

Doktori (PhD) értekezés

***AZ ASPERGILLUS NIDULANS* GOMBA LAKTÓZ ÉS GALAKTÓZ ANYAGCSERÉJÉNEK JELLEMZÉSE ÉS SZABÁLYOZÁSA**

Készítette:

Fekete Erzsébet

okl. biológia-kémia szakos középiskolai tanár

Témavezetők:

Dr. Karaffa Levente

egyetemi adjunktus

és

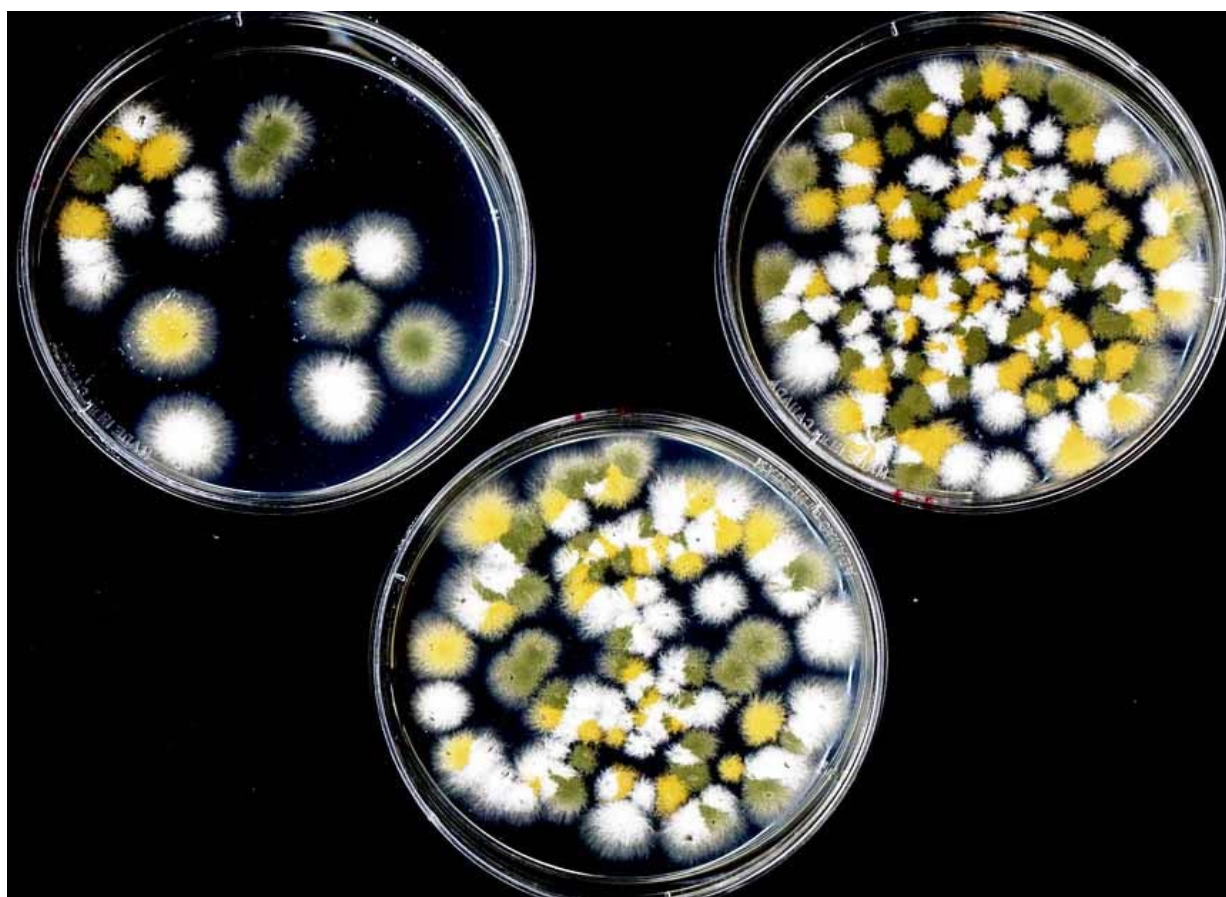
Dr. Szentirmai Attila

emeritusz egyetemi tanár



Debreceni Egyetem
Általános Orvostudományi Kar
2004

Mindenkinek, akit szeretek...



A feltört kleisztotécium szétszélesztett askospóráiból kinőtt telepek (*A. nidulans*)

Forrás: www.fgsc.net

Címlap: Eltérő színű *A. nidulans* törzsek. Forrás: www.fgsc.net

TARTALOMJEGYZÉK

Köszönetnyilvánítás	5. oldal
Bevezetés	6. oldal
Irodalmi áttekintés	7. oldal
Karbon katabolit represszió gombákban	7. oldal
Pentózok anyagcseréje gombákban	11. oldal
Gombák laktóz és galaktóz anyagcseréjének áttekintése	14. oldal
Előzmények	16. oldal
Anyagok és Módszerek	17. oldal
Gombatörzsek	17. oldal
<i>Aspergillus nidulans</i> törzsek	17. oldal
<i>Trichoderma reesei</i> törzsek	19. oldal
Törzsfenntartás	19. oldal
<i>Aspergillus nidulans</i>	19. oldal
<i>Trichoderma reesei</i>	20. oldal
Tenyésztési körülmények	20. oldal
<i>Aspergillus nidulans</i>	20. oldal
<i>Trichoderma reesei</i>	22. oldal
Analitikai módszerek	22. oldal
Növekedés	22. oldal
Szénhidrát meghatározás	23. oldal
NMR-vizsgálatok	25. oldal
Polarimetriás mérések	25. oldal
Az <i>A. nidulans</i> laktóz felvételének vizsgálata	26. oldal
Enzimaktivitások meghatározása	26. oldal
Proteáz aktivitás meghatározása	27. oldal
Sejtmentes kivonat készítése	27. oldal
A β -galaktozidáz aktivitás meghatározása	28. oldal
Galaktokináz aktivitás meghatározása	28. oldal
Poliol dehidrogenáz aktivitás	28. oldal
A „galaktitol dehidrogenáz” reakció vizsgálata	29. oldal
A hexokináz aktivitás vizsgálata	29. oldal
Az aldóz reduktáz aktivitás meghatározása	30. oldal

A fehérjetartalom meghatározása	30. oldal
Kettős mutánsok előállítása	30. oldal
Reprodukálhatóság	32. oldal
Felhasznált vegyszerek	32. oldal
Kutatási költségek finanszírozása	32. oldal
Eredmények	33. oldal
Laktóz hidrolízis <i>A. nidulans</i> -ban	33. oldal
A laktóz felvétel szabályozása <i>A. nidulans</i> -ban	34. oldal
A β -galaktozidáz enzim szabályozása <i>A. nidulans</i> -ban	35. oldal
Növekedés laktózon és az aktivitás repressziója glükózzal	35. oldal
A β -galaktozidáz aktivitás indukciója	40. oldal
A galaktóz anyagcsere és a β -galaktozidáz aktivitás kapcsolata	43. oldal
Reduktív D-galaktóz lebontási útvonal <i>A. nidulans</i> -ban	47. oldal
A megfigyelés	47. oldal
Az első intermedier azonosítása	49. oldal
Az első enzimatis lépés azonosítása	51. oldal
A második intermedier azonosítása	53. oldal
A második enzimatis lépés azonosítása	55. oldal
Hogyan tovább, L-szorbóz?	57. oldal
Az eredmények megbeszélése	59. oldal
Irodalmi hivatkozások	67. oldal
Tézisek	81. oldal
Publikációs lista	82. oldal

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A Főnököt általában nem szokták szeretni. Főleg, ha kettő van belőle...

Úgy látszik, én e tekintetben roppant szerencsés vagyok. Hálás vagyok a sorsnak, hogy **Dr. Szentirmai Attila** professzor úr munkacsoportjában dolgozhattam, aki mindenben segített a munkám során. Ő egy igazi iskolateremtő professzor, és egy nagyon jó ember. Kiemelt köszönet illeti legjobb barátomat és keresztfiam (**Karaffa Levente Benjámin**, Ő még nem Dr.) édesapját, **Dr. Karaffa Levente** adjunktust. Mellette csinálhattam, amit mindig is szerettem volna: érdekes élettani jelenségeket megfigyelni, értelmezni, az eredményeket este vörösbor mellett megbeszélni. Remélem, a jövőben is együtt tudunk dolgozni.

Dr. Karaffa Erzsébet Mónika volt az egyik szakdolgozati témavezetőm. Vele kezdtem el fonalas gombákkal foglalkozni. Köszönöm, hogy megtanított alapvető technikákra, melyek fontosak voltak a doktori munkám során. Ő készíti a legfinomabb milánói makarónit. Sok sikert az Agráron!

Köszönöm **Dr. Christian P. Kubicek** professzornak, hogy mindig szívesen látott bécsi laborjában és közösen dolgozhattunk egy gazdaságilag is jelentős gomba, a *Trichoderma reesei* vizsgálatai során.

Köszönet illeti **Dr. Axel A. Brakhage** professzort (Hannoveri Egyetem, Mikrobiológiai Tanszék), Tőle tanultam meg, hogyan kell kettős mutánsokat készíteni, melyek nélkülözhetetlenek voltak egyes problémák megválaszolásában.

A precíz NMR-vizsgálatok **Dr. Bányai István** nevét fémjelzik.

Munkám során **Dr. Biró Sándor**, **Dr. Gyémánt Gyöngyi**, **Dr. Kónya József** és **Dr. Nagy Noémi** laborjában is dolgoztam. Köszönöm, hogy időt szakítottak rám.

Nagyon sokat jelentett **Kozma József**, **Sepsi Adél**, **Dr. Novák (EK) Ervin**, **Dr. Antal Károly**, **Dr. Novák Levente** (köszí a mosógépet!) és tiszteletbeli férjem, **Dr. Könczöl Kálmán** szakmai segítsége és barátsága.

Ha valami elromlott vagy eltört, **Maglóczki Laci** bácsi és **Donka Bandi** segítettek nekünk. A fermentációs munkák során felmerülő eszközhiányt **Bakondi-Kovács István** tudta mindig orvosolni.

Köszönöm szépen!

BEVEZETÉS

Tanszékünkön a megalakulás óta folynak kutatások a fermentációs ipar szempontjából jelentős mikrobiológiai problémák tudományos igényű magyarázatára. A számos lehetőség közül végül a fonalas gombák élettani, biokémiai és genetikai tanulmányozása nemesedett tanszéki kutatási programmá.

Az *Aspergillus nidulans*-t (teleomorf: *Emericella nidulans*) egy szisztematikus keresés eredményeként „tették meg” a tömlősgombák (*Ascomycota*) modellszervezetének a XX. század negyvenes éveiben. Ennek több oka volt: (a) a faj minimál táptalajon, vagyis egyetlen szerves szénforráson, nitrogénforráson, néhány egyszerű són és nyomelemen is képes teljes életciklusát befutni, (b) szinte minden szén- illetve nitrogénforrást képes asszimilálni, lehetővé téve az anyagcsere teljes vertikumának vizsgálatát, (c) életciklusának döntő részében haploid, azonban stabil diploid állapot is kialakítható, (d) nagy mennyiségben képez vegetatív, egymagvú konídiospórákat, s mivel ezek eltérő színűek lehetnek, a különböző genotípusú törzsek szabad szemmel is elválaszthatók, (e) könnyen képez askospórákat tartalmazó kleisztotéciumokat is (ivaros szaporodás), ami a kettős mutánsok kialakítását könnyíti meg. A fentiek miatt világszerte rengeteg kutatócsoport vizsgálja az *A. nidulans*-t, aminek természetes következménye lett az óriási számú mutáns (Clutterbuck 1997), plazmid- és génkonstrukció, melyek a „community”-hez tartozó laborok között szívességi alapon keringenek. További kutatási és technikai lehetőséget jelent az *A. nidulans* genom teljes szekvenciájának ismerete (8 kromoszóma, 31 Mb).

Munkacsoportunk, mely korábban nagy termelőképességű, imperfekt *Penicillium* és *Acremonium chrysogenum* törzsekkel foglalkozott, 2000-ben kezdte el az *A. nidulans* kutatását. Ennek alapvető oka a fenti β -laktám termelők és az *A. nidulans* anyagcseréje közötti hasonlóság volt (Arst és Penalva 2003). Úgy gondoltuk, az ipari mikrobiológia fontos kérdéseinek *A. nidulans*-on történő vizsgálata jobb, alaposabb magyarázatokat eredményez majd, mintha a kevésbé ismert biológiájú termelői törzsekkel tennénk ugyanezt.

Ezen megközelítés első eredményeit tartalmazza ez a dolgozat, melyben a laktóz és galaktóz anyagcsere általunk feltárt tulajdonságait és szabályozását részletezzük. Ahogy az a tudományban lenni szokott, az eredmények számos új kérdést is felvetnek; ennek ellenére úgy érezzük, sikerült néhányat megismernünk egy régi, de máig jelentős fermentációs ipari szénforrás, a laktóz lebontásának „titkai” közül.

IRODALMI ÁTTEKINTÉS

Karbon katabolit represszió gombákban

Minden élőlény igyekszik anyagcseréjét a lehető leghatékonyabban működtetni. Ehhez alapvető feltétel a gazdaságosság: csak azok a lebontó enzimek szintetizálódnak, melyekre *de facto* szükség van, és csak olyan mennyiségben, hogy fedezzék a felépítő folyamatok aktuális energia- és redukálóerő igényét. Azon enzimek, melyek adott körülmények között szükségtelenek, nem jönnek létre, vagy ha mégis, az szelekciós hátrányt jelent a sejtre nézve.

A szénváz lebontásának szabályozásakor a legfontosabb szempont az időegység alatt felszabadítható nettó energia mennyisége: a sejt a leggyorsabban hasznosuló szénforrást fogja felvenni és oxidálni, a lassabban hasznosulók lebontásához szükséges enzimek szintézise pedig gátlődik. A jelenséget karbon katabolikus szabályozásnak (represszió) nevezzük; szigorúan transzkripciós szintű folyamat. Jellemzően (de nem kizárólag) a glükózzal lehet kiváltani (a „katabolikus” jelző azon idők maradványa, amikor a jelenségért a glükóz „katabolit”-jait, bomlástermékeit tartották felelősnek).

Glükóz szénforrás jelenlétében tehát azok a gének, melyek más szénforrások lebontásához szükséges enzimeket kódolnak, gátolva vannak. A mechanizmus meglétét nagyszámú mikrobában sikerült kimutatni. Eukarióták közül a *Saccharomyces cerevisiae*-ben tanulmányozták behatóan (Gancedo 1998, Trumbly 1992). A fonalas gombák karbon katabolit repressziójáról azonban viszonylag kevés ismeret áll rendelkezésre, noha pl. a *Trichoderma* és *Aspergillus* törzsek számos olyan iparilag jelentős enzimet, rekombináns proteint és metabolitot állítanak elő, melyek bioszintézise glükóz represszió alatt van (Davies 1991, Kubicek 1992, Suominen és Rainikainen 1993). A Tanszékünkön korábban részletesen vizsgált *Acremonium chrysogenum* és *Penicillium chrysogenum* törzsek cephalosporin C illetve penicillin bioszintézisének néhány (de nem összes) lépése ugyancsak karbon represszió alatt áll (Martin-Zanca és Martin 1983, Kozma és mtsai 1993).

Élesztőben a glükóz repressziót a Mig1p nevű Zn-ujj fehérje közvetíti, mely a TUP1p és az SSN6p fehérjékkel kapcsolódva a represszálnak a gének promoterének specifikus régiójához kötődik. Ezt a represszor komplexet az *snf1* gén által kódolt protein kináz inaktíválhatja (Celenza és Carlson 1986), derepresszálnak ezzel olyan géneket, mint a *SUC2* (invertáz) és *GAL* (galaktóz lebontás; Johnston 1987). A Mig1p-hez hasonló

aminosav-sorrendű Mig2p Zn-ujj fehérje szintén képes inaktiválni a *SUC2* gén kifejeződését, ám egyéb karbon represszió által szabályzott génre nem hat, és az Snf1p kináz sem szabályozza (Lutfiyya és Johnston 1996).

A fonalas gombák karbon katabolit represszióját a *creA* gén közvetíti. Jelenlétét kimutatták többek között az *A. nidulans*-ban (Dowzer és Kelly 1991), az *A. niger*-ben (Drysdale és mtsai 1993, Ruijter és mtsai 1997), a *T. reesei*-ben (Strauss és mtsai 1995, Ilmen és mtsai 1996), a *T. harzianum*-ban (Takashima és mtsai 1996) és a növénypatogén *Cochliobolus carbonum*-ban (Tonukari és mtsai 2003) is. Nem ismerünk olyan fonalas gombáról szóló közleményt, amely a *creA*-homológ hiányáról tudósítana. A *creA* egy olyan Cys₂-Hys₂-típusú Zn-ujj fehérjét kódol, mely számos glükóz által represszálható gén promoteréhez képes specifikusan kötődni, meggátolva átíródásukat. Ezen gének távolról sem teljes listáját mutatja az **I. táblázat**.

GÉN / LÓKUSZ	KÓDOLT ENZIM	MIKROORGANIZMUS	HIVATKOZÁS
<i>xyn1</i>	xilanáz	<i>Trichoderma reesei</i>	Mach és mtsai (1996)
<i>prnB</i>	prolin transzporter	<i>Aspergillus nidulans</i>	Cubero és Scazzocchio (1994)
<i>alcA</i>	alkohol dehidrogenáz	<i>Aspergillus nidulans</i>	Kulmburg és mtsai (1993)
<i>bxl1</i>	β-xilozidáz	<i>Talaromyces emersonii</i>	Reen (2003)
<i>lac1</i>	p-difenol oxidáz (lignin anyagcsere)	<i>Pleurotus sajor-caju</i> (ehető)	Soden és Dobson (2003)
<i>sorB3</i>	Nagy affinitású glükóz transzporter lókusza	<i>Aspergillus nidulans</i>	MacCabe és mtsai (2003)
<i>abf1</i>	α-L-arabinofuranozidáz	<i>Penicillium purpurogenum</i>	Carvallo és mtsai (2003)
<i>cdh</i>	cellobióz dehidrogenáz	<i>Trametes versicolor</i>	Stapleton és Dobson (2003)
<i>otaA</i>	ornitin transzamináz	<i>Aspergillus nidulans</i>	Dzikowska és mtsai (2003)

I. táblázat. Működő CreA-kötőhellyel rendelkező gének, illetve lókuszek

A CreA fehérje kötődéséhez a 5'-SYGGGG-3', vagy a 5'-SYGGRG-3' szekvenciákra van szükség (S=C vagy G, Y=C vagy T és R=A vagy G), ugyanazokra, mint a MigG1p és Mig2p kötődéséhez (Vautard és mtsai 1999). Ennek szép példája, hogy a *T. reesei* cellobiohidroláz I gén promoterének egy fenti szekvenciát tartalmazó régiója riporter génként a *S. cerevisiae*-ben is képes volt glükóz repressziót közvetíteni (Carraro és mtsai 1998). A *creA* teljes delécióját eredetileg halálosnak gondolták (Dowzer és Kelly 1991), szemben az élesztők *mig1* génjének elvesztésével. Később kiderült (ugyanazon munkacsoport jóvoltából), hogy a korábbi megfigyelés csupán a nem precíz deléciónak volt köszönhető (1,5 kb-nyi 3' szekvenciát is kivágtak, amikor a *creA*-t a *riboB* génre cserélték), és a *creA* nullmutáns, ugyan extrém fenotípus mellett, de életképes (Shroff és mtsai 1997).

A. nidulans-ban a *creA* gén transzkripciójának mértéke a legtöbb szénforráson állandó, glükóz hozzáadására azonban ötszörösére emelkedik. A transzkriptum autoreguláció alatt áll, glükózon az indukált szint hamarosan visszaesik, újból derepresszálo szénforráson (pl. arabinóz; Strauss és mtsai 1995) azonban változatlan marad. Hasonló mechanizmust mutattak ki *T. reesei*-ben is (Ilmen és mtsai 1996). A *creB* mutáns viszont, mely glükózon is derepresszált alkohol dehidrogenáz génnel rendelkezik (Hynes és Kelly 1977), képtelen glükóz hatására megemelni a *creA* gén kifejeződésének szintjét (Strauss és mtsai 1999). Ez arra utal, hogy a *creB* gén szerepet játszik a glükóz szignál *creA* génhez való továbbításában.

A *creA* gén transzkripció szabályzásán kívül a CreA fehérje is regulálható, részben a C-terminális specifikus végének más fehérjékkel való direkt kölcsönhatása (Strauss és mtsai 1999), részben a fehérje foszforilezése révén. Ez utóbbi folyamat élesztőkben szükségtelen a Mig1p fehérje kötődéséhez (Östling és mtsai 1996).

Rendkívül keveset tudunk azokról a "korai" szignálokról, melyek a karbon katabolit szabályozást kiváltják fonalas gombákban. A glükóz megjelenését követő első lépésekben ugyanis több fontos különbség is adódik az élesztő és fonalas gombák között:

- fonalas gombákban a cukortranszport nem kapcsolódik hexóz foszforilezéséhez (Brown és Romano 1969, Desai és Modi 1974).
- fonalas gombákban a glükóz transzporterek száma lényegesen kevesebb, mint élesztőkben. *A. nidulans*-ban egyet (Romano és Kornberg 1968), *A. niger*-ben (Torres

és mtsai 1996) és *Neurospora crassa*-ban (Allen és mtsai 1989, Schneider és Wiley 1971) pedig kettőt írtak le, míg élesztőkben 15-20-at (Maiera és mtsai 2002).

- Glükóz távollétében *N. crassa*-ban a két hexóz transzporter fehérje derepresszáva van (Schneider és Wiley 1971), míg élesztőkben az összes hexóz transzporter fehérjét kódoló gén represszált (Özcan és Johnston 1995).
- Az *A. nidulans* hexo/glükokináz hiányos mutánsai nem karbon katabolit derepresszáltak (Ruijter és mtsai 1996), míg élesztőkben ezen enzimek génjeinek roncsolása karbon katabolit derepressziót eredményez (Rose és mtsai 1991).

Látható tehát, hogy az élesztőkre leírt karbon katabolit szabályozási mechanizmus fonalas gombákra való automatikus alkalmazása már jelenlegi ismereteink szintjén is megkérdőjelezhető. Ehhez további adalék, hogy a különböző genusokba tartozó fonalas gombák *creA*-homológjai képesek funkcionálisan komplementálni egymást, a *mig1* hiányos élesztőket azonban nem (Vautard és mtsai 1999).

Az első karbon katabolit derepresszált *A. nidulans* mutánst több, mint 30 éve izolálták, amit számos további követett (Arst és Cove 1973, Bailey és Arst 1975, Hynes és Kelly 1977, Arst és mtsai 1990, Shroff és mtsai 1996). Az alkalmazott stratégia lényege a következő: egyes szubsztrátumok (L-prolin, acetamid) egyaránt lehetnek szén-és nitrogén források is, emiatt a lebontásukhoz szükséges enzimek szintézise karbon és nitrogén represszió alatt áll. Ha bármelyik represszió alól a gén mentesül, megtörténik az expresszió. A nitrogén katabolit repressziót az aktivátor *areA* gén terméke közvetíti, amely tehát ellentétes elven működik, mint a represszor CreA – a lassan hasznosuló nitrogénforrások (pl. nitrát) asszimilációjához működőképes AreA fehérje szükséges. Egy *areA* mutáns törzs csak ammónium ionok jelenlétében tud a legtöbb szénforráson (köztük glükózon is) nőni, a fenti “kettős” szubsztrátumokon viszont vad típusként viselkedik. Ha ellenben L-prolin vagy acetamid mellé glükózt is adunk, a növekedés leáll. A *creA* gén mutációit ezért úgy definiálták és szelektálták, mint az *areA* mutáns allélek szupresszorait glükóz + L-prolin (pl. *creA1* mutáns), vagy glükóz + acetamid (pl. *creA204*, *creA218*, *creA220*, *creA221*, *creA225* mutánsok) táptalajokon. Olyan mutációkat kerestek, melyek lehetővé tették a növekedést glükóz jelenlétében is. Fenotípusosan ezek számos (de nem feltétlenül az összes) karbon represszáható gén derepressziójában, valamint “extrém” morfológiában jelentkeztek. Ez utóbbi gyenge konídium képzést, a szabad micéliumok

hifacsomókhoz viszonyított arányának növekedését, sőtét “testecskék” (tartalék tápanyagok, melyek “alapanyagait” a vad típusú sejt nem vette volna fel) hifákban való megjelenését jelenti.

A molekuláris jellemzés három *A. nidulans creA*-mutáns csoportot különített el: (a) a DNS-kötőhelyen belül értelmetlen nukleotid sorrenddel rendelkezők, (b) csonka CreA polipeptidet produkálók, (c) nullmutánsok. Az első csoport tagjai nem tudnak stabilan kötődni a célpromóterek szekvenciáihoz, a második esetben (mutánstól függően) a fehérje egyes alapvető részei nem íródnak át, míg a nullmutánsokban a *creA*-t teljes egészében más gévre cserélték.

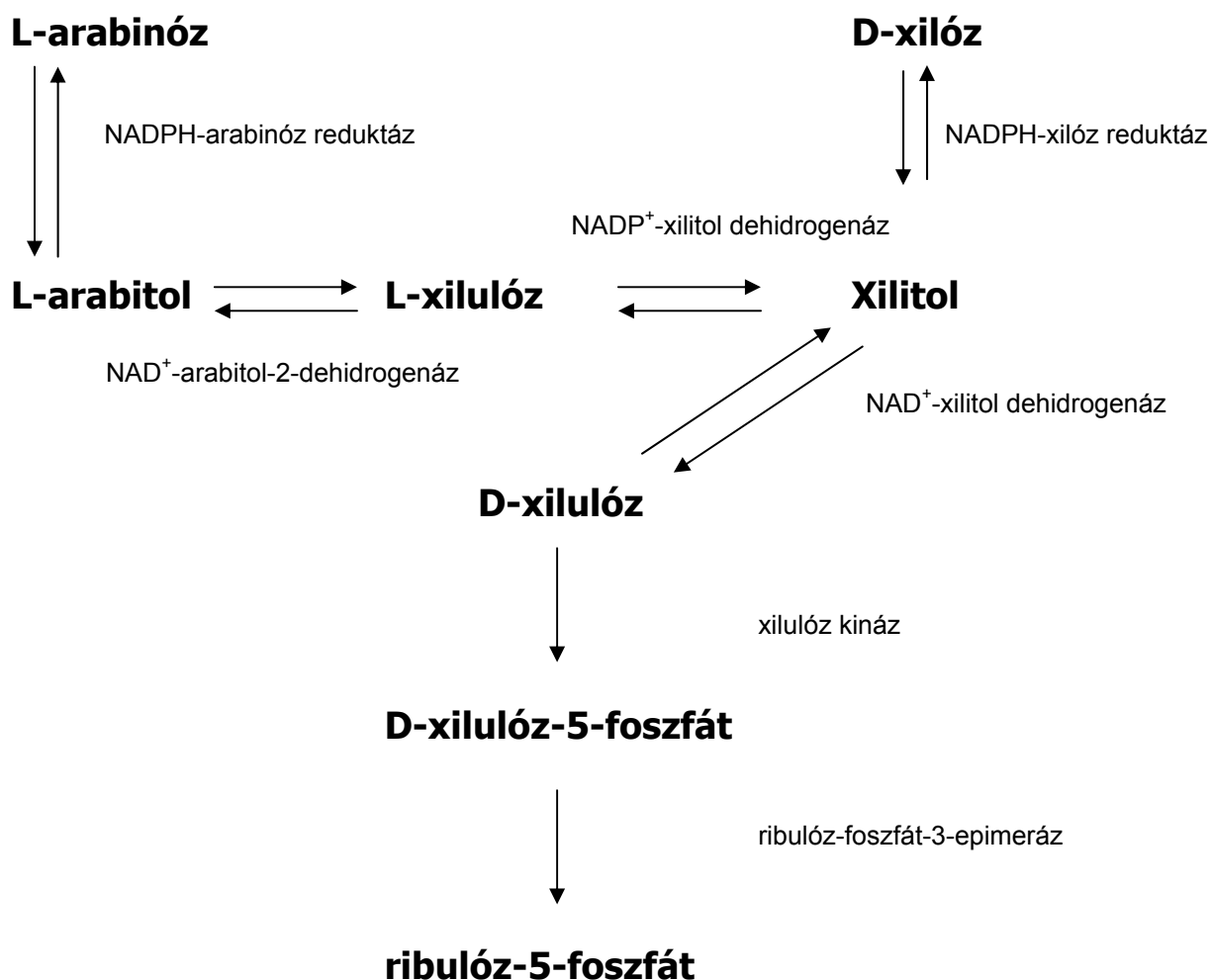
Pentózek anyagcseréje gombákban

A fonalas gombák jellemzően szaprofita élőlények, így nem meglepő, hogy számos törzsük hatékony termelője a poliszacharidokat hidrolizáló enzimeknek. A poliszacharid hidrolázok egyik típusát alkotják a hemicellulolitikus enzimek, melyek a növényekben nagy mennyiségben előforduló hemicellulózok hidrolitikus hasítását képesek katalizálni. A hemicellulóz kifejezés a növényi sejtfalban a cellulózzal szorosan egybeépült nem-cellulóz jellegű poliszacharidokat takarja (Eriksson és mtsai 1990). Kémiailag két vagy több monoszacharid (pl. D-xilóz, L-arabinóz, D-mannóz, D-glükóz, D-galaktóz, 4-O-metil-D-glükuronsav) heteropoliszachariddá kapcsolódásával jellemezhetők; az alegységek ecetsavval, illetve p-kumársavval észter-kötésben vehetnek részt. A hemicellulózok elsődleges szerkezete a növényfajra jellemző, de egyazon növény szervei között is komoly eltérések lehetnek. A keményfák legfontosabb hemicellulóz komponense az O-acetil-4-O-metil-D-glükurono-D-xilán, mellette pedig glükomannán figyelhető meg viszonylag nagyobb mennyiségben (Timell 1967, Wilkie 1983). A puhafáknál ezzel szemben az O-acetil-D-galakto-D-glüko-D-mannán a legfőbb hemicellulóz komponens, de nagy mennyiségben fordul elő az L-arabino-D-glükurono-D-xilán is – megjegyzendő, a puhafák hemicellulózában előforduló xilánhoz nem kapcsolódik ecetsav, mint a keményfákéban. A pázsitfűvek legelterjedtebb hemicellulóz típusa pedig az arabinoxilán (Voragen és mtsai 1992, Wilkie 1979). Minden xilán egység β -1,4 kötésű D-xilopiranoz egységekből épül fel. A xilopiranozil egységek általában α -1,2 kötésű 4-O-metil-D-glükuronsavval és α -1,3 kötésű L-arabinofuranózzal vannak random módon szubsztituálva, de nagyon sokféle egyéb szubsztituens is kötődhet hozzájuk.

A legfontosabb xilán depolimerizáló enzim az endo- β -1,4-xilanáz, mely jellemzően a lánc nem-szubsztituált részein hasít. Más enzimek a xilanázzal szinergizmusban működnek, új hasítóhelyeket hozva létre a xilanáz számára, vagy pedig a xilanáz által felszabadított lineáris és szubsztituált oligoszaccharidokat hidrolizálják. A hidrolitikus enzimek ipari léptékű előállítása szempontjából legjelentősebb gomba-nemzetségnek számító *Trichoderma* különböző fajaiból eddig 3 xilanázt tisztítottak, jellemeztek, és kristályosítottak, valamint izolálták és szekvenálták az őket kódoló géneket is (Biely és Tenkanen 1998). A fentiek mellett eddig három α -D-galaktozidázt (Margolles-Clark és mtsai 1996a) és egy α -L-arabinofuranozidázt (Margolles-Clark és mtsai 1996b) kódoló gént is izoláltak. Az előbbi D-galaktózt, az utóbbi L-arabinózt szabadít fel a hemicellulóz polimerből. Ismertek továbbá a β -D-xilozidázt (mely xilo-oligoszacharidokat és xilobiózt hidrolizál), az acetil-xilán észterázt (mely ecetsavat szabadít fel; (Margolles-Clark és mtsai 1996c) és a glükuronsavat felszabadító α -D-glükuronidázt kódoló gének szekvenciái is (Margolles-Clark és mtsai 1996d).

