

***A *PENICILLIUM CHRYSOGENUM* LAKTÓZ
HASZNOSÍTÁSÁNAK VIZSGÁLATA***

DOKTORI (PH.D.) ÉRTEKEZÉS

Készítette: Nagy Zoltán

Témavezető: Dr. Biró Sándor

Készült a Debreceni Egyetem Mikrobiológiai és Biotechnológiai Tanszékén

2002

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS	5
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	8
3. ANYAGOK ÉS VIZSGÁLATI MÓDSZEREK	22
3.1. Fiziológiai vizsgálatok	22
3.1.1. Törzsfenntartás	22
3.1.2. A gomba tenyésztése	22
3.1.3. A β -galaktozidáz aktivitás mérése	23
3.1.4. A fehérje tartalom mérése	24
3.1.5. A tenyészet száraztömegének mérése	24
3.1.6. A glükóz mennyiségének mérése	24
3.1.7. A laktóz mennyiségének mérése	24
3.1.8. Az ammónia mennyiségének meghatározása	25
3.1.9. Ciklikus nukleotidok (cAMP, cGMP) és ADP-ribóz koncentráció meghatározása	25
3.2. Enzimológiai vizsgálatok	26
3.2.1. Enzimmtisztítás	26
3.2.2. Részleges enzimmtisztítás	27
3.2.3. A β -galaktozidáz aktivitás pH és hőmérséklet függésének mérése	27
3.2.4. Szubsztrátspecifitás vizsgálata	27
3.2.5. A β -galaktozidáz molekulatömegének meghatározása gélszűrőssel	28
3.2.6. Gélelektroforézis	28
3.2.7. Fehérje transzfer polivinilidén-fluorid (PVDF) membránra	29
3.2.8. N-terminális aminosav szekvenciák meghatározása	30
3.3. Molekuláris biológiai vizsgálatok	30
3.3.1. <i>Penicillium chrysogenum</i> kromoszómális DNS izolálás	30
3.3.2. Alapvető molekuláris biológiai módszerek	31
3.3.3. Az N-acetil- β -D-hexóزامинидáz gén 5' végének amplifikálása polimeráz láncreakcióval	31
3.3.4. A PCR termék klónozása	31
3.3.5. A plazmid DNS inszertjének szekvenálása	32

3.3.6. A β -galaktozidáz és N-acetil- β -D-hexóزامинидáz enzimeket kódoló gének számának meghatározása Southern hibridizációval	32
4. EREDMÉNYEK	33
4.1. Fiziológiai vizsgálatok	33
4.1.1. Intra- és extracelluláris β -galaktozidáz termelés vizsgálata <i>Penicillium chrysogenum</i> -ban	33
4.1.2. Növekedés és β -galaktozidáz termelés különböző szénforrásokon	34
4.1.3. Különböző szénforrások hatása az indukált β -galaktozidáz termelésre	38
4.1.4. β -galaktozidáz szintézis a glükóz elfogyása után	38
4.1.5. cAMP, cGMP és ADP-ribóz koncentráció vizsgálata különböző szénforráson nőtt tenyészetekben	40
4.1.6. A koffein, a dBcAMP és a dezoxi-D-glükóz hatása a β -galaktozidáz szintézisre	41
4.2. A β-galaktozidáz aktivitással rendelkező enzim tisztítása és jellemzése <i>Penicillium chrysogenum</i>-ban	44
4.2.1. Az enzim tisztítása	44
4.2.2. A pH hatása az enzim aktivitásra	46
4.2.3. A hőmérséklet hatása az enzim aktivitásra	46
4.2.4. Molekulatömeg meghatározás	46
4.2.5. Az enzim szubsztrátspecifitásának vizsgálata	47
4.2.6. A β -galaktozidázzal együtt tisztuló két fehérje sajátosságai	48
4.2.7. A három fehérje N-terminális aminosav szekvenciájának meghatározása	48
4.3. Genetikai vizsgálatok	50
4.3.1. A N-acetil- β -D-hexóزامинидáz gén 5' végének szekvenálása	50
4.3.2. A β -galaktozidáz és N-acetil- β -D-hexóزامинидáz enzimeket kódoló gének számának meghatározása Southern hibridizációval	52
5. MEGBESZÉLÉS	54
5.1. A β-galaktozidáz aktivitás szénforrás szabályozása	54
5.2. A β-galaktozidáz aktivitással rendelkező enzim jellemzése	60
6. ÖSSZEFOGLALÁS	65
7. IRODALOMJEGYZÉK	67
7.1. Hivatkozott közlemények	67
7.2. Saját közlemények	77
8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	79

1. BEVEZETÉS

A penicillin ipari előállítása *Penicillium chrysogenum*mal történik. Régóta ismert, hogy a bioszintézis szénforrás szabályozás alatt áll. Könnyen metabolizálható szénforrásokon (glükóz, fruktóz, galaktóz) a penicillin titer alacsony, míg nehezebben metabolizálható szénforráson (laktóz) a titer magas. A glükóz és más könnyen hasznosítható szénforrások represszálják a penicillin bioszintetikus gének expresszióját, ám laktózt használva szénforrásként, ilyen represszió nem megfigyelhető meg (Brakhege 1998). Éppen ezért sokáig a penicillin termelés laktóz szénforráson történt. Ma az optimális titer elérését szubrepresszáló mennyiségű glükóz adagolásával oldják meg (Nielsen 1995). Mivel általában a gombák jobban nőnek glükózon, mint laktózon, ezek alapján úgy tűnik, hogy szuboptimális növekedési körülmények kedveznek a penicillin termelésnek. Noha *Penicillium chrysogenum*ban a glükóz represszáló hatására és a penicillin bioszintézis szabályozásában betöltött szerepére vonatkozólag elég sok ismeret áll rendelkezésre, addig a laktóz hasznosításáról és annak szabályozásáról csak alig, pedig ennek megértése közelebb vihetne nagyobb termelőképeségű törzsek előállításához és tenyésztésük optimalizálásához.

A laktóz hasznosítás vizsgálata abból a szempontból is érdekes, hogy a *Penicillium chrysogenum* természetes körülmények között a laktózzal mint szénforrással gyakorlatilag nem „találkozhatott”, ellentétben sok baktériummal, élesztővel és fonalas gombával, így a laktóz hasznosítás mechanizmusának tanulmányozása alternatív hasznosítási útra, szabályozó rendszerre világíthat rá. A mechanizmusok sokféleségére, olykor fajon belüli több út párhuzamos meglétére, és a szabályozás bizonyos elemeinek szinte faj specifikus voltára, már eddig is számos tanulmány rámutatott (Fantes és Roberts 1973; Bates és mtsai. 1967).

A laktóz hasznosítás kulcslépése, a molekula hidrolízise glükózra és galaktózra. A reakciót, a glikozid-hidrolázok közé tartozó, β -galaktozidáz aktivitással rendelkező enzimek katalizálják, melyek megtalálhatók az állatokban, a növényekben és a mikroorganizmusokban is (Díaz és mtsai. 1996). A baktériumok, az élesztők és a fonalas gombák β -galaktozidáza általában intracelluláris enzim, és a tápközegben jelenlévő laktózzal indukálható, de számos fajban az enzim extracelluláris.

Ismert tény, hogy a glükóz és más gyorsan hasznosuló cukrok gátolják a β -galaktozidáz szintézisét karbon repressziót előidézve. Legalaposabban az *Escherichia coliban* tanulmányozták az enzimet és az enzim termelődésének szabályozását (Saier 1996).

Sokáig a karbon katabolit represszióknak csak az *Escherichia coliban* megfigyelt cAMP-függő mechanizmusa volt részleteiben ismert. A katabolit érzékeny enzimeknek, mint például a β -galaktozidáznak, glükóz jelenlétében mért alacsony aktivitása és az alacsony cAMP szint közötti összefüggés jól demonstrálható. Később két cAMP-től független katabolit represszió mechanizmus is ismertté vált baktériumokban, az egyik *Escherichia coliban*, a másik *Bacillus subtilisben* (Saier 1996).

Élesztőkben és más gombákban az eddig vizsgáltak alapján a glükóz represszió mechanizmusa teljesen eltérő a baktériumokétól. A glükóz represszióban nem vesz részt közvetlenül a cAMP, s amennyiben szerepe van, az lényegesen eltér a baktériumokban megismerttől (Ronne 1995). Ismereteink azonban ezen a területen elég hiányosak. A katabolit represszió mechanizmusában a kulcsszerepet „cink-ujj” típusú fehérjék játsszák, mint például élesztőkben a MIG, *Aspergillusban* a CREA represszor fehérjék. Fonális gombákban a karbon represszió mechanizmusa az antibiotikum termeléssel kapcsolatban a leginkább ismert. A szénforrás bizonyítottan több ponton is szabályozza az antibiotikum bioszintézist, és úgy tűnik, hogy a penicillin termelés karbon repressziójának mechanizmusa azonosságot mutat a szénhidrát hasznosítás mechanizmusával *Penicillium chrysogenumban* (Barredo 1988). A β -galaktozidáz szerepének és szabályozásának vizsgálata további támpontokkal szolgálhat a két mechanizmus közötti összefüggések tisztázásához. β -galaktozidáz aktivitással rendelkező enzimet/enzimeket már számos gombából tisztítottak és meghatározták sajátosságaikat. Ezek a vizsgálatok azonban főként extracelluláris enzimekre irányultak, melyek más mikroorganizmusokban megtalálható β -galaktozidázokkal összehasonlítva, magasabb hőmérsékleten is stabilak és alacsonyabb pH-n is jól működnek (Shaikh és mtsai. 1999). Ezen kísérletek célja főként az volt, hogy az enzimet az iparban (pl.: élelmiszeriparban), vagy glikokonjugátumok szintéziséhez használják. Magát az enzimtermelést és a szabályozódását azonban csak néhány esetben vizsgálták.

Mivel *Penicillium chrysogenumban* még nem tanulmányozták a laktóz hasznosítás mechanizmusát, ezért munkánk során ennek vizsgálatát tűztük ki célul. Elsősorban azokat a jelenségeket tanulmányoztuk, amelyek a laktóznak, mint szénforrásnak a felhasználásával kapcsolatosak, és azokra a kérdésekre igyekeztünk

választ adni, amelyek az eddig ismert mechanizmusok ismeretében felvetődnek, megalapozva ezzel egy átfogóbb élettani, genetikai vizsgálatot. Ehhez, egy a tanszékünkön rendelkezésre álló, ipari termelésben használt *Penicillium chrysogenum* törzset használtunk. Vizsgáltuk a β -galaktozidáz intracelluláris termelődését, indukálhatóságát, karbon repressziójának mechanizmusát. Kísérleteinkben a különböző szénforrások hatására bekövetkező enzimaktivitás változást, valamint ezzel párhuzamosan a különböző nukleotidok sejten belüli szintjét mértük, különös tekintettel a cAMP-re. A β -galaktozidáz enzimatis és genetikai jellemzésével együtt, próbáltunk összefüggést keresni a kapott eredmények között és az eddig ismert mechanizmusokkal összevetve a karbon represszió mechanizmusára következtetni.

Ennek alapján a következő vizsgálatokat tűztük ki célul:

1. Hol történik a laktóz hidrolízise, sejten belül vagy kívül? A hidrolízisért felelős β -galaktozidáz intracelluláris vagy extracelluláris? Hogyan változik az aktivitás a tenyésztés során?
2. Különböző szénforrások, hogyan befolyásolják a gomba növekedését? Mely szénforrásokon tapasztalható β -galaktozidáz termelés? Indukálható-e az enzim szintézise? Mennyire hatékony az enzim a laktóz hasznosítása szempontjából?
3. Hogyan befolyásolja a glükóz és más könnyen hasznosuló szénforrás az enzim termelését? Mely szénforrások represszálják a β -galaktozidáz aktivitást? Megfigyelhető-e az enzim szintézis derepressziója?
4. Van-e összefüggés a β -galaktozidáz aktivitás és a sejten belüli cAMP szint között? Lehet-e szerepe a cAMP-nek az enzim termelés szabályozásában? A foszfodiészteráz inhibitor koffein milyen hatással van a szénforrás szabályozásra? A cAMP homológ 6-N-2-O-dibutiril-ciklikus-AMP (dBcAMP) befolyásolja-e a β -galaktozidáz termelést?
5. Milyen enzimatis sajátosságokkal rendelkezik a tisztított enzim? Milyen hasonlóságot mutat más mikrobiális β -galaktozidáz enzimekkel?
6. Hány β -galaktozidáz aktivitással rendelkező enzimet kódoló struktúr gén azonosítható *Penicillium chrysogenum*-ban?
7. Milyen más fehérjék vehetnek részt az enzimműködés szabályozásában?

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

A *Penicillium* nemzetség rendkívül fajgazdag, tagjai az egész világon elterjedtek. Előfordulnak a talajban, vízben, élő és holt szervezetek felületén. Spóráik jelen vannak a levegőben, és rátapadnak a legkülönbözőbb szubsztrátumokra, amelyeken minimális életlehetőségek mellett képesek növekedni. A nemzetségbe tartozó fajok többsége szaprofita, de található közöttük parazita és kommenzalista is. Nagy gyakorlati jelentőségük van az ide tartozó fajoknak az antibiotikum termelésben, továbbá más olyan szerves anyagok képzésében, amelyek például egyes sajtfélék vagy szalámfélék érésében működnek közre; hátrányos a szerepük a termékek rothadási folyamataiban, a mikotoxinok képzésében és abban, hogy egyes embereken allergiás megbetegedéseket váltanak ki (Fassatiova 1979). Eddig egyetlen állati patogén fajt írtak le, a *Penicillium marneffeit*, de már azt is kimutatták, hogy *Penicillium chrysogenum* emberben endophthalmitist okozhat (Eschete és mtsai. 1981). A csoport egyik iparilag legjelentősebb tagja, a β -laktám antibiotikumok, penicillinek termelésére használt *Penicillium chrysogenum*.

Penicillint számos gomba nemzetség (pl.: *Penicillium*, *Aspergillus*, *Acremonium*, *Epidermophyton*, *Polypaecilum*, stb.) termel (Aoki és Okuhara 1980; Aharonowitz és Cohen 1992). A *Penicillium* és *Aspergillus* nemzetségből a *Penicillium chrysogenum* és az *Aspergillus nidulans* a legfontosabbak. A penicillin ipari termelése a *Penicillium chrysogenum*-ra alapul, az *Aspergillus nidulans*-nak az alapkutatásban van nagy szerepe. Mivel már a kezdetektől *Penicillium chrysogenum*-mal történik a termelés, igen átfogóan tanulmányozták ezt a fajt. Ennek eredményeként mára jelentős ismeretanyag halmozódott fel a termelő törzsek kifejlesztésének módszereiről, a növekedéshez és penicillin termeléshez szükséges optimális tápközegről és a *Penicillium chrysogenum* tápanyag igényéről (Jarvis és Johnson 1950; Nielsen 1995). Ennek ellenére a gomba metabolizmusának és növekedési mechanizmusának számos aspektusa még mindig feltáratlan, ezért ezeknek a témáknak a tanulmányozása értékes.

A mikroorganizmusok karbon katabolizmusukat hozzáigazítják az éppen aktuális körülményekhez. Az egyik ilyen szabályozó mechanizmus ebben az adaptációban, a karbon represszió. A gyorsan metabolizálódó szénhidrátok represszálják azoknak az enzimeknek a szintézisét, amelyek összefüggésben vannak az alternatív

szénforrások katabolizmusával, biztosítva ezzel, hogy a jelen levő legkedvezményezettebb szénforrás hasznosuljon elsődlegesen. Sejtfiziológiai szempontból ez két okból is előnyös. Egyrészt az energetikailag legkedvezőbb szénforrás hasznosul, másrészt a sejtek nem vesztenek energiát más katabolit rendszer szintézisére (Ruijter és Visser 1997).

Ahogy már más szerzők is javasolták (Ronne 1995), a „karbon represszió” kifejezést használjuk a gyakran használatos „karbon katabolit represszió” terminológia helyett, mivel ebben az utóbbiban benne foglaltatik, hogy a katabolitok részt vesznek a repressziós mechanizmusban, ami azonban jelenleg még nem tisztázott. A repressziót különböző szénforrások idézhetik elő, de valószínűleg a glükóz a legrepresszálbóbb. A legtöbb kísérletes tanulmány tulajdonképpen a glükóz hatására vonatkozik, és valószínűleg ez az oka, amiért a „glükóz represszió” kifejezés szintén használatos. A glükóz represszió egy speciális esete a karbon repressziónak, mint általános jelenségnek.

Általában karbon represszióra utal az a megfigyelés, hogy egy enzim aktivitása alacsony, ha egy indukáló és represszálo szénforrás keverékén történik a növekedés, szemben azzal, ha csak indukáló szénforráson. Egy ilyen megfigyelés azonban még nem bizonyítja, hogy a vizsgált enzim bioszintézise ténylegesen represszálván van. A represszálo hatás lehet indirekt, és például az inducer képződés hiányának tulajdonítható.

A karbon represszió által szabályozott rendszereket metabolikus funkciójuk alapján három csoportra lehet osztani. Az első és nagy csoportba azok a gének tartoznak, amelyek a kevésbé preferált szénforrások katabolizmusát végző enzimeket kódolják. (A legtöbb enzimrendszert, melyek poliszacharidok, mint pl.: cellulóz, pektin, xilán és arabán, degradálásában vesznek részt, úgy tűnik, a glükóz represszálja.)

A második csoportba azok a gének tartoznak, melyek a glükoneogenezis és a glioxalát ciklus enzimeit kódolják. Ezeket a géneket *Penicilliumban* és *Aspergillusban* még nem tanulmányozták kiterjedten. Tulajdonképpen még nem tisztázott, hogy a glükoneogenezis génjei egyáltalán represszáltak-e.

A harmadik csoportba azok a karbon represszió alatt álló gének tartoznak, amelyek a szekunder metabolizmussal vannak kapcsolatban. A leginkább jellemzett rendszer a mai napig a penicillin termelés *Aspergillus nidulansban* és *Penicillium chrysogenumban*.

A karbon represszió mechanizmusát részletesen tanulmányozták baktériumokban, ahol mint „karbon katabolit represszió” ismert, annak a korai

feltételezésnek az alapján, mely szerint a glükóz foszforilációja idézi elő a repressziót (Ronne 1995).

A karbon katabolit represszió mechanizmusát a legátfogóbban *Escherichia coli*-ban tanulmányozták. Baktériumokban sokáig csak az *Escherichia coli*-ban megfigyelt cAMP függő mechanizmus volt ismert molekuláris szinten (Botsford és Harman 1992). Jól kimutatható az összefüggés glükóz jelenlétében a katabolit érzékeny enzimeknek, mint például a β -galaktozidáznak, az alacsony aktivitása és az alacsony cAMP szint között. A glükóz egy foszfortranszferáz rendszeren keresztül jut be a sejtbe, amelynek révén foszforilálódik, miközben az egyik nagy energiájú foszfoprotein intermediér (IIA^{glc}) defoszforilálódik (Saier 1996). Ez azt eredményezi, hogy az adenilát-cikláz inaktiválódik, a citoplazmatikus cAMP koncentráció lecsökken, a cAMP-CRP (cAMP-cAMP receptor protein) komplex ledisszociál a DNS-ről, a transzkripció leáll (Saier 1996).

Később két cAMP-től független katabolit represszió mechanizmus is ismertté vált baktériumokban. Az egyik *Escherichia coli*-ban, a másik *Bacillus subtilis*-ben (Saier 1996).

E. coli-ban a központi szerepet egy katabolit represszor/aktivátor (Cra) fehérje játssza, amely katabolit hiányában az adott operon operátor régiójához kapcsolódik, és annak megfelelően, hogy az operátor hol helyezkedik el az operon RNS-kötő helyéhez képest, aktiválni, illetve gátolni fogja a transzkripciót. A cukrok ebben az esetben is foszfortranszferáz rendszeren keresztül jutnak a sejtbe. A citoplazmatikus glikolitikus katabolitok (pl.: fruktóz-1-foszfát és fruktóz-1,6-biszfoszfát) hozzákapcsolódnak a tetramer Cra fehérjéhez, aminek eredményeképpen az ledisszociál a DNS-ről, inaktiválva illetve derepresszálva a transzkripciót, ezzel katabolit repressziót illetve katabolit aktiválást eredményezve.

Bacillus subtilis-ben egy katabolit által aktivált, ATP-dependens protein kináz (CAP), egy foszfocarrier protein (Hpr) és egy transzkripciós faktor (CcpA) révén valósul meg a folyamat. Magas glükózszint esetén az intracelluláris metabolitok akkumulálódnak (pl.: fruktóz-1,6-biszfoszfát) és aktiválják a protein-kinázt, amely foszforilálja a foszfocarrier protein szeril-csoportját. A Hpr a transzkripciós faktoral egy komplexet hoz létre, amely komplex bekapcsolódik a megfelelő operon szabályozó régiójába, katabolit repressziót előidézve.

Baktériumokban ettől a három mechanizmustól fajoként is különböző karbon katabolit mechanizmusok is léteznek, amelyek viszont még kevésbé feltártak (Saier 1996).

Élesztők és más gombák szintén mutatnak egy hasonló, „glükóz represszió” vagy „glükóz hatásnak” nevezett választ, amit már 100 évvel ezelőtt felfedezték, jóval a baktériumokban először tanulmányozott ilyen jelenség előtt. Az élesztőkkel és fonalas gombákkal végzett vizsgálatok megmutatták, hogy eukarióta szervezetekben létezik a glükóz represszió egy olyan mechanizmusa, amely különbözik a baktériumokban megtalálhatótól. Gombákban a glükóz represszió valószínűleg ugyanazt a célt szolgálja, mint amit baktériumokban, azonban teljesen eltérő mechanizmus révén. Gombákban ugyanis a glükóz repressziót nem a cAMP szint megugrása közvetíti, és szintén különbözik attól a glükóz repressziótól, amely során a célzott promóter régiók egy DNS-kötő represszor fehérje direkt negatív kontrollja alatt állnak. A gombák közül *Saccharomyces cerevisiae*-ben (Ronne 1995; Gancedo 1992) tanulmányozták legátfogóbban a karbon repressziót, de sok tanulmány jelent meg *Aspergillus nidulans* esetében is (Ruijter 1997).

Saccharomyces cerevisiae-ben a glükóz represszió mechanizmusának megértéséhez először is azt szükséges tisztázni, hogy a különböző szénforrásokat hogyan hasznosítja a gomba sejt. A nem fermentálódó szénforrások, mint például az etanol, a Krebs-ciklusban metabolizálódik, és a respiráció révén ATP keletkezik. Mivel a sejtnak hexóz-foszfátokra is szüksége van a bioszintetikus reakciókhoz, glükóz hiányában, a glükoneogenezis révén kell biztosítani. A glükoneogenezis legtöbb lépését a glikolitikus enzimek katalizálják, ám két lépés irreverzibilis, ezért saját glükoneogenetikus enzimekkel rendelkeznek: a fruktóz-biszfoszfáttal (Fbp1) és a PEP-karboxikinázzal (Pck1).

Ezzel szemben, a fermentálódó szénforrások, mint például a glükóz, a glikolitikus úton keresztül metabolizálódnak. A képződött piroszőlősav zömében dekarboxileződik és etanollá redukálódik, regenerálva a glikolízis során felhasználódott NAD-ot. A glükóznak csak egy kis része metabolizálódik teljesen, és sokkal kevesebb ATP képződik, mint az oxidatív növekedés során. A tisztán fermentatív növekedés pazarlásnak tűnhet, azonban a szén nem vész el, hanem csak egyszerűen elkülönül, mint etanol. Amint a glükóz elfogy, az élesztő sejtek mitokondriális enzimeit derepresszálódnak, és a képződött etanol elkezd metabolizálódni. Ezt az átmenetet, a glükóz fermentációból a glükoneogenetikus növekedésbe nevezzük diauxikus shift-nek. Meg kell jegyezni, hogy az elérhető glükóz gyors átalakítása etanollá szelekciós előnyt biztosít az élesztő sejtek számára egy olyan közegben, ahol a kompetítor szervezet nem tudja hasznosítani az etanolt.

A fermentatív növekedésből a glükoneogenetikus növekedésbe történő átmenet nagy változásokat jelent az egész szén metabolizmus folyamatában. A folyamatban részt vevő sok enzim poszttranszkripció szabályozás alatt áll, de nagy számban vannak transzkripció szinten kontrollált gének is, amelyek vagy indukálódnak, vagy represszálódnak glükóz jelenlétében.

A glükóz represszált géneket a fentiek alapján három csoportra lehet osztani: 1) *FBP1* és *PCK1*, melyek a glükoneogenezis saját enzimei. Ezeket a géneket a glükóz erősen represszálja, hogy megakadályozza a glikolízis és a glükoneogenezis egyidejű működését. 2) A mitokondriális enzimeket kódoló gének, amelyek a Krebs-ciklusban és a respirációban vesznek részt (*Aspergillus*ban, lévén obligát aerob, ez nem valószínű, amit Raitt és mtsai. (1994) meg is erősítettek azzal, hogy kimutatták, a glükóz nem represszálja a citokróm *c* szintézisét ellentétben a *Saccharomyces cerevisiae*vel). 3) Azok a glükóz represszált gének, amelyek más szénforrások felvételét és metabolizálását végzik. Ezek közé tartoznak a *GAL*, *SUC* és *MAL* gének termékei, melyek a galaktóz, szacharóz és maltóz felhasználásának első lépéseit katalizálják. Ezek a cukrok a glikolitikus útra lépnek be, mint hexóz-foszfátok és a glükózzal megegyező módon metabolizálódnak. Az etanol, tejsav és glicerol hasznosításáért felelős gének hasonlóképpen glükóz represszió alatt állnak (Ronne 1995).

