkatársai 2008; Kumar és munkatársai 2012).

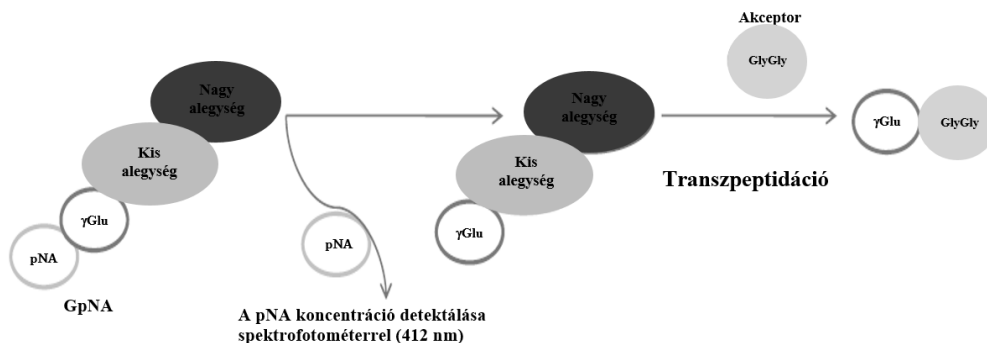


- A fentiekén túl a γ GT szintén képes nem csak a GSH, de a GSSG és a GS-R-ek szerkezetének megbontására is (Penninckx és Elskens 1993; Pócsi és munkatársai 2004).

2.3 A γ -glutamil transzpeptidáz fiziológiai szerepe

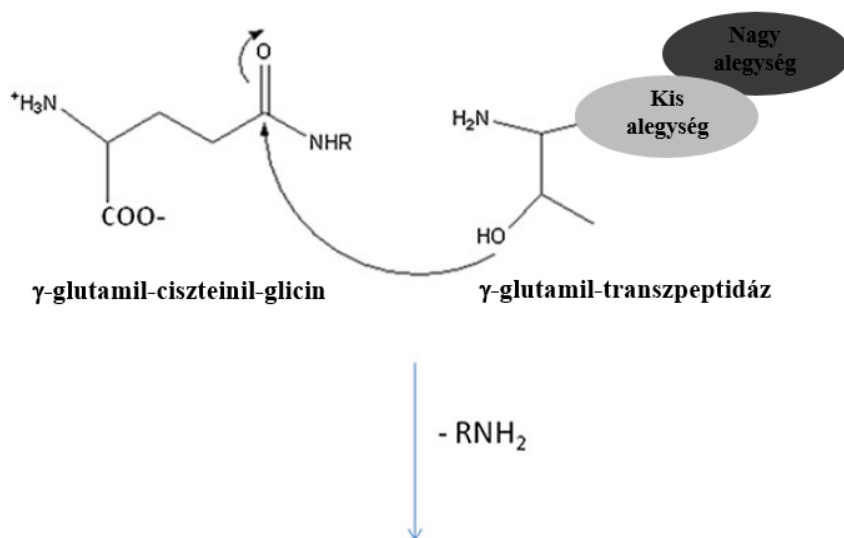
A γ GT-ok (EC 2.3.2.2) a prokarióták, archeák és eukarióták körében is általánosan elterjedt, evolúciósan erősen konzervált enzimek (Verma és munkatársai 2015). Felépítésüket tekintve az NTN-hidrolázok („N-terminal nucleophile hydrolases”) szupercsaládjába tartoznak. Bár ismertek egy alegységből álló γ GT-ok is (Martin és Slovin 2000; Nakano és munkatársai 2006), jellemző rájuk a heterodimer szerkezet. A két alegységet ugyanazon gén kódolja, de az egyik alegység - szintézisét követően - autokatalitikusan módosul (Inoue és munkatársai 2000; Minami és munkatársai 2004; Okada és munkatársai 2007). A *S. cerevisiae* esetében például az ECM38/Cis2 gén egy 64 kDa-os fehérjét kódol, amelyből proteolitikus hasítást követően egy 29 kDa-os fehérje is kialakul, így a heterodimert egy 64 és egy 29 kDa alegység alkotja (Jaspers és Penninckx 1984; Jaspers és munkatársai 1985; Mehdi és munkatársai 2001). A γ GT-ok további, jellegzetes közös tulajdonsága a négyrétegű, $\alpha\beta\beta\alpha$ struktúrájú (a *Bacillus anthracis* esetében hatrétegű, $\alpha\alpha\beta\beta\alpha\alpha$ struktúrájú; Wu és munkatársai 2009), „szendvics” szerkezet (Verma és munkatársai 2015).

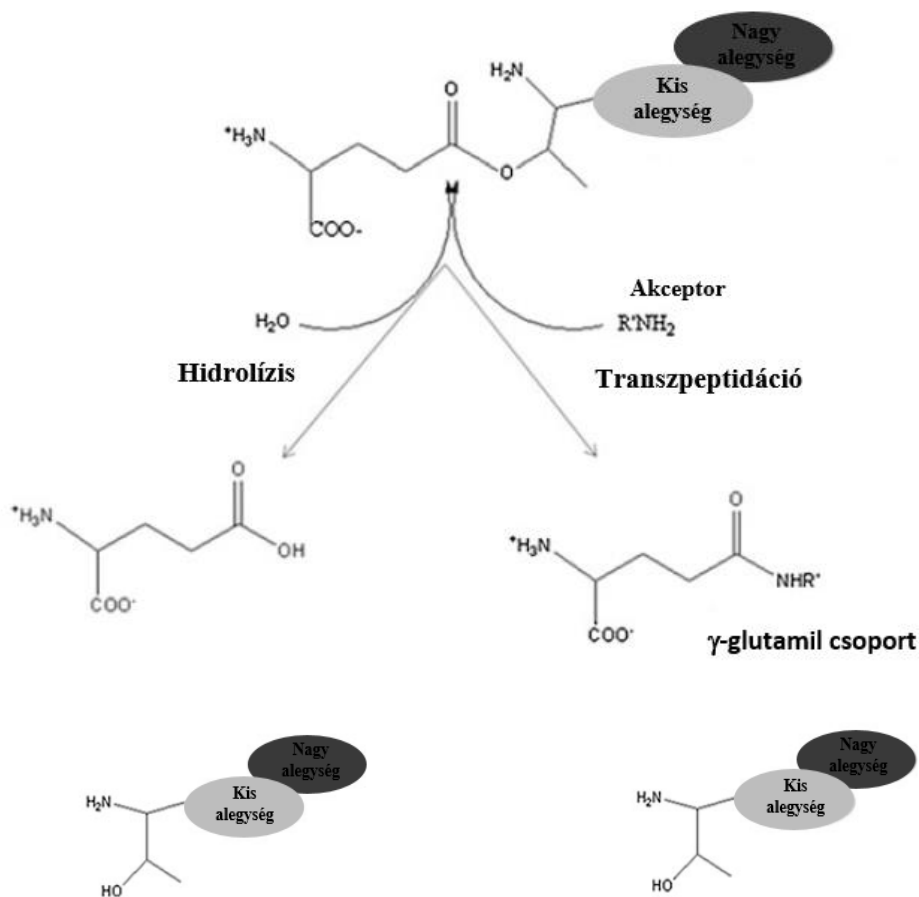
A γ GT-ok γ -glutamil vegyületek γ -glutamil csoportját helyezik át más molekulákra. Ennek megfelelően aktív centrumuk is egy a γ -glutamil donor és egy a γ -glutamil akceptor megkötésére alkalmas részből épül fel. A γ -glutamil donor lehet GSH, GSSG, GS-R, glutamin (Gln), γ -glutamil dipeptid és sok más γ -glutamil vegyület, pl. a γ -glutamil-p-nitroanilid (γ GpNA) (Pócsi és munkatársai 2004) is. Ez utóbbi molekulának az enzim detektálásában van jelentősége (6. ábra).



6. ábra A γ GT aktivitás mérésének elve (Castellano és Merlino 2013).

A γ -glutamil akceptor leggyakrabban valamilyen aminosav, vagy peptid, de lehet hidroxil-amin és víz is. Ez utóbbi esetben nem transzpeptidációról, hanem a γ -glutamil vegyületek hidrolíziséről beszélünk (Pócsi és munkatársai 2004, 7. ábra). Sok γ GT esetében a fő aktivitását a hidrolízis és nem a transzpeptidáció jelenti (Harding és munkatársai 1997; Mehdi és munkatársai 2001).

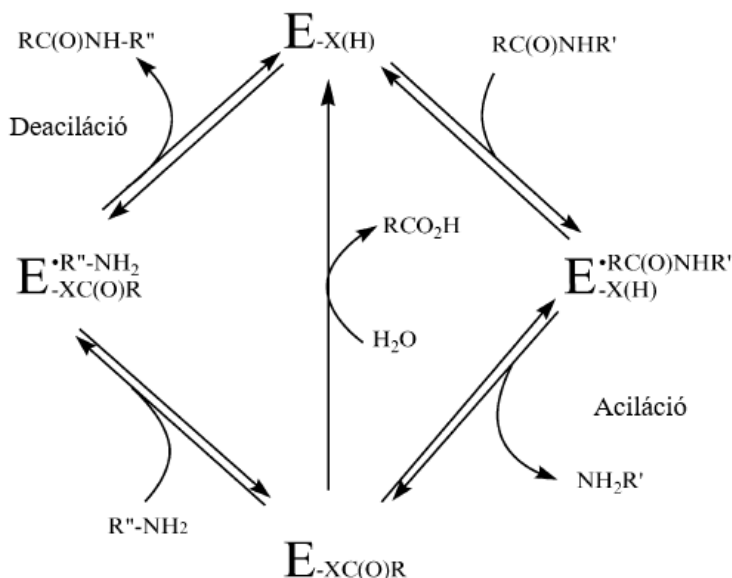




7. ábra A γ GT katalizált transzpeptidációs és hidrolízis reakciók (Castellano és Merlino 2013).

A reakciómechanizmusra a ping-pong bi-bi mechanizmus egy változata jellemző (8. ábra): 1. Az enzim megköti a γ -glutamil donort, majd a γ -glutamil csoporttal acilezi az aktív centrum egyik aminosavának (hidroxil) oldalláncát. 2. Felszabadul a γ -glutamil csoportját vesztett szubsztrát (első termék). 3. A γ -glutamil akceptor megkötése és acilezése. 4. Az acilezett második termék is felszabadul. A két szubsztrát tehát egy időben nincs jelen az aktív centrumban (a γ -glutamil csoportot leszámítva) és az enzim szabad,

illetve γ -glutamilezett formában van jelen. A γ -glutamil donor a szabad enzimet képes acilezni, míg a γ -glutamil akceptor a γ -glutamilezett enzimet tudja deacilezni.



8. ábra A γ GT ping-pong bi-bi reakciómechanizmusa (Castonguay és munkatársai 2003).

A sejtek egynél több γ GT génnel is rendelkezhetnek. Egy γ GT gént hordoz az *E. coli*, a *S. cerevisiae* és sok rágcsáló genomja (Jaspers és Penninckx 1984; Suzuki és munkatársai 1988; Zhang és Forman 2009). Két γ GT génnel rendelkezik a *S. pombe* (Park és munkatársai 2004), míg a *Colletotrichum graminicolab*an három (Bello és munkatársai 2013), illetve a *Trichoderma atroviridae*, *T. reesei*, *T. virens* és az *Arabidopsis thaliana* fajokban négy γ GT gén található (Storozhenko és munkatársai 2002; Bello és Epstein 2013). A humán genom szintén legalább 4 γ GT gént tartalmaz (Zhang és munkatársai 2005). Az *Aspergillus* fajokban 2-4 potenciális, γ GT domaint

kódoló gén található (az *A. nidulans* esetében kettő), de az ezek által kódolt fehérje katalitikus aktivitása egyik esetben sem ismert.

A γ GT-ok mérete, hőmérséklet és pH optimuma, reakciókinetikai paraméterei igen változatosak (Brenda adatbázis). Sejten belüli lokalizációjuk és fiziológiai jelentőségük szintén változatos. Az eddig vizsgált élesztő fajokban a γ GT (Springael és Penninckx 2003; Matsuyama és munkatársai 2006) a vakuoláris membránhoz kötötten van jelen. A *S. cerevisiae* esetében ezen enzim részt vesz a vakuólumban raktározott GSH lebontásában, ami lehetővé teszi a felszabaduló aminosavak hasznosítását nitrogénéhező körülmények között (Mehdi és Penninckx 1997; Springael and Penninckx 2003), sőt a GSH szintézis út alapanyagainak biztosításával - paradox módon - hozzájárulhat a sejtek citoszolikus GSH tartalmának növekedéséhez is, amit Cd^{2+} stressz alatt figyeltek meg (Adamis és munkatársai 2009). Valószínűleg a γ GT-ok hasonló folyamatokban vehetnek részt a *S. pombe* esetében is. Erre utal, hogy a vakuoláris membránkötött γ GT-okat kódoló *ggt1* és *ggt2* gének szén- és nitrogénéhezésre, valamint oxidatív és nitrozatív stresszre is indukálódnak (Park és munkatársai 2004; Kang és munkatársai 2005). Emlős sejtek esetében a γ GT a citoplazma membránon lokalizálódik és az extracelluláris GSH, illetve más extracelluláris γ -glutamil vegyületek lebontásában és hasznosításában működik közre. Itt is megfigyelhető, hogy az extracelluláris GSH lebontásából felszabaduló aminosavak serkentik a sejtek citoszolikus GSH szintézisét (Zhang és munkatársai 2005; Heisterkamp és munkatársai 2008; Zhang és Forman 2009). Prokariótákban az enzim gyakran periplazmikusan (Gram negatív fajok), vagy sejtfalhoz kötötten, illetve extracellulárisan (Gram pozitív fajok) van jelen és különféle γ -glutamil vegyületek (pl. a poli- γ -glutamil-glutamát kapszula, GSH, Gln) lebontásában és C, N, illetve S forrásként való hasznosításában működik

közre (Hanigan és Ricketts 1993; Kimura és munkatársai 2004; Minami és munkatársai 2004; Shibayama és munkatársai 2007). A humánpatogén *Helicobacter pylori* esetében a γ GT termelés fontos virulencia faktor. A baktérium ezen enzim segítségével tudja az extracelluláris Gln-t és GSH-t nitrogén forrásként hasznosítani (Shibayama és munkatársai 2007), de a bakteriális γ GT részt vesz a CD₄-pozitív T sejtek gátlásában is (Schmees és munkatársai 2007). A szintén humánpatogén *B. anthracis* esetében a poli- γ -D-glutamil-D-glutamát típusú kapszula a baktérium γ GT-a segítségével kapcsolódik kovalens kötéssel a sejtfalhoz, jelentősen megnövelve a sejtek virulenciáját (Candela és Fouet 2005).

Extracelluláris/sejtfalhoz kötött γ GT-zal rendelkezik a *Histoplasma capsulatum* (Zarnowski és munkatársai 2008) és a *C. graminicola* is (Bello és munkatársai 2013). Ez utóbbi gombafaj esetében az enzim részt vesz az extracelluláris GSH N forrásként való felhasználásában (Bello és munkatársai 2013). Meglepő módon a citoszolikus GSH lebontásában és a citoszolikus GSH koncentráció szabályozásában az eddig vizsgált γ GT-oknak nincs szerepe (Kumar és munkatársai 2003; Ganguli és munkatársai 2007; Ohkama-Ohtsu és munkatársai 2008; Kumar és munkatársai 2012). E feladatot, az előző fejezetben említett „alternatív” GSH lebontó útvonalak látják el (Kumar és munkatársai 2003; Ganguli és munkatársai 2007; Ohkama-Ohtsu és munkatársai 2008; Kumar és munkatársai 2012).

A γ GT-ok nem csak az extracelluláris, illetve vakuoláris γ -glutamil vegyületek (köztük a GSH) lebontásában működhetnek közre. A GSSG lebontásával a redox egyensúly (GSH/GSSG arány) fenntartásához is hozzájárulhatnak. Ez különösen a sejtfalban, növényeknél az apoplasztban fontos, ahol nincs lehetőség a GSSG redukálására glutation reduktáz segítségével. A redox egyensúly megtartásában fontos γ GT-t írtak le - többek

között - az *A. thaliana* apoplasztjából (Ohkama-Ohtsu és munkatársai 2008), de a *Sclerotinia sclerotiorum* fonalas gomba sejtfalából is (Li és munkatársai 2012). A fentiekén túl a γ GT-ok a GSH-függő detoxifikációban is közreműködnek, a spontán, illetve glutation-S-transzferázok segítségével képződő glutation-S-konjugátumok átalakításával (Pócsi és munkatársai 2004; Ohkama-Ohtsu és munkatársai 2008; Wünschmann és munkatársai 2010; Agblor és Josephy 2013).

A γ GT-ok egészségügyi jelentőséggel is bírnak. A γ GT aktivitás növekedése a szérumban nem csak a máj és az epehólyag-epeutak megbetegedésére utalhat, de szív- és érrendszeri betegségek (pl. atheroszklerózis, koszorúér rendellenességek) velejárója is lehet. Sőt a magas szérum γ GT aktivitás hozzájárulhat e betegségek kialakulásához és súlyosbodásához (Celik és munkatársai 2014, Mao és munkatársai 2014, Ghatge és munkatársai 2016, Ndrepepa és munkatársai 2016). A nagy szérum γ GT aktivitás, elhízott betegeknél, a 2-es típusú diabétesz kialakulását eredményezheti (Wei és munkatársai 2015). A fentiekén túl a γ GT képződésének hiánya/zavara glutationémia, illetve glutationuria és ezen keresztül mentális retardáció kialakulásához vezet. Míg a γ GT túltermelődése az asztma és a parkinson-kór patogenezisében is szerepet játszhat (Betro és munkatársai 1973, Schulman és munkatársai 1975, Wright és munkatársai 1979, Owen és munkatársai 1996).

A γ GT indukciója a daganatos sejtekben is megfigyelhető hozzájárulva e sejtek megfelelő aminosav ellátottságához és a kemoterápiás szerek hatékonyabb detoxifikációjához (Bard és munkatársai 1986, Godwin és munkatársai 1992, Hanigan 2014). Nem meglepő módon intenzív kutatás folyik kemoterápia alatt eredményesen használható γ GT inhibitorok kifejlesztésére (Mena és munkatársai 2007, Hanigan 2014).

A γ GT enzimet elsősorban γ -glutamil vegyületek, mint élelmiszer adalékok, illetve gyógyszer alapanyagok előállítására használják az iparban (Suzuki és munkatársai 2003). A termékek közül említést érdemel az élelmiszeripar által használt teanin (γ -glutamil-etilamid; a tea egyik kedvező élettani hatásokkal bíró íz anyaga) (Suzuki és munkatársai 2002a). A gyógyászatban a fenil-alanin, valin, leucin, illetve hisztidin helyett gyakran azok γ -glutamil származékait használják, hogy csökkentsék ezen aminosavak keserű ízét (Suzuki és munkatársai 2002b). A γ -glutamil-L-dopamin szintén gyógyászati jelentőséggel bír, mivel ezen készítményből a dopamin csak a nagy γ GT aktivitást mutató szervekben (vese, agy) szabadul fel. Ezáltal felhasználható ezen szervek célzott dopamin kezelésére (Wilk és munkatársai 1977). A γ -glutamil vegyületek közül legnagyobb mennyiségben azonban a γ -glutamil-Gln-t állítják elő. Az élelmiszeriparban és a humán terápiában e vegyületet a Gln helyett használják. Ugyanis mind vízzoldékonysága, mind stabilitása lényegesen jobb, mint a Gln-é (El sayed és munkatársai 2010).

A γ GT enzim ipari jelentőségét - biokonverziós célú felhasználása mellett - az adja, hogy jelenléte befolyásolja egyes fermentációs folyamatok hatékonyságát. A Glu a szójaszósز egyik legfontosabb íz anyaga (umami íz). A Glu jelentős része Gln enzimatis hidrolízisével (glutamináz enzim) keletkezik (Kurose és munkatársai 1969, Yano és munkatársai 1988, Ito és munkatársai 2013). Az extracelluláris γ GT-ok a Gln-t úgy hasznosítják, hogy közben nem keletkezik Glu és ezáltal kedvezőtlenül befolyásolhatják a szójaszósز fermentációját (Tomita és munkatársai 1988). A legtöbb Gram pozitív baktérium képes poli- γ -glutamil-glutamát alapú tok (kapszula), illetve nyálka szintézisére (Candela és Fouet 2006). A poli- γ -glutamil-glutamátot, mint nem toxikus, biodegradábilis polimert az iparban *Bacillus* fajok segítségével állítják elő (Jeong és munkatársai 2010). E fermentációkat a γ GT

indukálódása szintén kedvezőtlenül befolyásolja. Hiszen a γ GT segítségével a baktériumok a megtermelt poli- γ -glutamil-glutamátot képesek lebontani és/vagy kovalens kötéssel a sejtfalukhoz kapcsolni, ami csökkentheti a termelt biopolimer mennyiségét és megnehezíti a fermentléből való kinyerését (Kimura és munkatársai 2004).

3. Eredmények

3.1 Az *A. nidulans* γ GT aktivitásáért felelős gén azonosítása

Az *A. nidulans* genomja két olyan gént tartalmaz (AN10444 és AN5658), melyek γ GT domainnel rendelkező fehérjét kódolnak. Az AN10444 gén a II. kromoszómán található és a *S. cerevisiae* ECM38 γ GT-t kódoló génjének ortológja. Az AN5658 gén az V. kromoszómán lokalizálódik és leginkább a *S. pombe* *ggt1* szintén γ GT-t kódoló génjéhez hasonlít.

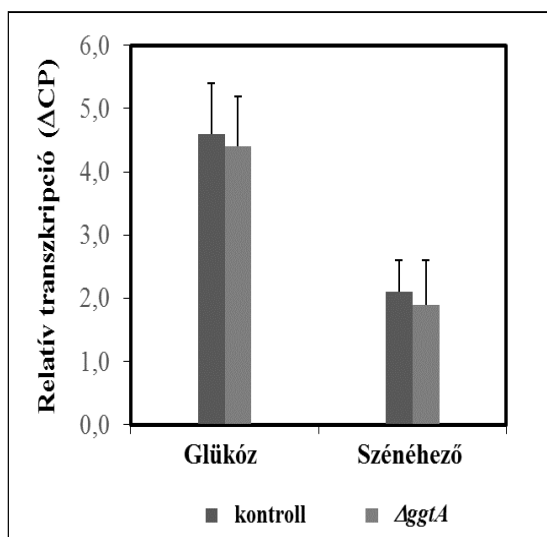
Törzs	Glükóz micélium γ GT (nkat/mg fehérje)	GD + kazein pepton fermentlé γ GT (nkat/ml)	micélium γ GT (nkat/mg fehérje)
tNJ36 (kontroll)	0,016 $\pm$ 0,004	0,58 $\pm$ 0,05	0,30 $\pm$ 0,04
tNJ190-1 (Δ <i>ggtA</i>)	<0,005 ^a	<0,006 ^a	<0,005 ^a
tNJ190-2 (Δ <i>ggtA</i>)	<0,005 ^a	<0,006 ^a	<0,005 ^a
tNJ190-3 (Δ <i>ggtA</i>)	<0,005 ^a	<0,006 ^a	<0,005 ^a
tNJ151-1 (<i>ggtA</i> komplementáció)	0,014 $\pm$ 0,004	0,58 $\pm$ 0,05	0,37 $\pm$ 0,04
tNJ151-2 (<i>ggtA</i> komplementáció)	0,012 $\pm$ 0,005	0,43 $\pm$ 0,06 ^a	0,31 $\pm$ 0,03
tNJ188-1 (Δ AN5658)	0,015 $\pm$ 0,004	0,57 $\pm$ 0,05	0,33 $\pm$ 0,03
tNJ188-2 (Δ AN5658)	0,012 $\pm$ 0,004	0,51 $\pm$ 0,05	0,29 $\pm$ 0,05
tNJ188-3 (Δ AN5658)	0,013 $\pm$ 0,003	0,52 $\pm$ 0,05	0,36 $\pm$ 0,03
tNJ189-1 (AN5658 komplementáció)	0,013 $\pm$ 0,005	0,55 $\pm$ 0,05	0,34 $\pm$ 0,004
tNJ189-2 (AN5658 komplementáció)	0,012 $\pm$ 0,004	0,51 $\pm$ 0,06	0,33 $\pm$ 0,005

1. táblázat A γ GT aktivitás változása deléciós és komplementált *A. nidulans* törzsekben. A törzseket glükóz szénforrást is tartalmazó komplex tápközegeben (YGL) tenyésztettük 18 h keresztül, majd a kinőtt micéliumot kazein pepton tartalmazó, glükóz-mentes tápközegebe (GD + kazein pepton) mostuk át. A mintavétel közvetlenül az átmosás előtt („glükóz” adatsor), illetve a fermentlé esetében az átmosást követő 48 h, a micélium esetében a 100 h időpontban történt. (Az átmosást megelőzően, a glükózos tenyészetek fermentelve nem mutatott γ GT aktivitást.) A táblázatban 4 független mérés átlaga és szórása szerepel.

