

ZÁRÓJELENTÉS

Az F042602 sz. ifjúsági OTKA pályázatról

Dr. Karaffa Levente

Debreceni Egyetem, TTK, Genetikai és Alkalmazott Mikrobiológiai Tanszék

Előzmények, problémafelvetés

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

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

Munkacsoportunk, mely korábban nagy termelőképeségű, imperfekt *Penicillium* és *Acremonium chrysogenum* törzseket tanulmányozott, 2000 nyarán kezdte el az *A. nidulans* kutatását. Ennek alapvető oka az ipari β -laktám termelők és az *A. nidulans* anyagcsereje közötti hasonlóság volt. Úgy gondoltuk, az alkalmazott mikrobiológia fontos kérdéseinek egy közismert modell-szervezeten történő vizsgálata jobb, alaposabb magyarázatokat eredményez majd, mintha a kevésbé ismert biológiájú termelői törzsekkel tennénk ugyanezt. Mindezek ellenére kutatásainkat a pályázat időtartamának második felében ipari jelentőségű gombákra, elsősorban a celluláz és hemicelluláz enzim termelése miatt ismert *Trichoderma reesei*-re is kiterjesztettük.

Karbon katabolit represszió gombákban

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

A szénváz lebontásának szabályozásakor a legfontosabb szempont az időegység alatt felszabadítható nettó energia mennyisége: a sejt a leggyorsabban hasznosuló szénforrást fogja felvenni és oxidálni, a lassabban hasznosuló lebontásához szükséges enzimek szintézise pedig gátlódik. A jelenséget karbon katabolikus szabályozásnak (represszió) nevezzük;

szigorúan transzkripciós szintű folyamat. Jellemzően (de nem kizárólag) a glükózzal lehet kiváltani (a „katabolikus” jelző azon idők maradványa, amikor a jelenségért a glükóz „katabolit”-jait, bomlástermékeit tartották felelősnek).

Glükóz szénforrás jelenlétében tehát azok a gének, melyek más szénforrások lebontásához szükséges enzimeket kódolnak, gátolva vannak. A mechanizmus meglétét nagyszámú mikróbában sikerült kimutatni. Eukarióták közül a *Saccharomyces cerevisiae*-ben tanulmányozták behatóan (Gancedo 1998). A fonalas gombák karbon katabolit repressziójáról azonban viszonylag kevés ismeret áll rendelkezésre, noha pl. a *Trichoderma* és *Aspergillus* törzsek számos olyan iparilag jelentős enzimet, rekombináns proteint és metabolitot állítanak elő, melyek bioszintézise glükóz represszió alatt van (Davies 1991, Kubicek 1992, Suominen és Rainikainen 1993).

A fonalas gombák karbon katabolit represszióját a *creA* gén közvetíti. Nem ismerünk olyan fonalas gombáról szóló közleményt, amely a *creA*-ortológ hiányáról tudósítana. A *creA* egy olyan Cys₂-Hys₂-típusú Zn-ujj fehérjét kódol, mely számos glükóz által represszálható gén promotéréhez képes specifikusan kötődni, meggátolva átíródásukat.

A CreA fehérje kötődéséhez a 5'-SYGGGG-3', vagy a 5'-SYGGRG-3' szekvenciákra van szükség. A *creA* nullmutánsok – ugyan extrém fenotípus mellett – de életképesek (Shroff és mtsai 1997).