Ma még nem teljesen tisztázott, hogy a glükóz miként váltja ki a repressziót, de úgy tűnik, hogy a hexokináznak fontos szerepe van benne, mivel az enzim aktivitása szükséges a represszióhoz. Emellett számos megfigyelés arra mutat, hogy a represszió kiváltásában a glikolízis fluxusának van nagy szerepe, sokkal inkább, mint egy kezdeti intermediernek (Ronne 1995).

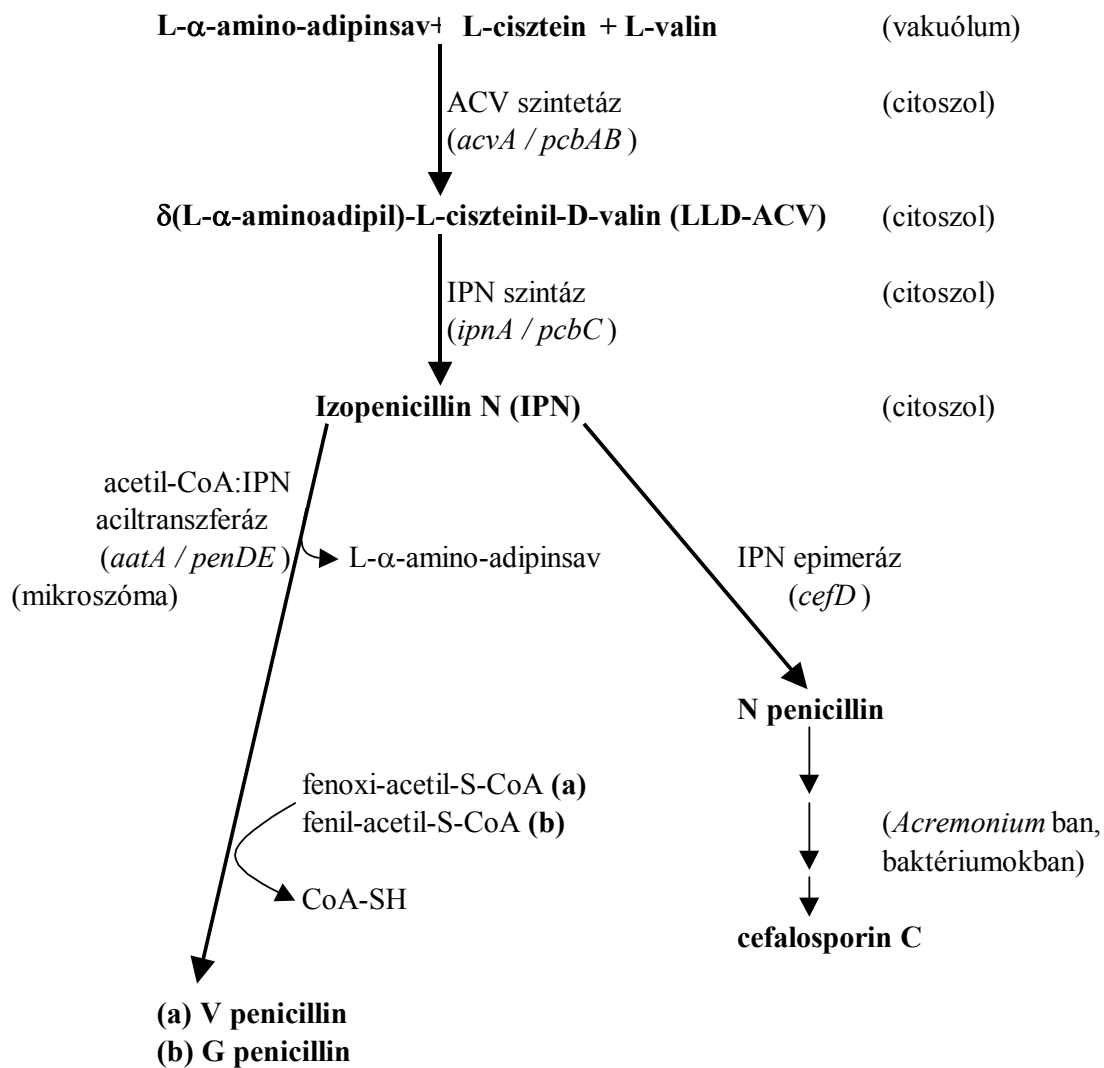
Élesztőkben a glükóz repressziót vizsgáló korai munkák a cAMP szerepére helyezték a hangsúlyt, abban a meggyőződésben, hogy a szignál ugyanaz lehet, mint a baktériumok katabolit repressziójában. Ehelyett azonban azt találták, hogy egy protein kináznak (Snf1, Cat1 vagy Ccr1) van kulcsszerepe a glükóz represszióban (Carlson és mtsai. 1981). Ez a kináz minden glükóz represszált gén expressziójához szükséges (Celenza és Carlson 1986). Egy egyszerű modell a glükóz represszióra az lenne, hogy a glükóz generál egy szignált, ami gátolja vagy közömbösíti az Snf1 aktivitását. Arra azonban nincs egyértelmű bizonyíték, hogy a glükóz szabályozza az Snf1 aktivitást.

A glükóz represszióra specifikus „downstream” effektorokat már azonosították: a MIG1 represszort élesztőben és a közeli rokon CREA represszort *Aspergillus*ban.

Egy lehetséges alternatív mechanizmus a glükóz szabályozásra a cAMP út. Hasadó élesztőben végzett kísérletek alapján úgy tűnik, hogy a *FBPI* glükóz repressziója ezen útvonal által közvetített (Hoffman és Winston 1991). Hangsúlyozni kell azonban, hogy míg baktériumokban a katabolit represszió rendelkezik egy cAMP szignállal, addig hasadó élesztőkben, a cAMP szerepe teljesen ellentétes irányú. Hasadó élesztőben a glükóz indukálja a cAMP szintézist (Byrne és Hoffman 1993), baktériumokban gátolja. Sőt, a cAMP glükóz repressziót okoz hasadó élesztőben, de baktériumokban serkenti a glükóz represszált gének expresszióját. Ezen kívül élesztőben nincs a bakteriális CAP fehérjéhez hasonló, cAMP-kötő transzkripciós faktor. Eukariótákban ehelyett a cAMP dependens protein kináz adja tovább a cAMP szignált.

Sarjadzó élesztőben a cAMP út funkciója még nem pontosan tisztázott, de nem elképzelhetetlen, hogy részt vesz a glükóz szabályozásban. Ahogy hasadó élesztőben, a glükóz átmenetileg itt is indukálja a cAMP szintézist és számos glükóz represszált gén expresszióját befolyásolja, mint például az *ADH2*-t (Denis és Audino 1991). Azonban az invertáz aktivitás folyamatosan glükóz represszált olyan törzsekben, melyekben eléggé alacsony a cAMP dependens kináz aktivitás. Ez azt mutatja, hogy az Snf1 útvonalon keresztüli represszió független a cAMP rendszertől, de nem zárható ki a lehetőség, hogy a cAMP rendszer az Snf1 úttal párhuzamosan működik.

Mára a penicillin bioszintézis szinte teljesen tisztázott. A folyamat három enzimatis lépésből áll, amelyekből az első kettő minden β -laktám antibiotikumot termelő folyamatban azonos (**1. ábra**). Ezt a két lépést katalizáló enzimek feltehetőleg először egy prokarióta szervezetben alakultak ki, és egy génklaszter, amely ennek a két enzimnek a génjeit tartalmazta, mintegy 370 millió évvel ezelőtt kerülhetett át ezekből a prokariótákból a *Penicillium*, *Cephalosporium* és más β -laktám termelő fonalas gombák közös ősébe (Weigel és mtsai. 1988). Az egyes fajok ezt követő evolúciójának ellenére még mindig nagyfokú homológia figyelhető meg az egyes szervezetek enzimeit között (Martín 1992).



1. ábra. A penicillin bioszintézise. Penicillin bioszintézis csak gombákban megfigyelhető, ám cefalosporint mind gombák, mind baktériumok szintetizálnak.

Már hamar kimutatták, hogy a penicillinben a kén, az L-ciszteinből származik (Arnstein és Grant 1954 a,b), és a β -laktám bioszintézis első lépése három aminosav: az L- α -aminoadipinsav, L-cisztein és L-valin kondenzációja, aminek eredménye egy tripeptid: az α -aminoadipil-ciszteinil-valin (ACV) (Arnstein és mtsai. 1960, Arnstein és Morris 1960). Később kimutatták, hogy a tripeptid δ -(L- α -aminoadipil)-L-ciszteinil-D-valin (LLD-ACV) konfigurációjú (Loder és Abraham 1971, Adriens és mtsai. 1975). Ma már tudjuk, hogy a reakciót egyetlen multifunkcionális enzim, az ACV szintetáz (ACVS) katalizálja, mely a két peptidkötés kialakítása mellett a valin epimerizációját is elvégzi

(Zhang és Demain 1992). Az ACV 1960-as felfedezése után több mint 15 évre volt szükség ahhoz, hogy sikerüljön a tripeptidet penám szerkezetűvé átalakítani sejt extraktumban (Fawcett és mtsai. 1976) és hogy néhány év múltán az LLD-ACV-ból nyert terméket, mint izopenicillin N-t azonosítsák (O'Sullivan és mtsai. 1979, Konomi és mtsai. 1979). Ma már tudjuk, hogy az LLD-ACV oxidatív gyűrű záródását, izopenicillin N-t létrehozva, egyetlen enzim, az izopenicillin-N-szintetáz (IPNS) végzi, amely szabad oxigént használ elektron akzeptorként (White és mtsai. 1982). Az izopenicillin N egy elágazási pont a penicillin és cefalosporin/cefamicin bioszintézisben. A penicillinek bioszintézisében az izopenicillin N oldallánca leggyakrabban fenilacetil vagy fenoxi-acetil csoportra cserélődik le, penicillin G-t vagy penicillin V-t létrehozva. Ezt a reakciót az acetil-CoA:izopenicillin-N-aciltranszferáz (AT) katalizálja, aminek jelenlétét már 1967-ben demonstrálták *Penicillium chrysogenum* nyers extraktumában (Pruess és Johnson 1967). Az oldallánc cseréje kétféleképpen is végbemehet (Alvarez és mtsai. 1987). Az egyik lehetőség, hogy az α -aminoadipinsav oldallánc lehasad és 6-amino-penicillánsav (6-APA) szabadul fel. Ezt követően, ha jelen van a CoA-val az aktivált oldallánc prekursor (pl.: mint CoA-tioészter), akkor a CoA felszabadulása közben hozzákötődhet az acetiltranszferázhoz, és létrejön a kész penicillin molekula. Elképzelhető egy egylépéses reakció mechanizmus is, amelyben az izopenicillin N α -aminoadipinsav oldallánca közvetlenül kicserélődik a prekuzorral anélkül, hogy a 6-APA felszabadulna az enzimről. Később kimutatták, hogy az izopenicillin-N-aciltranszferáz *Penicillium chrysogenum*ban mind a három reakciót képes véghezvinni *in vitro*, de az még nem ismert, hogy a két mechanizmus közül melyik van túlsúlyban *in vivo*.

*Aspergillus nidulans*ban és *Penicillium chrysogenum*ban a penicillin bioszintézisét katalizáló három enzimet kódoló gének: az *acvA* (*pcbA*), az *ipnA* (*pcbC*) és az *aat* (*penDE*). Ezek a gének génklaszterbe szerveződnek, és több tanulmány is kimutatta, hogy a gének működését komplex szabályozó hálózat kontrollálja (Brakhage 1997, Brakhage 1998).

A penicillin termelésre kifejlesztett táptalajok vizsgálata révén régóta jól ismert, hogy diszacharidok valamint oligo- és poliszacharidok jobb szénforrások a penicillin bioszintézis számára, mint a glükóz. A penicillin *Penicillium chrysogenum* általi ipari termeléséhez éppen ezért korábban laktózt használtak szénforrásként, mivel így sikerült a legmagasabb penicillin titert elérni. A főlegben használt glükóz drasztikusan lecsökkentette a titert (Soltero és Johnson 1953; Martin és mtsai. 1982). A fruktóznak,

galaktóznak és szacharóznak a glükózhoz hasonlóan szintén negatív hatása volt a penicillin termelésre. Tekintettel arra, hogy a glükóz hatása koncentráció függő, ipari méretekben a penicillin bioszintézis glükóz általi karbon represszió kikerüléséhez szubrepresszálo mennyiségű glükózt adagolnak a tenyészetbe (Matsumura és mtsai. 1978, Soltero és Johnson 1954). Érdekes megjegyezni, hogy a karbon represszió meglete pH függő: a pH csökkenésével hatása nő (Espeso és mtsai. 1993). A fiziológiai értelmezése a penicillin bioszintézis karbon kontrolljának még nem teljesen tisztázott. Egy, a kompetitív mikroorganizmusok növekedését gátló antibiotikum lehetséges termelése fontosabb, ha a szénforrás limitált, mint ha bőven elérhető mennyiségben van jelen.

A szénforrás több ponton is szabályozza a penicillin bioszintézist: (1) L- α -AAA fluxusán, (2) oldallánc prekursorok aktiválásán, (3) penicillin bioszintézis gének transzkripcióján és (4) penicillin bioszintézis gének poszttranszkripciós szabályozásán keresztül. *Penicillium chrysogenum* esetében a glükóz pótlás laktóz szénforráson lecsökkentette az L- α -AAA pool-t a micéliumban, ami valószínűleg az L- α -AAA ACV átalakulás fluxusát is csökkentette (Hönlinger és Kubicek 1989). Az ACV és IPN képződését a glükóz szintén represszálta (Hönlinger és Kubicek 1989; Revilla és mtsai. 1984, 1986). [14 C] valin ACV-be történő *in vivo* beépülésének közvetett mérése alapján szintén feltételezhető, hogy a penicillin bioszintézis glükóz repressziója során a glükóz represszálja és nem gátolja a penicillin bioszintetikus enzimeket. Ezzel szemben Renno és munkatársai szerint (Renno és mtsai. 1992) mind a három penicillin bioszintézis gén steady-state mRNS szintje magas volt gyors növekedés esetében, amikor számottevő glükóz volt jelen. Mindezek azt mutatják, hogy a szénforrás szabályozásának mérése, legalábbis részben, de függ a kísérleti megközelítéstől.

*Aspergillus nidulans*ban hasonló jelenség figyelhető meg. Represszálo szénforrások, mint a glükóz, szacharóz, lecsökkentik a penicillin termelést (Brakhage és mtsai. 1992). Riportergén fúziós vizsgálatok eredményei azt mutatják, hogy az *ipnA* gén expresszióját a fermentáció folyamán a laktóz helyett szénforrásként használt glükóz vagy szacharóz represszálja (Brakhage és mtsai 1992). Ezt alátámasztotta az a megfigyelés is, hogy az IPNS specifikus aktivitás jelentősen lecsökkent glükózon nőtt tenyészetekben. Az *ipnA* expressziójának repressziója, represszálo szénforrások által, legalábbis részben, transzkripciós szinten történik, mivel az egyensúlyi *ipnA* mRNS szint lecsökken, mikor a tenyészetek represszálo szénforráson, mint például szacharózon nőnek (Brakhage 1998). Azonban a tápközegben lévő glükóz mind az *acvA*, mind az *aata* riporter gén

fúziók expresszióját csak kevéssé, vagy alig represszálta. Viszont az *aatA* gén termékének, az IAT-nak a specifikus aktivitása lecsökkent a laktóz helyett glükózon nőtt tenyészetekben (Brakhage és mtsai. 1992). Ez alapján úgy tűnik, hogy az IAT glükóz szabályozása, legalábbis részben, posztranszkripciós szinten történik. Az azonban még nem tisztázott, hogy a glükóz szabályozás miért történik transzkripciós szinten az *ipnA* esetében és posztranszkripciós szinten az *aatA* esetében.

A penicillin termelés karbon repressziója valószínűleg megkívánja a glükóz katabolizmusát, és ezen keresztül hat, ugyanis a glükóz analógok, mint pl.: β -metil-glükózid, 3-O-metil-glükózid, a glükózzal azonos koncentrációban, nem fejtik ki ezt a hatást. Ezeket az analógokat felveszik a sejtek, de tovább nem metabolizálják (Bourd és mtsai. 1975, López és Thoms 1977).

A cAMP szerepe a szénforrás szabályozásban vitatott kérdés. *Penicillium chrysogenum*-ban a cAMP szint magas, ha a gomba laktóz szénforráson nő, és erősen lecsökken (kb. 75 %) ha glükózt adunk hozzá (Kozma és mtsai. 1993). *Aspergillus nidulans*-ban nem mutattak ki összefüggést az intracelluláris cAMP szint és a szénforrás (laktóz és glükóz) között (Brakhage 1998).

Annak vizsgálatához, hogy az *ipnA* gén expresszióját a szénforrás miként szabályozza molekuláris szinten, olyan *Aspergillus nidulans* mutánsokat vizsgáltak, amelyek primer metabolizmus különböző génjeinek glükóz represszióját befolyásoló (*creA^d-1*, *creB304* és *creC302*) (Bailey és Arst 1975), már korábban karakterizált helyeket hordoztak. Ezek alapján megállapítható, hogy nagy valószínűséggel a CREA nem játszik szerepet a penicillin bioszintézis karbon repressziójában.

Amint a fentiekből is kitűnik, a szénhasznosítás és a penicillin bioszintézis között szoros kapcsolat áll fenn, sőt *Penicillium chrysogenum* glükokináz deficiens mutáns vizsgálatai alapján (Barredo és mtsai. 1988) úgy tűnik, hogy a szénhidrát hasznosítás és a penicillin bioszintézis szénforrás szabályozása közös mechanizmus révén valósul meg.

A *Penicillium chrysogenum*, hasonlóan a legtöbb fonalas gombához, jelentős bioszintetikus képességgel rendelkezik, és egyszerű összetételű táptalajon is nőhet. A szerves anyagok széles spektrumát képes szén- és energiaforrásként felhasználni, de a leggyakrabban használt szén- és energiaforrások a cukrok, mint a glükóz, a laktóz és a szacharóz (Moss 1987).

*Penicillium chrysogenum*ban a szubsztrátumok és metabolikus termékek transzportját csak néhány sajátos esetben vizsgálták (Nielsen 1995; Hunter és Segel 1971, 1973), de más fonalas gombák és élesztők (különösen *Saccharomyces cerevisiae*) transzport folyamatairól kellő mennyiségű ismeret áll rendelkezésre.

Gombákban a szénhidrátok transzportja facilitált diffúzióval (pl.: a glükóz) vagy aktív transzporttal (pl.: a laktóz) történik, ami nem foglal magában egy egyidejű foszforilációs lépést, mint az a baktériumok PTS-rendszere esetében megfigyelhető. Azonban a szénhidrát foszforilációja gyorsan történik a sejtbejutás után, ezért nehéz azonosítani a nem foszforilált intracelluláris cukrokat.

Amikor a *Penicillium chrysogenum* olyan diszacharidokon, mint például a szacharóz és laktóz nő, azok monomerjeikre hidrolizálnak (glükóz/fruktóz és glükóz/galaktóz) az invertáz (vagy β -frukto-furanozidáz) és laktáz (β -galaktozidáz) enzimek által. A monomerek a glikolitikus utakon metabolizálódnak. Élesztőben (Gancedo és Serrano 1989) és *Neurospora crassaban* (Marzluf és Metzenberg 1967) az invertáz a periplazmatikus térben lokalizálódik. *Penicillium chrysogenum*ban az invertáz lokalizációja ismeretlen. *Penicillium chrysogenum* süllyesztett (submerged) kultúrában extracellulárisan figyeltek meg némi invertáz aktivitást, de elképzelhető, hogy csak a hifák fragmentálódása során szabadult ki a periplazmatikus térből az extracelluláris tápközegbe. Későbbi batch kultúrában azt tapasztalták, hogy szacharóz szén- és energiaforráson mind a glükóz, mind a fruktóz a tápközegben akumulálódik, ami tisztán mutatja, hogy igen nagy invertáz aktivitás van jelen extracellulárisan. A laktáz a citoszólban lokalizálódik élesztőben (Gancedo és Serrano 1989), fonalas gombákban lehet intra- vagy extracelluláris, vagy mind a kettő egyszerre, mint például *Neurospora crassaban* (Landman 1954, Lester és mtsai. 1962).

A cukrok közös belépési helye a glikolitikus utakba, a három monofoszfáton (glükóz-1-foszfát, glükóz-6-foszfát és fruktóz-6-foszfát) keresztül történik, amelyek egymásba könnyen átalakulhatnak, és ezért egyetlen metabolikus pool-t alkotnak (Nielsen 1995; Sih és Knight 1956). Az intracelluláris glükóz és fruktóz egyenesen a hexóz-monofoszfát pool-ba lépnek be, a hatos szénatomuk foszforileződése révén. Az extracelluláris galaktóz transzportjából vagy a laktóz intracelluláris hidrolíziséből származó galaktóz belépése a hexóz-monofoszfát pool-ba sokkal bonyolultabb módon történik. *Penicillium chrysogenum*ban még nem azonosították a galaktóz asszimilációjáért felelős enzimeket (Nielsen 1995), de a folyamat feltehetőleg hasonlóan történik, mint az élesztőkben (Gancedo és Serrano 1989).

A laktóz hasznosítás kulcsenzime a laktózt glükózra és galaktózra hidrolizáló β -galaktozidáz (β -D-galaktozid-galaktohidroláz vagy laktáz; EC 3.2.1.23), mely egyaránt megtalálható baktériumokban, gombákban, növényekben és állatokban. A reakció mechanizmust, és az enzim háromdimenziós szerkezetét tekintve, a legrészletesebben az *Escherichia coli*-ban található β -galaktozidázt tanulmányozták (Ring és mtsai. 1988; Jacobson és mtsai. 1994), azonban az ipar számára legfontosabb β -galaktozidázok élesztőkből és különböző *Aspergillus* fajokból származnak. Ezeket az enzimeket főként az élelmiszeriparban használják, a glükóz és galaktóz közötti β -(1,4) kötés hidrolizálásához, a világszerte nagy mennyiségben felhalmozódó laktóz hasznosításához, vagy a laktóz intolerancia miatt az eltávolításához (Shukla 1975). Az ipari felhasználása mellett azonban már jó ideje glikokonjugátumok régió- és sztereospecifikus szintéziséhez is használják (Attal és mtsai. 1992). Ezeknek a biotechnológiai alkalmazásoknak a szempontjából előnyös, ha az enzim termotabilabb és alacsonyabb pH-n is jól működik, valamint extracelluláris. Ebből adódóan, a kutatások nagyrészt ilyen enzimek keresésének és tisztításának irányába történtek, különösen fonalas gombák esetében. Számos tanulmány jelent meg különböző forrásból származó β -galaktozidáz tisztításáról és enzimatiszításáról (Fischer és mtsai. 1995; Shaikh és mtsai. 1999; Rogalski és Lobarzewski 1995; Gargova 1995), azonban az enzimtermelés szabályozásáról jóval kevesebb.

Általában elmondható, hogy a legtöbb mikroorganizmusban a laktóz indukálja, a glükóz represszálja a β -galaktozidáz aktivitást.

A represszáló szénforrások közül általában a glükóz a legrepresszálóbb. *Escherichia coli*-ban, a glükóz három módon befolyásolja a β -galaktozidáz szintézist. A glükóz megakadályozhatja a laktóz belépését a sejtbe, így magát az indukciót is. Ezt inducer kizárásnak nevezik. Indukált sejtekben, a glükóz jelenléte felére csökkenti a β -galaktozidáz szintézis mértékét, amit karbon katabolit represszió (permanens represszió) neveznek. Valamint indukált sejtben, a kezdeti β -galaktozidáz szintézist átmenetileg a glükóz lecsökkenti, amit tranziens represszió (transzient represszió) neveznek. A glükóznak a β -galaktozidáz indukcióra kifejtett két utóbbi hatása a *lac* operon, katabolit gén aktivátor fehérje (CAP) és a cAMP általi, pozitív szabályozásának eredménye (Dickson és Markin 1980). Gombákban a glükóz represszió mechanizmusa eltér a

baktériumokétól, ahogy arról már fentebb volt szó. Lényeges különbség, hogy a glükóz nem eredményezi az enzim permanens represszióját.

Fonalas gombák közül *Aspergillus nidulans*-ban és *Neurospora crassa*-ban tanulmányozták részletesebben az enzim szintézis szabályozását (Fantès és Roberts 1973; Bates és mtsai. 1967). *Aspergillus nidulans* esetén extracellulárisan nem mérték β -galaktozidáz aktivitást, az enzim intracelluláris, nagyrészt az oldható sejtextraktumban, valamint kis mennyiségben a sejtfalhoz kötötten mérhető (Díaz és mtsai. 1996). A β -galaktozidáz termelést mind a laktóz, mind a galaktóz indukálja, a glükóz pedig represszálja. A galaktóz jobb indukere az enzimnek, viszont nemcsak a jelenléte, hanem a metabolizmusa is szükséges a normál indukcióhoz. Fiziológiai szempontból a β -galaktozidáz egyik funkciója valószínűleg az, hogy laktóz szénforráson lehetővé tegye a konídiumok csírázását. β -galaktozidáz defektes mutánsok vizsgálatai alapján pedig feltételezhető, hogy egy alternatív laktóz hasznosítási út is létezik *Aspergillus nidulans*-ban (Fantès és Roberts 1973). *Neurospora crassa*-ban két, fizikailag is jól elkülöníthető β -galaktozidáz enzim található. Az egyik mind intra-, mind extracellulárisan megtalálható. A kisebbik enzim pH optimuma 4,2 (*o*-nitrofenil- β -D-galaktopiranozidra (ONPG) nézve), és laktóz, D-galaktóz, D-xilóz és L-arabinóz szénforráson egyaránt indukálódik. A nagyobbik β -galaktozidáz pH optimuma 7,5 (ONPG-re nézve), ám D-xilóz és L-arabinóz nem indukálja, csak egy nagyon alacsony aktivitás figyelhető meg a két szénforráson. Azonban mind a két enzim mutat az előzőhöz hasonló alacsony aktivitást glükóz, szacharóz és fruktóz szénforráson nőtt tenyészetekben. A legjobb inducer, *Neurospora crassa* esetében is, a galaktóz (Bates és mtsai. 1967). Számos esetben leírták, hogy a laktóz mellett a galaktóz is jó, vagy jobb indukere az enzimnek, sőt *Phycomyces blakesleeanus*-ban a fruktóz (Montero és mtsai. 1989), *Penicillium canescens*-ben az L-arabinóz (Nikolaev és Vinetski 1998) is indukálja a β -galaktozidáz szintézist.