^a - Szignifikáns eltérés a kontroll és a kezelt tenyészetek között (Student t-test, n = 4, p < 0,05).

A Prof. Dr. Yu (University of Wisconsin, Madison, USA) laboratóriumában készült deléció és komplementált törzsek vizsgálatával megállapítottuk, hogy az AN5658 gén inaktiválásának nem volt érdemleges hatása a γ GT aktivitásokra, míg az AN10444 gén (továbbiakban *ggtA*) deléciója gyakorlatilag teljes mértékben megszüntette a tenyészetek γ GT aktivitását és a deléció törzsek *ggtA*-val történő komplementálása visszaállította a szülői törzsben mért aktivitásokat (1. táblázat).

Érdemes megemlíteni, hogy az *Aspergillus oryzae* glutamináz A enzimje szintén jelentős γ GT aktivitással rendelkezik (Tomita és munkatársai 1988). Így felvetődött a kérdés, hogy a mért γ GT aktivitások hátterében a mi esetünkben is egy ilyen speciális glutamináz A gén állhat. Ennek okán fontosnak tartottuk, hogy ellenőrizzük a Δ *ggtA* törzsekben a glutamináz A-t kódoló *gtaA* (AN4809) gén relatív transzkripcióját. Vizsgálataink alapján azonban a *ggtA* gén deléciója nem befolyásolta a *gtaA* gén transzkripcióját szénéhező körülmények között (9. ábra).

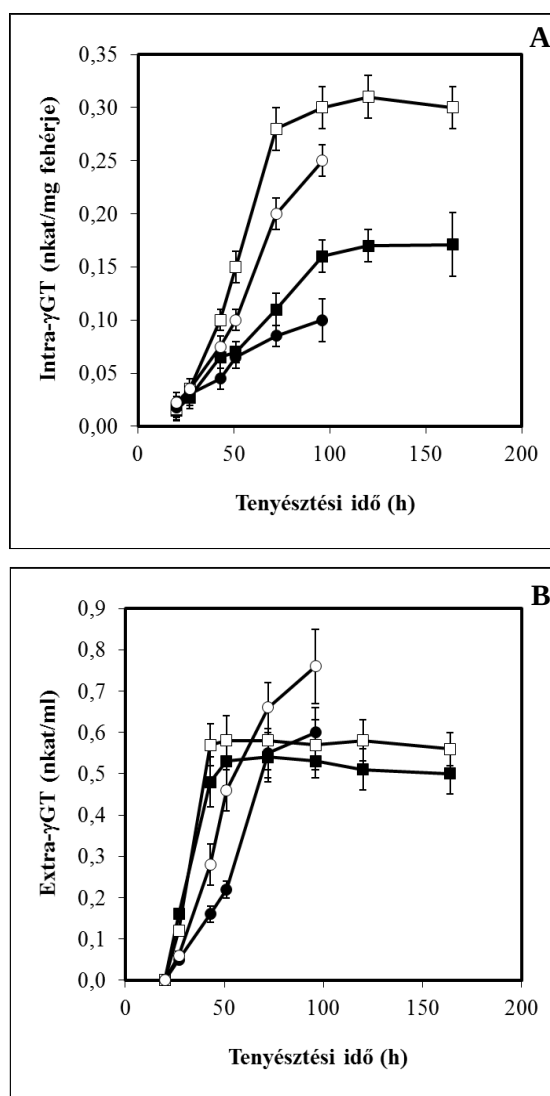


9. ábra A *ggtA* gén deléciójának hatása a *gtaA* gén expressziójára. A tNJ36 (kontroll) és tNJ190-1 (*ΔggtA*) törzseket YGL táplevesben tenyésztettük 18 h keresztül, majd a kinőtt micéliumot GD táplevesbe mostuk át. A mintavétel közvetlenül az átmosás előtt („glükóz”), illetve 4 h-val az átmosást követően („C éhezés”) történt. Az ábrán 4 független mérés átlaga és szórása szerepel.

Szignifikáns eltérés a kontroll és a mutáns törzsek ΔCP értékei között (Student t-test, $n = 4$, $p < 0,05$) nem volt. A referencia gén az *actA* gén (AN6542) volt.

3.2 A γ GT képződésének szabályozása

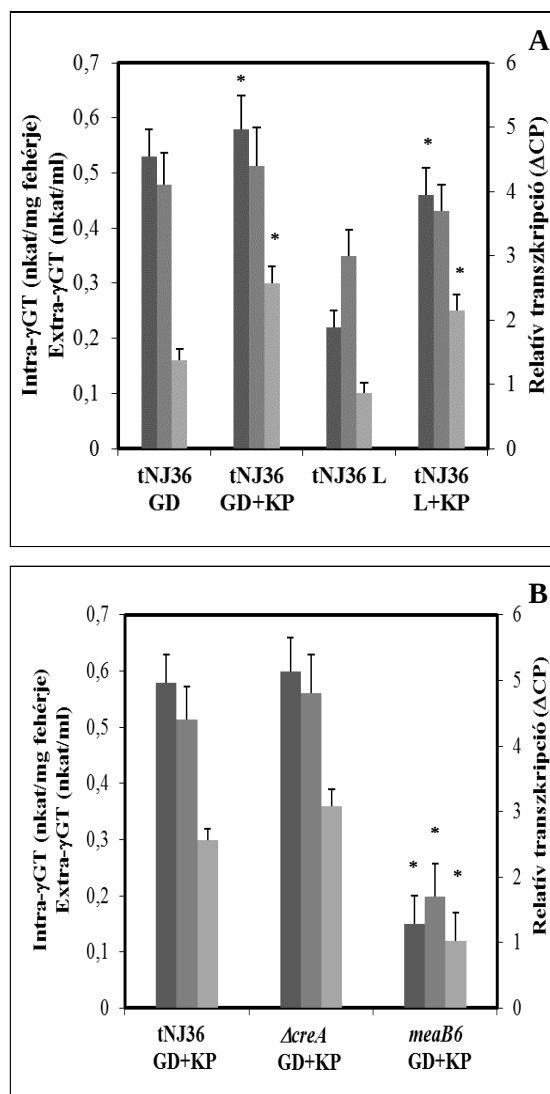
Elsőként a szénstressz és a szerves nitrogénforrások jelenlétének hatását tanulmányoztuk. Kísérleteink alapján szénforrás mentes tápközegben (szénéhezés), illetve laktóz szénforráson (szénforrás limitáció) egyaránt indukálódott a *ggtA* gén és megnőtt a γ GT aktivitás (2. táblázat; 10. ábra). Mindenképpen érdekes, hogy nemcsak intracellulárisan, sejten belül (10a. ábra), hanem extracellulárisan (10b. ábra), a fermentlében is akkumulálódott az enzim. A szénstressz hatására bekövetkező indukciót a kazein pepton jelenléte felerősítette, ami elsősorban az intracelluláris γ GT aktivitások esetében volt jól megfigyelhető (2. táblázat; 10. ábra). Érdemes megjegyezni, hogy a kazein peptonhoz hasonló hatású volt az élesztőkivonat, a borjúsérum albumin (BSA), a GlyGly, a Gln és a Glu is.



10. ábra Az intracelluláris (A) és extracelluláris (B) γ GT aktivitások időbeli változása különféle tenyésztési körülmények esetén. Az *A. nidulans* tNJ36 törzset YGL komplex tápközegben tenyésztettük 18 h keresztül, majd a kinőtt micéliumot az alábbi táplevesekbe mostuk át: szénforrásmentes minimál tápleves (GD; ■), laktóz tartalmú minimál tápleves (L; ●), kazein peptonnal kiegészített GD tápleves (□), kazein peptonnal kiegészített L tápleves (○). Az ábrákon 4 független mérés átlagai és azok szórásai láthatók.

A szén stresszválasz szabályozásában is fontos *creA* (Shroff és munkatársai 1997; Emri és munkatársai 2006) karbon katabolit represszióért

felelős transzkripció faktor hiánya érdemben nem befolyásolta a γ GT aktivitásokat és a *ggtA* gén transzkripcióját (10. ábra; 11a. és 11b. ábra). Ezzel szemben a nitrogén represszió kialakításában közreműködő *meaB* transzkripció faktor (Wong és munkatársai 2007; Szilágyi és munkatársai 2010) génjének inaktiválása gátolta a *ggtA* transzkripcióját, valamint az intra- és extracelluláris γ GT képződését (11a. és 11b. ábra).



11. A és 11. B ábra A tápközeg összetételének hatása a tenyészetek γ GT aktivitására (extra- γ GT ■, intra- γ GT ■) és a *ggtA* gén relatív transzkripciójára (■). A tNJ36 (kontroll), JMK1 (*ΔcreA*) és FGSC A451 (*meaB6*) törzseket YGL tápközegben tenyésztettük 18 órán keresztül, majd a kinőtt micéliumot GD és L táplevesekbe mostuk át. Egyes esetekben a tenyészetekhez kazein peptont (+KP) is adtunk. A mintavétel az átmosást követően 6 h (relatív transzkripció), 48 h (extra- γ GT), illetve 100 h (intra- γ GT) időpontokban történt. Az RT-qPCR vizsgálatok esetében a referencia gén az AN6700 gén volt. Az ábrákon 4 független mérés átlaga és szórása szerepel.

* - Szignifikáns eltérés a tNJ36 törzs esetében a GD, LC és GD + KP táplevesben mért értéktől (Student's t-test, $n = 4$, $p < 0,05$).

3.3 A γ GT extracelluláris képződésének vizsgálata

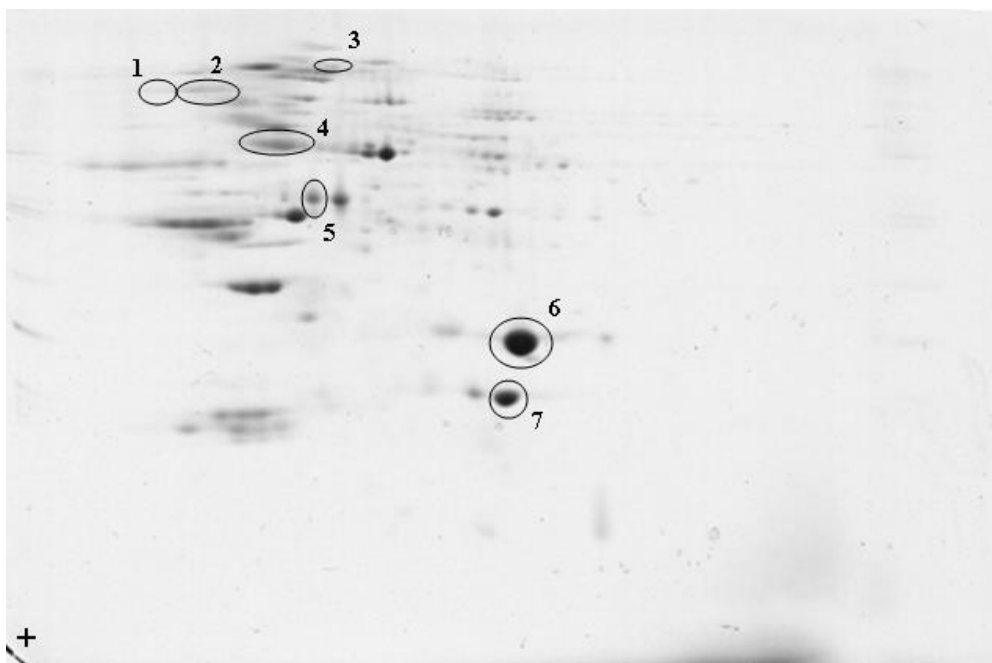
Az előző fejezetekben láttuk, hogy a γ GT aktivitások a fermentációban is megjelentek (1. táblázat; 10. ábra). A detektált extracelluláris aktivitások ellenére, a SignalP 4.1 program (Petersen és munkatársai 2011) alapján a *ggtA* gén nem rendelkezik szignál szekvenciával.

A. nidulans ANID_10444	MQLQGYDGN AQDVEKQPLLPSLDNELQV SFSLQNQTRNSGSTMSPPSPSLS	50
A. oryzae AO090023000537	MSQPRLLISN-RDVENQSSNLISSNSKT SIAHQHTSQK- - - YRPRVTAI	45
A. clavatus ACLA_006420	- - - - -	0
A. terreus ATEG_04362	- - - - -	0
A. fumigatus Afu7g04760	- - - - -	0
A. nidulans ANID_10444	LSRLRLSVCTTLC LVLVVFHVP SVLPSP L - - - - - DSYDRYTRAHK	91
A. oryzae AO090023000537	IPTLLIKLCFLA ILS LLLIVSHPPNSNTWPF - - - - - NSFKNFSDSDS	86
A. clavatus ACLA_006420	MSGLLRATFLAACALLLVISLPEALTAPL - - - - - ENGQFQHIKH-	40
A. terreus ATEG_04362	MLRALKISLSIALV VVLV VVHLPSVHSTPL VLSPRYQGLEHGS -DHLGE-	48
A. fumigatus Afu7g04760	- - - - -	0
A. nidulans ANID_10444	YERSAEAHDKKRGAVASESAICSRHGTDIILMGGNAADAMVATMLCVGVV	141
A. oryzae AO090023000537	ASRSKSA-PGKLGAVASENSICSHQGV DILRKGGNAADASRNGQ- - - QR I	132
A. clavatus ACLA_006420	- - - - - GKRGAVASESAICSRHGTDIILKIGGNAADALVATVLCVGV I	81
A. terreus ATEG_04362	- - - - - GKLGAVASESALCSHHGT EMLKKGGNAADAVSTI SLWTWEV	89
A. fumigatus Afu7g04760	- - - - -	0
A. nidulans ANID_10444	GMVHS- -GIG	149
A. oryzae AO090023000537	AMVHS- -GIG	140
A. clavatus ACLA_006420	GMVHS- -GIG	89
A. terreus ATEG_04362	SAKISD I GIG	99
A. fumigatus Afu7g04760	-MYHS- -GIG	7

12. ábra A *ggtA* és néhány ortológja feltételezett N-terminális szekvenciájának összehasonlítása. Az illesztés a Cobalt Constraint-based Multiple Protein Alignment Tool segítségével az alábbi génekhez tartozó feltételezett N-terminális aminosav szekvenciák felhasználásával történt: *ggtA* (*A. nidulans*), Afu7g04760 (*A. fumigatus*), ACLA_006420 (*A. clavatus*), ATEG_04362 (*A. terreus*) és AO090023000537 (*A. oryzae*). Az azonos, illetve hasonló fekete, illetve szürke háttérrel lettek kiemelve. A szignál szekvenciát a SignalP 4.1 program segítségével azonosítottuk és az ábrán bekeretezéssel jelöltük.

Néhány *Aspergillus* faj *ggtA* ortológ génjei által kódolt fehérjéinek feltételezett N-terminális szekvenciáit összehasonlítva azt tapasztaltuk, hogy az *A. fumigatus* Afu7g04760 génje által kódolt fehérje nem rendelkezik szignálszekvenciával, az *A. clavatus* ACLA_006420 és az *A. terreus* ATEG_04362 génjei által kódolt fehérjék esetében megtalálható az N-

terminális szignálszekvencia, míg az *A. nidulans* *ggtA* és az *A. oryzae* AO090023000537 génjében egy „rejtett”, az N-terminálistól távolabb elhelyezkedő szignálszekvencia található (12. ábra). Szénéhező tenyészetekre jellemző a sejtek autolízise (Emri és munkatársai 2008), amely során intracelluláris fehérjék juthatnak a tápközegbe aktív szekréció nélkül is a sejtek szétesése következtében.



13. ábra Az *A. nidulans* tNJ36 tenyészetének fermentlevéből származó fehérjék 2-D gélelektorforézis képe. Az *A. nidulans* tNJ36 törzset YGL tápközegben tenyésztettük 18 h keresztül, majd a kinőtt micéliumot L táplevesbe mostuk át. A fermentlé fehérje összetételének vizsgálatához a mintát 50 h időpontban vettük. A számok az azonosított fehérjéket jelölik: 1. feltételezett aminopeptidáz Y (AN8445); 2. *CelB* celluláz (AN3418); *CatB* kataláz (AN9339); 4. *GelA* feltételezett 1,3- β -transzglikozidáz (AN7657); 5. *AbnC* endoarabináz (AN8007); 6. *PepJ* deuterolizin-típusú metallo-proteáz (AN7962); 7. *SodA* Cu/Zn szuperoxid dizmutáz (AN0241). A „+” jel a gél savas (pH 3) végét jelöli.

Laktóz szénforráson növekvő tenyészetekben ugyanakkor az autolízis nem figyelhető meg. Ennek alátámasztására 2-D gélelektroforézis és HPLC-MS

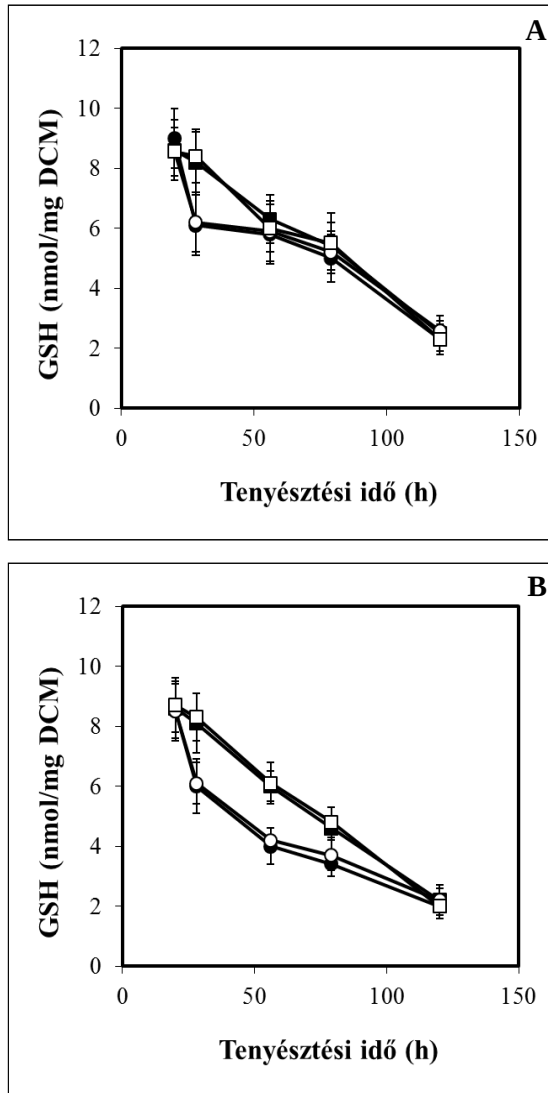
alkalmazásával azonosítottunk néhány laktóz szénforráson növekvő tenyésztetre jellemző extracelluláris fehérjét (13. ábra). Összesen 7 fehérje azonosítására volt lehetőségünk. Ezek a következők voltak: aminopeptidáz (AN8445), *CelB* celluláz (AN3418), *CatB* kataláz (AN9339), *GelA* 1,3- β -transzglykozidáz (AN7657), *AbnC* endoarabináz (AN8007), *PepJ* deuterolizin-típusú metallo-proteáz (AN7962) és *SodA* Cu/Zn szuperoxid dizmutáz (AN0241). Ezen fehérjék mindegyike ismert szekréciós fehérje az *A. nidulans*-ban (Holdom és munkatársai 1996; Emri és munkatársai 2009; Saykhedkar és munkatársai 2012).

3.4 A *ggtA* gén deléciójának fiziológiai következményei

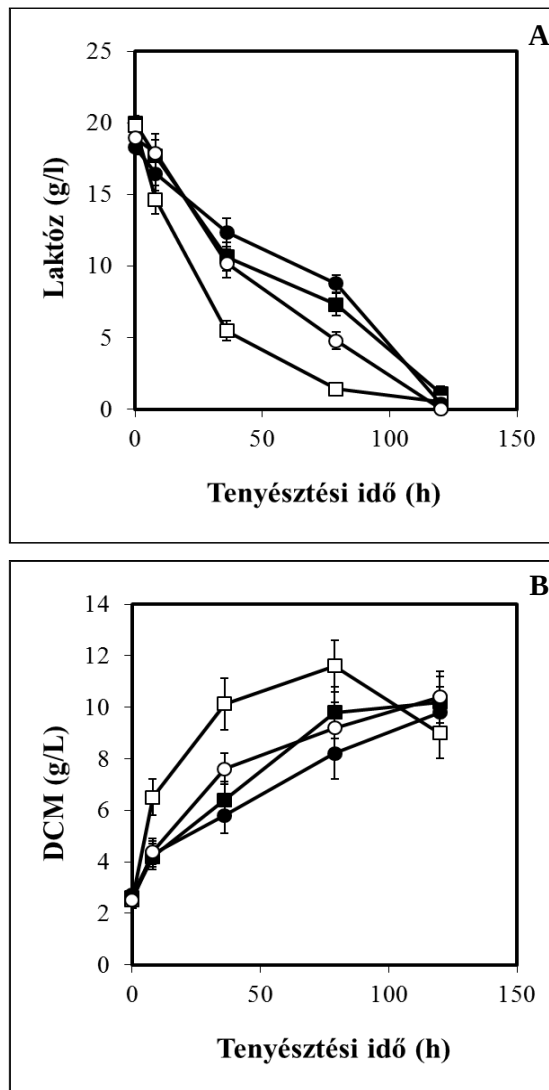
Amint az a 3.1 fejezetből is kiderül a *ggtA* gén deléciója (hasonlóan az AN5658 gén deléciójához) nem letális, sőt a deléció érdemi változást a tenyészetek morfológiájában és növekedésében nem okozott sem felületi, sem süllyesztett kultúrákban.

Szénéhező és szénforrás limitált körülmények között a *ggtA* gén hiánya nem befolyásolta a sejtek GSH tartalmának csökkenését (14. ábra). Fontos megjegyezni, hogy a fermentlé érdemi mennyiségben nem tartalmazott GSH-t, sem a kontroll (tNJ36 és komplementált törzsek), sem a $\Delta ggtA$ törzsek esetében. Az extracelluláris GSH + GSSG tartalom minden alkalommal kevesebb volt 0,5 nmol/ml-nél.

Laktóz tartalmú tápközegekben a kazein pepton jelenléte serkentette a tenyészetek növekedését, ami a szárazanyag tartalom (DCM) növekedésben, illetve a laktóz fogyásban is jól megfigyelhető volt (15. ábra). A $\Delta ggtA$ törzs esetében a kazein peptonnak ilyen hatása nem volt (15. ábra).