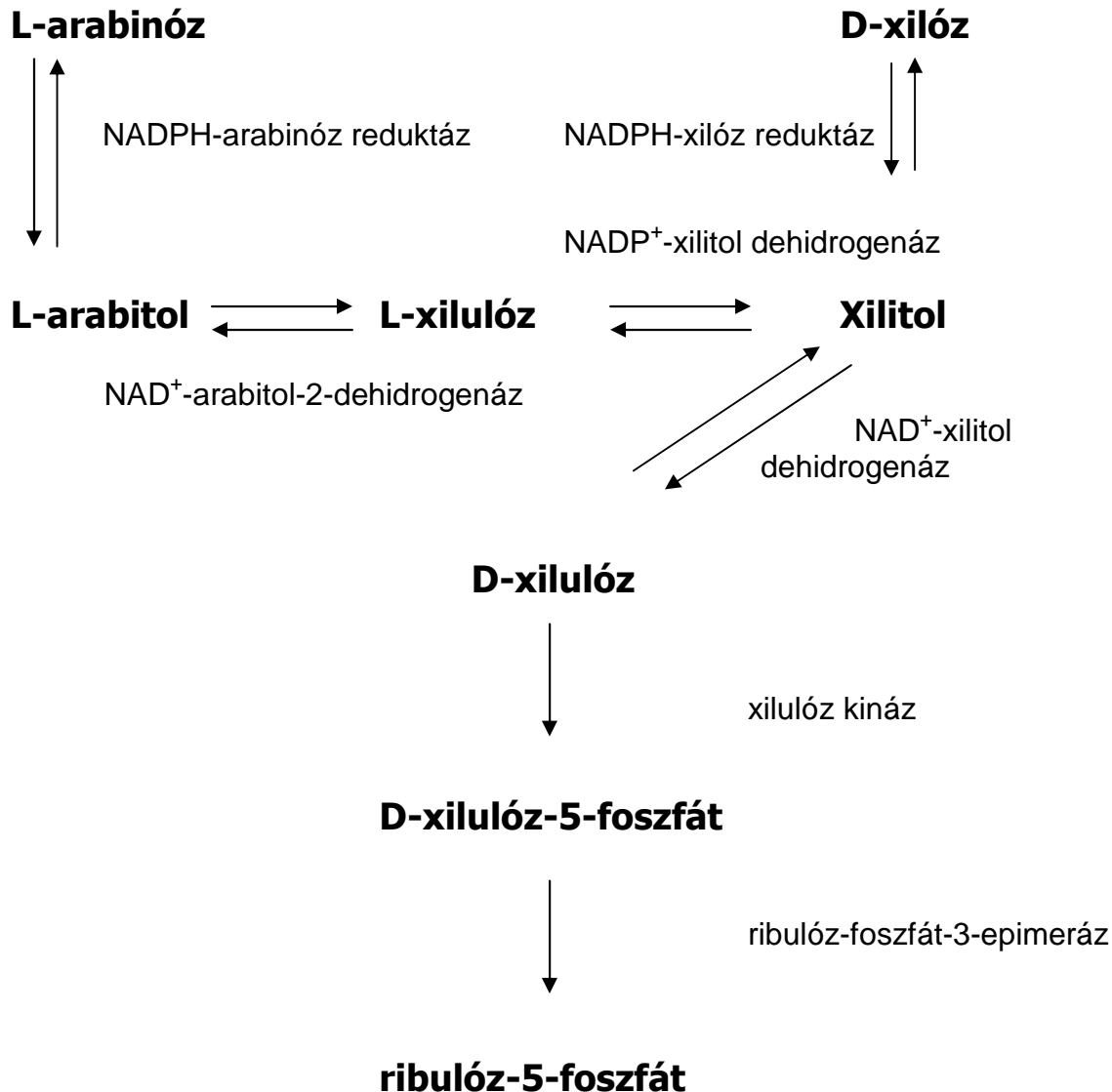
A. nidulans-ban a *creA* gén transzkripciójának mértéke a legtöbb szénforráson állandó, glükóz hozzáadására azonban ötszörösére emelkedik. A transzkriptum autoreguláció alatt áll, glükózon az indukált szint hamarosan visszaesik, újból derepresszáló szénforráson (pl. arabinóz) azonban változatlan marad. Hasonló mechanizmust mutattak ki *T. reesei*-ben is (Ilmen és mtsai 1996). A *creA* gén transzkripciós szabályzásán kívül a CreA fehérje is regulálható, részben a C-terminális specifikus végének fehérjékkel való direkt kölcsönhatása (Strauss és mtsai 1999), részben a fehérje foszforilezése révén.

Pentózek anyagcseréje gombákban

A fonalas gombák jellemzően szaprofita élőlények, így nem meglepő, hogy számos törzsük hatékony termelője a poliszacharidokat hidrolizáló enzimeknek. A poliszacharid hidrolázok egyik típusát alkotják a hemicellulolitikus enzimek, melyek a növényekben nagy mennyiségben előforduló hemicellulózok hidrolitikus hasítását képesek katalizálni. A hemicellulóz kifejezés a növényi sejtfalban a cellulózzal szorosan egybeépült nem-cellulóz jellegű poliszacharidokat takarja (Eriksson és mtsai 1990). Kémiaiilag két vagy több monoszacharid (pl. D-xilóz, L-arabinóz, D-mannóz, D-glükóz, D-galaktóz, 4-O-metil-D-glükuronsav) heteropoliszachariddá kapcsolódásával jellemezhetők; az alegységek ecetsavval, illetve p-kumársavval észter-kötésben vehetnek részt. A hemicellulózok elsődleges szerkezete a növényfajra jellemző, de egyazon növény szervei között is komoly eltérések lehetnek. A keményfák legfontosabb hemicellulóz komponense az O-acetil-4-O-metil-D-glükurono-D-xilán, mellette pedig glükomannán figyelhető meg viszonylag nagyobb mennyiségben. A puhafáknál ezzel szemben az O-acetil-D-galakto-D-glüko-D-mannán a legfőbb hemicellulóz komponens, de nagy mennyiségben fordul elő az L-arabino-D-glükurono-D-xilán is.