Noha (mint fentebb látható) számmottevő ismeret gyűlt már össze a hemicellulóz polimert monomerjeire hasító enzimrendszerekről és az őket kódoló génekről, viszonylag keveset tudunk a monomerek további lebontásának módjáról és ennek szabályozásáról. A hemicellulóz hexózok (D-galaktóz, D-mannóz) lebontásáról sok adat áll rendelkezésre *S. cerevisiae*-re vonatkozóan (Boles és mtsai 1994), és az elmúlt két évben (részben általunk) a *T. reesei* és az *A. nidulans* kapcsán is születtek fontos eredmények. A pentóz anyagcsere azonban nagyon kevésbé ismert a fonalas gombákban, és ez esetben még a *S. cerevisiae*-t sem hívhatjuk segítségül, mivel ebben az élesztőben alternatív reakcióutak alakultak ki ezen szubsztrátumok átalakítására és lebontására. A D-xilóz lebontását más élesztőkben (*Pichia* *sps.*, *Candida* *sps.*) az anaerob etanol produkció kapcsán tanulmányozták (Jeffries 1985) és megállapították, lebontása redukciós és oxidációs lépések révén megy végbe, szemben a baktériumoknál tapasztalható izomerizációval. Chiang és munkatársai (Chiang és mtsai 1958, Chiang és Knight 1959, 1960a, 1960b, 1961) fölfedezték, *P. chrysogenum*-ban az L-arabinóz és a D-xilóz lebontási útvonalai részlegesen megegyeznek, és ugyanezt mutatták ki további munkacsoportok is, *Aspergillus* gombafajokat vizsgálva (Witteveen és mtsai 1989, DeVries és mtsai 1994, Shi és mtsai 2000). D-xilózon és L-arabinózon nőni nem tudó *A. niger* mutáns micéliumai nagy mennyiségű intracelluláris arabitolt, illetve

xilitolt halmoznak fel. Mindezen eredmények együtt azt alább következő lebontási útvonalat jelölték ki a D-xilóz számára: D-xilóz – xilitol – D-xilulóz – D-xilulóz- 5-foszfát. Ugyanez az L-arabinóz számára: L-arabinóz – L-arabitol – L-xilulóz – xilitol – D-xilulóz – D-xilulóz-5-foszfát (**1. ábra**). Az összes redukciós lépés (cukor – poliol) NADPH-függő, míg az oxidációs lépések (poliol – cukor) NAD^+ -függők. Mindegyik reakciót más-más enzim katalizálja. Ezen enzimeket illetően azonban vannak még megválaszolatlan kérdések, ilyen pl. az L-arabinózt L-arabitolá redukáló aldóz reduktáz mibenléte. Az aldóz reduktáz élesztőkben és pl. *A. niger*-ben is széles szubsztrát-specifitású enzim, D-xilózt és L-arabinózt is képes átalakítani (De Vries és mtsai 1999b), az erősen eltérő affinitás viszont felveti, esetleg két különálló enzimről van szó. Eddig sem fehérje, sem génszinten nem vizsgálták még ez(eke)t az enzime(ke)t.



1. ábra. Fonalas gombák D-xilóz és L-arabinóz anyagcseréjének vázlata

Rendkívül keveset tudunk az L-arabinóz és a D-xilóz lebontásának szabályzásáról, és a szabályzás molekuláris mechanizmusáról. Ruijter és mtsai (1997) valószínűsítették, hogy az L-arabinóz lebontás első két lépése CreA-függő karbon katabolit szabályzás alatt áll, de munkájuk során csupán enzimaktivitásokat mértek, így a transzkripció kontroll mibenléte továbbra is kérdéses. Ennek ellenére a CreA-függő szabályozás megléte nagyon valószínű, mivel a karbon represszió folyamatában esszenciális *Snf1*-kináz hiányos *T. reesei* mutánsok csak nagyon gyengén nőnek L-arabinózon (Cziferszky és mtsai 2003). Hasonló megfigyelést tettek a növénypatogén *Cochliobolus carbonum* gomba kapcsán is (Tonukari és mtsai, 2000).

Gombák laktóz és galaktóz anyagcseréjének áttekintése

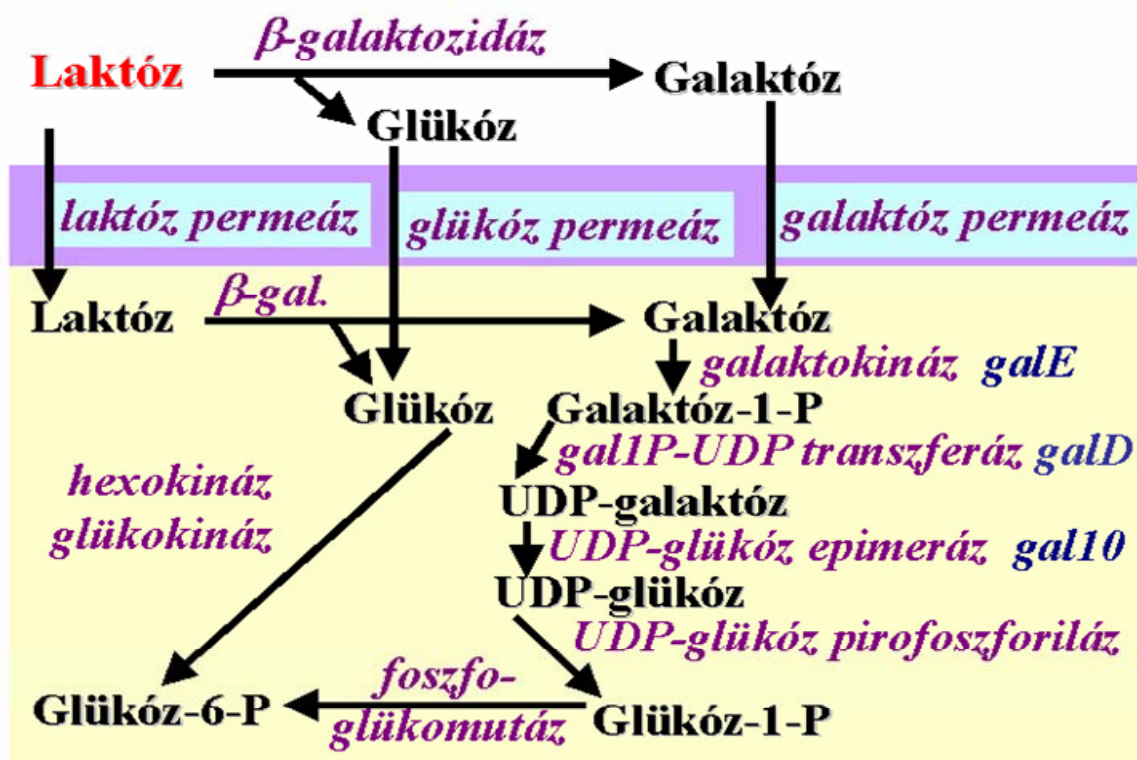
A sajtgyártás melléktermékeként évi 300 ezer tonna mennyiségben képződő laktóz (tejcukor; 1,4-0- β -D-galaktopiranozil-D-glükóz) kb. 15%-át használja fel szénforrásként a fermentációs ipar olyan folyamatokban, mint a *T. reesei* celluláz, vagy a *P. chrysogenum* penicillin termelése (Roelfsema és mtsai 1990). A laktóz tehát megújuló szénforrás, hátránya viszont, hogy a gombák lassan, egyes gazdaságilag fontos fajok (a legtöbb élesztő, *A. niger* – Elshafei és Abdel-Farah 2001) pedig egyáltalán nem tudják hasznosítani. Ennek evolúciós magyarázata lehet, hogy a laktóz a „legfiatalabb” cukor a természetben (Novák E., személyes közlés). Az *Escherichia coli* laktóz lebontásának szabályozása az operon-modell miatt tankönyvi ismeretnek számít, a baktériumok laktóz anyagcseréje (Shuster és Doudoroff 1967, Chassy és Thompson 1983) azonban alapvetően különbözik az eukariótákétól.

A laktóz lebontás első lépése a glükózzá és galaktózzá történő hidrolízis, ami vagy az extracelluláris β -galaktozidáz vagy a laktóz permeáz és az intracelluláris β -galaktozidáz párhuzamos működésének eredményeként történik. Sejtfalhoz kötött, extracelluláris és intracelluláris β -galaktozidázokat egyaránt leírtak, sokszor egy fajon belül is (Diaz és mtsai 1996, Nikolaev és Vinetski 1998, Nagy és mtsai 2001a,b). A glükóz glikolitikusan, a galaktóz pedig jellemzően a Leloir-útvonalon alakul tovább. A *Kluyveromyces lactis* élesztőben (mely azon kevés élesztők egyike, mely képes a laktózt hasznosítani, s ezért ebből a szempontból a legjobban ismert gombafaj) a laktóz hidrolízise intracelluláris, a Leloir-útvonal működése pedig nélkülözhetetlen (Chang és Dickson 1988, Dickson és Riley 1989, Meyer és mtsai 1991, Cardinali és mtsai 1997).

A Leloir-útvonalon történő D-galaktóz hasznosítás mind a pro-mind az eukarióta sejtekben általánosan elterjedt (Dey 1983, Frey 1996, Bettenbrock és Alpert 1998, Holden és mtsai 2003). Részben a lebontó anyagcsere útvonala, melyben a D-galaktóz szén- és energiaforrásként is hasznosul, de felépítő útvonalként is működik, ilyenkor változatos funkciójú és felépítésű szénhidrátok (lipopoliszacharidok, sejtalkomponensek, exopoliszacharidok) szintézisében működik közre, mint a D-galaktóz építőelem szolgáltatója. Uborkában pl. a sztachióz – szacharóz átalakításnál játszik szerepet (Gross és Pharr 1982).

A Leloir útvonal első enzime az ATP-függő galaktokináz (EC 2.7.1.6), mely a D-galaktózt (kizárólag C-1 pozícióban) foszforilezi. A D-galaktóz-1-foszfátra a D-galaktóz-1-foszfát uridililtranszferáz enzim (EC 2.7.7.12) egy UDP-glükózzal szembe fordított UMP-csoportot helyez, vagyis glükóz-1-foszfátot és UDP-galaktózt hoz létre. Az UDP-galaktóz szubsztrátumként szolgál az UDP-galaktóz-4-epimeráz (EC 5.1.3.2) által katalizált reakciónak, ami az UDP-glükóz regenerálását eredményezi. Az UDP-glükózra az UDP-glükóz-pirofoszforiláz enzim (EC 2.7.7.9) egy pirofoszfát csoportot rak (ezáltal elvonja az UDP-glükózt a D-galaktóz-1-foszfát uridililtranszferáz általi reverzibilis reakcióból), így glükóz-1-foszfát és UTP jön létre. Az előbbi a foszfoglukomutáz (EC 5.4.2.6) alakítja át a glikolízis közvetlen intermediérévé, glükóz-6-foszfáttá. A Leloir-útvonal enzimeit tehát a C-4 hidroxil térszerkezetét változtatják meg (epimerizáció). A laktóz anyagcsere, ezen belül a Leloir-útvonal általános vázlatát a **2. ábra** szemlélteti. Meg szeretnénk jegyezni, hogy többek szerint a D-galaktóz-mutarotáz gén illetve enzim is a Leloir-útvonalhoz tartozik, mely a β -D-galaktózt alakítja át α -D-galaktózzá, még a kináz reakció előtt (Wallenfels és mtsai 1964, Bouffard és mtsai 1994). Néhány baktérium (pl. *Lactococcus lactis*) mellett *P. notatum*-ból (Bentley és Bhate 1960a, b) és *A. niger*-ből (Kinoshita és mtsai 1981) is izolálták az aktivitást, ez utóbbiból mint aldóz-1-epimerázt (EC 5.1.3.3).

Laboratóriumi körülmények között számos szénforrás (pl. keményítő, növényi olajok, szoforóz, cellobióz, cellulóz) képes hatékonyan indukálni illetve derepresszálni a karbon katabolit represszió alá eső gének kifejeződését, de technikai és gazdasági okok miatt ezek ipari léptékben nem alkalmazhatók. Jelenleg ezért a laktóz a legfontosabb, termelői körülmények között is használható indukáló / derepresszálni szénforrás. Egyre jelentősebb alkalmazás a *T. reesei* celluláz promótereire alapuló heterológ fehérje előállítás is, mely szintén laktóz szénforráson történik (Penttillä 1998).



2. ábra. A laktóz és galaktóz lebontás általános sémája

Előzmények

Tanszékünkön a *P. chrysogenum* β -galaktozidáz enzimének vizsgálata „alapító” témának számít, a talán legértékesebb eredmények Dr. Nagy Zoltán doktori értekezése kapcsán kerültek napvilágra (Nagy és mtsai 2001a, b). Noha a laktóz fermentációs ipari felhasználása legalább 50 éves, a fonalas gombák galaktóz anyagcseréjét és szabályozását előttünk egyetlen non-profit munkacsoport sem vizsgálta (a termelői szféra ismereteit lehetetlen megbecsülni, a szabadalmak pedig – sajnos – ritkán nyújtanak használható adatokat). Négy évvel ezelőtt ennek a hiánynak a pótlására vállalkoztunk. Munkánkhoz szerencsés és öröndetes módon illeszkedtek Christian P. Kubicek professzor (Bereich Molekulare Biotechnologie, TU Wien) csoportjának a miénkkel egy időben kezdett, a *T. reesei* laktóz anyagcseréjét illetve cellulolitikus enzimeinek laktóz általi indukcióját célzó kutatásai. Noha ezekbe a világszínvonalú kutatásokba mi is bekapcsolódhattunk (Seiboth és mtsai 2002a, 2003), jelen doktori értekezés tézisei kizárólag az *A. nidulans*-sal, Debrecenben végzett kísérleteink eredményeiből származnak, csakúgy, mint **“Az eredmények megbeszélése”** részben bemutatott *T. reesei* munkák.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

I. Gombatörzsek

1. *Aspergillus nidulans* törzsek

A munkánk során felhasznált törzseket a **II. táblázat** tartalmazza. Az R21 jelű vad törzs Axel A. Brakhage professzor (Institut für Mikrobiologie, Universität Hannover), a két *creA* mutáns törzs Dr. Joan M. Kelly (Department of Genetics, University of Adelaide) laboratóriumából származik. Az „A” előjelű törzseket az FGSC (Fungal Genetic Stock Center, University of Kansas Medical Center, Kansas City) katalógusából vásároltuk meg. A „G” előjelű törzseink Dr. John Clutterbuck (Division of Molecular Genetics, University of Glasgow) törzsgyűjteményéből érkeztek. Az általunk létrehozott mutánsokat EFES (**E**rzsébet **F**ekete, **E**rzsébet **S**ándor) jelzéssel láttuk el. Születésük körülményeit lásd **Anyagok és Módszerek V.** fejezet.

TÖRZS	GENOTÍPUS	HIVATKOZÁS
R21	<i>pabaA1 yA2</i>	Roberts (1967)
A60	<i>biA1; wA3; galA1</i>	Roberts (1963)
A61	<i>galD5 biA1; wA3</i>	Roberts (1963)
A214	<i>biA1; wA3; galE9</i>	Roberts (1963)
A466	<i>galD5 suA1 adE20 riboA1 anA1 pro94 lysF88 pabaA1 yA2 adE20; ssbA1</i>	Käfer (1977)
A500	<i>biA1; methG1; nicA2; sbA3 malA1</i>	Käfer (1977)
G092	<i>yA2; frA1 pyroA4</i>	Roberts (1963)
G094	<i>biA1; wA3; araA1</i>	Roberts (1963)
creAΔ4	<i>yA2; pabaA1; creAΔ4 argB1</i>	Shroff és mtsai (1997)
creAd30	<i>biA1; creAd30</i>	Arst és mtsai (1990)
EFES1	<i>galD5 suA1 adE20 riboA1 anA1 pro94 lysF88 pabaA1 yA2 adE20; wA3; galE9</i>	Fekete és mtsai (2002)
EFES2	<i>pabaA1 yA2; galE9</i>	Fekete és mtsai (2004)
EFES3	<i>yA2; frA1 pyroA4; galE9</i>	Fekete és mtsai (2004)
EFES4	<i>biA1; wA3; araA1; galE9</i>	Fekete és mtsai (2004)

II. táblázat. A munkánk során felhasznált *Aspergillus nidulans* törzsek

A **II. táblázat**ban egymástól pontosvesszővel el *nem* választott gének együtt öröklődnek, mivel ugyanazon a kromoszómán találhatók.

A **II. táblázat**ban felsorolt és **félkövér betűvel jelölt** fontosabb markereket és fenotípusukat a **III. táblázat** foglalja össze:

GÉN	FENOTÍPUS	HIVATKOZÁS
<i>yA2</i>	sárga konídium	Clutterbuck (1972)
<i>wA3</i>	fehér konídium	Pontecorvo és mtsai (1953)
<i>biA1</i>	biotin auxotrófia	Roper (1950)
<i>pabaA1</i>	p-amino-benzoesav auxotrófia	Pontecorvo és mtsai (1953)
<i>galE9</i>	galaktokináz aktivitás hiánya	Robert (1963)
<i>galD5</i>	galaktóz-1-foszfát uridiltranszferáz aktivitás hiánya	Roberts (1963)
<i>galA1</i>	Alacsony, nem indukálható galaktokináz és galaktóz-1-foszfát uridiltranszferáz aktivitás	Roberts (1963)
<i>riboA1</i>	riboflavin auxotrófia	Cove (1979)
<i>anA1</i>	aneurin auxotrófia	Käfer (1958)
<i>lysF88</i>	lizin auxotrófia	Aspen és Meister 1962
<i>nicA2</i>	nikotinsav auxotrófia	Pontecorvo és mtsai 1953
<i>sbA3</i>	D-szorbitol hasznosítás képességének hiánya	Roberts 1963
<i>frA1</i>	fruktokináz aktivitás hiánya	Roberts 1963
<i>pyroA4</i>	piridoxin auxotrófia	Käfer 1958
<i>araA1</i>	L-arabitol hasznosítás képességének hiánya	Roberts 1963
<i>creAΔ4</i>	CreA nullmutáns	Shroff és mtsai 1997
<i>creA^d30</i>	CreA mutáns	Shroff és mtsai 1997

III. táblázat. A munkánk során használt *Aspergillus nidulans* törzsek fontosabb markerei és ezek fenotípusa

2. *Trichoderma reesei* törzsek

Mindkét általunk használt *T. reesei* törzs [QM9414 (vad típus) és Δ GAL (galaktokináz mutáns)] Dr. Christian P. Kubicek (Bereich Molekulare Biotechnologie, Technische Universität Wien) laborjából származik (Seiboth és mtsai 2003).

II. Törzsfenntartás

1. *Aspergillus nidulans*

A beszerzést követően minden törzset 10 g/l glükózt és a szükséges markereket tartalmazó folyékony AMM (**A**spergillus **M**inimal **M**edium; Pontecorvo és mtsai 1953) táptalajra oltottunk le. Ennek összetevői: 6 g/l NaNO_3 , 2 ml sóoldat, 10 g/l szénforrás, az adott törzs auxotróf markere(i); pH=6,5.

A sóoldat összetétele: 26 g/l KCl, 26 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 76 g/l KH_2PO_4 , 50 ml/l nyomelemoldat.

A nyomelemoldat alkotói: 40 mg/l Na-borát, 400 mg/l $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 714 mg/l $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 8 mg/l Na-molibdát és 800 mg/l $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, pH=2,0.

A tenyészeteket egy éjszakán át növesztettük rázatott lombikokban (37 °C, 200 rpm), ezután 1,5 ml fermentlevet 300 μ l tömény glicerinnel alaposan összekevertünk és az elegyet -80 °C-on tároltuk. Átlagosan két havonta vettünk elő új mélyfagyasztott mintákat, melyeket áoltás után ferdített agaron, un. spóráztató táptalajon tartottuk fenn. A növekedés 37 °C-on történt, a ferdéket ezután parafilmmel lezárva +4 °C-on tároltuk. A spóráztató táptalaj összetétele: 0,092 g/l di-ammónium-tartarát, 10 g/l glükóz, 20 ml/l sóoldat, az egyes törzseknek szükséges kiegészítők, valamint 15 g/l agar (Pontecorvo és mtsai 1953). Új ferdék leoltásakor mindig ellenőriztük, hogy a genotípus változatlan-e.

A glükózt 50%-os oldatként használtuk, és külön sterilizáltuk. A vitamin kiegészítők többségét (p-amino-benzoészav [H_1 -vitamin], tiamin [aneurin, B_1 -vitamin], piridoxin [B_6 -vitamin], riboflavin [B_2 -vitamin]) 2 mg/l végkoncentrációban, a biotint (B_7 -vitamin) viszont 1 mg/l végkoncentrációban adtuk a tenyészetekhez. Az aminosav kiegészítőket (lizin, arginin, metionin) 40 mg/l-es koncentrációban használtuk. Minden kiegészítőt Millipore Millex GP 0,22 μm -os szűrő segítségével csíramentesítettünk, és lamináris fülke alatt adtuk a már steril táptalajhoz.

2. *Trichoderma reesei*

A törzsfenntartás ferdített kémcsöveken, komplex táptalajon (30 g/l maláta kivonat, 20 g/l agar), 28 °C-on történt.

III. Tenyésztési körülmények

1. *Aspergillus nidulans*

Az összes kísérlet kémiailag definiált (minimál) táptalajon ment végbe. A mutánsok analízise és a kettős mutánsok létrehozása (keresztezések) során az AMM táptalajt 20 g/l agarral szilárdítottuk. A rázatott lombikos kísérletek, a szakaszos, a ráadagolásos és a folytonos fermentációk az általunk kifejlesztett AMM2 táptalajon történtek (Fekete és mtsai 2002). Az AMM2 összetétele: 8 g/l $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, 2 ml sóoldat (lásd 19. oldal), 10 g/l szénforrás, az adott törzs markere(i), 0,1 g/l CaCl_2 ; pH=6,5.

Munkánk során sokféle szénforrást: pentózokat (L-arabinóz és D-xilóz), aldohexózokat (D-glükóz és D-galaktóz), ketohexózokat (D-fruktóz, D-tagatóz, D-szorbóz, L-szorbóz), a laktóz diszacharidot, polioloikat (glicerin, L-arabitol, D-xilitol, D-szorbitol, mannitol, galaktitol), fukózt (6-deoxi-D-galaktóz), deoxi-D-glükózt, valamint acetátot használtunk. A szénforrásokat mindig utólag adtuk a már steril táptalajhoz, lombik esetében lamináris fülke alatt, fermentornál pedig oltólombik segítségével. A glükózt, fruktózt és glicerolt 50 %-os, a galaktitol 10 %-os, minden más szénforrást 25 %-os (w/v) vizes oldat formájában használtunk és Millipore Millex GP 0,22 μm -os szűrővel sterilizáltunk.

Az *A. nidulans* törzsek tenyésztését vagy 500 ml-es Erlenmeyer-lombikokban, vagy az Inel Kft. (Budapest) által gyártott laboratóriumi üvegfermentorban végeztük. A rázatott lombikos tenyésztés során a lombikok 100 ml tápfolyadékot tartalmaztak, melyekbe átlagosan egy ferdített agarcső konídiospóra tartalmát oltottuk bele. A leoltáshoz használt spórakoncentráció $1-1,5 \times 10^6$ / ml tartományba esett (a spórákat Bürker-kamrában számoltuk meg). A tenyésztés minden esetben 37 °C-on történt, a levegőellátást egy 200 rpm fordulaton járatott New Brunswick Scientific Co., Inc. (Edison, New Jersey, U.S.A.) gyártmányú rázógép segítségével biztosítottuk.

A laboratóriumi fermentor egy 2,5 l teljes és 2 l hasznos térfogatú kettős falú üvegedény, melyet külső termosztáttal lehet hőszabályozni. A tenyésztési hőmérséklet ez esetben is 37 °C volt. A tenyészet oxigénellátásának biztosításához steril membránszűrőn

(Sartorius) át kompresszált levegőt ($p = 0,5$ bar) préseltünk a tápfolyadékba (40 ml/perc), s ezt egy hatlapátos Rushton-tárcsával felszerelt mechanikus keverővel (600 rpm) porlasztottuk. A kémhatást kombinált pH-elektrodával (Ingold) mértük és az esetek többségében egy analóg szabályzó kör segítségével, 3 M HCl illetve 3 M NaOH adagolása révén $pH = 6,5$ értéken tartottuk. A fermentort is konídiospórákkal oltottuk le, melyek koncentrációja megegyezett a lombikok esetében alkalmazottal. A micélium üvegfalra tapadásának elkerülése érdekében a szárazra törölt fermentort használat előtt antiadhéziós szerrel (Sigmacot; Sigma-Aldrich Kft.) kezeltük. A habzás csökkentése érdekében reggel és este steril membránszűrőn keresztül pár csepp habzásgátlót (polipropilén-glikol 2000) injektáltunk a fermentorba. Lombikok esetében ugyanezt a habzásgátlót eleve a tápfolyadékba sterileztük, illetve szükség esetén steril fülke alatt, pipettával adagoltuk a tenyészetekhez (Krahe és mtsai 1996, Karaffa és mtsai 1997, 1999).

A ráadagolásos fermentációkat is a fent említett Inel üvegfermentorban végeztük. A tenyésztési körülmények megegyeztek a szakaszos fermentációnál leírtakkal. Az adagolás során 15 g/l végkoncentrációjú steril szénforrást (D-glükóz, D-galaktóz, laktóz) juttattunk a fermentorba leoltó lombik segítségével.

A kemosztát típusú folytonos fermentációkat is az Inel fermentorban végeztük, a fenn leírt fizikai-kémiai körülmények megtartása mellett, glükóz tartalmú AMM2 táptalajon (Sándor és mtsai 2000, 2001). Leoltás után a tenyészetek 36 óra hosszat nőttek, ezután folytonosítottuk be őket perisztaltikus pumpák (Gilson) segítségével. Amikor három fermentációs térfogatnyi fermentlé kiáramlása alatt eltelt idő során az egységnyi térfogatra vonatkoztatott sejttömeg (sejtkoncentráció) nem változott, az egyensúlyi állapotot megvalósultnak tekintettük. Ezt jellemzően 9-10 térfogatnyi fermentlé átáramoltatása után értük el. Azt megelőzően az irodalomból (Brown 1990) jól ismert oszcillációk jelentkeztek a biomassza produkcióban. A glükóz koncentrációját a kimenő fermentlében már nem lehetett mérni, tehát “szénforrás limitált” tenyészeteket hoztunk létre. Mindehhez az AMM2 táptalajon a kiindulási glükóz koncentrációját 3 g/l értékre kellett vennünk, amiből 1,4 g/l egyensúlyi biomassza keletkezett.

Az indukciós kísérletekhez mosott sejtes tenyészeteket használtunk. A konídiumokat a laktóz anyagcsere szempontjából „semleges” (nem indukáló, nem represszáló; Seiboth és mtsai 2002b) glicerolt tartalmazó AMM2 táptalajra oltottuk le. Egy napos növekedést követően a teljes fermentlevet vízszugárszivattyúhoz kapcsolt üvegucson szűrtük át, a

fennmaradt micéliumokat steril jéghideg vízzel alaposan átmostuk, majd steril spatulával a friss táptalajt tartalmazó lombikokba raktuk őket. Az indukáló / represszálo szénforrást 10 g/l végkoncentrációban egy órányi rázatás után adtuk a tenyészethez; ezen idő alatt a sejt elhasználta a glicerolos tápközegből fennmaradt intracelluláris tartalék tápanyagokat, és azonnal hozzáfogott az új szénforrás hasznosításához. Egy óra alatt a szénforrás nélküli tenyészetek légzési aktivitása erősen lecsökkent (Karaffa és mtsai 1996), a sejtek életképessége viszont még nem romlott le.

2. *Trichoderma reesei*

A kísérletek során alkalmazott folyékony táptalaj összetétele a következő volt: 8 g/l $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, 1 g/l húspepton, 10 g/l szénforrás, 0,1 g/l CaCl_2 , 1g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 4 g/l KH_2PO_4 , 6 g/ Na_2HPO_4 , 20 ml/l nyomelem oldat; pH=5,0.

A nyomelemoldat összetétele: 250 mg/l $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$, 80 mg/l $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, 70 mg/l $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ és 100 mg/l CoCl_2 ; pH=2,0, kénsavval beállítva (Mandels és Andreotti 1978). A tenyésztési hőmérséklet 28 °C volt.

A rázatott lombikos és a fermentációs tenyésztéseknél ugyanazon eszközöket használtuk, mint az *A. nidulans* esetében. Mivel a *T. reesei* csírázásához a pepton nélkülözhetetlen, de a növekedés későbbi fázisaiban már nem esszenciális, a fermentort nem konídiospórákról, hanem 10 százaléknyi (v/v) vegetatív micéliális inokulumról indítottuk. Ezáltal a fermentorban lévő táptalajnak nem kellett peptont tartalmaznia, ami fontos szempont, hiszen a pepton nemcsak nitrogén-, hanem szénforrásként is szolgálhat.

A mosott sejtes tenyészetek vizsgálatakor az inokulum pepton tartalmú táptalajon nőtt ki, de az új tápfolyadékhoz csak egy szénforrást (10 g/l végkoncentrációban) adtunk.

IV. Analitikai módszerek

1. Növekedés

A növekedést a tenyészetek egységnyi térfogatra vonatkoztatott szárazanyag tartalmának (Dry Cell Weight, DCW) gyarapodására vezettük vissza. Lombik esetén 2 x 2 ml, fermentor esetén 2 x 10 ml fermentlevet előre lemért tömegű Sartorius üvegszálás szűrőn vákum alatt leszűrtünk, a szűrőt és a biomasszát 80 °C-os szárítószekrényben tömegállandóságig szárítottuk, súlyukat analitikai mérlegen meghatároztuk, majd a két mérés eredményét átlagoltuk (Sándor és mtsai 1999).

2. Szénhidrát meghatározás

A koncentrációkat HPLC-analízissel (Gilson) határoztuk meg, az eluent használat előtt vízszűrőszivattyúval gázmentesítettük. A törésmutató detektor kimenő jelét analóg rekorderrel (Radelkis) regisztráltuk, és csúcsmagasság alapján számszerűsítettük. A csúcsok minőségi meghatározásához a standard addíciós módszert alkalmaztuk, mennyiségi értékelésükhöz hárompontos, külső kalibrációs görbét használtunk.

A táptalaj laktóz, D-galaktóz, D-glükóz, D-szorbitol és galaktitol tartalmát, valamint a micéliumban akkumulálódott galaktitol koncentrációját H^+ -fázisú ioncserélő oszloppal (Bio-Rad Aminex HPX- H^+) határoztuk meg, 55 °C kolonnahőmérséklet és 0,5 ml/perc áramlási sebesség mellett. Eluensként 10 mM H_2SO_4 -et használtunk.

A szorbóz meghatározását Ca^{2+} -fázisú ioncserés oszloppal végeztük (Bio-Rad Aminex HPX-C), 85 °C-on, 0,6 ml/perc áramlási sebesség mellett, membránszűrt és ioncserélt vizet használva eluensként.

Hogy biztosak legyünk abban, hogy valóban galaktitolt és szorbózt határoztunk meg intracellulárisan, a sejtekben előforduló pentózokkal (L-arabinóz, D-xilóz, D-ribóz), hexózokkal (D-glükóz, D-fruktóz, D-mannóz, D-tagatóz) és poliolokkal (glicerol, D-eritritol, D-ribitol, L-arabitol, D-xilitol, D-mannitol, D-szorbitol) vetettük össze a csúcsokat. Célunk a galaktitol és a szorbóz fenti molekulától való egyenkénti elkülönítése volt, amihez természetesen eltérő elválasztási körülmények voltak szükségesek. Négyféle oszlopot használtunk: két H^+ -fázisú ioncserélőt (Merck Polyspher OA KC [5 mM H_2SO_4 eluens; 25°C kolonnahőmérséklet; 0,4 ml/perc áramlási sebesség]; Bio-Rad Aminex HPX-87 H^+ , az elválasztás paramétereit lásd fentebb), és két Ca^{2+} fázisú ioncserélőt: Sarasep CAR-Ca (víz eluens; 85°C kolonnahőmérséklet; 0,5 ml/perc áramlási sebesség) és Bio-Rad Aminex HPX-87C (az elválasztás paramétereit lásd fentebb).

A különböző körülmények között kapott retenciósidőket a **IV. táblázat** tartalmazza. Látható, hogy minden egyes felsorolt cukorra és poliolra nézve találtunk legalább egy olyan elválasztási protokollt, amely során a kérdéses anyag a galaktitoltól és a szorbóztól elkülönült. Az egyes HPLC-kolonnák számjele a következő:

¹ Merck Polyspher OA KC 300 mm x 7,8 mm

² Bio-Rad Aminex HPX-87 H^+ 300 mm x 7,8 mm

³ Bio-Rad Aminex HPX-87C 300 mm x 7,8 mm

⁴ Sarasep CAR-Ca 300 mm x 7,8 mm.