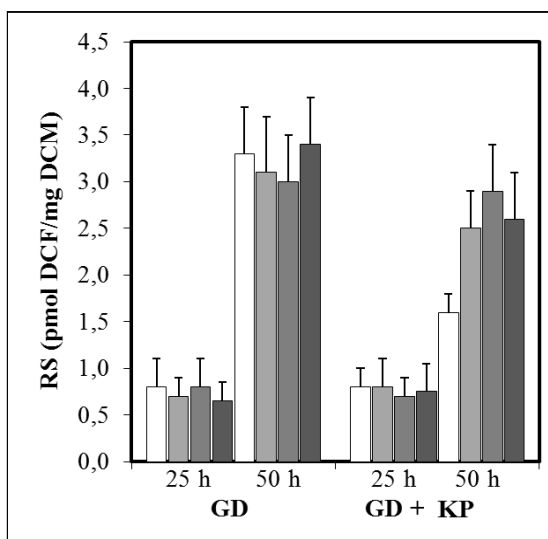
14. ábra Az intracelluláris GSH tartalom csökkenése az *A. nidulans* kontroll és $\Delta ggtA$ törzsében. A törzseket YGL tápközegben tenyésztettük 18 h keresztül, majd a kinőtt micéliumot az alábbi táplevesekbe mostuk át: A. ábra - GD tápleves (○, ●), illetve kazein peptonnal kiegészített GD tápleves (■, □); B. ábra - L tápleves (○, ●), illetve kazein peptonnal kiegészített L tápleves (■, □). A $\Delta ggtA$ törzset (tNJ190-1) fekete szimbólumok, a kontroll törzset (tNJ36) fehér szimbólumok jelölik. Az ábrákon 4 független mérés átlagai és azok szórásai láthatók. A GSSG tartalom 0,3-0,5 nmol/mg száraztömeg között volt minden esetben. A tNJ190-2 és tNJ190-3 törzsek a tNJ190-1 törzshöz hasonlóan viselkedtek.



15. ábra A kazein pepton hatása az *A. nidulans* Δ ggtA és kontroll tenyészeinek laktóz hasznosítására (A) és a növekedésre (B). A törzseket YGL tápközegben tenyésztettük 18 h keresztül, majd a kinőtt micéliumot L táplevesbe (○, ●), illetve kazein peptonnal kiegészített L táplevesbe (■, □) mostuk át. A Δ ggtA törzset (tNJ190-1) fekete szimbólumok, a kontroll törzset (tNJ36) fehér szimbólumok jelölik. Az ábrákon 4 független mérés átlagai és azok szórásai láthatók. A tNJ190-2 és tNJ190-3 törzsek a tNJ190-1 törzshöz hasonlóan viselkedtek.

A reaktív részecske (RS) tartalom a sejtekben szénforrás éhező körülmények hatására jelentősen megnőtt (16. ábra). A kazein pepton

jelenléte mérsékelte a RS tartalom növekedését, de a *ΔggtA* törzsben a kazein pepton ezen hatása csak gyengén érvényesült (16. ábra).

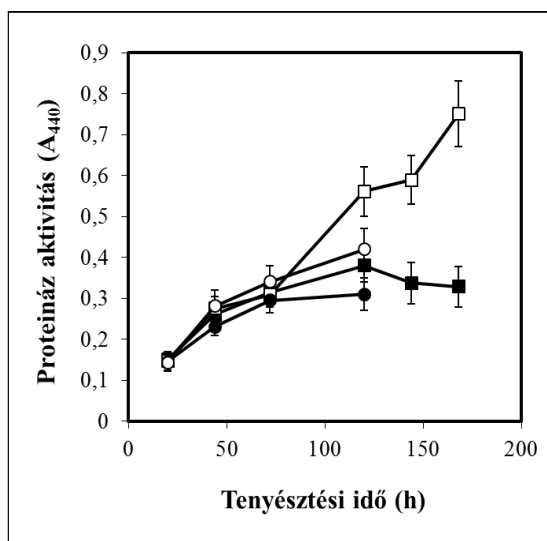


16. ábra A kazein pepton hatása a RS képződésére az *A. nidulans* *ΔggtA* és kontroll tenyészeiben. A törzseket YGL komplex tápközegben tenyésztettük 18 h keresztül, majd a kinőtt micéliumot GD, illetve kazein peptonnal kiegészített GD táplevesbe (GD + KP) mostuk át. A fehér oszlop a kontroll (tNJ36) törzset, a szürke oszlopok a deléciós törzseket (tNJ190-1, tNJ190-2, tNJ190-3) jelölik. A táblázatban 4 független mérés átlaga és szórása szerepel. A Student-féle t-teszt alapján ($n = 4$, $p < 0,05$) a tNJ190 törzsekben mért RS tartalom (GD + pepton tápközeg, 50 h) szignifikánsan nagyobb a tNJ36 törzsben mért értékekhez képest.

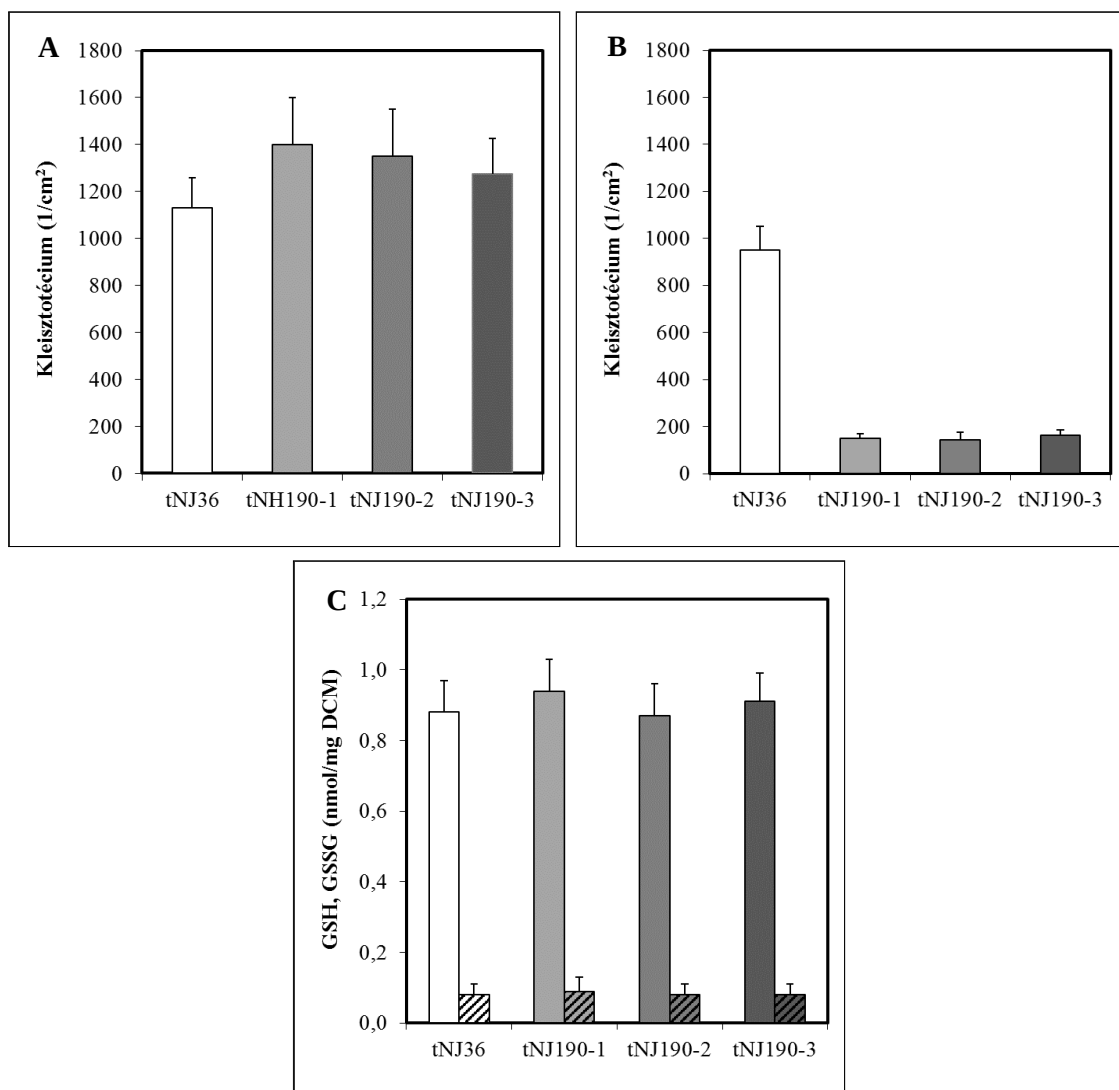
A *ggtA* gén deléciója kazein pepton jelenlétében szénéhező, valamint szénforrás limitált tápközegben egyaránt befolyásolta a tenyészetek proteináz termelését. A *ΔggtA* törzs proteináz termelése minden esetben elmaradt a kontroll törzstől (17. ábra).

Vizsgálataink alapján a *ggtA* gén nem befolyásolta érdemben a tenyészetek konidium termelését felületi kultúrákban: a mért konidium szám $5-7 \times 10^7$ konidium/cm² közötti érték volt a kontroll (tNJ36), a deléciós (tNJ190-1-3) és a komplementált (tNJ151-1-2) törzsekben egyaránt. Ezzel szemben az éretlen kleisztotéciumok száma nagyobbak, míg az érett

kleisztotéciumok száma kisebbnek bizonyult a *AggtA* törzsek esetében (18a. és 18b. ábra). A felületi tenyészetek GSH és GSSG tartalmát a *ggtA* delécio nem befolyásolta (18c. ábra).



17. ábra Extracelluláris proteináz aktivitások változása az *A. nidulans* *AggtA* és kontroll tenyészeiben. A törzseket YGL táplevesben tenyésztettük 18 h keresztül, majd a kinőtt micéliumot kazein peptonnal kiegészített GD táplevesbe (■, □), illetve kazein peptonnal kiegészített L táplevesbe (○, ●) mostuk át. A *AggtA* törzset (tNJ190-1) fekete szimbólumok, a kontroll törzset (tNJ36) fehér szimbólumok jelölik. Az ábrákon 4 független mérés átlagai és azok szórásai láthatók. A Student-féle t-teszt alapján ($n = 4$, $p < 0,05$) a tNJ190-1 törzs tenyészeiben a mért proteináz aktivitás a 100 h utáni időszakban szignifikánsan kisebb, mint a kontroll törzs esetében tapasztalt érték. A tNJ190-2 és tNJ190-3 törzsek a tNJ190-1 törzshöz hasonlóan viselkedtek.



18. A és 18. B ábra Az összes kleisztotécium (érett és éretlen; A), valamint az érett kleisztotéciumok (B) mennyiségének alakulása az *A. nidulans* kontroll (tNJ36) és *AggtA* (tNJ190-1-3) törzseinek felületi tenyészeiben. Az ábrákon 3 független mérés átlagai és azok szórásai láthatók. Szignifikáns eltérés (Student t-teszt, $n = 3$, $p < 0,05$) a kontroll és a *AggtA* törzsek között csak az érett kleisztotéciumok esetében volt (B ábra).

18. C ábra A tenyészetek GSH, illetve GSSG tartalmának (C) alakulása az *A. nidulans* kontroll (tNJ36) és *AggtA* (tNJ190-1-3) törzseinek felületi tenyészeiben. Az ábrákon 3 független mérés átlagai és azok szórásai láthatók. Az ábrán a GSH tartalmat sima, a GSSG tartalmat csíkozott oszlopok jelölik. A komplementált törzsek (tNJ151-1-2) a tNJ36 kontroll törzshöz hasonlóan viselkedtek.

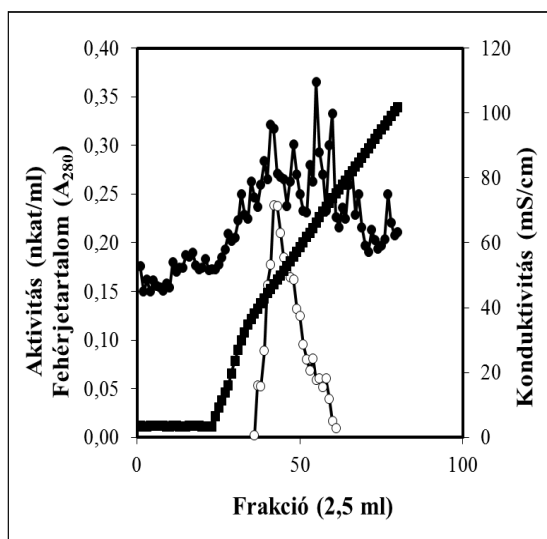
3.5 Az extracelluláris γ GT izolálása és jellemzése

A GgtA (*ggtA* gén által kódolt fehérje) extracelluláris térből való izolálása laktózos tenyészetek fermentlevéből történt. E fermentlevekben nagy GgtA aktivitások voltak mérhetőek (3. táblázat) hasonlóan a szénéhező tenyészetek fermentlevéhez, de ebben az esetben - az autolízis hiánya miatt - kevesebb szennyező fehérjével kellett számolnunk. A tisztításhoz frakcionált $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ kicsapást és DEAE-Sephadex anioncserélő kromatográfiát használtunk (19. ábra, 3. táblázat).

	Fehérjetartalom (mg)	Spec. aktivitás (nkat/mg fehérje)	Tisztulás	Kihozatal (%)
Nyerskivonat	21,2	1,6	1x	100
Frakcionált $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ kicsapás és dialízis	0,5	8,3	5,2x	11,8
DEAE-Sephadex anioncserélő kromatográfia	0,025	48	30x	3,4

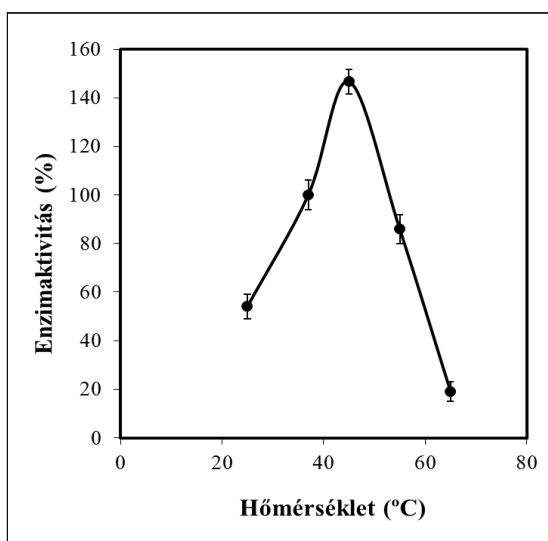
3. táblázat Az extracelluláris GgtA tisztítási táblázata.

Bár a tisztítási lépések jelentős veszteséggel jártak, a specifikus aktivitást több mint 30-szorosára sikerült növelnünk (3. táblázat). A tisztított mintában azonban még így is többféle fehérje sávot detektáltunk SDS-PAGE-n Coomassie Blue festést követően.

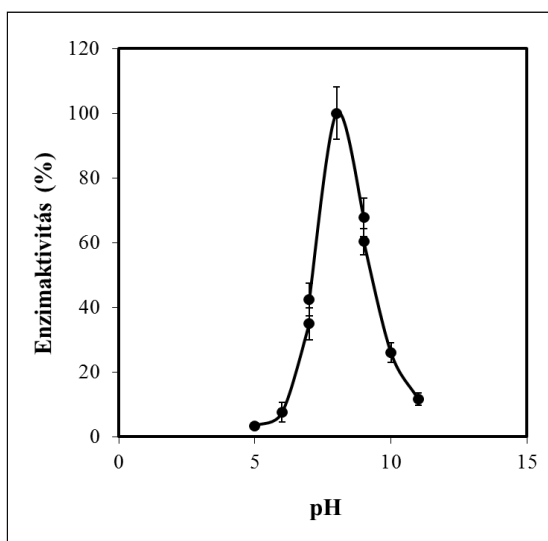


19. ábra Az extracelluláris GgtA tisztítása DEAE-Sephadex ioncserélő oszlopon. Az ábrán egy reprezentatív kromatogrammot tüntettem fel, ahol a „■” jelek az adott 2,5 ml térfogatú frakció vezetőképességét, a „●” jelek a 280 nm-en mért abszorbanciáját („fehérjetartalom”), míg a „○” jelek a γ GT aktivitását jelölik.

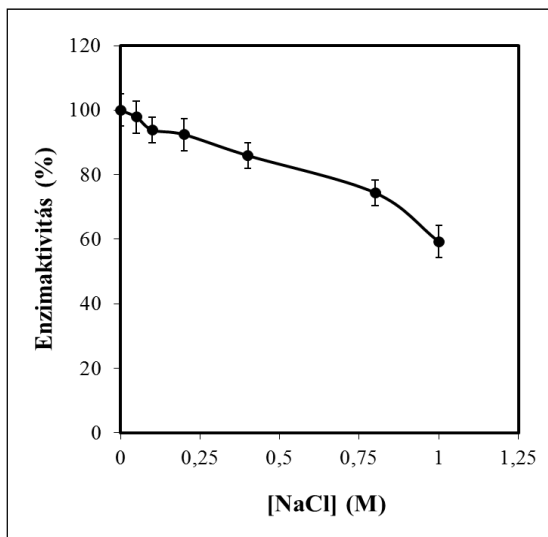
A részlegesen tisztított γ GT hőmérséklet és pH optimuma 45 °C (20. ábra), illetve pH 8,0 (21. ábra) volt. Jelentősebb enzimaktivitást csak 55 °C alatt és a pH 7-9 tartományban mértünk. A legtöbb prokarióta γ GT-zal ellentétben (Lin és munkatársai 2006; Yao és munkatársai 2006) a NaCl (0,050-1 M tartományban) nem aktiválta az enzimet (22. ábra). A γ GpNA szubsztráttal az enzim Michaelis-Menten kinetikát mutatott ($K_m = 0,2$ mM) (23. ábra).



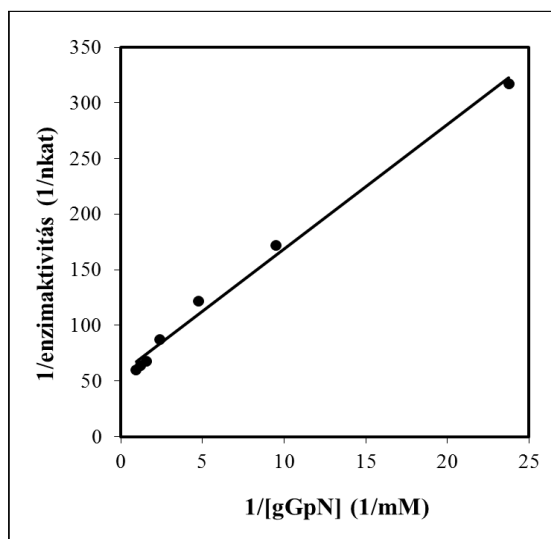
20. ábra A γ GT aktivitás hőmérsékletfüggése. A vizsgálatokat 1 mM γ GpNA és 20 mM glicil-glicin (Gly-Gly) jelenlétében pH 8,0 értéknél végeztük. A 37 °C-on mért értékeket (20 nkat) vettük 100 %-nak. Az ábrán 4 párhuzamos mérés átlagai szerepelnek (S. D. <12 %).



21. ábra A γ GT aktivitás pH-függése. A vizsgálatokat 1 mM γ GpNA és 20 mM Gly-Gly jelenlétében 37 °C-on végeztük. A pH 8,0 értéken mért aktivitást (20 nkat) vettük 100 %-nak. Az ábrán 4 párhuzamos mérés átlagai szerepelnek (S. D. <12 %).



22. ábra A γ GT aktivitás NaCl koncentráció-függése. A vizsgálatokat 1 mM γ GpNA és 20 mM Gly-Gly jelenlétében 37 °C-on és pH 8,0 mellett végeztük. A NaCl hiányában mért aktivitási értéket (20 nkat) tekintettük 100 %-nak. Az ábrán 4 párhuzamos mérés átlagai szerepelnek (S. D. <10 %).



23. ábra A γ GT katalizált reakció γ GpNA koncentráció-függése. A vizsgálatokat 20 mM Gly-Gly jelenlétében 37 °C-on és pH 8,0 mellett végeztük. Az ábrán 4 párhuzamos mérés átlagai szerepelnek (S. D. <10 %).

A GgtA számottevő hidroláz aktivitással nem rendelkezett és a hidroxil-amin is gyenge szubsztrátnak bizonyult (4. táblázat). A tesztelt aminosavak és peptidek közül a Gly-Gly és a Glu egyformán jó γ -glutamil akceptorai voltak a GgtA-nak, de számottevő transzpeptidáz aktivitás mértünk Cys, Met, Cys-Gly és Ala jelenlétében is (4. táblázat).

A tesztelt γ -glutamil donorok közül a Gln-nal és a GSH-val mért aktivitások (szubsztrát fogyások) összevethetők voltak a γ GpNA-dal mért értékekkel, sőt GSSG esetében is sikerült gyenge aktivitást kimutatnunk (24. ábra). Azt, hogy ezen esetekben valóban lezajlott a reakció az LC-ESI-MS/MS módszerrel kimutatott termékek (tripeptidek) képződése is igazolta (5. táblázat).

γ-Glutamil akceptor¹	Relatív enzim aktivitás (%)
Gly-Gly	100 $\pm$ 6 ²
Glu	98 $\pm$ 6 ²
Cys-Gly	36 $\pm$ 5 ²
Met	36 $\pm$ 6 ²
Cys	28 $\pm$ 5 ²
Ala	25 $\pm$ 5 ²
NH ₂ -OH ³	9 $\pm$ 3
H ₂ O (kontroll)	10 $\pm$ 2 ²

4. táblázat A GgtA γ -glutamil akceptor specificitása. A vizsgálatokat 1 mM γ GpNA és 20 mM γ -glutamil akceptor jelenlétében 37 °C-on és pH 8,0 mellett végeztük. A Gly-Gly jelenlétében mért aktivitást (25 nkat) tekintettük 100 %-nak.

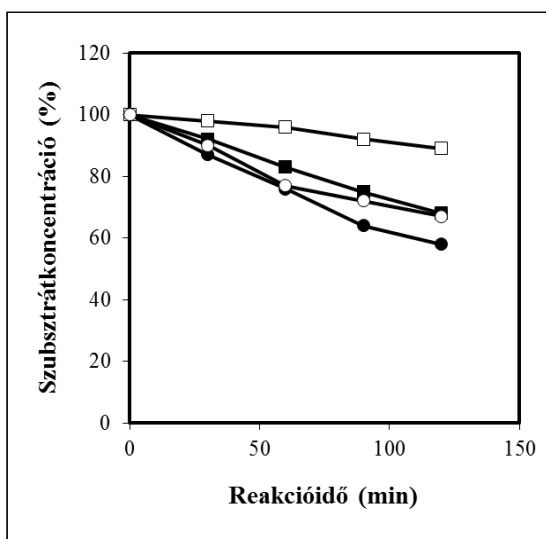
¹ - A 20 mM Gln, Asp, Gly, Ser, Thr és Orn jelenlétében mért aktivitási értékek nem különböztek szignifikánsan (Student-féle t-test, $p < 0,05$, $n = 4$) a kontroll (γ -glutamil akceptor hiányában mért) értékektől.

² - A mért érték szignifikánsan nagyobb (Student-féle t-test, $p < 0,05$, $n = 4$), mint a kontroll (γ -glutamil akceptor hiányában mért) értékek.

³ - Nem csak a p-nitroanilid felszabadulás mértéke volt kicsi, de Imaoka és munkatársai (2010) módszerét követve γ -glutamil-hidroxamát képződést sem tapasztaltunk.

γ -Glutamil donor	γ -Glutamil akceptor	Tripeptid
Gln	Cys-Gly	Glu-Cys-Gly
Gln	Gly-Gly	Glu-Gly-Gly
GSH	Gly-Gly	Glu-Gly-Gly
GSSG	Gly-Gly	Glu-Gly-Gly

5. táblázat A GgtA reakcióelegyből azonosított tripeptidek. A peptidek azonosítása LC-ESI-MS/MS módszerrel történt. Az azonosítást Gonda Sándor (DE Növénytani Tanszék) és Kiss-Szikszai Attila (DE Szerves Kémiai Tanszék) végezte.



24. ábra A γ -glutamil donor koncentrációk változásai a GgtA által katalizált reakcióban. A vizsgálatokat 1 mM γ GpNA (●), Gln (○), GSH (■), illetve GSSG (□) és 20 mM Gly-Gly jelenlétében 25 °C-on és pH 8,0 mellett végeztük. A γ -glutamil donor koncentrációk változása Gly-Gly, mint γ -glutamil akceptor hiányában kevesebb, mint 10 % volt. Az ábrán 3 párhuzamos mérés alapján számolt átlagértékek szerepelnek (S. D. <12 %).