Viszonylag keveset tudunk a monomerek bontásának módjáról és szabályozásáról. A hemicellulóz hexózok (D-galaktóz, D-mannóz) lebontásáról sok adat áll rendelkezésre *S. cerevisiae*-re vonatkozóan (Boles és mtsai 1994), és az elmúlt években (részben általunk) a *T. reesei* és az *A. nidulans* kapcsán is születtek fontos eredmények. A pentóz anyagcsere azonban nagyon kevésbé ismert a fonalas gombákban. A D-xilóz lebontását egyes élesztőkben (*Pichia* sps., *Candida* sps.) az anaerob etanol produkció kapcsán tanulmányozták és megállapították, lebontása redukciós és oxidációs lépések révén megy végbe, szemben a baktériumoknál tapasztalható izomerizációval. *P. chrysogenum*-ban és *Aspergillus* fajokban az L-arabinóz és a D-xilóz lebontási útvonalai részlegesen megegyeznek (Witteveen és mtsai

1989, De Vries és mtsai 1994, Shi és mtsai 2000). D-xilózon és L-arabinózon nőni nem tudó *A. niger* mutáns micéliumai nagy mennyiségű intracelluláris arabitolt, illetve xilitolt halmoznak fel. Mindezen eredmények együtt azt alábbi lebontási útvonalat sugallják a D-xilóz számára: D-xilóz – xilitol – D-xilulóz – D-xilulóz-5-foszfát. Ugyanez az L-arabinóz számára: L-arabinóz – L-arabitol – L-xilulóz – xilitol – D-xilulóz – D-xilulóz-5-foszfát (**1. ábra**). Az összes redukciós lépés (cukor – poliol) NADPH-függő, míg az oxidációs lépések (poliol – cukor) NAD⁺-függőek. Mindegyik reakciót más-más enzim katalizálja.



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

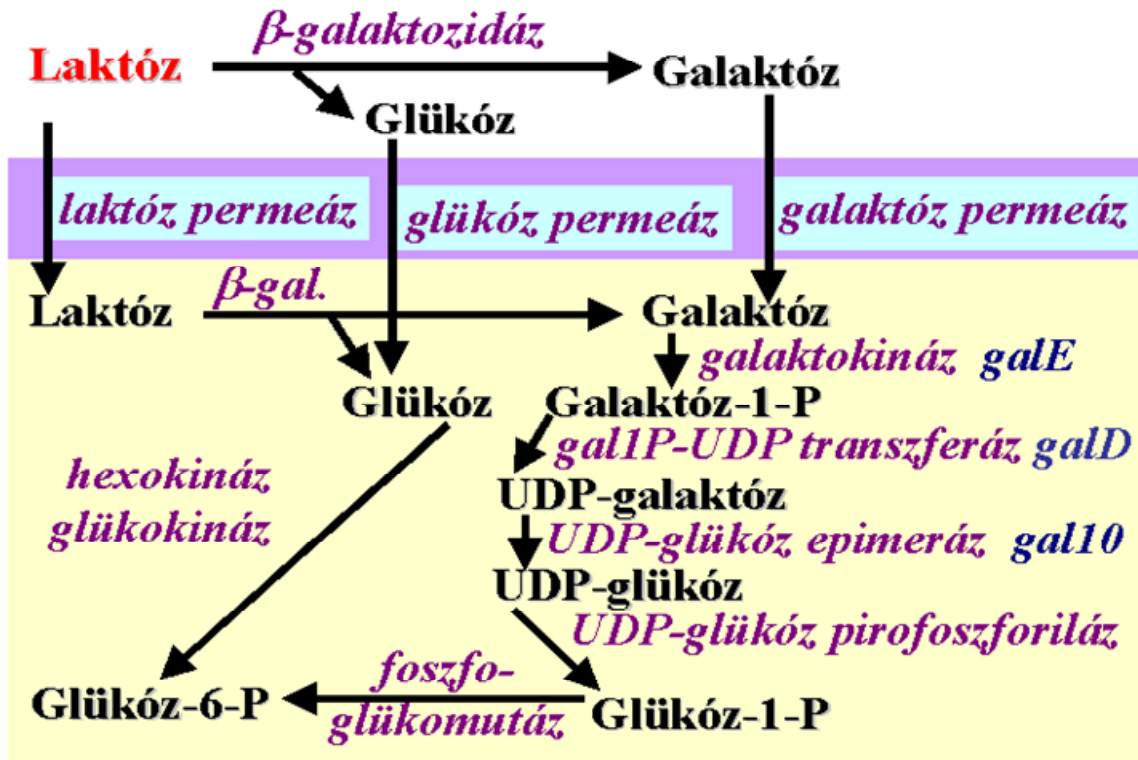
A laktóz anyagcsere és a D-galaktóz lebontás Leloir-útvonalának áttekintése