SZÉNHIDRÁT	KOLONNA	RETENCIÓS IDŐ (perc)
Arabinóz	1	18.37
	4	14.80
Arabitol	4	20.40
Fruktóz	2	12.60
Galaktitol	1	17.52
	2	13.60
Galaktóz	1	12.60
	2	15.82
Glükóz	2	11.60
Glicerol	1	22.50
Mannitol	1	17.09
Mannóz	1	13.20
Ribitol	3	13.76
Ribóz	1	15.20
Sorbitol	1	14.4
Szorbóz	1	15.64
	3	11.2
Tagatóz	1	15.87
	3	15.2
Xilitol	4	25.2
Xilóz	1	16.49
	4	12.8

IV. táblázat. Cukrok és poliolok HPLC-s elválasztásának főbb jellemzői

A foszforilezett cukor származékokat a Merck Polyspher OA KC oszloppal választottuk el, a csúcstól ezúttal is refraktív detektorral érzékeltük. Galaktóz-1-foszfát esetében 25 mM H_2SO_4 eluens, 30°C kolonnahőmérséklet és 0,5 ml/perc áramlási sebesség mellett a retenciós idő 2,05 perc volt. A szorbóz-foszfát meghatározásánál (retenciós idő: 2,5 perc) az elválasztás a körülményei a következők voltak: 25 mM H_2SO_4 eluens, 25°C kolonna hőmérséklet és 0,4 ml/perc áramlási sebesség.

Az intracelluláris koncentrációkat a 2,43 ml intracelluláris hifatérfogat / g száraz tömeg alapján számoltuk (Slayman és Tatum 1964).

3. NMR-vizsgálatok

Az intracelluláris galaktitol és szorbóz kimutatásakor a micéliumot leszűrtük, hideg vízzel mostuk, és hideg 1%-os TCA-oldatba szuszpendáltuk. Centrifugálás után (8,500 x g, 4 °C, 10 perc) a kapott felülúszót liofilizáltuk és a szárazanyagot D_2O -ban feloldottuk. Az NMR-spektrumok felvételét és kiértékelését a DE TTK Kémiai Tanszékcsoportjának DRX 360 MHz-es NMR-laboratóriumában Dr. Bányai István végezte.

A mérésekhez egy QNP-fejjel ($^1\text{H}/^{15}\text{N}/^{13}\text{C}/^{31}\text{P}$) felszerelt spektrométert (Bruker Avance) használtunk. Amikor a ^{13}C NMR spektrumot alacsony mintakonzentráció mellett vettük föl, a DEPT135 technikát alkalmaztuk, melynek során csak a protonált szénatomokat mértük. A kiértékeléshez standard Bruker szoftvert használtunk. Jellemzően pár száz tranzienszt vettünk fel 16 K mennyiségű adatponttal, köztük 5 másodperces késleltetéssel. A kémiai eltolódásokat a készülék belső standardja alapján adtuk meg, de az adott anyag jelenlétét lehetőség szerint standard addíciós módszerrel is ellenőriztük. A ^{31}P spektrumot csatolt és nem csatolt üzemmódban is felvettük., 10 μsec (30 fok) impulzushosszúsággal, 5 másodpercet hagyva a relaxációra. A kiértékelést és az ábrázolást a Bruker cég által forgalmazott WinNMR PC-re írt szoftverrel végeztük.

4. Polarimetriás mérések

A szorbóz optikai forgatóképességének meghatározására a DE TTK Biokémiai Tanszékén, Dr. Gyémánt Gyöngyi laborjában került sor.

A méréseket polariméterrel (Perkin-Elmer), szobahőmérsékleten, vizes oldatban, a nátrium D-vonalán, $\lambda=589$ nm-en végeztük. Referenciák az L- és D-szorbóz oldatok voltak. A minta a polarizált fényt az óramutató járásával ellentétes irányba (-) forgatta el.

5. Az *A. nidulans* laktóz felvételének vizsgálata

A kísérletek során [D-glükóz-1-¹⁴C]laktózt (200 μ Ci/ml = 7,4 MBq/ml; 57 mCi/mmol) használtunk, mely a gyártó által Millipore szűrővel sterilizált, 2 % etanolt tartalmazó vizes oldat formájában állt a rendelkezésünkre. Az izotópos kísérleteket (előírás szerint) a DE TTK Izotópalkalmazási Tanszék erre kijelölt laboratóriumában végeztük, a jelölt anyagot is ott tároltuk -20 °C-on.

A kísérletekhez az átmosósos technikát alkalmaztuk. A szénforrásként 10 g/l glicerolt tartalmazó AMM2 táptalajon 24 órán át növesztett micéliumot 50 ml laktózos (10 g/l végkoncentráció) AMM2 tápoldatba mostunk át, amihez 30 perc elteltével 2 μ l jelzett laktózt adtunk (ezalatt a micélium alkalmazkodott a laktózhoz, felvétele időben lineárisává vált). A laktóz felvétel karbon repressziótól való függését a fenti tenyészetekhez adott 10 g/l 2-deoxi-glükóz (represszálo szénforrás) illetve 10 g/l L-arabinóz (derepresszálo szénforrás) révén vizsgáltuk.

Nulla időpillanatnak a jelölt laktóz tenyészethez adását tekintettük; ezt követően négy órán keresztül 20 percenként 1 ml mintát vettünk. A leszűrt micéliumot 2 ml 200 g/l-es „hideg” laktóz oldattal mostuk, a fenti laktóz oldat 1 ml-ében felszuszpendáltuk, majd 4 ml szcintillációs folyadékkal (Patterson és mtsai 1965) elegyítettük.

A szcintillációs folyadék összetétele: 4 g 2,5-difenil-1,3-oxazol, 37 ml etilén-glikol, 106 ml absz. etanol, 257 ml alkil-fenil-polietilén-glikol 1000 ml-re feltöltve xilollal.

A mintákat folyadék szcintillációs spektrométerrel (Wallack) 100 másodpercen át mértük. Az eredményeket DPM-ben (desintegration per minute = bomlás/perc; 1 Bq = 1 bomlás/másodperc) tüntettük fel, amiket szárazanyag tartalomra vonatkoztattunk. A biomassa értékét 2 x 1 ml tenyészet leszűrése, és a két mérés átlagolása után nyertük.

6. Enzimaktivitások meghatározása

Extracelluláris és sejtfalhoz kötött enzimaktivitás méréseket csak az előkísérletek során végeztünk. Extracelluláris meghatározásnál a lecentrifugált (8,500 x g, 4 °C, 10 perc) majd dializált felülúszót használtuk enzimforrásként. A dialízis Spectra/Por 3 típusú (MWCO 3,500) membránon keresztül történt (4 °C, 24 óra), az aktivitás méréséhez használt pufferrel szemben (2 x 5 l), mely 0,5 mM nátrium-azidot tartalmazott a fertőzések ellen. A sejtfalhoz kötött aktivitások meghatározásakor a sejtet feltártuk (lásd **Anyagok és Módszerek 6. 2. fejezet**), lecentrifugáltuk (8,500 x g, 4 °C, 10 perc), az

„alulúszót” (sejttörmeléket) dializáltuk, majd enzimforrásként használtuk. Az értekezésben szereplő kísérletekben kizárólag intracelluláris enzimaktivitásokat mértünk.

6. 1. Proteáz aktivitás meghatározás

A fiziológiai munkák nem kezdődhetnek el az illető mikroba proteáz aktivitásának vizsgálata nélkül, mivel a levett mintákat illetve enzim-preparátumokat ennek megfelelően kell kezelni, tárolni.

A proteáz meghatározáshoz Rudolph és mtsai (1949) módszerét alkalmaztuk, szubsztrátumként azokazeint használtunk. Az enzimreakció sebességi állandóját a $K = 1/t \times 2,3 \times \log(c_1/c_2)$ egyenlet adja meg, ahol c_1 a kiindulási a c_2 pedig a végső protein koncentrációt jelenti. A reakcióhoz 0,2 M Na_2HPO_4 - 0,1 M citrát puffert (pH = 6,5) alkalmaztunk. 0,1 ml 25 g/l koncentrációjú azokazein oldathoz 0,1 ml mintát adtunk, melyet 37 °C-on 30 percig inkubáltunk. A reakciót 0,8 ml 50 g/l koncentrációjú TCA oldattal állítottuk le. A mintát lecentrifugáltuk (5 perc, 4 °C, 10,000 rpm), majd 1 ml felülúszóhoz 1 ml 0,5 M NaOH-ot adtunk. A fotometrálas $\lambda = 440$ nm-en történt.

Méréseink szerint az *A. nidulans* általunk használt törzsei elhanyagolható proteáz aktivitással rendelkeznek; az érték kb. 5 %-a az *A. chrysogenum* gomba esetében ugyanazon körülmények között mérhetőnek (Sándor és mtsai 1998). Az előkísérletek során 1,5 mM végkoncentrációjú proteázgátlót (fenil-metil-szulfonil-fluorid, PMSF) adtunk a mintákhoz. Az így kapott β -galaktozidáz aktivitási értékek megegyeztek a kezeletlen mintákéval, így a PMSF használatát a továbbiakban mellőztük.

6. 2. Sejtmentes kivonat készítése

Az intracelluláris enzimaktivitás meghatározásának első lépése a sejtfeltárás. Ennek során 25 ml fermentlevet üvegucson, vízsugárszivattyú segítségével leszűrtünk, a micéliumot steril hideg vízzel alaposan átmostuk, az adott enzimaktivitás méréséhez használt puffert 10 ml-ében felszuszpendáltuk, és -80 °C-ra fagyasztottuk. A jégbe fagyott micéliumot egy -20 °C-ra hűtött X-press készülék (AB Biox, Göteborg, Svédország) és a hozzá tartozó hidraulikus prés segítségével törtük fel. A szétroncsolt micéliumot lecentrifugáltuk (8,500 x g, 4 °C, 10 perc), dializáltuk, és a sejtmentes felülúszót használtuk enzimforrásként.

6. 3. A β -galaktozidáz aktivitás meghatározása

A meghatározáshoz 0,5 ml sejtmentes kivonatot 0,3 ml 10 mM-os o-nitrofenil- β -D-galaktopiranozid (ONPG) oldattal és 0,2 ml 0,1 M-os (pH=7,6) foszfát pufferrel elegyítettünk. Az elegyet 30 percig 37 °C-on inkubáltuk, majd a reakciót 2 ml 1 M Na_2CO_3 hozzáadásával leállítottuk. Az abszorbanciát $\lambda = 410$ nm-en olvastuk le, és ahhoz a vakhoz hasonlítottuk, melyben a Na_2CO_3 -ot az ONPG előtt adtuk a reakcióelegyhez (ezáltal a reakció nem játszódott le). Az egységnyi enzimaktivitás (1 U) megfelel 1 μmol o-nitrofenol 1 perc alatt történő felszabadulásának a reakció körülményei között.

6. 4. A galaktokináz aktivitás meghatározása

A D-galaktózt foszforilező galaktokináz aktivitás mérésére korábban csak izotópos (Roberts 1970) illetve komplikált, enzimes (Verhees és mtsai 2002) módszerek léteztek. Munkánk egyik jelentős eredménye egy HPLC-s meghatározáson alapuló, 5 %-os hibán belül ismételhető módszer kidolgozása. Elvi alapja a



reakció végtermékeként keletkező galaktóz-1-foszfát mennyiségi meghatározása, melyet HPLC-vel a korábban leírt módszer szerint detektáltunk. A reakcióelegy 10 mM ATP-t, 20 mM D-galaktózt, 10 mM MgSO_4 -et és 0,7 ml sejtmentes kivonatot tartalmazott, ez utóbbit 0,1 M-os, pH = 7,6-os foszfát pufferben vettük fel. Az *in vitro* reakció 37°C-on játszódott le. Indításként az elegyhez adtuk a D-galaktózt, jellemzően 30 percen át enyhe rázatás mellett inkubáltuk, majd jégre raktuk a kémcsöveket, leállítva ezzel a reakciót. A fehérjét 30 % (v/v) metanollal csaptuk ki. A D-galaktóz-1-P mennyisége lineárisan nőtt az eltelt reakcióidővel 5 és 110 perc között. Az egységnyi galaktokináz aktivitás (1 U) 1 μmol képződött galaktóz-1-foszfát képződésének felel meg 1 perc alatt, 37°C-on.

6. 5. Poliol dehidrogenáz aktivitásának meghatározása

Az aktivitások vizsgálatakor átmosásos kísérleteket végeztünk, a glicerolon előnövesztett micéliumot L-arabitol, galaktitol vagy D-szorbitol tartalmazó táptalajba (10 g/l végkoncentráció) helyeztük. A reakcióelegy 1 ml térfogatában 4 μmol NAD^+ , 100

μmol L-arabitol, galaktitol vagy D-szorbitol, 100 μl enzimforrás 0,1 M glicin pufferben (pH=9,6) volt feloldva. „Rate-assay” eljárással, $\lambda=340$ nm-en, szobahőmérsékleten, 2 percen át követtük nyomon a reakciót. 1 U enzimaktivitás 1 μmol NADH képződésének felel meg, 1 perc alatt a leírt körülmények mellett (Witteveen és mtsai 1989).

6. 6. A „galaktitol dehidrogenáz” reakció termékének vizsgálata

Az oxidációt 15 ml reakcióelegyben vizsgáltuk, ennek összetétele a következő volt: 20 mM galaktitol, 0,7 mM NAD^+ , körülbelül 1 mg dializált sejtmentes fehérjekivonat (enzimforrás), 1 mM MgCl_2 , mindez 0,1 M Tris-HCl (pH = 8,5) pufferben feloldva. A koenzim regenerációja végett 1 μl L-laktát dehidrogenázt (3 U / ml) és 200 mM piruvátot is adtunk a rendszerhez (Huwing és mtsai 1997). Az inkubálás 37°C-on, 100 órán át történt 0,5 mM nátrium-azid jelenlétében. Ezután az elegyet 5 percig forraltuk, a kicsapódott fehérjéket lecentrifugáltuk (25 °C, 20,000 x g, 20 perc). A felülúszót HPLC és NMR analízisnek vetettük alá.

A végtermék (L-szorbóz) azonosítása után ellenőriztük, hogy az enzim fordított irányú (redukció: L-szorbóz + NADH) reakciója galaktitolt eredményez-e. Az *in vitro* kísérletben 1 mg/ml dializált sejtmentes kivonatot, 100 mM L-szorbózt, 10 mM NADH-t, 5 mM MgCl_2 -ot használtunk 0,1 M foszfát pufferben (pH = 6.5). Az oxidáció termékének azonosításához használt analitikai módszereket alkalmaztuk ennél a reakciónál is.

6. 7. A hexokináz aktivitás vizsgálata

Az enzimaktivitás mérést a galaktokináz aktivitáshoz hasonló HPLC-analízissel végeztük (Fekete és mtsai 2002). Az oldat 1 ml-nyi térfogata 50 mM-os foszfát pufferben (pH=7,6) 1 mg dializált sejtmentes kivonatot, 20 mM ATP-t és 40 mM MgCl_2 tartalmazott. A reakció 100 mM L-szorbóz hozzáadásával indult, az inkubálás 37°C-on 24 órán át történt. Ezután a kémcsöveket jégre tettük, a fehérjét 30 % (v/v)-os metanollal kicsaptuk és centrifugálás után (25 °C, 20,000 x g, 20 min) a felülúszót elemeztük.

A hexokináz enzim általi reakció termékét alkalikus foszfáttal emésztettük, hogy meggyőződjünk, valóban L-szorbóz-foszfát keletkezett. 180 μl reakcióelegyhez 20 μl (20 U/ ml) alkalikus foszfatázt adtunk, melyet 1 ml-re egészítettünk ki az enzim pufferével (1 mM Tris-HCl, pH=8,0, 100 μM MgCl_2 , 10 μM ZnCl_2 , 5 mM KCl és 5 % (w/v) glicerol).

90 perc eltelte után HPLC-vel vizsgáltuk az L-szorbóz-foszfát, az L-szorbóz és a foszfát koncentrációjának változását (Fekete és mtsai 2004).

6. 8. Az aldóz reduktáz aktivitás meghatározása

Az aktivitás mérést 25 °C-on „rate-assay” eljárással végeztük, mely során a reakcióelegyben lévő 0,2 mM NADPH koncentrációjának csökkenését követtük nyomon 1 percen át, $\lambda=340$ nm hullámhosszon. A mérés kezdetét a 100 mM D-galaktóz, L-arabinóz vagy D-xilóz hozzáadása jelentette a 0,1 M foszfát pufferben feloldott 100 μ l/ml enzimforráshoz. 1 μ mól NADPH fogyása a fenti körülmények között 1 U aldóz reduktáz aktivitásnak felel meg (Witteveen és mtsai 1989).

7. A fehérjetartalom meghatározása

Az enzimaktivitási adatok specifikussá tételéhez az értékeket összfehérje tartalomra vonatkoztattuk; ehhez a minták fehérje koncentrációját módosított Lowry-féle módszerrel (Peterson 1983) határoztuk meg, Bovin Serum Albumint (BSA) használva a kalibrációhoz. A frissen készített „A reagens” 1 térfogatnyi I. oldatot (100 g/l NaCO₃, 1 g/l CuSO₄ x 5 H₂O, 2 g/l Na-tartarát) 2 térfogatnyi 50 g/l SDS-oldatot és 1 térfogatnyi 0,8 M-os NaOH-oldatot tartalmazott. A „B reagens” 2 N „Folin & Ciocalteu’s phenol reagent” és víz 1 : 5 arányú elegye. Az 5-100 μ g fehérje /ml koncentrációra hígított minták 1 ml-éhez 1 ml „A reagenst” adtunk, 10 percig 25 °C-on inkubáltuk, majd a színreakció létrejöttéhez szükséges 0,5 ml „B reagens”-t hozzápipettáztuk az elegyhez. Szobahőmérsékleten 30 perc eltelte után $\lambda=750$ nm-en fotometráltuk az oldatokat.

V. Kettős mutánsok előállítása

Munkánk során szükségessé vált három kettős *A. nidulans* mutáns (*galE/galD* = EFES1; *galE/frA1* = EFES3; *galE/araA1* = EFES4) fenotípus-elemzése. Mivel ilyen mutánsok az általunk ismert törzsgyűjteményekből nem szerezhetők be, mi hoztuk létre őket. A törzsek keresztezéséhez és az utódok elkülönítéséhez Pontecorvo és mtsai (1953) klasszikus módszerét alkalmaztuk. Az EFES1 az A214 és A466, az EFES3 az A214 és G092, az EFES4 pedig az EFES2 és G094 törzsek keresztezéséből származik. Az EFES4 megalkotásához előbb egy „technikai” mutáns (EFES2) létrehozása volt szükséges, mely az R21 és A214 keresztezésből jött létre.

A két keresztezni kívánt törzs 1 csepp komplex táptalajjal (30 g/l malátakivonat) elegyített, összekevert spóraszuszpenzióját (10^7 - 10^7 db / ml) 20 g/l agarral szilárdított glükóz (10 g/l) AMM táptalajra csepegtettük, majd oltókaccsal homogenizáltuk és sugárirányban széthúztuk az agarlemezek felszínén. A táptalaj az egyedi markereket nem tartalmazta, komplementációra készítve ezáltal a sejteket. Száradás után a Petri-csészéket 37 °C-on 24 órán keresztül inkubáltuk. Ezt követően cellulóz alapú ragasztószalaggal (cellux) a Petri-csészéket szorosan körbetekertük, ezáltal erősen limitáltuk ugyan az oxigén ellátást, de teljesen nem gátoltuk meg. Az oxigén hiányos körülmények ugyanis kedveznek a hibrid kleisztotéciumok kialakulásának. 11-14 napos inkubáció után a legnagyobb (szabad szemmel is látható) kleisztotéciumokat összegyűjtöttük, és sztereomikroszkóp alatt egyesével 3 %-os víz-agar felszínen hengergetve megtisztítottuk őket a szülői spóráktól. Ezután 1 db kleisztotéciumot 700 µl spóramosó oldatba (8 g/l NaCl és 0,5 g/l Tween-80) raktunk, és túvel feltörtük a falát. A kiszabaduló askospórák vörös színűek, ezt optimális esetben szabad szemmel is látni lehet.

Az askospóra oldatból 10-15 µl-t egy olyan glükóz tartalmú AMM táptalajra szélesztettünk, amely az összes szülői auxotróf markert tartalmazta. Mivel a szülői törzsek eltérő színűek voltak (ez a keresztezés egyik peremfeltétele, a másik az eltérő auxotrófia), a rekombináció megtörténtének bizonyítéka az egy szélesztés során megjelenő többféle színű telep (lásd **2. oldal** színes fényképek). Ezt követően minden egyes hibrid kleisztotéciumból megjelenő telepet spóraanalízisnek vetettünk alá (kb. 200 telep). Ennek élettani alapja minden keresztezésnél értelemszerűen más. Az EFES1 (*galE/galD*) kettős mutáns esetében a *galE* szülői törzs növekedni képes D-galaktóz és ammónia tartalmú minimál táptalajon, míg galaktóz és nitráton nem, ezzel szemben a *galD* szülői mutáns D-galaktózon semmiféle körülmények között nem nő. Az EFES1 mutáns tehát nem nő D-galaktózon, a galaktokináz reakció pedig negatív eredményt ad. Az EFES3 (*frA1/galE*) kettős mutáns az *frA1* szülői mutáció miatt semmilyen körülmények között nem nő D-fruktózon, míg a *galE* mutáció miatt csak ammónium ionok jelenlétében nő D-galaktózon. Az EFES4 (*araA1/galE*) kettős mutáns az *araA1* háttér miatt nitrogénforrástól függetlenül nem tudja a galaktitolt hasznosítani, a *galE* mutáció pedig a fenn leírt fenotípust okozza. Ezen egyszerű tesztek lehetővé tették a kettős mutánsok elkülönítését a szülői törzsektől.

Utolsó lépésként definiáltuk az új mutáns auxotrófiáit, vagyis szilárd, glükóz-AMM táptalajon, növekedési teszt révén szisztematikusan megvizsgáltuk a szülői markerek meglétét illetve hiányát. Ennek eredményét a **II. táblázat** tartalmazza (lásd 17. oldal).

VI. Reprodukálhatóság

Az összes bemutatott számszerű adat 3-8 független kísérlet átlagaként született. A növekedés mérésénél minden adatpont két kísérleten belüli mintavétel átlagaként született, ehhez járult a kísérlet ismételése. Kemosztát típusú folyamatos fermentációknál az egyensúly beállta után öt alkalommal vettünk mintát a tenyészetből, magát a fermentációt azonban - ugyanazon a növekedési rátán - nem ismételtük meg. Az adatokat Sigmaplot (Jandel Scientific Inc.) szoftverrel elemeztük és számszerűsítettük, és minden kísérlet-sorozaton belül standard eltéréseket (SD) számoltunk. Ezek értékei a növekedés meghatározásakor is alulmúlták az átlagok 14 %-át, az enzimaktivitások mérésénél 7-10 % között mozogtak, míg a kromatográfiás és izotópos méréseknél 5 % alatt maradtak. A grafikonoknál az egyes mérési pontokhoz tartozó hibahatárokat (az áttekinthetőség kedvéért) nem mutatjuk. Az indukciós kísérleteknél a változások szignifikancia-vizsgálatát a nem-indukált adatokhoz képest Student-féle *t*-teszttel végeztük; a probabilitás (*p*) adatait a szövegben adjuk meg.

VII. Felhasznált vegyszerek

Munkánk során mindvégig analitikai tisztaságú vegyszereket használtunk, még a táptalaj komponensek esetében is. A finomvegyszerek túlnyomó többségét a Sigma-tól rendeltük (Sigma-Aldrich Kft., Budapest). Kivételt képez az alkalikus foszfatáz és puffere (Promega Ltd.), a ¹⁴C laktóz (Amersham Pharmacia Biotech UK Ltd.), és a D₂O (Merck).

VIII. Kutatási költségek finanszírozása

Munkánkat két OTKA (F 031985 és F 042602), egy FKFP (0009/2001), valamint két Osztrák-Magyar Kormányközi Kutatási Együttműködési Pályázat (A-20/98 és A-26/2000) segítette. Nagy segítséget jelentett a DE OEC ÁOK „Mikrobiológia és Farmakológia” doktori program nappali tagozatos doktori ösztöndíjasoknak biztosított éves kutatási támogatása is.

EREDMÉNYEK

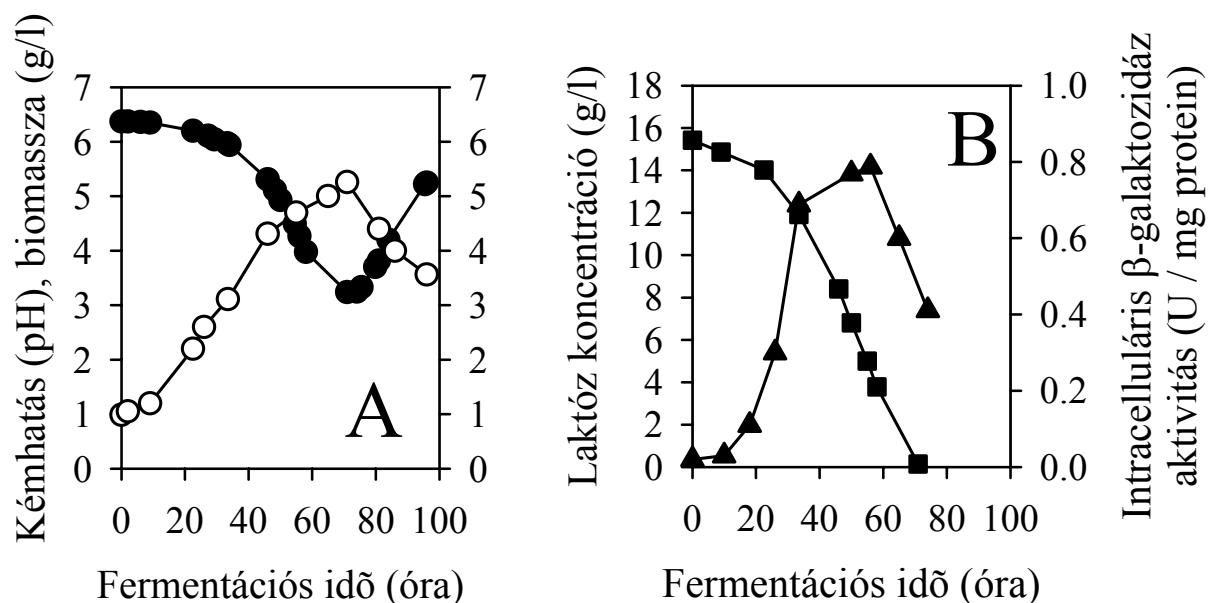
I. Laktóz hidrolízis az *A. nidulans*-ban: sejten belül, avagy sejten kívül történik?

Munkánk első lépéseként azt kívántuk tisztázni, hogy a **2. ábrán** bemutatott általános laktóz anyagcsere melyik típusa valósul meg az *A. nidulans*-ban. Három lehetőség létezik: (a) a laktózt egy specifikus transzporter veszi föl és az intracelluláris β -galaktozidáz révén sejten belül hidrolizálódik, (b) a laktóz az extracelluláris β -galaktozidáz aktivitás miatt sejten kívül hidrolizálódik D-galaktozra és D-glükózra, és (c) a kétféle lebontási út párhuzamosan van jelen a törzsben.

A vad típusú *A. nidulans* viszonylag jól nőtt laktózon (**3. A ábra**), 15 g/l koncentrációban adva kb. 70 óra alatt fogyott el (**3. B ábra**). Szilárd laktózos AMM2 táptalajon kb. 3 nap kellett a teljes életciklus konídiospóra képzéssel záruló befutásáig. Nyilvánvaló tehát, hogy az *A. nidulans* hasznosítani tudja a laktózt.

Extracelluláris vagy sejtfalhoz kötött β -galaktozidáz aktivitást a növekedés egyetlen fázisában sem tudtunk kimutatni, ellenben az intracelluláris aktivitás csaknem végig jelen volt (**3. B ábra**). Ezt alátámasztandó *in silico* vizsgálatot végeztünk, melynek során a *K. lactis* élesztőnek az Entrez-adatbázisból (www.ncbi.nlm.nih.gov) letöltött β -galaktozidáz szekvenciájával a *N. crassa* egyik nyilvános adatbázisában (www-genome.wi.mit.edu) BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) keresést végeztünk, és a legjobban hasonlító két szekvenciát kiválasztottuk (a két szekvencia gyakorlatilag azonos volt). Az eljárás alapja azon irodalomból ismert tény volt, hogy a gombák β -galaktozidáz génsekvenciái hasonlóak. A kettős szűrőn átesett szekvenciákat a Cereon adatbázisba (Monsato Company, St. Louis, MO, USA – itt 16144 contigs formájában csaknem a teljes *A. nidulans* genom jelen van) BLAST-oltuk. Két magas homológiájú *A. nidulans* β -galaktozidáz szekvenciát találtunk, melyeket nem-fajspecifikus Entrez-BLAST során ellenőriztünk. Az egyik 1309 bp hosszúságú szekvencia gyakorlatilag azonos a *K. lactis* – *N. crassa* β -galaktozidázzal, míg a másik valamivel kisebb hasonlóságot mutat ezekhez, 1554 bp hosszú, és prokarióták (*Thermotoga neapolitana*, *Caldicellulosiruptor lactoaceticus*, *Arthrobacter sp.*) β -galaktozidáz génjével homológ erőteljesen. Mivel mindkét szekvencia tartalmaz START és STOP kodont is, Open Reading Frame (ORF)-ként definiáltuk őket. Intronok (a PCGENE program alapján) egyikükben sincsenek. A nyilvántartott fonalas

gomba szignál-szekvenciák egyike sem található meg bennük, ami megerősíti, az *A. nidulans* valóban csak intracelluláris β -galaktozidáz aktivitással rendelkezik.



3. ábra. Laktóz-AMM2 táptalajon nőtt vad típusú *A. nidulans* időprofiljai

Szimbólumok: kémhatás (pH) (●) és növekedés (biomassza, DCW) (○); laktóz koncentráció (■) és intracelluláris β -galaktozidáz aktivitás (▲)

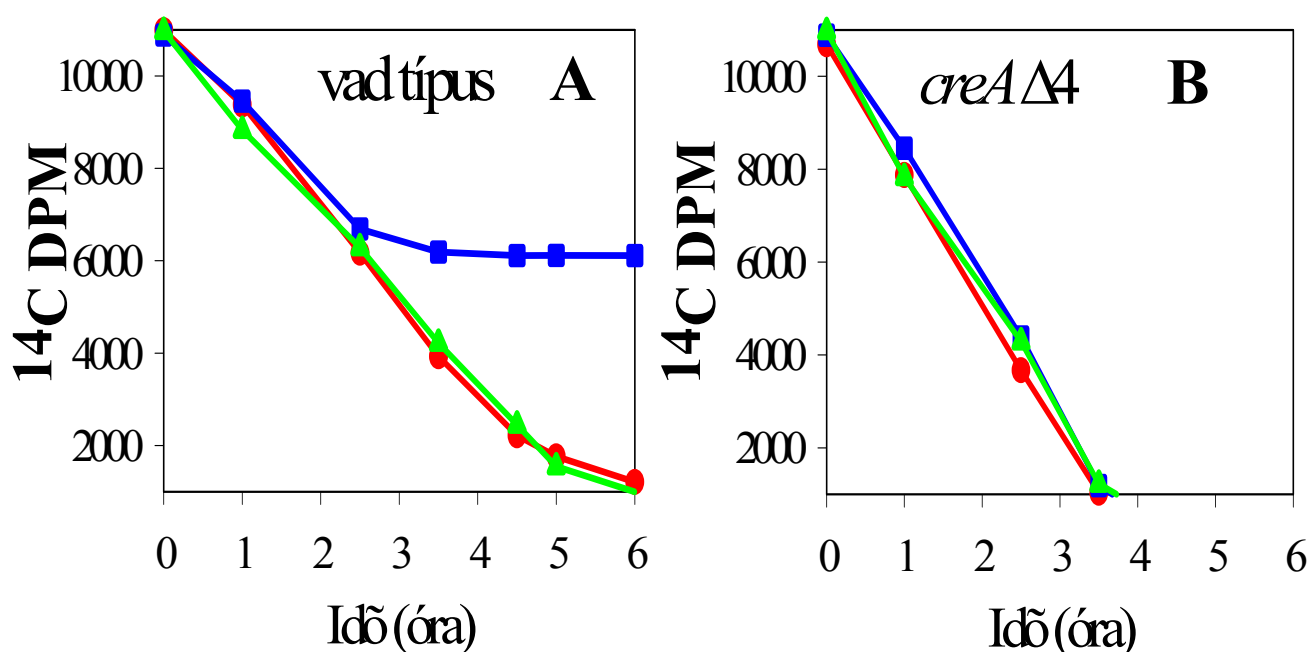
II. A laktóz felvétel szabályozása *A. nidulans*-ban

Laktóz-AMM2 minimál táptalajon növekvő vad típusú *A. nidulans* tenyészetéhez az eredeti laktózmennyiség kb. egyharmadának elfogyása után, az exponenciális fázisban 10 g/l D-glükózt adtunk. Az eredmény a laktóz felvétel leállása, és a glükóz felvétel azonnali megindulása volt. A laktózfelvétel csak a glükóz 95 %-nak elfogyása után indult meg újra. Az elmondottakat az **5. ábra (Eredmények fejezet III. 1. pont)** szemlélteti.