A γ GpNA fogyást a felszabaduló p-nitroanilid mennyiségének fotometriás meghatározása segítségével határoztuk meg. A Gln koncentrációkat LC-ESI-MS/MS módszer segítségével Gonda Sándor (DE Növénytani Tanszék) és Kiss-Szikszai Attila (DE Szerves Kémiai Tanszék) határozta meg. A GSH és GSSG koncentrációk detektálása az Anyagok és módszerek fejezetben leírt rate-assay segítségével történt.

3.6 Az intracelluláris glutation lebontásában potenciálisan résztvevő gének vizsgálata

Tekintettel arra, hogy a *ggtA* deléciója nem befolyásolta a sejtek GSH tartalmát, illetve annak csökkenését szénéhező körülmények között, megvizsgáltuk néhány a GSH lebontásában potenciálisan résztvevő gén relatív transzkripciója és a sejtek GSH tartalma közötti korrelációt. A gomba GSH anyagcseréjét szénforrás, illetve nitrogénforrás éhezéssel, szénforrás limitációval és élesztőkivonat adagolásával befolyásoltuk. A GSH tartalom változásait az alábbi gének relatív transzkripció változásaival vetettük egybe: *ggtA*; AN5658 (a korábban vizsgált két, potenciálisan γ GT domaint kódoló gén); AN3459, AN1879 és AN1092 (*dug1-3*) (a *S. cerevisiae* *dug* génjeinek ortológjai); AN4809 (*gtaA*) (glutamináz A-t kódoló gén) és AN3150 (*ggcsA*) a GSH szintézis kulcsenzimét (γ GCS) kódoló gén. Amint az a 6. táblázatban is látszik, a szénforrás limitáció, valamint a szén- és nitrogénéhezés egyaránt csökkentette a sejtek GSH tartalmát, míg az élesztőkivonat adagolása mérsékelte a GSH tartalom csökkenését. A *ggcsA* relatív transzkripciója élesztőkivonat jelenlétében nagyobb volt, mint hiányában. A *ggtA* aktivitását a szénforrás limitáció, valamint a szén- és nitrogénéhezés egyaránt megnövelte és az élesztőkivonat adagolása e növekedést felerősítette. Az AN5658 gén relatív transzkripciója csak szénéhezés hatására növekedett meg az élesztőkivonat jelenlététől függetlenül. A *gtaA* aktivitását a szén- és nitrogénéhezés is felerősítette, de az élesztőkivonat ebben az esetben is hatástalan volt. A *dug1* gént a szénforrás limitáció, valamint a szén- és nitrogénéhezés indukálta, ellenben az élesztőkivonat jelenléte nem befolyásolta az indukciót. A *dug2* gén relatív transzkripciója érdemben nem változott. A *dug3* gén aktivitását a szénforrás limitáció, valamint a szén- és nitrogénéhezés indukálta, az élesztőkivonat jelenléte viszont inkább

represszálo hatású volt. A sejtek GSH tartalma és egy-egy gén relatív transzkripciója között csak a *dug1* és *dug3* gének esetében találtunk nullától szignifikánsan eltérő, negatív korrelációt.

Tenyészet	GSH (nmol/mg DCM)	Relatív transzkripció (Δ CP)						
		AN3459 (<i>dug1</i>)	AN1879 (<i>dug2</i>)	AN1092 (<i>dug3</i>)	AN10444 (<i>ggtA</i>)	AN5658	AN4809 (<i>gtaA</i>)	AN3150 (<i>ggcsA</i>)
G (glükóz, NaNO ₃) (kontroll)	7,6 ± 0,9	-2,1 ± 0,8	-4,2 ± 1	-8,2 ± 1,2	2,5 ± 0,5	-5,2 ± 1,2	-4,6 ± 0,8	3,7 ± 0,6
L (laktóz, NaNO ₃)	5,1 ± 0,5 ^a	1,6 ± 0,8 ^a	-4,1 ± 1	-6,9 ± 1,2	4,8 ± 0,6 ^a	-5,1 ± 1	-4,1 ± 0,8	3,5 ± 0,5
L + YE (laktóz, élesztőkivonat, NaNO ₃)	6,5 ± 0,8 ^b	1,7 ± 0,8 ^a	-4,5 ± 0,8	-8,3 ± 1,8	6,1 ± 0,8 ^{a,b}	-5,2 ± 1	-4,2 ± 0,5	4,4 ± 0,6 ^b
GD (szénforrás mentes, NaNO ₃)	4,5 ± 0,5 ^a	2,2 ± 0,5 ^a	-4,7 ± 0,8	-5,1 ± 1,5 ^a	5,2 ± 0,8 ^a	-3,6 ± 1	-2,1 ± 0,5 ^a	3,6 ± 0,5
GD + YE (élesztőkivonat, NaNO ₃)	6,4 ± 0,8 ^b	2,3 ± 0,5 ^a	-4,6 ± 1	-7,2 ± 1,5	6,7 ± 0,8 ^{a,b}	-4,2 ± 1	-3,1 ± 0,6 ^{a,b}	4,6 ± 0,6 ^b
ND (glükóz, nitrogénforrás mentes)	6,2 ± 0,8 ^a	1,2 ± 0,8 ^a	-4,4 ± 1	-5,8 ± 1 ^a	3,8 ± 0,7 ^a	-5,1 ± 0,8	-2,5 ± 0,6 ^a	3,7 ± 0,5
Korrelációs koefficiens^c	-	-0,74 ^d	0,19	-0,79 ^d	-0,39	-0,35	-0,52	0,41

6. táblázat A tenyésztési körülmények hatása a sejtek GSH tartalmára és néhány gén relatív transzkripciójára. Az *A. nidulans* tNJ36 törzset YGL tápközegben tenyésztettük 18 h keresztül, majd a kinőtt micéliumot a táblázatban jelzett tápközegbe mostuk át. A mintavétel az átmosást követően a 8 h (relatív transzkripció), illetve 24 h (GSH) időpontban történt.

A táblázatban 4 független mérés átlagai és szórásai szerepelnek. A referencia gén az *actA* gén (AN6542) volt.

^a - Szignifikáns eltérés a kontroll és a kezelt tenyészetek között (Student-féle t-teszt, $p < 0,05$, $n = 4$).

^b - Szignifikáns eltérés az élesztőkivonatos és a megfelelő élesztőkivonat nélküli tenyészet között (Student-féle t-teszt, $p < 0,05$, $n = 4$).

^c - Pearson-féle korrelációs koefficiens értéke a relatív transzkripció és GSH koncentráció között.

^d - A korrelációs koefficiens értéke szignifikánsan eltér a nullától ($p < 0,01$, $n = 18$).

A Pearson-féle korrelációs koefficiens egy-egy gén a relatív transzkripció adatai és a hozzá tartozó GSH koncentrációk között számoltuk ki az eredeti adatpárok felhasználásával.

4. Eredmények megbeszélése

4.1 A γ GT-t kódoló gén azonosítása

Az *A. nidulans* genomjában két, potenciálisan γ GT-t kódoló gén található, melyek szekvenciájuk alapján a „*Pezizomycotina-only*” (*ggtA*) és a „*Pezizomycotina-Saccharomycotina*” (AN5658) kládokba sorolhatóak (Bello és Epstein 2013). A két gén közül a *ggtA* felelős a sejtekben mért nagy intra- és extracelluláris γ GT aktivitásokért. Erre utaltak az alábbiak:

- A *ggtA* gén delécioja kimutatási határ alá csökkentette a tenyészetek γ GT aktivitását (1. táblázat).
- A komplementált törzsekben a γ GT aktivitások közel megegyeztek a kontroll törzsben mért értékekkel (1. táblázat).
- A γ GT aktivitás változásai követték a *ggtA* gén relatív transzkripciójának változásait (2. táblázat).

Tekintettel arra, hogy a *AggtA* törzsekben gyakorlatilag nem tudtunk γ GT aktivitást kimutatni az e célra általánosan használt γ GpNA szubsztrát segítségével, így az is elmondható, hogy - legalább is az általunk használt tenyésztési körülmények között - a *ggtA* lehet az egyetlen fiziológiai szempontból jelentős γ GT gén. Ez azért érdekes mert sok fajban több, egy időben aktív γ GT gén is található (Storozhenko és munkatársai 2002; Park és munkatársai 2004; Bello és Epstein 2013; Bello és munkatársai 2013).

Minthogy az AN5658 gén delécioja nem befolyásolta érdemben a γ GT aktivitásokat, így e gén terméke, biokémiai aktivitásának természete továbbra is kérdéses. Érdemes megemlíteni, hogy az AN5658 *Neurospora crassaban* megtalálható ortológját (NCU04130) aminoacilázként (EC 3.5.1.14) azonosították. Elképzelhető, hogy az AN5658 is egy ilyen, a γ GT-okkal rokon enzim képződéséért felelős. Természetesen az sem zárható ki azonban,

hogy az AN5658 egy γ GT-t kódol, csak aktivitása az általunk használt módszerrel, vagy az általunk vizsgált körülmények között nem detektálható.

4.2 A GgtA szerepe az intracelluláris GSH anyagszerében

Eredeti várakozásainkkal ellentétben a *ggtA* hiánya érdemben nem befolyásolta a sejtek GSH tartalmát. A szénstressz által indukált GSH tartalom csökkenés a *AggtA* törzsekben is ugyanolyan intenzitású volt, mint a kontroll törzsben (14. ábra) és nem tapasztaltunk korrelációt a *ggtA* gén relatív transzkripciója és a sejtek GSH tartalma között sem (6. táblázat). Kísérleti adataink természetesen nem zárják ki annak lehetőségét, hogy a GgtA intracellulárisan bontja a GSH-t, csak felhívják a figyelmet arra, hogy a GgtA nem esszenciális a sejtek GSH tartalmának normál szinten tartásához, illetve az intracelluláris GSH gyors lebontásához. Megfigyeléseink összhangban vannak a szakirodalomban található adatokkal. A γ GT nem vesz részt a *S. cerevisiae* (Ganguli és munkatársai 2007), *A. thaliana* (Ohkama-Ohtsu és munkatársai 2008) és az emlős sejtek (Kumar és munkatársai 2012) citoszolikus GSH tartalmának csökkentésében. A *C. graminicola* fonalas gomba *ggtA* ortológ génjének (GGT1) deléciója, illetve túltermeltetése szintén nem volt szignifikáns hatással az intracelluláris GSH tartalomra (Bello és munkatársai 2013). Ezzel szemben, a *S. sclerotiorum* GGT1 gén deléciója megnövelte a tenyészetek teljes glutation (GSSG + GSH) koncentrációját és oxidatív stresszt váltott ki (Li és munkatársai 2012). Ebben az esetben azonban nem egyértelmű, hogy a teljes GSH tartalom növekedéséért a GSH (vagy a GSSG) bontásának hiánya, esetleg a megfigyelt oxidatív stressz által kiváltott intenzív GSH szintézis volt felelős.

A *S. cerevisiae* és a *C. albicans* esetében (Kumar és munkatársai 2003; Ganguli és munkatársai 2007; Desai és munkatársai 2011; Kaur és munkatársai 2012) a DUG útvonal felelős az intracelluláris GSH

lebontásáért. Az útvonalat alkotó három gén ortológjai az *A. nidulans* genomjában is megtalálhatóak. Az AN3459 a *dug1*, az AN1879 a *dug2*, míg az AN1092 a *dug3* ortológja. Kísérleteinkben az AN3459 és AN1092 gének relatív transzkripciója szoros negatív korrelációt mutatott a sejtek GSH tartalmával, míg az AN1879 relatív transzkripciója többé-kevésbé konstansnak bizonyult (6. táblázat). Érdekes megjegyezni, hogy *S. cerevisiae* esetében a Dug2 fehérjének nincsen katalitikus aktivitása, de nélkülözhetetlen a működőképes - (Dug1-Dug2)₂ szerkezetű - fehérje komplex kialakulásához (Kaur és munkatársai 2012). A transzkripciós vizsgálatok alapján elképzelhető, hogy az *A. nidulans* esetében is a DUG útvonal biztosítja a sejtekben a GSH lebontását. Ezen hipotézis alátámasztására azonban további - pl. az érintett génekben sérült törzsek vizsgálatán alapuló - kísérletek szükségesek.

4.3 A GgtA extracelluláris lokalizációja

A GgtA fiziológiai szerepének megértése szempontjából fontos kérdés az enzim lokalizációja. Vizsgálataink alapján a *ggtA* indukciója együtt járt az enzim extracelluláris térben való megjelenésével (2. táblázat). Extracelluláris, illetve sejtfalhoz kötött γ GT-t mutattak ki a *H. capsulatum* (Zarnowski és munkatársai 2008) és a *C. graminicola* (Bello és munkatársai 2013) gombák esetében is. A prokarióták körében szintén általános, hogy az enzim a periplazmikus térben (Gram negatív fajok), vagy sejtfalhoz kötötten (Gram pozitív fajok) van jelen (Hanigan és Ricketts 1993; Kimura és munkatársai 2004; Minami és munkatársai 2004; Shibayama és munkatársai 2007), sőt az emlősök citoplazma membránhoz kötött γ GT-a is a membrán extracelluláris oldalán fejt ki aktivitását (Zhang és munkatársai 2005; Heisterkamp és munkatársai 2008; Zhang és Forman 2009). Az *A. nidulans* esetében az enzim extracelluláris megjelenése azért érdekes, mert a *ggtA* gén nem

tartalmaz klasszikus, a SignalP 4.1 programmal (Petersen és munkatársai 2011) kimutatható szignálszekvenciát (12. ábra), noha a szignálszekvencia meglepte sok ortológ gén esetében azonosítható, többek között: AFL2G_00188 (*A. flavus*), ACLA_006420 (*A. clavatus*), ATEG_04362 (*A. terreus*), Pc21g09300 (*Penicillium chrysogenum*), EAS30515.2 (*Coccidioides immitis*). Szignálszekvencia hiányában felmerül annak lehetősége is, hogy az enzim alapvetően csak intracellulárisan van jelen a sejtekben és szénéhezéskor a sejtek autolízise (szétesése) következtében kerül csak a tápközegbe. Ennek ellentmond azonban, hogy a GgtA termelés laktóz szénforrás esetében is indukálódik és a fehérje ilyenkor is megjelenik az extracelluláris térben (10. ábra) noha, laktóz szénforráson az *A. nidulans* tenyészetek jól növekedtek (15. ábra) és autolízis nem volt megfigyelhető. Ez utóbbit az is alátámasztja, hogy a fermentléből azonosított 6 fehérje (CelB, CatB, GelA, AbnC, PepJ, SodA) mindegyike ismert szekretált fehérje volt (13. ábra; Holdom és munkatársai 1996; Emri és munkatársai 2009; Saykhedkar és munkatársai 2012).

Érdemes megjegyezni, hogy az *A. nidulans* több ismert, extracellulárisan (is) jelenlévő fehérjéje esetében sem lehet klasszikus szignál szekvenciát kimutatni. Ilyen fehérje a ChiB kitináz és a SodA szuperoxid dizmutáz is (Holdom és munkatársai 1996; Erdei és munkatársai 2008; Saykhedkar és munkatársai 2012; Szilágyi és munkatársai 2012). Azaz, a szignálszekvencia (kimutatásának) hiánya nem feltétlenül jelenti azt, hogy a fehérje biztosan nem szekretálódik. Vizsgálataink alapján ugyanakkor a *ggtA* gén - a *chiB* és *sodA* génekkel ellentétben - rendelkezik egy „rejtett”, az N-terminálistól mintegy 50 aminosavra lévő szignálszekvenciával (12. ábra). Hasonló szignálszekvenciát találtunk az *A. oryzae* *ggtA* ortológ AO090023000537 génjében is (12. ábra). Ezen szokatlan szignálszekvencia magyarázata lehet annotálási hiba (a gén elejét tévesen azonosították), de az

is elképzelhető, hogy ez a speciális szignálszekvencia biztosítja az enzim kettős (intra- és extracelluláris) termelődését.

4.4 A GgtA lehetséges fiziológiai jelentősége

Az extracelluláris γ GT-ok nagy része γ -glutamil vegyületek lebontásában és C-, N-, illetve S-forrásként történő hasznosításában működik közre. A *Bacillus subtilis* esetében például a γ GT tulajdonképpen egy a poli- γ -glutamil-glutamát kapszula hidrolízisét végző enzim, amely lehetővé teszi a baktérium számára a sejtalkotó aminosav-forrásként történő hasznosítását (Kimura és munkatársai 2004). A *H. pylori* ugyanakkor extracelluláris γ GT segítségével hidrolizálja a Gln-t és a GSH-t és csak a hidrolízis termékeit (Glu, ammónia, Cys-Gly) veszi fel. Más esetekben a γ GT a GSSG bontásával segít fenntartani az extracelluláris tér (pl. növényi apoplaszt) redox egyensúlyát (Ohkama-Ohtsu és munkatársai 2008). A részlegesen tisztított GgtA esetében azonban sem jelentős hidroláz, sem jelentős GSSG bontó aktivitást nem tudtunk kimutatni (24. ábra; 4. táblázat). Elképzelhető, hogy az *A. nidulans* GgtA esetében az enzim feladata nem a γ -glutamil vegyületek bontása, hanem a γ -glutamil vegyületek szintézise lehet. Érdeemes megjegyezni, hogy a GgtA kis hidroláz aktivitása biotechnológiai szempontból előnyös lehet, hiszen kedvezően befolyásolhatja ezen enzim felhasználását különféle γ -glutamil származékok gyártásában (Suzuki és munkatársai 2007).

Eredményeink egy része arra utal, hogy a GgtA képződése több ponton kapcsolódik a tenyészetek nitrogén anyagcseréjéhez és ezen belül is az aminosavak és peptidek hasznosításához:

- Az intenzív GgtA termelést a szénstressz indukálta, azaz olyankor termelődött az enzim, amikor az alternatív energiaforrások (pl. peptidek)

hasznosítása különösen fontos lehet a gomba számára (10. ábra; 2. táblázat). Nem meglepő módon ezen tenyészetek sokféle proteázt is termelnek (Szilágyi és munkatársai 2013).

- A GgtA képződését aminosavak, peptidek és fehérjék jelenléte is felerősítette (10. ábra; 2. táblázat). E jelenség az extracelluláris proteáz termelés esetében szintén megfigyelhető volt (Szilágyi és munkatársai 2010).

- A GgtA termelődését a MeaB fehérje jelenléte jelentősen befolyásolta (2. táblázat). A MeaB egy bZIP típusú transzkripciós faktor, amely a nitrogén katabolit represszió szabályozásában működik közre (Wong és munkatársai 2007). Hiánya nem csak a GgtA, de az extracelluláris proteázok képződésére is hatással volt (Szilágyi és munkatársai 2010). Fontos megjegyezni, hogy a nitrogén katabolit represszió legfontosabb transzkripciós faktora, az AreA, szénstressz alatt nem aktív (Todd és munkatársai 2005). Irodalmi adatok alapján nemcsak a *meaB* gén mutációi, de sok más, a proteáz termelést befolyásoló gén (pl. *fadA*, *flbA*, *ganB*, *rgsA*) mutációja is hatással van a tenyészetek γ GT termelésére (Molnár és munkatársai 2004, 2006).

- A *ggtA* deléciója csökkentette a tenyészetek proteáz termelését (17. ábra) és ezzel összefüggésben fékezte a tenyészetek növekedését laktóz szénforráson kazein pepton jelenlétében (15. ábra), illetve gátolta a kazein pepton RS termelődést csökkentő hatását (16. ábra).

- A *ggtA* deléciója gátolta a kleisztotéciumok érését (18. ábra). E megfigyelés szintén köthető a nitrogén anyagcseréhez, ugyanis az aminosavak jelenléte serkenti (Han és munkatársai 2001), míg az extracelluláris proteázok hiánya fékezi a kleisztotéciumok kialakulását (Emri Tamás szóbeli közlése, DE-TTK, Biotechnológiai és Mikrobiológiai Tanszék).

A fentiek alapján feltételezzük, hogy a GgtA γ -glutamil vegyületek szintézisével segíti a tenyészetek peptid/aminosav hasznosítását. A γ -glutamil

vegyületek képződését a szénéhező tenyészetek lúgos - a GgtA pH optimumához közeli - pH-ja és az extracelluláris fehérjék és proteázok jelenléte miatti nagy aminosav/peptid (azaz γ -glutamil akceptor) koncentráció is segítheti (Emri és munkatársai 2004, 2008; Suzuki és munkatársai 2007). A γ -glutamil vegyületek képződése több ok miatt is hasznos lehet. Egyrészt a γ -glutamil vegyületek szabályozó feladatokat láthatnak el és végső soron a tenyészetek proteáz termelését befolyásolják a szubsztrát jelenlétének függvényében. Hasonló példát láthatunk a lac operon működésének szabályozásánál, ahol az inducer nem maga a laktóz, vagy hidrolízisének termékei (glükóz, galaktóz), hanem a laktóz izomerizációjával képződő allolaktóz (Wheatley és munkatársai 2013). A γ -glutamil vegyületek szabályozó szerepét Viña és munkatársai (1985) is leírták már. Vizsgálataikban azt tapasztalták, hogy a γ GT által termelt γ -glutamil-aminosavak serkentették a patkányok emlősejtjeinek aminosav felvételét. A γ -glutamil-aminosavak ugyanakkor számos előnyös tulajdonsággal rendelkeznek. A γ -glutamiláció növelheti oldékonyságukat (pl. a γ -glutamil-Cys 1000x jobban oldódik vizes közegben, mint maga Cys; Hara és munkatársai 1992) és befolyásolhatja stabilitásukat is (pl. a γ -glutamil-Gln sokkal kevésbé hajlamos piroglutamát képzésére, mint a Gln; Suzuki és munkatársai 2007). Az említett példák is szemléltetik, hogy megfelelő körülmények között a γ -glutamil vegyületek képzése és az aminosavak, peptidek γ -glutamil vegyületek formájában történő felvétele előnyös lehet a gomba számára. A γ -glutamil származékok ráadásul a fent említett előnyös tulajdonságaikat nagy proteáz/peptidáz aktivitás mellett is megőrzik, ugyanis a γ -glutamil csoport jelenléte védelmet biztosít ezen hidrolázokkal szemben (Hara és munkatársai 1992). Természetesen a fenti hipotézis tesztelése további vizsgálatokat igényel.

5. Anyagok és módszerek

5.1 A vizsgált törzsek és tenyésztésük

A kísérleteinkben használt *A. nidulans* törzseket a 7. táblázat foglalja össze.

Törzs	Genotípus	Törzs referencia
rJMP1.59	<i>pyrG89; pyroA4; veA⁺</i>	1
tNJ190-1	<i>pyrG89, ΔAN10444::A. fumigatus pyrG⁺, pyroA4, veA⁺</i>	2 ¹
tNJ190-2	<i>pyrG89, ΔAN10444::A. fumigatus pyrG⁺, pyroA4, veA⁺</i>	2 ¹
tNJ190-3	<i>pyrG89, ΔAN10444::A. fumigatus pyrG⁺, pyroA4, veA⁺</i>	2 ¹
tNJ188-1	<i>pyrG89, ΔAN5658::A. fumigatus pyrG⁺, pyroA4, veA⁺</i>	2 ¹
tNJ188-2	<i>pyrG89, ΔAN5658::A. fumigatus pyrG⁺, pyroA4, veA⁺</i>	2 ¹
tNJ188-3	<i>pyrG89, ΔAN5658::A. fumigatus pyrG⁺, pyroA4, veA⁺</i>	2 ¹
tNJ151-1	<i>PyrG89, ΔAN10444::A. fumigatus pyrG⁺, 3/4pyroA4::AN10444:pyroA⁺, veA⁺</i>	2 ¹
tNJ151-2	<i>pyrG89, ΔAN10444::A. fumigatus pyrG⁺, 3/4pyroA4::AN10444:pyroA⁺, veA⁺</i>	2 ¹
tNJ189-1	<i>pyrG89, ΔAN5658::A. fumigatus pyrG⁺, 3/4pyroA4::AN5658:pyroA⁺, veA⁺</i>	2 ¹
tNJ189-2	<i>pyrG89, ΔAN5658::A. fumigatus pyrG⁺, 3/4pyroA4::AN5658:pyroA⁺, veA⁺</i>	2 ¹
tNJ36	<i>pyrG89, pyrG89::A. fumigatus pyrG⁺, pyroA4, veA⁺</i>	3
JMK1	<i>pabaA1, riboB, yA1, ΔcreA, veA1</i>	4
FGSC A24	<i>sC12, veA1</i>	5
FGSC A26	<i>biA1, veA1</i>	5
FGSC A41	<i>biA1, sB3, veA1</i>	5
FGSC A451	<i>pabaA1, meaB6, cnxH3, sC12, veA1</i>	5
FGSC A553	<i>biA1, cnxH3, veA1</i>	5

7. táblázat A kísérleteinkben felhasznált *A. nidulans* törzsek.