Az *Escherichia coli* laktóz lebontásának szabályozása az operon-modell miatt tankönyvi ismeretnek számít, a baktériumok laktóz anyagcsereje (Shuster és Doudoroff 1967, Chassy és Thompson 1983) azonban alapvetően különbözik az eukariótákétól.

A laktóz lebontás első lépése a glükózzá és galaktózzá történő hidrolízis, ami vagy az extracelluláris β-galaktozidáz vagy a laktóz permeáz és az intracelluláris β-galaktozidáz párhuzamos működésének eredményeként történik. Sejtfalhoz kötött, extracelluláris és intracelluláris β-galaktozidázokat egyaránt leírtak, sokszor egy fajon belül is (Diaz és mtsai

1996, Nikolaev és Vinetski 1998, Nagy és mtsai 2001a,b). A glükóz glikolitikusan, a galaktóz pedig jellemzően a Leloir-útvonalon alakul tovább (Holden és mtsai 2003).

A Leloir-útvonal részben a lebontó anyagcsere része, melyben a D-galaktóz szén- és energiaforrásként is hasznosul, de felépítő útvonalként is működik, ilyenkor változatos funkciójú és felépítésű szénhidrátok (lipopoliszacharidok, sejtfalkomponensek, exopoliszacharidok) szintézisében működik közre, mint a D-galaktóz építőelem szolgáltatója. Uborkában pl. a sztachióz – szacharóz átalakításnál játszik szerepet (Gross és Pharr 1982).



2. ábra. A laktóz anyagcsere és Leloir-útvonal általános sémája

A Leloir útvonal első enzime az ATP-függő galaktokináz (EC 2.7.1.6), mely a D-galaktózt (kizárólag C-1 pozícióban) foszforilezi. A D-galaktóz-1-foszfátra a D-galaktóz-1-foszfát uridililtranszferáz enzim (EC 2.7.7.12) egy UDP-glükórról származó UMP-csoportot helyez, vagyis glükóz-1-foszfátot és UDP-galaktózt hoz létre. Az UDP-galaktóz szubsztrátumként szolgál az UDP-galaktóz-4-epimeráz (EC 5.1.3.2) által katalizált reakciónak, ami az UDP-glükóz regenerálását eredményezi. Az UDP-glükózra az UDP-glükóz-pirofoszforiláz enzim (EC 2.7.7.9) egy pirofoszfát csoportot rak (ezáltal elvonja az UDP-glükózt a D-galaktóz-1-foszfát uridililtranszferáz általi reverzibilis reakcióból), így glükóz-1-foszfát és UTP jön létre. Az előbbi a foszfo-glükomutáz (EC 5.4.2.6) alakítja át a glikolízis közvetlen intermedierjévé, glükóz-6-foszfáttá. A Leloir-útvonal enzimei tehát a C-4 hidroxil térszerkezetét változtatják meg (epimerizáció). A laktóz anyagcsere, ezen belül a Leloir-útvonal általános vázlatát az 2. ábra szemlélteti. A Leloir-útvonal része még a D-galaktóz-mutarotáz gén illetve enzim is, mely a β -D-galaktózt alakítja át α -D-galaktózzá, még a kináz reakció előtt (Bouffard és mtsai 1994). Az *A. niger*-ből aldóz-1-epimerázként (EC 5.1.3.3) izolálták ezt az aktivitást (Kinoshita és mtsai 1981).

