

# 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

Készült:

A Debreceni Egyetem Orvos-és Egészségtudományi Centrum  
“Mikrobiológia és Farmakológia” Doktori Iskolájának keretében a  
TTK Mikrobiológiai és Biotechnológiai Tanszékén

2004

## BEVEZETÉS, PROBLÉMAFELVETÉS

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. Az adott körülmények között szükségtelen enzimek 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, miközben a lassabban hasznosuló lebontásához szükséges enzimek képződése gátlódik. A jelenséget karbon katabolit szabályozásnak (represszió) nevezzük; szigorúan transzkripciós szintű folyamat. Tipikusan (de nem kizárólag) a glükózzal lehet kiváltani.

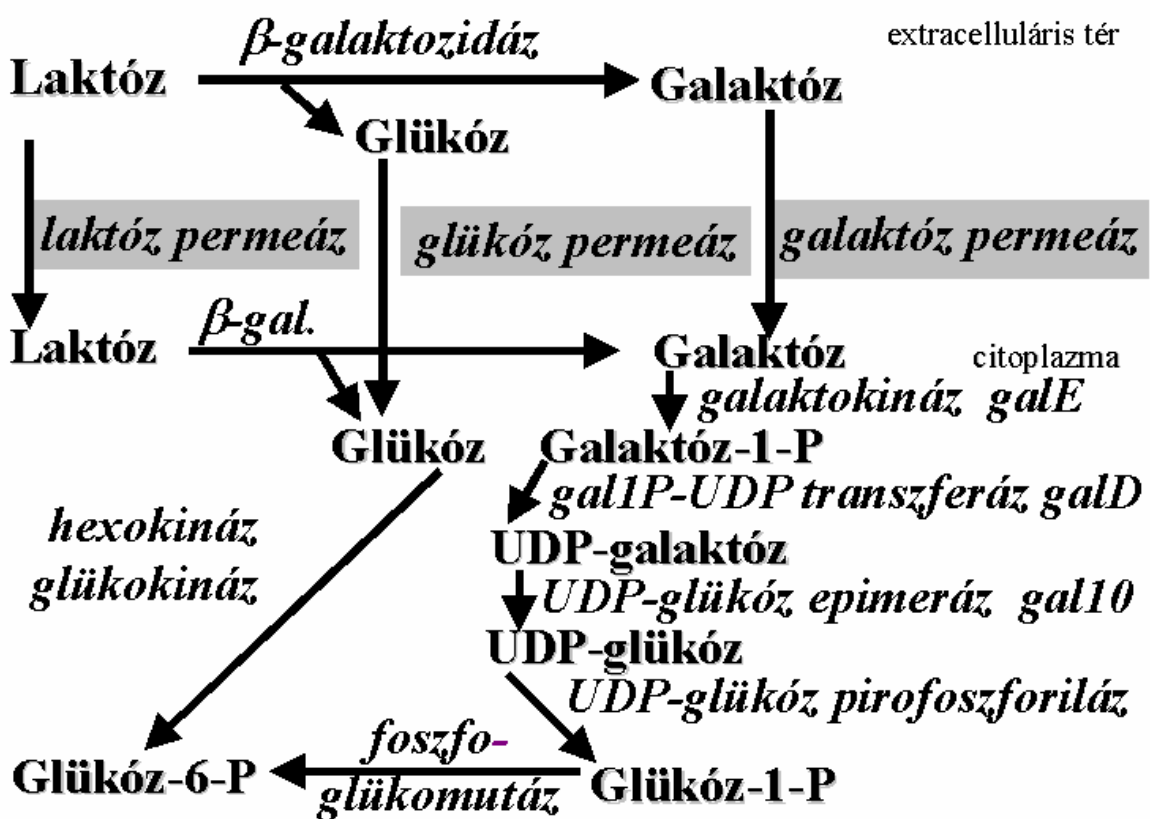
A fonalas gombák *creA* génje egy olyan cink-ujj fehérjét kódol, mely számos glükóz által represszálható gén promoteréhez képes specifikusan kötődni, meggátolva átíródásukat. A gén delécióját sokáig letálisnak gondolták, de később sikerült életképes nullmutánst előállítani (Shroff és mtsai 1997).

A szénváz lebontás szabályozásán túl a glükóz számos bioszintetikus, köztük gazdaságilag jelentős metabolitok (antibiotikumok, aminosavak, nukleotidok, enzimek) képződéséért felelős gén transzkripcióját is gátolja. Néhány esetben a fermentációs technológia fejlődésével (limitált mennyiségű glükóz adagolásával) a hatás kivédhetővé vált, de sokszor (pl. celluláz, hemicelluláz enzimek előállítása) továbbra is a lassan hasznosuló (derepresszáló) szénforrás idiofázisbeli alkalmazása az egyetlen megoldás.

Nagyüzemi léptékben jelenleg a laktóz a legelterjedtebben használt derepresszáló szénforrás. A laktóz (1,4-O- $\beta$ -D-galaktopiranozil-D-glükóz) a sajtgyártás melléktermékeként évi 300 ezer tonna mennyiségben keletkezik,

tehát megújuló szénforrásnak tekinthető. A fenti mennyiség csupán 15 %-át hasznosítja a fermentációs ipar (Roelfsema és mtsai 1990).

A laktóz lebontás első lépése a glükózzá és galaktózzá történő hidrolízis, ami vagy az extracelluláris  $\beta$ -galaktozidáz vagy a laktóz permeáz és az intracelluláris  $\beta$ -galaktozidáz összehangolt működésének eredményeként történik. A glükóz egyrészt a pentóz foszfát úton, másrészt a glikolizist táplálva hasznosul. A galaktóz az eukariótákban a LeLoir-útvonalon, végeredményben glükózzá (glükóz-6-foszfát) epimerizálódva hasznosul.