A törzsek eredetét számokkal jelöltem: 1. Kwon és munkatársai (2010); 2. Spitzmüller és munkatársai (2015); 3. Szilágyi és munkatársai (2010); 4. Shroff és munkatársai (1997); 5. McCluskey (2003)

¹ - A törzseket Nak-Jung Kwon és Jae-Hyuk Yu (Departments of Bacteriology and Genetics, University of Wisconsin) készítette jointed PCR-en alapuló irányított mutagenézis segítségével a Spitzmüller és munkatársai (2015) közleményben leírtak alapján.

A törzseket nitrátos minimál tápagon tartottuk fenn (Barratt és munkatársai 1965). A tápagar az alábbi összetevőkből állt: 10 g/l glükóz, 6

g/l NaNO_3 , 1,5 g/l KH_2PO_4 , 0,5 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,5 g/l KCl, 0,1 v/v % nyomelem oldat, 20 g/l agar, pH 6,5. A tápagar szükség szerint 0,2 g/l L-metionint, 25 $\mu\text{g/l}$ biotint, 200 $\mu\text{g/l}$ 4-aminobenzoésavat (paba) és 200 $\mu\text{g/l}$ piridoxint is tartalmazott. A nyomelemoldat az alábbi komponensekből tevődött össze: 22 g/l $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 11 g/l H_3BO_3 , 5 g/l $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 5 g/l $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,6 g/l $\text{CoSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 1,6 g/l $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 1,1 g/l $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ és 50 g/l Na_2EDTA . A tápagarra leoltott törzset 1 héten át 37 °C-on inkubáltuk, majd a kinőtt és bescpórázott tenyészeteket 4 °C-on tároltuk. A maximum 1 hétig tárolt, bescpórázott tenyészeteket használtuk fel a kísérleteinkhez.

A szénforrás éhezés hatásait süllyesztett tenyészetekben tanulmányoztuk. A kísérleteket YGL tápközegben felnövesztett gomba micéliummal végeztük. A YGL tápleves 5 g/l élesztőkvonattal kiegészített Barratt-féle minimál tápleves volt. A tápleves 100 ml-ét 5×10^6 spórával oltottuk be és a tenyészeteket rázóinkubátorban 37 °C-on 200 rpm-mel ráztuk 18 órán át. A 18 órás, még növekedő tenyészeteket zsugorított üvegszűrőn leszűrtük, mostuk és az így kapott micéliummal dolgoztunk tovább. A micélium mosásához 37 °C-ra előmelegített, szénforrás-mentes Barratt-féle minimál táplevest (GD) használtunk. A micéliumot 100 ml Barratt-féle minimál táplevesbe szuszpendáltuk fel és 37 °C-on 200 rpm-mel ráztuk tovább. Az átmosást követően a tenyészetek szárazanyag tartalma 5-6 g/l volt. A tápleves összetételét a kísérletektől függően az alábbi módon módosítottuk:

- Az extracelluláris γGT izolálásakor glükóz helyett 20 g/l laktózt tartalmazó táplevest (L) használtunk (8. táblázat).
- A γGT képződésének tanulmányozásához és a mutáns törzsek vizsgálatához glükóz (szénforrás) mentes (GD), illetve glükóz helyett 20 g/l laktózt tartalmazó (L) tápleveseket alkalmaztunk, melyeket a kísérlettől függően 4

g/l kazein peptonnal (+KP), 4 g/l élesztőkivonattal (+YE), 4 g/l BSA-val, 4 g/l Gly-Gly-nel, 4 g/l Na-Glu-tal vagy 4 g/l Na-Gln-nal egészítettünk ki (8. táblázat).

- A glutation anyagcserében érintett gének transzkripciójának vizsgálatokor a tápleves szén- és/vagy nitrogénforrásként 1) 20 g/l glükózt és 6 g/l NaNO₃-ot (G), 2) 20 g/l laktózt és 6 g/l NaNO₃-ot (L), 3) 20 g/l laktózt, 6 g/l NaNO₃-ot és 4 g/l élesztőkivonatot (L+YE), 4) 6 g/l NaNO₃-ot (szénforrás mentes tápközeg; GD), 6 g/l NaNO₃-ot és 4 g/l élesztőkivonatot (GD+YE), vagy 6) 20 g/l glükózt (nitrogénforrás mentes tápközeg; ND) tartalmazott (8. táblázat).

Megnevezés	Összetétel
felületi tenyészet	Barratt-féle nitrátos tápagar
YGL	élesztőkivonattal kiegészített, Barratt-féle glükóz-nitrát (komplex) tápleves
G	Barratt-féle glükóz-nitrát tápleves
L	Barratt-féle laktóz-nitrát tápleves (glükóz helyett laktózt tartalmazó G tápleves)
GD	szénforrásmentes tápleves (glükózt nem tartalmazó G)
ND	nitrogénforrásmentes tápleves (Na-nitrátot nem tartalmazó G tápleves)
L + YE	élesztőkivonattal kiegészített L tápleves
L + KP	kazein peptonnal kiegészített L tápleves
GD + YE	élesztőkivonattal kiegészített GD tápleves
GD + KP	kazein peptonnal kiegészített GD tápleves

8. táblázat A dolgozatban szereplő tápközégek és jelölésük.

5.2 Mintavétel és a minta előkészítése

Az RNS izoláláshoz mintavételkor 5-15 ml tenyészetet zsugorított üvegszűrőn átszűrtünk, jéghideg (0 °C-os) dietil-pirokarbonáttal (DEPC) kezelt vízzel mostuk, ezt követően a micéliumot előhűtött, steril Eppendorf csövekbe mértük és -70 °C-on tároltuk. A micéliumot az RNS izolálás előtt liofileztük, majd elporítottuk.

Az intracelluláris enzimaktivitás mérésekor 10 ml tenyészetet zsugorított üvegszűrőn átszűrtünk, ultraszűrt vízzel mostunk, azután a micéliumokat 10 ml 4 °C-os 0,1 mol/l-es foszfát pufferben (pH 7,6) szuszpendáltuk fel és -20 °C-on fagyasztva tároltuk. Mérés előtt a fagyott mintákat X-press (AB Biox, Göteborg, Svédország) segítségével tártuk fel. A sejtmentes kivonatot centrifugáltuk (10 perc, 10000 g, 4 °C) és a felülúszót használtuk méréseinkhez (Emri és munkatársai 1997).

Az extracelluláris enzimaktivitás mérésekor 10 ml tenyészetet zsugorított üvegszűrőn átszűrtünk és a szűrletet a mérésig -20 °C-on fagyasztva tároltuk.

A tenyészetek RS, GSH és GSSG tartalmának meghatározásakor 5 ml tenyészetet zsugorított üvegszűrőn átszűrtünk, a kiszűrt micéliumot desztillált vízzel alaposon mostuk, majd 1 ml 5 w/v % 5'-szulfoszalicilsav oldatban szuszpendáltuk fel. A mintákat -20 °C-on tároltuk. A mérés előtt a sejtaltörmeléket 20 perc 4 °C-on történő inkubációt követően lecentrifugáltuk (10 perc, 10000 g, 4 °C) és a felülúszóval dolgoztunk tovább.

5.3 Analitikai vizsgálatok

5.3.1 Az intracelluláris és extracelluláris γ GT aktivitás mérése

Az intracelluláris γ GT aktivitás mérésekor a reakcióelegy 0,1 mol/l Tris-HCl-t (pH 8,0), 20 mmol/l Gly-Gly, 1 mmol/l γ GpNA-t és 50 % (v/v)

mintát (sejtmentes kivonat) tartalmazott. Az 1 órás, szobahőmérsékleten történő inkubációt követően a mintákat centrifugáltuk (10 perc, 10000 g, 4°C) és a felszabadult *p*-nitroanilid mennyiségét az abszorbancia 410 nm-en mért növekedéséből határoztuk meg (Emri és munkatársai 1997). Az enzimaktivásokat a minták fehérjetartalmára vonatkoztattuk és a specifikus aktivitásokat mkat/kg-protein dimenzióban adtuk meg. A minták fehérjetartalmát Bradford-reagens segítségével határoztuk meg (Bradford 1976).

Az extracelluláris γ GT aktivitás mérése hasonló módon történt, de a reakcióelegy 5 % (v/v) mintát (fermentlé) tartalmazott. Ebben az esetben a minták aktivitását a fermentlé térfogatára vonatkoztattuk és mkat/l dimenzióban adtuk meg. Egyes kísérletekben a γ GpNA-et 1 mmol/l Gln, GSH vagy GSSG helyettesítette, míg a Gly-Gly helyett olykor 20 mmol/l glutamát (Glu), Gln, Cys, Met, aszparagin (Asp), Gly, szerin (Ser), treonin (The), ornitin (Orn) vagy Cys-Gly szerepelt a reakcióelegyben. Más kísérletekben a reakcióelegy 0-1 mol/l NaCl-ot, 1,5 mmol/l GSH-t, illetve GSSG-t vagy 0-1 mmol/l Gln-t is tartalmazott.

5.3.2 Az extracelluláris proteináz termelés detektálása

A proteináz aktivitás mérésénél 100 μ l mintához, 100 μ l, 25 mg/ml-es, 0,2 mol/l Na_2HPO_4 /0,1 mol/l citromsav (pH 6,5) pufferben feloldott azokazein oldatot adtunk. A 30 perces inkubációt (37 °C) követően a reakciót 800 μ l 5 w/v %-os triklór-ecetsavval állítottuk le. A minták centrifugálása (5 perc, 10000 g, 4 °C) után a felülúszóhoz 1:1 arányban 0,5 mol/l-es NaOH oldatot adtunk. A proteináz aktivitás hatására felszabaduló színes termék mennyiségének meghatározása fotometriásan történt ($\lambda = 440\text{nm}$) (Tomarelli és munkatársai 1949). Az enzimaktivitások értékét egységekben (U) fejeztük

ki, 1 U az az enzim mennyiség volt, ami 1 egység adszorbancia változást okoz a fent leírt aktivitásmérés során. A mért értékeket a méréshez felhasznált minta térfogatára vonatkoztattuk és U/ml dimenzióban adtuk meg.

5.3.3 A szárazanyag-tartalom meghatározása

A tenyészetek szárazanyag-tartalmának (DCM) mérésekor 5 ml tenyészetet zsugorított üvegszűrőn szűrtünk át, a kiszűrt micéliumokat desztillált vízzel mostuk, majd súlyállandóságig (2 nap) szárítottuk, végül lemértük a tömegét (Pusztahelyi és munkatársai 1997). A kapott értéket 1 l-re vonatkoztattuk és g/l dimenzióban adtuk meg.

5.3.4 A RS tartalom meghatározása

A sejtek RS tartalmának vizsgálatánál a tenyészetekhez 2',7'-diklórfluorescein diacetátot adtunk 10 $\mu\text{mol/l}$ -es végkoncentrációban (Halliwell és Gutteridge 2007). Az egy óra alatt képződő 2',7'-diklórfluoreszcin (DCF) koncentrációját fluorimetriás módszerrel határoztuk meg ($\lambda_{\text{ext,DCF}} = 502 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em,DCF}} = 523 \text{ nm}$) a szulfoszalicilsavas módszerrel feltárt (5.2 fejezet) mintákból DCF-el készült kalibráló sor segítségével. A minták DCF tartalmát a sejtek száraztömegére vonatkoztattuk és pmol/mg DCM dimenzióban adtuk meg.

5.3.5 A sejtek oxidált és redukált glutation tartalmának mérése

A minták GSSG tartalmának meghatározásához az Anderson (1985) által kidolgozott „rate assay” eljárást használtuk. A reakcióelegy a következő összetételű volt: 115 mmol/l Na-foszfát puffer (pH 7,5), 50 mmol/l EDTA, 0,6 mmol/l 5,5'-ditio-bis(2-nitrobenzoesav) (DTNB), 0,2 mmol/l NADPH, 1,5 kU/l GR és 10 % (v/v) minta. A DTNB redukálódását 412 nm-en,

fotometrikus úton követtük nyomon. A minták GSH tartalmát előzetesen 2-vinilpiridines kezeléssel (185 mmol/l, 1 óra, pH 6,0-7,0) reagáltattuk el. A minták GSSG tartalmát a mért jel alapján kalibráló sor segítségével határoztuk meg.

A GSH tartalom meghatározásához szintén az Anderson-féle (1985) módszer alapján történt olyan módon, hogy a minták teljes glutation (GSH + GSSG) tartalmát mértük meg (a 2-vinilpiridines kezelés elhagyásával) és a GSSG tartalom ismeretében határoztuk meg a GSH mennyiségét. A mért értékeket a minták DCM-ra vonatkoztattuk és nmol/mg dimenzióban adtuk meg.

5.4 Transzkripció vizsgálatok

5.4.1 RNS izolálás

A liofilezett micéliumból az RNS-t TRISOL reagens (Invitrogen) segítségével izoláltuk a gyártó által javasolt protokoll alapján (Chomczynski 1993). Az RNS mintákat DNáz kezelést követően használtuk fel az RT-qPCR mérésekhez. A DNáz kezelést Turbo DNA-free Kit (Life Technology) segítségével végeztük. A minták RNS koncentrációját és tisztaságát spektrofotométerrel határoztuk meg. Az RNS minták minőségét denaturáló agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük.

Az agaróz gél 10 g/l agarózt, 10 % (v/v) 10x MOPS-EDTA oldatot, 0,002 % (v/v) GelRed-et (10 mg/ml) és 5 % (v/v) formaldehidet tartalmazott. A futtatás 1x MOPS-EDTA oldatban történt 80 V feszültség mellett. Az RNS mintákat (7,5 µg) az elektroforézis előtt 5 µl 25 mmol/l etilén-diamin-tetraecetsavat (EDTA) és 10 g/l nátrium-lauril-szulfátot tartalmazó oldat és 25 µl minta felvivő puffer (RNA loading buffer, Invitrogen) elegyében inkubáltuk 10 percig 68 °C-on. A 10x MOPS-EDTA összetétele a következő

volt: 200 mmol/l MOPS, 50 mmol/l nátrium-acetát, 10 mmol/l EDTA, pH 7,0.

5.4.2 Génexpresszó vizsgálata RT-qPCR segítségével

Az RT-qPCR reakciókat QuantiTect™ SYBR® Green RT-qPCR kittel (Qiagen) végeztük el, a gyártó által megadott protokoll alapján. Minden reakcióelegy 400 ng totál RNS-t, 2,5 mmol/l Mg^{2+} -t és 0,5 μ mol/l génspecifikus primert tartalmazott. Az RT-qPCR reakció lépései a következők voltak: 1.) reverz transzkripció, 50 °C, 30 perc; 2.) reverz transzkriptáz denaturáció, 95 °C, 15 perc; 3.) DNS denaturáció, 94 °C, 15 másodperc; 4.) primer hibridizáció, T_m -(5-8) °C, 30 másodperc; 5.) lánc hosszabbítás, 72 °C, 30 másodperc. A 3-5 lépéseket 40 ciklusban ismételtük meg.

Vizsgálatainkhoz az alábbi oligonukleotid PCR primereket és annealing hőmérsékleteket használtuk fel:

ggcsA (AN3150): F: 5'-AGGAGGGAGGTAGCAAAAG-3', R: 5'-CAGATGGAGGGTAATAAGGC-3' (47 °C)

ggtA (AN10444): F: 5'-GTCGCCATCGCTGTCGTTATC-3', R: 5'-CGAGTCCAACGGTGACGGAAG-3 (51 °C)

AN5658: F: 5'-CCAGACAAAACCCCGACTTTG-3', R: 5'-CAGCATTTCCACCCTGACTC-3' (51 °C)

gtaA (ANID4809): F: 5'-GACGCCGCTCCTATTCTCTG-3', R: 5'-ATTGCCTCTCGCTGGGTTAG-3' (55 °C)

actA (AN6542): F: 5'-GAAGTCCTACGAACTGCCTGATG-3, R: 5'-AAGAACGCTGGGCTGGAA-3' (51 °C)

eEF-3 (AN6700): F: 5'- CCTATTCCCGAGCAAGTTC-3', R: 5'-TGATGTTTCCTGACGATGGC-3' (51 °C)

dug1 (AN3459): F: 5'-CCTGTCTGGCTCGTTCATC-3', R: 5'-CGTCTTCTTTCAATGCGGGC-3' (51 °C)

dug2 (AN1879): F: 5'-GCAATGGACAATACAGGGC-3', R: 5'-GGGAATGGATGGAATAGAGC-3' (51 °C)

dug3 (AN1092): F: 5'-ACTGCGAAACTTGGAACGG-3', R: 5'-CTAAGAACAATGCGAATGCCC-3' (51 °C)

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

A relatív transzkripció mértékét a Δ módszerrel számoltuk ki:

$\Delta CP = CP_{\text{vizsgált gén}} - CP_{\text{referencia gén}}$, ahol ΔCP a relatív transzkripció és CP a PCR termék akkumulálódásához szükséges ciklusszám a vizsgált gén, illetve a referencia gén esetében. A referencia gén az *actA* (Kovács és munkatársai 2013), illetve az *eEF-3* (Szilágyi és munkatársai 2013) gén volt.

5.5 Az extracelluláris γ GT izolálása és jellemzése

5.5.1 Az enzim tisztítása ioncsere kromatográfiával

Az enzim tisztítása érdekében a fermentléhez (50 ml) 60 %-os telítettségig kristályos $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -ot adagoltunk 4 °C-on és 1 órán át történő állandó kevertetés mellett. A kicsapódó fehérjéket lecentrifugáltuk (20 perc, 20000 g, 4 °C), majd a felülúszóhoz ismét kristályos $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -ot

adagoltunk 80 %-os telítettségig. Az ismételt 1 órán át történő 4 °C-os inkubációt követően a kicsapódó fehérjét lecentrifugáltuk (20 perc, 20000 g, 4 °C) és a csapadékot 5 ml 0,1 M K₂HPO₄ pufferben (pH 8,0) vettük fel, végül egy éjszakán át dializáltuk 4 °C-on ugyanezen pufferrel szemben.

Az anioncserés kromatográfiát Biologic LP (Biorad) készülék segítségével valósítottuk meg. A kromatográfiához DEAE-Sephadex töltetű oszlopot (2 cm x 20 cm) használtunk. Az oszlop equilibrálása 0,1 M/l kálium-foszfát pufferrel (pH 8,0) történt. Az elúcióhoz 0-1 M/l NaCl-ot tartalmazó 0,1 M/l kálium-foszfát puffert (pH 8,0) használtunk. A folyási sebesség 0,5 ml/perc, a frakciók térfogata 2,5 ml volt. A készülék automatikusan detektálta a frakciók fehérjetartalmát (λ = 280 nm) és konduktivitását. A frakciók γ GT aktivitását az 5.3.1 fejezetben leírtak alapján γ GpNA és Gly-Gly segítségével detektáltuk, a legaktívabb három frakciót egyesítettük és ezt használtuk fel méréseinkhez. Az aktív frakciók fehérjetartalmát Bradford-reagens segítségével is meghatároztuk (Bradford 1976). A minta tisztaságát SDS-poliakrilamid gélelektroforézis (SDS-PAGE) segítségével ellenőriztük. Az SDS-PAGE-hez 13 w/v %-os gél használtunk (LeBlanc és Cochrane 1987) és a protein sávokat Coomassie Blue festéssel tettük láthatóvá (Laemmli 1970). Molekulasúly markerként előfestett Page-Ruler™ (Fermentas) fehérje létrát használtunk.

5.5.2 Az extracelluláris γ GT hőmérséklet és pH optimumának meghatározása

A hőmérséklet optimum meghatározásakor a tisztított extracelluláris γ GT aktivitását 25-75 °C tartományban teszteltük.

A pH optimum meghatározásakor a mérést pH 5-7 (0,1 M/l kálium-foszfát puffer), pH 7-9 (0,1 M/l Tris/HCl puffer) és pH 9-11 (0,1 M/l Gly puffer) tartományban végeztük.

5.5.3 Az extracelluláris γ GT szubsztrát specifitásának jellemzése

Az extracelluláris γ GT szubsztrát specifitásának meghatározásakor a reakcióelegy 0,1 mol/l kálium-foszfát puffer (pH 8,0) oldva 1 mmol/l Gln-t, GSH-t, vagy GSSG-t, mint γ -glutamil donort és 20 mmol/l Gly-Gly-t vagy Cys-Gly-t, mint γ -glutamil akzeptort tartalmazott. A reakcióelegyet 2 órán át szobahőmérsékleten inkubáltuk. Ezt követően a mintákat liofileztük és a csapadékot metanolban oldottuk fel. Centrifugálást (1 perc, 10000 g, 4 °C) követően a reakció során képződő γ Glu-Gly-Gly-t, illetve GSH-t LC-ESI-MS/MS (High-performance liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry) segítségével azonosítottuk. A vizsgálatokat Gonda Sándor (Debreceni Egyetem, Növénytani Tanszék) és Kiss-Szikszai Attila (Debreceni Egyetem, Szerves Kémiai Tanszék) végezte a Spitzmüller és munkatársai (2016) közleményben leírtak alapján.

5.6 A fehérje azonosítása 2D PAGE alkalmazásával

A fehérjék 2D gélelektroforézisét Dr. Keserű Judit (Debreceni Egyetem, Humánagenetikai Tanszék) végezte el a Spitzmüller és munkatársai (2015) közleményben leírtak alapján. A minták előkészítésénél az alábbiak szerint jártam el: A sejtmentessé szűrt fermentléből az extracelluláris fehérjéket 20 w/v % triklór-ecetsav segítségével csaptuk ki. A triklór-ecetsav minta 1:1 arányú elegyét 30 percig jégen inkubáltuk, majd a kicsapódott fehérjéket centrifugálással (20 perc, 10000 g, 4 °C) gyűjtöttük össze. A csapadékot 0,5 ml jéghideg acetonnal mostuk, majd szobahőmérsékleten szárítottuk (Pusztahelyi és munkatársai 2011) és 0,1 ml rehidratáló pufferben oldottuk vissza. A rehidratáló puffer az alábbi összetételű volt: 7 mol/l urea, 2 mol/l tiourea, 20 g/l 3-[(3-kolamidopropil)-dimetilammónium]-1-

propánszulfonát (CHAPS), 50 mmol/l ditiotritol (DTT), 2 g/l 100X Bio-Lyte 3/10 IPG puffer, 0,02 g/l brómfenolkék.

A gélből kivágott minták azonosítása tripszines emésztést követően nanoHPLC-MS rendszer segítségével történt. A vizsgálatokat Dr. Csósz Éva (Debreceni Egyetem, Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet) végezte a Spitzmüller és munkatársai (2015) közleményben leírtak alapján.

5.7 A spóraszám és a kleisztotécium mennyiségének vizsgálata

A törzsek frissen készített spóra szuszpenziójából (2×10^7 konidium/ml) 5 μ l-t Barratt-féle minimál tápagar közepére cseppentettük, majd a tenyészeteket 37 °C-on 6 napig inkubáltuk. A képződött konidiumokat 0,1 v/v % Tween 20 tartalmú desztillált vízzel mostuk le. A kapott szuszpenzió töménységét Bürker-kamrával becsültük meg, a telep területére vonatkoztattuk (Hagiwara és munkatársai 2007) és konidium / cm² egységben adtuk meg.