Új tudományos eredmények

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

A megfigyelés

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

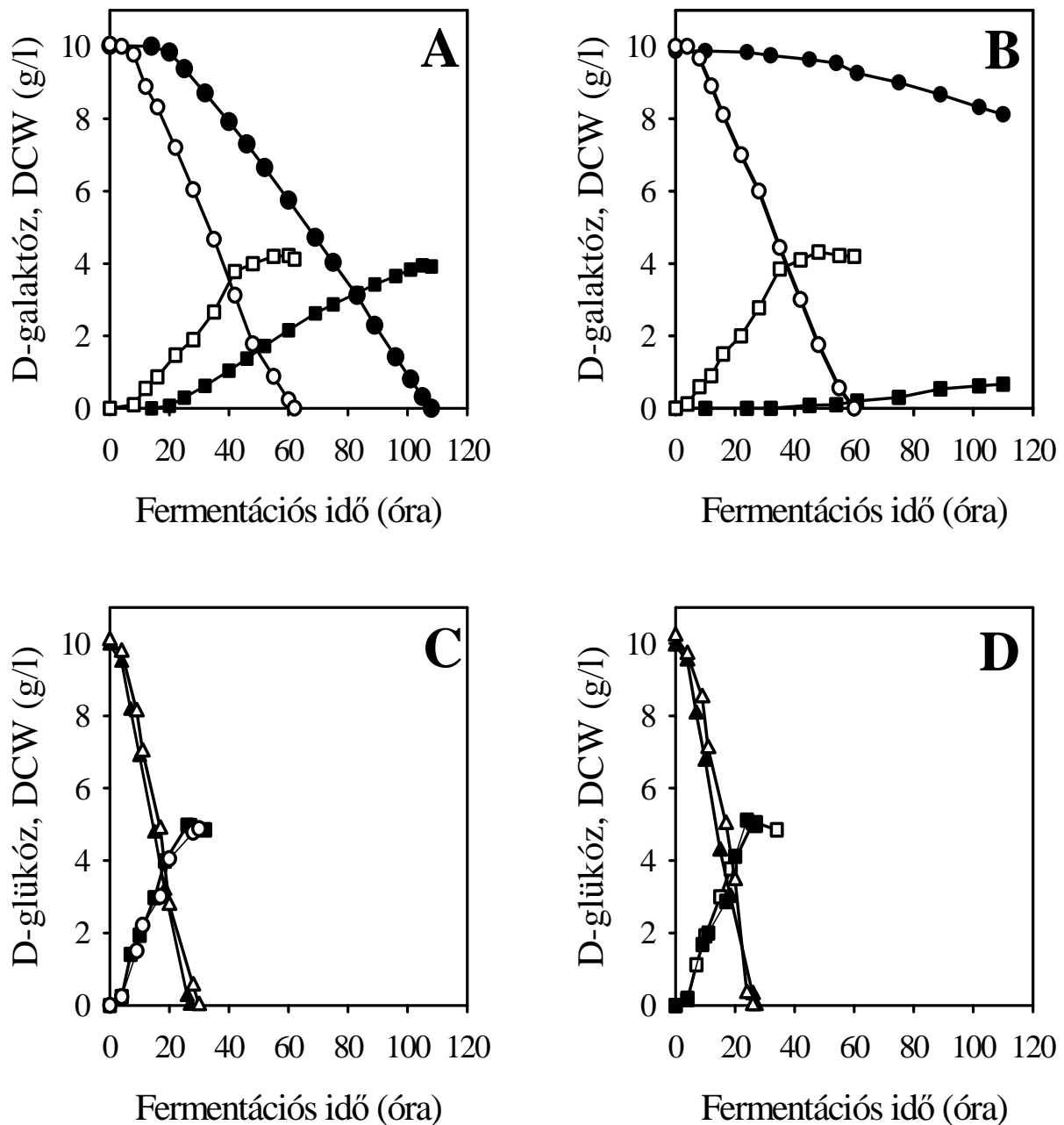
Az ellentmondás feloldása céljából tüzetesen összehasonlítottuk a korábbi szerzők és az általunk használt tenyészkörülményeket, és megállapítottuk: míg Roberts (1963) és Käfer (1977) nitrátot használt nitrogénforrásként, addig mi ammónium ionokat. Nitrátot használva kizárólagos nitrogénforrásként az *A. nidulans* galaktokináz mutáns valóban nem nőtt D-galaktózon (**3. B. ábra**), ammónium ionok használata mellett azonban a só anionjának kémiai minőségétől (szulfát, klorid, foszfát) függetlenül igen (**3. A. ábra**). Mivel Roberts (1963) 10 mM foszfáttal puffertolta táptalaját, mi is kiegészítettük ugyanennyi foszfáttal a tenyészetet, de ennek sem volt hatása a növekedésre. A tenyészet kémhatását végig pH = 6,5 értéken tartottuk (2 L-es laboratóriumi fermentort használtunk), így a két különböző nitrogénforrás által kiváltott esetleges kémhatás-változás sem lehet felelős a jelenségért. Glükóz tartalmú táptalajon a nitrogénforrás anyagi minősége (ammónium illetve nitrát ionok) nem befolyásolta a tenyészet növekedését vagy szénforrás felvételét (**3. C-D. ábra**), és ugyanezt találtuk más szénforrások (glicerol, acetát, fruktóz) esetében is. Megállapítottuk tehát, hogy a jelenség *A. nidulans*-ban a galaktóz anyagcserére specifikus, megjelenéséhez pedig a galaktokináz lókuszműködésképtelensége illetve hiánya szükséges.