Az enzimműködés szabályozásában más enzimek is részt vehetnek, vagy más enzimekkel közösen látják el funkciójukat. Eukarióta szervezetekben, például emberben, vizsgáltak olyan lizoszómákat, amelyekben a β -galaktozidáz más enzimekkel képez multienzim komplexet. Ilyen lizoszómális multienzim komplex a szialidáz- β -galaktozidáz-N-acetil-aminogalakto-6-szulfát szulfatáz komplex, mely glikolipidek, glikoproteinek és oligoszacharidok katabolizmusában vesz részt (Pshezhetsky és Ashmarina 2001). Ilyen továbbá a karboxipeptidáz- β -galaktozidáz-neuraminidáz enzim

komplex, ahol a karboxipeptidáznak fontos szerepe van a lizoszómális enzimek biogenezisében, az enzim prekursorok proteolitikus processzingjében (Pshezhetsky és Potier 1993).

3. ANYAGOK ÉS VIZSGÁLATI MÓDSZEREK

3.1. Fiziológiai vizsgálatok

3.1.1. Törzsfenntartás

Kísérleteinkben a *Penicillium chrysogenum* NCAIM 00237 törzset használtuk. A törzsfenntartás Czapek-Dox, illetve Sabouraud táptalajon történt. A Czapek-Dox táptalaj összetétele: 0,3 % (w/v) Na NO₃, 0,1 % (w/v) K₂HPO₄, 0,05 % (w/v) KCl, 0,05 % (w/v) MgSO₄ × 7 H₂O, 0,001 % (w/v) FeSO₄ × 7H₂O, 3 % (w/v) szacharóz, 2 % (w/v) agar (pH=6,6) volt. A Sabouraud táptalaj összetétele: 1 % (w/v) kazein pepton, 2 % (w/v) glükóz, 1,7 % (w/v) agar (pH=5,6) volt. A gombát 25 °C-on, 7 napig tenyésztettük a fent említett táptalajokon. A ferde tenyészeteket 4 °C-on tároltuk a további felhasználásig.

3.1.2. A gomba tenyésztése

Vizsgálatainkhoz folyékony tenyészeteket készítettünk, amelyeket spóra szuszpenzióval oltottunk be. A gombát komplex tápoldatban tenyésztettük, melynek összetétele a következő volt: 2 % (w/v) szénforrás (a kísérletnek megfelelően; külön sterilizve), 0,4 % (w/v) pepton, 0,4 % (w/v) élesztő kivonat, 0,2 % (w/v) KH₂PO₄, 0,8 % (w/v) Na₂HPO₄ × 12 H₂O, 0,025 % (w/v) MgSO₄ × 6 H₂O. A tápközeg pH-ja 7,0 volt. A tenyésztés 500 ml-es Erlenmeyer lombikokban történt, lombikonként 200 ml tápoldattal, amit 200 millió spórával oltottunk be (maximum 4 ml szuszpenzióban), és 25 °C-on, 200 fordulat/perc rázattunk. A táplevest a kísérlettől függően 2 % laktózzal, 0,5-2 % glükózzal, 2 % galaktózzal, 2 % glicerinnel vagy 2 % szacharózzal, illetve 0,15 % koffeinnel, 0,025 % dibutiril-cAMP-vel (dBcAMP), 1 % dezoxi-D-glükózzal egészítettük ki a tenyésztés 40. órájában.

Mosott sejtes kísérletekhez a fent említett komplex tápoldatban, glükóz szénforráson nőtt, 48 órás korú, tenyészeteket használtunk. A micéliumot üvegszűrőn, steril körülmények között leszűrtük és minimál tápoldatba mostuk át. A minimál tápoldat összetétele: 2 % szénforrás, 0,2 % (w/v) KH₂PO₄, 0,8 % (w/v) Na₂HPO₄ × 12 H₂O, 0,025 % (w/v) MgSO₄ × 6 H₂O, 1 % (NH₄)₂SO₄ volt. A kísérlettől függően 0,15

% koffeint, és 1 % dezoxi-D-glükózt, szénforrásként 2 % laktózt, vagy 2 % glükózt tartalmazott a tápközeg. A tenyésztés ebben az esetben is 500 ml-es Erlenmeyer lombikokban történt, lombikonként 200 ml tápoldattal, amit 100 ml komplex tápoldatban felnőtt micéliummal oltottunk be, és 25 °C-on, 200 fordulat/perc fordulatszámra rázattunk.

3.1.3. A β -galaktozidáz aktivitás mérése

A β -galaktozidáz aktivitás változások nyomon követéséhez a mintákat a komplex tápoldatban nőtt tenyészetek esetében a növekedés 24-90. óráig tartó időszakában, míg mosott sejtes tenyészeteknél a 0-48. órás időszakban vettük. A fenti körülmények között már kellő mennyiségű micélium volt jelen a tápközegben és a sejtek nagy része még nem lizált.

Intracelluláris enzimaktivitás méréséhez 10 ml mintát vettünk a tenyészetből, melyet üvegszűrőn leszűrtünk, a micéliumot desztillált vízzel mostuk, majd 5 ml 0,1 M Na-K-foszfát pufferben (pH=7,0) felfuszpendálva lefagyasztottuk (-20 °C).

Intracelluláris enzimaktivitások mérése előtt a lefagyasztott micéliumokat X-press-szel (AB Biox, Göteborg, Svédország) tártuk fel. A feltárt mintákat felolvasztás után Eppendorf csövekben, 10000 fordulat/perc fordulatszámra, 4 °C-on, 10 percig centrifugáltuk. A β -galaktozidáz aktivitást a felülúszóból mértük, az enzim szintetikus, kromogén szubsztrátjával, *o*-nitrofenil- β -D-galaktopiranoziddal (ONPG), 30 °C-on, 30 perces inkubálással. A reakciótérfogat 1 ml volt, amely 500 μ l nyers extraktumot, 3 mM végkoncentrációjú ONPG-t tartalmazott 0,1 M Na-K-foszfát pufferben (pH=7,0). A reakciót 5 perces előinkubálás után a szubsztrát hozzáadásával indítottuk. Majd 30 perc múlva, jégen lehűtve állítottuk le a reakciót. Tisztított enzimpreparátum esetén a reakció leállítása 2 ml 0,1 M Na₂CO₃-tal történt. A nyers extraktum esetében a leállítás azért történt jégen, mert olyan anyagot tartalmazott, amely lúgos pH tartományban sárga színű, és zavarta volna a mérést. A felszabadult *o*-nitrofenol mennyiségét fotometriásan mértük 410 nm-en, és a kapott értékeket fehérjére és időre vonatkoztatva specifikus aktivitásban (U/mg fehérje) fejeztük ki, ahol 1U=1 nmol képződött *o*-nitrofenol/perc.

Extracelluláris β -galaktozidáz aktivitást a tenyészetből származó szűrlet 500 μ l-ből mértük a fenti módszerrel, és a kapott aktivitást száraztömegre és időre vonatkoztattuk.

3.1.4. A fehérje tartalom mérése

A minták fehérje tartalmát a Peterson (1983) által módosított Lowry féle módszerrel határoztuk meg, amihez BSA (marha szérum albumin) standardot használtunk.

3.1.5. A tenyészet száraztömegének mérése

A szárazanyag tartalom meghatározásához a tenyészetből 5 ml mintát vettünk, amit szűrőpapíron leszűrtünk, majd a micéliumot desztillált vízzel mostuk és szobahőmérsékleten, több napon keresztül, súlyállandóságig szárítottuk. A száraztömeget a tenyészet egy milliliterére vonatkoztattuk.

3.1.6. A glükóz mennyiségének mérése

A glükóz fogyasztásának meghatározását a Leary és munkatársai (1992) által kidolgozott rate assay módszerrel végeztük. A tenyészet szűrletének 30 μ l-ét és 3 ml reagens oldatot küvetében összemértük és 3 percig mértük az abszorbancia változását ($\lambda=500$ nm). A reagens oldat összetétele a következő volt: 0,1 M Na-K-foszfát pufferben (pH=6,6), 4 kU/l glükóz-oxidáz, 1 kU/l peroxidáz, 0,76 mM 4-amino-antipirin és 11 mM fenol. A kalibrációt 2,5-50 mM glükóz standard sor felhasználásával végeztük.

3.1.7. A laktóz mennyiségének mérése

A laktóz koncentráció meghatározása laktózon nőtt tenyészet szűrletéből HPLC analízissel történt, Sándor és munkatársainak (1999) módszere alapján. Az analízis Bio-Rad Aminex-H⁺, hidrogén-fázisú, ioncserélő oszlopon, 10 mM H₂SO₄ izokratikus elúciójával történt. Az áramlási sebesség 0,5 ml/perc, a hőmérséklet 55 °C volt.

3.1.8. Az ammónia mennyiségének meghatározása

Az ammónia koncentrációt laktózon és glükózon nőtt komplex tenyészetek szűrletében határoztuk meg, ammónia szenzitív elektród (OP-NH₃-7113-S, Radelkis Budapest, Magyarország) segítségével.

3.1.9. Ciklikus nukleotidok (cAMP, cGMP) és ADP-ribóz koncentráció meghatározása

A különböző szénforrásokon nőtt tenyészetek intracelluláris cAMP, cGMP és ADP-ribóz koncentrációját HPLC segítségével mértük meg. A mintavételt és előkészítést közvetlenül a mérés előtt végeztük. A mintákat laktóz, glükóz, glicerín és szacharóz szénforráson nőtt tenyészetek esetében a 24. órában vettük, míg a laktózon nőtt tenyészeteknél, ahol a 40. órában represszálo szénforrást adtunk, a mintavétel a 48. órában történt. A nukleotid koncentráció méréséhez 5 ml tenyészetet üvegszűrőn leszűrtünk és desztillált vízzel mostunk. A sejteket 1 ml 10 %-os (v/v) jéghideg perklorosavban felfuszpendáltuk és 30 percig, 4 °C-on állni hagytuk. A micéliumot Eppendorf csövekben centrifugáltuk (10000 fordulat/perc, 15 perc, 4 °C), majd a felülúszót 2 M jéghideg NaOH-dal neutralizáltuk. Centrifugálás után a felülúszót 0,45 µm-es HV-Millipore szűrőn átszűrtük és 200 µl-t a HPLC oszlopra injektáltunk (Gebelein és mtsai. 1992).

A kromatográfia paramétereit és az analízist Di Pierro és munkatársai (1995) által kidolgozott módszert követve állítottuk be és végeztük. Supelcosil LC-18, 150 × 4,6 mm, 3 µm szemcseméretű, saját védő oszloppal rendelkező oszlopot (Supelco) használtunk, amelyet a következő összetételű mozgó fázissal (puffer A) ekvilibráltunk: 10 mM tetrabutil-ammónium-hidroxid mint ionpár képző, 10 mM KH₂PO₄, 0,25 % (v/v) metanol (pH=7,0). A lépcsős gradienst egy második pufferrel (puffer B) alakítottuk ki, melynek összetétele: 2,8 mM tetrabutil-ammónium-hidroxid, 100 mM KH₂PO₄, 30 % (v/v) metanol (pH=5,5) volt. A puffereket minden mérésnél frissen készítettük. A gradienst a következő lépéseken keresztül alakítottuk ki: 2,5 perc 0 % puffer B; 2,5 perc múlva 30 % puffer B; 9 perc múlva 60 % puffer B; 8 perc múlva 100 % puffer B. Az áramlási sebesség a kromatográfia során 1,4 ml/perc volt.

3.2. Enzimológiai vizsgálatok

3.2.1. Enzimmtisztítás

Az intracelluláris β -galaktozidáz tisztításához 200 ml, 2 % laktóz szénforrást tartalmazó komplex tápoldatban nőtt, 65 órás korú tenyészetet használtunk, amit üvegszűrőn leszűrtünk és desztillált vízzel mostunk, hogy a tápoldat komponenseket eltávolítsuk. A mosott micélium tömeget felfuszpendáltuk 15 ml 0,1 M Na-K-foszfát pufferben (pH=7,0) és lefagyasztva, -20 °C-on tároltuk a további feldolgozásig. Tisztítás előtt a sejteket X-press-szel tártuk fel. A tisztítás minden lépését 4 °C-on végeztük.

A tisztítás lépései a következők voltak:

1. Ammónium-szulfátos precipitáció (60-100 %)

A felolvasztott szuszpenzióhoz 3 mM koncentrációban fenil-metil-szulfonil-fluorid (PMSF) proteáz inhibitor adtunk. Ezt követően a sejtmentes nyers extraktumot 10000 fordulat/perc fordulatszám, 10 percig centrifugáltuk. A felülúszóból a főlegesen fehérjék nagy részét 60 %-os telítettségű ammónium-szulfáttal kicsaptuk, és a csapadékot centrifugálással eltávolítottuk (10000 fordulat/perc, 15 perc, 4 °C). A felülúszót 100 %-ig telítettük ammónium-szulfáttal, majd a csapadékot centrifugáltuk, a pelletet 2 ml 0,01 M Na-K-foszfát pufferben (pH=7,0) felfuszpendáltuk és ugyanazon puffer 5000 ml-vel szemben dializáltuk egy éjszakán keresztül, 4 °C-on.

2. Ioncserélő kromatográfia

A dializált fehérje oldatot 0,01 M Na-K-foszfát pufferben (pH=7,0) ekvibrált, DEAE-Sephadex A-50 (3 cm×10 cm) ioncserélő oszlopra vittük fel. A fehérjéket lineáris só gradienssel eluáltuk, amit 200 ml, NaCl-ra nézve 0,05-0,2 M koncentrációjú ekvibráló pufferrel alakítottunk ki. Az elúció során, 1 ml/perc átfolyási sebesség mellett 2 ml-es frakciókat szedtünk, melyekből β -galaktozidáz aktivitást határoztunk meg. A magas enzimaktivitást mutató frakciókat összegyűjtöttük és ultraszűréssel (Kwik-Spin macro ultrafiltration units; 10000 MWCO; Pierce, USA) töményítettük 5000 g fordulatszám, 4 °C-on.

3. Affinitás kromatográfia

A részlegesen tisztított enzim oldatot affinitás oszlopon (*p*-aminobenzil-1-tio- β -D-galaktopiranozid; 1,5 cm×3 cm; Sigma) tisztítottuk tovább, amit 0,01 M citrát-foszfát pufferrel (pH=7,0) ekvibráltunk. A minta felvitele után az oszlopot 40 ml pufferrel mostuk, majd az enzimet 0,1 M Na-K-foszfát pufferrel (pH=7,0) eluáltuk. A nagy β -

galaktozidáz aktivitással rendelkező frakciókat összegyűjtöttük és a fentebb leírt módon, ultraszűréssel töményítettük.

4. Kromatofókusálás

Végső tisztítási lépésként a töményített enzim oldatot 25 mM imidazol/HCl pufferrel (pH=7,0) ekvibrált PBE 94 (1 cm×16 cm; Pharmacia Biotech, Uppsala, Svédország) kromatofókusáló oszlopra vittük fel. A pH gradienst nyolcszorosára hígított polipuffer 74 (pH=4,0) eluáló pufferrel alakítottuk ki. Az elúciót 0,66 ml/perc folyási sebességgel végeztük, és 2 ml-es frakciókat szedtünk, melyekből meghatároztuk az enzim izoelektromos pontját és az aktivitással rendelkező frakciókat összegyűjtve, az enzimet ultraszűréssel töményítettük.

3.2.2. Részleges enzimtisztítás

A részleges enzimtisztítás egyes lépéseinek kivitelezése megegyezett a fentebb leírt módszerekkel. Különbség, hogy a minta feltárása után a felolvasztott nyers extraktumhoz nem adtunk PMSF-et. A tisztítás első lépése az ammónium-szulfátos kicsapás és dialízis volt. Ezt követte az affinitás kromatográfia, melynek végén, a töményítés után megkaptuk a részlegesen tisztított fehérje oldatot.

3.2.3. A β -galaktozidáz aktivitás pH és hőmérséklet függésének mérése

A tisztított enzim pH optimumát 0,1 M citrát-foszfát pufferben (pH=3,0-4,5) és 0,1 M Na-K-foszfát pufferben (pH=4,5-8,0) határoztuk meg. Az aktivitást a 3.1.3. fejezetben leírt mérési módszerrel végeztük.

A tisztított enzim hőmérséklet optimumát 4-70 °C hőmérséklet tartományban, 0,1 M citrát-foszfát pufferben (pH=4,0), 30 percig inkubálva határoztuk meg.

3.2.4. Szubsztrátspecifitás vizsgálata

A tisztított enzim szubsztrátspecifitását ONPG, laktóz, *p*-nitrofenil-2-acetamido-2-dezoxi- β -D-glükopiranozid (PNP-GlcNAc), *p*-nitrofenil- α -D-glükopiranozid és *p*-nitrofenil- β -D-glükopiranozid szubsztrátokkal vizsgáltuk.

Az ONPG hidrolízist a 3.1.3. fejezetben leírt módszernek megfelelően végeztük el.

A laktóz hidrolízis 0.01 M citrát-foszfát pufferben (pH=4,0), 24 óráig, 30 °C-on történt. A felszabaduló glükózt, a Leary és munkatársai (1992) által kidolgozott rate assay módszerrel határoztuk meg.

A PNP-GlcNAc bontást 0,1 M citrát-foszfát pufferben (pH=4,0), 10 percig, 37 °C-on mértük. A felszabadult *p*-nitrofenolt 410 nm-en fotometriásan határoztuk meg. A reakció leállítása 0,2 M Na-borát pufferrel (pH=10,0) történt.

Az α -glükozidáz és β -glükozidáz aktivitást 0,1 M Na-K-foszfát pufferben (pH=4,0), 3-3 mM végkoncentrációjú *p*-nitrofenil- α -D-glükopiranozid és *p*-nitrofenil- β -D-glükopiranozid szubsztrátokkal, 30 percig, 30 °C-on mértük.

A kinetikai paramétereket, K_m és V_{max} értékeket, Lineweaver-Burk ábrázolással, a klasszikus Michaelis-Menten sebességi egyenlet alapján, lineáris illesztő programmal határoztuk meg. A mérést tisztított enzimmel, 0,5-5,0 K_m szubsztrát koncentráció tartományban végeztük.

3.2.5. A β -galaktozidáz molekulatömegének meghatározása géliszűréssel

A tisztított enzim molekulatömegét Sephacryl S-300 géliszűrő oszlopon (1,5 cm $\times$ 57 cm) határoztuk meg (4 °C-on). Az elúciót 0,1 M Na-K-foszfát pufferrel (pH=7,0) végeztük, amely 0,2 M NaCl-ot és 3 mM NaN_3 -ot tartalmazott. A átfolyási sebesség 0,87 ml/perc volt. A frakciókból enzim aktivitást, és fehérje tartalmat ($\lambda=280$ nm) mértünk. A molekulatömeg értékét a következő molekula standardok (Serva) segítségével határoztuk meg: ló mioglobint (17,8 kDa), szarvasmarha szérumban albumin (67 kDa), szarvasmarha kataláz (240 kDa) és ferritin (450 kDa); Andrews (1964) módszere alapján.

3.2.6. Gélelektroforézis

A β -galaktozidáz enzim tisztítási lépéseinek nyomon követésére és az enzimaktivitás detektálására natív, 5-20 % (w/v) gradiens gélelektroforézist használtunk. Az elektroforézist a módosított Laemmli módszer (1970) alapján Mini-Protean II. (BioRad, Hercules, CA, USA) gélelektroforézis készülékkel végeztük. Elektroforézis után (4 °C, 80V, 14 óra) a gélek egyik felén Coomassie brilliant blue festéssel detektáltuk a fehérjéket, a gélek másik felén, McGrew és Green (1990)

módszerének megfelelően, X-gal-lal végzett festéssel detektáltuk a β -galaktozidáz aktivitást. A festés előtt a gélt 0,1 M Na-K-foszfát pufferben (pH=7,0) ekvibráltuk 1 órán keresztül.

Az tisztított enzim alegységeinek molekulatömegét 10 %-os (w/v) redukáló SDS-poliakrilamid gélen határoztuk meg, Laemmli (1970) módszerét követve. A móltömeg meghatározására a következő Low-range SDS-PAGE molekulatömeg standardokat (Bio-Rad) használtuk: foszforiláz b (97,4 kDa), szérum albumin (66,2 kDa), ovalbumin (45 kDa), karbon-anhidráz (31 kDa), tripszin inhibitor (21,5 kDa), lizozim (14,4 kDa). A fehérjéket Coomassie brilliant blue festéssel detektáltuk. A β -galaktozidáz enzimmel együtt tisztuló két fehérje molekulatömegét is ezzel a módszerrel határoztuk meg a részlegesen tisztított enzim preparátumból.

A proteáz aktivitás detektálására 10 %-os (w/v) natív akrilamid gélt használtunk, mely 0,4 % (w/v) zselatint tartalmazott. Az elektroforézis paraméterei megegyeztek a natív gradiens gélelektroforézis paramétereivel (4 °C, 80V, 14 óra). Elektroforézis után a géleket 0,1 M Na-K-foszfát pufferben (pH=7,0), szobahőmérsékleten, 20 percig ekvibráltuk és 37 °C-on, 1 órán keresztül inkubáltuk. Az előhívás Coomassie brilliant blue festéssel történt.

3.2.7. Fehérje transzfer polivinilidén-fluorid (PVDF) membránra

Az eljárást a Millipore Corporation által közölt technikai leírás alapján, „Semi-Dry System (Single Transfer)” elektroblottolási módszerrel végeztük.

A blottolást részlegesen tisztított fehérje preparátumból, 10 %-os redukáló SDS-PAGE géllal végeztük, a 3.2.6. fejezetben leírt módszernek megfelelően. Elektroforézis után a gélt 15 percig ekvibráltuk transzfer pufferben (25 mM TRIS, 192 mM glicin, 10 % (v/v) metanol). A blottoláshoz PVDF (polivinilidén-fluorid, Millipore) membránt használtunk, amit 15 percig 100 % metanolban, 2 percig desztillált vízben mostunk, majd 5 percig ekvibráltunk anód II. pufferben (25 mM TRIS, 10 % (v/v) metanol, pH=9,5). A leírásnak megfelelően összeraktuk az elektroblottoló készüléket, amihez anód I. (0,3 TRIS, 10 % (v/v) metanol, pH=10,4), anód II. és katód (2 mM, 192 mM glicin, 10 % (v/v) metanol, pH=8,3) pufferekben megnedvesített Watman 3MM szűrőpapírokat használtunk. Az alkalmazott áramerősség 1 mA/cm² volt. Az elektrotranszfer 1 óráig tartott. Az előhívást Ponceau-S vörös festéssel végeztük. A membránt 20 percig

festettük 0,5 % (w/v) Ponceau-S vörös és 1 % (v/v) ecetsav elegyében, majd desztillált vízzel mostuk, és szárítottuk.

3.2.8. N-terminális aminosav szekvenciák meghatározása

Az aminosav szekvenciák meghatározása Edman degradációval történt.

3.3. Molekuláris biológiai vizsgálatok

3.3.1. *Penicillium chrysogenum* kromoszómális DNS izolálás

200 ml komplex tápoldatban felnevesztett, 2 napos rázatott tenyészetet üvegszűrőn leszűrtünk, desztillált vízzel mostunk, majd a micéliumot liofilizáltuk. A liofilizált micéliumot folyékony nitrogénben eldörzsöltük, és 0,7 ml-ként Eppendorf csövekbe szétosztottuk. A port 1 ml lizáló oldatban (2 g / 100 ml SDS, 1,86 g / 100 ml EDTA, 10 µl 10 mg / ml proteináz-K, pH=8,0) felfuszpendáltuk, és előbb 30 percig 37 °C-on, majd 15 percig 70 °C-on inkubáltuk. 100 µl, 5 M Na-acetátot adtunk hozzá, 30 percig jégen inkubáltuk, majd centrifugáltuk (10000 fordulat/perc, 15 perc). A felülúszót 700 µl-ként Eppendorf csövekbe szétosztottuk és 800 µl fenol/kloroform/izoamil-alkohol (25:24:1; 0,5 M és 0,1 M TRIS-HCL-val, pH=8,0 ekvilibrált fenolból) elegyét hozzáadva, homogénre összeráztuk. Ezt követően centrifugáltuk (10000 fordulat/perc, 5 perc), majd a vizes fázissal megismételtük a kezelést. A vizes fázishoz hozzáadtunk 800 µl kloroform/izoamil-alkohol (24:1) elegyét, jól összeráztuk, majd centrifugáltuk (10000 fordulat/perc, 5 perc). A felső vizes fázishoz hozzáadtunk 0,5 térfogat 7,5 M Na-acetátot és azonos térfogatú izopropanolt, jégen 15 percig inkubáltuk, majd centrifugáltuk (10000 fordulat/perc, 15 perc). A pelletet 0,5 ml etanollal mostuk, centrifugáltuk (10000 fordulat/perc, 10 perc), szobahőmérsékleten szárítottuk, majd 100 µl TE pufferben (10 mM TRIS-HCl, 1 mM EDTA, pH=8,0) feloldottuk. Az oldathoz 10 µl RNáz-t (10 mg/ml) adtunk, 37 °C-on, 30 percig inkubáltuk. Az emésztés után, újra megismételtük a kezelést a fenol/kloroform/izoamil-alkoholos lépéstől kezdődően (fenol/kloroform/izoamil-alkoholos kezelést csak egyszer ismételve), és az etanolos mosás és szárítás után az összes csapadékot 1-2 ml TE pufferben oldottuk fel.