I. ábra Eukarióták laktóz hasznosításának vázlatja

Noha a laktóz ipari felhasználása (penicillin fermentáció) több mint 50 éves, a fonalas gombák laktóz anyagcseréjét és annak szabályozását szisztematikusan eddig egyetlen non-profit munkacsoport sem tanulmányozta. Munkánk során ezt a hiányt igyekeztünk pótolni. Kísérleteinket az *Aspergillus nidulans* (teleomorf: *Emericella nidulans*) gombával végeztük, melyet évtizedek

óta az *Ascomyces*-ek, sőt sok esetben az eukarióta élőlények modellszervezetének tekintenek (Arst és Penalva 2003).

## ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

**Törzsfenntartás:** A beszerzett törzseket a markereket is tartalmazó AMM (Pontecorvo és mtsai 1953) táptalajra oltottuk le. A kinőtt tenyészeteket glicerolos oldatban tároltuk -80 °C-on. A mélyfagyasztott törzseket átoltás után ferdített agaron, spóráztató táptalajon tartottuk fenn (Fekete és mtsai 2002). A növekedés 37 °C-on történt, a ferdéket ezután parafilmmel lezárva +4 °C-on tároltuk. A munkánk során használt törzseket az **I. táblázat** tartalmazza.

### I. táblázat A kísérleti munkához használt törzsek

Törzs jele illetve <i>genotípusa</i> (a laktóz metabolizmus szempontjából)	Törzs fenotípusa (a laktóz metabolizmus szempontjából)	Igény (auxotrófia)	Konídium színe	Forrás
R21	Vad törzs	PABA	Sárga	Roberts (1967)
A60 <i>galA1</i>	Galaktokináz és a Gal- 1-P-uridililtranszferáz nem indukálható	Biotin	Fehér	Roberts (1963)
A61 <i>galD5</i>	Galaktóz-1-P-uridilil- transzferáz hiány	Biotin	Fehér	Roberts (1963)
A214 <i>galE9</i>	Galaktokináz hiány	Biotin	Fehér	Roberts (1963)
A466 <i>galD5</i>	Galaktóz-1-P-uridilil- transzferáz hiány	PABA Riboflavin Aneurin Piridoxin Lizin	Sárga	Käfer (1977)
A500 <i>sbA3</i>	Szorbitol hasznosítás hiánya	Biotin Metionin Nikotinsav	Zöld	Käfer (1977)

G092 <i>frA1</i>	Fruktokináz hiány	Piridoxin	Sárga	Roberts (1963)
G094 <i>araA1</i>	Arabitol hasznosítás hiánya	Biotin	Fehér	Roberts (1963)
- <i>CreAΔ4</i>	CreA nullmutáns	PABA Arginin	Sárga	Shroff és mtsai (1997)
- <i>CreA<sup>d</sup>30</i>	<i>creA</i> gén csökkent aktivitású	Biotin	Zöld	Arst és mtsai (1990)
EFES1 <i>galD5, galE9</i>	A466 x A214 kettős mutáns (G-1-P-UT-áz) és galaktokináz hiány)	PABA Riboflavin Aneurin Piridoxin Lizin	Fehér	Fekete és mtsai (2002)
EFES2 <i>galE9</i>	R21 x A214 kettős mutáns (galaktokináz hiány)	PABA	Sárga	Fekete és mtsai (2004)
EFES3 <i>frA1, galE9</i>	A214 x G092 kettős mutáns (galaktokináz és fruktokináz hiány)	Piridoxin	Sárga	Fekete és mtsai (2004)
EFES4 <i>araA1, galE9</i>	EFES2 x G094 kettős mutáns (galaktokináz és arabitol hasznosítás hiánya)	Biotin	Fehér	Fekete és mtsai (2004)

Az „A” jelű törzsek a Fungal Genetics Stock Center (University of Kansas Medical Center, USA) gyűjteményéből, a „G”jelű törzsek a University of Glasgow gyűjteményéből érkeztek. Az „EFES” (Erzsébet Fekete, Erzsébet Sándor) név az általunk előállított mutáns törzseket jelzi.

**Tenyésztési körülmények:** A mutánsok analízise és a kettős mutánsok létrehozása során agarral szilárdított AMM táptalajt használtunk. A rázatos lombikos kísérletek, a szakaszos, a ráadagolásos és a  folytonos fermentációk AMM2 táptalajon történtek (Fekete és mtsai 2002). A sülyesztett kultúrákat 500 ml-es Erlenmeyer-lombikokban illetve 2 l-es laboratóriumi üvegfermentorban tartottuk fenn. Az  indukciós kísérletekhez mosott sejtes tenyészeteket használtunk, melynek során a konidiospórákat a laktóz és galaktóz

anyagcsere szempontjából „semleges” (nem indukáló, nem represszáló; Seiboth és mtsai 2002) glicerolt tartalmazó AMM2 táptalajra oltottuk, majd a kinőtt micéliumot friss tápfolyadékot tartalmazó lombikokba mostuk át.