Ahhoz, hogy eldönthessük, az alternatív galaktóz lebontási útvonal teljes egészében pótolni képes-e a galaktokináz enzim hiányát a *galE* mutánsban, összehasonlítottuk a vad típus és a mutáns törzs növekedési paramétereit D-galaktóz szénforráson. A kompenzáció nem volt teljes, mivel a biomassza képződés rátája a vad típusú tenyészetben közel kétszerese a *galE* mutánsban mérhetőnek, ami ugyanilyen arányú különbséget okozott a növekedési rátákban is.

Az új útvonal első köztesének azonosítása

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

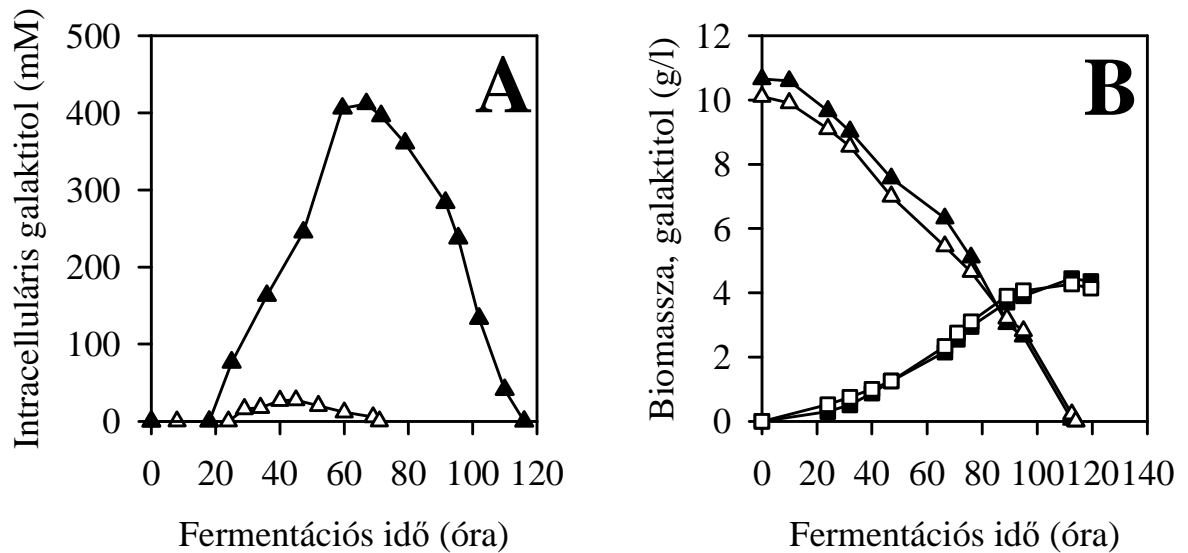
Mivel úgy gondoltuk, hogy a feltételezett intracelluláris köztes azonosítása közelebb vihet minket az alternatív D-galaktóz hasznosítási útvonal megismeréséhez, a tápközeget és a biomasszát is elemzésnek vetettük alá, olyan komponensek után kutatva, melyek kiinduláskor nem voltak jelen. Ennek eredményeként az *A. nidulans* galaktokináz mutáns biomasszájában meglepően nagy (>400 mM) koncentrációban galaktitol (dulcitol, a D-galaktóz poliolja) találtunk. A galaktitol felhalmozódás átmeneti volt, a tenyésztés végén hasznosult (**4. A. ábra**).