A jelenséget többféle módon magyarázhattuk: (a) a D-glükóz gátlószere a laktóz permeáznak, (b) a D-glükóz szubsztrátuma a laktóz permeáznak és verseng vele a kötőhelyért, (c) a laktóz permeáz karbon katabolit szabályozás alatt áll.

A kérdés megválaszolásához a jóval pontosabb mérést lehetővé tevő izotópos technikával vizsgáltuk tovább a laktóz felvételt (**4. A ábra**). Mint látható, 2-deoxi-D-glükóz (karbon repressziót kiváltó, de nem metabolizálódó szénforrás) tenyészetéhez adása után a laktóz felvétele kb. 3 óra alatt szűnt meg teljesen, ami jelzi, nem inhibíció (ez azonnali gátlást eredményezne), hanem a *creA* gén transzkripcióját (és ezáltal időt) igénylő karbon katabolit szabályozás történik. A derepresszálo L-arabinóz tenyészetéhez adásakor a laktóz felvétel változatlanul ment tovább.

A következőkben a kísérleteket a karbon katabolit derepresszált *A. nidulans creAΔ4* nullmutánssal ismételtük meg. A laktóz felvétel sebessége egyáltalán nem csökkent a



4. ábra. *A. nidulans* vad típus (A) és *creA* Δ4 nullmutáns (B) laktóz felvétele 2-deoxi-D-glükóz és L-arabinóz jelenlétében. **Kontroll**

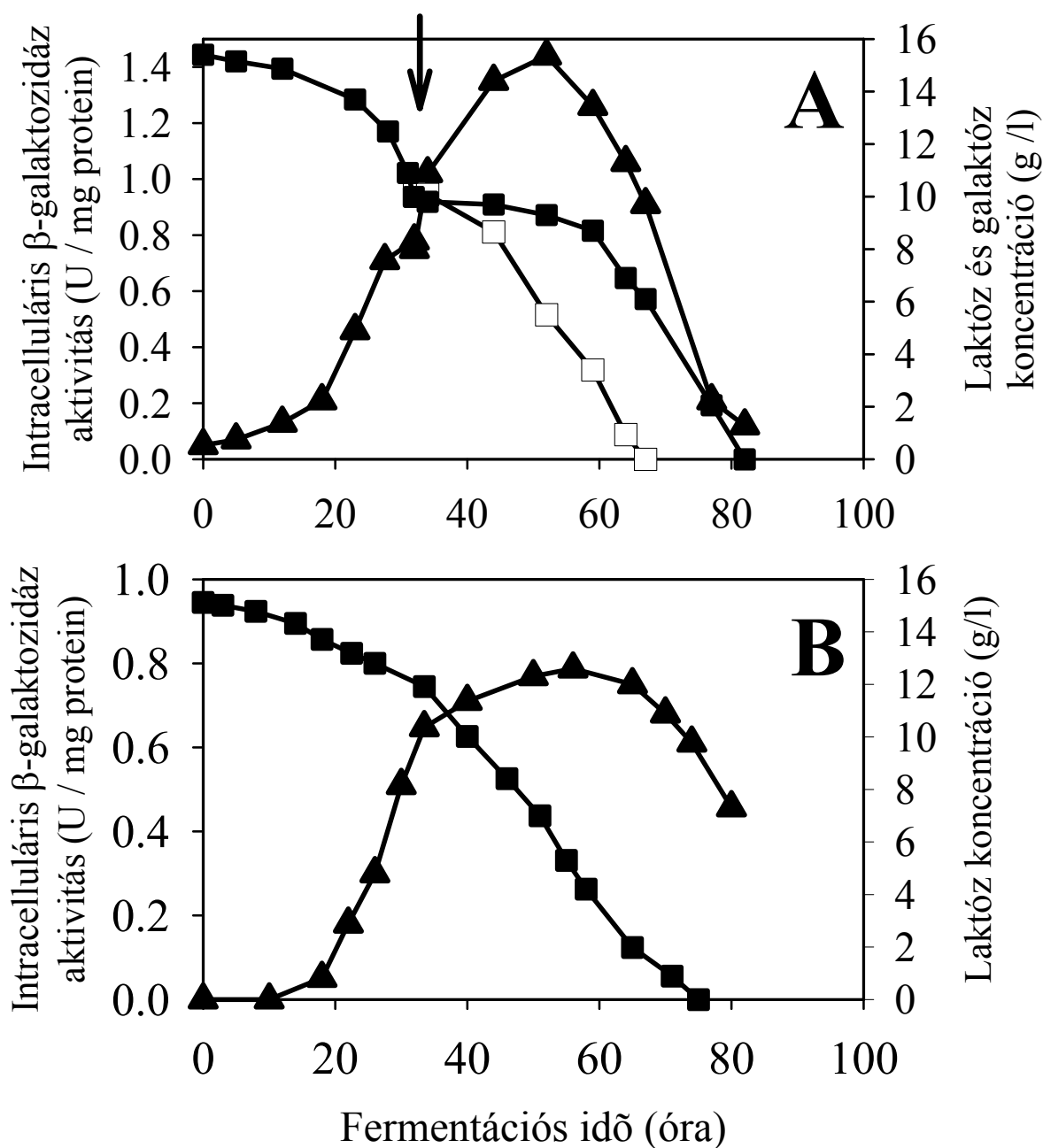
represszálo 2-deoxi-D-glükóz jelenléte miatt (4. B ábra). Mivel a *creA* mutáns a laktóz anyagcsere szempontjából vad típusként viselkedik (kizárólag intracelluláris β-galaktozidáz aktivitás, a vad típushoz hasonló növekedési ráta laktózon), megállapítottuk, hogy a laktóz felvétele *A. nidulans*-ban CreA-függő karbon represszió alatt áll. Ezt igazolták a *creA*^{d30} mutánssal végzett izotópos mérések is.

III. A β-galaktozidáz enzim szabályozása *A. nidulans*-ban

III.1. Növekedés laktózon és az aktivitás repressziója glükózzal

A vad típusú *A. nidulans* glükózon, glicerolon vagy acetáton nőve nem mutatott intracelluláris β-galaktozidáz aktivitást, laktózon és galaktózon azonban a növekedés minden fázisában mérhető volt. Érdekes módon a fenti szénforrások közül nem a „tankönyvi” szubsztrátumnak számító laktózon, hanem D-galaktózon keletkeztek a legmagasabb aktivitási értékek. Az aktivitás időfüggése párhuzamos volt a növekedéssel és a laktózfelvétellel, a szénforrás elfogyása után pedig az enzim képződése megszűnt. A 3. A és B ábrák-hoz hasonló időprofilú, egymással megegyező eredmények születtek pH-

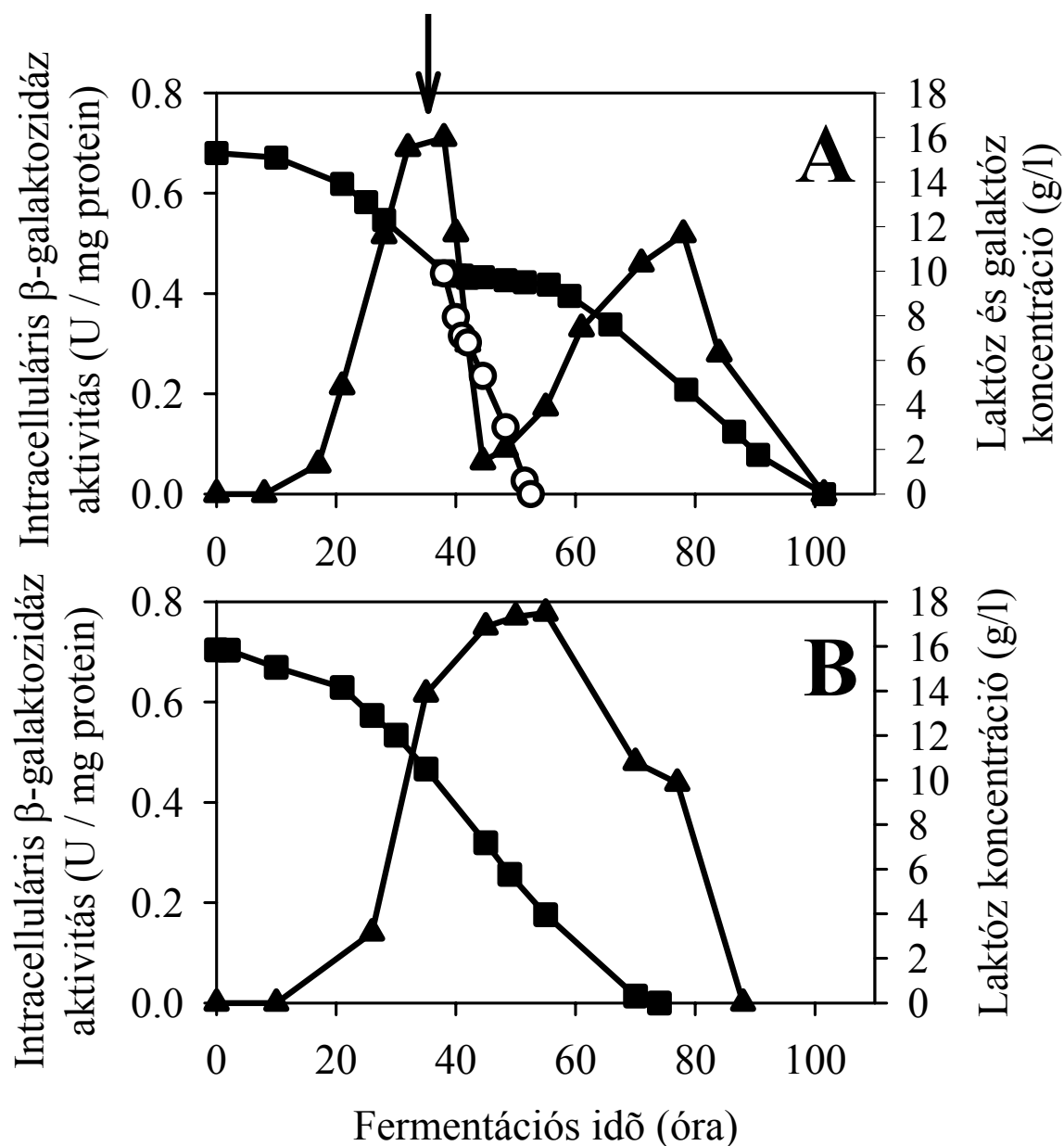
szabályzott (pH = 6,5) és nem szabályzott körülmények között, amikor a kémhatás a növekedési fázis végére pH = 3,5-ig esett vissza. A laktózon nőtt micélium β -galaktozidáz aktivitását fokozni lehetett D-galaktóz ráadagolással (10 g/l), ami szintén azt mutatta, hogy az enzim képződése nem maximális laktózon (5. ábra).



5. ábra. A: Vad típusú *A. nidulans* intracelluláris β -galaktozidáz aktivitásának időprofilja laktóz-AMM2 táptalajon, galaktóz ráadagolás során. A nyíl a galaktóz adagolás időpontját mutatja. **B:** kontroll tenyészet (galaktóz adagolás nem történt).

Szimbólumok: laktóz koncentráció (■), D-galaktóz koncentráció (□), intracelluláris β -galaktozidáz aktivitás (▲)

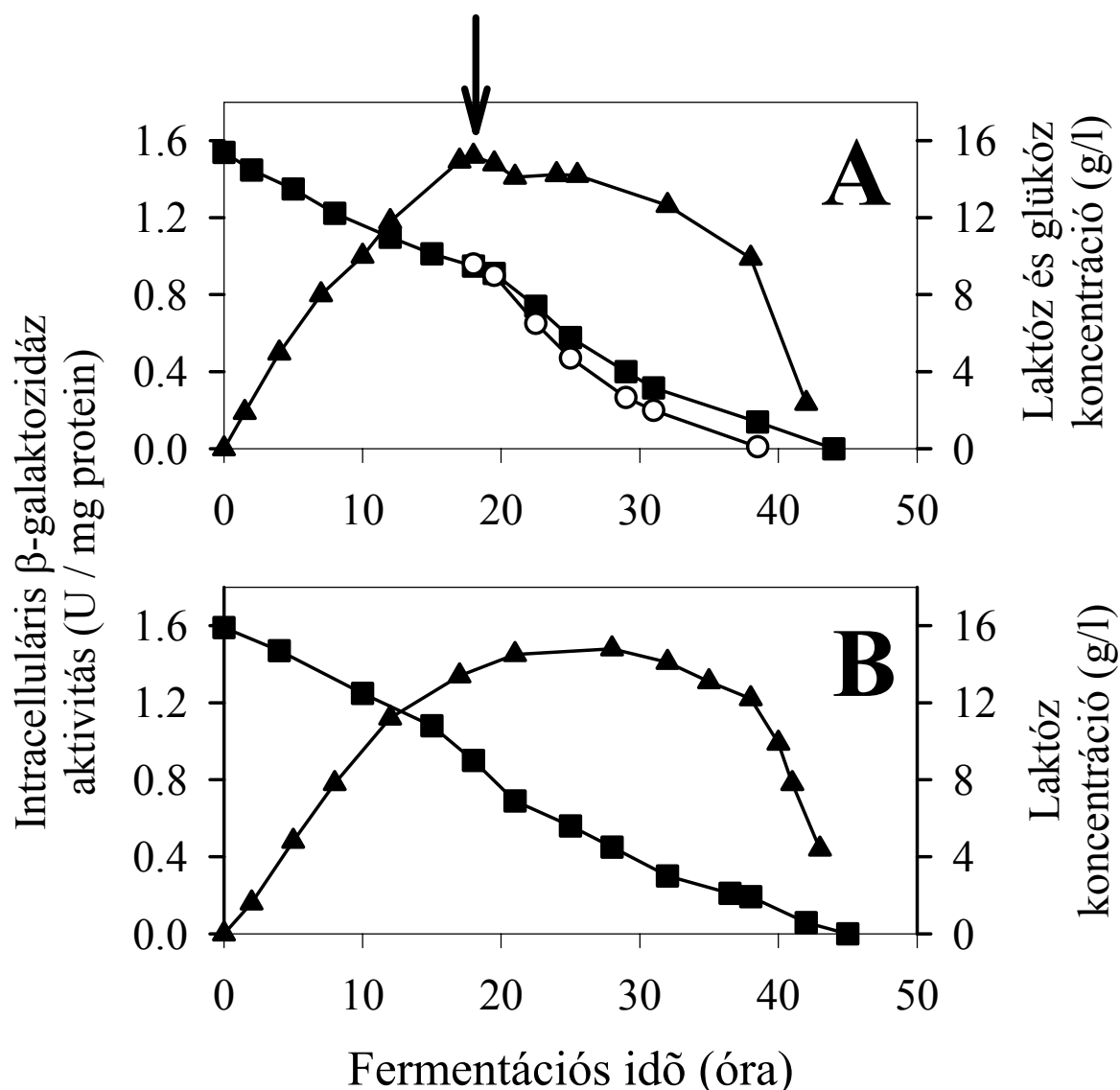
A β -galaktozidáz aktivitás hiánya glükózon, glicerolon és acetáton, valamint jelenléte laktózon és galaktózon azt sugallta, hogy ennek az enzimnek a bioszintézise is karbon szabályozás alatt áll. D-glükóz hozzáadására a laktózon nőtt tenyészetekben a β -galaktozidáz aktivitás szintje azonnal csökkenni kezdett, és pár órán belül az aktivitás mérhetősége teljesen megszűnt. A glükóz kétharmadának elfogyása után a β -galaktozidáz aktivitás újra megjelent (6. ábra), és csaknem az eredeti értékig emelkedett.



6. ábra. A: Vad típusú *A. nidulans* intracelluláris β -galaktozidáz aktivitásának időprofilja laktóz-AMM2 táptalajon, D-glükóz ráadagolás során. A nyíl a D-glükóz adagolás időpontját mutatja. **B:** kontroll tenyészet (D-glükóz adagolás nélkül)

Szimbólumok: laktóz koncentráció (■), glükóz koncentráció (○), intracelluláris β -galaktozidáz aktivitás (▲)

A **6. ábrán** szemléltetett kísérlet azt mutatta, hogy a glükóz gátolja a β -galaktozidáz aktivitás megjelenését, de – hasonlóan a laktóz permeáz szabályozásához – ez alapján még nem dönthető el, hogy az induktor (a laktóz) felvételének gátlása (inhibíció), vagy pedig valódi karbon katabolit represszió (a transzkripció gátlása) van-e a jelenség hátterében. A karbon katabolit represszióért felelős *creA* gén feltételezett szerepének tanulmányozása céljából ismét a *creA*-hiányos *A. nidulans* $\Delta 4$ nullmutáns törzset használtuk. A glükóz ráadagolásos kísérletet ezzel a törzsszel megismételve a β -galaktozidáz aktivitás szintje változatlan maradt, de ez a laktóz folyamatos felvételével is magyarázható volt (**7. ábra**).



7. ábra. A: *A. nidulans creAΔ4* mutáns intracelluláris β -galaktozidáz aktivitásának időprofilja laktóz-AMM2 táptalajon, D-glükóz ráadagolás során. A nyíl a D-glükóz adagolás időpontját mutatja. **B:** kontroll tenyészet (D-glükóz adagolás nélkül)

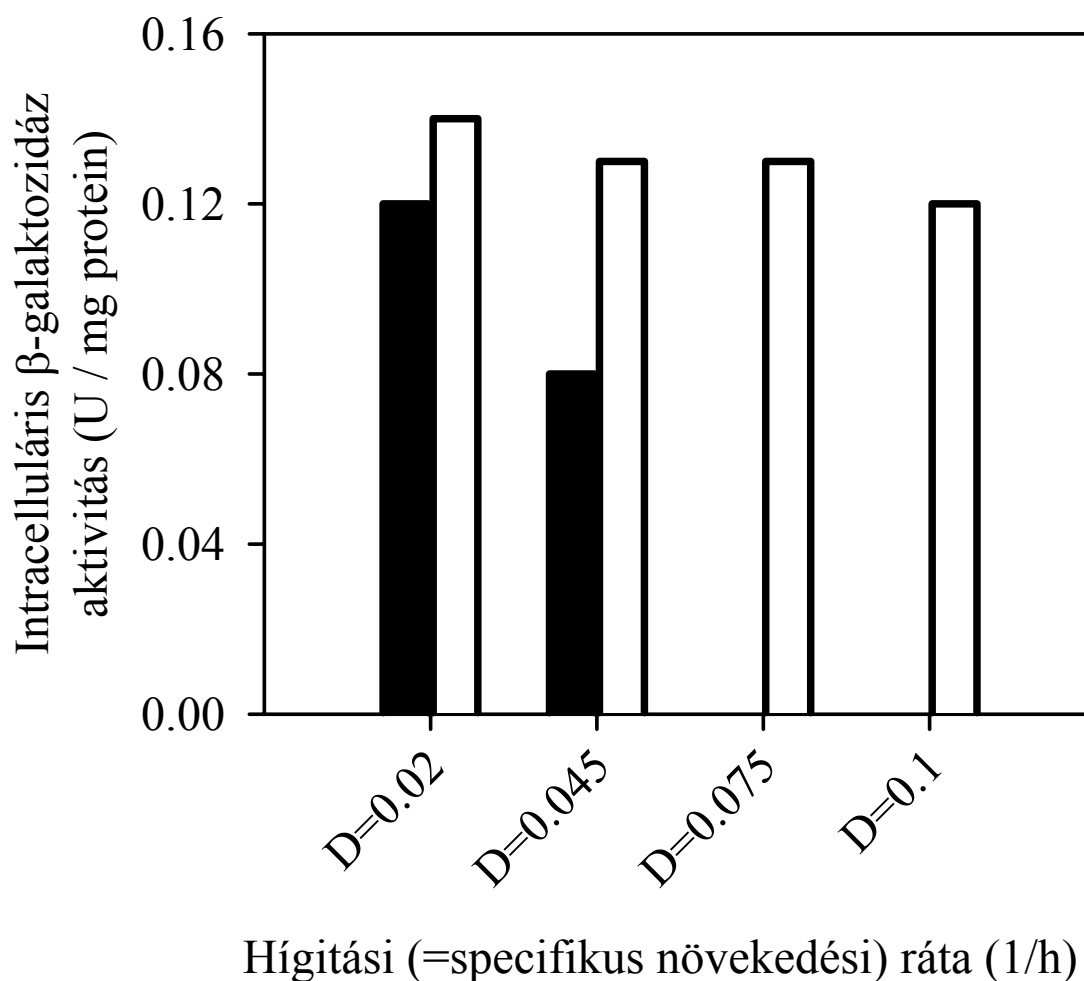
Szimbólumok: laktóz koncentráció (■), glükóz koncentráció (○), intracelluláris β -galaktozidáz aktivitás (▲)

Annak eldöntésére, hogy a β -galaktozidáz aktivitás önmagában is CreA-függő karbon katabolit represszió alatt áll-e, a $\Delta 4$ mutáns, valamint a csonkolt *creA* mRNS-t létrehozó *creA^{d30}* mutáns törzsek β -galaktozidáz aktivitás szintjét vizsgáltuk meg glükózon és glicerinen. Mindkét törzs a laktózon mérhető érték alig 17 %-át kitevő, de azért reprodukálhatóan mérhető aktivitással ($0,12 \pm 0,01$ U / mg protein) rendelkezett.

A β -galaktozidáz aktivitás glükóz repressziótól való függését kemosztát típusú folytonos tenyészetben vizsgáltuk tovább. Ennek magyarázata, hogy az alacsony specifikus növekedési ráta represszáló szénforráson is karbon katabolit derepressziót okoz (Szentirmai A., személyes közlés). A táptalaj komponensek koncentrációját úgy állítottuk be, hogy a növekedést a szénforrás (glükóz) limitálja. Egyensúlyi körülmények között a specifikus növekedési ráta egyenlő volt az általunk beállított hígítási rátával. Négy különböző hígítási rátájú tenyészetet vizsgáltunk, az értékek a sülyesztett szakaszos tenyésztés különböző növekedési fázisait igyekeztek átfogni. A tenyészetek egyensúlyi biomassza koncentrációja mindegyik hígítási ráta mellett ugyanakkora ($1,3 \pm 0,1$ g/l) volt, ami egyértelműen mutatta: a növekedés nem volt oxigén limitált (mivel a specifikus légzés a növekedési ráta függvénye, oxigén limitáció esetén a hígítási ráta növelésével az egyensúlyi biomassza koncentráció csökken; Pirt 1975).

A vad típusú *A. nidulans* tenyészetből a magas növekedési rátákon ($D=0,01$ 1/h, $D=0,075$ 1/h) nem tudtunk β -galaktozidáz aktivitást mérni, azonban $D=0,045$ 1/h értéknél az aktivitás megjelent, a legalacsonyabb növekedési rátán ($D=0,02$ 1/h) pedig ugyanazt az értéket mértük, amit a *creA $\Delta 4$* és *creA^{d30}* mutánsoknál szakaszos tenyészetben glicerolon vagy glükózon ($0,12 \pm 0,01$ U / mg protein; **8. ábra**).

A folytonos fermentációkat az *A. nidulans creA $\Delta 4$* nullmutánssal megismételve minden hígítási ráta értéken mérési hibán belül ugyanazt az aktivitási értéket kaptuk, amit szakaszos tenyészetben glükózon vagy glicerolon, a vad típusnál pedig alacsony hígítási rátájú kemosztátban, glükózon (**8. ábra**). Az eredmények alátámasztják a β -galaktozidáz enzim glükóz általi szabályozásáról elmondottakat, és világosan mutatják, hogy bár a β -galaktozidáz aktivitás egy része CreA-függő represszió alatt áll, a túlnyomó része indukció útján alakul ki. A továbbiakban ezért az indukciós folyamatot tanulmányoztuk.



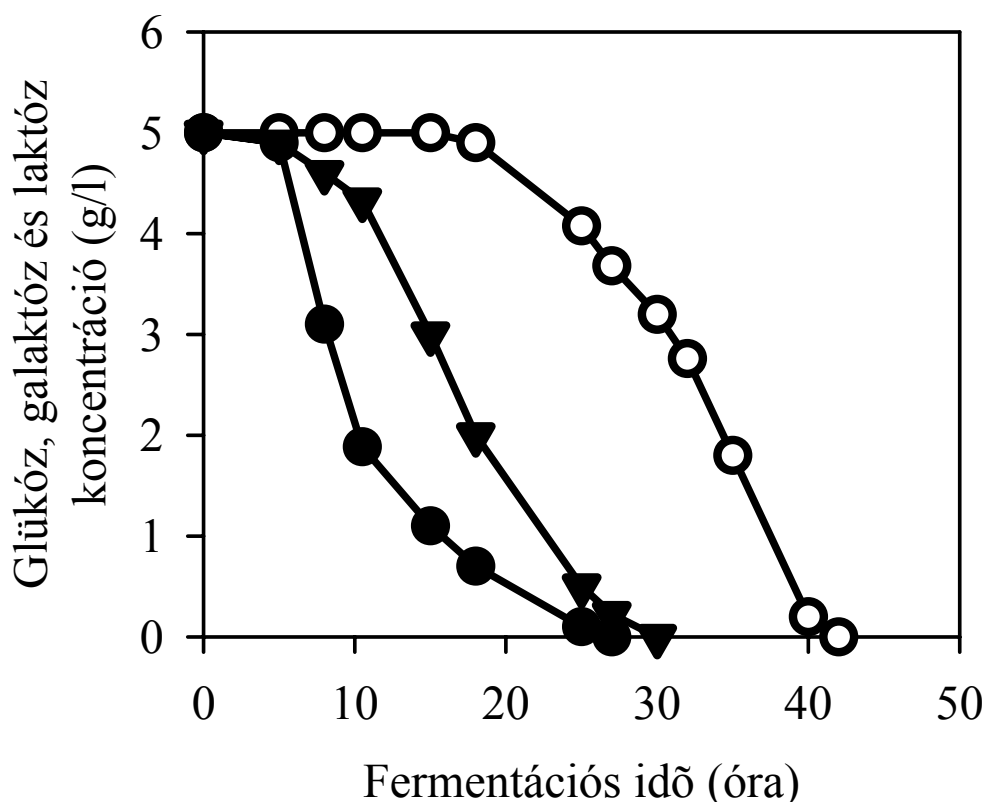
8. ábra. *A. nidulans* vad típus (fekete oszlop) és *creA*Δ4 mutáns (fehér oszlop) β-galaktozidáz aktivitásának változása a specifikus növekedési ráta függvényében, AMM2 glükóz-limitált kemosztát tenyészetben

III. 2. A β-galaktozidáz aktivitás indukciója

Az indukció folyamatát mosott sejtes tenyészetek révén tanulmányoztuk, ahol a friss táptalaj az inducer különböző koncentrációit tartalmazta. A D-galaktóz ilyen körülmények között is a β-galaktozidáz laktóznál hatékonyabb induktorának bizonyult, a legmagasabb enzimaktivitási érték a vad típusban 1,01 U / mg protein volt, amit 8 mM-nál magasabb koncentrációnál tudott kifejteni. A *creA*Δ4 nullmutáns törzsben ennél szignifikánsan ($p < 0,1 \%$) magasabb ($1,72 \pm 0,13$ U/mg protein) maximális indukciót mértünk D-galaktóz hatására, és hasonlóan ($1,61 \pm 0,11$ U/mg protein) magas értékeket kaptunk a *creA*Δ30 mutáns törzsben is. Ez annak volt köszönhető, hogy az indukció nem

ért el telítési értéket 8 mM inducer koncentrációjánál (mint tette azt a vad típusnál), hanem tovább nőtt a D-galaktóz koncentráció emelésével, egészen 11 mM-os értékig.

A CreA-nak tehát a D-galaktóz általi indukció folyamatára is részlegesen gátló hatása van. Ezt alátámasztandó, a vad típus β -galaktozidáz aktivitását glükóz és galaktóz együttes jelenlétében próbáltuk meg indukálni. A glükóz semmilyen koncentráció-arány mellett nem gátolta a galaktóz felvételét (5-5 g/l koncentrációk esetén a fogyásgörbék a **9. ábra** szerint alakultak), ami azt sugallta, hogy a két hexóz valóban a **2. ábrán** bemutatott önálló, egymástól független transzporterek révén jut be a sejtbe. Az indukált β -galaktozidáz aktivitás szintjét viszont kb. 30 %-al csökkentette a glükóz (**V. táblázat**), aláhúзва fenti megállapításunkat a galaktóz-indukció glükóz általi részleges gátlásáról. Ez a hatás a CreA-n keresztül érvényesül, ugyanis a karbon derepresszált mutáns törzseknél a β -galaktozidáz D-galaktóz általi indukcióját a glükóz semmilyen koncentrációban nem befolyásolta (**V. táblázat**).



9. ábra. Vad típusú *A. nidulans* tenyészet laktóz (○), galaktóz (▼) és glükóz (●) fogyása 5-5 g/l koncentrációk mellett

Néhány fonalas gomba (*A. niger*, *P. canescens*) esetében leírták (Nikolaev és Vinetski 1998, De Vries és mtsai 1999a), hogy a β -galaktozidáz enzim képződését indukálni lehet L-arabinózzal és más hemicellulóz monomerekkel. Kísérleteink szerint ez a helyzet az *A. nidulans* esetében is, mivel az L-arabinóz és a D-xilóz egyaránt indukálja a β -galaktozidáz képződését. A fonalas gombákban természetes körülmények között nem fordul elő D-arabinóz, így nem meglepő, hogy ez az izomer hatástalan volt. Érdekes módon az L-arabinóz még a D-galaktóznál is hatékonyabb inducernek bizonyult. Mind a D-xilóz, mind az L-arabinóz által kiváltott β -galaktozidáz indukció szignifikánsan ($p < 0,1\%$) magasabb értékeket eredményezett a *creA*-hiányos mutáns törzsben (**V. táblázat**), vagyis CreA nemcsak a D-galaktóz, hanem a pentózok általi indukciót is gátolta.

	Vad típus		CreA $\Delta 4$	
	$\frac{K_{\max}}{K_m}$	$V_{\max}$	$\frac{K_{\max}}{K_m}$	$V_{\max}$
D-galaktóz	8,33	1.01	11,1	1,72
	0,55		0,69	
glükóz + galaktóz	-	0,70	-	1,71
	-		-	
L-arabinóz	13,3	1.02	6,67	2,17
	0,8		0,41	
D-xilóz	6,67	0.28	6,67	0,41
	2,67		0,67	

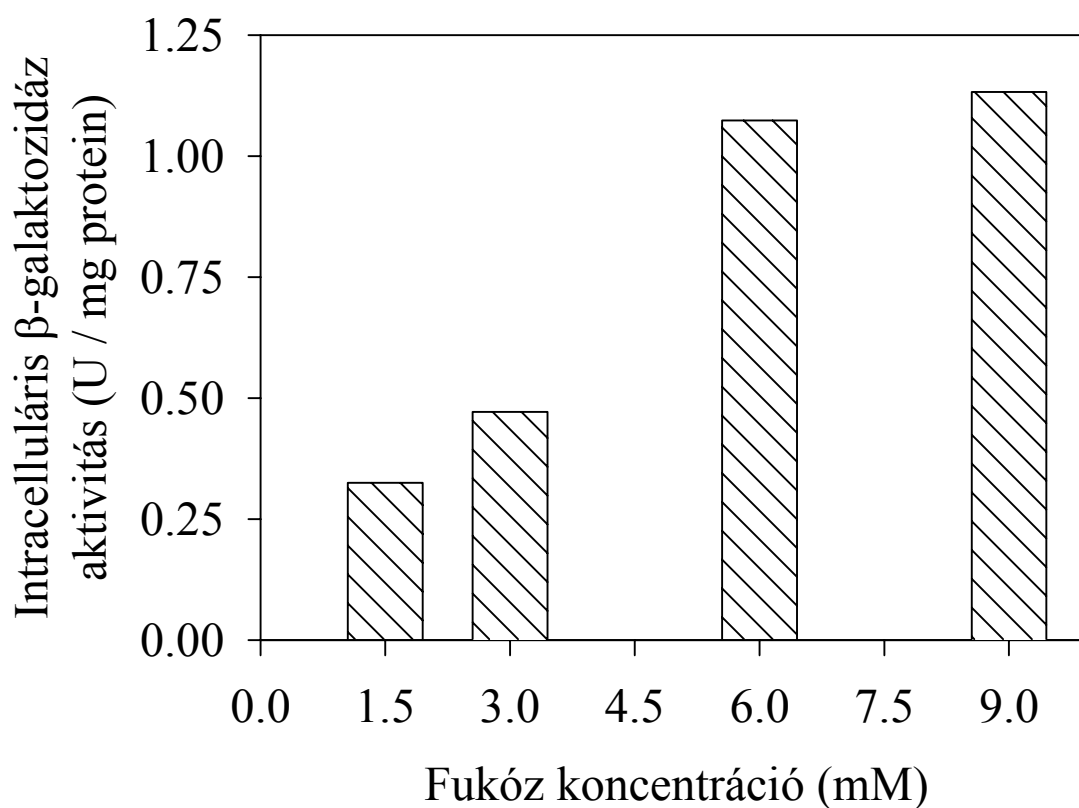
V. táblázat. A β -galaktozidáz aktivitás indukciója D-galaktózzal, L-arabinózzal és D-xilózzal a vad típusú és a *CreA* $\Delta 4$ *A. nidulans* törzsekben. $V_{\max}$: maximális specifikus enzimaktivitás (U/mg protein); $K_{\max}$: a maximális aktivitáshoz szükséges inducer koncentráció (mM); K_m : a maximális aktivitás feléhez tartozó inducer koncentráció (mM)

A két leghatékonyabb induktor (D-galaktóz és L-arabinóz) együttes hatását vizsgálva kiderült: ha a D-galaktózt szuboptimális koncentrációban alkalmazzuk, akkor az így kialakult, maximálisnál kisebb aktivitás megnövelhető L-arabinózzal, és fordítva is ez a

helyzet ($p < 0,1 \%$). A maximális indukciós értékek azonban nem voltak fokozhatók a másik monoszacharid által ($p < 0,1 \%$).