**Analitikai módszerek:** A növekedést a tenyészet egységnyi térfogatra vonatkoztatott szárazanyag tartalmának gyarapodására vezettük vissza. A szénhidrátok (cukrok, poliolo) minőségi és mennyiségi meghatározását HPLC-analízissel végeztük, a csúcsokat törésmutató detektorral érzékeltük. Az intracelluláris metabolit-koncentrációkat a 2,43 ml intracelluláris hifatérfogát / g száraz tömeg alapján számoltuk (Slayman és Tatum 1964). Az NMR mérésekhez egy QNP-fejjel ( $^1\text{H}/^{15}\text{N}/^{13}\text{C}/^{31}\text{P}$ ) felszerelt spektrométert használtunk. Amikor a  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumot alacsony mintakonzentráció mellett vettük föl, a DEPT135 technikát alkalmaztuk, melynek során csak a protonált szénatomokat mértük. A szorbóz optikai forgatóképességének meghatározását polariméterrel, a nátrium D-vonalán végeztük. Az *A. nidulans* laktóz felvételének vizsgálatához [D-glükóz-1- $^{14}\text{C}$ ] laktózt használtunk, a mintákat folyadék szcintillációs spektrométerrel mértük. A proteáz összaktivitás meghatározásához Rudolph és mtsai (1949) módszerét alkalmaztuk. Az intracelluláris enzimaktivitás meghatározásának első lépését, a sejtfeltárást Xpress készülékkel végeztük. A szétroncsolt micéliumot lecentrifugáltuk, dializáltuk, és a felülúszót használtuk enzimforrásként. A  $\beta$ -galaktozidáz aktivitást az o-nitrofenil- $\beta$ -D-galaktopiranozid hidrolizáló képesség mértékeként értelmeztük. A poliol (L-arabitol, galaktitol, D-szorbitol) dehidrogenáz aktivitás meghatározásakor az adott szubsztrátumon, adott koenzim mellett mérhető reakciósebességet „rate-assay” eljárással követtük nyomon. A galaktitol dehidrogenáz reakció végtermékének vizsgálatakor a koenzim regenerációja végett L-laktát dehidrogenázt és piruvátot is adtunk az elegyhez. A reakció lejátszódása után a lecentrifugált felülúszóból a végterméket NMR és HPLC analízissel azonosítottuk, majd a reakciót fordított irányba (redukció: hexóz +

NADH) is lejátszódtattuk. A hexokináz aktivitás meghatározását HPLC-analízissel végeztük, a szubsztrátumot ATP és enzimforrás jelenlétében inkubálva. Az aldóz reduktáz aktivitás meghatározását L-arabinóz és D-xilóz szubsztrátumok alkalmazása mellett, „rate-assay” eljárással végeztük, mely során a reakcióelegyben lévő NADPH koncentrációjának csökkenését követtük nyomon. Az enzim-aktivitási adatok specifikussá tételéhez az értékeket összfehérje tartalomra vonatkoztattuk; ehhez a minták fehérje koncentrációját módosított Lowry-féle módszerrel (Peterson 1983) határoztuk meg.

**Kettős mutánsok előállítása:** 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.

**Reprodukálhatóság:** Az összes számszerű adat 3-8 független kísérlet átlagaként született. 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.

## **EREDMÉNYEK**

### **I. Új eljárás a galaktokináz aktivitás meghatározására**

Munkánk egyik jelentős eredménye egy HPLC-s meghatározáson alapuló, 5 %-os hibán belül ismételhető módszer kidolgozása volt. Elvi alapja a



reakció termékeként keletkező galaktóz-1-foszfát mennyiségi meghatározása, melyet HPLC-vel, 25 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> eluens, Merck Polyspher OA KC

oszlop, 30 °C kolonna-hőmérséklet és 0,5 ml/perc áramlási sebesség mellett, törésmutató detektorral érzékelünk (Fekete és mtsai 2002).

## II. Laktóz hasznosítás *A. nidulans*-ban

A vad típusú *A. nidulans* viszonylag jól nőtt laktózon. Nitrogén forrásként ammonium-foszfátot tartalmazó táptalajon (AMM2) a 15 g/l koncentrációban adott laktóz kb. 70 óra alatt fogyott el. A teljes élelciklus befutásáig kb. 3 napra volt a törzsnek szüksége. Az *A. nidulans* tehát hasznosítani tudja a laktózt.

Extracelluláris vagy sejtfalhoz kötött  $\beta$ -galaktozidáz aktivitást a növekedés egyetlen fázisában sem tudtunk kimutatni, ellenben az intracelluláris aktivitás csaknem a teljes fejlődési ciklus alatt jelen volt. Ezt alátámasztandó *in silico* vizsgálatot végeztünk, melynek során a *Kluyveromyces lactis* élesztőnek az Entrez-adatbázisból ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) letöltött  $\beta$ -galaktozidáz szekvenciájával a *N. crassa* egyik nyilvános adatbázisában ([www-genome.wi.mit.edu](http://www-genome.wi.mit.edu)) BLAST keresést végeztünk, és a legjobban hasonlító két szekvenciát kiválasztottuk. A kettős szűrőn átesett szekvenciákat a Cereon adatbázisba ([microbial.cereon.com](http://microbial.cereon.com)) BLAST-oltuk. Két magas homológiájú *A. nidulans*  $\beta$ -galaktozidáz szekvenciát találtunk, melyeket nem-fajspecifikus Entrez-BLAST során ellenőriztünk. Az egyik 1309 bp hosszúságú szekvencia gyakorlatilag azonos a *K. lactis* – *N. crassa*  $\beta$ -galaktozidázzal (e-106), míg a másik valamivel kisebb hasonlóságot mutat ezekhez, 1554 bp hosszú, és prokarióták (*Thermotoga neapolitana*, *Caldicellulosiruptor lactoaceticus*, *Arthrobacter sp.*)  $\beta$ -galaktozidáz génjével erőteljesen homológ (e-112; e-141; e-130). Intronok nincsenek bennük. A nyilvántartott fonalas gomba szignálszekvenciák egyike sem található meg bennük, ami megerősíti, az *A. nidulans* valóban csak intracelluláris  $\beta$ -galaktozidáz aktivitással rendelkezik.



### III. Az *Aspergillus nidulans* $\beta$ -galaktozidáz aktivitásának képződése

Az élettani vizsgálatok igazolták, hogy az *A. nidulans* glükózon illetve glicerolon nem mutat  $\beta$ -galaktozidáz aktivitást, laktózon és galaktózon azonban a növekedés minden fázisában jelen van. Az aktivitás időfüggése párhuzamos a növekedéssel és a laktózfelvétellel, a szénforrás elfogyása után pedig az enzim képződése megszűnik. 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  $\beta$ -galaktozidáz aktivitását tovább lehetett növelni D-galaktóz ráadagolással, ami azt mutatta, az enzim képződése laktózon nem éri el a maximális szintet. Glükóz hozzáadására a laktózon nőtt tenyészetekben a  $\beta$ -galaktozidáz aktivitás szintje csökkenni kezdett, és pár órán belül az aktivitás mérhetősege teljesen megszűnt. Ezzel párhuzamosan a laktóz felvétele is leállt a glükóz elfogyásáig. Ezt követően a laktóz felvétel és a  $\beta$ -galaktozidáz aktivitás újra megjelent. A glükóz jelenléte tehát az aktivitás gyors eltűnését eredményezte, ami a fehérje gyors lebomlását és rövid féléletidejét jelzi.