3. ábra. Az *A. nidulans* vad típus (üres szimbólumok) és galaktokináz mutáns (tömött fekete szimbólumok) szénforrás hasznosításának és biomassza képződésének időprofiljai. **A:** D-galaktóz és ammónium ionok. **B:** D-galaktóz és nitrát ionok. **C:** D-glükóz és ammónium ionok. **D:** D-glükóz és nitrát ionok. **Szimbólumok:** növekedés (biomassza képződés, DCW) (□, ■), D-galaktóz fogyasztás (○, ●), D-glükóz fogyasztás (△, ▲)

Jóval kisebb koncentrációban a vad típus micéliumában is találtunk felhalmozódó galaktitolt; mennyisége a tenyésztés exponenciális fázisában kezdett el nőni, a galaktóz felvétel időszakában növekedett, majd a lassuló fázis végén gyorsan felhasználódott, jelezve, a galaktitol képzésért és továbbalakításért felelős enzimek a vad típusban is megtalálhatók. Laktózon növekvő vad és galaktokináz mutáns törzsek micéliumában szintén találtunk

galaktitolt, ennek mennyisége kevesebb, kb. 75 %-a volt a galaktózon mértnek. A galaktóz és laktóz koncentrációjának (2-40 g/l értékek között) nem volt hatása a képződött galaktitol mennyiségére. Egyéb szénforrásokon (L-arabinóz, D-xilóz, acetát, D-fruktóz, D-glükóz, glicerol) való növesztés nem eredményezett intracelluláris galaktitol felhalmozódást egyik törzsben sem.



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

Szimbólumok: galaktitol koncentráció (Δ, ▲), biomassza koncentráció (□, ■)

Az intracellulárisan felhalmozódott galaktitol gyors elfogyása az *A. nidulans* galaktitol lebontásának vizsgálatára irányította a figyelmünket. Első lépésként glicerolon előnövesztett vad típusú és galaktokináz mutáns törzseket galaktitolt kizárólagos szénforrásként tartalmazó táptalajra mostunk át. A növekedés és a galaktitol felvétel mindkét törzsben ugyanakkora rátával történt. Hasonló eredmények születtek a konídiospóráról indított tenyészetekkel is (**4. B. ábra**). Megállapítottuk, az *A. nidulans* a növekedés minden fázisában képes a galaktitol hasznosítására, lebontásához nem igényli a galaktokináz enzim jelenlétét.

Az első enzimátikus lépés azonosítása

Az eddigiek során bizonyítékot szereztünk arra, hogy a galaktokináz hiánya esetén a galaktóz metabolizmusa galaktitol köztesen át megy végbe. Annak eldöntésére, hogy a törzsek rendelkeznek-e galaktitol bontó aktivitással, glicerolon előnövesztett, galaktitolra átmosott vad típusú és galaktokináz hiányos mutáns (*galE*) *A. nidulans* tenyészetek sejtmentes, dializált kivonatát használtuk enzimforrásként. Mint látható (**1. táblázat**), mindkét törzs rendelkezik galaktitol dehidrogenáz aktivitással, amely csak NAD^+ -kofaktorral működik, NADP^+ -vel nem.

De Vries és mtsai (1994) közleménye szerint egy eredetileg Clutterbuck (1981) által leírt (G094=*araA1*) és L-arabinitol dehidrogenáz hiányos fenotípussal jellemzett *A. nidulans* mutáns nem nő galaktitolon. A megfigyelést igazoltuk, majd megállapítottuk, a mutánsnak nincs galaktitol dehidrogenáz aktivitása (**1. táblázat**). Nitrogénforrásként ammónium ionokat használva azonban az *araA1* mutáns nőtt L-arabitolon (galaktitolon viszont nem), és a vad, valamint a galaktokináz hiánymutáns törzseknél ugyan kisebb, de jól mérhető L-arabinitol

dehidrogenáz aktivitást mutatott. Nitrogénforrásként nitrátot, szénforrásként L-arabitol tartalmazó táptalajon azonban nem volt sem L-arabinitol dehidrogenáz aktivitás, sem növekedés, összhangban a korábbi közleményekkel. Az *araA1* mutáns viselkedése L-arabitolon tehát nagyon hasonló volt a *galE* mutáns viselkedéséhez D-galaktózon – mindkettő nitrát tartalmú táptalajon mutatta a definiált mutáns fenotípust, ammónium ionok jelenlétében a jelleg eltűnt.