A tisztított kromoszómális DNS-t 1 %-os agaróz gélen ellenőriztük, valamint fotometriásan meghatároztuk koncentrációját és tisztaságát.

3.3.2. Alapvető molekuláris biológiai módszerek

A munkánk során alkalmazott alapvető molekuláris biológiai módszereket, ha azt másként nem jelezzük, a J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis; 1989. Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Second Edition), Cold Spring Harbor Laboratory Press kézikönyvében található protokollok alapján végeztük. Ezek a módszerek a következők voltak: agaróz gélelektroforézis (I/6.3-I/6.20); DNS fragmentumok amplifikálása polimeráz láncreakcióval (II/14.2); plazmid izolálás *Escherichia coli*ből (I/1.25-I/1.28); Southern hibridizáció (kapillártranszfer II/9.38, vákum transzfer Hoefer TransVac™ Te80 készülékkel).

3.3.3. Az N-acetil-β-D-hexóaminidáz gén 5' végének amplifikálása polimeráz láncreakcióval

A PCR reakcióhoz *EcoRI* (Promega) hasító enzimmal emésztett, *Penicillium chrysogenum* kromoszómális DNS-t használtunk templátként. Primerként az általunk tervezett, 21-21 mer-es oligonukleotidok (Sigma-Genosys Ltd.) szolgáltak. A „blunt-end” amplifikálás érdekében *Pfu* DNS polimerázt (Promega) használtunk. A reakció összetételét és lépéseit a fent említett protokoll alapján állítottuk össze és terveztük meg. A PCR reakció összetétele: 10 µl *Pfu* DNS polimeráz 10X puffer (MgSO₄-tal); 5 µl *EcoRI*-gyel emésztett kromoszómális DNS (500 ng); 2,5-2,5 µl primer1 és 2 (20 µM); 1 µl dNTP mix (10 mM); 1 µl *Pfu* DNS polimeráz (2-3 U/µl); 33 µl steril desztillált víz.

3.3.4. A PCR termék klónozása

A *Pfu* DNS polimerázzal felszaporított (689 bp hosszúságú) „blunt” PCR fragmentumot visszaizoláltuk agaróz gélből, „GeneClean Kit®” (BIO 101) felhasználásával. A tiszta DNS fragmentum ligálását, transzformálását a „Zero Blunt™ PCR Cloning Kit” (Invitrogen) alapján végeztük. A ligálás T4 DNS ligázzal történt, 16 °C-on, 1 órán keresztül, linearizált pCR®-Blunt (3513 bp) vektorba. A kapott plazmid

DNS-t *Escherichia coli* Top 10 kompetens sejtekbe transzformáltuk. Az *Escherichia coli* Top10 sajátosságai: F⁻, *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) ϕ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74 deoR recA1 araD139 Δ (*ara-lau*) 7697 *galU galK rpsL*(Str^R) *endA1 nupG*. A kapott pozitív transzformánsból visszaizoláltuk a plazmid DNS-t, „GenElute™ Plasmid Midi-Prep Kit” (Sigma) felhasználásával, és szekvenáltattuk.*

3.3.5. A plazmid DNS inszertjének szekvenálása

Az inszert szekvenciáját a plazmid T7 és M13 reverz primerek felhasználásával határoztuk meg. A szekvenálás egy ABI 373 automata szekvenátorral (Applied Biosystems) történt, egy „dye terminator cycle sequencing kit”-et, Amplitaq DNS polimeráz FS-sel (Applied Biosystems), használva.

3.3.6. A β -galaktozidáz és N-acetil- β -D-hexóaminidáz enzimeket kódoló gének számának meghatározása Southern hibridizációval

Az *EcoRI* hasító enzimmel emésztett kromoszómális DNS-t, és kontrollként a fentebb leírt, szintén *EcoRI*-gyel emésztett klónozott plazmidot agaróz gélen megfuttatva, Hybond C-membránra blottoltunk. A membránt ezt követően 1 órán keresztül, 42 °C-on prehibridizáltuk, majd egy éjszakán át, szintén 42 °C-on hibridizáltuk. A hibridizáláshoz az általunk tervezett, 45 mer-es, 5' végén digoxigeninnel jelölt oligonukleotidot (Sigma-Genosys Ltd.) használtuk próbaként. Az immunológiai detektálást a „DIG Nucleic Acid Detection Kit” (Boehringer Mannheim) leírása alapján végeztük.

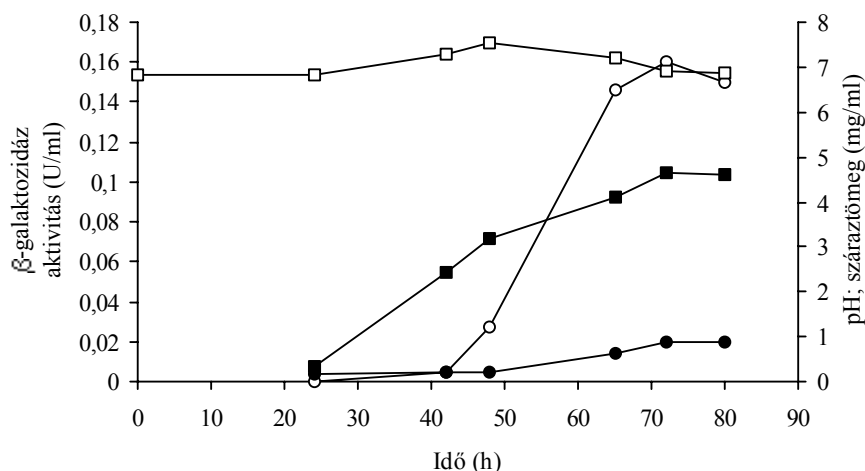
A finom vegyszerek a Sigma-Aldrich Kft. Magyarországtól származtak; a többi vegyszer, ha azt másként nem jeleztük, akkor a Spectrum 3D Kft-től lett beszerezve.

4. EREDMÉNYEK

4.1. Fiziológiai vizsgálatok

4.1.1. Intra- és extracelluláris β -galaktozidáz termelés vizsgálata *Penicillium chrysogenum*-ban

A *Penicillium chrysogenum* NCAIM 00237 növekedését és a β -galaktozidáz aktivitás változását (2. ábra) laktóz szénforrást tartalmazó, folyékony komplex tápoldatban vizsgáltuk. A spórával beoltott tenyészetekben az első 24 órában számottevő száraztömeg változást nem tapasztaltunk. A 24. óra után lassú, de folyamatos növekedés volt tapasztalható. A tenyésztés 65. óráját követően a száraztömeg növekedése mellett a sejtek lízisének megindulása is megfigyelhető volt.



2. ábra. β -galaktozidáz bioszintézis 2 % laktóz szénforráson nőtt *Penicillium chrysogenum* tenyészetben. (○) intracelluláris β -galaktozidáz aktivitás, (●) extracelluláris β -galaktozidáz aktivitás, (■) száraztömeg, (□) a tápközeg pH-ja.

Az intra- és extracelluláris β -galaktozidáz aktivitás változását követve megállapítottuk, hogy az aktivitás döntően sejthez kötötten (intracellulárisan) mérhető. Az extracelluláris aktivitás igen alacsony volt, kisebb mértékű növekedését csak a tenyésztés késői szakaszában figyeltük meg, miután a sejtek lízise már megkezdődött. Az intracelluláris β -galaktozidáz aktivitás a növekedés 60-70 órás szakaszában érte el maximumát. A

tenyésztés ideje alatt a tápközeg pH értéke jelentősen nem változott, végig pH=7 körüli értéket mutatott.

A kísérletek további részében már csak az intracelluláris β -galaktozidáz aktivitás változását vizsgáltuk.

4.1.2. Növekedés és β -galaktozidáz termelés különböző szénforrásokon

Glükóz, galaktóz, glicerín és szacharóz szénforrásokat tartalmazó folyékony komplex tápoldatban megvizsgálva a növekedést és a β -galaktozidáz aktivitás változását, a következőket tapasztaltuk (**3. ábra**).

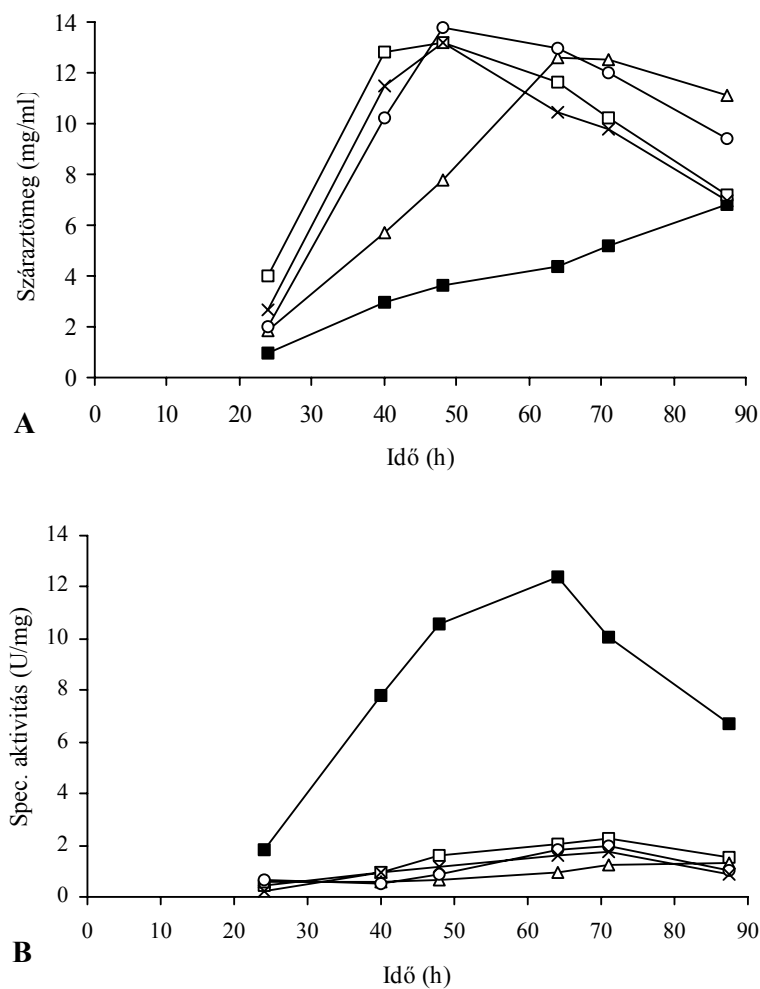
A legjobb szénforrásnak a könnyen metabolizálódó glükóz, szacharóz és érdekes módon a galaktóz bizonyult; mindhárom esetben gyors növekedést figyeltünk meg. A tenyészetek körülbelül a 48. órára érték a legnagyobb biomassza tömeget, ezután a növekedés megállt és a sejtek lízise is megindult. A glicerín, bár az előbbi szénforrásoknál lassabban metabolizálódott, szintén kielégítő növekedést biztosított. A laktózt viszont, összehasonlítva az előbbi szénforrásokkal, kis biomasszát adó, gyenge szénforrásnak találtuk (**3 A. ábra**).

Laktózon nőtt tenyészetekben jelentős mennyiségű β -galaktozidáz termelődött. Glükóz, szacharóz, glicerín és galaktóz szénforrásokon azonban számottevő β -galaktozidáz aktivitást nem tudtunk kimutatni (**3 B. ábra**).

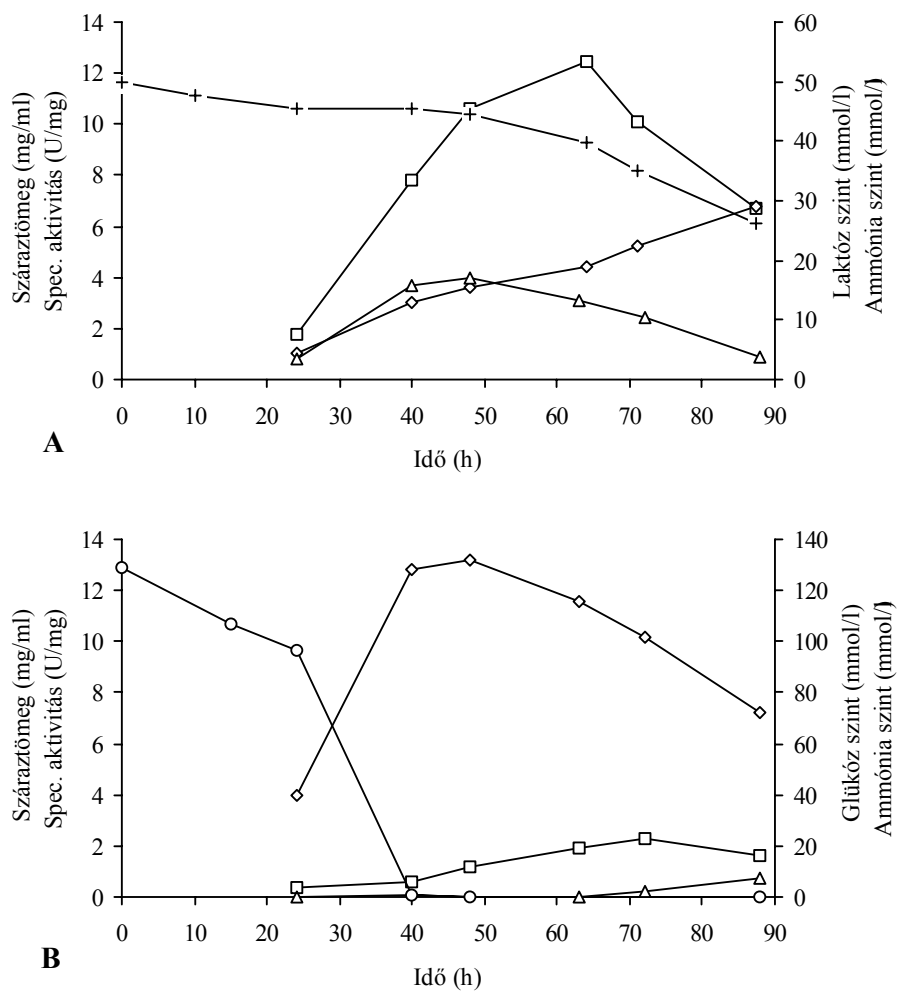
A laktóz szénforráson nőtt tenyészet esetében a tenyésztés 48. órájáig, amíg a β -galaktozidáz aktivitás viszonylag magas szintet el nem ért, magas ammóniatermelést figyeltünk meg. Ezután megnőtt a laktóz felhasználás a gombában, és az ammóniatermelés visszaesett (**4 A. ábra**). Glükózon nőtt tenyészetben az ammóniatermelés rendkívül gyenge volt, és csak a 20. óra után, a glükóz elfogyását követően kezdett el növekedni (**4 B. ábra**).

A továbbiakban mosott sejtés tenyészetekben vizsgáltuk a növekedést és a β -galaktozidáz termelést és azt tapasztaltuk, hogy ha a sejteket laktóz szénforrást tartalmazó tápközegbe mostuk át glükózt tartalmazó komplex tápoldatból, a β -galaktozidáz aktivitás egy öt órás, míg a szárazanyag tartalom egy 10 órás lag fázist követően kezdett el növekedni (**5 A. és C. ábra**). Ha a micéliumot glükóz tartalmú tápközegbe mostuk át, ilyen lag fázist a növekedésben nem tapasztaltunk, és számottevő β -galaktozidáz aktivitást sem mértünk (**5 A. és C. ábra**).

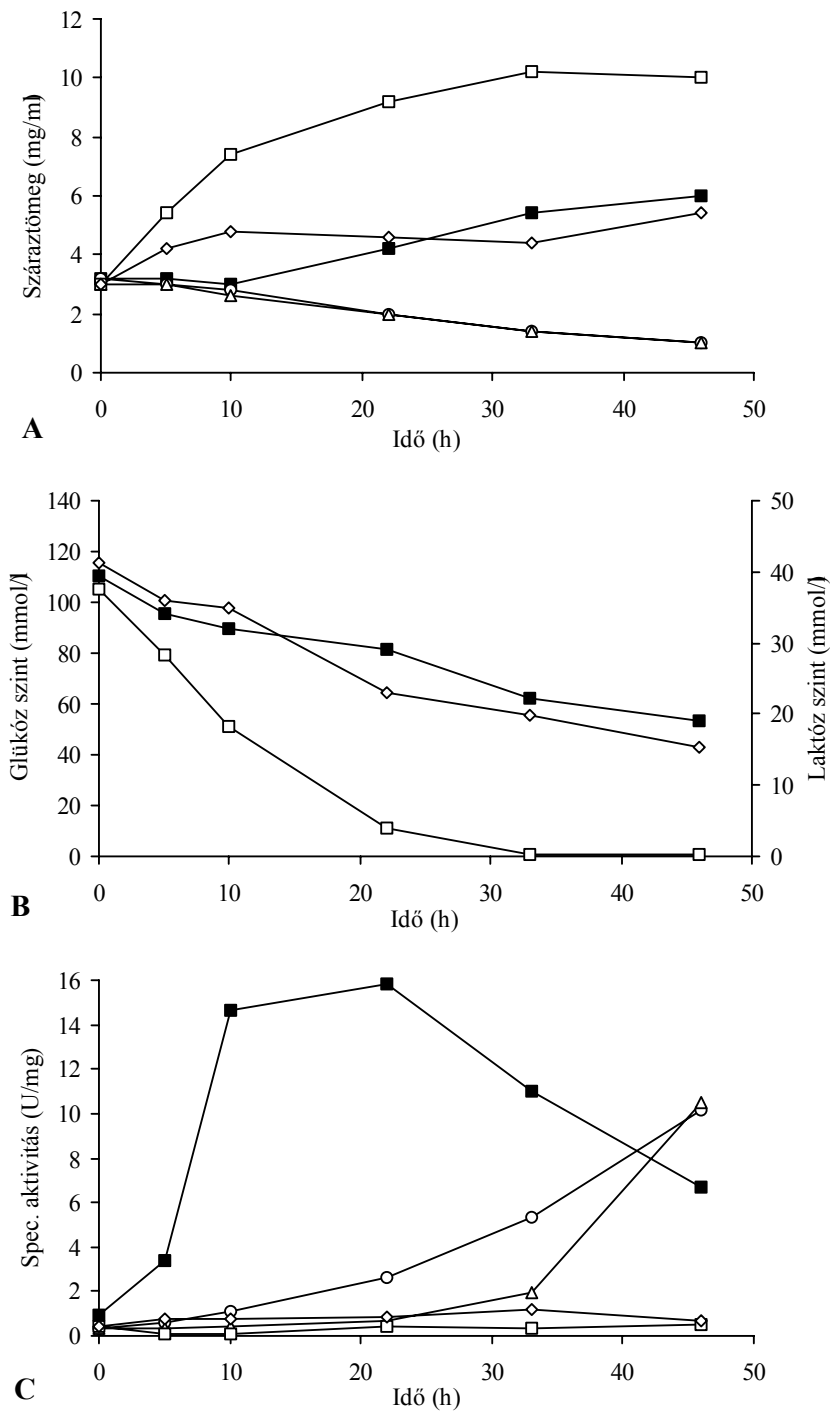
A tápközeg laktóz tartalmának csökkenése mind komplex, mind minimál tápoldatban lassú volt (4 A. és 5 B. ábra).



3. ábra. Növekedés (A) és β -galaktozidáz aktivitás (B) különböző szénforrásokon nőtt *Penicillium chrysogenum* tenyészetekben. (■) 2 % laktózon, (□) 2 % glükózon, (○) 2 % galaktózon, (×) 2 % szacharózon vagy (Δ) 2 % glicerinen.



4. ábra. Növekedés ($\diamond$), β -galaktozidáz aktivitás ($\square$), valamint laktóz (+), glükóz ($\circ$) és ammónia (Δ) szint változás 2 % laktóz (A) és 2 % glükóz (B) szénforráson, komplex tápoldatban nőtt tenyészetekben.



5. ábra. A növekedés (A), a laktóz és glükóz szint (B) és a β -galaktozidáz aktivitás (C) változása *Penicillium chrysogenum* mosott sejtjes tenyészeiben. (■) 2 % laktózon, (□) 2 % glükózon, (Δ) 2 % laktózon és 0,15 % koffeinen, (○) 2 % laktózon és 1 % 2-dezoxi-D-glükózon és (◇) 2 % glükózon és 0,15 % koffeinen.

4.1.3. Különböző szénforrások hatása az indukált β -galaktozidáz termelésre

Amennyiben laktóz szénforráson, komplex tápoldatban nőtt tenyészethez glükózt, galaktózt, szacharózt vagy glicerint adtunk a tenyésztés 40. órájában, akkor azt tapasztaltuk, hogy a tenyészetek intenzív növekedésnek indultak (**6 A. ábra**), a β -galaktozidáz termelés azonban mind a négy szénforrás jelenlétében lényegesen csökkent. Az enzimaktivitások mintegy 60-80 %-kal alacsonyabbak voltak a 64. órában, mint a laktózon nőtt kontroll tenyészetben (**6 C. ábra**).

Amikor laktóz szénforráson nőtt tenyészethez a 40. órában 2 % laktózt adtunk, nem tapasztaltunk változást sem a növekedésben, sem az enzimaktivitásban, sem a laktóz fogyás sebességében (**6. ábra**).

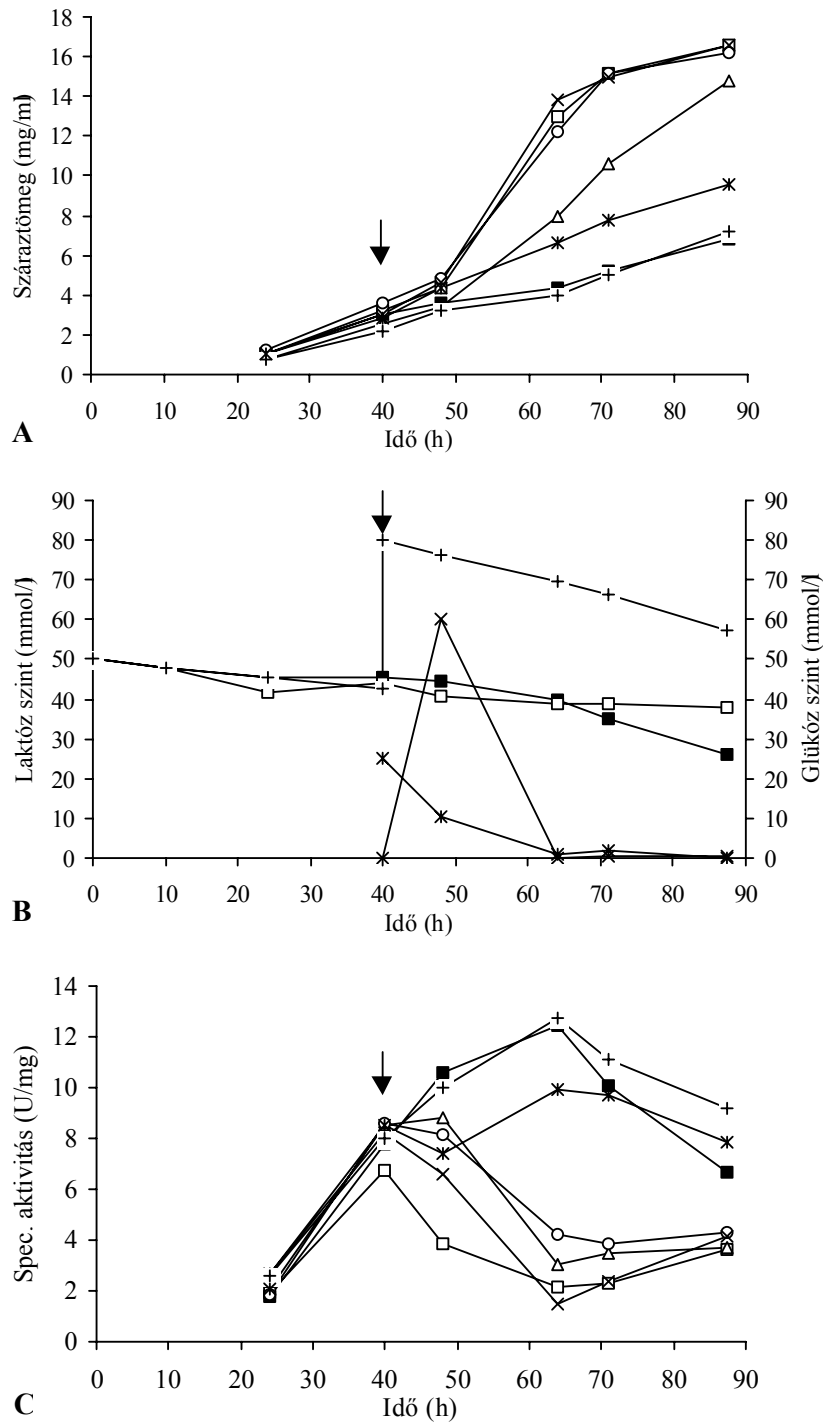
Szacharózt adva a laktózon nőtt tenyészethez, a tápközeg glükóz koncentrációja hirtelen megnőtt, majd a 48. órától gyors ütemben csökkent, és a 64. óráig a glükóz teljesen elfogyott (**6 B. ábra**).