A  $\beta$ -galaktozidáz aktivitás hiánya glükózon és glicerolon, valamint jelenléte laktózon és galaktózon azt sugallta, hogy az enzim bioszintézise karbon szabályozás alatt áll. Nyitott kérdés maradt, hogy a hatás az induktor felvételének gátlásán (inhibíción), vagy pedig karbon katabolit represszió (a  $\beta$ -galaktozidáz transzkripciójának gátlásán) alapul.

A karbon katabolit represszióért felelős *creA* gén feltételezett szerepének tanulmányozása céljából a *creA*-hiányos *A. nidulans* törzset használva a glükóz ráadagolás nem befolyásolta a laktózfelvételt, és a  $\beta$ -galaktozidáz aktivitás szintje is változatlan maradt, jelezve, hogy nem a laktózfelvétel folyamata gátolt, hanem a laktóz permeáz képződését represszálja a glükóz. A nullmutáns esetében a 2-deoxi-D-glükóz sem csökkentette a laktóz felvételi rátát, ami megerősítette a *creA* gén szerepét a laktóz felvétel szabályozásában.

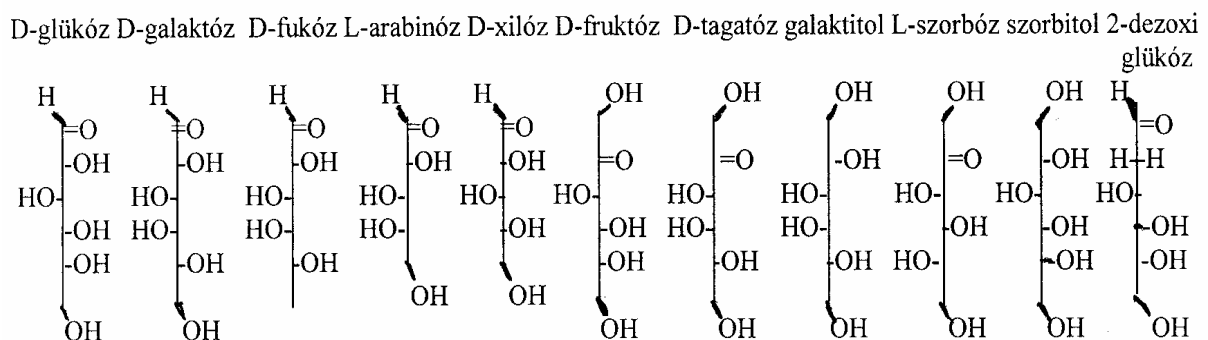
Annak eldöntésére, hogy a  $\beta$ -galaktozidáz aktivitás szintje önmagában is CreA-függő karbon katabolit represszió alatt áll-e, a CreA $\Delta$ 4 mutánsban a  $\beta$ -galaktozidáz aktivitás szintjének alakulását vizsgáltuk meg glükóz, illetve glicerol jelenlétében. A sejtek a laktózon mérhető érték 18 %-át kitevő aktivitással rendelkeztek, jelezve, hogy bár a  $\beta$ -galaktozidáz szint egy része valóban CreA-függő represszió alatt áll, az aktivitás nagyobb hányada indukció útján alakul ki. Glükóz és a laktóznál hatékonyabb induktor D-galaktóz egyidejű jelenlétében a glükóz nem gátolta a galaktóz felvételét, viszont kb. 30 %-al csökkentette a  $\beta$ -galaktozidáz aktivitás szintjét, jelezve, hogy a glükóznak az indukció folyamatára is van részleges hatása. Ez a gátló hatás a CreA-n keresztül érvényesül.

A micélium laktóz felvételét  $^{14}\text{C}$  jelölt laktózt tartalmazó táptalajon tovább tanulmányozva megállapítottuk, hogy a 2-deoxi-D-glükóz táptalajhoz adása a felvételt kb. 3 óra alatt állítja le, ami megfelel egy rövid féléletidejű fehérjére kifejtett transzkripciós hatásnak. A  $\beta$ -galaktozidáz D-galaktóz általi indukcióját azonban a glükóz nem befolyásolta.

Eredményeink szerint a glükóz hatása legalább három szinten jelentkezik, és ezek mindegyike CreA-függő folyamat: (a) a konstitutív  $\beta$ -galaktozidáz aktivitás képződésének gátlása; (b) az indukció részleges gátlása, mivel a CreA-negatív 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 (alkohol dehidrogenáz) szabályozása *A. nidulans*-ban és a xilanáz bioszintézise *A. niger*-ben. A CreA-nak az inducort felvevő fehérjével (ez esetben a laktóz permeázzal) való kölcsönhatását azonban eddig sehol nem írták le. A *Kluyveromyces marxianus* élesztőben a laktóz felvételt a glükóz gátolja, de nem tudjuk, ez karbon katabolit represszió eredménye-e.

Néhány más fonalas gomba (*A. niger*, *Penicillium canescens*) esetében a  $\beta$ -galaktozidáz képződését indukálni lehet L-arabinózzal és más hemicellulóz monomerekkel. Kísérleteink szerint *A. nidulans* esetében is ez a helyzet, mivel az L-arabinóz és a D-xilóz egyaránt indukálja a  $\beta$ -galaktozidáz képződését. A fonalas gombákban természetes körülmények között nem fordul elő D-arabinóz, így nem meglepő, hogy ez az izomer hatástalannak bizonyult. Érdekes módon az L-arabinóz még a D-galaktóznál is hatékonyabb inducernek bizonyult. Mind a D-galaktóz, mind az L-arabinóz által kiváltott  $\beta$ -galaktozidáz indukció szignifikánsan magasabb értékeket eredményezett a *creA*-hiányos mutáns törzsben. Az L-arabinóz és D-xilóz által kiváltott indukció pontos okát nem tudjuk, de feltehetően kapcsolatba hozható a szerkezeti hasonlóságuk mellett (II. ábra) a természetes poliszacharidokban történő előfordulásukkal, ami az alapvetően szaprofita gombák egyik fő tápláléka.