III. 3. A galaktóz anyagcsere és a β -galaktozidáz aktivitás kapcsolata

A galaktóz anyagcsere β -galaktozidáz képződéséhez szükséges szakaszának azonosítása céljából galaktokináz, valamint galaktóz-1-foszfát-uridilil transzferáz hiányos *A. nidulans* mutánsokat tanulmányoztunk. A hemicellulóz monomerek vizsgálatánál alkalmazott átmosásos technikát alkalmazva kiderült, a galaktokináz mutáns hasonló $V_{\max}$ aktivitást mutatott D-galaktózzal, az indukcióhoz szükséges K_m érték viszont lényegesen alacsonyabb volt. A vad típusú *A. nidulans* törzsben D-fukóz (6-deoxi-D-galaktóz; nem metabolizálódó D-galaktóz analóg) hatására a D-galaktóz kiváltotta értékkel megegyező β -galaktozidáz aktivitás alakult ki (**10. ábra**), jelezve, a galaktóz önmagában elég az indukció kialakításához, a Leloir-útvonal köztesei nem szükségesek hozzá (**VI. táblázat**).



10. ábra. *A. nidulans* vad típusú törzs β -galaktozidáz enzim aktivitásának indukciója fukózzal (6-deoxi-D-galaktóz)

A galaktóz-1-foszfát-uridilil transzferáz hiányos *A. nidulans* mutáns (*galD*) fenotípus vizsgálata azonban váratlan eredményt hozott: a törzs konstitutív β -galaktozidáz aktivitást mutatott glükózon és glicerolon is (11. A ábra). Értéke ($\sim 0,28 \pm 0,04$ U /mg protein) kb. kétszerese volt a *creA*-hiányos mutáns törzs konstitutív alapaktivitásának. A β -galaktozidáz aktivitás D-galaktózzal egyáltalán nem, L-arabinózzal azonban teljes mértékben indukálhatónak bizonyult (VI. táblázat). Az aktivitási értékek a tenyésztés folyamán glükózon és glicerolon is végig jelen voltak, de a tenyészet növekedési sebességével fordítottan változtak, a legmagasabb enzimszintet a stacioner fázisban érve el.

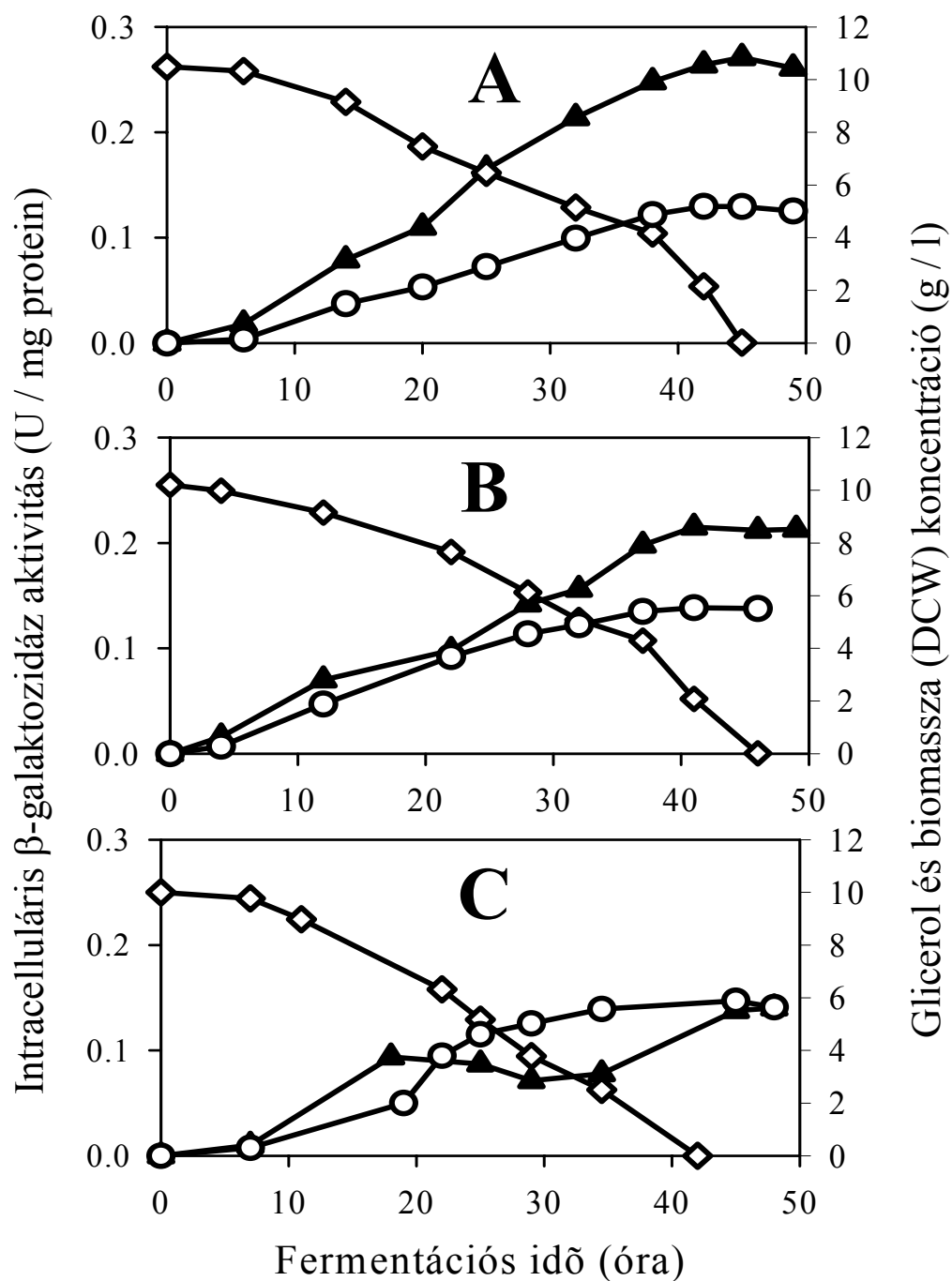
Hiánymutáns törzsek	<i>galE</i>		<i>galA</i>		<i>galD(A61)</i>		<i>galD(A466)</i>		<i>galE/galD</i>	
	$\frac{K_{\max}}{K_m}$	$V_{\max}$	$\frac{K_{\max}}{K_m}$	$V_{\max}$	$\frac{K_{\max}}{K_m}$	$V_{\max}$	$\frac{K_{\max}}{K_m}$	$V_{\max}$	$\frac{K_{\max}}{K_m}$	$V_{\max}$
D-galaktóz	$\frac{2,78}{0,04}$	1,18	$\frac{*}{*}$	0,22	$\frac{*}{*}$	0,31	$\frac{*}{*}$	0,36	$\frac{*}{*}$	0,26
L-arabinóz	n.m.	n.m.	$\frac{6,67}{0,8}$	1,4	$\frac{10}{0,8}$	1,02	$\frac{13,3}{0,8}$	1,12	$\frac{6,67}{0,8}$	1,01

VI. táblázat. A β -galaktozidáz aktivitás indukciója D-galaktózzal és L-arabinózzal a LeLoir-útvonal mutánsaiban. n.m. : nem mértük

* : koncentráció független aktivitás, $K_{\max}$ és K_m értékek nélkül

A *galD* mutáns β -galaktozidáz aktivitásának vad típustól eltérő szabályozását elvileg kétféleképpen lehetett magyarázni. Feltételezhettük, hogy a felhalmozódó, és más eukariótákban (köztük az emberben is) toxikus galaktóz-1-foszfát fejt ki egyfajta feedback gátlást a saját keletkezésében szerepet játszó enzimekre, másrésről a galaktóz-1-foszfát-uridilil transzferáz enzim szabályzó szerepéből is kiindulhattunk. Ahhoz, hogy a két lehetőség közül dönteni tudjunk, olyan mutánsra volt szükségünk, mely nem képes a galaktóz-1-foszfát szintézisére, de nem rendelkezik galaktóz-1-foszfát-uridilil transzferáz aktivitással sem. Keresztettük tehát az *A. nidulans galE* és a *galD* mutáns törzseket.

A galaktokináz / galaktóz-1-foszfát-uridilil-transzferáz kettős mutáns törzs (EFES1) kétféle fenotípust mutathatott: vagy az egyik, vagy a másik szülői törzshöz hasonlatosat.



11. ábra. A. Az *A. nidulans galD* mutáns β -galaktozidáz aktivitásának időprofilja glicerolon. **B.** *A. nidulans* EFES1 kettős mutáns β -galaktozidáz aktivitásának időprofilja glicerolon. **C.** *A. nidulans galA* mutáns β -galaktozidáz aktivitásának időprofilja glicerolon.
Szimbólumok: növekedés (○), glicerol (◇), intracelluláris β -galaktozidáz aktivitás (▲)

Amennyiben a β -galaktozidáz aktivitás szabályozása a galaktokináz mutánshoz hasonló (vagyis indukálható lesz D-galaktózzal, glicerolon pedig nem lesz aktivitás), akkor a galaktóz-1-foszfát okozta az indukálhatóság elvesztését, ha viszont a kettős mutáns nem lesz indukálható D-galaktózzal, de konstitutív aktivitást mutat glicerolon, akkor a galaktóz-1-foszfát-uridilil transzferáz enzimnek van szabályzó szerepe.

A kérdésre kapott választ a **11. B ábra** mutatja. Több független *galE/galD* kettős mutánt izoláltunk, a β -galaktozidáz aktivitás képződésének szabályozása mindegyikükben a galaktóz-1-foszfát-uridilil transzferáz mutánshoz volt hasonló. Ezt az eredményt támasztotta alá az *A. nidulans galA* mutáns vizsgálata is. Ebben a törzsben a galaktokináz és a galaktóz-1-foszfát uridilil transzferáz aktivitások minimálisak és nem indukálhatók, fenotípusosan tehát egy *galE/galD* kettős mutánshoz hasonlít. A *galA* törzs β -galaktozidáz aktivitásának szabályozása minőségileg megegyezett a *galD* egyes és az EFES1 kettős mutánsával, vagyis D-galaktózzal nem, L-arabinózzal teljes mértékben indukálható volt, represszálo (glükóz) illetve „semleges” szénforráson (glicerol) pedig konstitutív aktivitást mutatott (ez utóbbi megállapítást a **11. C ábra** szemlélteti). Mennyiségi értelemben a *galA* mutáns konstitutív aktivitása glicerolon alacsonyabb volt ($p < 0,1 \%$), mint a *galD* vagy a *galD/galE* kettős mutánsé. Megállapítottuk tehát, hogy a galaktóz-1-foszfát-uridilil transzferáz enzim részlegesen represszálja az *A. nidulans* β -galaktozidáz aktivitásának képződését, és a loss-of-function *galD* mutánsban meglévő derepressziót az aktivitás kismértékű megjelenése (lásd *galA* mutáns) csökkenti ugyan, de nem szünteti meg.

A fenti indukciós vizsgálatoknak egy távolabbra mutató eredménye is volt. Kizárandó a β -galaktozidáz enzimaktivitás galaktóz-1-foszfát felhalmozódáson keresztüli gátlásának lehetőségét, megvizsgáltuk a galaktokináz mutáns D-galaktóz felvételét; ehhez a törzset egyedüli szénforrásként D-galaktózt tartalmazó AMM2 táptalajon inkubáltuk. Meglepetésünkre a törzs nemcsak felvette a D-galaktózt, hanem nőtt is rajta. A spontán mutáció lehetősége miatt több, függetlenül deponált *A. nidulans* galaktokináz mutáns törzset szereztünk be, de a fenotípus minden esetben ugyanaz maradt. Megfigyelésünk szöges ellentétben állt azon közel négy évtizedes tézissel, miszerint a galaktokináz aktivitás nélkülözhetetlen a D-galaktóz anyagcseréhez (Roberts 1969). Munkánk következő részében ezt a (bizonyos értelemben véletlen) megfigyelést igyekszünk értelmezni.

IV. Reduktív D-galaktóz lebontási útvonal *A. nidulans*-ban

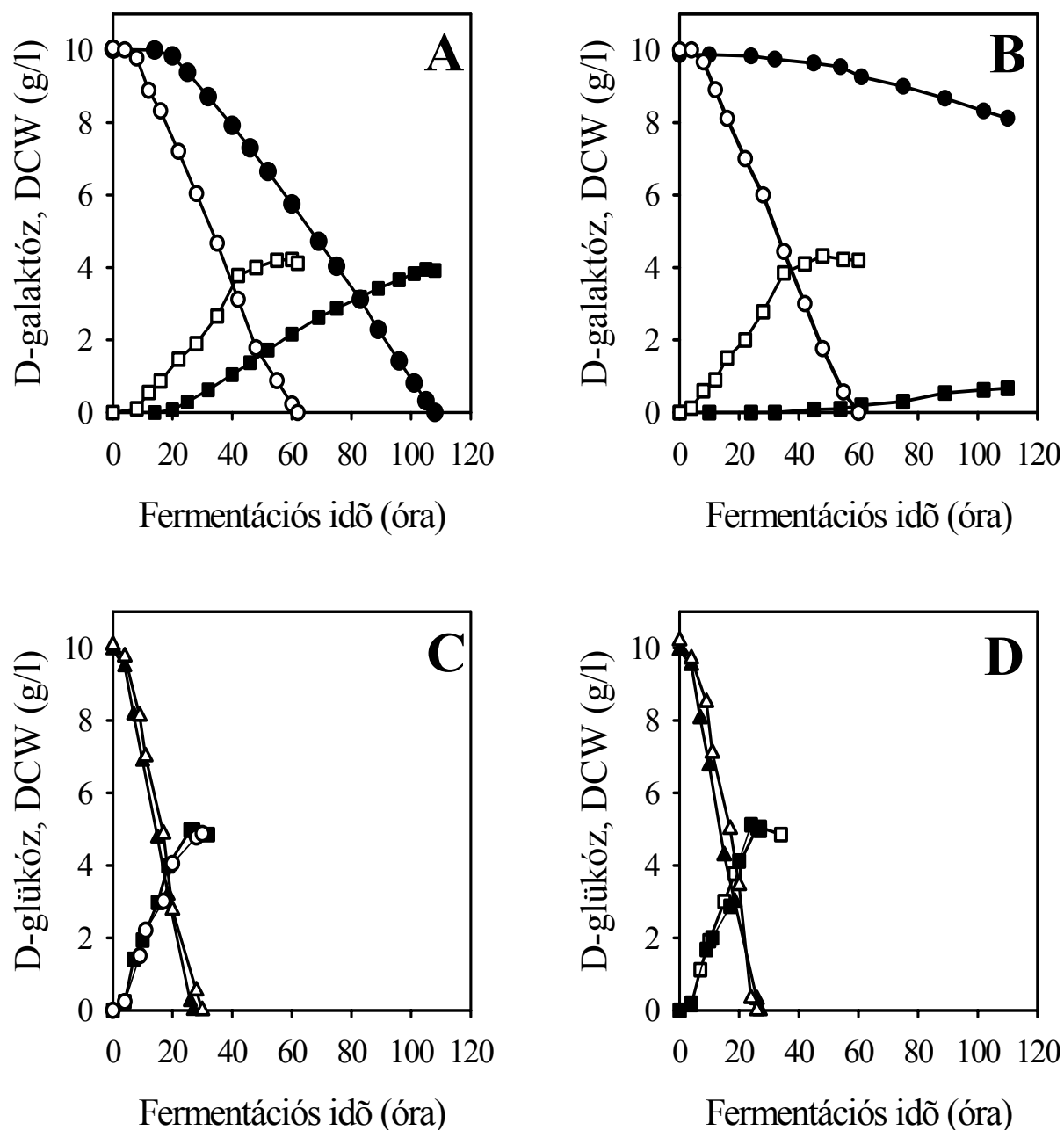
IV. 1. A megfigyelés

Noha a gombák D-galaktóz anyagcseréjét csak kevés fajban vizsgálták, a *K. lactis* élesztőben és az *A. nidulans* esetében is megállapították, hogy a galaktokináz a Leloir-útvonal nélkülözhetetlen kulcsenzime (Dickson és Riley 1989, Roberts 1963, Käfer 1977), melynek hiányában a mutáns törzsek nem képesek D-galaktózon nőni. Ezzel szemben mi azt találtuk, hogy a *galE* mutánsok felveszik és hasznosítják a D-galaktózt; szilárd D-galaktóz-AMM2 táptalajon a teljes életciklusukat befutják 3,5-4 nap alatt.

Az ellentmondás feloldása céljából tüzetesen összehasonlítottuk a korábbi szerzők és az általunk használt tenyészkörülményeket, és megállapítottuk: míg Roberts (1963) és Käfer (1977) nitrátot használt nitrogénforrásként, addig mi ammónium ionokat. Munkánk kezdetén ugyanis táptalaj optimalizálást végeztünk, ennek során találtunk rá arra a hivatkozásra (Fiedurek és mtsai 1996), mely a β -galaktozidáz enzim képződés fokozása céljából ammónium ionokat javasolt a táptalajba.

Nitrátot használva kizárólagos nitrogénforrásként az *A. nidulans* galaktokináz mutáns valóban nem nőtt D-galaktózon (**12. A ábra**), ammónium ionok használata mellett (**12. B ábra**) azonban a só anionjának kémiai minőségétől (szulfát, klorid, foszfát) függetlenül igen. Mivel Roberts (1963) 10 mM foszfáttal pufferolta táptalaját, mi is kiegészítettük ugyanennyi foszfáttal a tenyészetet, de ennek sem volt hatása a növekedésre. A tenyészet kémhatását végig pH=6,5 értéken tartottuk (2 l-es laboratóriumi fermentort használtunk), így a kétféle nitrogénforrás által kiváltott esetleges kémhatásváltozás sem lehet felelős a jelenségért. Glükóz tartalmú AMM2 táptalajon a nitrogénforrás anyagi minősége (ammónium vs. nitrát ionok) nem befolyásolta a tenyészet növekedését vagy szénforrás felvételét (**12. C, D ábra**), és ugyanezt találtuk más szénforrások (glicerol, acetát, fruktóz) esetében is. Megállapítottuk tehát, hogy a jelenség kifejezetten a galaktóz anyagcseréhez kötődik, megjelenéséhez pedig a galaktokináz gén (*galE*) működésképtelensége illetve hiánya szükségeltetik.

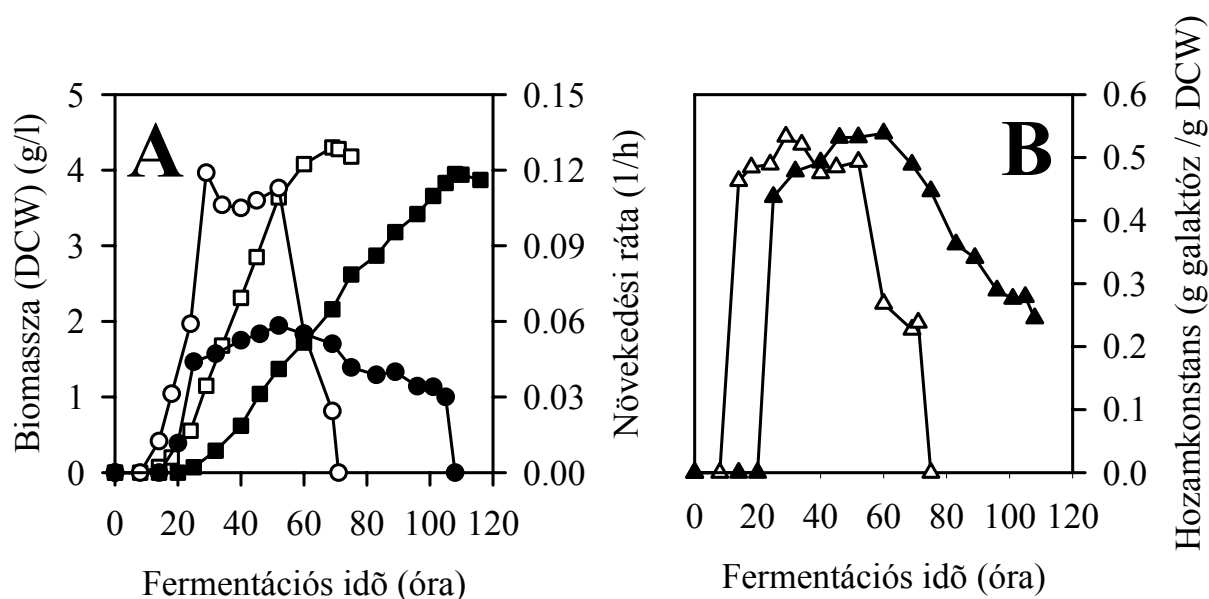
Ahhoz, hogy eldönthessük, az alternatív galaktóz lebontási útvonal teljes egészében pótolni képes-e a galaktokináz enzim hiányát a *galE* mutánsban, összehasonlítottuk a vad típus és a mutáns törzs növekedési paramétereit D-galaktózon (**13. ábra**). Mint látható, a



12. ábra. Az *A. nidulans* vad típus (üres szimbólumok) és galaktokináz mutáns (tömött fekete szimbólumok) szénforrás hasznosításának és biomassza képződésének időprofiljai AMM2 táptalajon. **A** D-galaktóz és ammónium ionok. **B** D-galaktóz és nitrát ionok. **C** D-glükóz és ammónium ionok. **D** D-glükóz és nitrát ionok

Szimbólumok: növekedés (biomassza képződés, DCW) (□, ■), D-galaktóz fogyás (○, ●), D-glükóz fogyás (△, ▲)

kompenzáció nem teljes, hiszen a biomassza képződés rátája a vad típusú tenyészetben közel kétszerese a *galE* mutánséban mérhetőnek (13. A ábra), ami ugyanilyen arányú különbséget okozott a növekedési rátákban is (13. A ábra).



13. ábra. A. és B. Az *A. nidulans* vad típus (üres szimbólumok) és galaktokináz mutáns (tömött szimbólumok) időprofiljai D-galaktózon való növekedés során.

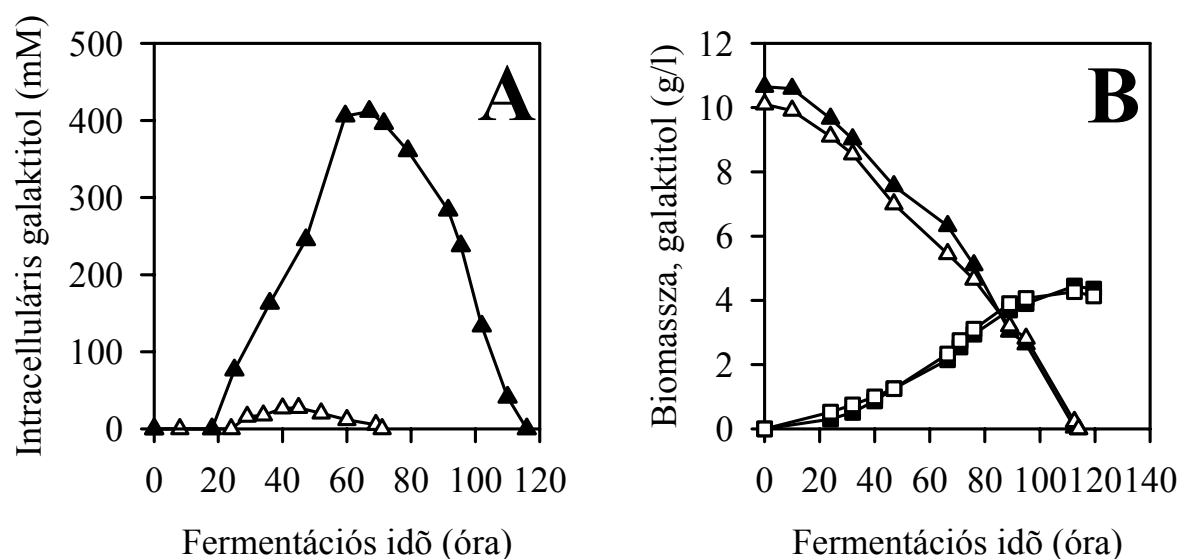
Szimbólumok: növekedés (□, ■), növekedési ráta (○, ●), hozamkonstans (Δ, ▲)

IV. 2. Az első intermedier azonosítása

A vad típusú *A. nidulans* és a galaktokináz mutáns törzs (A214) D-galaktózon való növekedésének összehasonlítása azt is kimutatta, hogy a szénforrásra vonatkozó biomassza hozamkonstansok jelentősen eltérnek egymástól (13. B ábra). A vad típusú törzsben a hozamkonstans időprofilja gyors felfutás után a galaktóz hasznosítás csaknem teljes időtartama alatt állandó értéken volt, majd a stacioner fázisban gyorsan leesett. Ehhez képest a galaktokináz mutáns hozamkonstansának időprofilja a kezdeti felfutás után egy folyamatosan hanyatló értéket mutatott, a stacioner fázis elejére a maximális érték 60 %-ra esett vissza. Ez a hozamkonstans-időprofil jellegzetes példája az átmeneti, intracelluláris metabolit feldúsulásnak. Más szénforrásokon (L-arabinóz, D-xilóz, glükóz, acetát, glicerol) a két törzs hozamkonstans-időprofiljai megegyeztek, laktózon azonban kevésbé hangsúlyosan, de a D-galaktózon észlelthez hasonló tendenciákat tapasztaltunk.

Mivel úgy gondoltuk, az említett intracelluláris köztes azonosítása közelebb vihet minket az alternatív D-galaktóz hasznosítási útvonal megismeréséhez, a tápközeget és a

biomasszát is elemzésnek vetettük alá, olyan komponensek után kutatva, melyek kiinduláskor nem voltak jelen. Ennek eredményeként az *A. nidulans* galaktokináz mutáns biomasszájában meglepően nagy (>400 mM) koncentrációban galaktitolt (dulcitol, a D-galaktóz poliolja) találtunk. A galaktitol, mint azt felhalmozódásának időprofilja is világosan mutatja (**14. A ábra**), a tenyésztés végén hasznosul. Érdekes módon jóval kisebb koncentrációban ugyan, de a vad típus micéliumában is találtunk felhalmozódó galaktitolt; mennyisége a tenyésztés exponenciális fázisában kezdett el nőni, a galaktóz felvétel időszakában növekedett, majd a lassuló fázis végén gyorsan felhasználódott (**14. A ábra**), jelezve, a galaktitol képzésért és továbbalakításért felelős enzimek a vad típusban is megtalálhatók. Laktózon növekvő vad és galaktokináz mutáns törzsek micéliumában szintén találtunk galaktitolt, ennek mennyisége kevesebb, kb. 75 %-a volt a galaktózon mértnek. A galaktóz és laktóz koncentrációjának (2-40 g/l értékek között) nem volt hatása a képződött galaktitol mennyiségére. Egyéb szénforrásokon (L-arabinóz, D-xilóz, acetát, D-fruktóz, D-glükóz, glicerol) való növesztés nem eredményezett intracelluláris galaktitol felhalmozódást egyik törzsben sem.



14. ábra. Időprofilok *A. nidulans* vad típusú (üres szimbólumok) és galaktokináz mutáns (tömött szimbólumok) törzsekben **A** Intracelluláris galaktitol felhalmozódás, AMM2-galaktózon. **B** Növekedés illetve szénforrás hasznosulás AMM2-galaktitolon.

Szimbólumok: galaktitol koncentráció (Δ , $\blacktriangle$), biomassza koncentráció ($\square$, $\blacksquare$)

Az intracellulárisan felhalmozódott galaktitol gyors elfogyása az *A. nidulans* galaktitol lebontásának vizsgálatára irányította a figyelmünket. Első lépésként AMM2-

glicerolon előnövesztett vad típusú és galaktokináz törzseket AMM2-galaktitol táptalajra mostunk át. A növekedés és a galaktitol felvétel mindkét törzsben ugyanakkora rátával történt. Hasonló eredmények születtek a konídiospóráról indított tenyészetek vizsgálata során is (**14. B ábra**). Megállapítottuk tehát, az *A. nidulans* a növekedés minden fázisában képes a galaktitol hasznosítására, lebontásához nem igényli a galaktokináz enzim jelenlétét.

IV. 3. Az első enzimatis lépés azonosítása

Az eddigiek során bizonyítékot szereztünk arra, hogy a galaktokináz hiánya esetén a galaktóz metabolizmusa galaktitol köztesen át megy végbe. Annak eldöntésére, hogy a törzsek rendelkeznek-e galaktitol bontó aktivitással, AMM2-glicerolon kinövesztett, AMM2-galaktitolra átmosott vad típusú és galaktokináz hiányos mutáns (*galE*) *A. nidulans* tenyészetek sejtmentes, dializált kivonatát használtuk enzimforrásként. Mint látható (**VII. táblázat**), mindkét törzs rendelkezik galaktitol dehidrogenáz aktivitással, amely szigorúan csak NAD⁺-kofaktorról működik, NADP⁺-vel nem.