Ha 2 % helyett 0,5 % glükózt adtunk a tenyészethez, akkor kisebb mértékben ugyan, de fokozódott a növekedés és csökkent a β -galaktozidáz aktivitás, ám egyik változás sem érte el a 2 % glükóz okozta szintet. A glükóz gyors elfogyását követően az enzimaktivitás ismét megnőtt (**6. ábra**).

4.1.4. β -galaktozidáz szintézis a glükóz elfogyása után

Megvizsgáltuk, miként változik a β -galaktozidáz aktivitás glükózon, mint kizárólagos szénforráson nőtt tenyészet esetében. Az aktivitás mellett mértük a tápközeg glükóz tartalmának változását és a növekedést is. Ahogy a **4 B. ábrán** látható, a glükóz elfogyása körüli időpontban a növekedés leállt és a β -galaktozidáz aktivitás megemelkedett.

A mért aktivitás ugyan elég alacsony volt, ám a változás szignifikánsnak bizonyult. Az aktivitás értékek (U mg^{-1}) a következők voltak: $1,17 \pm 0,42$ ($P < 5\%$) a 48. órában; $1,89 \pm 0,26$ ($P < 0,1\%$) a 63. órában; $2,30 \pm 0,59$ ($P < 1\%$) a 72. órában és $1,63 \pm 0,82$ ($P < 5\%$) a 88. órában, a 24. órában mért értékhez viszonyítva, mely $0,34 \pm 0,19$ volt. Az átlagértékeket és a szórást három független mérés eredményeiből számítottuk. A szignifikanciát (P) Student-féle teszttel számoltuk.



6. ábra. Különböző szénforrások hatása a növekedésre (A), a laktóz és glükóz hasznosításra (B) és a β -galaktozidáz aktivitásra (C). A 2 % laktóz (■) szénforráson nőtt *Penicillium chrysogenum* tenyészetekhez, a 40 órában hozzáadott szénforrások: (□) 2 % glükóz, (○) 2 % galaktóz, (×) 2 % szacharóz, (Δ) 2 % glicerín, (+) 2 % laktóz és (*) 0,5 % glükóz.

4.1.5. cAMP, cGMP és ADP-ribóz koncentráció vizsgálata különböző szénforráson nőtt tenyészetekben

A β -galaktozidáz aktivitás és a cAMP szint közötti összefüggés vizsgálatához laktóz, glükóz, glicerin és szacharóz szénforrásokon nőtt *Penicillium chrysogenum* tenyészetekben mértük a sejten belüli cAMP koncentrációt. Detektálható mennyiségű cAMP csak laktóz és szacharóz szénforrásokon nőtt tenyészetekben volt jelen. Ennek mennyisége laktózon: 7,67 pmol/mg száraztömeg, szacharózon: 3,96 pmol/mg száraztömeg volt. Nem volt detektálható mennyiségű cAMP glükózon és glicerinen nőtt tenyészetekben, vagy ha laktózon nőtt tenészethez glükózt illetve glicerint adtunk a 40. órában.

A cGMP és ADP-ribóz sejten belüli koncentrációit a **1. táblázat**ban foglaltuk össze. Ennek a két nukleotidnak az esetében jelentős különbségeket illetve tendenciát nem tapasztaltunk az egyes szénforrásokra vonatkozólag.

TENYÉSZETEK	cGMP		ADP-ribóz	
	pmol/ml kult.	pmol/mg sza.	pmol/ml kult.	pmol/mg sza.
Laktóz, 24 h	143	9,53	58	3,86
Glükóz, 24 h	265	8,03	43	1,30
Glicerin, 24 h	173	11,16	47	3,03
Laktóz+glükóz, 48 h	197	2,86	45	0,66
Laktóz+glicerin, 48 h	56	0,95	29	0,49
Laktóz+szacharóz, 48 h	73	2,21	21	0,64

1. táblázat: A cGMP és ADP-ribóz detektálása *Penicillium chrysogenum* különböző szénforrásokon nőtt tenészeteiben.

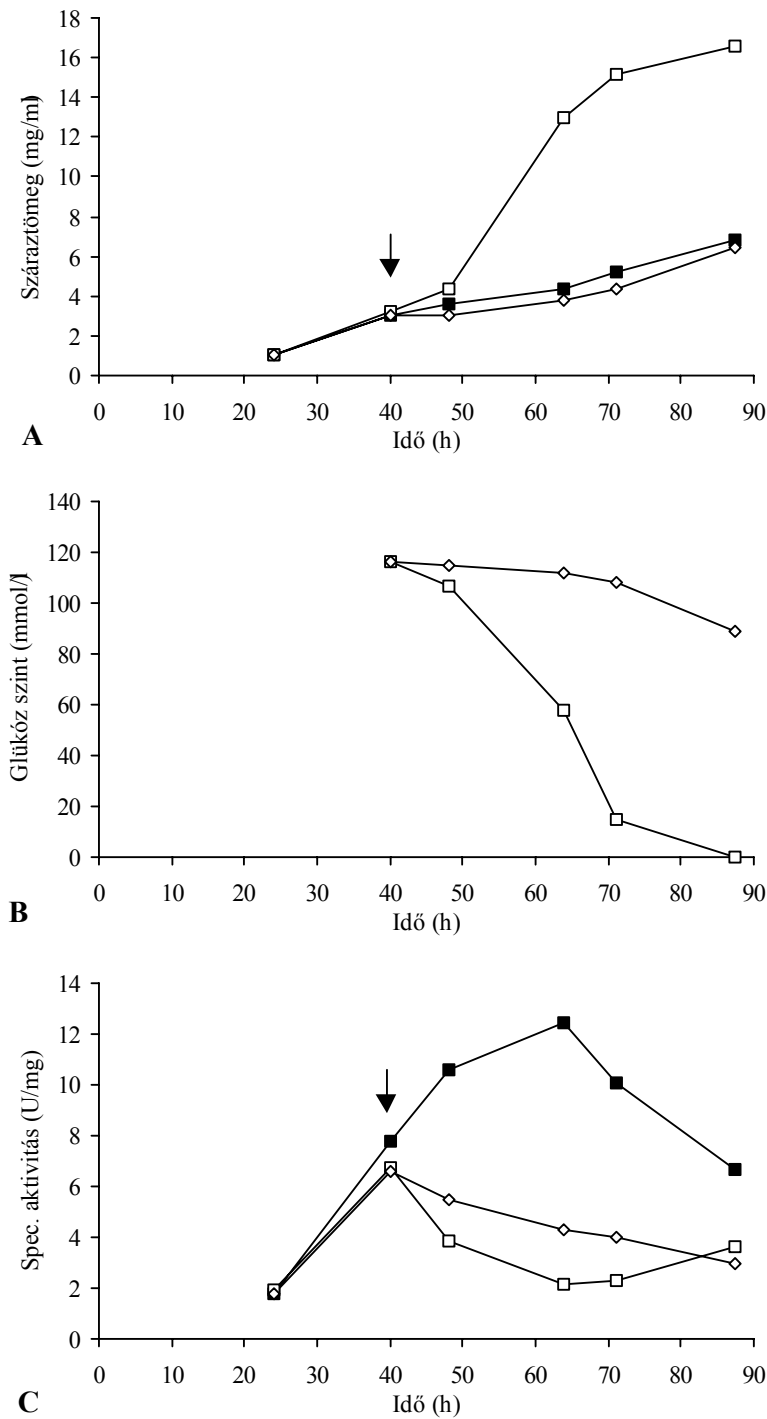
4.1.6. A koffein, a dBcAMP és a dezoxi-D-glükóz hatása a β -galaktozidáz szintézisre

Ha laktózt tartalmazó komplex tápoldatban nőtt tenyészetekhez a 40. órában (7. **ábra**) glükózt illetve együttesen glükózt és koffeint adtunk, azt tapasztaltuk, hogy a koffein jelentősen csökkentette a növekedést és a glükóz fogyasztását, de a glükóz által előidézett enzim szintézis csökkenését lényegesen nem befolyásolta (7 C. **ábra**).

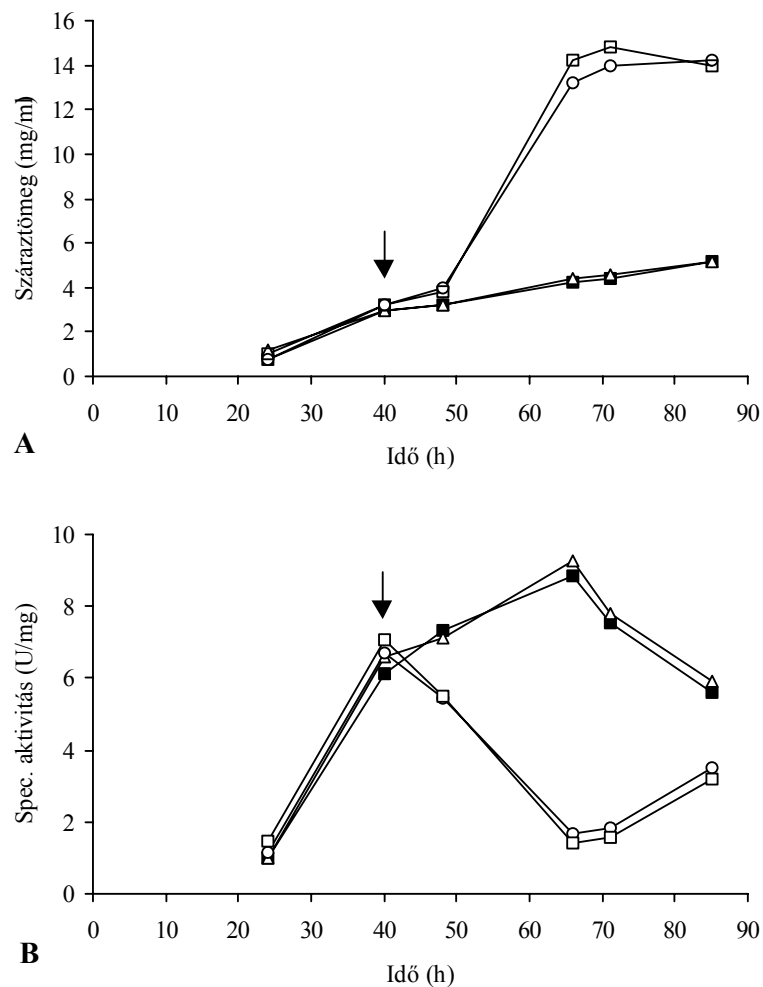
Ha a glükózon nőtt tenyészetet glükózt és koffeint tartalmazó minimál tápoldatba mostuk át, azt tapasztaltuk, hogy a koffein szintén csökkentette a növekedés mértékét (5 A. **ábra**) és a glükóz fogyasztást (5 B. **ábra**), ám nem befolyásolta az enzim szintézist, összehasonlítva a glükózon nőtt tenyészettel (5 C. **ábra**). Laktózon nőtt mosott sejtes tenyészetben a koffein jelentősen lecsökkentette a növekedést és a β -galaktozidáz aktivitást, de később az enzim szintézise megindult.

A laktózon nőtt tenyészethez dBcAMP-t, illetve dBcAMP-t és glükózt adagolva sem a növekedésben, sem a β -galaktozidáz aktivitásban nem találtunk változást a kontrollhoz képest (8. **ábra**).

Amennyiben a glükóz szénforráson, komplex tápoldatban nőtt tenyészetet laktózt és dezoxi-D-glükózt tartalmazó minimál tápoldatba mostuk át, azt tapasztaltuk, hogy a dezoxi-D-glükóz hasonlóan hatott a növekedésre és az enzimaktivitásra, mint a koffein (5. **ábra**).



7. ábra. A koffein hatása a növekedésre (A), a glükóz hasznosításra (B) és a β -galaktozidáz aktivitásra (C), 2 % laktóz (■) szénforráson, komplex tápoldatban nőtt *Penicillium chrysogenum* tenyészetekben. A növekedés 40. órájában 2 % glükózt (□), valamint 2 % glükózt 0,15 % koffeinnel (◇) adtunk a kontroll tenyészethez.



8. ábra. dBcAMP hatása a növekedésre (A) és a β -galaktozidáz aktivitásra (B) 2 % laktóz (■) szénforráson, komplex tápoldatban nőtt *Penicilium chrysogenum* tenyészetekben. A növekedés 40. órájában 2 % glükózt (□), 2 % glükózt és 0,025 % dBcAMP-t (○), és 0,025 % dBcAMP-t (Δ) adtunk a kontroll tenyészethez.

4.2. A β -galaktozidáz aktivitással rendelkező enzim tisztítása és jellemzése *Penicillium chrysogenum*

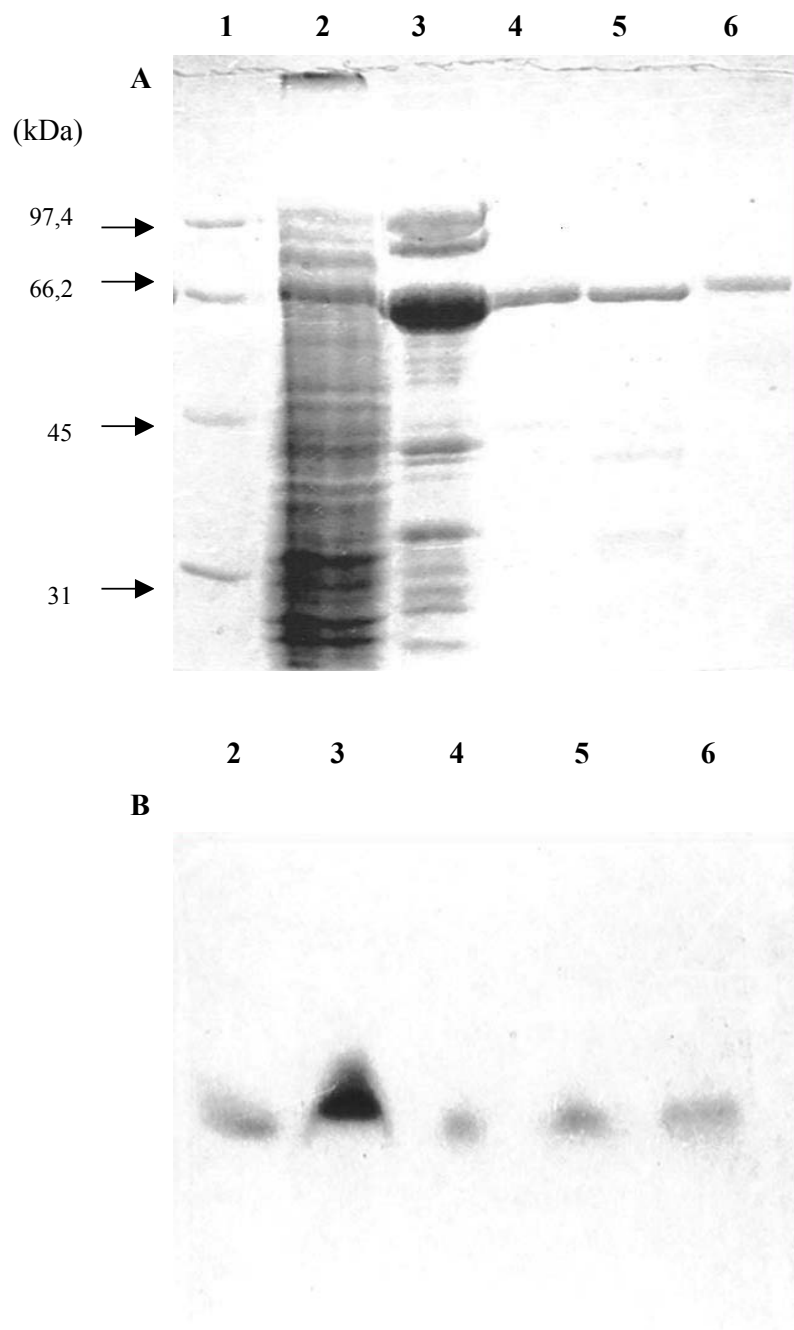
4.2.1. Az enzim tisztítása

A tisztításhoz laktóz szénforrást tartalmazó komplex tápoldatban nőtt, 65 órás *Penicillium chrysogenum* tenyészetet használtunk, melyet X-press-sel tártunk fel. A tisztítási folyamat egyes lépéseinek eredményeit a **2. táblázat**ban foglaltuk össze. A tisztítás első lépésével igen jó hatásfokú részleges tisztítást sikerült elérni. A nyers kivonat 60-100 %-os telítettségű ammónium-szulfátos kicsapásával a fehérje tartalmat 95 %-kal sikerült csökkenteni, miközben a specifikus aktivitás tízszeresére nőtt.

TISZTÍTÁSI LÉPÉSEK	Összfehérje (mg)	Összaktivitás (U)	Specifikus aktivitás (U/mg)	Tisztulás	Kihozatal (%)
Nyers sejtkivonat	162,04	14,31	0,08	1	100
Ammónium-szulfátos kicsapás	7,49	6,72	0,89	10	47
DEAE-Sephadex kromatográfia és ultraszűrés	0,56	2,12	3,74	42	15
Affinitás kromatográfia és ultraszűrés	0,42	1,75	4,11	47	12
Kromatofókusztól és ultraszűrés	0,2	1,16	5,84	66	8

2. táblázat: A β -galaktozidáz enzim tisztítási lépései.

Az így nyert részlegesen tisztított enzimet ioncserélő kromatográfiával, DEAE-Sephadex oszlopon tisztítottuk tovább. Ez a lépés már csak négyszeres tisztulást eredményezett, viszont (mint az a későbbiekben kiderült) kritikus pontja volt a tisztításnak, ugyanis ezzel a módszerrel sikerült két, az enzimmél nagyobb méretű, azzal együtt tisztuló fehérjét eltávolítani (**9. ábra, 3. zseb**). A módszer hátránya, hogy a tisztulási rátához viszonyítva nagy veszteséggel járt.



9. ábra. Tisztítási lépések nyomonkövetése gélelektroforézissel. Fehérje detektálása SDS-PAGE (A), és enzimaktivitás detektálása X-gal-os festéssel, natív, gradiens PAGE (B) alkalmazásával. 1. sáv: molekulatömeg markerek; 2. sáv: nyers sejtkivonat; 3. sáv: ammónium-szulfátos kicsapás; 4. sáv: DEAE ioncserélő kromatográfia; 5. sáv: affinitás kromatográfia; 6. sáv: kromatofókusztálás.

Következő lépésként az enzim oldatot *p*-aminobenzil-1-tio- β -D-galaktopiranozid affinitás oszlopra vittük fel. Ez a lépés a mi esetünkben csak csekély további tisztulást eredményezett, aminek valószínűleg az enzim viszonylag nagy tisztasága volt az oka.

Utolsó tisztítási lépésként kromatofókuszálást használtunk, ami további 1,5-szeres tisztulást eredményezett. Az enzim izoelektromos pontja 4,6-nak adódott.

Mindezen tisztítási lépések eredményeképpen 66-szoros tisztulást és 8 %-os kitermelést sikerült elérni. Az egyes tisztítási lépéseket poliakrilamid gélelektroforézissel is nyomonkövettük mind a fehérjékre, mind az enzimaktivásra vonatkozólag, melyek eredményei a **9. ábrán** láthatóak. A tisztított enzim egyetlen sávot mutat a Coomassie-val festett és a natív gélen egyaránt, ami alapján az enzim elfogadható tisztaságot ért el.

4.2.2. A pH hatása az enzim aktivitásra

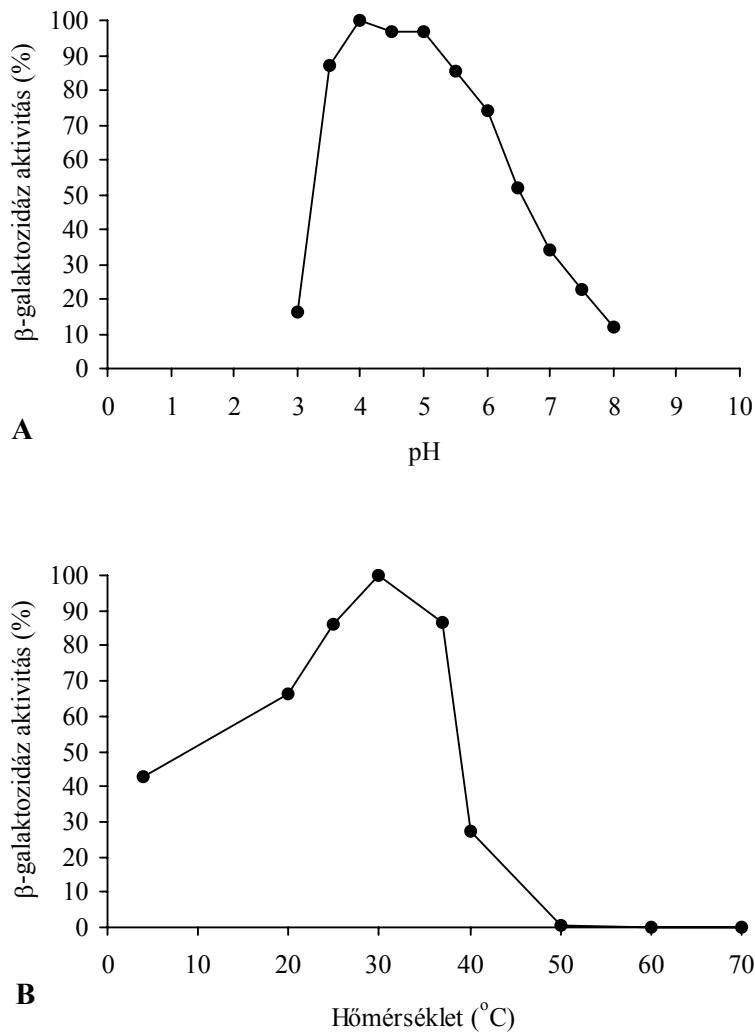
A tisztított β -galaktozidáz enzim aktivitásának pH függése a **10 A. ábrán** látható. Az enzim széles pH optimumot mutatott a pH=4-5 közötti tartományban, ahol maximális aktivitásának több mint 95 %-át megőrizte. Az enzim aktivitása élesen lecsökkent 4-es pH érték alatt; pH=3 értéken aktivitásának csak 15 %-a maradt meg. Magasabb pH értéken (pH=5 fölött) az aktivitás csökkenés nem volt olyan éles: pH=7 értéken az enzim aktivitásának több mint 30 %-át megőrizte.

4.2.3. A hőmérséklet hatása az enzim aktivitásra

A β -galaktozidáz aktivitás hőmérséklet optimuma 27 °C és 37 °C közé esett. A hőmérséklet emelésével az enzimaktivitás 30 °C-ig nőtt. 37 °C fölött az aktivitás a termikus inaktiválódás következtében gyorsan csökkent (**10 B. ábra**).

4.2.4. Molekulatömeg meghatározás

A tiszta enzim natív molekulatömegét 17,8 és 450 kDa között kalibrált, Sephacryl S300-as gélszűrő oszlopon határoztuk meg. A natív fehérje molekulatömege $M_r=270$ kDa. Mivel az SDS-PAGE felhasználásával meghatározott molekulatömeg 66 kDa volt (**9. ábra**), megállapítottuk, hogy az enzim aktív formája négy azonos alegységből épül fel.



10. ábra. A pH (A) és a hőmérséklet (B) hatása a β -galaktozidáz aktivitásra *Penicillium chrysogenum*-ban.

4.2.5. Az enzim szubsztrátspecifitásának vizsgálata

A szubsztrátspecifitási vizsgálatok eredményeit a **3. táblázat**ban foglaltuk össze. Az enzim hidrolizálta az ONPG-t, a PNP-GlcNAc-ot és a laktózt, ám a *p*-nitrofenil- α -D-glükopiranozid és a *p*-nitrofenil- β -D-glükopiranozid szubsztrátokat nem. A kinetikai paraméterek meghatározásához az említett három szubsztrátot használtuk. A meghatározás lineáris Lineweaver-Burk illesztéssel történt.

Szubsztrátok	K_m	V_{max}
ONPG	1,81 mM	40 nkat/mg
PNP-GlcNAc	1,28 mM	166 nkat/mg
Laktóz	27,02 mM	9,2 nkat/mg
PNP- β -D-glükopiranozid	Nem hidrolizálja	Nem hidrolizálja
PNP- α -D-glükopiranozid	Nem hidrolizálja	Nem hidrolizálja

3. táblázat: A β -galaktozidáz enzim szubsztrátspecifitása.

4.2.6. A β -galaktozidázzal együtt tisztuló két fehérje sajátosságai

A β -galaktozidáz aktivitással rendelkező enzimmel együtt tisztuló két fehérje molekulatömegét SDS-PAGE felhasználásával, részlegesen tisztított enzim preparátumból határoztuk meg. A két fehérje relatív molekulatömege 83 kDa-nak és 78 kDa-nak bizonyult.

Natív gélelektroforézis segítségével kimutattuk a 78 kDa molekulatömegű fehérje proteáz aktivitását, melyhez Ca^{2+} jelenléte volt szükséges (**11. ábra**).