**II. ábra A kísérletekben felhasznált szénhidrátok szerkezete**

A két leghatékonyabb inducer (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. A maximális indukciós értékek azonban nem voltak fokozhatók a másik monoszacharid által.

Ahhoz, hogy azonosítani tudjuk a D-galaktóz anyagcsere  $\beta$ -galaktozidáz képződéshez szükséges szakaszát, galaktokináz, valamint galaktóz-1-foszfát uridililtranszferáz hiányos mutánsokat tanulmányoztunk. A galaktokináz

hiánymutáns hasonló  $V_{\max}$  értékű aktivitást mutatott, az indukcióhoz szükséges  $K_m$  érték viszont lényegesen alacsonyabb volt. A vad típusú törzsben D-fukóz (nem metabolizálódó D-galaktóz analóg) hatására a D-galaktóz kiváltotta értékkel megegyező  $\beta$ -galaktozidáz aktivitás alakult ki, jelezve, a D-galaktóz önmagában elég az indukció kialakításához, a LeLoir-útvonal köztesei nem szükségesek.

A galaktóz-1-foszfát uridililtranszferáz hiányos mutáns fenotípus-vizsgálata azonban váratlan eredményt hozott. A törzs konstitutív  $\beta$ -galaktozidáz aktivitást mutatott glükózon és glicerolon is. Értéke kb. kétszerese volt a *creA*-hiányos mutáns törzsének. A  $\beta$ -galaktozidáz aktivitás D-galaktózzal egyáltalán nem, L-arabinózzal azonban teljes mértékben indukálhatónak bizonyult. Az aktivitási értékek – noha a tenyésztés folyamán glükóz és glicerol végig jelen voltak – a tenyészet növekedési sebességével fordítottan változtak, a legmagasabb enzimszint a stacioner fázisban alakult ki.

A jelenség elvileg kétféleképpen magyarázható. Egyrészt lehetséges, hogy a felhalmozódó, és más eukariótákban (köztük az emberben is) toxikus galaktóz-1-foszfát fejt ki egyfajta feed-back gátlást a saját keletkezésében szerepet játszó enzimekre, de ugyanilyen joggal feltételezhető a galaktóz-1-foszfát-uridilil transzferáz enzim szabályzó szerepe is. 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. Kereszteztük tehát az *A. nidulans galE* (A214) és a *galD* (A466) mutáns törzseket. A kettős mutáns kétféle fenotípust mutathatott, vagy az egyik, vagy a másik szülői törzshöz hasonlatosan. Amennyiben a  $\beta$ -galaktozidáz aktivitás szabályozása a galaktokináz mutánsához 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. Több független kettős mutánst is izoláltunk, ezek egybehangzó eredményei a galaktóz-1-foszfát uridilil transzferáz szabályzó szerepét igazolták.

Hasonló (bár nem teljesen megegyező) jelenséget írtak le a *K. lactis* esetében (Cardinali és mtsai 1997), így az indukció valószínűleg rokon mechanizmusok szerint játszódik le. 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 transzkripciós aktivátort. *K. lactis*-ban a galaktokináz aktivitás hiánya nem gátolja a Gal3p-t abban, hogy a  $\beta$ -galaktozidáz indukciót elősegítse, vagyis a katalitikus funkció elvesztése nem jelenti automatikusan a szabályzó szerep megszűnését is.

Feltételezve, hogy az *A. nidulans* galaktokináz mutáns továbbra is képes a (katalitikusan inaktív) fehérje előállítására, az élesztőkre leírt indukciós mechanizmus vélhetően erre a fajra is alkalmazható. Ettől függetlenül a galaktóz-1-foszfát uridililtranszferáz mutánsban észlelt konstitutív  $\beta$ -galaktozidáz aktivitás más magyarázatot igényel. *K. lactis*-ban a jelenséget a D-galaktóz intracelluláris felszaporodásának tudták be, ezzel szemben az *A. nidulans*-ban a konstitutív érték nem fokozható D-galaktózzal. További eltérés, hogy *K. lactis*-ban csupán a stacioner fázisban jelent meg a  $\beta$ -galaktozidáz aktivitás, szemben az *A. nidulans*-sal. Emiatt úgy tűnik, *A. nidulans*-ban a galaktóz-1-foszfát uridililtranszferáz részleges represszorként működik, és a D-galaktóz csupán ezt a hatást ellensúlyozza.

Az indukció mechanizmusától függetlenül az a tény, hogy a galaktóz-1-foszfát uridilil-transzferáz mutáns  $\beta$ -galaktozidáz aktivitása teljes mértékben indukálható L-arabinózzal azt jelzi, hogy a D-galaktóz és az L-arabinóz hatása két eltérő útvonalon jelentkezik, melyek közül az L-arabinózé nem gátolt a fenti

mutánsban. Mivel viszont az egyik monoszacharid sem képes a másik által kifejtett maximális indukciós értéket tovább fokozni, vagy ugyanazt a transzkripciós aktivátort stimulálják, vagy a két transzkripciós aktivátor olyannyira átfedi egymást, hogy egyszerre csak az egyik képes kötődni a DNS-hez. Mindez azt mutatja, az *A. nidulans*  $\beta$ -galaktozidáz aktivitás indukciójának molekuláris mechanizmusai eltérőek a *K. lactis* esetében leírtaktól.