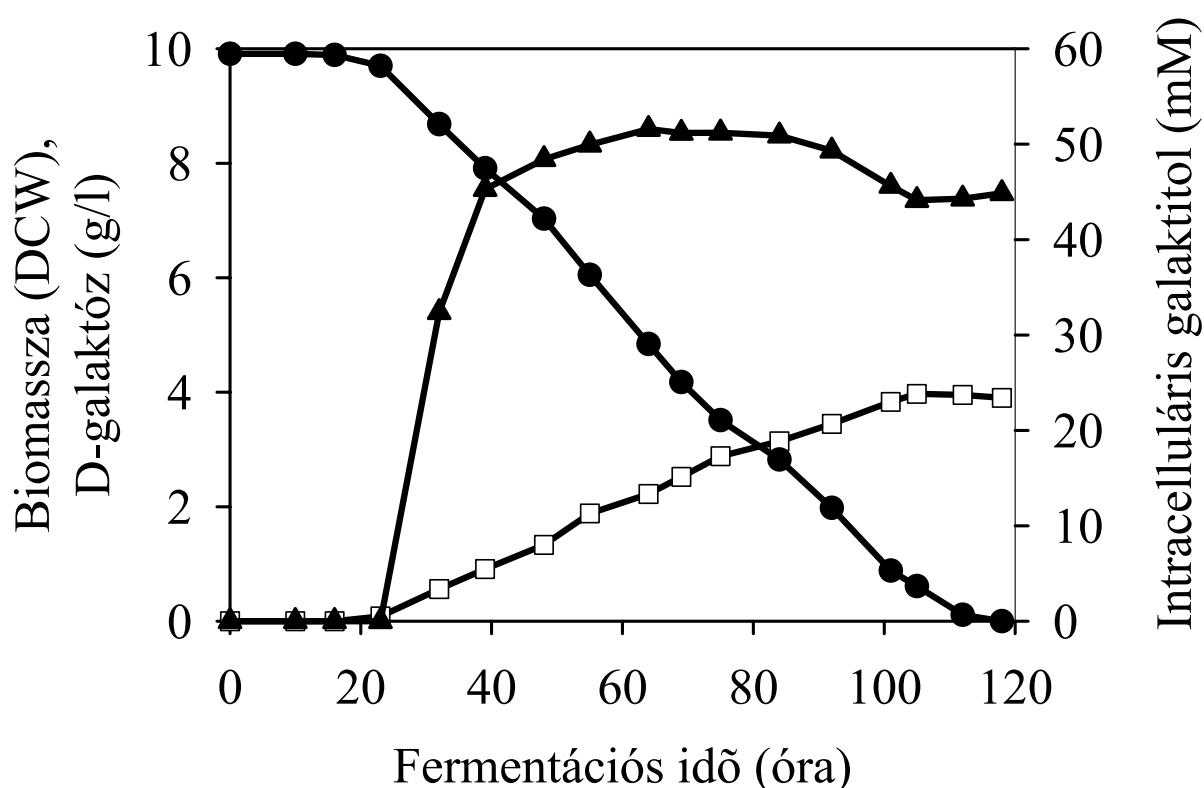
Poliol dehidrogenáz aktivitás (U / mg protein)

Törzs	Kofaktor	Szubsztrátum	
		L-arabitol	Galaktitol
Vad típus	NAD ⁺	0,41 ± 0,03	0,081 ± 0,005
	NADP ⁺	< 0,004	< 0,004
<i>araA1</i>	NAD ⁺	0,094 ± 0,02	< 0,004
	NADP ⁺	< 0,004	< 0,004
<i>galE</i>	NAD ⁺	0,356 ± 0,02	0,066 ± 0,004
	NADP ⁺	< 0,004	< 0,004

VII. táblázat. Poliál dehidrogenáz aktivitások *A. nidulans*-ban, AMM2 táptalajon, galaktitol és L-arabitol szubsztrátumokon, NAD⁺ illetve NADP⁺ kofaktorok használata mellett

De Vries és mtsai (1994) közleménye szerint egy eredetileg Clutterbuck (1981) által leírt (G094=*araA1*) és L-arabitol dehidrogenáz hiányos fenotípussal jellemzett *A. nidulans* mutáns nem nő galaktitolon sem. A megfigyelést igazoltuk (16. C ábra), majd megállapítottuk, a mutánsnak nincs galaktitol dehidrogenáz aktivitása sem (VII. táblázat). Meglepetésünkre azonban nitrogénforrásként ammónium ionokat használva az *araA1* mutáns nőtt L-arabitolon (galaktitolon viszont nem), és a vad, valamint a galaktokináz hiánymutáns törzseknél ugyan kisebb, de jól mérhető L-arabitol dehidrogenáz aktivitást mutatott. Nitrogénforrásként nitrátot, szénforrásként L-arabitol tartalmazó táptalajon azonban nem volt sem L-arabitol dehidrogenáz aktivitás, sem növekedés, összhangban a korábbi közleményekkel. Az *araA1* mutáns viselkedése L-arabitolon tehát nagyon hasonló volt a *galE* mutáns viselkedéséhez D-galaktózon – mindkettő nitrát tartalmú táptalajon mutatta a definiált mutáns fenotípust, ammónium ionok jelenlétében a jelleg eltűnt.

A VII. táblázat *in vitro* adatokat mutat, ezért kíváncsiak voltunk, hogy az L-arabitol dehidrogenáz aktivitás *in vivo* is felelős-e a galaktitol lebontásáért. Ehhez az *araA1* mutánst D-galaktózon növesztettük, és kielemeztük a fermentlevet és a biomasszát (15. ábra).



15. ábra. *A. nidulans* L-arabitol dehidrogenáz hiányos mutáns időprofilja D-galaktózon.
Szimbólumok: biomassza (□), D-galaktóz (●), intracelluláris galaktitol (▲) koncentrációk

Az *A. nidulans* L-arabitol dehidrogenáz mutáns növekedése galaktózon valamivel lassabb volt, mint a vad típusé, viszont nagyjából megegyezett a galaktokináz hiánymutáns esetében tapasztalttal. Az intracelluláris galaktitol a növekedésnek már viszonylag korai szakaszában megjelent, és a stacioner fázis végére érte el maximális értékét (~50 mM), amely jóval alacsonyabb volt a galaktokináz hiánymutánsban (~410 mM), de valamivel magasabb a vad típusban mért értéknél (~30 mM; lásd **14. A ábra**). A lényegi különbség azonban az, hogy az *araA1* mutáns nem tudta hasznosítani az intracelluláris galaktitolt, vagyis a galaktitol felhalmozódás végleges volt, nem átmeneti (**15. ábra**). A galaktóz elfogyása után a tenyészetet még napokig fenntartva széteső, autolizáló sejteket észleltünk, ennek eredményeként a galaktitol az extracelluláris térben is megjelent, ám még ekkor sem hasznosult. Megállapítottuk tehát, hogy az *A. nidulans* galaktitol anyagcseréjében az L-arabitol dehidrogenáz aktivitás megkerülhetetlen.

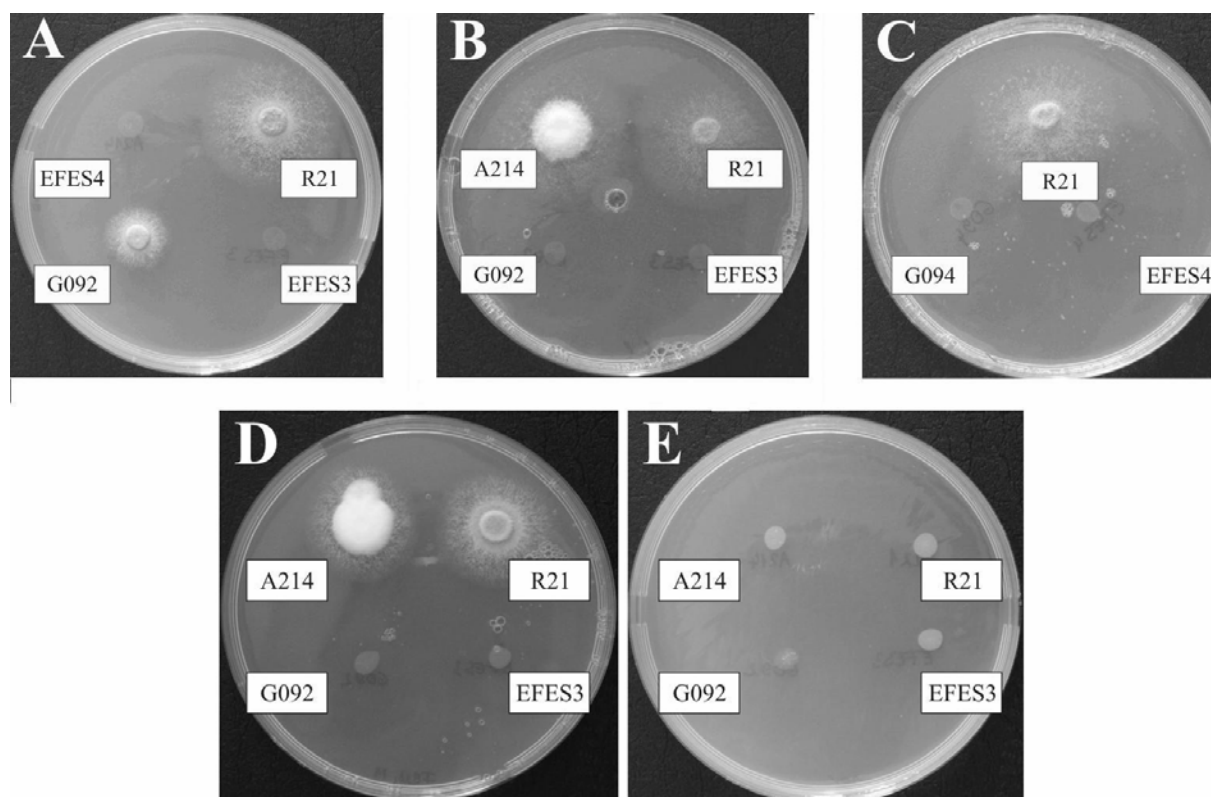
A következőkben arra kerestük a választ, hogy az alternatív galaktóz lebontási út kizárólag galaktitolon át halad-e, avagy létezik egy harmadik utas megoldás is. Ehhez egy L-arabitol dehidrogenáz / galaktokináz kettős mutánst (*araA1/galE* = EFES4) hoztunk létre. Megközelítésünk lényege, hogy ha a Leloir-útvonaltól független galaktóz lebontás kizárólag galaktitolon át megy végbe, akkor galaktokináz negatív háttérben az L-arabitol dehidrogenáz mutáns nem fog tudni D-galaktózon nőni. Mint a **16. A ábra** mutatja, valóban ez volt a helyzet; bizonyítékot szereztünk tehát arra, hogy az alternatív galaktóz lebontási út obligát köztese a galaktitol, melyet az L-arabitol dehidrogenáz alakít tovább.

IV. 4. A második intermedier azonosítása

Az L-arabitol dehidrogenáz reakció végterméke L-arabitolal L-xilulóz (**1. ábra**), galaktitollal való reakciójának terméke azonban nem ismert. Mivel a galaktitol az L-arabitol dehidrogenáz révén alakul tovább, a reakciótermék azonosítása elengedhetetlen volt az alternatív galaktóz lebontási út további vizsgálatához.

Galaktitolon nőtt vad típusú, galaktokináz és L-arabitol dehidrogenáz hiánymutáns törzsek dializált sejtmentes kivonatát enzimforrásként használtuk, és az *in vitro* reakció termékeit HPLC és NMR (**17. ábra**) segítségével elemeztük. Mindkét analitikai módszer a reakcióidővel lineárisan növekvő koncentrációjú szorbózt mutatott ki a vad típus és a galaktokináz mutáns esetében, más hexózt nem találtunk a reakcióelegyben. Polarimetriás elemzés révén a szorbózt L-szorbózként azonosítottuk. Rendkívül fontos megfigyelés

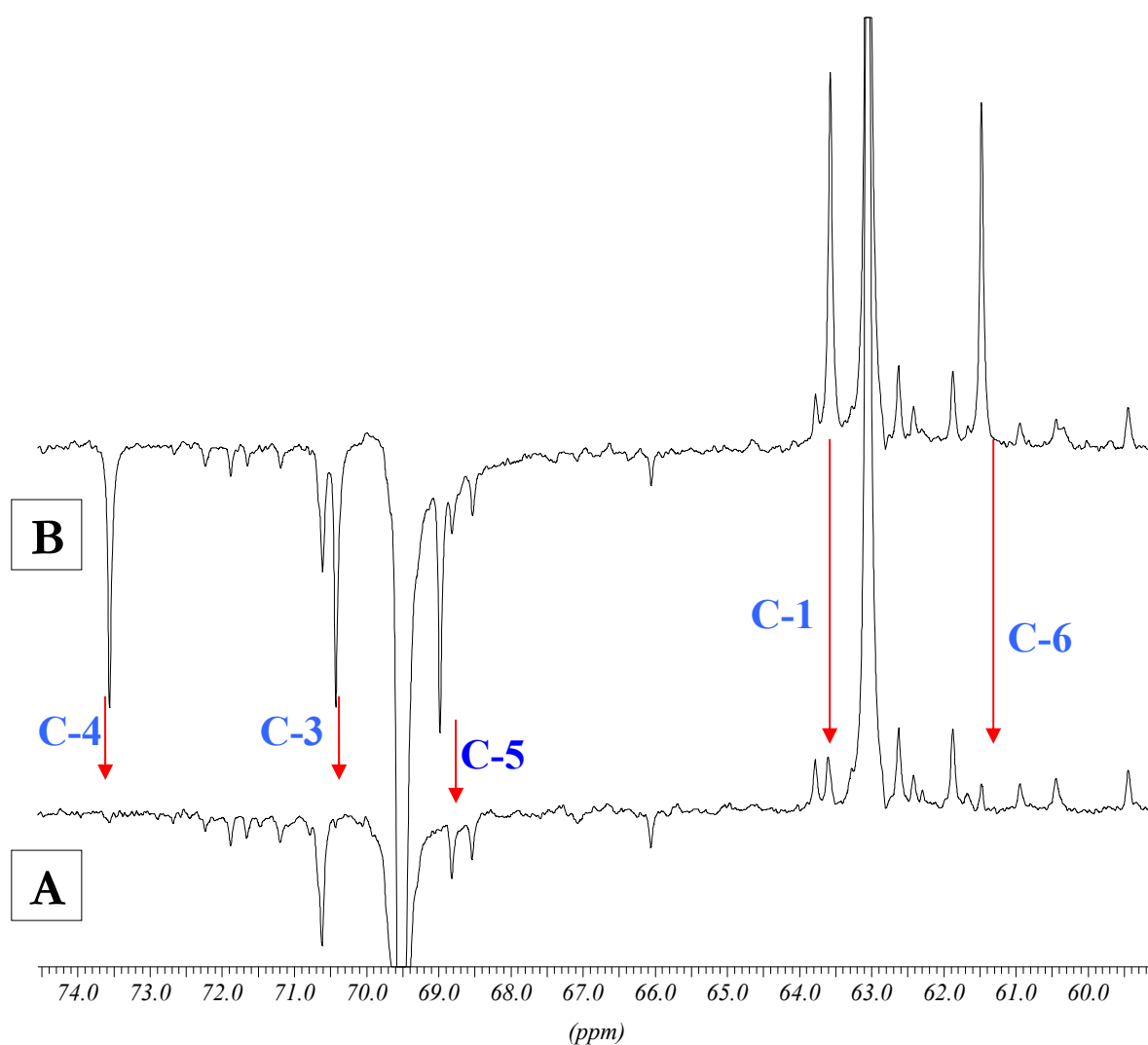
volt, hogy az *araA1* mutáns esetében reakció végterméket nem találtunk, bármeddig is inkubáltuk az elegyet.



16. ábra. *A. nidulans* vad és mutáns törzsek növekedése a munkánk során használt fontosabb szénforrásokon. **A** Növekedés D-galaktózon. **B** és **C** Növekedés galaktitolon. **D** Növekedés L-szorbózon ammónium ionok jelenlétében. **E** Növekedés L-szorbózon nitrát ionok jelenlétében. Az **A-D** jelű Petri-csészékben nitrogénforrásként ammónium ionokat használtunk

Fordított irányba (redukció) játszódta a reakciót, a vad típus és a galaktokináz mutáns dializált sejtmentes kivonatát enzimforrásként használva, NADH (de nem NADPH) jelenlétében az L-szorbózt galaktitollá tudtuk alakítani. Ugyanez a reakció az L-arabitol dehidrogenáz mutáns dializált sejtmentes kivonatával nem ment végbe. Mindez azt bizonyította, az L-arabitol dehidrogenáz aktivitás eredményeként a galaktitol szubsztrátum L-szorbózzá alakul.

Az L-szorbóz kis mennyiségben fel is halmozódik a micéliumban; galaktitolon növesztett vad típusú és galaktokináz mutáns törzsekben 20-60 μM L-szorbózt tudtunk kimutatni. Akárcsak az *in vitro* reakció esetében, más hexózt kimutatható mennyiségben *in vivo* sem találtunk.



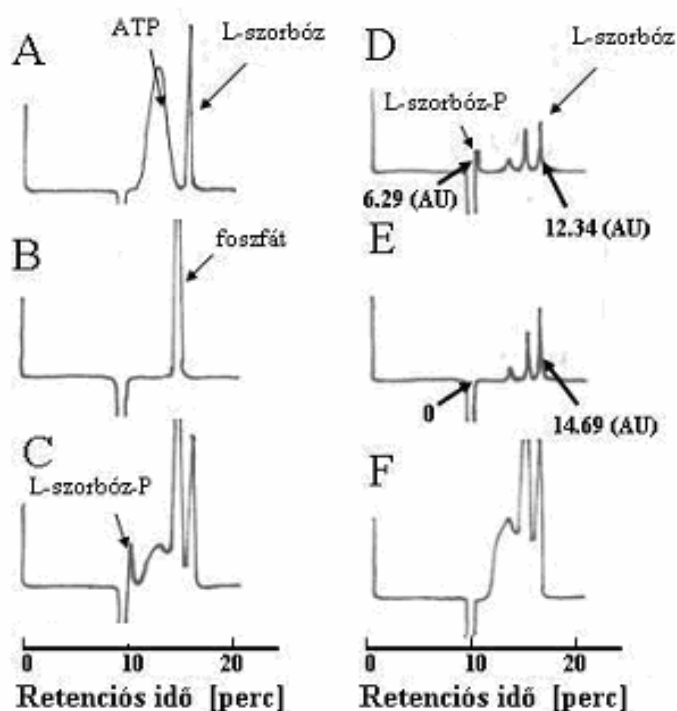
17. ábra. **A** L-arabitol dehidrogenáz - galaktitol oxidációs reakció szorbózként azonosított végtermékének ^{13}C DEPT-NMR spektruma. **B** L-szorbóz ráadagolás (standard addíció)

IV. 5. A második enzimatis lépés azonosítása

Természetesen kíváncsiak voltunk, hogyan alakul tovább a sejtben az L-szorbóz. Elorza és Arst (1971) közleménye szerint az intracelluláris L-szorbóz előbb D-szorbitollá redukálódik, majd ez D-fruktozzá alakul, ami a hexokináz általi foszforilezés révén lép be az anyagcsere főáramába. Ahhoz, hogy bebizonyítsuk, a hexokináz valóban rész vesz az L-szorbóz anyagcserében és ezáltal az alternatív D-galaktóz lebontási útvonalban, egy *A. nidulans* hexokináz hiánymutáns törzset (*frA1*) elemeztünk. A mutáns valóban nem tudott sem L-szorbózon (**16. D ábra**), sem galaktitolon (**16. B ábra**) nőni.

A hexokináz esszenciális szerepét az alternatív D-galaktóz lebontási útvonalban egy *A. nidulans* galaktokináz/hexokináz kettős mutáns (*galE/frA1* = EFES3) vizsgálatával

bizonyítottuk. Mint azt a **16. A** ábra mutatja, a mutáns nem tudott D-galaktózon nőni, és a várakozásnak megfelelően galaktitolon (**16. B** ábra) és L-szorbózon (**16. D.** ábra) sem. Más szénforrásokon (glükóz, glicerol, acetát) a mutáns törzsek vad típusként viselkedtek.



18. ábra. Az L-szorbóz foszforilezésének HPLC-kromatogramjai *A. nidulans*-ban. **A** ATP és L-szorbóz. **B** sejtmentes kivonat. **C** A hexokináz reakció L-szorbóz szubsztrátummal, az *A. nidulans galE* mutáns dializált, sejtmentes kivonatát használva. **D** Az L-szorbóz-6-foszfát tartalmú elegy alkalikus foszfátazzal való kezelése 0 h időpillanatban. **E** Az L-szorbóz-6-foszfát tartalmú elegy alkalikus foszfátazzal való kezelése, 3 h időpillanatban. **F** A hexokináz reakció L-szorbóz szubsztrátummal, az *A. nidulans frA1* mutáns dializált, sejtmentes kivonatát használva 6 h után. AU: arbitrárius egység (Arbitrary Unit)

Elorza és Arst (1971) közleménye értelmében a hexokináznak közvetett szerepe van az L-szorbóz anyagcserében, hiszen *de facto* a D-fruktózt foszforilezi. Mivel azonban a hexokináz széles szubsztrátspecifitású enzim (Machado de Domenech és Sols 1980, Puri és mtsai 1988), megvizsgáltuk, képes-e az L-szorbózt közvetlenül foszforilezni. Ehhez vad típusú, L-arabitol dehidrogenáz hiánymutáns (*araA1*), galaktokináz hiánymutáns (*galE*) és hexokináz hiánymutáns (*frA1*) törzseket fruktózon növesztettünk, és a dializált sejtmentes kivonatot enzimforrásként használtuk az L-szorbóz *in vitro* foszforilezéséhez. Az enzimreakciót a galaktokináz aktivitás mérésére általunk kifejlesztett HPLC-alapú módszer változatával követtük nyomon. Mint azt a **18. C** ábra mutatja, a vad, *araA1* és *galE* törzsek

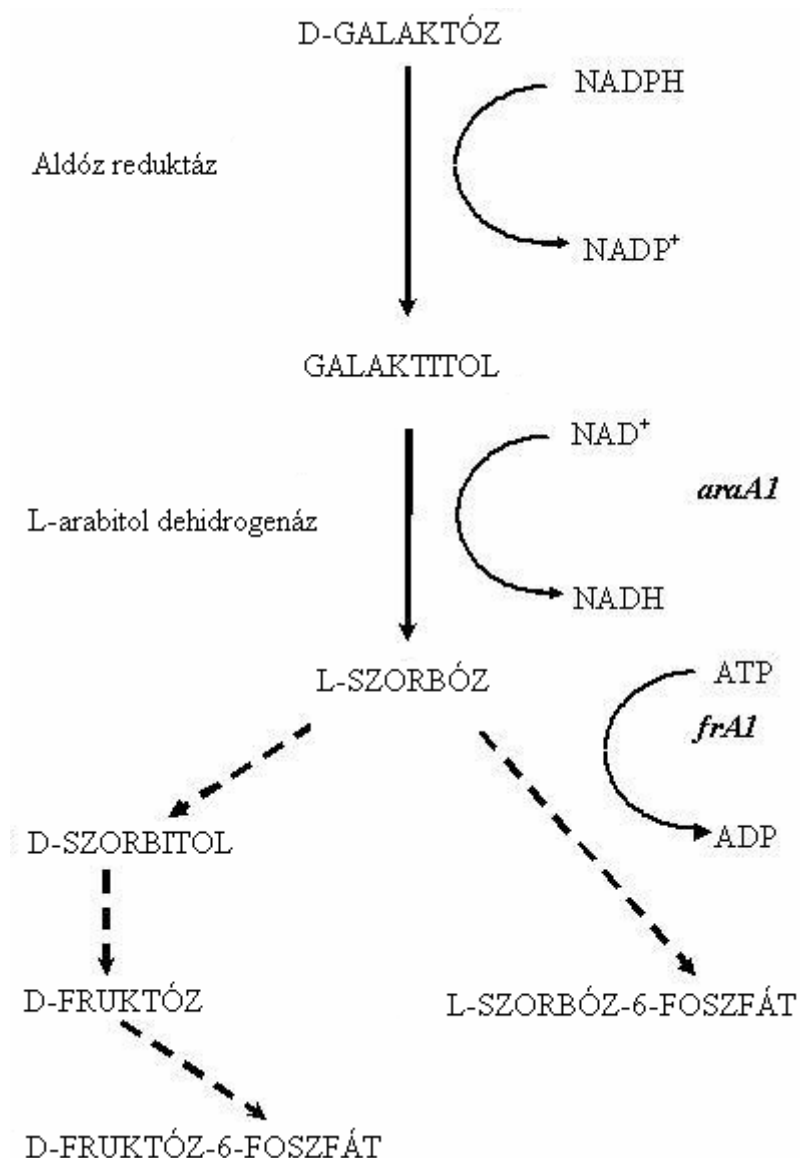
ATP-függő módon foszforilezték az L-szorbózt. A reakció termékét ^{31}P NMR-rel L-szorbóz-foszfátként azonosítottuk. További bizonyítékot jelentett, hogy a foszforilált termék alkalikus foszfatáz enzimmel való kezelése eredményeként az L-szorbóz-foszfát eltűnt, viszont sztöchiometrikus mennyiségben megnőtt az elegyben található L-szorbóz mennyisége (**18. D, E ábra**).

Az *frA1* hiánymutáns törzs sejtmentes kivonatát azonban nem tudtuk az L-szorbóz foszforilezéséhez enzimforrásként használni, mivel még elnyújtott inkubációs idő alatt sem keletkezett L-szorbóz-foszfát (**18. F ábra**). Bizonyítékot szereztünk tehát arra, hogy – legalábbis *in vitro* – a hexokináz képes közvetlenül foszforilezni az L-szorbózt.

IV. 6. Hogyan tovább, L-szorbóz?

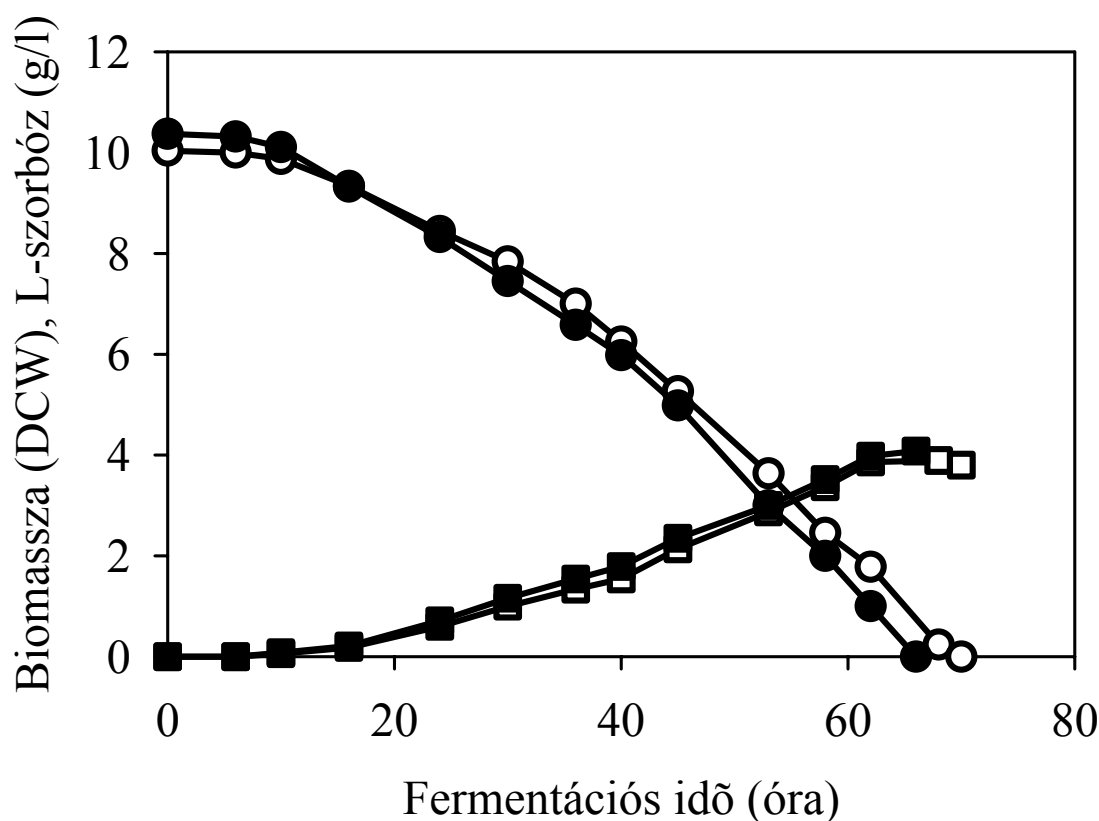
Az L-szorbóz közel negyven éve szerepel olyan cukorként a szakirodalomban, melyet az *A. nidulans*, bár képes felvenni és metabolizálni, egyedüli szénforrásként nem tud a növekedéséhez felhasználni (Roberts 1963, Elorza és Arst 1971). Néhol kifejezetten toxikusnak írták le (MacCabe és mtsai 2003). Ezért kifejezetten meglepő volt az a megfigyelés, miszerint a hexokináz aktivitással rendelkező *A. nidulans* törzsek képesek L-szorbózon nőni mind szilárd, mind folyékony AMM2 táptalajon. Az idézett közleményekben megadott illetve az általunk használt tenyészkörülmények összevetése során kiderült, ebben az esetben is a táptalaj nitrogénforrásának kémiai minősége a meghatározó: L-szorbózt és nitrát ionokat tartalmazó AMM táptalajon nincs növekedés (**16. E ábra**), viszont az L-szorbózt és ammónium ionokat tartalmazón igen (**16. D ábra**), és még csak lassúnak sem nevezhető (**20. ábra**). Tudományos magyarázatot pillanatnyilag nem tudunk adni a jelenségre, csupán azt jegyezzük meg, hogy az L-szorbóz hasznosítás a *galE* mutáns D-galaktózon és az *araA1* mutáns L-arabitolon való növekedése után a harmadik olyan eset, ahol egy szénforrás lebontásának képességét a nitrogénforrás anyagi minősége determinálja. Szemben a másik két példával, az L-szorbóz hasznosítás feltételei vad típuson is tanulmányozhatók.

Mint említettük, Elorza és Arst (1971) egy L-szorbóz $\rightarrow$ D-szorbitol $\rightarrow$ D-fruktóz lebontási útvonalat írtak le. Mivel saját eredményeink szerint az L-szorbózt a hexokináz közvetlenül képes foszforilezni (**18. ábra**), nem zárható ki, hogy az L-szorbóz-6-foszfát izomerizálódik fruktóz-6-foszfáttá, sőt a két útvonal akár párhuzamosan is működhet (**19. ábra**).



19. ábra. A redukzív D-galaktóz lebontási útvonal vázlatja *A. nidulans*-ban. A szaggatott nyilak a lehetséges alternatív útvonalakat jelölik

A tényleges lebontási útvonal meghatározása céljából szereztük be az *A. nidulans* *sbA3* mutánst, mely leírói szerint a D-szorbitol → D-fruktóz lépés sérülése miatt nem képes a D-szorbitol hasznosítására (Käfer 1977). Egy *galE/sbA3* kettős mutáns segítségével könnyedén eldönthettük volna, az alternatív galaktóz lebontás D-szorbitol köztesen keresztül történik-e. Az *sbA3* mutáns fenotípusa azonban újfent nitrogénforrás-függőnek bizonyult; ammónium ionok jelenlétében a D-szorbitol normális növekedést eredményezve egyedüli szénforrásként is hasznosult, nitrát ionok mellett azonban nem. A mutánst tehát nem tudtuk terveink szerint használni, viszont a nitrogénforrás anyagi minősége által befolyásolt lókuszok száma tovább gyarapodott.



20. ábra. Az *A. nidulans* vad típusú (üres szimbólumok) és galaktokináz mutáns (tömött szimbólumok) törzsek időprofiljai L-szorbóz-AMM2 táptalajon
Szimbólumok: növekedés (□, ■), L-szorbóz fogyás (○, ●)

AZ EREDMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE

Munkánk első részében az intracelluláris β -galaktozidáz aktivitás képződésének szabályozásával foglalkoztunk. Noha mindvégig specifikus enzimaktivitásokat mértünk, és emiatt az észlelt jelenségekben nem szigorúan csak a transzkripció szabályozás, hanem a transzkriptum és az átíródott enzim stabilitása is szerepet játszhat, mégis az „indukció” és „represszió” kifejezéseket használtuk az enzimképződésre gyakorolt pozitív illetve negatív hatások jelölésékor. Meg szeretnénk jegyezni azonban, hogy a *K. lactis* élesztőben a β -galaktozidáz aktivitás értékei tökéletesen korreláltak a transzkriptum képződésével (Webster és Dickson 1988, Cardinali és mtsai 1997).

A szakirodalom (Roberts 1973, Gajewski és mtsai 1972, Diaz és mtsai 1996) egységes abban, hogy az *A. nidulans* egyetlen gén termékeként keletkező, intracelluláris-citoszolikus β -galaktozidáz enzimmel rendelkezik, eltérően más fonalas gomba fajoktól

(pl. *P. chrysogenum*, *P. canescens*, *T. reesei*). Valóban, a vad típusú *A. nidulans* fermentlevének, sejtmentes kivonatának illetve sejttörmelékének elemzése során csak intracelluláris β -galaktozidáz aktivitást találtunk, sejtfalhoz kötöttet és extracellulárisat nem. Az *A. nidulans* genom számítógépes elemzése azonban érdekes eredményt hozott: egyfelől a β -galaktozidáz géneknek tűnő ORF-ek egyikében sincs ismert szignálszekvencia (megerősítve kísérletes munkáink eredményét), másfelől azonban *két* db β -galaktozidáz szekvenciát találtunk, egy gombákéhoz és egy prokariótákéhoz hasonlót. Jelenleg még nem tudjuk, mindkettő kifejeződik-e. A feltételezett génekhez primereket (BioScience) terveztünk, PCR segítségével felszaporítottuk őket, egy-egy rövidebb (331 illetve 809 bp hosszúságú) szakaszukat szubklónoztuk (pGEM 3Z⁺ [Promega] plazmidokba ligáltuk), majd *E. coli* DH5 kompetens sejtekbe [Promega] transzformáltuk. Az expresszió vizsgálata (Northern-analízis) jelenleg is folyik. Kutatócsoportunk jövőbeli feladata lesz megvizsgálni, hogy ha kifejeződnek a gének, akkor szabályozásuk mennyiben tér el egymástól, illetve milyen arányban vesznek részt az összaktivitás kialakításában.