4.2.7. A három fehérje N-terminális aminosav szekvenciájának meghatározása

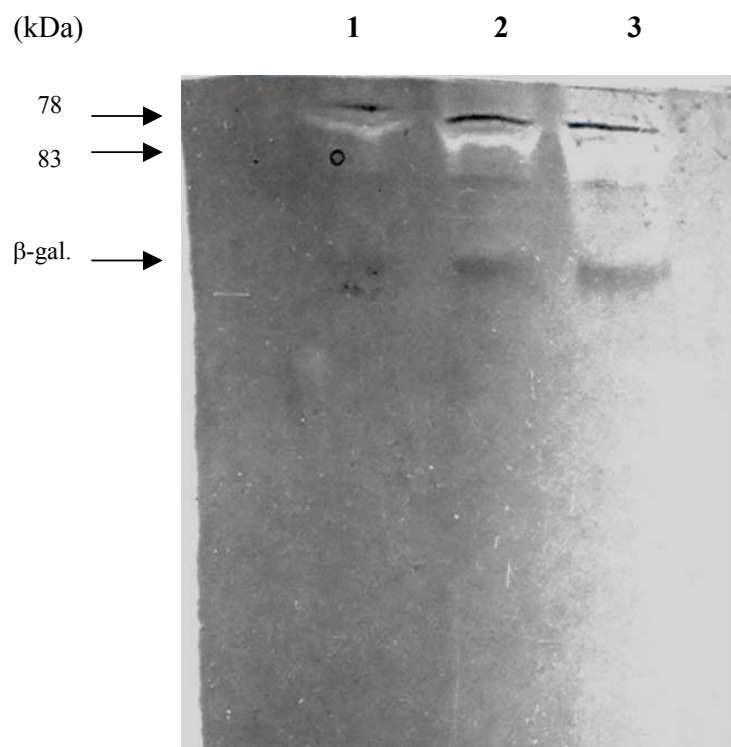
Meghatároztuk a β -galaktozidáz enzim és a vele együtt tisztuló, 83 kDa-os és 78 kDa-os két fehérje N-terminális aminosav szekvenciáját, melynek eredményét a **4. táblázat**ban foglaltuk össze.

A *Penicillium chrysogenum* β -galaktozidáz N-terminális aminosav szekvenciája megegyezett a korábban *Penicillium chrysogenum*-ból klónozott és szekvenált N-acetil- β -D-hexóزامinidáz prekursor fehérje 99-113. aminosav szekvenciájával (Diez és Barredo 1998). Ez utóbbi fehérje egy 18 aminosavból álló szignálszekvenciával is rendelkezik.

A 83 kDa méretű fehérje N-terminális szekvenciája majdnem megegyezett (11 aminosavból 10 azonos) egy *Aspergillus fumigatus*-ból származó dipeptidil peptidáz szignál szekvenciát követő szekvenciájával (Beauvais és mtsai. 1997). A különbség

azonban egy alanin/treonin aminosav csere eredménye, mely aminosavak tripletjei csak egy bázisban különböznek egymástól.

A másik, 78 kDa méretű, együtt tisztuló fehérje N-terminális aminosav szekvenciája nem mutatott jelentős homológiát más ismert szekvenciával, de Ca^{2+} függő proteáz aktivitással rendelkezett.



11. ábra. Proteáz aktivitás kimutatása natív, zselatinos akrilamid gélen, részlegesen tisztított enzim preparátumból (1. sáv: 10 μl ; 2. sáv: 20 μl ; 3. sáv: 30 μl).

Fehérje	Aminosav szekvencia
<i>Penicillium chrysogenum</i> β -galaktozidáz (N-terminális)	APSGIHNVDVHVVDN
<i>Penicillium chrysogenum</i> N-acetil- β -D-hexóزامинидáz (99-113. aminosav)	APSGIHNVDVHVVDN
<i>Penicillium chrysogenum</i> 83 kDa-os fehérje (N-terminális)	LTPEQLIAAPR
<i>Aspergillus fumigatus</i> dipeptidil peptidáz (19-29. aminosav)	LTPEQLITAPR
<i>Penicillium chrysogenum</i> 78 kDa-os fehérje (N-terminális)	TEEFL(S)QF(F)

4. táblázat: A β -galaktozidáz és a vele együtt tisztuló fehérjék N-terminális aminosav szekvenciáinak összevetése homológ szekvenciákkal.

4.3. Genetikai vizsgálatok

4.3.1. Az N-acetil- β -D-hexóزامинидáz gén 5' végének szekvenálása

Mivel a β -galaktozidáz enzim legalább 15 aminosav hosszúságú N-terminális aminosav szekvenciája megegyezett a korábban *Penicillium chrysogenum*-ból klónozott és szekvenált N-acetil- β -D-hexóزامинидáz prekursor fehérje 99-113. aminosav szekvenciájával, ezért meghatároztuk a gén 5' végének nukleotid szekvenciáját is.

Az aminosav szekvenciák és az adatbázisban található *Penicillium chrysogenum* N-acetil- β -D-hexóزامинидáz prekursor fehérje gén szekvenciája alapján (Diez és Barredo 1998) két oligonukleotidot terveztünk, melyeket a PCR reakcióban primerként használtunk. Az előremutató primer, a β -galaktozidáz enzim N-terminális aminosav szekvenciájának megfelelően, a hexóزامинидáz gén 1618-1638-ig tartó bázissorrendjével megegyező, 21 bázis hosszúságú oligonukleotid volt. A reverz primer, a hexóزامинидáz gén 2286-2306-ig tartó bázissorrendjével egyező, szintén 21

bázis hosszúságú oligonukleotid volt (**5. táblázat**). Így a két primer egy 689 bázispár hosszúságú DNS szakaszt zárt közre.

OLIGONUKLEOTIDO K	Nukleotid szekvencia	Nukleotid pozíció*
Előremutató primer	5'-GCGCCCTCCGGAATCCATAAC-3'	1618-1638
Reverz primer	5'-ACAGATGGTCCTTAACAGAGC-3'	2286-2306
Digoxigeninnel oligonukleotid jelölt	5'-GCGCCCTCCGGAATCCATAACGT CGATGTTTCATGTGGTGGACAAC-3'	1618-1662

5. táblázat: A PCR reakcióban és Southern hibridizációban használt oligonukleotidok.

*A nukleotid pozíció az NCBI adatbázisban található *Penicillium chrysogenum* N-acetil- β -D-hexózaminidáz prekursor fehérje teljes génszekvenciája (Diez és Barredo 1998) alapján van meghatározva.

A PCR reakcióhoz templátként *EcoRI* hasító enzimmel emésztett *Penicillium chrysogenum* kromoszómális DNS-t használtunk. A „blunt-end” klónozás érdekében a génszakaszt *Pfu* DNS polimerázzal amplifikáltuk. A PCR reakció lépései: 1 ciklus 94°C (3 perc), 55 °C (1 perc), 72 °C (2 perc); 40 ciklus 94 °C (1 perc), 55 °C (1 perc), 72 °C (2 perc); 1 ciklus 72 °C (5 perc).

A PCR reakcióban a várákozásnak megfelelő mérettartományban egyetlen, körülbelül 700 bázispár hosszúságú DNS szakasz amplifikálódott. Ezt a DNS fragmentumot gélből visszaizolálva pCR®-Blunt plazmidba (Invitrogen) klónoztuk, majd szekvenáltattuk.

A klónozott DNS szakasz szekvenciája (**12. ábra**) 100 %-ig megegyezett az adatbázisban található *Penicillium chrysogenum* N-acetil- β -D-hexózaminidáz prekursor fehérje gén 1618-2306 közé eső génszakasz szekvenciájával.

```

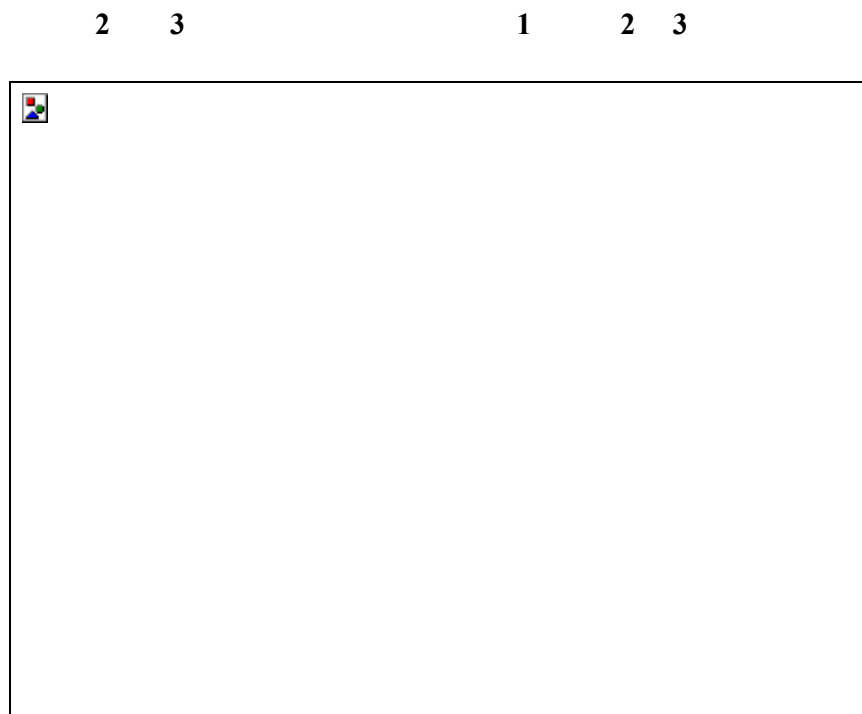
1  gcgccctccg gaatccataa cgtcgatggt catgtggtgg acaacgatgc
51 cgatctccaa tacggtgtgg atgaatccta tacactggta gtgagcgatg
101 gtggcatcag gatcaattct cagacggtct ggggtgtggt gcaggcattc
151 accaccctgc agcagattat catctcggat gggaagggcg gtttgatcat
201 tgaacagccc gtcaagatca aggatgcccc gctgtacccc catcgtggta
251 tcatgataga caccgggctc aacttcatta ccgttcgcaa gtccttgag
301 cagatcgacg gtatggccct gtccaagctc aatgttctcc actggcactt
351 ggacgattct cagtcgtggc ccatgcagat gagctcctac ccggagatga
401 ccaaagatgc ttactgcct cgcgaaatct acaccgagca cgacatgcgc
451 cgctgattg cctacgcacg cgcgcgaggt gtccgcgtca tccccgaggt
501 cgacatgccc gccactcag cctccggctg gcagcaggtc gacccggaga
551 tcgtggcatg tgccgaatcc tgggtggtcg acgacgtttg ggcggagcac
601 accgccgtcc agccgaaccc tggccagctc gacattatct accccaagac
651 ctacgaagtt gtcaacaatg tctaccagga attgtctcg

```

12. ábra. Az N-acetil- β -D-hexóaminidáz gén 5' végének 689 bp hosszúságú fragmentumának szekvenciája.

4.3.2. A β -galaktozidáz és N-acetil- β -D-hexóaminidáz enzimeket kódoló gének számának meghatározása Southern hibridizációval

A hibridizációhoz egy 45 bázis hosszúságú, 5' végén digoxigeninnel jelölt, a β -galaktozidáz enzim N-terminális aminosav sorrendjének és az N-acetil- β -D-hexóaminidáz gén 5' végének 1618-1662-ig tartó bázissorrendjének megfelelő oligonukleotidot terveztünk próbaként (**5. táblázat**). A *Penicillium chrysogenum* kromoszómális DNS-t *EcoRI* restrikciós enzimmel emésztettük; kontrollként a korábban klónozott plazmidot használtuk, melyet szintén *EcoRI* enzimmel emésztettünk. A hibridizáció és immunológiai detektálás eredményeként az emésztett kromoszómális DNS egyetlen fragmentuma volt detektálható, melynek mérete megegyezett a pozitív kontrollként használt inszert méretével. A negatív kontrollként alkalmazott vektor nem adott szignált, vagyis a hibridizáció és a detektálás megfelelően sikerült (**13. ábra**).



13. ábra. Southern hibridizáció digoxigeninnel jelölt primerrel. 1. sáv: *Hind*III-mal emésztett λ -fág standard; 2. sáv: *Eco*RI enzimmal emésztett klónozott plazmid; 3. sáv: *Eco*RI enzimmal emésztett *Penicillium chrysogenum* kromoszómális DNS.

5. MEGBESZÉLÉS

5.1. A β -galaktozidáz aktivitás szénforrás szabályozása

A szénforrás szabályozás, amint az régóta ismeretes, fontos szerepet játszik a szekunder metabolitok, így a penicillin bioszintézisében is. A glükóz, és más könnyen hasznosítható szénforrások represszálják a penicillin bioszintetikus gének expresszióját. Laktózt használva szénforrásként ilyen represszió nem tapasztalható (Brakhage 1998). A laktóz felhasználás penicillin termelésben betöltött rendkívül fontos szerepének ellenére elég kevés tanulmány jelent meg a β -galaktozidáz szintézis szabályozásáról fonalas gombákban.

Kísérleteink azt mutatták, hogy az általunk vizsgált *Penicillium chrysogenum* törzsben a β -galaktozidáz aktivitás sejthez kötött. Jelentősebb extracelluláris aktivitást csak a sejtlízis megindulása után tapasztaltunk (**2. ábra**). A *Penicillium chrysogenum*hoz hasonlóan intracelluláris β -galaktozidáz aktivitással rendelkezik az *Aspergillus nidulans* (Díaz és mtsai. 1996) és a *Thermomyces lanuginosus* (Fischer és mtsai. 1995). *Aspergillus oryzae*ban (Gargova és mtsai. 1995), *Aspergillus niger*ben (Widmer és Leuba 1979), *Penicillium notatum*ban (Rogalski és Lobarzewski 1995) és *Rhizomucor* fajokban (Shaikh és mtsai. 1999) extracellulárisan mérték β -galaktozidáz aktivitást. *Phycomyces blakesleeanus*ban mind extra-, mind intracelluláris formában megtalálható az enzim (Montero és mtsai. 1989). *Neurospora crassa*ban két típusú laktáz található (Bates és mtsai. 1967), amelyekből az egyik extra- és intracellulárisan is megtalálható, a másik csak intracellulárisan.

A fonalas gombák β -galaktozidáz enzim termeléséről részletes tanulmány csak *Aspergillus nidulans* és *Neurospora crassa* esetében jelent meg (Fantes és Roberts 1973, Bates és mtsai. 1967). Ezeknél a fajoknál az enzimet a laktóz és a galaktóz indukálta, és érdekes módon a galaktóz volt a jobb inducer. Glükóz, szacharóz, glicerín és néhány más szénforrás represszálta az enzim szintézist. *Penicillium chrysogenum*ban az általunk vizsgált szénforrások közül csak a laktózon nőtt tenyészetekben volt magas a β -galaktozidáz aktivitás (**3 B. ábra**). Glükóz, szacharóz, galaktóz vagy glicerín, mint egyedüli szénforrás jelenlétében gyakorlatilag nem lehetett β -galaktozidáz aktivitást detektálni az exponenciális növekedési fázisban (**3 B. ábra**). A megvizsgált szénforrások közül csak a laktóz indukálta az enzim szintézist, a többi, köztük a

galaktóz, nem. Ez ellentétes azzal, amit *Aspergillus nidulans*-ban, és *Neurospora crassabana*-ban tapasztaltak, ahol a laktóz mellett a galaktóz is indukálta az enzim szintézist. A galaktóz más gombákban is inducere a β -galaktozidáznak, mint például *Candida pseudotropicalis*-ban (Pedrique és Castillo 1982), és *Saccharomyces fragilis*-ben (Davies 1956). *Phycomyces blakesleeanus*-ban a galaktóz mellett a fruktóz is (Montero és mtsai. 1989), *Penicillium canescens*-ben a galaktóz mellett az L-arabinóz is hatásos inducer (Nikolaev és Vinetski 1998).

Ellentétben *Aspergillus nidulans*-szal és más fajokkal, kísérleteinkben a laktóz nehezen metabolizálható szénforrásnak bizonyult, amit a gyenge növekedés és a lassú laktóz fogyás is mutatott (4 A. ábra). A laktóz szénforráson nőtt tenyészetben magas kezdeti ammóniatermelés volt megfigyelhető (4 A. ábra). Az irodalomból jól ismert, hogy aminosavakon, mint szén- és energiaforráson történő növekedés jelentős ammóniatermelést eredményez (Nielsen 1995; Petman és Kinghorn 1976; Pusztahelyi és mtsai. 1997ab), ami ebben az esetben azt mutatja, hogy a gomba számára a pepton könnyebben hozzáférhető energiaforrás volt, mint a laktóz, és csak bizonyos idő eltelte után, egy viszonylag magas β -galaktozidáz aktivitást elérve, kezdte a laktózt hasznosítani. Ezzel ellentétben a glükózon nőtt tenyészetben, ahol a glükóz egy könnyen és jól hasznosuló szénforrás, az ammóniatermelés csak a glükóz elfogyása után volt tapasztalható (4 B. ábra). Az aminosavak a glükóznál lassabban metabolizálódó, gyengébb szén- és energiaforrások. A sejtbe jutásuk aktív transzporttal, valószínűleg szinporttal történik, valamint előbb át kell alakulniuk a szén metabolizmus intermediereivé (Hunter és Segel 1971; Benko és mtsai. 1969). *Penicillium chrysogenum*-ban nincs közölt adat a laktóz felvételről, de valószínűleg hasonló rendszerek vannak, mint amit *Aspergillus nidulans*-ban és *Neurospora crassabana*-ban megfigyeltek (Mark és Romano 1971; Lester és mtsai. 1962; Scarborough 1970 ab). A laktóz, feltehetőleg egy specifikus aktív transzport rendszer révén, proton szinporttal jut be a sejtekbe (Nielsen 1995), hasonlóan az aminosavakhoz. Az egyes aminosav csoportok számára azonban külön transzport rendszer létezik, és a felvételt tovább segíti, hogy szénéhezés során egy közös permeáz is működésbe lép (Hunter és Segel 1971, 1973; Jorgensen 1993). Ilyen szénéhezésre mutató jelek tapasztalhatók, ha a gomba laktóz szénforráson nő, és ilyen szuboptimális növekedési körülmények kedveznek a penicillin bioszintézis számára is.

Aspergillus nidulans-ban a galaktóz ugyanolyan gyenge szénforrás, mint a laktóz (Fantes és Roberts 1973). Ezzel szemben az általunk vizsgált *Penicillium chrysogenum* törzsben

a galaktóz meglehetősen jó és hasonlóan represszálo hatású szénforrás volt, mint a glükóz (6 C. ábra). Mindez azt mutatja, hogy a *Penicillium chrysogenum*-ban a galaktóz hasznosítása más módon történik, mint azokban a gombákban, ahol a galaktóz is indukálja a β -galaktozidáz bioszintézist.

Ha glükózt, galaktózt, szacharózt vagy glicerint adtunk laktózon nőtt tenyészethez, az enzim szint lecsökkent mindaddig, míg ezek a szénforrások el nem fogytak (6 C. ábra). A galaktóz tehát nemcsak nem indukálta, de a glükózhoz, szacharózhoz és glicerinhoz hasonlóan még represszálta is a β -galaktozidáz bioszintézist. Amennyiben 2 % helyett 0,5 % glükózt adtunk a laktóz szénforráson nőtt tenyészethez, az enzim szintézis szintén represszálódott, de kisebb mértékben, és a kis mennyiségű glükóz gyors elfogyása következtében rövidebb ideig. A glükóz elfogyása után az enzim aktivitás ismét megemelkedett. Ez azt mutatja, hogy a represszió mértéke függ a glükóz koncentrációjától. A glükóz hatása a penicillin bioszintézisre hasonlóan koncentrációfüggő 28-140 mM koncentráció tartományban (Revilla és mtsai. 1984). Érdekes megfigyelés, hogy bár a szacharóz a laktózhoz hasonlóan diszacharid, ennek ellenére a glükózhoz hasonlóan gyorsan metabolizálódik és erősen represszálo hatású. Ennek oka valószínűleg a nagy extracelluláris invertáz aktivitás (Nielsen 1995). Ezt alátámasztja, hogy az általunk végzett kísérlet során, amikor szacharózt adtunk laktózon nőtt tenyészethez, a glükóz szintje ugrásszerűen megemelkedett a tápközegben, majd gyorsan el is fogyott. Vagyis a szacharózt az invertáz extracellulárisan gyorsan hidrolizálja, és a megfelelő transzport rendszerek révén (Nielsen 1995) a képződött glükóz és fruktóz jut be a sejtekbe, ami gyors növekedést, és repressziót eredményez. A fentiek alapján nem meglepő, hogy nagy mennyiségű szacharóz a tápközegben a penicillin termelését is lecsökkenti, represszálja a penicillin bioszintézist (Brakhage 1998). Ezzel szemben a laktóznak előbb be kell jutnia a sejtbe, hogy az intracelluláris β -galaktozidáz glükózra és galaktózra hidrolizálhassa.

Ha laktóz szénforráson nőtt tenyészethez további laktózt adagoltunk, sem a növekedésben (6 A. ábra), sem a laktóz fogyásban (6 B. ábra), sem a β -galaktozidáz aktivitásban (6 C. ábra) nem történt változás, ami a laktóz erősen limitált felhasználására utalt.

Neurospora crassa β -galaktozidáza esetében, amikor a tenyészetet nem indukáló szénforrásról indukáló szénforrásra mosták át, az enzim aktivitás és a növekedés csak órák múlva emelkedett meg (Bates és mtsai. 1967). Hasonlóakat tapasztaltunk mosott

sejtes tenyészetben, amikor glükóz szénforrásról laktóz szénforrásra mostuk át a tenyészetet. A növekedés csak az átmosást követő tizedik órában kezdődött el egy hosszabb lag fázis után. A β -galaktozidáz aktivitás, egy öt órás lag fázist követően, már jelentős mértékben megnőtt (**5 B. ábra**). Baktériumokban azonban ez a lag fázis jóval rövidebb. Az inducer jelenlétére válaszként már néhány percen belül megemelkedik az enzim aktivitás és fokozódik a növekedés (Jacob és Monod 1961).

A glükóz szénforráson, komplex tápoldatban nőtt tenyészetben tapasztalt összefüggés a glükóz elfogyása, a növekedés leállása és az alacsony β -galaktozidáz aktivitás megjelenése között arra enged következtetni, hogy *Penicillium chrysogenum*-ban az enzimnek egy indukció nélküli, derepresszált szintézise is megtalálható (**4 B. ábra**). A derepresszió mértéke alacsony, de szignifikáns volt. Különböző enzimek derepresszált szintézise élesztőkben (Zimmermann 1977) és *Aspergillus nidulans*-ban is ismert, ám β -galaktozidáznál eddig még nem írták le.

Ezeknek az eredményeknek a tükrében felvetődik az a kérdés, hogy döntően milyen folyamatok eredményezik, hogy a laktóz ennyire rosszul hasznosul? Vajon a sejten belül, a laktózból felszabaduló glükóz és galaktóz represszálja-e a β -galaktozidáz fokozott szintézisét és/vagy a laktóz transzportját? Vagy a laktóz transzportja és hidrolízise már eleve szűk keresztmetszetet jelent a laktóz hasznosításban, amit a laktózból képződő kis mennyiségű és gyorsan hasznosuló glükóz és galaktóz represszáló hatása lényegesen már nem befolyásol. Az első felvetést támasztja alá, hogy a glükóz és galaktóz erőssen represszálta a β -galaktozidáz enzim szintézisét, és a glükózzal ismert, hogy transzport rendszereket represszálhat (Rand és Tatum 1980 ab). Másfelől szintén ismert, hogy *Penicillium chrysogenum*-ban a laktóz nem eredményezi a penicillin bioszintézis represszióját, vagyis csak szubrepresszáló mennyiségű glükóz szabadul fel a laktóz hidrolíziséből, ami gyorsan metabolizálódik is. Szacharóz esetében a felszabaduló nagy mennyiségű glükóz mind a penicillinnek, mind a β -galaktozidáznak a termelését represszálta, de ebben az esetben a szacharóz hasznosítása és így a szacharózon való növekedés is gyors volt. Saját kísérletek alapján úgy gondoljuk, hogy a laktózból felszabaduló glükóz represszáló hatása, bár nem zárható ki, úgy tűnik kevésbé meghatározó a laktóz hasznosítás szabályozásának szempontjából.

A cAMP-t, mint intracelluláris szabályozó molekulát már számos esetben vizsgálták különböző szervezetekben (Pall 1981; D'Souza és Heitman 2001). Mikroorganizmusokban a szénhidrát anyagcsere szignáljaként tanulmányozták

átfogóan, különösen a baktériumok karbon katabolit repressziójában betöltött központi szerepével kapcsolatban (Pall 1981). A cAMP szerepe a gombák karbon repressziójában lényegesen különbözik a baktériumokban meghatározottól (Ronne 1995), és a rendelkezésre álló adatok elég ellentmondásosak (Ruijter és Visser 1997). Korábbi vizsgálatok azt mutatták, hogy *Aspergillus nidulans*-ban (Zonneveld 1976), *Saccharomyces cerevisiae*-ben (Denis és Audino 1991) és *Schizosaccharomyces pombe*-ben (Byrne és Hoffman 1993) a cAMP szint magasabb, amikor a glükóz nagy koncentrációban van jelen. Azonban más eredmények szerint nincs, vagy alig van összefüggés a szénforrás és az intracelluláris cAMP szint változás között *Aspergillus* (Zonneveld 1976), *Mucor* (Paveto és mtsai. 1975) és *Neurospora* fajokban (Pall 1977). Különböző szénforrásokon nőtt tenyészetekben meghatároztuk a cAMP szintet annak érdekében, hogy megvizsgáljuk a cAMP lehetséges szerepét a β -galaktozidáz szénforrás regulációjában. Eredményeink azt mutatták, hogy a laktózon nőtt sejtekben viszonylag magas a cAMP szint, míg glükózon nőtt sejtekben alacsony, jó egyezést mutatnak Emri és mtsai. (1994) és Kozma és mtsai. (1992) által leírtakkal. Glicerinen nőtt tenyészetben nem volt detektálható mennyiségű cAMP jelen, ám szacharóz szénforráson, a laktózhhoz hasonlóan jól detektálható cAMP szintet mértünk. Mivel a szacharóz a glükózhhoz hasonlóan erősen represszálta a β -galaktozidáz szintézist és fokozta a növekedést, feltételezhető, hogy *Penicillium chrysogenum*-ban sincs közvetlen összefüggés a cAMP szint és a karbon represszió illetve szénéhezés között.