#### **IV. Reduktív D-galaktóz lebontás *A. nidulans*-ban**

Az elmúlt egy esztendő fontos eredménye volt egy új D-galaktóz lebontási útvonal felfedezése és részleges jellemzése. Eukariótákban, köztük *A. nidulans*-ban a szakirodalom szerint a galaktokináz gén deléciója lehetetlenné teszi a D-galaktózon való növekedést (Roberts 1970), a mi galaktokináz mutánsaink viszont (noha több, független forrásból szereztük be őket) mégis viszonylag jól növekedtek galaktózon süllyesztett tenyészetben, és a teljes élelciklusukat teljesítették szilárd táptalajon. A növekedésre való képtelenséget eredményező, illetve az általunk alkalmazott tenyész körülmények között a nitrogénforrás minőségében volt különbség: a korábbi szerzők nitrátot, mi viszont nitrogénforrásként ammonium-foszfátot használtunk. A táptalaj kémhatása mindkét esetben ugyanakkora (pH=6,5) volt, és a foszfát koncentrációjának eltéréséből adódó esetleges szabályzó hatást is kizártuk kísérletes úton.

A nitrát és az ammónium ionok asszimilációja között élettani szempontból az a fő különbség, hogy a nitrát redukció NADPH-igényes, míg az ammónia beépítése nem. Feltételeztük tehát, hogy a sejtek szabad NADPH-állománya van döntő hatással a növekedésre, ehhez viszont azt kellett feltételeznünk, hogy a galaktóz lebontása foszforilezés hiányában egy NADPH-függő folyamat révén megy végbe, s mivel ebben az esetben a szén- és a nitrogénforrás asszimilációja NADPH-igényes, ez meghaladja a sejt lehetőségeit.

A galaktóztól és a laktóztól eltérő szénforrások (glükóz, fruktóz,

acetát, glicerol) alkalmazásakor a nitrogénforrás minősége nem befolyásolta a galaktokináz mutánsok növekedését. Laboratóriumi fermentorban, D-galaktózon és ammónium ionokon növesztve a vad és a galaktokináz hiányos *A. nidulans* mutáns törzseket azt találtuk, hogy míg a vad típus tipikus hozamkonstans-profilot mutat (gyors felfutás, viszonylag hosszú plató, majd a tenyésztés végén gyors visszaesés), addig a mutáns hozamkonstansa a felfutás után időben folyamatos csökkenéssel jellemezhető. Ez tankönyvi példája az átmeneti, később felhasználódó intracelluláris metabolit-felhalmozódásnak. A feltárt *A. nidulans* micélium sejtmentes kivonatának HPLC-s elemzése galaktitol (dulcitol) jelenlétét mutatta ki, melyet NMR-es vizsgálat is megerősített. A galaktokináz hiányos mutánsban a galaktitol maximális mennyisége elérte a 450 mM koncentrációt, ami nincs messze a vízben való oldékonyságának felső határától. Az ozmotikusan aktív galaktitol hatása miatt a sejtfalak jellegzetesen megvastagodtak, göcsörtössé váltak. Érdekes módon a vad típusban is találtunk kb. 40 mM galaktitolt, ami ugyan nem okozott abnormális növekedési és morfológiai sajátosságokat, de jelezte: az alternatív (reduktív) galaktóz lebontási útvonal nem kényszerpálya, hanem a vad típusban is jelen van (Fekete és mtsai 2004).

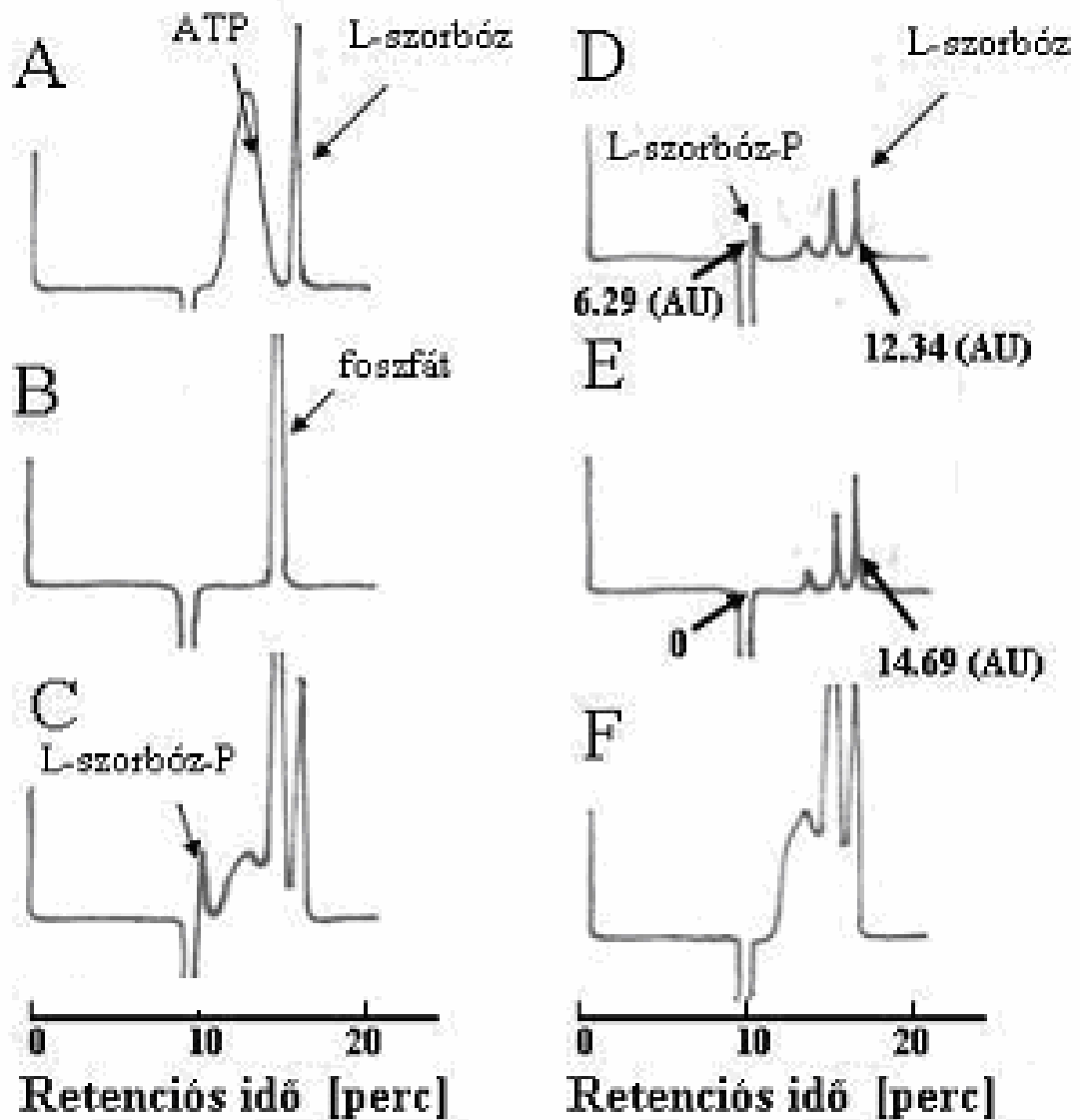
Megállapítottuk, hogy a D-galaktóz → galaktitol átalakítást egy NADPH-függő aldóz reduktáz katalizálja, mely pentóz szubsztrátumokon (D-xilóz, L-arabinóz) adja a legnagyobb aktivitást. A galaktitol dehidrogénezése ezzel szemben  $\text{NAD}^+$ -függő folyamat. A galaktitol hasznosítás képessége mind a vad, mind a galaktokináz hiányos mutánsban egyforma volt, jelezve, a galaktokináz nem résztvevője a galaktitol anyagcserének. Ezzel szemben egy L-arabitol dehidrogenázban mutáns *A. nidulans* törzs (*araA1*) képtelen volt a galaktitol hasznosítására konídium, illetve micélium formában, sőt a galaktóz redukciója során keletkező intracelluláris galaktitolt sem tudta metabolizálni. Ez az eredmény genetikai bizonyítékát adta annak, hogy a galaktitol oxidációt az L-