A törzsek kleisztotécium képzését a fentiekhez hasonló módon végeztük, de ebben az esetben a Petri-csészéket 1 nap inkubációt követően szigetelő szalaggal lezártuk (oxigén limitáció) (Kawasaki és munkatársai 2002). A teljesen kifejlődött, sötéten pigmentált kleisztotéciumok és az éretlen kleisztotécium kezdemények számának meghatározása sztereomikroszkóp segítségével történt. A kleisztotéciumok mennyiségét kleisztotécium / cm² egységben adtuk meg.

5.8 Statisztikai vizsgálatok

A disszertációban minden egyes kísérletnél 3-5 független mérés átlagát és annak szórását adtuk meg. Az átlagértékek közötti eltéréseket a Student-

féle t-próbával teszteltük és csak a $p \leq 5\%$ valószínűségek esetén fogadtuk el a különbséget szignifikánsnak.

5.9 Felhasznált vegyszerek

A kísérleteinkben felhasznált finomvegyszerek, ha másként nem jelöltem, a Sigma-Aldrich Kft. termékei voltak. Minden egyéb vegyszer legalább analitikai minőségű volt és a VWR Kft.-től került beszerzésre.

6. Összefoglalás

A szénstressz, azaz a szénforrás éhezés és a szénforrás limitáció az egyik leggyakoribb stresszhelyzet a természetben és ipari körülmények között egyaránt. Vizsgálataim középpontjában az *A. nidulans*, mint modell organizmus szénéhező, illetve szénforrás limitált tenyészetének tanulmányozása állt. E tenyészetek egyik jellegzetes tulajdonsága, hogy a hifák GSH tartalma folyamatosan csökken és néhány napon belül már a kiindulási érték 10 %-át sem éri el (Emri és munkatársai 2004, 2008). Hasonló jelenséget korábban a *P. chrysogenum* szénéhező tenyészetében is megfigyeltek (Sámi és munkatársai 2001). A GSH tartalom csökkenése együtt járt a sejtek RS tartalmának emelkedésével és az oxidatív stressz által is szabályozott folyamatok (többek között az apoptózis és a szekunder anyagcsere) indukálódásával (Emri és munkatársai 2004, 2008). Minthogy a szénéhező tenyészetekben a γ GT termelés is indukálódik és a γ GT-t sokáig a legfontosabb GSH lebontó enzimnek tartották (Pócsi és munkatársai 2004), úgy gondoltuk, hogy a két jelenség (GSH tartalom csökkenés és a γ GT indukció) között ok okozati kapcsolat lehet. Vizsgálataim középpontjában az *A. nidulans* γ GT-ának megismerése állt. Legfontosabb eredményeim az alábbiak:

1. A *ggtA* (AN10444) gén delécioja a kimutatási érték alá csökkentette a tenyészetek γ GT aktivitását, ami arra utal, hogy - legalább is az általunk vizsgált körülmények között - az AN10444 gén által kódol GgtA az egyetlen olyan fehérje, amely jelentős γ GT aktivitással rendelkezett (3.1 alfejezet).

2. A tenyészetek relatív *ggtA* transzkripció és specifikus γ GT aktivitás változásai alapján elmondható, hogy a szénéhezés mellett a szénforrás limitáció is indukálta a GgtA termelést. Az indukció mértéke peptidek adagolásával növelhető volt, de csak aktív *meaB* gén jelenlétében. E

tekintetben a GgtA termelés hasonló volt az extracelluláris proteáz termeléshez (3.2 alfejezet).

3. A γ GT aktivitás nem csak a hifákból, de a fermentléből is jól detektálható volt. Noha a *ggtA* gén klasszikus szignál szekvenciát nem kódol, az enzim extracelluláris térben való megjelenése - nagy valószínűséggel - aktív szekréciónak és nem a sejtek autolítikus szétesésének volt a következménye (3.2-3.3 alfejezetek).

4. Az extracelluláris térből frakcionált ammónium-szulfátos kicsapás és DEAE-Sephadex anioncserélő kromatográfia segítségével részlegesen kitisztított enzim pH optimuma pH 8,0-nak, hőmérséklet optimuma 45 °C-nak adódott. Az enzim Michaelis-Menten kinetikát mutatott a γ GpNA szubsztrát esetében ($K_m = 0,2$ mM) és aktivitása NaCl jelenlétében nem nőtt, hanem csökkent. A gyengén lúgos pH optimum arra utal, hogy az enzim a szénéhező tenyészetek gyengén lúgos fermentléjében is jól működik (3.5 alfejezet).

5. A tisztított enzim jelentős transzpeptidáz, de minimális hidroláz aktivitással rendelkezett. A Gly-Gly mellett a legjobb γ -glutamil akzeptornak a Glu bizonyult, míg a γ GpNA mellett a Gln-t és a GSH-t (kisebb mértékben a GSSG-t) is fel tudta használni, mint γ -glutamil donort (3.5 alfejezet).

6. A Δ *ggtA* törzzsel végzett vizsgálatok alapján a GgtA nem szükséges a sejtek GSH tartalmának csökkenéséhez szénstressz alatt (3.4 alfejezet). A GSH intracelluláris lebontásáért - feltételezhetően - inkább az elsőként a *S. cerevisiae*-ben leírt DUG útvonal (Kaur és munkatársai 2012; Kumar és munkatársai 2003) lehet felelős (3.6 alfejezet).

7. A GgtA és az extracelluláris proteáz termelésben megfigyelt hasonlóságok, a Δ *ggtA* törzs fenotípusa, valamint a GgtA gyenge hidroláz aktivitása alapján (3.4 és 3.5 alfejezet) úgy gondoljuk, hogy az enzim

elsődleges feladata nem a γ -glutamil vegyületek (beleértve a GSH-t és a GSSG-t is) lebontása, hanem ellenkezőleg a γ -glutamil vegyületek szintézise lehet. A dolgozatban bemutatott hipotézisünk szerint a γ -glutamil vegyületek képződése a szénéhező és szénforrás limitált tenyészetek aminosavak és peptid hasznosítását segíthetik elő. E hipotézis alátámasztása azonban még további vizsgálatokat igényel.

7. Summary

Carbon stress (carbon starvation and carbon limitation) is one of the most common stresses both in Nature and in industry. Here, I studied carbon starved and carbon limited cultures of *A. nidulans* as a model organism. One of the characteristic features of these cultures is that the GSH content of hyphae continuously decreases until it reaches a very low (less than 10 % of original value) level in a few days (Emri *et al.* 2004, 2008). Similar changes have previously been observed with carbon starved *P. chrysogenum* cultures (Sámi *et al.* 2001). Depletion of the GSH pool is followed by the accumulation of RS and the induction of processes (*e.g.* apoptosis and secondary metabolism) which are regulated by oxidative stress (Emri *et al.* 2004, 2008). Since carbon starved cultures also produce high γ GT activities and this enzyme is thought to be involved in GSH degradation (Pócsi *et al.* 2004), we assumed a causal relationship between the two phenomenon (GSH depletion and induction of γ GT). I studied the properties, regulation and physiological significance of γ GT in *A. nidulans*. The main results of this study are the followings:

1. Deletion of the *ggtA* (AN10444) gene reduced γ GT activity to below the detection limit suggesting that - at least under the conditions we studied - GgtA (encoded by the AN10444 gene) was the only protein which had significant γ GT activity.

2. Both carbon starvation and carbon limitation induced γ GT production according to the detected changes in the relative transcription of *ggtA* as well as in the specific γ GT activities of cultures. Addition of peptides to the fermentation broth enhanced this induction but only in the presence of active *meaB* gene. In this respect, GgtA formation was similar to extracellular protease production.

3. γ GT activities were detected both from hyphae and from the fermentation broth. Although the *ggtA* gene does not encode a regular signal sequence, the extracellular occurrence of this enzyme was - most likely - the consequence of active secretion and not passive liberation from autolysing cells.

4. GgtA was partially purified by fractionated ammonium-sulfate precipitation and DEAE-Sephadex anion exchange chromatography. The pH and temperature optima of the enzyme were pH 8.0 and 45 °C, respectively. It showed Michaelis-Menten kinetics with γ GpNA as the substrate ($K_m = 0,2$ mM) and its activity did not increase, but even decreased, in the presence of NaCl. The slightly alkaline pH optimum indicates that the enzyme can be active in the fermentation broth of carbon starved cultures.

5. The partially purified enzyme had significant transpeptidase and negligible hydrolase activity. Besides GlyGly, Glu was the best γ -glutamyl acceptor and in addition to γ GpNA, Gln and GSH (as well as GSSG to a much lesser extent) functioned as γ -glutamyl donors in the GgtA catalyzed reaction.

6. Surprisingly, GgtA was not necessary for the bulk degradation of intracellular GSH under carbon stress according to the phenotype of the *Δ ggtA* strains. RT-qPCR experiments suggest that instead of GgtA, the orthologues of the *S. cerevisiae* DUG pathway (Kaur *et al.* 2012; Kumar *et al.* 2003) may be responsible for the regulation of intracellular GSH contents.

7. On the basis of the similarities between protease and γ GT production, the phenotype of *Δ ggtA* strain and the weak hydrolase activity of GgtA we assume that the main function of GgtA is not to degrade but synthesize γ -glutamyl compounds. This process may help the utilization of

peptides and amino-acids in carbon stressed cultures. However, additional experiments are needed to verify this hypothesis.

8. Irodalomjegyzék

- Abarca, M.L., Bragulat, M.R., Castellá, G. and Cabañes, F.J. (1994) Ochratoxin A production by strains of *Aspergillus niger* var. *niger*. *Appl Environ Microbiol* 60, 2650-2652.
- Abe, K., Gomi, K., Hasegawa, F., Machida, M. (2006) Impact of *Aspergillus oryzae* genomics on industrial production of metabolites. *Mycopathologia* 162, 143-153.
- Abe, K. and Gomi, K. (2008) Food products fermented by *Aspergillus oryzae*. In: *The Aspergilli: Genomics, Medical Applications, Biotechnology and Research Methods*, Osmani, S.A. and Goldman, G.H. eds. (Boca Raton, FL: CRC Press, Taylor and Francis Group), pp. 429-439.
- Adamis, P.D., Mannarino, S.C., Eleutherio, E.C. (2009) Glutathione and gamma-glutamyl transferases are involved in the formation of cadmium-glutathione complex. *FEBS Lett* 583, 1489-1492.
- Adams, T.H., Wieser, J.K., Yu, J.H. (1998) Asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Microbiol Mol Biol Rev* 62, 35-54.
- Agblor, A.A. and Josephy, P.D. (2013) Donor substrate specificity of bovine kidney gamma-glutamyltransferase. *Chem Biol Interact* 203, 480-485.
- Ahluwalia, S.S. and Goyal, D. (2007) Microbial and plant derived biomass for removal of heavy metals from wastewater. *Bioresour Technol* 98, 2243-2257.
- Alcazar-Fuoli, L. and Mellado, E. (2004) Current status of antifungal resistance and its impact on clinical practice. *Br J Haematol* 166, 471-484.

- Anders, M.W. (2004) Glutathione-dependent bioactivation of haloalkanes and haloalkenes. *Drug Metab Rev* 36, 583-589.
- Anderson, M.E. (1985) Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. *Methods Enzymol* 113, 548-555.
- Aneja, K.R., Sharma, C., Joshi, R. (2010) Fungal infection of the ear: a common problem in the north eastern part of Haryana. *Int J Pediatric Otorhinolaryngol* 74, 604-607.
- Anzai, T., Takatori, K., Kosuge, J., Akai, M., Higuchi, T. (2000) Distribution of *Emericella nidulans* in the environment of thoroughbred stables. *J Equine Sc* 11, 19-21.
- Anzai, T., Takatori, K., Shimozawa, K., Manglai, D. (2000) Fungal and bacterial isolation from inflamed guttural pouches. Drug susceptibility of the isolates. *J Japan Vet Med Assoc* 53, 63-66.
- Archer, D.B. (2000) Filamentous fungi as microbial cell factories for food use. *Current Opinion in Biotechnology* 11, 478-483.
- Archer, D.B. and Turner, G. (2006) Genomics of protein secretion and hyphal growth in *Aspergillus*. In: *The Mycota XIII*, Brown, A.J.P., ed. (Berlin: Springer-Verlag), pp. 75-96.
- Ariyanayagam, M.R. and Fairlamb, A.H. (1999) *Entamoeba histolytica* lacks trypanothione metabolism. *Mol Biochem Parasitol* 103, 61-69.
- Armstrong, R.N. (1994) Glutathione S-transferases: structure and mechanism of an archetypical detoxication enzyme. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 69, 1-44.

- Bachhawat, A.K., Ganguli D., Kaur J., Kasturia N., Thakur A., Kaur H., Kumar A., Yadav A. (2009) Glutathione production in yeast. *Yeast Biotechnology: Diversity and Applications*, pp. 259-280.
- Baerends, R.J., Sulter, G.J., Jeffries, T.W., Cregg, J.M., Veenhuis, M. (2002) Molecular characterization of the *Hansenula polymorpha* FLD1 gene encoding formaldehyde dehydrogenase. *Yeast* 19, 37-42.
- Bard, S., Noel, P., Chauvin, F., Quash, G. (1986) gamma-Glutamyltranspeptidase activity in human breast lesions: an unfavourable prognostic sign. *Br J Cancer* 53, 637-642.
- Barkai-Golan, R. (2008a) *Aspergillus* mycotoxins. In: Barkai-Golan, R. and Paster, N. (eds.) Mycotoxins in fruits and vegetables. *Elsevier*, San Diego, CA, USA, pp. 115-151.
- Barkai-Golan, R. (2008b) *Penicillium* mycotoxins. In: Barkai-Golan, R. and Paster, N. (Eds.) Mycotoxins in fruits and vegetables. *Elsevier*, San Diego, CA, USA, pp. 153-183.
- Barratt, R.W., Johnson, G.B., Ogata, W.N. (1965) Wild-type and mutant stocks of *Aspergillus nidulans*. *Genetics* 52, 233-246.
- Bello, M.H. and Epstein, L. (2013) Clades of γ -glutamyltransferases (GGTs) in the ascomycota and heterologous expression of *Colletotrichum graminicola* CgGGT1, a member of the pezizomycotina-only GGT clade. *J Microbiol* 51, 88-99.
- Bello, M.H., Morin, D., Epstein, L. (2013) γ -Glutamyltransferases (GGT) in *Colletotrichum graminicola*: mRNA and enzyme activity, and evidence that CgGGT1 allows glutathione utilization during nitrogen deficiency. *Fungal Genet Biol* 51, 72-83.

Bennett, J.W. and Klich, M. (2003) Mycotoxins. *Clin Microbiol Rev* 16, 497-516.

Bentley, R., and Bennett, J.W. (2008) A ferment of fermentations: reflections on the production of commodity chemicals using microorganisms. *Adv Appl Microbiol* 63, 1-32.

Betro, M.G., Oon, R.C., Edwards, J.B. (1973) Gamma-glutamyl transpeptidase in diseases of the liver and bone. *Am J Clin Pathol* 60, 672-678.

Bouras, N. and Strelkov, S.E. (2010) Influence of carbon source on growth and mycotoxin production by isolates of *Pyrenophora tritici-repentis* from wheat. *Can J Microbiol* 56, 874-884.

Boylan, M.T., Mirabito, P.M., Willett, C.E., Zimmerman, C.R., Timberlake, W.E. (1987) Isolation and physical characterization of three essential conidiation genes from *Aspergillus nidulans*. *Mol Cell Biol* 7, 3113-3118.

Boylan, J.A., Hummel, C.S., Benoit, S., Garcia-Lara, J., Treglown-Downey, J., Crane, E.J. 3rd, Gherardini, F.C. (2006) *Borrelia burgdorferi* bb0728 encodes a coenzyme A disulphide reductase whose function suggests a role in intracellular redox and the oxidative stress response. *Mol Microbiol* 59, 475-486.

Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.

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

- Bruno, J.F., Ellner, S.P., Vu, I., Kim, K. and Harvell, C.D. (2011) Impacts of aspergillosis on sea fan coral demography: modeling a moving target. *Ecological Monographs* 81, 123-139.
- Cai, S., Zhu, T., Du, L., Zhao, B., Li, D., Gu, Q. (2011) Sterigmatocystins from the deep-sea-derived fungus *Aspergillus versicolor*. *J Antibiot* 64, 193-196.
- Candela, T. and Fouet, A. (2005) *Bacillus anthracis* CapD, belonging to the gamma-glutamyltranspeptidase family, is required for the covalent anchoring of capsule to peptidoglycan. *Mol Microbiol* 57, 717-726.
- Candela, T. and Fouet, A. (2006) Poly-gamma-glutamate in bacteria. *Mol Microbiol* 60, 1091-8.
- Celik, O., Cakmak, H.A., Satilmis, S., Gungor, B., Akin, F., Ozturk, D., Yalcin, A.A., Ayca, B., Erturk, M., Atasoy, M.M., Uslu, N. (2014) The relationship between gamma-glutamyl transferase levels and coronary plaque burdens and plaque structures in young adults with coronary atherosclerosis. *Clin Cardiol* 37, 552-7.
- Chasseaud, L.F. (1979) The role of glutathione and glutathione S-transferases in the metabolism of chemical carcinogens and other electrophilic agents. *Adv Cancer Res* 29, 175-274.
- Chen, K.C., Yin, W.S., Tiu, C., Houn, J.Y. (1994) 11 alpha-hydroxylation of progesterone using modified alginate-immobilized cells. *Enzyme Microb Technol* 16, 551-555.
- Chomczynski, P. (1993) A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques* 15, 532-537.

- Christensen, C.M. and Kaufmann, H.H. (1969) Granin Storage: The role of fungi in quality loss. *University of Minnesota Press*, Minneapolis. pp. 153.
- Cole, R.J. and Cox, R.H. (1981) Handbook of Toxic Fungal Metabolites. *Academic Press*, New York.
- Cotty, P.J., Bayman, P., Egel, D.S., Elias, K.E. (1994) Agriculture, aflatoxins and *Aspergillus*, in The Genus *Aspergillus*, from Taxonomy and Genetics to Industrial Application, *FEMS Symposium* 69. eds. Powell K.A., Renwick A. and Peberdy J.F., *Plenum Press*, New York, pp. 1-27.
- Dagenais, T.R. and Keller, N.P. (2009) Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in Invasive Aspergillosis. *Clin Microbiol Rev* 22, 447-465.
- Dalle-Donne, I., Rossi, R., Colombo, G., Giustarini, D., Milzani, A. (2009) Protein S-glutathionylation: a regulatory device from bacteria to humans. *Trends Biochem Sci* 34, 85-96.
- Dame, Z.T., Suwannarach, N., Lumyong, S., Laatsch, H. (2015) A new citrinin dimer isolated from *Aspergillus terreus* strain ZDF21. *Nat Prod Commun* 10, 623-624.
- David, H., Özçelik, I.S., Hofmann, G., Nielsen, J. (2008) Analysis of *Aspergillus nidulans* metabolism at the genome-scale. *BMC Genomics* 9, 163.
- Dayer, R., Fischer, B.B., Eggen, R.I., Lemaire, S.D. (2008) The peroxiredoxin and glutathione peroxidase families in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Genetics* 179, 41-57.
- Desai, P.R., Thakur, A., Ganguli, D., Paul, S., Morschhäuser, J., Bachhawat, A.K. (2011) Glutathione utilization by *Candida albicans* requires a functional glutathione degradation (DUG) pathway and OPT7, an unusual

member of the oligopeptide transporter family. *J Biol Chem* 286, 41183-41194.

Dyer, P.S. and O'Gorman, C.M. (2011) Sexual development and cryptic sexuality in fungi: insights from *Aspergillus* species. *FEMS Microbiol Rev* 36, 165-192.

Eaton, D.L. and Groopman J.D., eds. (1993) The Toxicology of Aflatoxins. *Academic Press*, New York and London.

Eaton, D.L. and Bammler, T.K. (1999) Concise review of the glutathione S-transferases and their significance to toxicology. *Toxicol Sci* 49, 156-164.

Eble, T.E. and Hanson, F.R. (1951) Fumagillin, an antibiotic from *Aspergillus fumigatus* H-3. *Antibiot Chemother* 1, 54-58.

El Sayed, A.S., Fujimoto, S., Yamada, C., Suzuki, H. (2010) Enzymatic synthesis of γ -glutamylglutamine, a stable glutamine analogue, by γ -glutamyltranspeptidase from *Escherichia coli* K-12. *Biotechnol Lett* 32, 1877-1881.

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

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

Emri, T., Molnár, Zs., Pusztahelyi, T. and Pócsi, I. (2004) Physiological and morphological changes in autolysing *Aspergillus nidulans* cultures. *Folia Microbiologica* 49, 277-284.

- Emri, T., Molnár, Zs., Pusztahelyi, T., Rosén, S. and Pócsi, I. (2004) Effect of vitamin E on the autolysis and sporulation of *Aspergillus nidulans*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 118, 337-348.
- Emri, T., Molnár, Z., Veres, T., Pusztahelyi, T., Dudás, G., Pócsi, I. (2006) Glucose-mediated repression of autolysis and conidiogenesis in *Emericella nidulans*. *Mycol Res* 110, 1172-1178.
- Emri, T., Molnár, Zs., Szilágyi, M., Pócsi, I. (2008) Regulation of autolysis in *Aspergillus nidulans*. *Appl Biochem Biotechnol* 151, 211-220.
- Emri, T., Szilágyi, M., László, K., M-Hamvas, M., Pócsi, I. (2009) PepJ is a new extracellular proteinase of *Aspergillus nidulans*. *Folia Microbiol* 54, 105-109.
- Emri, T., Majoros, L., Tóth, V., Pócsi, I. (2013) Echinocandins: production and applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 97, 3267-3284.
- Erdei, E., Pusztahelyi, T., Miskei, M., Barna, T., Pócsi, I. (2008) Characterization and heterologous expression of an age-dependent fungal/bacterial type chitinase of *Aspergillus nidulans*. *Acta Microbiol Immunol Hung* 55, 351-361.
- Ettxebeste, O., Ni, M., Garzia, A., Kwon, N.J., Fischer, R., Yu, J.H., Espeso, E.A., Ugalde, U. (2008) Basic-zipper-type transcription factor FlbB controls asexual development in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot Cell* 7, 38-48.
- Fahey, R.C., Newton, G.L., Arrick, B., Overdank-Bogart, T., Aley, S.B. (1984) *Entamoeba histolytica*: a eukaryote without glutathione metabolism. *Science* 224, 70-72.

Fahey, J. W., Zalcman, A. T., Talalay, P. (2001) The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry* 56, 5-51.

Fairlamb, A.H., Blackburn, P., Ulrich, P., Chait, B.T., Cerami, A. (1985) Trypanothione: a novel bis(glutathionyl)spermidine cofactor for glutathione reductase in trypanosomatids. *Science* 227, 1485-1487.

Fassatiová, O. (1984) Penészek és fonalaszombák az alkalmazott mikrobiológiában. *Mezőgazdasági Kiadó*, Budapest.

Fernandez-Canon, J.M. and Penalva, M.A. (1995). Fungal metabolic model for human type I hereditary tyrosinaemia. *PNAS* 92, 9132-9136.

Fleissner, A. and Dersch, P. (2010) Expression and export: recombinant protein production systems for *Aspergillus*. *Appl Microbiol Biotechnol* 87, 1255-1270.

Fraser, J.A., Davis, M.A., Hynes, M.J. (2002) A gene from *Aspergillus nidulans* with similarity to URE2 of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a glutathione S-transferase which contributes to heavy metal and xenobiotic resistance. *Appl Environ Microbiol* 68, 2802-2808.