Az endogén cAMP szintet különböző drogokkal, exogén cAMP-vel vagy ennek analógjaival (pl.: dBcAMP), befolyásolni lehet (Pall 1981). Metilxantinok, mint a teofillin, koffein és 1-metil-3-izobutilxantin, mint foszfodiészteráz inhibitorok működnek, ezért az endogén cAMP szint emelésére használhatóak (Pall 1981, Scott és Solomon 1973, Emri és mtsai. 1998). *Penicillium chrysogenum*-ban, a koffein hatékonyan növelte a sejten belüli cAMP koncentrációt (Emri és mtsai. 1994). Saját kísérleteinkben, komplex tápközegben, a koffein jelentősen lecsökkentette a glükóz fogyasztást és a növekedést, ám a β -galaktozidáz aktivitásra alig volt hatással (**7 C. ábra**). Mosott sejtes tenyészetben, glükózon és koffeinen, a koffein lecsökkentette ugyan a növekedést, ám nem növelte meg a β -galaktozidáz aktivitást. Laktózon nőtt tenyészetben azonban, a koffein jelentősen lecsökkentette a növekedést és csökkentette az enzimaktivitást (**5. ábra**). Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a cAMP nem befolyásolta közvetlenül a β -galaktozidáz szintézist. Elfogadva, hogy a koffein fő hatása

a cAMP szint megemelése, a cAMP-nek nincs szerepe a β -galaktozidáz szintézis karbon repressziójában, viszont erősen gátolta a glükóz fogyaszt mind komplex tápközegben, mind mosott sejtes tenyészetekben (**7 B. és 5 B. ábra**). Pancreas Langerhans-szigeteiben kimutatták, hogy a koffein gátolja a D-glükóz transzportját, ami azt jelenti, hogy a koffein glükóz felvételének a gátlása független az intracelluláris cAMP szintet befolyásoló képességétől (McDaniel és mtsai. 1977). Elképzelhető, hogy a mi kísérleteinkben a csökkent glükóz fogyás szintén a glükóz felvétel gátlásának tulajdonítható.

Állati sejtekben a legáltalánosabban használt cAMP analóg a dBcAMP. Számos fonalas gombában alkalmazták már, bár kisebb vagy hasonló aktivitással rendelkezett, mint maga a cAMP (Pall 1981). Az általunk végzett kísérletekben a dBcAMP nem volt hatással sem a növekedésre, sem a β -galaktozidáz aktivitásra (**8. ábra**). *Neurospora crassaban* (Terenzi 1976) és *Aspergillus nigerben* (Wold és Suzuki 1973) szintén viszonylag inaktív, aminek oka feltehetőleg az, hogy nem alakul át megfelelő mennyiségben 6-N-monobutiril-cAMP-vé, ami az emlős sejtekben megfigyelt aktív analóg (Pall 1981). *Mucor* fajokban azonban a dBcAMP élesztőszerű növekedést eredményező morfológiai változásokat okoz (Jones és Bullock 1977).

Szintén központi szerepet játszó jelátvivő nukleotidok a cGMP és az ADP-ribóz. Az általunk végzett kísérletek alapján, jól detektálható mennyiségben vannak jelen *Penicillium chrysogenum* sejtekben, ám sejten belüli koncentrációjuk változása és az alkalmazott szénforrás között semmilyen közvetlen összefüggést nem találtunk (**1. táblázat**).

A dezoxi-D-glükóz, mint nem természetes glükóz analóg, élesztőben erősen gátolja a növekedést és a fermentációt. Foszforilált formáján keresztül, a glikolízis fluxusát befolyásolja, leginkább a fermentálódó cukrok felvételén és sejtfal poliszacharidok szintézisének gátlásán keresztül (Heredia és mtsai. 1963). Az általunk vizsgált *Penicillium chrysogenum* törzsben a dezoxi-D-glükóz lecsökkentette a növekedést és a β -galaktozidáz aktivitást (**5. ábra**), ezért feltételezhető, egy glikolitikus intermediér befolyásolhatja az enzim aktivitását, mint például *Saccharomyces cerevisiae* α -glükozidáz esetében (Kuo és Lampen 1972).

A fentebb tárgyalt eredmények alapján úgy tűnik, hogy a β -galaktozidáz aktivitást, *Penicillium chrysogenum*ban, a laktóz indukálja, a glükóz, szacharóz,

glicerin, és ellentétben más gombákkal és élesztőkkel, a galaktóz is represszálja. Emellett, a β -galaktozidáz szintézisnek egy indukció nélküli, derepresszált szintézise is megfigyelhető az általunk vizsgált *Penicillium chrysogenum* törzsben. A cAMP szerepét a karbon represszióban nem lehetett kimutatni. Ezek az eredmények, összevetve a penicillin bioszintézis szénforrás szabályozásáról eddig rendelkezésre álló ismeretekkel, megerősítik azt a feltételezést (Barredo és mtsai. 1988), mely szerint a szénhidrát hasznosítás és a penicillin bioszintézis szénforrás szabályozása hasonló mechanizmus révén valósulhat meg.

5.2. A β -galaktozidáz aktivitással rendelkező enzim jellemzése

Mivel eredményeink azt mutatták, hogy *Penicillium chrysogenum*ban a β -galaktozidáz enzim intracelluláris, és a bioszintézise szubsztrát indukció és glükóz represszió alatt áll, ahol a glükóz mellett a galaktóz is represszáló szénforrás, ezért az enzim tisztításához laktóz szénforráson nőtt tenyészet micéliumát használtuk. A megtisztított enzim sajátságait a **6. táblázat**ban foglaltuk össze.

	β -galaktozidáz	N-acetil- β -D-hexóزامинидáz
M_w	270 kDa (4 X 66 kDa)	141 kDa (2 X 66,4 kDa)
pH optimum	4,0-5,0	4,0-5,5
Hőmérséklet optimum	30 °C	50 °C
pI	4,6	5,0 (4,9)
K_m (ONPG)	1,81 mM	Nem hidrolizálja
(Laktóz)	27,02 mM	Nem hidrolizálja
(PNP-GlcNAc)	1,28 mM	0,57 mM
V_{max} (ONPG)	40 nkat/mg	Nem hidrolizálja
(Laktóz)	9,2 nkat/mg	Nem hidrolizálja
(PNP-GlcNAc)	166 nak/mg	55 kat/kg

6. táblázat: *Penicillium chrysogenum* β -galaktozidáz és N-acetil- β -D-hexóزامинидáz (Pócsi és mtsi. 1999) enzimatiskus sajátságainak összehasonlítása

Az enzim pH optimuma nagy egyezést mutat *Aspergillus oryzae*ból (Gargova és mtsai. 1995) tisztított β -galaktozidázával, a *Neurospora crassa* (Bates és mtsai. 1967) alacsonyabb pH optimummal rendelkező enzimével (pH=4,2), a *Penicillium notatum*ból (Rogalski és Lobarzewski 1995) és *Penicillium citrinum*ból (Watanabe és mtsai. 1979) izolált enzimekével. Az *Aspergillus nidulans* (Díaz és mtsai. 1996) β -galaktozidázának a pH optimuma 7,5. Az általunk tisztított β -galaktozidáz hőmérséklet optimuma az *Aspergillus nidulans*ban (Díaz és mtsai. 1996) található laktáz hőmérséklet optimumával egyezik, míg más gombák β -galaktozidázai, különösen melyek extracellulárisak, magasabb hőmérséklet optimummal rendelkeznek. A *Penicillium chrysogenum* β -galaktozidáz izoelektromos pontja megegyezik az *Aspergillus niger*ből (Widmer és Leuba 1979) izolált enzim izoelektromos pontjával.

A molekulatömeg meghatározás eredményeként azt kaptuk, hogy a natív enzim móltömege 270 kDa, amely négy, egyenként 66 kDa tömegű, alegységből épül fel, vagyis az enzim homotetramer. A multimer sajátság elég általános a mikrobiális β -galaktozidázok között. Homotetramer formában található *Escherichia coli*ban (Steers és Cuatrecasas 1971), *Bacillus macerans*ban (Steers és Cuatrecasas 1971) és *Lactobacillus helveticus*ban (Nadder de Macias és mtsai. 1983). A tanulmányozott gomba enzimek közül *Aspergillus oryzae*ban (Gargova és mtsai. 1995) és *Aspergillus niger*ben (Widmer, F. és Leuba 1979) monomer, *Aspergillus nidulans*ban (Díaz és mtsai. 1996), *Rhizomucor sp*-ben (Shaikh 1999), *Fusarium oxysporum*ban (Brando és mtsai 1987), *Thermomyces lanuginosus*ban (Fischer és mtsai. 1995) multimer. Ezek az enzimek döntően extracellulárisak (pl.: *Aspergillus oryzae*ban, *Aspergillus niger*ben, *Rhizomucor sp*-ben és *Penicillium notatum*ban), de van közöttük néhány intracelluláris is (*Aspergillus nidulans*ban, *Thermomyces lanuginosus*ban).

Az enzim kinetikai paraméterei szintetikus szubsztrátjára (ONPG) nézve $K_m=1,81$ mM, $V_{max}=40$ nkat/mg, laktózra vonatkozólag $K_m=27,02$ mM, $V_{max}=9,2$ nkat/mg adódott. Az enzim K_m értékei nagy azonosságot mutatnak az *Aspergillus nidulans*ban (Díaz és mtsai. 1996) és *Aspergillus oryzae*ban (Gargova mtsai. 1995) mért értékekkel. A K_m értékben nagyságrendi különbség van a szintetikus és természetes szubsztrát esetében, ami azonban általános az eddig leírt β -galaktozidázok esetében (Gargova és mtsai. 1995).

A szubsztrátspecifitási vizsgálatok azt mutatták, hogy az enzim hexóaminidáz aktivitással is rendelkezik. Hasonló megfigyelést más β -galaktozidázok esetében még

nem írtak le. Az N-acetil- β -D-hexóزامинидázt Pócsi és mtsai. (1993, 1999) tisztították *Penicillium chrysogenum*ból, meghatározva enzimátikus sajátságait. Ennek eredményeit, összehasonlítva az általam tisztított β -galaktozidáz aktivitással rendelkező enzim sajátságaival, a **6. táblázat**ban foglaltuk össze. A kinetikai paraméterek alapján a β -galaktozidáz nem rendelkezik olyan nagy hexóزامинидáz aktivitással mint az N-acetil- β -D-hexóزامинидáz, de a β -galaktozidáz aktivitáshoz képest, ez igen jelentős. Lényeges különbség, hogy a tisztított N-acetil- β -D-hexóزامинидáz nem hidrolizálta sem a laktózt, sem a β -galaktozidázok legjobb szintetikus szubsztrátját, az ONPG-t. Emellett jelentős az eltérés a két enzim hőmérséklet optimumában is.

Ha a két enzim fehérje szerkezetét összehasonlítottuk, további fontos különbségeket és azonosságokat találtunk. Molekulatömeg alapján, a β -galaktozidáz egy elég nagy méretű, tetramer fehérje, ami viszonylag ritka az eukariótákból tisztított β -galaktozidázok között. Az N-acetil- β -D-hexóزامинидáz dimer szerkezetű *Penicillium chrysogenum*ban, és mind a natív fehérje, mind az alegységek molekulatömege nagy hasonlóságot mutat más gombákban található hexóزامинидázokéval (Scigelova és Crout 1999). Lényeges hasonlóság, hogy a két enzim alegységeinek molekulatömegei gyakorlatilag megegyeznek. Az alegységek 15 aminosav hosszúságú N-terminális aminosav sorrendjét meghatározva és összehasonlítva, azt kaptuk, hogy a β -galaktozidáz N-terminális szekvenciája megegyezik az N-acetil- β -D-hexóزامинидáz szignál szekvenciát követő 99-113 aminosav szekvenciájával, ami közvetlenül egy KR (Liz-Arg) hasító hely után következik (Diez és Barredo 1998). Ez az egyezés felveti annak lehetőségét, hogy a két fehérjét ugyanazon gén kódolja, és a két enzim különböző poszttranszlációs érési folyamatok révén jön létre. Ezt, egyrészt alátámasztani látszik, hogy az N-acetil- β -D-hexóزامинидáz szignál szekvenciát követő 97-98. aminosav KR (Liz-Arg), amely élesztőben a Kex2 endopeptidáz hasítóhelye (Fuller és mtsai. 1989), ami alapján feltételezhető, hogy *Penicillium chrysogenum*ban az „N-acetil- β -D-hexóزامинидáz” prekursor egy pre-pro-fehérjeként szintetizálódik, s a hasítást egy Kex2 homológ végzi. Másrészt a β -galaktozidáz poszttranszlációs érésére vonatkozólag, az enzim tisztítása szolgált néhány felvetéssel. Az enzim tisztítása ugyanis több lépést igényelt, mint más mikroorganizmusoknál, ahol az affinitás kromatográfiát sikeresen alkalmazták a β -galaktozidáz gyors tisztítására (Díaz és mtsai. 1996; Steers és mtsai. 1971, 1974; Pollard és Steers 1973). *Penicillium chrysogenum* esetében ugyanis a β -galaktozidázzal két másik, nehezen elválasztható fehérje tisztult együtt. Meghatározva

ennek a két fehérjének az N-terminális aminosav szekvenciáját, azt kaptuk, hogy a 83 kDa méretű fehérje aminosav szekvenciája egy *Aspergillus fumigatus*-ból származó dipeptidil peptidáz (Beauvais és mtsai. 1997) szignálszekvenciát követő szekvenciájával mutat nagy homológiát. A másik, 78 kDa méretű, együtt tisztuló fehérje proteáz aktivitással rendelkezik, melyhez Ca^{2+} jelenléte volt szükséges, de N-terminális aminosav szekvenciája nem mutat jelentős homológiát más ismert szekvenciával (**4. táblázat**). A dipeptidil peptidázok igen fontosak a sejtek anyagcseréjében, a dipeptidek metabolizmusában. Az *Aspergillus fumigatus*-ból izolált dipeptidil peptidáz expressziója nagymértékben függ a növekedés körülményeitől; maximális intra- és extracelluláris szintet fehérje, vagy fehérje hidrolizátumot tartalmazó tenyészetekben mértek, amikor nem volt jelen semmilyen cukor (Beauvais és mtsai. 1997). A Ca^{2+} -dependens proteázok fontos szerepet játszanak perkurzor fehérjék proteolitikus processzálásában. Ilyen proteáz többek között az élesztőből izolált Kex2 endoproteáz is (Fuller és mtsai. 1989). Ezek alapján elképzelhető, hogy a β -galaktozidázal együtt tisztuló két proteáz az enzim érésében játszhat szerepet.

A *Penicillium chrysogenum* β -galaktozidáz és N-acetil- β -D-hexóaminidáz genetikai vizsgálatainak eredményeként, a β -galaktozidáz aktivitással rendelkező fehérje N-terminális aminosav sorrendje alapján tervezett jelölt oligonukleotiddal végzett hibridizációs kísérlet során egyetlen hibridizáló fragmentumot találtunk az emésztett genomiális DNS-ben (**13. ábra**). Ez a 45 bázis hosszúságú oligonukleotid az N-acetil- β -D-hexóaminidáz gén 5' végének 1618-1662-ig tartó bázissorrendjével is megegyezett. Tekintve, hogy a hibridizáció során csak egyetlen szignált kaptunk és az általunk tervezett primerekkel (**5. táblázat**) amplifikált 689 bp hosszúságú DNS fragmentum szekvenciája (**12. ábra**), mely a hibridizálódó szakaszt is magában foglalta, 100 %-ig megegyezett az N-acetil- β -D-hexóaminidáz gén 1618-2306 közötti szakaszának bázissorrendjével, feltételezhető, hogy *Penicillium chrysogenum*-ban a β -galaktozidáz és az N-acetil- β -D-hexóaminidáz enzimek alegységeit egyetlen, közös gén kódolja.

A *Penicillium chrysogenum* β -galaktozidáz és N-acetil- β -D-hexóaminidáz lehetséges közös génjének, meghatározott aminosav szekvenciájának, és az enzimek néhány sajátosságának egyezése, illetve a tisztított β -galaktozidáz hexóaminidáz aktivitása

alapján feltételezzük, hogy az ipari penicillin termelő törzsben a laktóz bontását egy egyéb aktivitással/aktivitásokkal is rendelkező, a laktózt viszonylag rosszul bontó glikohidroláz végzi. Ez is magyarázhatja, hogy a laktóz nehezen metabolizálható szénforrás, és más fajoktól eltérő szabályozást mutat. A fehérje érése/aktiválása poszttranszlációs proteolízissel történhet. Ebben a tisztítás során vele együtt maradó proteolitikus fehérjék szerepe még tisztázandó kérdés.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

Kísérleteink azt mutatták, hogy az általunk vizsgált *Penicillium chrysogenum* törzsben a β -galaktozidáz aktivitás sejthez kötött. Jelentősebb extracelluláris aktivitást csak a sejtlízis megindulása után tapasztaltunk. A legjobb szénforrásnak a könnyen metabolizálódó glükóz, szacharóz, glicerín és érdekes módon a galaktóz bizonyult; a laktóz viszont kis biomasszát adó gyenge szénforrás, aminél még a pepton is könnyebben hozzáférhető energiaforrás a gomba számára. A vizsgált szénforrások közül csak a laktóz indukálta az enzimszintézist, a többi - köztük a galaktóz is - represszálta. Kísérleteink arra engednek következtetni, hogy *Penicillium chrysogenum*ban az enzimnek egy indukció nélküli, derepresszált szintézise is megtalálható.

Az egyes szénforrásokon mért cAMP koncentrációt vizsgálva feltételezhető, hogy *Penicillium chrysogenum*ban sincs, hasonlóan más fonalas gombákhoz, közvetlen összefüggés a cAMP szint és a karbon represszió illetve szénéhezés között. A koffein hatását vizsgáló kísérletek eredményei azt mutatták, hogy a cAMP nem befolyásolta közvetlenül a β -galaktozidáz szintézist, viszont erősen gátolta a glükóz fogyaszt, ami valószínűleg a glükóz felvétel gátlásának tulajdonítható.

A kapott eredmények, összevetve a penicillin bioszintézis szénforrás szabályozásáról eddig rendelkezésre álló ismeretekkel, megerősítik azt a feltételezést, mely szerint a szénhidrát hasznosítás és a penicillin bioszintézis szénforrás szabályozása hasonló mechanizmus révén valósulhat meg.

Munkánk során intracelluláris β -galaktozidáz aktivitással rendelkező enzimet tisztítottunk *Penicillium chrysogenum*ból, meghatároztuk enzimatiságait és összehasonlítottuk más enzimekkel. Emellett az enzimmel együtt tisztuló két fehérjét is részben azonosítottunk. A *Penicillium chrysogenum* β -galaktozidáz és N-acetil- β -D-hexóزامinidáz meghatározott aminosav és gén szekvenciájának, és az enzimek néhány sajátságának egyezése, illetve a tisztított β -galaktozidáz hexóزامinidáz aktivitása alapján feltételezzük, hogy az ipari, penicillin termelő törzsben a laktóz bontását egy egyéb aktivitással/aktivitásokkal is rendelkező, a laktózt viszonylag rosszul bontó glikohidroláz végzi. Ez is magyarázhatja, hogy a laktóz nehezen metabolizálható szénforrás, és más fajoktól eltérő szabályozást mutat. A fehérje érése/aktiválása feltehetőleg poszttranszlációs proteolízissel történik.

The study of lactose utilisation in *Penicillium chrysogenum*

Our experiments showed that the β -galactosidase activity in *Penicillium chrysogenum* is cell bound. The low activity in the culture filtrate was probably due to cell lysis at later stages of the growth. Glucose, sucrose, glycerol and surprisingly galactose were the best, easily metabolised carbon sources, while lactose was a rather poor carbon source, giving much less biomass. Our results suggest that even peptone was a better energy source than lactose. In our strain the enzyme was induced only by lactose. The other carbon sources (including galactose) repressed the β -galactosidase biosynthesis. Based on the results it seems, that in *Penicillium chrysogenum* there was an uninduced, derepressed synthesis of the enzyme.

Investigating the cAMP level on different carbon sources our results suggested that like in other filamentous fungus there was no direct correlation between cAMP level and carbon repression or carbon starvation in *Penicillium chrysogenum*. Investigating the effect of caffeine we found that cAMP did not influence the β -galactosidase synthesis but strongly antagonised glucose consumption probably due to the inhibition of glucose uptake.

These results compared to carbon regulation of penicillin biosynthesis also suggest that a common regulatory mechanism is involved in carbon regulation of sugar utilisation and penicillin biosynthesis.

The intracellular β -galactosidase from *Penicillium chrysogenum* was purified and some of its parameters determined and compared to other enzymes. We found some important enzymatic and genetic similarities between β -galactosidase and β -N-acetylhexosaminidase in *Penicillium chrysogenum*. In addition we partially characterised two proteins which co-purified with β -galactosidase. Based on these results we propose that in our industrial penicillin producer strain lactose is hydrolysed by a glycohydrolase with broad substrate specificity that has low affinity for lactose. This explains why lactose is a “non-easily metabolised” carbon source. Activity of the co-purifying proteins in this process is an intriguing question.

7. IRODALOMJEGYZÉK

7.1. Hivatkozott közlemények

- Adriens, P.; Meesschaert, B.; Wuyts, W.; Vanderhaeghe, H.; Eyssen, H. 1975. Presence of δ -(α -aminoadipyl)-cysteinyl-valine in fermentations of *Penicillium chrysogenum*. Antimicrob. Agents Chemother. **8**: 638-642.
- Aharonowitz, Y.; Cohen, G. 1992. Penicillin and cephalosporin biosynthetic genes: structure, organization, regulation, and evolution. Ann. Rev. Microbiol. **46**: 461-495.
- Alvarez, E.; Cantoral, J. M.; Barredo, J. L.; Díez, B.; Martín, J. F. 1987. Purification to homogeneity and characterization of acyl coenzim A:6-aminopenicillanic acid acyltransferase of *Penicillium chrysogenum*. Antimicrob. Agents Chemother. **31**: 1675-1682.
- Andrews, P. C. 1964. Estimation of the molecular weights of proteins by sephadex gel filtration. Biochem. J. **91**: 222-233.
- Aoki, H.; Okuhara, M. 1980. Natural β -lactam antibiotics. Ann. Rev. Microbiol. **34**: 159-181.
- Arnstein, H. R. V.; Artman, M.; Morris, D.; Toms, E. J. 1960. Sulphur-containing amino acids and peptides in the mycelium of *Penicillium chrysogenum*. Biochem. J. **76**: 353-357.
- Arnstein, H. R. V.; Grant, P. T. 1954a. The biosynthesis of penicillin. 1. The incorporation of some amino acids into penicillin. Biochem. J. **57**: 353-359.
- Arnstein, H. R. V.; Grant, P. T. 1954b. The biosynthesis of penicillin. 2. The incorporation of cysteine into penicillin. Biochem. J. **57**: 360-368.
- Arnstein, H. R. V.; Morris, D. 1960. The structure of a peptide, containing α -aminoadipic acid, cysteine and valine present in the mycelium of *Penicillium chrysogenum*. Biochem. J. **76**: 357-361.
- Attal, S.; Bay, S.; Cantacuzene, D. 1992. Enzymatic synthesis of β -galactosylpeptides and of β -(1,3)-digalactosyl serine derivatives using β -galactosidase. Tetrahedron **48**: 9251-9260.

- Bailey, C.; Arst, Jr., H. N. 1975. Carbon catabolite repression in *Aspergillus nidulans*. Eur. J. Biochem. **51**: 573-577.
- Barredo, J. L.; Alvarez, E.; Cantoral, J. M.; Diez, B.; Martin, J. F. 1988. Glucokinase-deficient mutant of *Penicillium chrysogenum* is derepressed in glucose catabolite regulation of both beta-galactosidase and penicillin biosynthesis. Antimicrob. Agents Chemother. **32**(7): 1061-1067.
- Bates, W. K.; Hedman S. C.; Woodward D. O. 1967. Comparative inductive responses of two β -galactosidases of *Neurospora*. J. Bacteriol. **93**: 1631-1637.
- Beauvais, A.; Monod, M.; Svab, J.; Kobayashi, H.; Diauquin, M.; Hovanessian, A. G.; Latge, J. P. 1997. Biochemical and antigenic characterization of a new dipeptidyl-peptidase isolated from *Aspergillus fumigatus*. J. Biol. Chem. **272**(10): 6238-6244.
- Benko, P. V.; Wood, T. C.; Segel, I. H. 1969. Multiplicity and regulation of amino acid transport in *Penicillium chrysogenum*. Arch. Biochem. Biophys. **129**: 498-508.
- Botsford, J. L., Harman, J. G. 1992. Cyclic AMP in prokaryotes. Microbiol. Rev. **56**: 100-122.
- Bourd, G. J.; Erlagaeva, R. S.; Bolshakova, T. N.; Gershanovitch, V. N. 1975. Glucose catabolite repression in *Escherichia coli* K12 mutants defective in methyl- α -D-glucoside transport. Eur. J. Biochem. **53**: 419-427.
- Brakhage, A. A. 1997. Molecular regulation of penicillin biosynthesis in *Aspergillus (Emericella) nidulans*. FEMS Microbiol. Lett. **148**: 1-10.
- Brakhage, A. A. 1998. Molecular regulation of β -lactam biosynthesis in filamentous fungi. Microbiol. Mol. Biol. Rev. **62**: 547-585.
- Brakhage, A. A.; Browne, P.; Turner, G. 1992. Regulation of *Aspergillus nidulans* penicillin biosynthesis and penicillin biosynthesis gene *acvA* and *ipnA* by glucose. J. Bacteriol. **174**: 3789-3799.
- Brando R. L.; Nicoli J. R.; Figueiredo A. F. 1987 Purification and characterization of a beta-galactosidase from *Fusarium oxysporum* var. *lini*. J. Dairy Sci. **70**(7): 1331-1337.
- Byrne, S. M.; Hoffman, C. S. 1993. Six git genes encode a glucose-induced adenylate cyclase activation pathway in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. J Cell Sci. **105**: 1095-1100.