arabitol dehidrogenáz enzim végzi. Azt, hogy a redukzív D-galaktóz lebontás kizárólag a galaktitol - L-arabitol dehidrogenáz útvonalon át történik, egy galaktokináz / L-arabitol dehidrogenáz kettős mutáns (EFES4) létrehozásával és vizsgálatával bizonyítottuk: a fenti mutáns ugyanis nem volt képes D-galaktózon nőni.

A galaktitol oxidáció termékének megállapításához újból sejtmentes kivonatokat elemeztünk. A galaktózon vagy galaktitolon nőtt tenyészetekben, sőt dializált sejtmentes kivonatot *in vitro* enzimforrásként használva egyaránt L-szorbóz nevű ketohexóz halmozódott fel, amit ezúttal is két független analitikai módszerrel (HPLC és NMR) bizonyítottunk. Ez azt jelenti, hogy az oxidációt végző enzim kétfunkciós; dehidrogénezésre és epimerizációra is képes. A visszafelé menő reakció (redukció: hexóz + NADH) vizsgálatokor az L-szorbózból galaktitol keletkezett, viszont az L-arabitol dehidrogenáz hiányos mutáns esetében a reakció *in vitro* egyik irányba sem játszódott le, igazolva, hogy valóban ez a lókus (illetőleg a terméke) felelős a galaktitol oxidációjáért. NADPH-t használva redukáló ágensként az utóbbi reakció nem játszódott le. A galaktitolon növesztett vad típusú és galaktokináz hiányos *A. nidulans* micéliumban az L-szorbóz kis mennyiségben (20-60  $\mu$ M) fel is halmozódott.

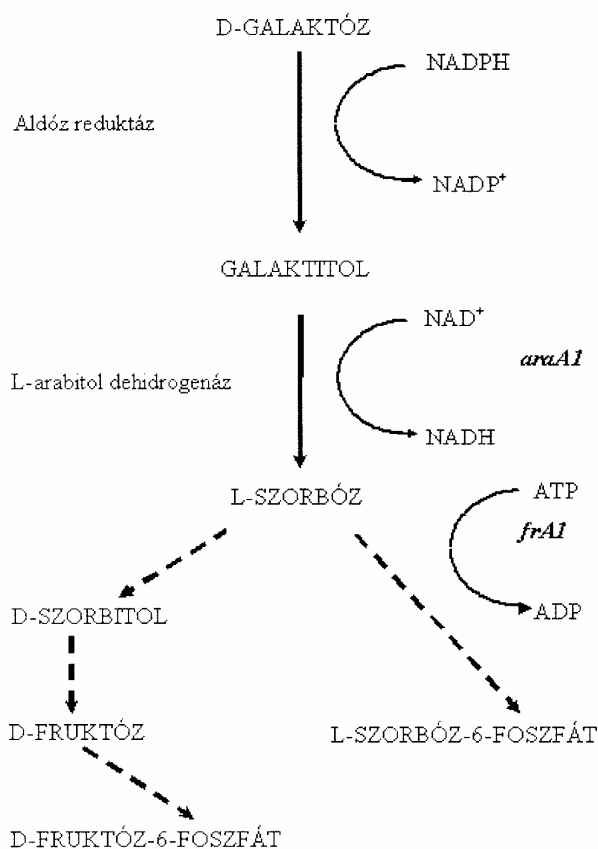
Megvizsgáltuk melyik enzim lehet felelős az L-szorbóz továbbalakításáért. Az *A. nidulans* három hexóz kinázzal rendelkezik: glükokináz, galaktokináz, hexokináz (fruktokináz). Az első kettő erősen szubsztrátspecifikus, míg a harmadik széles spektrumú (Puri és mtsai 1988). A hexokináz illetve az általunk előállított hexokináz / galaktokináz kettős mutáns (EFES3) sem galaktitolon, sem L-szorbózon nem tudott növekedni, emellett az EFES3 mutáns nem nő D-galaktózon sem. Mindezek genetikai bizonyítékát adják, hogy az L-szorbózt a hexokináz foszforilezi.