Fuchs, J.A., Haller, B. and Tuggle, C.K. (1983) Mutants of *Escherichia coli* altered in glutathione metabolism. In: *Functions of Glutathione: Biochemical, Physiological, Toxicological and Clinical Aspects* (Larson, A., Orrenius, S., Holmgren, A. and Mannervik, B. eds.), pp. 385-393. *Raven Press*, New York.

Ganguli, D., Kumar, C., Bachhawat, A.K. (2007) The alternative pathway of glutathione degradation is mediated by a novel protein complex involving three new genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 175, 1137-1151.

- García-Santamarina, S., Boronat, S., Ayté, J., Hidalgo, E. (2013) Methionine sulphoxide reductases revisited: free methionine as a primary target of H₂O₂ stress in auxotrophic fission yeast. *Mol Microbiol* 90, 1113-1124.
- Ghatge, M., Sharma, A., Vangala, R.K. (2016) Association of γ -glutamyl transferase with premature coronary artery disease. *Biomed Rep* 4, 307-312.
- Gille, G. and Sigler, K. (1995) Oxidative stress and living cells. *Folia Microbiol* 40, 131-152.
- Glazer A. N. and Nikaido H. (2007) Microbial Biotechnology. *Fundamentals of Applied Microbiology*, Second Edition.
- Godfrey, T. and West, S. (1996) Industrial enzymology. *Stockton Press*.
- Godwin, A.K., Meister, A., O'Dwyer, P.J., Huang, C.S., Hamilton, T.C., Anderson, M.E. (1992) High resistance to cisplatin in human ovarian cancer cell lines is associated with marked increase of glutathione synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 3070-3074.
- Gomes, D.S., Fragoso, L.C., Riger, C.J., Panek, A.D., Eleutherio, E.C. (2002) Regulation of cadmium uptake by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* 1573, 21-25.
- 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.
- Grant, C.M., MacIver, F.H., Dawes, I.W. (1997) Glutathione synthetase is dispensable for growth under both normal and oxidative stress conditions in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* due to an accumulation of the dipeptide gamma-glutamylcysteine. *Mol Biol Cell* 8, 1699-1707.

- Grant, C.M. (2001) Role of the glutathione/glutaredoxin and thioredoxin systems in yeast growth and response to stress conditions. *Mol Microbiol* 39, 533-541.
- Gugnani, H.C. (2003) Ecology and taxonomy of pathogenic *Aspergilli*. *Front Biosci* 8, 346-357.
- Hagiwara, D., Asano, Y., Marui, J., Furukawa, K., Kanamaru, K., Kato, M., Abe, K., Kobayashi, T., Yamashino, T., Mizuno, T. (2007) The SskA and SrrA response regulators are implicated in oxidative stress responses of hyphae and asexual spores in the phosphorelay signaling network of *Aspergillus nidulans*. *Biosci Biotechnol Biochem* 71, 1003-1014.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. (1999) Free Radicals in Biology and Medicine, 3rd edn. *Clarendon Press*, Oxford.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. (2007) Free Radicals in Biology and Medicine, 4th edn. *Oxford University Press*, Oxford.
- Han, K.H., Han, K.Y., Yu, J.H., Jahng, K.Y. and Chae, K.S. (2001) The *nsdD* gene encodes a putative GATA-type transcription factor necessary for sexual development of *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* 41, 299-309.
- Han, K.H., Kim, J.H., Moon, H., Kim, S., Lee, S.S., Han, D.M., Jahng, K.Y. and Chae, K.S. (2008a) The *Aspergillus nidulans* *esdC* (early sexual development) gene is necessary for sexual development and is controlled by veA and a heterotrimeric G protein. *Fungal Genet Biol* 45, 310-318.
- Han, K.H. (2009) Molecular Genetics of *Emmericella nidulans* Sexual Development. *Mycobiology* 37, 171-182.

- Hanigan, M.H. and Ricketts, W.A. (1993) Extracellular glutathione is a source of cysteine for cells that express gamma-glutamyl transpeptidase. *Biochemistry* 32, 6302-6306.
- Hanigan, M.H. (2014) Gamma-glutamyl transpeptidase: redox regulation and drug resistance. *Adv Cancer Res* 122, 103-41.
- Hara, T., Yokoo, Y., Furukawa, T. (1992) Potential of γ -L-glutamyl-L-cystine and bis- γ -L-glutamyl-L-cystine as a cystine-containing peptide for parental nutrition. In: *Frontiers and New Horizons in Amino Acid Research*, Takai, K. (ed.), Elsevier, Amsterdam, pp. 607-611.
- Harding, C.O., Williams, P., Wagner, E., Chang, D.S., Wild, K., Colwell, R.E., Wolff, J.A. (1997) Mice with genetic gamma-glutamyl transpeptidase deficiency exhibit glutathionuria, severe growth failure, reduced life spans, and infertility. *J Biol Chem* 272, 12560-12567.
- Hayes, J.D., Flanagan, J.U., Jowsey, I.R. (2005) Glutathione transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 45, 51-88.
- Hedayati, M.T., Pasqualotto, A.C., Warn, P.A., Bowyer, P., Denning, D.W. (2007) *Aspergillus flavus*: human pathogen, allergen and mycotoxin producer. *Microbiology* 153, 1677-1692.
- Heisterkamp, N., Groffen, J., Warburton, D., Sneddon, T.P. (2008) The human gamma-glutamyltransferase gene family. *Hum Genet* 123, 321-332.
- Hell, R. (1997) Molecular physiology of plant sulfur metabolism. *Planta* 202, 138-48.
- Hill, J.C. and Johnson, G.T. (1969) Microbial transformation of phenazines by *Aspergillus sclerotiorum*. *Mycologia* 61, 452-467.

Hoffmann, B., Wanke, C., Lapaglia, S.K. and Braus, G.H. (2000) *c-Jun* *RACK1* homologues regulate a control point for sexual development in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* 37, 28-41.

Holdom, M.D., Hay, R.J., Hamilton, A.J. (1996) The Cu,Zn superoxide dismutases of *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus terreus*: purification and biochemical comparison with the *Aspergillus fumigatus* Cu,Zn superoxide dismutase. *Infect Immun* 64, 3326-3332.

Houbraken, J., Visagie, C.M., Meijer, M., Frisvad, J.C., Busby, P.E., Pitt, J.I., Seifert, K.A., Louis-Seize, G., Demirel, R., Yilmaz, N., Jacobs, K., Christensen, M., Samson, R.A. (2014) A taxonomic and phylogenetic revision of *Penicillium* section *Aspergilloides*. *Stud Mycol* 78, 373-451.

Hwang, C., Sinskey, A.J., Lodish, H.F. (1992) Oxidized redox state of glutathione in the endoplasmic reticulum. *Science* 257, 1496-1502.

Imaoka, M., Yano, S., Okumura, M., Hibi, T., Wakayama, M. (2010) Molecular cloning and characterization of γ -glutamyl transpeptidase from *Pseudomonas nitroreducens* IFO12694. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 74, 1936-1939.

Inglis, D.O., Binkley, J., Skrzypek, M.S., Arnaud, M.B., Cerqueira, G.C., Shah, P., Wymore, F., Wortman, J.R., Sherlock, G. (2013) Comprehensive annotation of secondary metabolite biosynthetic genes and gene clusters of *Aspergillus nidulans*, *A. fumigatus*, *A. niger* and *A. oryzae*. *BMC Microbiol* 13, 91.

Inoue, Y. and Kimura, A. (1995) Methylglyoxal and regulation of its metabolism in microorganisms. *Adv Microb Physiol* 37, 177-227.

- Inoue, M., Hiratake, J., Suzuki, H., Kumagai, H., Sakata, K. (2000) Identification of catalytic nucleophile of *Escherichia coli* gamma-glutamyltranspeptidase by gamma-monofluorophosphono derivative of glutamic acid: N-terminal thr-391 in small subunit is the nucleophile. *Biochemistry* 39, 7764-7771.
- Ito, K., Koyama, Y., Hanya, Y. (2013) Identification of the glutaminase genes of *Aspergillus sojae* involved in glutamate production during soy sauce fermentation. *Biosci Biotechnol Biochem* 77, 1832-40.
- Izawa, S., Inoue, Y., Kimura, A. (1995) Oxidative stress response in yeast: effect of glutathione on adaptation to hydrogen peroxide stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 368, 73-76.
- Jakucs és Vajna (2003) Mikológia. *Agroinform Kiadó*.
- Janowiak, B.E. and Griffith, O.W. (2005) Glutathione synthesis in *Streptococcus agalactiae*. One protein accounts for gamma-glutamylcysteine synthetase and glutathione synthetase activities. *J Biol Chem* 280, 11829-11839.
- Jaspers, J. and Penninckx, M.J. (1984) Glutathione metabolism in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Evidence that γ -glutamyltranspeptidase is a vacuolar enzyme. *Biochimie* 66, 71-74.
- Jaspers, J., Gigot, D., Penninckx, M.J. (1985) Pathways of glutathione degradation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Phytochemistry* 24, 703-707.
- Jeong, J.H., Kim, J.N., Wee, Y.J., Ryu, H.W. (2010) The statistically optimized production of poly(gamma-glutamic acid) by batch fermentation of a newly isolated *Bacillus subtilis* RKY3. *Bioresour Technol* 101, 4533-9.

- Jiao, F., Kawakami, A., Nakajima, T. (2008) Effects of different carbon sources on trichothecene production and Tri gene expression by *Fusarium graminearum* in liquid culture. *FEMS Microbiol Lett* 285, 212-219.
- Jones, C.M., Lawrence, A., Wardman, P., Burkitt, M.J. (2003) Kinetics of superoxide scavenging by glutathione: an evaluation of its role in the removal of mitochondrial superoxide. *Biochem Soc Trans* 31, 1337-1339.
- Josephy, P.D. (2010) Genetic variations in human glutathione transferase enzymes: significance for pharmacology and toxicology. *Hum Genomics Proteomics* 2010, 876940.
- Kafer, E. and Chae, S.K. (2008) uvsFRFC1, the large subunit of replication factor C in *Aspergillus nidulans*, is essential for DNA replication, functions in UV repair and is upregulated in response to MMS-induced DNA damage. *Fungal Genet Biol* 45, 1227-1234.
- Kang, H.J., Kim, B.C., Park, E.H., Ahn, K., Lim, C.J. (2005) The gene encoding gamma-glutamyl transpeptidase II in the fission yeast is regulated by oxidative and metabolic stress. *J Biochem Mol Biol* 38, 609-618.
- Kaur, H., Ganguli, D., Bachhawat, A.K. (2012) Glutathione degradation by the alternative pathway (DUG pathway) in *Saccharomyces cerevisiae* is initiated by (Dug2p-Dug3p)₂ complex, a novel glutamine amidotransferase (GATase) enzyme acting on glutathione. *J Biol Chem* 287, 8920-8931.
- Kawasaki, L., Sánchez, O., Shiozaki, K., Aguirre, J. (2002) SakA MAP kinase is involved in stress signal transduction, sexual development and spore viability in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* 45, 1153-1163.
- Kevei Ferenc és Kucsera Judit (2010) Mikrobiológia I. *JATEPress Kiadó*.

Kim, D.U., Hayles, J., Kim, D., Wood, V., Park, H.O., Won, M., Yoo, H.S., Duhig, T., Nam, M., Palmer, G., Han, S., Jeffery, L., Baek, S.T., Lee, H., Shim, Y.S., Lee, M., Kim, L., Heo, K.S., Noh, E.J., Lee, A.R., Jang, Y.J., Chung, K.S., Choi, S.J., Park, J.Y., Park, Y., Kim, H.M., Park, S.K., Park, H.J., Kang, E.J., Kim, H.B., Kang, H.S., Park, H.M., Kim, K., Song, K., Song, K.B., Nurse, P., Hoe, K.L. (2010) Analysis of a genome-wide set of gene deletions in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Nat Biotechnol* 28, 617-623.

Kim, H.S., Han, K.Y., Kim, K.J., Han, D.M., Jahng, K.Y. and Chae, K.S. (2002) The veA gene activates sexual development in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Biol* 37, 72-80.

Kim, J.S., Bang, M.A., Lee, S., Chae, H.Z., Kim, K. (2010) Distinct functional roles of peroxiredoxin isozymes and glutathione peroxidase from fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. *BMB Rep* 43, 170-175.

Kimura, K., Tran, L.S., Uchida, I., Itoh, Y. (2004) Characterization of *Bacillus subtilis* γ -glutamyltranspeptidase and its involvement in the degradation of capsule poly-gammaglutamate. *Microbiol* 150, 4115-4123.

Kovács, Z., Szarka, M., Kovács, Sz., Boczonádi, I., Emri, T., Abe, K., Pócsi, I., Pusztahelyi, T. (2013) Effect of cell wall integrity stress and RlmA transcription factor on asexual development and autolysis in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Biol* 54, 1-14.

Krauth-Siegel, R.L., Bauer, H., Schirmer, R.H. (2005) Dithiol proteins as guardians of the intracellular redox milieu in parasites: old and new drug targets in trypanosomes and malaria-causing plasmodia. *Angew Chem Int Ed Engl* 44, 690-715.

- Kredics, L., Varga, J., Kocsubé, S., Dóczy, I., Samson, R.A., Rajaraman, R., Narendran, V., Bhaskar, M., Vágvölgyi, C., Manikandan, P. (2007) Case of keratitis caused by *Aspergillus tamarii*. *J Clin Microbiol* 45, 3464-3467.
- Kullisaar, T., Songisepp, E., Aunapuu, M., Kilk, K., Arend, A., Mikelsaar, M., Rehema, A., Zilmer, M. (2010) Complete glutathione system in probiotic *Lactobacillus fermentum* ME-3. *Prikl Biokhim Mikrobiol* 46, 527-531.
- Kumar, A., Tikoo, S., Maity, S., Sengupta, S., Sengupta, S., Kaur, A., Bachhawat, A.K. (2012) Mammalian proapoptotic factor ChaC1 and its homologues function as γ -glutamyl cyclotransferases acting specifically on glutathione. *EMBO Rep* 13, 1095-1101.
- Kumar, C., Sharma, R., Bachhawat, A.K. (2003) Utilization of glutathione as an exogenous sulfur source is independent of gamma-glutamyl transpeptidase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for an alternative glutathione degradation pathway. *FEMS Microbiol Lett* 219, 187-194.
- Kurose, E., Oyama, Y., Matuo, T., Sugimori, T. (1969) Biosynthesis and degradation of glutamic acid in microorganisms relating to the soy sauce brewing. *J Ferment Technol* 47, 693-700.
- Kuzniak, E. and Sklodowska, M. (2001) Ascorbate, glutathione and related enzymes in chloroplasts of tomato leaves infected by *Botrytis cinerea*. *Plant Sci* 160, 723-731.
- Kwon, N.J., Garzia, A., Espeso, E.A., Ugalde, U., Yu, J.H. (2010) FlbC is a putative nuclear C2H2 transcription factor regulating development in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* 77, 1203-1219.
- Laborde, E. (2010) Glutathione transferases as mediators of signaling pathways involved in cell proliferation and cell death. *Cell Death Differ* 17, 1373-1380.

- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Latgé, J.P. (1999) *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clin Microbiol Rev* 12, 310-350.
- LeBlanc, G.A. and Cochrane, B.J. (1987) A rapid method for staining proteins in acrylamide gels. *Anal Biochem* 161, 172-175.
- Lee, J.C., Straffon, M.J., Jang, T.Y., Higgins, V.J., Grant, C.M., Dawes, I.W. (2001) The essential and ancillary role of glutathione in *Saccharomyces cerevisiae* analysed using a grande gsh1 disruptant strain. *FEMS Yeast Res* 1, 57-65.
- Li, T.J., Hirayama, Y., Kitano, M. (1997) Glutathione S-transferase pi-class as a tumour marker in lingual preneoplastic and neoplastic lesions of rats and humans. *Virchows Arch* 431, 37-43.
- Li, Y., Wei, G., Chen, J. (2004) Glutathione: a review on biotechnological production. *Appl Microbiol Biotechnol* 66, 233-242.
- Li, M., Liang, X., Rollins, J.A. (2012) *Sclerotinia sclerotiorum* γ -glutamyl transpeptidase (Ss-Ggt1) is required for regulating glutathione accumulation and development of sclerotia and compound appressoria. *Mol Plant Microbe Interact* 25, 412-420.
- Lin, L.L., Chou, P.R., Hua, Y.W., Hsu, W.H. (2006) Overexpression, one-step purification and biochemical characterization of a recombinant gamma-glutamyltranspeptidase from *Bacillus licheniformis*. *Appl Microbiol Biotechnol* 73, 103-112.

Machida, M. (2008) in *The Aspergilli: Genomics, Medical Aspects, Biotechnology, and Research Methods*, eds. Osmani, S.A. and Goldman, G.H. (CRC Press, Boca Raton, FL), pp. 75-84.

Manikandan, P., Varga, J., Kocsubé, S., Anita, R., Revathi, R., Németh, T.M., Narendran, V., Vágvölgyi, C., PanneerSelvam, K., Shobana, C.S., Babu Singh, Y.R., Kredics, L. (2013) Epidemiology of *Aspergillus* keratitis at a tertiary care eye hospital in South India and antifungal susceptibilities of the causative agents. *Mycoses* 56, 26-33.

Manzoni, M. and Rollini, M. (2002) Biosynthesis and biotechnological production of statins by filamentous fungi and application of these cholesterol-lowering drugs. *Appl Microbiol Biotechnol* 58, 555-564.

Mao, Y., Qi, X., Xu, W., Song, H., Xu, M., Ma, W., Zhou, L. (2014) Serum gamma-glutamyl transferase: a novel biomarker for coronary artery disease. *Med Sci Monit* 20, 706-10.

Martin, M.N. and Slovin, J.P. (2000) Purified gamma-glutamyl transpeptidases from tomato exhibit high affinity for glutathione and glutathione S-conjugates. *Plant Physiol* 122, 1417-1426.

Martinelli, S.D. (1994) *Aspergillus nidulans* as an experimental organism. *Prog Ind Microbiol* 29, 33-58.

Masayuki, M. and Katsuya, G. (2010) *Aspergillus*: Molecular Biology and Genomics.

Matsuyama, A., Arai, R., Yashiroda, Y., Shirai, A., Kamata, A., Sekido, S., Kobayashi, Y., Hashimoto, A., Hamamoto, M., Hiraoka, Y., Horinouchi, S., Yoshida, M. (2006) ORFeome cloning and global analysis of protein localization in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Nat Biotechnol* 24, 841-847.

McArthur J. V. (2006) *Microbial Ecology: An Evolutionary Approach*. Academic Press, 1st Edition.

McCluskey, K. (2003) The Fungal Genetics Stock Center: from molds to molecules. *Adv Appl Microbiol* 52, 245-262.

Mehdi, K. and Penninckx, M.J. (1997) An important role for glutathione and γ -glutamyltranspeptidase in the supply of growth requirements during nitrogen starvation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* 143, 1885-1889.

Mehdi, K., Thierie, J., Penninckx, M.J. (2001) Gamma-glutamyl transpeptidase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and its role in the vacuolar transport and metabolism of glutathione *Biochem J* 359, 631-637.

Meister, A. and Anderson, M.E. (1983) Glutathione. *Annu Rev Biochem* 52, 711-760.

Mena, S., Benlloch, M., Ortega, A., Carretero, J., Obrador, E., Asensi, M., Petschen, I., Brown, B.D., Estrela, J.M. (2007) Bcl-2 and glutathione depletion sensitizes B16 melanoma to combination therapy and eliminates metastatic disease. *Clin Cancer Res* 13, 2658-2666.

Mendoza-Cózatl, D., Loza-Tavera, H., Hernández-Navarro, A., Moreno-Sánchez, R. (2005) Sulfur assimilation and glutathione metabolism under cadmium stress in yeast, protists and plants. *FEMS Microbiol Rev* 29, 653-671.

Mihinova, D. and Pieckova, E. (2012) Moldy buildings, health of their occupants and fungal prevention. *Bratisl Lek Listy* 113, 314-318.

Minami, H., Suzuki, H., Kumagai, H. (2004) Gamma glutamyltranspeptidase, but not YwrD, is important in utilization of extracellular glutathione as a sulfur source in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 186, 1213-1214.

Mirabito, P.M., Adams, T.H., Timberlake, W.E. (1989) Interactions of three sequentially expressed genes control temporal and spatial specificity in *Aspergillus* development. *Cell* 57, 859-868.

Molnár, Zs., Mészáros, E., Szilágyi, Zs., Rosén, S., Emri, T. and Pócsi, I. (2004) Influence of *fadA*^{G203R} and *ΔflbA* mutations on the morphology and physiology of submerged *Aspergillus nidulans* cultures. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 118, 349-360.

Molnár, Zs., Emri, T., Zavaczki, E., Pusztahelyi, T. and Pócsi, I. (2006) Effects of mutations in the GanB/RgsA G protein mediated signaling on the autolysis of *Aspergillus nidulans*. *Journal of Basic Microbiology* 46, 495-603.

Moreno, G. and Arenas, R. (2010) Other fungi causing onychomycosis. *Clin Dermatol* 28, 160-163.

Muller, E.G. (1996) A glutathione reductase mutant of yeast accumulates high levels of oxidized glutathione and requires thioredoxin for growth. *Mol Biol Cell* 7, 1805-1813.

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

Nakano, Y., Okawa, S., Yamauchi, T., Koizumi, Y., Sekiya, J. (2006) Purification and properties of soluble and bound gamma-glutamyltransferases from radish cotyledon. *Biosci Biotechnol Biochem* 70, 369-376.

- Ndrepepa, G., Braun, S., Schunkert, H., Laugwitz, K.L., Kastrati, A. (2016) Gamma-glutamyl transferase and prognosis in patients with coronary artery disease. *Clin Chim Acta* 452, 155-60.
- Newton, G.L., Ta, P., Fahey, R.C. (2005) A mycothiol synthase mutant of *Mycobacterium smegmatis* produces novel thiols and has an altered thiol redox status. *J Bacteriol* 187, 7309-7316.
- Oakley, B.R. and Morris, N.R. (1981) A beta-tubulin mutation in *Aspergillus nidulans* that blocks microtubule function without blocking assembly. *Cell* 24, 837-845.
- Ohkama-Ohtsu, N., Oikawa, A., Zhao, P., Xiang, C., Saito, K., Oliver, D.J. (2008) A gamma-glutamyl transpeptidase-independent pathway of glutathione catabolism to glutamate via 5-oxoproline in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 148, 1603-1613.
- Okabe, M., Lies, D., Kanamasa, S., Park, E.Y. (2009) Biotechnological production of itaconic acid and its biosynthesis in *Aspergillus terreus*. *Appl Microbiol Biotechnol* 84, 597-606.
- Okada, T., Suzuki, H., Wada, K., Kumagai, H., Fukuyama, K. (2007) Crystal structure of the gamma-glutamyltranspeptidase precursor protein from *Escherichia coli*. Structural changes upon autocatalytic processing and implications for the maturation mechanism. *J Biol Chem* 282, 2433-2439.
- Owen, A.D., Schapira, A.H., Jenner, P., Marsden, C.D. (1996) Oxidative stress and Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 786, 217-223.
- Papouli, M., Roilides, E., Bibashi, E., Andreou, A. (1996) Primary cutaneous aspergillosis in neonates: case report and review. *Clin Infect Dis* 22, 1102-1104.