- Carlson, M.; Osmond, B. C.; Botstein, D. 1981. Mutants of yeast defective in sucrose utilization. *Genetics*. **98(1)**: 25-40.
- Celenza, J. L.; Carlson, M. 1986. A yeast gene that is essential for release from glucose repression encodes a protein kinase. *Science*. **233**: 1175-80.
- D'Souza, C. A.; Heitman, J. 2001. Conserved cAMP signaling cascades regulate fungal development and virulence. *FEMS Microbiol. Rev.* **25**: 349-364.
- Davies, A. 1956. Some factors affecting lactase formation and activity in *Saccharomyces fragilis*. *J. Gen. Microbiol.* **14**: 425-439.
- Denis, C.L.; Audino, D.C. 1991. The CCR1 (SNF1) and SCH9 protein kinases act independently of cAMP-dependent protein kinase and the transcriptional activator ADR1 in controlling yeast ADH2 expression. *Mol Gen Genet.* **229(3)**: 395-399.
- Di Pierro, D.; Tavazzi, B.; Perno, C. F.; Bartolini, M.; Balestra, E.; Calio, R.; Giardina, B.; Lazzarino, G. 1995. An ion-pairing high-performance liquid chromatography method for direct simultaneous determination of nucleotides, deoxynucleotides, nicotonic coenzymes, oxypurines, nucleotides, and bases in perchloric acid cell extracts. *Anal. Biochem.* **231**: 407-412.
- Díaz, M.; Pedregosa, A. M.; de Lucas, J. R.; Torralba, S.; Monistrol, I. F.; Laborda, F. 1996. Purification and properties of β -galactosidase from *Aspergillus nidulans*. *Microbiol. SEM*, **12**: 585-592.
- Dickson, R. C.; Markin, J. S. 1980. Physiological studies of β -galactosidase induction in *Kluyveromyces lactis*. *J. Bacteriology* **142(3)**: 777-785.
- Diez, B.; Barredo, J. L. 1998. The beta-N-acetylhexosaminidase encoding gene from *Penicillium chrysogenum*. *Adva. Antibioticos* 59-61.
- Emri, T.; Bartók, G.; Szentirmai, A. 1994. Regulation of specific activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase in *Penicillium chrysogenum*. *FEMS Microbiol. Lett.* **117**: 67-70.
- Emri, T., Pócsi, I.; Szentirmai, A. 1998. Changes in the glutathione (GSH) metabolism of *Penicillium chrysogenum* grown on different nitrogen, sulphur and carbon sources. *J. Basic Microbiol.* **38**: (1) 3-8.
- Eschete, M. L.; King, J. W.; West, B. C.; Oberle, A. 1981. *Penicillium chrysogenum* endophthalmitis. *Mycopathology* **74**: 125-127.

- Espeso, E. A., Tilburn, J., Arst, H. N., Jr. and Penalva, M. A. 1993. pH regulation is a major determinant in expression of a fungal penicillin biosynthetic gene. *EMBO J.* **12**: 3947-3956.
- Fantes, P. A.; Roberts, C. F. 1973. β -galactosidase activity and lactose utilization in *Aspergillus nidulans*. *J. Gen. Microbiol.* **77**: 471-486.
- Fassatiova, O. 1979. Penészek és fonalas gombák az alkalmazott mikrobiológiában. Mezőgazdasági kiadó 1984.
- Fawcett, P. A.; Usher, J. J.; Huddleston, J. A.; Bleaney, R. C.; Nisbet, J. J.; Abraham, E. P. 1976. Synthesis of δ -(- α -aminoadipyl)cysteinyl-valine and its role in penicillin biosynthesis. *Biochem. J.* **157**: 651-660.
- Fischer L.; Scheckermann C.; Wagner F. 1995 Purification and characterization of a thermotolerant beta-galactosidase from *Thermomyces lanuginosus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **61(4)**: 1497-1501.
- Fuller, R. S.; Brake, A.; Thorner, J. 1989. Yeast prohormone processing enzyme (*KEX2* gene product) is a Ca^{2+} -dependent serine protease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **86**: 1434-1438.
- Gancedo, C.; Serrano, R. 1989. Energy-yielding metabolism. pp. 205-259. In: A. H. Rose and J. S. Harrison (eds.) *The Yeasts*, Vol. 3. Academic Press, London, UK.
- Gancedo, J. M. 1992. Carbon catabolite repression in yeast. *Eur. J. Biochem.* **206**: 297-313.
- Gargova, S., Pishtijski, I.; Stoilova, I. 1995. Purification and properties of β -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. *Biotechnol. Biotechnol. Eq.* **9**: 47-51.
- Garraway, M. O.; Evans, R. C. 1984. *Fungal nutrition and physiology*. John Wiley & Sons, New York.
- Gebelein, M.; Merdes, G.; Berger, M. R. 1992. Nucleotide preparation from cells and determination of nucleotides by ion-pair high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **577**: 146-150.
- Heredia, C. F.; de la Fuente, G.; Sols, A. 1963. Metabolic studies with 2-deoxyhexoses. I. Mechanisms of inhibition of growth and fermentation in baker's yeast. *Biochim. Biophys. Acta.* **86**: 216-223.
- Hoffman, C. S.; Winston, F. 1991. Glucose repression of transcription of the *Schizosaccharomyces pombe fbp1* gene occurs by a cAMP signaling pathway. *Genes Dev.* **5(4)**: 561-71.

- Hönlinger, C.; Kubicek, C. P. 1989. Regulation of δ -(L- α -aminoadipyl)-L-cysteinyl-D-valine and isopenicillin N biosynthesis in *Penicillium chrysogenum* by the α -aminoadipate pool size. FEMS Microbiol. Lett. **65**: 71-76.
- Hunter, D. R.; Segel, I. H. 1971. Acidic and basic amino acid transport systems of *Penicillium chrysogenum*. Arch. Biochem. Biophys. **144**: 168-183.
- Hunter, D. R.; Segel, I. H. 1973. Effect of weak acids on amino acid transport by *Penicillium chrysogenum*: Evidence for a proton or charge gradient as the driving force. J. Bacteriol. **113**: 1184-1192.
- Jacob, F.; Monod, J. 1961. Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. J. Mol. Biol. **3**: 318-356.
- Jacobson, R. H.; Zhang, X. J.; DuBose, F.; Matthews, B. W. 1994. Three-dimensional structure of β -galactosidase from *E. coli*. Nature (London) **369**: 761-766.
- Jarvis, F. G.; Johnson, M. J. 1950. The mineral nutrition of *Penicillium chrysogenum* Q176. J. Bacteriol. **59**: 51-60.
- Jones, B. E.; Bullock, J. D. 1977. Effect of 6-N-2-O-dibutyryl-cAMP on morphogenesis in mucorales. J. Gen. Microbiol. **103**: 29-36.
- Jorgensen, H. S. 1993. Metabolic fluxes of *Penicillium chrysogenum*. Ph. D. thesis, Technical University of Denmark, Lyngby.
- Konomi, T.; Herchen, S.; Baldwin, J. E.; Yoshida, M.; Hunt, N. A.; Demain, A. L. 1979. Cell-free conversion of δ -(L- α -aminoadipyl)-L-cysteinyl-D-valine into an antibiotic with the properties of isopenicillin N in *Cephalosporium acremonium*. Biochem. J. **184**: 427-430.
- Kozma, J.; Bartók, G.; Szentirmai, A. 1992. Fructose-2,6-bisphosphate level and β -lactam formation in *Penicillium chrysogenum*. J. Basic Microbiol. **33**: 27-34.
- Kuo, S. C.; Lampen, J. O. 1972. Inhibition by 2-deoxy-D-glucose of synthesis of glycoprotein enzymes by protoplasts of *Saccharomyces*: relation to inhibition of sugar uptake and metabolism. J. Bacteriol. **111**(2): 419-429.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature **227**: 680-685.
- Landman, O. E. 1954. Neurospora lactase. II. Enzyme formation in the standard strain. Arch. Biochem. Biophys. **52**: 93-109.

- Leary, N. O.; Pembroke, A.; Duggan, P. F. 1992. Improving accuracy of glucose oxidase procedure for glucose determinations on discrete analyzers. *Clin. Chem.* **38**: 298-302.
- Lester, G.; Azzena, D.; Hechter, O. 1962. Permeability and metabolism of lactose in *Neurospora crassa*. *J. Bacteriol.* **84**: 217-227.
- Loder, P. B.; Abraham, E. P. 1971. Biosynthesis of peptides containing α -aminoadipic acid and cysteine in extracts of *Cephalosporium* sp. *Biochem. J.* **123**: 477-482.
- López, J. M.; Thoms, B. 1977. Role of sugar uptake and metabolic intermediates on catabolite repression in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **129**: 217-224.
- Mark, C. G.; Romano, A. H. 1971. Properties of hexose transport systems of *Aspergillus nidulans*. *Biochim. Biophys. Acta* **249**: 216-226.
- Martín, J. F. 1992. Clusters of genes for the biosynthesis of antibiotics: Regulatory genes and overproduction of pharmaceuticals. *J. Ind. Microbiol.* **9**: 73-90.
- Martín, J. F.; Revilla, G.; Zanca, D. M.; López-Nieto, M. 1982. Carbon catabolite regulation of penicillin and cephalosporin biosynthesis. *Trends in Antibiotic Res.* **32**: 258-268.
- Marzluf, G. A.; Metzenberg, R. L. 1967. Studies of the functional significance of the transmembrane location of invertase in *Neurospora crassa*. *Arch. Biochem. Biophys.* **120**: 487-496.
- Matsumura, M.; Imanaka, T.; Yoshida, T.; Taguchi, H. 1978. Effect of glucose and methionine consumption rates on cephalosporin C production by *Cephalosporium acremonium*. *J. Ferm. Technol.* **56**: 345-353.
- McDaniel, M. L.; Weaver, D. C.; Roth, C. E.; Fink, C. J.; Swanson, J. A.; Lacy, P. E. 1977. Characterization of the uptake of the methylxanthines theophylline and caffeine in isolated pancreatic islets and their effect on D-glucose transport. *Endocrinology* **101**(6): 1701-1708.
- McGrew, B. R.; Green, D. M. 1990. Enhanced removal of detergent and recovery of enzymatic activity following sodium dodecyl sulfate-polyacrilamide gel electrophoresis: Use of casein in gel wash buffer. *Anal. Biochem.* **189**: 68-74.
- Montero, S.; de Arriaga, D.; Busto, F.; Soler, J. 1989. Induction of intracellular and extracellular beta-galactosidase activity in *Phycomyces blakesleeanus*. *Biochem. Int.* **18**(3): 637-645.

- Moss, M. O. 1987. Morphology and physiology of *Penicillium* and *Acremonium*. pp. 37-71. In: J. F. Pederdy (ed.), *Penicillium* and *Acremonium*. Plenum Press, New York.
- Nadder de Macias, M. E.; Manca de Nadra, M. C.; Strasser de Saad, A. M.; Pesce de Ruiz Holgado, A. A.; Oliver, G. 1983 Isolation and properties of β -galactosidase of a strain of *Lactobacillus helveticus* isolated from natural whey starter. J. Appl. Biochem. **5**: 275-281.
- Nielsen, J. 1995. Physiological engineering aspects of *Penicillium chrysogenum*. Ph. D. thesis, Technical University of Denmark, Lyngby.
- Nikolaev, IV. IV.; Vinetski, YP. 1998. L-Arabinose induces synthesis of secreted beta-galactosidase in the filamentous fungus *Penicillium canescens*. Biochemistry **63(11)**: 1294-1298.
- O'Sullivan, J.; Bleaney, R. C.; Huddleston, J. A.; Abraham, E. P. 1979. Incorporation of ^3H from δ -(L- α -amino[4,5- ^3H]adipyl)-L-cysteinyl-D-[4,4- ^3H]valine into isopenicillin N. Biochem. J. **184**: 421-426.
- Pall, M. L. 1977. Cyclic AMP and the plasma membrane potential in *Neurospora crassa*. J. Biol. Chem. **252**: 7146-7150.
- Pateman, J. A.; Kinghorn, J. R. 1976. Nitrogen metabolism. pp. 159-237. In: J. E. Smith and D. R. Berry (eds.), *The Filamentous Fungi*, Vol. II. Edward Arnold, London, UK.
- Paveto, C.; Epstein, A.; Passeron, S. 1975. Studies of cyclic 3',5'-monophosphate levels, adenylate cyclase and phosphodiesterase activities in the dimorphic fungus, *Mucor rouxii*. Arch. Biochem. Biophys. **169**: 449-457.
- Pedrique, M.; Castillo F. J. 1982. Regulation of β -D-galactosidase synthesis in *Candida pseudotropicalis*. Appl. and Environ. Microbiol. **43**: 303-310.
- Peterson, G. L. 1983. Determination of total protein. Methods Enzymol. **91**: 86-105.
- Pócsi, I.; Pócsi, I.; Pusztahelyi, T. 1999. Physiological and enzymological characterization of the β -N-acetylhexosaminidase of *Penicillium chrysogenum*. J. Basic Microbiol. **39**: 177-187.
- Pócsi, I.; Pusztahelyi, T.; Bogáti, M. Sz.; Szentirmai, A. 1993. The formation of N-acetyl- β -D-hexosaminidase is repressed by glucose in *Penicillium chrysogenum*. J. Basic Microbiol. **33**: 259-267.

- Pollard, H. B.; Steers, E. Jr. 1973. *Bacillus megaterium* KM β -galactosidase: Purification by affinity chromatography and characterization of the active species. Arch. Biochem. Biophys. **158**: 650-661.
- Pruess, D. L.; Johnson, M. J. 1967. Penicillin acyltransferase in *Penicillium chrysogenum*. J. Bacteriol. **94**: 1502-1508.
- Pshezhetsky, A. V.; Ashmarina, M. 2001. Lysosomal multienzyme complex: biochemistry, genetics, and molecular pathophysiology. Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol. **69**: 81-114.
- Pshezhetsky, A. V.; Potier, M. 1993. Stoichiometry of the human lysosomal carboxypeptidase-beta-galactosidase complex. Biochem. Biophys. Res. Commun. **195(1)**: 354-362.
- Pusztahelyi, T., Pócsi, I. and Szentirmai, A., 1997 b. Aging of *Penicillium chrysogenum* cultures under carbon starvation. II: protease and N-acetyl- β -D-hexosaminidase production. Biotechnol. Appl. Biochem., **25**, 87-93.
- Pusztahelyi, T., Pócsi, I., Kozma, J. and Szentirmai, A., 1997 a. Aging of *Penicillium chrysogenum* cultures under carbon starvation. I: morphological changes and secondary metabolite production. Biotechnol. Appl. Biochem., **25**, 81-86.
- Raitt, D. C., Bradshaw, R. E., Pillar, T. M. 1994. Cloning and characterisation of the cytochrome *c* gene of *Aspergillus nidulans*. Mol. Gen. Genet. **242**: 17-22.
- Rand, J. B.; Tatum, E. L.; 1980a. Characterization and regulation of galactose transport in *Neurospora crassa*. J. Bacteriol. **141**: 707-714.
- Rand, J. B.; Tatum, E. L.; 1980b. fructose transport in *Neurospora crassa*. J. Bacteriol. **142**: 763-767.
- Renno, D. V.; Saunders, G.; Bull, A. T.; Holt, G. 1992. Transcript analysis of penicillin genes from *Penicillium chrysogenum*. Curr. Genet. **21**: 49-54.
- Revilla, G.; López-Nieto, M. J.; Luengo, J. M.; Martin, J. F. 1984. Carbon catabolite repression of penicillin biosynthesis by *Penicillium chrysogenum*. J. Antibiot. **XXXVII**: 781-789.
- Revilla, G.; Ramos, F. R.; López-Nieto, M. J.; Alvarez, E.; Martin, J. F. 1986. Glucose represses formation of δ -(L- α -aminoadipyl)-L-cysteiny-D-valine and isopenicillin N synthase but not penicillin acyltransferase in *Penicillium chrysogenum*. J. Bacteriol. **168**: 947-952.

- Ring, M.; Bader, D. E.; Huber, R. E. 1988. Site-directed mutagenesis of β -galactosidase (*E. coli*) reveals that Tyr-503 is essential for activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **152**: 1050-1055.
- Rogalski, J.; Lobarzewski, J. 1995. The purification and Immobilization of *Penicillium notatum* β -galactosidase. *Acta Biotechnol.* **15(2)**: 211-222.
- Ronne, H. 1995. Glucose repression in fungi. *TIG.* **11**: 12-17.
- Ruijter, G. J. G.; Visser, J. 1997. Carbon repression in *Aspergilli*. *FEMS Microbiol. Lett.* **151**: 103-114.
- Saier, M. H. Jr. 1996. Cyclic AMP-independent catabolite repression in bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **138**: 97-103.
- Sándor, E.; Szentirmai, A.; Biró, S.; Karaffa, L. 1999. Specific cephalosporin C production of *Acremonium chrysogenum* is independent of the culture density. *Biotechnol. Techniq.* **13**: 443-445.
- Scarborough, G. A. 1970a. Sugar transport in *Neurospora crassa*. *J. Biol. Chem.* **245**: 1694-1698.
- Scarborough, G. A. 1970b. Sugar transport in *Neurospora crassa*. II. A second glucose transport system. *J. Biol. Chem.* **245**: 3985-3987.
- Scigelova, M.; Crout, D. H. G. 1999. Microbial β -N-acetylhexosaminidase and their biotechnological applications. *Enz. Microbial Technol.* **25**: 3-14.
- Scott, W. A.; Solomon, B. 1973. Cyclic 3',5' AMP phosphodiesterase of *Neurospora crassa*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **53**: 1024-1030.
- Shaikh S. A.; Khire J. M.; Khan M. I. 1999. Characterization of a thermostable extracellular beta-galactosidase from a thermophilic fungus *Rhizomucor sp.* *Biochim. Biophys. Acta* **1472(1-2)**: 314-322.
- Shukla, T. P. 1975 Galactosidase Technology. Solution to the Lactose Problem. *CRC Crit. Rev. Food Technol.* **5**: 325-356.
- Sih, C. J.; Knight, S. G. 1956. Carbohydrate metabolism of *Penicillium chrysogenum*. *J. Bacteriol.* **72**: 694-699.
- Soltero, F. V.; Johnson, M. J. 1953. Effect of the carbohydrate nutrition on penicillin production by *Penicillin chrysogenum* Q-176. *Appl. Microbiol.* **1**: 52-57.
- Soltero, F. V.; Johnson, M. J. 1954. Continuous addition of glucose for evaluation of penicillin-producing cultures. *Appl. Microbiol.* **2**: 41-44.

- Steers, E. J.; Cuatrecasas, P.; Pollard, H. B. 1971. Purification of β -galactosidase from *E. coli* by affinity chromatography. *J. Biol. Chem.* **246**: 196-200.
- Steers, E.; Cuatrecasas, P. 1974 Isolation of beta-galactosidase by chromatography. *Methods Enzymol.* **34**: 350-358.
- Terenzi, H. F.; Flawia, M. M.; Tellez-Iñon, M. T.; Torres, H. N.; 1976. The control of *Neurospora crassa* morphology by cyclic adenosine 3',5'-monophosphate and dibutyryl cyclic adenosine 3',5'-monophosphate. *J. Bacteriol.* **126**: 91-99.
- Watanabe, Y.; Kibesaki, Y.; Takenishi, S.; Sakai, K.; Tsujisaka, Y. 1979. *Agric. Biol. Chem.* **43**: 943-950.
- White, R. L.; John, E.-M. M.; Baldwin, J. E.; Abraham, E. P. 1982. Stoichiometry of oxygen consumption in the biosynthesis of isopenicillin from a tripeptide. *Biochem. J.* **203**: 791-793.
- Widmer, F.; Leuba, J. L. 1979. β -galactosidase from *Aspergillus niger*: Separation and characterization of three multiple form. *Eur. J. Biochem.* **100(2)**: 559-567.
- Wold, W. S. M.; Suzuki, I. 1973. Promotion of conidia aggregation in *Aspergillus niger* by cAMP and 5'GMP. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **55**: 824-830.
- Zhang, J.; Demain, A. L. 1992. ACV Synthetase. *CRC Crit. Rev. Biotechnol.* **12**: 245-260.
- Zimmermann, F. K.; Kaufmann, I.; Rasenberger, H.; Haussmann, P. 1977. Genetics of carbon catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*: genes involved in the derepression process. *Molec. Gen. Genet.* **151**: 95-103.
- Zonneveld, B. J. M. 1976. The effects of glucose and manganase on adenosine 3',5'-monophosphate levels during growth and differentiation of *Aspergillus nidulans*. *Arch. Microbiol.* **108**: 41-44.

7.2. Saját közlemények

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

Z. Nagy, T. Kiss, A. Szentirmai, S. Biró: β -Galactosidase of *Penicillium chrysogenum*: Production, Purification, and Characterization of the Enzyme. Protein Expression and Purification, 21(1), 24-29 (2001). Impf.: 1,569

Z. Nagy, Zs. Keresztessy, A. Szentirmai, S. Biró: Carbon source regulation of β -galactosidase in *Penicillium chrysogenum*. J. Basic Microbiol. 41(6), 351-362 (2001). Impf.: 0,613

Z. Nagy, A. Szentirmai, S. Biró: A multifunctional glycohydrolase is responsible for lactose utilisation in an industrial *Penicillium chrysogenum* strain. Előkészületben.

Előadások, poszterek

Nagy Z., Keresztessy Zs., Szentirmai A., Biró S.: Katabolit represszió vizsgálata *Penicillium chrysogenum*-ban. A Magyar Mikrobiológiai Társaság 15. Nagygyűlése, Miskolc 1998.

Nagy Z., Szentirmai A., Biró S.: Purification and properties of β -galactosidase from *Penicillium chrysogenum*. 13th International Congress of the Hungarian Society for Microbiology, Budapest 1999.

Nagy Z., Szentirmai A., Biró S.: Carbon catabolite repression of β -galactosidase biosynthesis by *Penicillium chrysogenum*. A Magyar Mikrobiológiai Társaság 2000. évi Nagygyűlése, 2000.

Nagy Z., Szentirmai A., Biró S.: Laktóz metabolizmus *Penicillium chrysogenum*-ban: mely enzim hidrolizálja a laktózt? A Magyar Mikrobiológiai Társaság 2001. évi Nagygyűlése, 2001.

Egyéb publikációk

J. Kerékgyártó, **Z. Nagy**, Z. Szirmai: Synthesis of spacer-armed carbohydrate model compounds. Carbohydrate Research, 297, 107-115 (1997). Impf.: 1,606

Z. Nagy, A. Szentirmai, A. J. Clutterbuck, S. Biró: Isolating and mapping β -galactosidase negative mutants of *Aspergillus nidulans* and *Penicillium chrysogenum*. Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica 46 (2-3), 342 (1999).

Nagy Z., A. J. Clutterbuck., Szentirmai A., Biró S.: *Aspergillus nidulans* β -galaktozidáz mutáns izolálása és térképezése, I. Magyar Mikológiai Konferencia, Budapest 1999.

8. KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

Köszönetemet szeretném kifejezni témavezetőmnek Dr. Biró Sándor egyetemi docensnek és Dr. Szentirmai Attila egyetemi tanárnak oktatásukért, szakmai irányításukért és emberi támogatásukért;

Dr. Lenkey Béla tanszékvezető egyetemi docensnek, hogy lehetővé tette és támogatta a doktori értekezésem befejezését a DE TTK Mikrobiológiai és Biotechnológiai Tanszéken;

Dr. Pócsi István egyetemi docensnek és Dr. Keresztessy Zsoltnak a szakmai segítségnyújtásért;

Prof. Dr. A. John Clutterbuck egyetemi tanárnak szakmai irányításáért, támogatásáért;

Dr. Forgács Katalinnak, Kiss Tündének, Birkó Zsuzsannának, Dr. Emri Tamásnak és Vasas Gábornak önzetlen szakmai segítségükért és baráti támogatásukért;

Dr. Mádiné Dr. Pusztahelyi Tündének az enzimológiai, Dr. Karaffa Leventének és Fekete Erzsébetnek a HPLC vizsgálatokban nyújtott segítségükért;

Tegdes Lászlónénak, Pócsi Imrének nélkülözhetetlen munkájukért és segítségükért;

Leiter Évának, Sámi Lászlónak és a tanszék valamennyi dolgozójának az önzetlen segítségükért;

a DEOEC „Mikrobiológia és Farmakológia” doktori programnak (vezetőjének Prof. Dr. Gergely Lajos intézetigazgató egyetemi tanárnak, DEOEC Mikrobiológiai Intézet) és a TEMPUS alapítványnak, hogy ösztöndíjukkal is lehetővé tették értekezésem megírását.

9. FÜGGELÉK