Az *A. nidulans* intracelluláris β -galaktozidáz aktivitásának képződése D-galaktózzal és L-arabinózzal hatékonyan, laktózzal és D-xilózzal kevésbé jól indukálható, glükóz jelenlétében pedig gátlódik. A laktóz és D-galaktóz általi indukciót Fantes és Roberts (1973) is kimutatta *A. nidulans*-ban, viszont az L-arabinózt egészen gyenge, a D-xilózt pedig hatástalan induktornak írták le. Ezzel szemben egy termelői *P. chrysogenum* törzs extracelluláris β -galaktozidáz aktivitásának képződését a D-galaktóz nem indukálta (Nagy és mtsai (2001b). A D-xilóz és L-arabinóz kiváltotta extracelluláris β -galaktozidáz indukciót más fajok esetében is leírták (*A. niger* - de Vries és mtsai 1999a, *P. canescens* - Nikolaev és Vinetski 1998). Az L-arabinóz és D-xilóz indukáló hatásának pontos okát nem tudjuk, de feltehetően kapcsolatba hozható a természetes poliszacharidokban (pl. hemicellulózok) való előfordulásukkal, ami az alapvetően szaprofita *Aspergillus*-ok egyik fő tápláléka. A gomba részéről valóban előnyösnek tűnik, ha hidrolázait a tápanyagul szolgáló hetero-poliszacharidok minél többféle monomere tudja indukálni.

A glükóz jelenléte a táptalajban az aktivitás gyors eltűnését eredményezte, ami a fehérje gyors lebomlását és rövid féléletidejét jelzi. Eredményeink szerint a glükóz hatása legalább három szinten jelentkezik, és ezek mindegyike CreA-függő folyamat: (a) a konstitutív β -galaktozidáz aktivitás képződésének gátlása; (b) az indukció részleges gátlása,

mivel a CreA-negatív genetikai háttér a vad típushoz képest másfélszeres aktivitásokat eredményezett; (c) a laktózfelvétel gátlása. A CreA-függő karbon katabolit represszió többszintű részvétele a szabályozásban nem ismeretlen jelenség - ilyen pl. az *alcA* gén szabályozása *A. nidulans*-ban (Mathieu és Felenbok 1994) és a xilánáz bioszintézise *A. niger*-ben (de Vries et al. 1999b). A CreA-nak az inducert felvevő fehérjével (ez esetben a laktóz permeázzal) való kölcsönhatását azonban eddig sehol nem írták le, de a jelenség hasonlít a *S. cerevisiae* maltóz permeáz részlegesen Mig1p-függő glükóz repressziójához (Hu és mtsai 2000, Medintz és mtsai 2000). A *K. marxianus* élesztőben a laktóz felvételt a glükóz gátolja (de Bruijne és mtsai 1988), de nem tudjuk, ez karbon katabolit represszió eredménye-e.

A β -galaktozidáz aktivitás képződésének indukciójához a D-galaktóznak nem kell foszforileződnie, mivel (a) a galaktokináz hiányos mutánsban is hasonlóan játszódik le az indukció, és (b) az indukció a nem foszforileződő D-fukózzal is kiváltható. A Leloir-út köztesei tehát nem játszanak szerepet a β -galaktozidáz képződés indukciójában.

A galaktóz-1-foszfát-uridilil transzferáz gén mutációja konstitutív β -galaktozidáz aktivitást és D-galaktózzal szembeni érzéketlenséget eredményezett. Hasonló (bár nem teljesen megegyező) jelenséget írtak le a *K. lactis* esetében (Cardinali és mtsai 1997), így a D-galaktóz általi indukció valószínűleg hasonló mechanizmusok szerint játszódik le az említett élesztőben és az *A. nidulans*-ban. Élesztőkben a galaktóz indukció a galaktóznak a Gal3p (galaktokináz) proteinhez kötődésével kezdődik. A galaktóz-Gal3p komplex kölcsönhatásba lép a Gal80p proteinnel, és megakadályozza, hogy az gátolni tudja a Gal4p transzkripció aktivátort (Bhat és Murthy 2001). *K. lactis*-ban a galaktokináz aktivitás hiánya nem gátolja a Gal3p-t abban, hogy a β -galaktozidáz indukciót elősegítse, vagyis a katalitikus funkció elvesztése nem jelenti automatikusan a (megváltozott, csonkolt) fehérje szabályzó funkciójának megszűnését (Meyer és mtsai 1991). Feltételezve, hogy az *A. nidulans* galaktokináz mutáns továbbra is képes a (katalitikusan inaktív) galaktokináz fehérje előállítására, a fenn leírt galaktóz indukciós mechanizmus vélhetően rá is alkalmazható. Ettől függetlenül a galaktóz-1-foszfát-uridilil transzferáz mutánsban észlelt konstitutív β -galaktozidáz aktivitás más magyarázatot igényel, mivel a jelenség részleteiben eltér az élesztő esetében tapasztalttól. *K. lactis*-ban a jelenséget a D-galaktóz intracelluláris felszaporodásának tudták be, *A. nidulans*-ban viszont a konstitutív érték nem fokozható

D-galaktózzal. További eltérés, hogy *K. lactis*-ban csupán a stacioner fázisban jelent meg a β -galaktozidáz aktivitás, szemben az *A. nidulans*-sal, ahol a növekedés minden fázisában jelen volt. Emiatt úgy tűnik, *A. nidulans*-ban a galaktóz-1-foszfát-uridilil transzferáz a β -galaktozidáz aktivitás képződésének részleges represszorként működik, és a D-galaktóz csupán ezt a hatást ellensúlyozza. A modell hibája, hogy nem ad magyarázatot arra, miért csak részleges a derepresszió.

Az indukció mechanizmusától függetlenül az, hogy a galaktóz-1-foszfát-uridilil transzferáz mutáns β -galaktozidáz aktivitása teljes mértékben indukálható L-arabinózzal jelzi, a D-galaktóz és az L-arabinóz indukciós hatása két, nyilvánvalóan nem egyforma útvonalon jelentkezik, melyek közül az L-arabinózé nem gátolt a *galD* mutánsban. Mivel viszont az egyik monoszacharid sem képes a másik által kifejtett maximális indukciós értéket tovább fokozni, vagy ugyanazt a transzkripció aktivátort stimulálják, vagy a két transzkripció aktivátor olyannyira átfedi egymást, hogy egyszerre csak az egyik képes kötődni a DNS-hez. Vizsgálataink végső tanulsága, hogy *A. nidulans*-ban a β -galaktozidáz képződés indukciójának molekuláris mechanizmusai eltérőek a *K. lactis* élesztő esetében leírtaktól.

Munkánk második részében genetikai és biokémiai bizonyítékokat szereztünk egy alternatív (reduktív) D-galaktóz lebontási útvonal létezéséről *A. nidulans*-ban, melynek során a D-galaktóz először galaktitollá redukálódik, majd L-szorbozzá oxidálódik, s melyben az L-arabitol dehidrogenáz és a hexokináz enzimek esszenciális szerepet játszanak.

Mint a felsorolásból is látszik, még nem azonosítottuk a galaktitol képződésért felelős enzimet. Az *A. nidulans* dializált, sejtmentes kivonata ugyan – szigorúan NADPH, és nem NADH jelenlétében – katalizálta a D-galaktóz galaktitollá történő redukcióját, valamint NADP⁺ és nem NAD⁺ jelenlétében a galaktitol $\rightarrow$ D-galaktóz oxidációt, sajnos azonban nem ismerünk olyan *A. nidulans* mutánst, mely a fenti aktivitás keletkezésében lenne „loss-of-function”. Ennek az is oka lehet, hogy a fonalas gombák genomjában nem egy, hanem legalább kettő, de inkább még több aldóz reduktáz gén van jelen. Hasper és mtsai (2000) ugyanis hiába inaktiválták az *A. niger* xilóz reduktáz gént, az aktivitás egy része megmaradt, összhangban Witteveen és mtsai (1989) megfigyelésével, miszerint az L-arabinóz reduktáz kisebb hatékonysággal ugyan, de képes a D-xilózt is redukálni. Saját

vizsgálataink is azt mutatták, hogy a NADPH-függő aldóz reduktáz aktivitás D-xilózon szubsztrátumon volt a legmagasabb, ezt követte az L-arabinóz, majd a D-galaktóz.

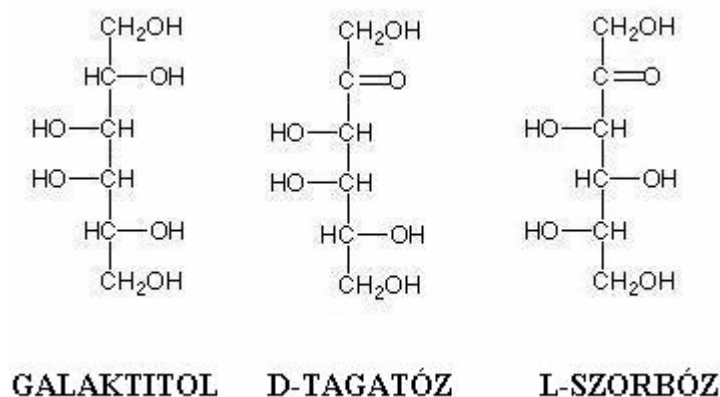
Emlős szövetekben a D-galaktóz galaktitolá történő redukcióját az aldóz reduktáz katalizálja; az aktivitás képződését elősegíti a Leloir-útvonal csökkent működése. Egy klasszikus példa a klinikai biokémiából az emberi galaktokináz deficiencia, melynek veleszületett katarakt (szürkehályog) lehet a következménye. A betegség során az aldóz reduktáz a D-galaktózt galaktitolá alakítja, amely feldúsul a szemlencsében (Ai és mtsai 2000), s ozmotikusan aktív anyag lévén jelentős mennyiségű vizet is magával vonz. Az aldóz reduktáz specifikus gátlása sokat ígérő terápiás stratégia a diabetes hosszútávú komplikációinak (retinopathia, szürkehályog) a megelőzésében (Kador és mtsai 1998, Banditelli és mtsai 1999). Mivel a gomba aldóz reduktáznak a D-galaktóz a szubsztrátuma, nagyon valószínű, hogy ez az enzim a felelős szerepet a munkánk során észlelt galaktitol felhalmozódásért (Verduyn és mtsai 1985, Singh és Schügerl 1992).

A reduktív galaktóz lebontási útvonal első lépésén kívül az L-szorbóz utáni szakasz sem egyértelmű még. A gombák L-szorbóz anyagcseréjéről rendkívül hiányosak az ismereteink, noha az L-szorbóz a fermentációs ipar fontos terméke; éves szinten kb. 25.000 t mennyiségben állítják elő D-szorbitolból, *Gluconobacter* fajok felhasználásával, a C-vitamin gyártása során (Lichtentaler 1998). Az *A. nidulans* esetében használhatatlan, gyakorlatilag mérgező szénforrásként írták le (MacCabe és mtsai 2003). Más gombák esetében ilyen hatásról nem tesznek említést, sőt *T. reesei* esetében az L-szorbózt mint potenciálisan celluláz inducer szénforrást említik (Nogawa és mtsai 2001).

Az L-szorbózt *A. nidulans*-ban a nagy affinitású glükóz transzporter veszi fel (MacCabe és mtsai 2003). Ez elvileg magyarázhatja a „toxikus” hatást, mivel azt a szerzők glükóz tartalmú minimál táptalajon észlelték. Mint említettük, gombákban csak a D-szorbitol $\rightarrow$ D-fruktóz $\rightarrow$ D-fruktóz-6-foszfát lebontási útvonalról találtunk hivatkozást (Elorza és Arst 1971). Baktériumokban az L-szorbóz anyagcsere oxidációs és redukciós lépéseket is magába foglal, pl. *Klebsiella pneumoniae*-ben az L-szorbóz-1-foszfátot az L-szorbóz-1-foszfát reduktáz gén terméke redukálja D-szorbitol-1-foszfáttá (Wohrl és mtsai 1990), *Lactobacillus casei*-ből pedig sikerült egy D-szorbitol-1-foszfát dehidrogenáz gént azonosítani (Yebrá és Perez-Martinez 2002). Mindkét génnel BLAST-keresést végeztünk az *A. nidulans* Cereon adatbázisában, de nem találtunk hasonló szekvenciákat. A fenti reakciók végbemenetele *A. nidulans*-ban ezért valószínűtlen.

Az *A. niger* hexokinázról azt közölték (Panneman és mta 1998), nem képes az L-szorbózt foszforilezni. Mivel az *A. nidulans* és az *A. niger* hexokináz aminosav-sorrendje nagyon hasonló, a megfigyelést csak az adott törzsrre specifikus sajátásgként tudjuk értelmezni, annál is inkább, mivel más eukarióta hexokinázoknak (vörös algától az emlősig) szubsztrátuma az L-szorbóz (Raushel és Cleland 1977, Van de Werve és Hers 1979, Oesterheld és Gross 2002). Mindenesetre a mi adataink világosan mutatják, hogy *in vitro* a hexokináz foszforilezi az L-szorbózt. Kísérletes adatunk jelenleg még nincs az L-szorbóz-foszfát pozíciójáról (elvileg C-6 és C-1 pozícióban történhet a foszforilezés), de mivel a gombák hexokináz enzimét a katalitikus mechanizmus alapján 6-foszfo transzferázként definiálják, elfogadtuk, hogy a foszfátcsoprt C-6 pozícióban van.

Az alternatív D-galaktóz lebontási útvonal egyik alapvető érdekessége, hogy nincsennek benne útvonal-specifikus enzimek, hanem más reakcióutakból már ismerteket használ. A galaktitol oxidáció az L-arabitol anyagcserében szerepet játszó L-arabitol dehidrogenáz révén történik (Chiang és Knight 1961), míg az L-szorbóz (vagy a D-fruktóz) foszforilezését a hexokináz végzi. Maga az útvonal a gombák D-xilóz és L-arabinóz lebontására emlékeztet (1. ábra), hiszen az aldóz először a megfelelő poliollá alakul, majd ez egy poliol dehidrogenáz révén ketózzá oxidálódik, ami foszforilálódik (Chiang és Knight 1959, 1961; Witteveen és mtsai 1989). A ketóz-foszfátok ribulóz-5-foszfáttá izomerizálódnak, ami a pentóz-foszfát útvonal köztese (Shi és mtsai 2000). Hexózkodra vonatkozó analóg reakciókat nem ismerünk, ezért nem tudjuk, hogy a fent leírt elvek a D-galaktóz reduktív lebontására is vonatkoznak-e.



21. ábra. A galaktitol, a D-tagatóz és az L-szorbóz szerkezeti képlete

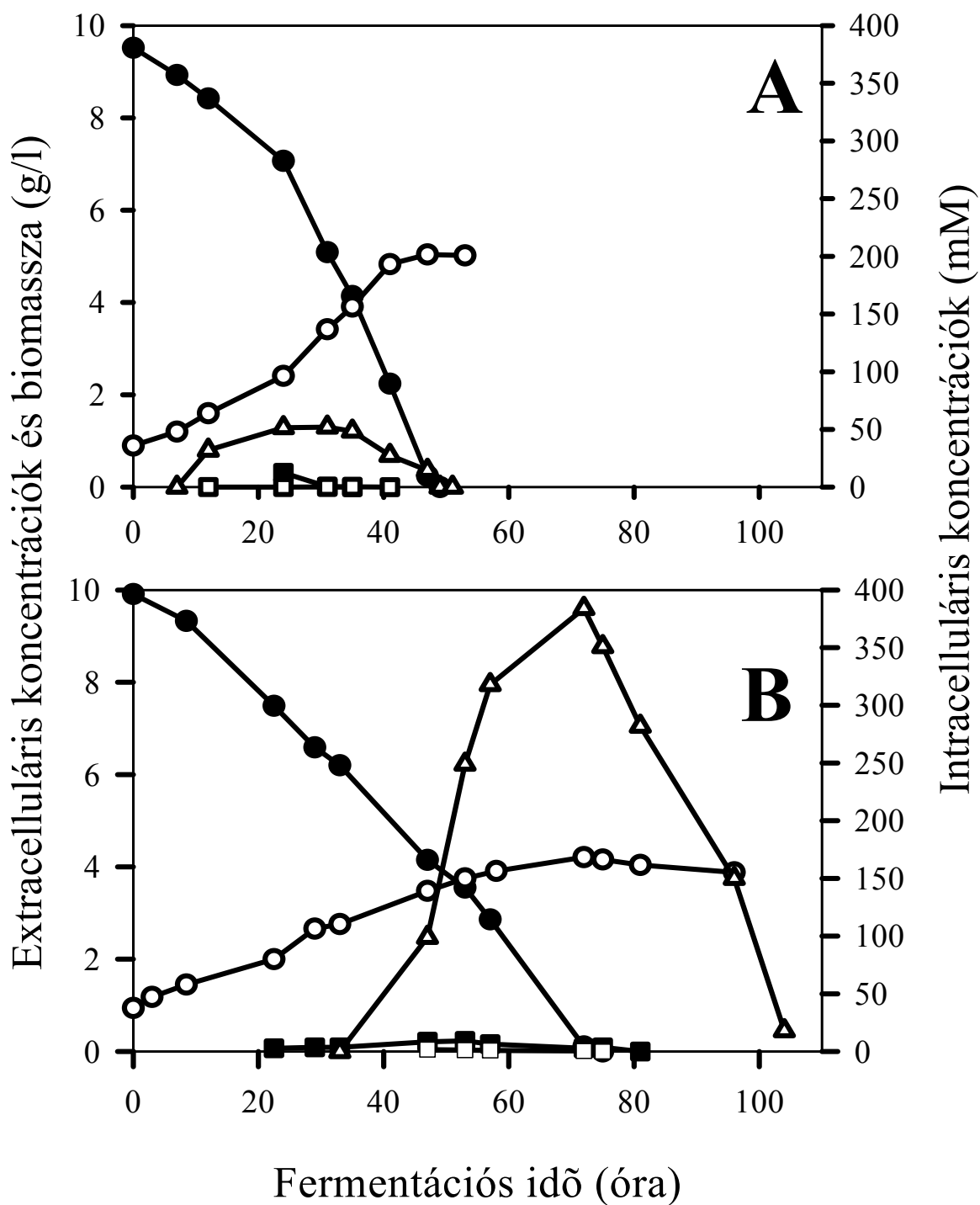
Az L-arabitol dehidrogenáz-galaktitol reakció végterméke, az L-szorbóz meglepő volt annyiban, hogy kémiaiilag a D-tagatóz lett volna a logikus reakciótermék. A **21. ábra** mutatja a galaktitol, a D-tagatóz és az L-szorbóz szerkezeti képletét. Látható, hogy az enzim nemcsak a C-2 hidroxilcsoportot oxidálja, hanem a C-4 és C-5 hidroxilcsoportok térszerkezetét is megváltoztatja, vagyis epimeráz funkciója is van.

Egyenlőre nehéz megítélni, mennyire jellemző a redukzív D-galaktóz lebontás a gombákra vagy tágabb értelemben az élőlényekre. Az útvonal eddig azonosított enzimei általánosan elterjedtek. További érv, hogy az útvonal az *A. nidulans*-tól rendszertanilag viszonylag távol álló *T. reesei*-ben is kimutatható volt. Mint a **22. ábra** mutatja, a *T. reesei* vad és galaktokináz mutáns törzsek időprofiljai (noha laktóz szénforráson növesztettük őket) nagyon hasonlóak voltak az *A. nidulans*-nál galaktózon tapasztalathoz, leszámítva az extracelluláris galaktóz megjelenését, ami a *T. reesei* erőteljes extracelluláris β -galaktozidáz aktivitásnak köszönhető.

Végezetül néhány gondolat munkánk talán legérdekesebb megfigyeléséről, a nitrát illetve az ammónium ionok szénforrás-asszimilációra kifejtett ellentétes hatásáról. Négy esetben: a *galE* mutáns galaktóz hasznosítása, az *araA1* mutáns L-arabitol hasznosítása, az *sbA3* mutáns D-szorbitol hasznosítása és a vad típus L-szorbóz hasznosítása kapcsán észleltük, hogy nitrát ionok kizárólagos jelenlétében nincs szénforrás felvétel, ammónium ionok használatánál azonban igen, ami növekedést is eredményez. A négy esetben az a közös, hogy háromnál van, D-szorbitol esetében feltételezhető egy poliol elem a katabolizmusban, aminek kialakulásához a cukor redukciója szükséges. Ezek a redukciók szigorúan NADPH-függők. A nitrát és az ammónium ionok asszimilációjának élettani szempontból talán legfontosabb különbsége, hogy a nitrát és nitrit redukció NADPH-t igényel. Munkahipotézisünk szerint ezért a nitrát jelenlétében észlelt gátló hatás a sejtek szabad NADPH-szintjének csökkenése miatt következett be – mivel az adott mutációk mellett mind a szén- mind a nitrogénforrás asszimilációjához NADPH szükséges, az igény meghaladta a sejt lehetőségeit. L-szorbóz esetében ezt vad genotípus mellett is észlelni lehetett. Ammónium-nitrát tartalmú táptalajon a törzsek fenotípusa ugyanolyan volt, mint ammónium-foszfáton, vagyis a nitrát ionok jelenléte önmagában nem gátló hatású.

Munkahipotézisünket nitrogén anyagcserében mutáns *A. nidulans* törzsek, illetve a NADPH-termelő pentóz-foszfát út kulcsenzimeinek (glükóz-6-foszfát dehidrogenáz, 6-foszfoglükonsav dehidrogenáz) overexpressziója révén próbáljuk bizonyítani. Ezek az

eredmények azonban már (remélhetőleg) egy másik doktori értekezés anyagát fogják képezni.



22. ábra. A *T. reesei* vad típus (A rész) és galaktokináz loss-of-function mutáns (B rész) időprofilja laktózon

Szimbólumok: laktóz koncentráció (●), növekedés (○), galaktitol koncentráció (Δ), intracelluláris galaktóz (□), extracelluláris galaktóz (■)

IRODALMI HIVATKOZÁSOK

1. Ai Y, Zheng Z, O'Brien-Jenkins A, Bernard DJ, Wynshaw-Boris T, Ning C, Reynolds R, Segal S, Huang K, Stambolian D (2000): A mouse model of galactose-induced cataracts. *Hum. Mol. Genet.* 9: 1821-1827.
2. Allen KE, McNally MT, Lowendorfs HS, Slayman, CW, Free SJ (1989): Deoxyglucose-resistant mutants of *Neurospora crassa*: isolation, mapping, and biochemical characterization. *J. Bacteriol.* 171: 53-58.
3. Arst HN Jr, Cove DJ (1973): Nitrogen metabolite repression in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Gen. Genet.* 126: 111-141.
4. Arst HN Jr, Penalva MA (2003): pH regulation in *Aspergillus* and parallels with higher eukaryotic regulatory systems. *Trends Genet.* 19: 224-231.
5. Arst HN Jr, Tollerwey D, Dowzer CEA, Kelly JM (1990): An inversion truncating the *creA* gene of *Aspergillus nidulans* results in carbon catabolite derepression. *Mol. Microbiol.* 4: 851-854.
6. Aspen AJ, Meister A (1962): Conversion of alpha-amino adipic acid to L-pipecolic acid by *Aspergillus nidulans*. *Biochemistry* 1: 606-612.
7. Bailey C, Arst HN Jr (1975): Carbon catabolite repression in *Aspergillus nidulans*. *Eur. J. Biochem.* 51: 573-577.
8. Banditelli S, Boldrini E, Vilardo PG, Cecconi I, Cappiello M, Dal Monte M, Marini I, Del Corso A, Mura U (1999): A new approach against sugar cataract through aldose reductase inhibitors. *Exp. Eye Res.* 69: 533-538.
9. Bentley R, Bhate DS (1960 a): Mutarotase from *Penicillium notatum*. I. Purification, assay, and general properties of the enzyme. *J. Biol. Chem.* 235: 1219-1224.
10. Bentley R, Bhate DS (1960 b): Mutarotase from *Penicillium notatum*. II. The mechanism of the mutarotation reaction. *J. Biol. Chem.* 235: 1225-1233.
11. Bettenbrock K, Alpert CA (1998): The *gal* genes for the Leloir pathway of *Lactobacillus casei* 64H. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 2013 – 2019.
12. Bhat PJ, Murthy TV (2001): Transcriptional control of the *GAL/MEL* regulon of yeast *Saccharomyces cerevisiae*: mechanism of galactose-mediated signal transduction. *Mol. Microbiol.* 40: 1059-1066.

13. Bhushan B, Halasz A, Spain J, Thiboutot S, Ampleman G, Hawari J (2002): Biotransformation of hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-tiazine catalyzed by a NAD(P)H: nitrate oxidoreductase from *Aspergillus niger*. *Environ. Sci. Technol.* 36: 3104-3108.
14. Biely P, Tenkanen M (1998): *Trichoderma* and *Gliocladium*. Enzymes, Biological Control and Commercial Applications (Harman GE and Kubicek CP, eds.) pp. 25-47. Taylor and Francis, London, UK.
15. Boles E, Liebetrau W, Hofmann M, Zimmermann FK (1994): A family of hexosephosphate mutases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* 220: 83-96.
16. Bouffard GG, Rudd KE, Adhya SL (1994): Dependence of lactose metabolism upon mutarotase encoded in the *gal* operon in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 244: 269-78.
17. Brown A (1990): Fed-batch and continuous culture. Fermentation Practical approach. (McNeil B, Harvey LM) IRL Press, Oxford.
18. Brown CE, Romano AH (1969): Evidence against necessary phosphorylation during hexose transport in *Aspergillus nidulans*. *J. Bacteriol.* 100: 1198-1203.
19. Cardinali G, Vollenbroich V, Jeon MS, de Graaf AA, Hollenberg CP (1997): Constitutive expression in *gal7* mutants of *Kluyveromyces lactis* is due to internal production of galactose as an inducer of the *Gal/Lac* regulon. *Mol. Cell. Biol.* 17: 1722 -1730.
20. Carraro DM, Ferreira Junior JR, Schumacher R, Pereira GG, Hollenberg CP, El-Dorry H (1998): A region of the cellobiohydrolase I promoter from the filamentous fungus *Trichoderma reesei* mediates glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*, dependent on mitochondrial activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 253: 407-414.
21. Carvalho M, de Ioannes P, Navarro C, Chavez R, Peirano A, Bull P, Eyzaguirre J (2003): Characterization of an alpha-L-arabinofuranosidase gene (*abf1*) from *Penicillium purpurogenum* and its expression. *Mycol. Res.* 107: 388-394.
22. Celenza JL, Carlson M (1986): A yeast gene that is essential for release from glucose repression encodes a protein kinase. *Science* 233: 1175-1180.

23. Chang YD, Dickinson RC (1988): Primary structure of the lactose permease gene from the yeast *Kluyveromyces fragilis*. Presence of an unusual transcript structure *J. Biol. Chem.* 263: 16696-16703.
24. Chassy BM, Thompson J (1983): Regulation and characterization of the galactose-phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system in *Lactobacillus casei*. *J. Bacteriol.* 154: 1204 -1214.
25. Chiang C, Knight SG (1959): D-Xylose metabolism by cell-free extracts of *Penicillium chrysogenum*. *Biochim. Biophys. Acta* 35: 454 - 463.
26. Chiang C, Knight SG (1960a): A new pathway of pentose metabolism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 3: 554-559.
27. Chiang C, Knight SG (1960b): Metabolism of D-xylose by moulds. *Nature* 188: 79-81.
28. Chiang C, Knight SG (1961): L-arabinose metabolism by cell-free extracts of *Penicillium chrysogenum*. *Biochim. Biophys. Acta* 46: 271-278.
29. Chiang C, Sih CJ, Knight SG (1958): D-Xylose metabolism by cell-free extracts of *Penicillium chrysogenum*. *Biochim. Biophys. Acta* 29: 664-665.
30. Clutterbuck (1972): Absence of laccase from yellow-spored mutants of *Aspergillus nidulans*. *J. Gen. Microbiol.* 70: 423-435.
31. Clutterbuck AJ (1981): An arabinose non-utilizing mutant *araA1*. *Asp. Newslett.* 15: 21.
32. Clutterbuck AJ (1997): The validity of the *Aspergillus nidulans* linkage map. *Fungal Genet. Biol.* 21: 267-277.
33. Cove DJ (1979): Genetic studies of nitrate assimilation in *Aspergillus nidulans*. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 54: 291-327.
34. Cubero B, Scazzocchio C (1994): Two different, adjacent and divergent zinc finger binding sites are necessary for CREA-mediated carbon catabolite repression in the proline gene cluster of *Aspergillus nidulans*. *EMBO J.* 13: 407-415.
35. Cziferszky A, Seiboth B, Kubicek CP (2003): The *Snf1* kinase of the filamentous fungus *Hypocrea jecorina* phosphorylates regulation-relevant serine residues in the yeast carbon catabolite repressor *Mig1* but not in the filamentous fungal counterpart *Cre1*. *Fungal Genet. Biol.* 40: 166-175.

36. Davies RW (1991): In Molecular Industrial Mycology. pp 45-81. Marcel Dekker, N.Y.
37. De Bruijne AW, Schuddemat J, van den Broek PJ, Van Steveninck J (1988): Regulation of sugar transport systems of *Kluyveromyces marxianus*: the role of carbohydrates and their catabolism. *Biochim Biophys Acta*. 939: 569-576.
38. De Vries RP, Flipphi MJ, Witteveen CFB, Visser J (1994): Characterization of an *Aspergillus nidulans* L-arabitol dehydrogenase mutant. *FEMS Microbiol. Letts*. 123: 83-90.
39. De Vries RP, van den Broek HC, Dekkers E, Manzanares P, de Graaff LH, Visser J (1999a): Differential expression of three α -galactosidase genes and a single β -galactosidase gene from *Aspergillus niger*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 2453 - 2460.
40. De Vries RP, Visser J, de Graaff LH (1999b): *CreA* modulates the *XlnR*-induced expression on xylose of *Aspergillus niger* genes involved in xylan degradation. *Res. Microbiol.* 150: 281-285.
41. Desai, JD, Modi, VV (1974): Phosphorus uptake in biotin deficient *Aspergillus nidulans*: an evidence for the involvement of binding protein in this process. *Indian J. Experim. Biol.* 12: 438-440.
42. Dey PM (1983): Galactokinase of *Vicia faba* seeds. *Eur. J. Biochem.* 136: 155-159.
43. Diaz M, Pedregosa AM, de Lucas JR, Torralba S, Monistrol IF, Laborda F (1996): Purification and properties of β -galactosidase from *Aspergillus nidulans*. *Microbiologia* 12: 585-592.
44. Dickson R. C, Riley MI (1989): The lactose-galactose regulon of *Kluyveromyces lactis*. *Biotechnol.* 13:19-40
45. Dowzer CEA, Kelly JM (1991): Analysis of the *creA* gene, a regulator of carbon catabolite repression in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Cell. Biol.* 11: 5701-5709.
46. Drysdale MR, Kolze SE, Kelly JM (1993): The *Aspergillus niger* carbon catabolite repressor encoding gene, *creA*. *Gene* 130: 241-245.
47. Dzikowska A, Kacprzak M, Tomecki R, Koper M, Scazzocchio C, Weglenski P (2003): Specific induction and carbon/nitrogen repression of arginine catabolism gene of *Aspergillus nidulans* - functional *in vivo* analysis of the *otaA* promoter. *Fungal. Genet. Biol.* 38: 175-186.

48. Elorza MV, Arst HN Jr (1971): Sorbose resistant mutants of *Aspergillus nidulans*. *Mol. Gen. Genet.* 111: 185-193.
49. Elshafei AM, Abdel-Fatah OM (2001): Evidence for a non-phosphorylated route of galactose breakdown in cell-free extracts of *Aspergillus niger*. *Enzyme Microb. Technol.* 29: 76-83.
50. Eriksson KE, Blanchette R.A, Ander P (1990): Microbial and Enzymatic Degradation of Wood and Wood Components. Springer-Verlag, Berlin, Németország.
51. Fantes PA, Roberts CF (1973): β -Galactosidase activity and lactose utilization in *Aspergillus nidulans*. *J. Gen. Microbiol.* 77: 471-486.
52. Fekete E, Karaffa L, Sándor E, Bányai I, Seiboth B, Gyémánt G, Sepsi A, Szentirmai A, Kubicek CP (2004): The alternative D-galactose degrading pathway of *Aspergillus nidulans* proceeds via L-sorbose. *Arch. Microbiol.* DOI: 10.1007/s00203-003-0622-8.
53. Fekete E, Karaffa L, Sándor E, Seiboth B, Biró S, Szentirmai A, Kubicek CP (2002): Regulation of formation of the intracellular β -galactosidase activity of *Aspergillus nidulans*. *Arch. Microbiol.* 179: 7-14.
54. Felenbok B, Flipphi M, Nikolaev I (2001): Ethanol catabolism in *Aspergillus nidulans*: a model system for studying gene regulation. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 69: 149-204.
55. Fiedurek J, Gromada A, Jamroz J (1995): Effect of medium components and metabolic inhibitors on β -galactosidase production and secretion by *Penicillium notatum* 1. *J. Basic Microbiol.* 1: 27-32.
56. Frey PA (1996): The Leloir pathway: a mechanistic imperative for three enzymes to change the stereochemical configuration of a single carbon in galactose. *FASEB J.* 10: 461-470.
57. Gajewski W, Litwinska W, Paszewski A, Chojnacki T (1972): Isolation and characterization of lactose non-utilizing mutants of *Aspergillus nidulans*. *Mol. Gen. Genet.* 116: 99-106.
58. Gancedo JM (1998): Yeast carbon catabolite repression. *Microb. Mol. Biol. Rev.* 62: 334-361.