- Park, H.J., Lim, H.W., Kim, K., Kim, I.H., Park, E.H., Lim, C.J. (2004) Characterization and regulation of the gamma-glutamyl transpeptidase gene from the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Can J Microbiol* 50, 61-66.
- Patil, R.H., Krishnan, P., Maheshwari, V.L. (2011) Production of lovastatin by wild strains of *Aspergillus terreus*. *Natural Product Communications* 6, 183-186.
- Pedersen, H., Beyer, M., Nielsen, J. (2000) Glucoamylase production in batch, chemostat and fed-batch cultivations by an industrial strain of *Aspergillus niger*. *Appl Microbiol Biotechnol* 53, 272-277.
- Penninckx, M.J. and Elskens, M.T. (1993) Metabolism and functions of glutathione in micro-organisms. *Adv Microb Physiol* 34, 239-301.
- Petersen, T.N., Brunak, S., von Heijne, G., Nielsen, H. (2011) SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat Methods* 8, 785-786.
- Peterson, S.W. (2008) Phylogenetic analysis of *Aspergillus* species using DNA sequences from four loci. *Mycologia* 100, 205-226.
- Petroski, R.J., Bates, R.B., Linz, G.S., Rosazza, J.P. (1983) Microbial transformation of natural antitumor agents. XII. Conversion of bouvardin to o-desmethyl-bouvardin and bouvardin catechol. *J Pharm Sci* 72, 1291-1293.
- 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.
- Pócsi, I., Prade, R.A. and Penninckx, M.J. (2004) Glutathione, altruistic metabolite in fungi. *Adv Microb Physiol* 49, 1-76.

Pontecorvo, G., Roper, J.A., Hemmons, L.M., Macdonald, K.D., Bufton, A.W. (1953) The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Adv Genet* 5, 141-238.

Prévéral, S., Gayet, L., Moldes, C., Hoffmann, J., Mounicou, S., Gruet, A., Reynaud, F., Lobinski, R., Verbavatz, J.M., Vavasseur, A., Forestier, C. (2009) A common highly conserved cadmium detoxification mechanism from bacteria to humans: heavy metal tolerance conferred by the ATP-binding cassette (ABC) transporter SpHMT1 requires glutathione but not metal-chelating phytochelatin peptides. *J Biol Chem* 284, 4936-4943.

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

Pusztahelyi, T., Klement, E., Szajli, E., Klem, J., Miskei, M., Karányi, Z., Emri, T., Kovács, S., Orosz, G., Kovács, K.L., Medzihradsky, K.F., Prade, R.A., Pócsi, I. (2011) Comparison of transcriptional and translational changes caused by long-term menadione exposure in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Biol* 48, 92-103.

Rabie, C.J., Steyn, M., van Schalkwyk, G.C. (1977) New species of *Aspergillus* producing sterigmatocystin. *Appl Environ Microbiol* 33, 1023-1025.

Rahman, K. (2007) Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clin Inertv Aging* 2, 219-236.

Ramos, F.R., López-Nieto, M.J., Martín, J.F. (1985) Isopenicillin N synthetase of *Penicillium chrysogenum*, an enzyme that converts delta-(L-alpha-aminoadipyl)-L-cysteinyl-D-valine to isopenicillin N. *Antimicrob Agents Chemother* 27, 380-387.

- Razzaghi-Abyaneh, M., Chang, P.K., Shams-Ghahfarokhi, M. and Rai, M. (2014) Global health issues of aflatoxins in food and agriculture: challenges and opportunities. *Front Microbiol.*
- Richard, J.L., Bhatnagar, D., Peterson, S., and Sandor, G. (1992) Assessment of aflatoxin and cyclopiazonic acid production by *Aspergillus flavus* isolates from Hungary. *Mycopathologia* 120, 183-188.
- Rodricks, J.V., Lustig, E., Campbell, A.D., Stoloff, L. (1968) Aspertoxin, a hydroxy derivative of O-methylsterigmatocystin from aflatoxin-producing cultures of *Aspergillus flavus*. *Tetrahedron Lett* 2975-2978.
- Roncal, T. and Ugalde, U. (2013) Conidiation induction in *Penicillium*. *Res Microbiol* 154, 539-546.
- Rouhier, N., and Jacquot, J.P. (2005) The plant multigenic family of thiol peroxidases. *Free Radic Biol Med* 38, 1413-1421.
- 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: chitinase production and antifungal effect of allosamidin. *J Gen Appl Microbiol* 47, 201-211.
- Samson, R.A., Visagie, C.M., Houbaken, J., Hong, S.B., Hubka, V., Klaassen, C.H., Perrone, G., Seifert, K.A., Susca, A., Tanney, J.B., Varga, J., Kocsubé, S., Szigeti, G., Yaguchi, T., Frisvad, J.C. (2014) Phylogeny identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Stud Mycol* 78, 141-173.
- Sasa, M. and Takagi, S. (2004) The application of *Aspergillus oryzae* in industry. Internal review, *Novozymes A/S*.

- Sato, I., Shimizu, M., Hoshino, T., Takaya, N. (2009) The glutathione system of *Aspergillus nidulans* involves a fungus-specific glutathione S-transferase. *J Biol Chem* 284, 8042-8053.
- Saykhedkar, S., Ray, A., Ayoubi-Canaan, P., Hartson, S.D., Prade, R., Mort, A.J. (2012) A time course analysis of the extracellular proteome of *Aspergillus nidulans* growing on sorghum stover. *Biotechnol Biofuels* 26, 5-52.
- Scazzocchio, C. (2006) *Aspergillus* genomes: secret sex and the secrets of sex. *Trends Genet* 22, 521-525.
- Schmees, C., Prinz, C., Treptau, T., Rad, R., Hengst, L., Voland, P., Bauer, S., Brenner, L., Schmid, R.M., Gerhard, M. (2007) Inhibition of T-cell proliferation by *Helicobacter pylori* gamma-glutamyl transpeptidase. *Gastroenterology* 132, 1820-1833.
- Schrammel, A., Gorren, A.C.F., Schmidt, K., Pfeiffer, S., Mayer, B. (2003) S-nitrosation of glutathione by nitric oxide, peroxynitrite, and $\bullet\text{NO}/\text{O}_2\bullet$. *Free Radic Bio Med* 34, 1078-1088.
- Schulman, J.D., Goodman, S.I., Mace, J.W., Patrick, A.D., Tietze, F., Butler, E.J. (1975) Glutathionuria: inborn error of metabolism due to tissue deficiency of gamma-glutamyl transpeptidase. *Biochem Biophys Res Commun* 65, 68-74.
- Segal, B.H., DeCarlo, E.S., Kwon-Chung, K.J., Malech, H.L., Gallin, J.I., Holland, S.M. (1998) *Aspergillus nidulans* infection in chronic granulomatous disease. *Medicine* 77, 345-354.
- Seo, J.A., Han, K.H. and Yu, J.H. (2004) The *gprA* and *gprB* genes encode putative G protein-coupled receptors required for self-fertilization in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* 53, 1611-1623.

Sharma, K.G., Sharma, V., Bourbouloux, A., Delrot, S., Bachhawat, A.K. (2000) Glutathione depletion leads to delayed growth stasis in *Saccharomyces cerevisiae*: evidence of a partially overlapping role for thioredoxin. *Curr Genet* 38, 71-77.

Shen, S., Sulter, G., Jeffries, T.W., Cregg, J.M. (1998) A strong nitrogen source-regulated promoter for controlled expression of foreign genes in the yeast *Pichia pastoris*. *Gene* 216, 93-102.

Shibayama, K., Wachino, J., Arakawa, Y., Saidijam, M., Rutherford, N.G., Henderson, P.J. (2007) Metabolism of glutamine and glutathione via gamma-glutamyltranspeptidase and glutamate transport in *Helicobacter pylori*: possible significance in the pathophysiology of the organism. *Mol Microbiol* 64, 396-406.

Shimizu, K. and Keller, N.P. (2001) Genetic involvement of a cAMP-dependent protein kinase in a G protein signaling pathway regulating morphological and chemical transitions in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* 157, 591-600.

Shroff, R.A., O'Connor, S.M., Hynes, M.J., Lockington, R.A., Kelly, J.M. (1997) Null alleles of *creA*, the regulator of carbon catabolite repression in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Biol* 22, 28-38.

Sideri, T., Rallis, C., Bitton, D.A., Lages, B.M., Suo, F., Rodríguez-López, M., Du, L.L., Bähler, J. (2014) Parallel profiling of fission yeast deletion mutants for proliferation and for lifespan during long-term quiescence. *G3 (Bethesda)*. 5, 145-155.

Singh, M., Shrivastava, D., Kale, R. (2012) Antioxidant Potential of *Asparagus adscendens*. *Biochemistry, Genetics and Molecular Biology*,

Antioxidant Enzyme, book edited by Mohammed Amr El-Missiry, ISBN 978-953-51-0789-7.

Smirnova, G.V. and Oktyabrsky, O.N. (2005) Glutathione in bacteria. *Biochemistry* 70, 1199-1211.

Song, J.Y., Cha, J., Lee, J., Roe, J.H. (2006) Glutathione reductase and a mitochondrial thioredoxin play overlapping roles in maintaining iron-sulfur enzymes in fission yeast. *Eukaryot Cell* 5, 1857-1865.

Spitzmüller, Z., Kwon, N.J., Szilágyi, M., Keserű, J., Tóth, V., Yu, J.H., Pócsi, I., Emri, T. (2015) γ -Glutamyl transpeptidase (GgtA) of *Aspergillus nidulans* is not necessary for bulk degradation of glutathione. *Arch Microbiol* 197, 285-297.

Spitzmüller, Z., Gonda, S., Kiss-Szikszai, A., Vasas, G., Pócsi, I., Emri, T. (2016) Characterization of extracellular γ -glutamyl transpeptidase from *Aspergillus nidulans*. *Mycoscience* Epub 4.

Springael, J.Y. and Penninckx, M.J. (2003) Nitrogen-source regulation of yeast gamma-glutamyl transpeptidase synthesis involves the regulatory network including the GATA zinc-finger factors Gln3, Nil1/Gat1 and Gzf3. *Biochem J* 371, 589-595.

Spröte, P., Brakhage, A.A., Hynes, M.J. (2009) Contribution of peroxisomes to penicillin biosynthesis in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot Cell* 8, 421-423.

Stephen, D.W. and Jamieson, D.J. (1996) Glutathione is an important antioxidant molecule in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Lett* 141, 207-212.

Storozhenko, S., Belles-Boix, E., Babychuk, E., Hérouart, D., Davey, M.W., Slooten, L., Van Montagu, M., Inzé, D., Kushnir, S. (2002) Gamma-glutamyl

transpeptidase in transgenic tobacco plants. Cellular localization, processing, and biochemical properties. *Plant Physiol* 128, 1109-1119.

Strange, R.C., Spiteri, M.A., Ramachandran, S., Fryer, A.A. (2001) Glutathione-S-transferase family of enzymes. *Mutat Res* 482, 21-26.

Sundquist, A.R. and Fahey, R.C. (1989) The function of gamma-glutamylcysteine and bis-gamma-glutamylcysteine reductase in *Halobacterium halobium*. *J Biol Chem* 264, 719-725.

Suzuki, H., Kumagai, H., Echigo, T., Tochikura, T. (1988) Molecular cloning of *Escherichia coli* K-12 ggt and rapid isolation of gamma-glutamyltranspeptidase. *Biochem Biophys Res Commun* 150, 33-38.

Suzuki, H., Izuka, S., Miyakawa, N., Kumagai, H. (2002a) Enzymatic production of theanine, an “umami” component of tea, from glutamine and ethylamine with bacterial γ -glutamyltranspeptidase. *Enzyme Microb Technol* 31, 884-889.

Suzuki, H., Kajimoto, Y., Kumagai, H. (2002b) Improvement of the bitter taste of amino acids through the transpeptidation reaction of bacterial γ -glutamyltranspeptidase. *J Agric Food Chem* 50, 313-318.

Suzuki, H., Izuka, S., Minami, H., Miyakawa, N., Ishihara, S., Kumagai, H. (2003) Use of bacterial γ -glutamyltranspeptidase for enzymatic synthesis of γ -D-glutamyl compounds. *Appl Environ Microbiol* 69, 6399-6404.

Suzuki, H., Yamada, C., Kato, K., (2007) Gamma-glutamyl compounds and their enzymatic production using bacterial gamma-glutamyltranspeptidase. *Amino Acids* 32, 333-340.

- Szilágyi, M., Pócsi, I., Forgács, K., Emri, T. (2010) MeaB dependent nutrition sensing regulates autolysis in carbon starving *Aspergillus nidulans* cultures. *Indian J Microbiol* 50, 104-108.
- Szilágyi, M., Anton, F., Forgács, K., Yu, J.H., Pócsi, I., Emri, T. (2012) Antifungal activity of extracellular hydrolases produced by autolysing *Aspergillus nidulans* cultures. *J Microbiol* 50, 849-854.
- Szilágyi, M., Miskei, M., Karányi, Z., Lenkey, B., Pócsi, I., Emri, T. (2013) Transcriptome changes initiated by carbon starvation in *Aspergillus nidulans*. *Microbiology* 159, 176-190.
- Tausz, M., Pilch, B., Rennenberg, H., Grill, D., Herschbach, C. (2004) Root uptake, transport, and metabolism of externally applied glutathione in *Phaseolus vulgaris* seedlings. *J Plant Physiol* 161, 347-349.
- 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.
- Timberlake, W.E. (1990) Molecular genetics of *Aspergillus* development. *Annu Rev Genet* 24, 5-36.
- Todd, R.B., Fraser, J.A., Wong, K.H., Davis, M.A. and Hynes, M.J. (2005) Nuclear accumulation of the GATA factor AreA in response to complete nitrogen starvation by regulation of nuclear export. *Eukaryot Cell* 4, 1646-1653.
- Tomarelli, R.M., Charney, J., Harding, M.L. (1949) The use of azoalbumin as a substrate in the colorimetric determination of peptic and tryptic activity. *J Lab Clin Med* 34, 428-433.

- Tomita, K., Ito, M., Yano, T., Kumagai, H., Tochikura, T. (1988) γ -Glutamyltranspeptidase activity and the properties of the extracellular glutaminase from *Aspergillus oryzae*. *Agric Bioi Chem* 52, 1159 -1163.
- Townsend, D.M. and Tew, K.D. (2003) The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance. *Oncogene* 22, 7369-7375.
- Turner, W.B. and Aldridge, D.C. (1983) Fungal metabolites II. *Academic Press*, New York.
- van de Kamp, M., Driessen, A.J., Konings, W.N. (1999) Compartmentalization and transport in beta-lactam antibiotic biosynthesis by filamentous fungi. *Antonie Van Leeuwenhoek* 75, 41-78.
- Vanacker, H., Harbinson, J., Ruisch, J., Carver, T. L. W., Foyer, C.H. (1998) Antioxidant defences of the apoplast. *Protoplasma* 205, 129-140.
- Varga, J. and Samson, R.A. (2008) Ribotoxin genes in isolates of *Aspergillus* section Clavati. *Antonie Van Leeuwenhoek* 94, 481-485.
- Veal, E.A., Toone, W.M., Jones, N., Morgan, B.A. (2002) Distinct roles for glutathione S-transferases in the oxidative stress response in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem* 277, 35523-35531.
- Verma, V.V., Gupta, R., Goel, M. (2015) Phylogenetic and evolutionary analysis of functional divergence among Gamma glutamyl transpeptidase (GGT) subfamilies. *Biol Direct* 10, 49.
- Vienken, K. and Fischer, R. (2006) The Zn(II)₂Cys₆ putative transcription factor NosA controls fruiting body formation in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* 61, 544-554.
- Viña, J.R., Puertes, I.R., Montoro, J.B., Saez, G.T., Viña, J., (1985) Gammaglutamyl-amino acids as signals for the hormonal regulation of amino

acid uptake by the mammary gland of the lactating rat. *Biology of the Neonate* 48, 250-256.

Vuilleumier, S., Sorribas, H., Leisinger, T. (1997) Identification of a novel determinant of glutathione affinity in dichloromethane dehalogenases/ glutathione S-transferases. *Biochem Biophys Res Commun* 238, 452-456.

Webster, J. (1986) Introduction to fungi. *Cambridge University Press*, Cambridge.

Wei, D., Chen, T., Gao, Y., Tian, H. (2015) Serum Gamma-Glutamyltransferase and Ferritin are Related to Insulin Resistance: A Population-Based Study. *Clin Lab* 61, 1157-61.

Wei, G., Li, Y., Du, G., Chen, J. (2003) Application of a two-stage temperature control strategy for enhanced glutathione production in the batch fermentation by *Candida utilis*. *Biotechnol Lett* 25, 887-890.

Weidenborner, M. (2001) Encyclopedia of Food Mycotoxins. *Springer Science & Business Media*.

Wheatley, R.W., Lo, S., Jancewicz, L.J., Dugdale, M.L., Huber, R.E. (2013) Structural explanation for allolactose (lac operon inducer) synthesis by lacZ β -galactosidase and the evolutionary relationship between allolactose synthesis and the lac repressor. *J Biol Chem* 288, 12993-13005.

Wilk, S., Mizoguchi, H., Orłowski, M. (1977) γ -Glutamyl dopa: kidney-specific dopamine precursor. *J Pharmacol Exp Ther* 206, 227-232.

Winderickx, J., Holsbeeks, I., Lagatie, O., Giots, F., Thevelein, J. & de Winde H. (2003) From feast to famine; adaptation to nutrient availability in yeast. In *Yeast stress responses*, pp. 305-387. Edited by S. Hohman and Mager, W.H. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

- Winterbourn, C.C. and Metodiewa, D. (1994) The reaction of superoxide with reduced glutathione. *Arch Biochem Biophys* 314, 284-290.
- Wong, K.H., Hynes, M.J., Todd, R.B., Davis, M.A. (2007) Transcriptional control of *nmrA* by the bZIP transcription factor MeaB reveals a new level of nitrogen regulation in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* 66, 534-551.
- Wright, E.C., Stern, J., Ersser, R., Patrick, A.D. (1979) Glutathionuria: gamma-glutamyl transpeptidase deficiency. *J Inherit Metab Dis* 2, 3-7.
- Wu, R., Richter, S., Zhang, R.G., Anderson, V.J., Missiakas, D., Joachimiak, A. (2009) Crystal structure of *Bacillus anthracis* transpeptidase enzyme CapD. *J Biol Chem* 284, 24406-24414.
- Wünschmann, J., Krajewski, M., Letzel, T., Huber, E.M., Ehrmann, A., Grill, E., Lendzian, K.J. (2010) Dissection of glutathione conjugate turnover in yeast. *Phytochemistry* 71, 54-61.
- Yano, T., Ito, M., Tomota, K., Kumagai, H., and Tochikura, T. (1988) Purification and properties of glutaminase from *Aspergillus oryzae*. *J Ferment Technol* 66, 137-143.
- Yao, Y.F., Weng, Y.M., Hu, H.Y., Ku, K.L., Lin, L.L. (2006) Expression optimization and biochemical characterization of a recombinant gamma-glutamyltranspeptidase from *Escherichia coli* novablue. *Protein J* 25, 431-441.
- Yin, W.B., Reinke, A.W., Szilágyi, M., Emri, T., Chiang, Y.M., Keating, A.E., Pócsi, I., Wang, C.C., Keller, N.P. (2013) bZIP transcription factors affecting secondary metabolism, sexual development and stress responses in *Aspergillus nidulans*. *Microbiology* 159, 77-88.

Yu, J.H. and Leonard, T.J. (1995) Sterigmatocystin biosynthesis in *Aspergillus nidulans* requires a novel type I polyketide synthase. *J Bacteriol* 177, 4792-4800.

Zadzinski, R., Maszewski, J., Bartosz, G. (1996) Transport of glutathione S-conjugates in the yeasts *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Biol Int* 20, 325-330.

Zarnowski, R., Cooper, K.G., Brunold, L.S., Calaycay, J., Woods, J.P. (2008) *Histoplasma capsulatum* secreted gamma-glutamyltransferase reduces iron by generating an efficient ferric reductant. *Mol Microbiol* 70, 352-368.

Zhang, H., Forman, H.J., Choi, J. (2005) Gamma-glutamyl transpeptidase in glutathione biosynthesis. *Methods Enzymol* 401, 468-483.

Zhang, H. and Forman, H.J. (2009) Redox regulation of gamma-glutamyl transpeptidase. *Am J Respir Cell Mol Biol* 41, 509-515.

9. Köszönetnyilvánítás

Szeretném köszönetemet kifejezni témavezetőmnek Dr. Emri Tamás egyetemi docensnek, lelkes témavezetéséért, önzetlen segítségnyújtásáért, szaktudásának továbbadásáért. Köszönettel tartozom Prof. Dr. Pócsi István tanszékvezető egyetemi tanárnak, aki lehetővé tette és értékes tanácsaival mindvégig támogatta munkámat a Debreceni Egyetem, TTK, Biotechnológiai és Mikrobiológiai Tanszékén.

Köszönettel tartozom Dr. Keserű Juditnak (Debreceni Egyetem) a 2D PAGE, Dr. Csősz Évának (Debreceni Egyetem) a nanoHPLC-MS vizsgálatok, valamint Dr. Gonda Sándornak (Debreceni Egyetem) és Kiss-Szikszai Attilának (Debreceni Egyetem) az LC-ESI-MS/MS vizsgálatok kivitelezéséért. Köszönet illeti Prof. Dr. Jae-Hyuk Yut és Dr. Nak-Yung Kwont (University of Wisconsin-Madison, Amerikai Egyesült Államok), hogy az általuk készített deléciós és komplementált törzseket a rendelkezésemre bocsátották.

Szeretném megköszönni Hajdu Márton biológia BSc szakos hallgató lelkiismeretes munkáját, továbbá a Biotechnológiai és Mikrobiológiai Tanszék minden egyes dolgozójának, PhD hallgatójának az odaadó segítséget, valamint azt, hogy munkámat kellemes légkörben, barátok közt végezhettem.

Végül, de nem utolsó sorban szeretnék köszönetet mondani családomnak és barátaimnak doktori munkám alatt nyújtott támogatásukért, biztatásukért.

A dolgozat a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal (K100464, K112181), valamint a TÁMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0045 projekt támogatásával készült.

10. Tudományos közlemények jegyzéke

Az értekezés alapjául szolgáló tudományos közlemények

1. Spitzmüller, Z., Kwon, N.J., Szilágyi, M., Keserű, J., Tóth, V., Yu, J.H., Pócsi, I., Emri, T. (2015) γ -Glutamyl transpeptidase (GgtA) of *Aspergillus nidulans* is not necessary for bulk degradation of glutathione. *Arch Microbiol* 197, 285-297. doi: 10.1007/s00203-014-1057-0. IF: 1.760
2. Spitzmüller, Z., Hajdú, M., Pócsi, I., Emri, T. (2015) Degradation of glutathione in *Aspergillus nidulans* - Short communication. *Acta Biol Hung* 66, 242-245. doi: 10.1556/018.66.2015.2.10. IF: 0.605
3. Spitzmüller, Z., Gonda, S., Kiss-Szikszai, A., Vasas, G., Pócsi, I., Emri, T. (2016) Characterization of extracellular γ -glutamyl transpeptidase from *Aspergillus nidulans*. *Mycoscience* in press. <http://dx.doi.org/10.1016/j.myc.2016.07.002>. IF: 1.165

Az értekezés témakörében elhangzott előadások és poszterek

1. Spitzmüller, Zs., Hajdu, M., Pócsi, I. and Emri, T. (2014) Physiological role of γ -glutamyl transpeptidase in *Aspergillus nidulans*. *Tavaszi Szél Konferencia*, Debrecen.
2. Spitzmüller, Zs., Hajdu, M., Pócsi, I. and Emri, T. (2014) Degradation of glutathione correlates with the transcription of the DUG genes in *Aspergillus nidulans*. *Fiatal Biotechnológusok Országos Konferenciája*, Szeged.
3. Spitzmüller, Zs., Hajdu, M., Pócsi, I. and Emri, T. (2014) Characterization of gamma-glutamyl transpeptidase from *Aspergillus nidulans*. *Congress of the Hungarian Society for Microbiology*, Keszthely.

4. Tóth, V., Spitzmüller, Zs., Vasas, G., Szilágyi, M., Pócsi, I. and Emri, T. (2011) Production of glutaminase A by *Aspergillus nidulans*. *16th International Congress of the Hungarian Society for Microbiology, Budapest*.
5. Emri, T., Tóth, V., Spitzmüller, Zs., Vasas, G., Szilágyi, M. and Pócsi, I. (2009) Glutathione metabolism of carbon starving *Aspergillus nidulans* cultures. *Acta Microbiologica and Immunologica Hungarica* 56, 143. *2nd Central European Forum for Microbiology, Keszthely*.