**III.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 foszfatázzal való kezelése 0 h időpillanatban. **E** Az L-szorbóz-6-foszfát tartalmú elegy alkalikus foszfatázzal 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)

Az irodalom (Elorza és Arst 1971) szerint az L-szorbóz lebontása a D-szorbitol → D-fruktóz útvonalon megy végbe. Ezzel szemben mi *in vitro* bizonyítékot szereztünk arra, hogy a hexokináz enzimnek szubsztrátuma L-szorbóz. A foszforilezést egy HPLC-alapú módszerrel követtük nyomon; a vad típusban, továbbá a galaktokináz és az L-arabitol dehidrogenáz hiányos mutánsokban is ATP-függő módon ment végbe (**III. ábra**). Kivételt a hexokináz aktivitást nem



**IV. ábra. A redukzív D-galaktóz lebontási útvonal(ak) vázlatja *A. nidulans*-ban.**

mutató törzs jelentett, melynek sejtmentes kivonata nem tudta foszforilezni az L-szorbózt. Lehetséges, hogy az L-szorbóz-6-foszfát izomerizálódik fruktóz-6-foszfáttá, de a két útvonal párhuzamosan is működhet (**IV. ábra**)

Összefoglalva munkánk második részét, genetikai és biokémiai bizonyítékokat szereztünk egy alternatív (redukatív) D-galaktóz lebontási útvonal meglétéről *A. nidulans*-ban, melynek során a D-galaktóz először galaktitollá redukálódik, majd L-szorbózzá oxidálódik. A folyamatban az L-

arabitol dehidrogenáz és a hexokináz enzimek esszenciális szerepet játszanak. Egyelőre nehéz megítélni, mennyire elterjedt ez a lebontási út az élővilágban. Az eddig azonosított enzimek mindenesetre általánosan elterjedtek, az útvonal pedig az *A. nidulans*-tól rendszertanilag viszonylag távol álló *T. reesei*-ben is kimutatható volt (Seiboth és mtsai 2004).

## HIVATKOZÁSOK

Arst HN Jr, Penalva MA (2003): pH regulation in *Aspergillus* and parallels with higher eukaryotic regulatory systems. *Trends Genet.* 19: 224-231.

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.

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.

Elorza MV, Arst HN Jr (1971): Sorbose resistant mutants of *Aspergillus nidulans*. *Mol. Gen. Genet.* 111: 185-193.

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.* 18: 35-44.

Fekete E, Karaffa L, Sándor E, Seiboth B, Biró S, Szentirmai A, Kubicek CP (2002): Regulation of formation of the intracellular  $\beta$ -galactosidase activity of *Aspergillus nidulans*. *Arch. Microbiol.* 179: 7-14.

Käfer E (1977): Meiotic and mitotic recombination in *Aspergillus* and its chromosomal aberrations. *Adv. Genet.* 19: 33-131.

Peterson GL (1983): Determination of total protein. *Methods Enzymol.* 91: 86-105.

Pontecorvo G, Roper JA, Hemmons LM, Macdonald KD, Button AWJ (1953): The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Adv. Genet.* 5: 141-238.

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.

Roberts CF (1963): The genetic analysis of carbohydrate utilization in *Aspergillus nidulans*. *J. Gen. Microbiol.* 31:45-58.

Roberts CF (1967): Complementation analysis of the tryptophan pathway in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* 55: 233-239.

Roberts CF (1970): Enzyme lesions in galactose non-utilizing mutants of *Aspergillus nidulans*. *Biochim. Biophys. Acta* 201: 267-283.

Roelfsema WA, Kuster FM, Pluim H (1990): Lactose and derivatives. Elvers B, Hawkins S, Schulz G (eds.) Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 4<sup>th</sup> ed. pp 107-114. VCH Weinheim FRG

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.

Seiboth B, Karaffa L, Sándor E, Kubicek CP (2002): 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.

Seiboth B, Hartl L, Pail M, Fekete E, Karaffa L, Kubicek CP (2004): The galactokinase of *Hypocrea jecorina* is essential for cellulase induction by lactose but dispensable for growth on D-galactose. *Mol. Microbiol.* DOI 10.1046/j.1365-2958.2003.03901.x

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.

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.

## 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*  $\beta$ -galaktozidáz aktivitásának képződése CreA-függő, többlépcsős glükóz represszió alatt áll.
3. Az *Aspergillus nidulans*  $\beta$ -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 enzimeként 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* fonalas gombák esetében próbáltuk ki.

## PUBLIKÁCIÓS LISTA

### A 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  $\beta$ -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 (2004): The alternative D-galactose degrading pathway of *Aspergillus nidulans* proceeds via L-sorbose. *Archives of Microbiology* **181**: 35-44. **Impakt faktor: 2,156**
- 3) SEIBOTH B, HARTL L, PAIL M, FEKETE E, KARAFFA L, KUBICEK CP (2004): The galactokinase of *Hypocrea jecorina* is essential for cellulase induction by lactose but dispensable for growth on D-galactose. *Molecular Microbiology* **51**: 1015-1025 **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  $\gamma$ -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  $\beta$ -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  $\beta$ -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):  $\beta$ -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  $\beta$ -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 sajátja (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*  $\beta$ -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  $\beta$ -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  $\beta$ -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-à-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  $\beta$ -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  $\beta$ -galactosidase activity in *Aspergillus nidulans* (1<sup>st</sup> 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* (1<sup>st</sup> 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:  $\beta$ -galactosidase genes in *Aspergillus nidulans* (A Magyar Mikrobiológiai Társaság XIV. nemzetközi nagygyűlése, Balatonfüred, 2003).