59. Gross KC, Pharr DM (1982): A potential pathway for galactose metabolism in *Cucumis sativus* L., a stachyose transporting species. *Plant. Physiol.* 69: 117-121.
60. Hasper AA, Visser J, de Graaff LH (2000): The *Aspergillus niger* transcriptional activator XlnR, which is involved in the degradation of the polysaccharides xylan and cellulose, also regulates D-xylose reductase gene expression. *Mol. Microbiol.* 36: 193-200.
61. Holden HM, Rayment I, Thoden JB (2003): Structure and function of enzymes of the Leloir pathway for galactose metabolism. *J. Biol. Chem.* 278: 43885-43888.
62. Hu Z, Yue Y, Jiang H, Zhang B, Sherwood PW, Michels CA (2000): Analysis of the mechanism by which glucose inhibits maltose induction of *MAL* gene expression in *Saccharomyces*. *Genetics* 154: 121-132.
63. Huwing A, Emmel S, Jäkel, G, Giffhorn F (1998): Enzymatic synthesis of L-tagatose from galactitol dehydrogenase from *Rhodobacter sphaeroides* D. *Carbohydrate Res.* 305: 337-339.
64. Hynes MJ, Kelly JM (1977): Pleiotropic mutants of *Aspergillus nidulans* altered in carbon metabolism. *Mol. Gen. Genet.* 150: 193-204.
65. Ilmen M, Thrane C, Penttilä M (1996): The glucose repressor gene *cre1* of *Trichoderma*: isolation and expression of a full-length and a truncated mutant form. *Mol. Gen. Genet.* 251: 451-460.
66. Jeffries T (1985): Emerging technology for fermenting D-xylose. *Trends Biotechnol.* 3: 206-211.
67. Johnston M (1987): A model fungal gene regulatory mechanism: the *GAL* genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* 51: 458-476.
68. Kador PF, Inoue J, Secchi EF, Lizak MJ, Rodriguez L, Mori K, Greentree W, Blessing K, Lackner PA, Sato S (1998): Effect of sorbitol dehydrogenase inhibition on sugar cataract formation in galactose-fed and diabetic rats. *Exp. Eye Res.* 67: 203-208.
69. Käfer E (1958): An 8-chromosome map of *Aspergillus nidulans*. *Adv. Genet.* 9: 105-145.
70. Käfer E (1977): Meiotic and mitotic recombination in *Aspergillus* and its chromosomal aberrations. *Adv. Genet.* 19: 33-131.

71. Karaffa L, Sándor E, Kozma J, Kubicek CP, Szentirmai A (1999): The role of the alternative respiratory pathway in the stimulation of cephalosporin C formation by soybean oil in *Acremonium chrysogenum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51: 633-638.
72. Karaffa L, Sándor E, Kozma J, Szentirmai A (1997): Methionine enhances sugar consumption, fragmentation, vacuolation and cephalosporin-C production in *Acremonium chrysogenum*. *Proc. Biochem.* 32: 495-499.
73. Karaffa L, Sándor E, Kozma J, Szentirmai A (1996): Cephalosporin-C production, morphology and alternative respiration of an *Acremonium chrysogenum* in glucose-limited chemostat. *Biotech. Letts.* 18: 701-706.
74. Kinoshita S, Kadota K, Taguchi H (1981): Purification and properties of aldose 1-epimerase from *Aspergillus niger*. *Biochim. Biophys. Acta* 662: 285-290.
75. Kozma J, Bartók G, Szentirmai A (1993): Fructose-2,6-bisphosphate level and β -lactam formation in *Penicillium chrysogenum*. *J. Basic Microbiol.* 33: 27-34.
76. Krahe M, Antranikian G, Markl H (1996): Fermentation of extremophilic microorganisms. *FEMS Microbiol. Rev.* 18: 271-285.
77. Kubicek CP (1992): The cellulase proteins of *Trichoderma reesei*: storage, multiplicity, mode of action and regulation of formation. *Adv. Biochem. Engin. Biotechnol.* 45: 1-27.
78. Kulmburg P, Mathieu M, Dowzer C, Kelly J, Felenbok B (1993): Specific binding sites in the *alcR* and *alcA* promoters of the ethanol regulon for the *CREA* repressor mediating carbon catabolite repression in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol.* 7: 847-857.
79. Lichtentaler FW (1998): Towards improving the utility of ketoses as organic raw materials. *Carbohydrate Res.* 313: 69-89.
80. Lutfiyya LL, Johnston M (1996): Two zinc-finger-containing repressors are responsible for glucose repression of *SUC2* expression. *Mol. Cell. Biol.* 16: 4790-4797.
81. MacCabe AP, Miro P, Ventura L, Ramon D (2003): Glucose uptake in germinating *Aspergillus nidulans* conidia: involvement of the *creA* and *sorA* genes. *Microbiology* 149: 2129-2136.

82. Mach RL, Strauss J, Zeilinger S, Schindler M, Kubicek CP (1996): Carbon catabolite repression of xylanase I (*xyn1*) gene expression in *Trichoderma reesei*. *Mol. Microbiol.* 21: 1273-1281.
83. Machado de Domenech EE, Sols A (1980): Specificity of hexokinases towards some uncommon substrates and inhibitors. *FEBS Lett.* 119: 174-176.
84. Maiera A, Völcker B, Boles E, Fuhrmann GF (2002): *FEMS Yeast Res.* 2: 539-550.
85. Mandels MM, Andreotti RE (1978): The cellulose to cellulase fermentation. *Proc. Biochem.* 13: 6-13.
86. Margolles-Clark E, Saloheimo M, Siika-Aho M, Penttälä ME (1996d): The alpha-glucuronidase-encoding gene of *Trichoderma reesei*. *Gene* 172: 171-172.
87. Margolles-Clark E, Tenkanen M, Luonteri E, Penttälä ME (1996a): Three alpha-galactosidase genes of *Trichoderma reesei* cloned by expression in yeast. *Eur. J. Biochem.* 240: 104-111.
88. Margolles-Clark E, Tenkanen M, Nakari-Setälä T, Penttälä ME (1996b): Cloning of genes encoding alpha-L-arabinofuranosidase and beta-xylosidase from *Trichoderma reesei* by expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 3840-3846.
89. Margolles-Clark E, Tenkanen M, Söderlund H, Penttälä ME (1996c): Acetyl xylan esterase from *Trichoderma reesei* contains an active-site serine residue and a cellulose-binding domain. *Eur. J. Biochem.* 237: 553-560.
90. Martin-Zanca DM, Martin JF (1983): Carbon catabolite regulation of the conversion of penicillin N into cephalosporin C. *J. Antibiot. (Tokyo)* 36 (6): 700-708.
91. Mathieu M, Felenbok B (1994): ***The Aspergillus nidulans CREA protein mediates glucose repression of the ethanol regulon at various levels through competition with the ALCR-specific transactivator.*** *EMBO J.* 13: 4022-4027.
92. Medintz I, Wang X, Hradek T, Michels CA (2000): A PEST-like sequence in the N-terminal cytoplasmic domain of *Saccharomyces* maltose permease is required for glucose-induced proteolysis and rapid inactivation of transport activity. *Biochemistry* 39: 4518-4526.

93. Meyer J, Walker-Jonah A, Hollenberg CP (1991): Galactokinase encoded by *GAL1* is a bifunctional protein required for the induction of the *GAL* genes in *Kluyveromyces lactis* and is able to suppress the *gal3* phenotype of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 11: 5454-5461.
94. Nagy Z, Keresztessy Z, Szentirmai A, Biró S (2001a): Carbon source regulation of beta-galactosidase biosynthesis in *Penicillium chrysogenum*. *J. Basic Microbiol.* 41: 351-362.
95. Nagy Z, Kiss T, Szentirmai A, Biró S (2001b): Beta-galactosidase of *Penicillium chrysogenum*: production, purification, and characterization of the enzyme. *Protein Expr. Purif.* 21: 24-29.
96. Nikolaev IV, Vienzski YP (1998): L-arabinose induces synthesis of secreted β -galactosidase in the filamentous fungus *Penicillium canescens*. *Biochem. (Moscow)* 63: 1294-1298.
97. Nogawa M, Goto M, Okada H, Morikawa Y (2001): L-Sorbose induces cellulase gene transcription in the cellulolytic fungus *Trichoderma reesei*. *Curr. Genet.* 38: 329-334.
98. Oesterhelt C, Gross W (2002): Different sugar kinases are involved in the sugar sensing of *Galdieria sulphuraria*. *Plant Physiol.* 128: 291-299.
99. Östling J, Carlberg M, Ronne H (1996): Functional domains in the *Mig1* repressor. *Mol. Cell. Biol.* 16: 753-761.
100. Özcan S, Johnston M (1996): Two different repressors collaborate to restrict expression of the yeast glucose transporter genes *HXT2* and *HXT4* to low levels of glucose. *Mol. Cell. Biol.* 16: 5536-5545.
101. Panneman H, Ruijter GJ, van den Broeck HC, Visser J (1998): Cloning and biochemical characterisation of *Aspergillus niger* hexokinase - the enzyme is strongly inhibited by physiological concentrations of trehalose 6-phosphate. *Eur. J. Biochem.* 258: 223-232.
102. Patterson MS, Greene RC (1965): Measurement of low energy beta-emitters in aqueous solution by liquid scintillation counting of emulsion. *Anal. Chem.* 37: 854-857.
103. Penttilä ME (1998): Heterologous protein production in *Trichoderma*. In: Harman GE, Kubicek CP (Eds.). *Trichoderma and Gliocladium* Vol. 2. Enzymes,

- Biological Control and Applications, 2. Taylor and Francis Ltd, London, UK, pp. 365-383.
104. Peterson GL (1983): Determination of total protein. *Methods Enzymol.* 91: 86-105.
 105. Pirt SJ (1975): Principle of microbe and cell cultivation. Blackwell Scientific Publication 1. kiadás, Oxford, U.K. 156-170.
 106. Pontecorvo G, Roper JA, Hemmons LM, Macdonald KD, Button AWJ (1953): The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Adv. Genet.* 5: 141-238.
 107. Puri RN, Bhatnagar D, Roskoski R Jr (1988): Inactivation of yeast hexokinase by o-phthalaldehyde: evidence for the presence of a cysteine and a lysine at or near the active site. *Biochim. Biophys. Acta* 957: 34-46.
 108. Raushel FM, Cleland WW (1977): Bovine liver fructokinase: purification and kinetic properties. *Biochemistry* 16: 2169-2175.
 109. Reen FJ, Murray PG, Tuohy MG (2003): Molecular characterisation and expression analysis of the first hemicellulase gene (*bx11*) encoding beta-xylosidase from the thermophilic fungus *Talaromyces emersonii*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 305 (3): 579-585.
 110. Roberts CF (1963): The genetic analysis of carbohydrate utilization in *Aspergillus nidulans*. *J. Gen. Microbiol.* 31:45-58.
 111. Roberts CF (1967): Complementation analysis of the tryptophan pathway in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* 55: 233-239.
 112. Roberts CF (1970): Enzyme lesions in galactose non-utilizing mutants of *Aspergillus nidulans*. *Biochim. Biophys. Acta* 201: 267-283.
 113. Roelfsema WA, Kuster FM, Pluim H (1990): Lactose and derivatives. Elvers B, Hawkins S, Schulz G (eds) Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 4th ed. pp 107-114. VCH Weinheim FRG
 114. Romano AH, Kornberg HL (1968): Regulation of sugar uptake by *Aspergillus nidulans*. *Proc. Roy. Soc. B.* 173: 475-490.
 115. Roper JA (1950): Search for linkage between genes determining a vitamin requirement. *Nature* 166: 956.
 116. Rose M, Albig W, Entian KD (1991): Glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae* is directly associated with hexose phosphorylation by hexokinases *PI* and *PII*. *Eur. J. Biochem.* 199: 511-518.

117. Rudolph MT, Jesse C, Mary LH (1949): The use of azoalbumin as a substrate in the colorimetric determination of peptic and tryptic activity. *J. Lab. Clin. Med.* 34: 428-433.
118. Ruijter G, Vanhanen SA, Gielkens MMC, van de Vondervoort P, Visser J (1997): Isolation of *Aspergillus niger creA* mutants and effects of the mutations on expression of arabinases and L-arabinose catabolic enzymes. *Microbiol. UK* 143: 2991-2998.
119. Ruijter GJ, Panneman H, van den Broeck HC, Bennett JM, Visser J (1996): Characterisation of the *Aspergillus nidulans frA1* mutant: hexose phosphorylation and apparent lack of involvement of hexokinase in glucose repression. *FEMS Microbiol. Letts.* 139: 223-228.
120. Sándor E, Karaffa L, Paul GC, Pócsi I, Thomas CR, Szentirmai A (2000): Assessment of the metabolic activity of *Acremonium chrysogenum* using Acridine Orange. *Biotechn. Letts.* 22: 693-697.
121. Sándor E, Pusztahelyi T, Karaffa L, Karányi Z, Pócsi I, Biró S, Szentirmai A, Pócsi I (1998): Allosamidin inhibits the fragmentation of *Acremonium chrysogenum* but does not influence the cephalosporin-C production of the fungus. *FEMS Microbiol. Lett.* 164: 231-236.
122. Sándor E, Szentirmai A, Biró S, Karaffa L (1999): Specific cephalosporin C production of *Acremonium chrysogenum* is independent of the culture density. *Biotechn. Techn.* 13: 443-445.
123. Sándor E, Szentirmai A, Paul GC, Thomas CR, Pócsi I, Karaffa L (2001): Analysis of the relationship between growth, cephalosporin C production and fragmentation in *Acremonium chrysogenum*. *Can. J. Microbiol.* 47: 801-806.
124. Schneider RP, Wiley WR (1971): Kinetic characteristics of the two glucose transport systems in *Neurospora crassa*. *J. Bacteriol.* 106: 487-492.
125. Seiboth B, Hartl L, Pail M, Fekete E, Karaffa L, Kubicek CP (2003): The galactokinase of *Hypocrea jecorina* is essential for cellulase induction by lactose but dispensable for growth on D-galactose. *Molecular Microbiology* DOI 10.1046/j.1365-2958.2003.03901.x
126. Seiboth B, Hofmann G, Kubicek CP (2002b): Lactose metabolism and cellulase production in *Hypocrea jecorina*: the *gal7* gene, encoding galactose-1-phosphate

- uridylyltransferase, is essential for growth on galactose but not for cellulase induction. *Mol. Genet. Genomics* 267: 124-32.
127. Seiboth B, Karaffa L, Sándor E, Kubicek CP (2002a): The *Hypocrea jecorina* gal10 (uridine 5'-diphosphate-glucose 4-epimerase-encoding) gene differs from yeast homologues in structure, genomic organization and expression. *Gene*. 295: 143-149.
 128. Shi NQ, Prahl K, Hendrick J, Cruz J, Lu P, Cho JY, Jones S, Jeffries T (2000): Characterization and complementation of a *Pichia stipitis* mutant unable to grow on D-xylose or L-arabinose. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 84: 201-216.
 129. Shroff RA, Lockington RA, Kelly JM (1996): Analysis of mutations in the *creA* gene involved in carbon catabolite repression in *Aspergillus nidulans*. *Can. J. Microbiol.* 42: 950-959.
 130. Shroff RA, O'Connor SM, Hynes MJ, Lockington RA, Kelly JA (1997): Null alleles of *creA*, the regulator of carbon catabolite repression in *Aspergillus nidulans*. *Fung. Gen. Biol.* 22: 28-38.
 131. Shuster CW, Doudoroff M (1967): Purification of 2-keto-3-deoxy-6-phosphohexonate aldolases of *Pseudomonas saccharophila*. *Arch. Mikrobiol.* 59: 279-86.
 132. Singh A, Schügerl K (1992): Induction and regulation of D-xylose catabolizing enzymes in *Fusarium oxysporum*. *Biochem. Int.* 28: 481-488.
 133. Slayman CW, Tatum EL (1964): Potassium transport in *Neurospora*: I. Intracellular sodium and potassium concentrations, and cation requirements for growth. *Biochim. Biophys. Acta* 88: 578-592.
 134. Soden DM, Dobson AD (2003): The use of amplified flanking region-PCR in the isolation of laccase promoter sequences from the edible fungus *Pleurotus sajor-caju*. *J. Appl. Microbiol.* 95: 553-562.
 135. Stapleton PC, Dobson AD (2003): Carbon repression of cellobiose dehydrogenase production in the white rot fungus *Trametes versicolor* is mediated at the level of gene transcription. *FEMS Microbiol. Lett.* 221: 167-172.
 136. Strauss J, Horvath HK, Abdallah BM, Kindermann J, Mach RL, Kubicek CP (1999): The function of *CreA*, the carbon catabolite repressor of *Aspergillus*

- nidulans*, is regulated at the transcriptional and post-transcriptional level. *Mol. Microbiol.* 32: 169-178.
137. Strauss J, Mach RL, Zeilinger S, Hartler G, Stöffler G, Wolschek M, Kubicek CP (1995): *Cre1*, the carbon catabolite repressor protein from *Trichoderma reesei*. *FEBS Letters* 376: 103-107.
 138. Suominen P, Rainikainen T (1993): eds. *Trichoderma reesei* cellulases and other hydrolases. Enzyme structures, biochemistry, genetics and applications. Foundation for Biotechnical and Industrial Fermentation Research Vol. 8. Fagepaino Oy Helsinki.
 139. Takashima S, Nakamura A, Iikura H, Masaki H, Uozumi T (1996): Cloning of a gene encoding a putative carbon catabolite repressor from *Trichoderma reesei*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 60: 173-176.
 140. Timell TE (1967): Recent progress in the chemistry of wood hemicelluloses. *Wood Sci. Technol.* 1: 47-76.
 141. Tonukari NJ, Scott-Craig JS, Walton JD (2000): The *Cochliobolus carbonum* SNF1 gene is required for cell wall-degrading enzyme expression and virulence on maize. *Plant Cell* 12: 237-248.
 142. Tonukari NJ, Scott-Craig JS, Walton JD (2003): Isolation of the carbon catabolite repressor (*CreA*) gene from the plant-pathogenic fungus *Cochliobolus carbonum*. *DNA Seq.* 14: 103-107.
 143. Torres ND, Comas-Riol JM, Wolschek M, Kubicek CP (1996): Glucose transport by *Aspergillus niger*. The low affinity carrier is only formed during growth on high glucose concentrations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 44: 790-794.
 144. Trumbly RJ (1992): Glucose repression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* 6: 5-21.
 145. Van de Werve G, Hers HG (1979): Mechanism of activation of glycogen phosphorylase by fructose in the liver. Stimulation of phosphorylase kinase related to the consumption of adenosine triphosphate. *Biochem J.* 178: 119-126.
 146. Vautard G, Cotton P, Fevre M (1999): The glucose repressor CRE1 from *Sclerotinia sclerotiorum* is functionally related to CREA from *Aspergillus nidulans* but not to the Mig proteins from *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 453: 54-58.

147. Verduyn C, Van Kleef R, Frank J, Schreuder H, Van Dijken JP, Scheffers WA (1985): Properties of the NAD(P)H-dependent xylose reductase from the xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis*. *Biochem J.* 226: 669-677.
148. Verhees CH, Koot DG, Ettema TJ, Dijkema C, de Vos WM, van der Oost J (2002): Biochemical adaptations of two sugar kinases from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *Biochem. J.* 366: 121-127.
149. Voragen AGJ, Gruppen H, Verbruggen MA, Victor RJ (1992) Xylans and Xylanases (Visser J és mtsai, eds.), pp. 51-67.
150. Wallenfels K, Hucho F, Herrmann K (1965): Enzymatically catalyzed mutarotation of aldoses. Studies on aldose-1-epimerase from *E. coli*. *Biochem. Z.* 343: 307-325.
151. Webster TD, Dickson RC (1988): The organization and transcription of the galactose gene cluster in *Kluyveromyces lactis*. *Nucl. Acids Res.* 16: 8011-8028.
152. Wilkie KCB (1979): The hemicelluloses of grasses and cereals. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 36: 215-264.
153. Wilkie KCB (1983): Hemicellulose. *Chem. Technol.* 13: 306-319.
154. Witteveen CFB, Busink R, van der Vondervoort P, Dijkema C, Swart K, Visser J (1989): L-arabinose and D-xylose catabolism in *Aspergillus niger*. *J. Gen. Microbiol.* 135: 2163-2171.
155. Wohrl BM, Sprenger GA, Lengeler JW (1990): Construction of a new catabolic pathway for D-fructose in *Escherichia coli* K12 using an L-sorbose-specific enzyme from *Klebsiella pneumoniae*. *Arch. Microbiol.* 154: 162-167.
156. Yebra MJ, Perez-Martinez G (2002): Cross-talk between the L-sorbose and D-sorbitol (D-glucitol) metabolic pathways in *Lactobacillus casei*. *Microbiol. UK.* 148: 2351-2359.

TÉZISEK

A munkánk során született új tudományos eredmények alapján az alábbi téziseket fogalmazzuk meg:

1. Az *Aspergillus nidulans* laktóz felvétele CreA-függő glükóz represszió alatt áll.
2. Az *Aspergillus nidulans* β -galaktozidáz aktivitásának képződése CreA-függő, többlépcsős glükóz represszió alatt áll.
3. Az *Aspergillus nidulans* β -galaktozidáz aktivitásának képződését a D-galaktóz és az L-arabinóz nem azonos mechanizmus révén indukálja.
4. Az *Aspergillus nidulans* rendelkezik egy galaktokináz-független D-galaktóz lebontási útvonallal. Az útvonal elemei közül köztesként azonosítottuk a galaktitolt és az L-szorbózt, illetve enzimként az L-arabitol dehidrogenázt és a hexokinázt.
5. Az *Aspergillus nidulans* a hexokináz aktivitás révén *in vitro* foszforilezni tudja az L-szorbózt, továbbá szénforrásként hasznosítva növekedni is tud rajta.
6. Egy új, ioncserés HPLC-elválasztás révén 5 %-os hibán belül meghatározható a galaktokináz aktivitás mértéke. A módszer alapja a galaktóz + ATP $\rightarrow$ galaktóz-1-foszfát + ADP reakció során képződő galaktóz-1-foszfát mennyiségi meghatározása. A módszert *Aspergillus nidulans* és *Trichoderma reesei* esetében próbáltuk ki.

PUBLIKÁCIÓS LISTA

DOKTORI ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK

- 1) **FEKETE E**, KARAFFA L, SÁNDOR E, SEIBOTH B, BIRÓ S, SZENTIRMAI A, KUBICEK CP (2002): Regulation of formation of the intracellular β -galactosidase activity of *Aspergillus nidulans*. *Archives of Microbiology* **179**: 7-14. **Impakt faktor: 2,156**
- 2) **FEKETE E**, KARAFFA L, SÁNDOR E, BÁNYAI I, SEIBOTH B, GYÉMÁNT GY, SEPSI A, SZENTIRMAI A, KUBICEK CP (2003): The alternative D-galactose degrading pathway of *Aspergillus nidulans* proceeds via L-sorbose. *Archives of Microbiology* DOI 10.1007/s00203-003-0622-8. **Impakt faktor: 2,156**
- 3) SEIBOTH B, HARTL L, PAIL M, **FEKETE E**, KARAFFA L, KUBICEK CP (2003): The galactokinase of *Hypocrea jecorina* is essential for cellulase induction by lactose but dispensable for growth on D-galactose. *Molecular Microbiology* DOI 10.1046/j.1365-2958.2003.03901.x **Impakt faktor: 6,398**

TOVÁBBI REFERÁLT KÖZLEMÉNYEK

- 1) KARAFFA L, SÁNDOR E, **FEKETE E**, SZENTIRMAI A (2001): The biochemistry of citric acid accumulation by *Aspergillus niger*. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* **48**: 429-441.
- 2) SÁNDOR E, **FEKETE E**, KARAFFA L (2003): Regulation of the cyanide-resistant alternative respiratory pathway in the fungus *Acremonium chrysogenum*. *Food Technology and Biotechnology* **41**: 43-47. **Impakt faktor: 0,305**
- 3) KARAFFA L, SÁNDOR E, **FEKETE E**, KOZMA J, SZENTIRMAI A, PÓCSI I (2003): Stimulation of the cyanide-resistant alternative respiratory pathway by oxygen in *Acremonium chrysogenum* correlates with the size of the intracellular peroxide pool. *Canadian Journal of Microbiology* **49**: 216-220. **Impakt faktor: 1,071**
- 4) NAGY MA, EMRI T, **FEKETE E**, SÁNDOR E, SPRINGAEL JY, PENNINCKX MJ, 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. **Impakt faktor: 0,976**

IDEGENNYELVŰ ABSZTRAKTOK, PROCEEDING-EK

- 1) SÁNDOR E, KARAFFA L, PÓCSI I, **FEKETE E**, KOZMA J, SZENTIRMAI A (1997): Is there any causal relationship between fragmentation and cephalosporin C production of *Acremonium chrysogenum*? *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* **44**: 414.
- 2) SÁNDOR E, **FEKETE E**, KARAFFA L, SZENTIRMAI A, PÓCSI I (1999): Effect of sulphur-containing amino acids on the glutathione metabolism and cephalosporin C production of *Acremonium chrysogenum*. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* **46**: 347-348.
- 3) KARAFFA L, **FEKETE E**, SÁNDOR E, SEPSI A, SEIBOTH B, SZENTIRMAI A, KUBICEK CP (2002): Carbon catabolite repression in the regulation of β -galactosidase activity in *Aspergillus nidulans*. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* **49**: 261-265.
- 4) **FEKETE E**, SÁNDOR E, SEPSI A, SZENTIRMAI A, KUBICEK CP, KARAFFA L (2002): Analysis of the phenotype of an *Aspergillus nidulans* mutant deficient in galactose-1-phosphate uridylyl transferase activity. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* **49**: 396.
- 5) **FEKETE E**, SÁNDOR E, SEPSI A, SZENTIRMAI A, KUBICEK CP, KARAFFA L (2002): Intracellular β -galactosidase activity is induced by hemicellulose monomers and repressed by CreA in *Aspergillus nidulans*. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* **49**: 396.
- 6) KARAFFA L, SÁNDOR E, **FEKETE E**, SZENTIRMAI A, PÓCSI I (2002): Oxygen and its free radicals in the production of cephalosporin C by *Acremonium chrysogenum*. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* **49**: 400.
- 7) **FEKETE E**, KARAFFA L, SÁNDOR E, SEIBOTH B, SZENTIRMAI A, KUBICEK CP (2001): β -galactosidase formation in *Aspergillus nidulans*. *Mededelingen Faculteit Landbouwkundige en Toegepaste Biologische Wetenschappen Universiteit Gent* **66/3a**: 285-287.
- 8) KARAFFA L, **FEKETE E**, SÁNDOR E, SEPSI A, SEIBOTH B, SZENTIRMAI A, KUBICEK CP (2002): Carbon catabolite repression in the regulation of β -galactosidase activity in *Aspergillus nidulans*. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* **49**: 261-265.

FONTOSABB ELŐADÁSOK, POSZTEREK

- 1) **FEKETE E**, SÁNDOR E, BIRÓ S, KOZMA J, SZENTIRMAI A, KARAFFA L: Az *Aspergillus nidulans* laktóz anyagcseréjének néhány sajátága (IX. Fermentációs Kollokvium, Debrecen, 2000).
- 2) **FEKETE E.**, KARAFFA L, SEPSI A, SÁNDOR E, BIRÓ S, SZENTIRMAI A, KUBICEK CP (2001): A karbon katabolit represszió szerepe az *Aspergillus nidulans* β -galaktozidáz

enzimének képződésében (az 50 éves Magyar Mikrobiológiai Társaság jubileumi nagygyűlése, Balatonfüred, 2001).

- 3) **FEKETE E**, SEPSI A, KARAFFA L, SÁNDOR E, SZENTIRMAI A, KUBICEK CP A β -galaktozidáz enzim szabályozása *Aspergillus nidulans* LeLoir-útvonalban sérült mutánsaiban (az 50 éves Magyar Mikrobiológiai Társaság jubileumi nagygyűlése, Balatonfüred, 2001).
- 4) **FEKETE E**, SÁNDOR E, SEPSI A, SZENTIRMAI A, KUBICEK CP, KARAFFA L: Galaktóz-1-foszfát-uridilil transzferáz hiányos *Aspergillus nidulans* mutáns fenotípusának elemzése (II. Magyar Mikológiai Konferencia, Szeged, 2002).
- 5) **FEKETE E**, SÁNDOR E, SEPSI A, SZENTIRMAI A, KUBICEK CP, KARAFFA L: Hemicellulóz monomerek indukálják, a CreA represszálja az *Aspergillus nidulans* intracelluláris β -galaktozidáz aktivitását (II. Magyar Mikológiai Konferencia, Szeged, 2002).
- 6) KARAFFA L, SÁNDOR E, **FEKETE E**, SZENTIRMAI A, PÓCSI I: Az oxigén és oxigén szabadgyökök szerepe az *Acremonium chrysogenum* cephalosporin C termelésében (II. Magyar Mikológiai Konferencia, Szeged, 2002).
- 7) BALOGH G, SÁNDOR E, **FEKETE E**, JUHÁSZ A, SERESS P, BAKONDI I, OLÁH A, PETHŐ CS, KARAFFA L, SZENTIRMAI A: Characterization of a fermentation by the lovastatin producer *Aspergillus terreus* (II. Magyar Mikológiai Konferencia, Szeged, 2002).
- 8) SÁNDOR E, **FEKETE E**, SZENTIRMAI A, THOMAS CR, PAUL GC, KARAFFA L: Mycelial fragmentation vis~á~vis cephalosporin C production in *Acremonium chrysogenum* (Power of Microbes in Industry and Environment Congress, Opatija, Horvátország, 2002).
- 9) **FEKETE E**, SÁNDOR E, PÓCSI I, SZENTIRMAI A, KARAFFA L: Regulation of the cyanide-resistant alternative oxidase in *Acremonium chrysogenum* (Power of Microbes in Industry and Environment Congress, Opatija, Horvátország, 2002).
- 10) **FEKETE E**, SÁNDOR E, SZENTIRMAI A, KUBICEK CP, KARAFFA L: A galaktóz lebontás alternatív útvonala *Aspergillus nidulans*-ban (A Magyar Mikrobiológiai Társaság Nagygyűlése, Balatonfüred, 2002).
- 11) SÁNDOR E, **FEKETE E**, SZENTIRMAI A, KUBICEK CP, KARAFFA L: A β -galaktozidáz aktivitás vizsgálata *Aspergillus nidulans*-ban (A Magyar Mikrobiológiai Társaság Nagygyűlése, Balatonfüred, 2002).
- 12) SEPSI A, **FEKETE E**, SÁNDOR E, SZENTIRMAI A, KUBICEK CP, KARAFFA L: Az *Aspergillus nidulans* L-arabitol-dehidrogenáz mutáns fenotípus vizsgálata (A Magyar Mikrobiológiai Társaság Nagygyűlése, Balatonfüred, 2002).

- 13) SERESTER OK, **FEKETE E**, KÓNYA J, NAGY N, SZENTIRMAI A, KARAFFA L: A laktóz permeáz vizsgálata *Aspergillus nidulans*-ban (A Magyar Mikrobiológiai Társaság Nagygyűlése, Balatonfüred, 2002).
- 14) **FEKETE E**, SÁNDOR E, SZENTIRMAI A, KUBICEK CP, KARAFFA L: Regulation of formation of the intracellular β -galactosidase activity in *Aspergillus nidulans* (1st FEMS Congress of European Microbiologists, Ljubljana, Szlovénia, 2003).
- 15) KARAFFA L, **FEKETE E**, SÁNDOR E, SZENTIRMAI A, KUBICEK CP: Reductive pathway of galactose catabolism in *Aspergillus nidulans* (1st FEMS Congress of European Microbiologists, Ljubljana, Szlovénia, 2003).
- 16) SÁNDOR E, NOVÁK E, SERESTER O, **FEKETE E**, SZENTIRMAI A, KARAFFA L: Regulation of the alternative oxidase activity and gene expression by the nitrogen source in *Aspergillus nidulans* (A Magyar Mikrobiológiai Társaság XIV. nemzetközi nagygyűlése, Balatonfüred, 2003).
- 17) **FEKETE E**, SÁNDOR E, SERESTER O, NOVÁK E, SZENTIRMAI A, KUBICEK CP, KARAFFA L: β -galactosidase genes in *Aspergillus nidulans* (A Magyar Mikrobiológiai Társaság XIV. nemzetközi nagygyűlése, Balatonfüred, 2003).