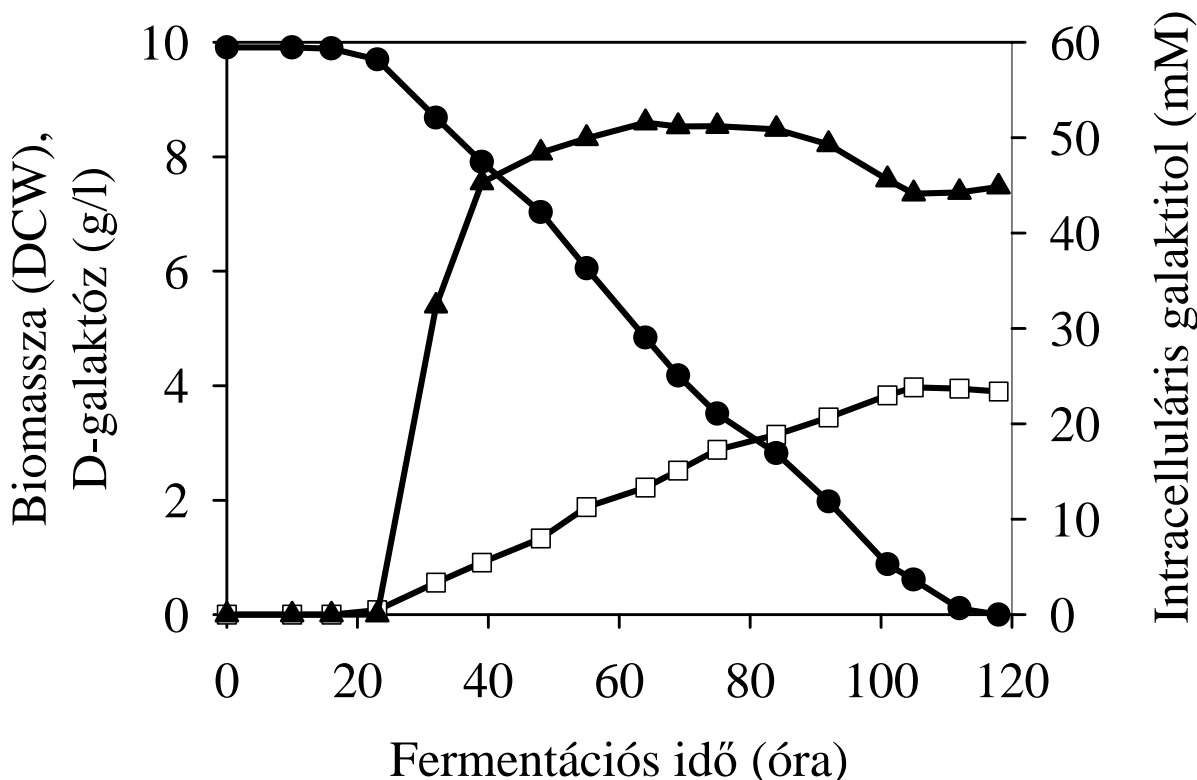
Poliol dehidrogenáz aktivitás (U / mg protein)

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

1. táblázat. Polioldehidrogenáz aktivitások *A. nidulans*-ban, galaktitol és L-arabitol szubsztrátumokon, NAD⁺ illetve NADP⁺ kofaktorok használata mellett

Az **1. táblázat** *in vitro* adatokat mutat, ezért kíváncsiak voltunk, hogy az L-arabinitol dehidrogenáz aktivitás *in vivo* is felelős-e a galaktitol lebontásáért. Ehhez az *araA1* mutánst D-galaktózon növesztettük, és kielemeztük a fermentlevet és a biomasszát (**5. ábra**).

Az *A. nidulans* L-arabinitol dehidrogenáz mutáns növekedése galaktózon valamivel lassabb volt a vad típusénál, viszont nagyjából megegyezett a galaktokináz hiánymutánsával. Az intracelluláris galaktitol a növekedés korai szakaszában megjelent, és a stacioner fázis végére érte el maximumát (~50 mM), amely jóval alacsonyabb volt a galaktokináz hiánymutánsban (~410 mM), de valamivel magasabb a vad típusban mért értéknél (~30 mM). A lényegi különbség azonban az, hogy az *araA1* mutáns nem tudta hasznosítani az intracelluláris galaktitolt, vagyis a galaktitol felhalmozódás végleges volt, nem átmeneti. A galaktóz elfogyása után mikroszkópi képen széteső sejteket láttunk, így érthető volt, hogy a galaktitol extracellulárisan is megjelent, ám még ekkor sem hasznosult. Megállapítottuk tehát, hogy az *A. nidulans* galaktitol anyagcseréjében az L-arabinitol dehidrogenáz aktivitás megkerülhetetlen.



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

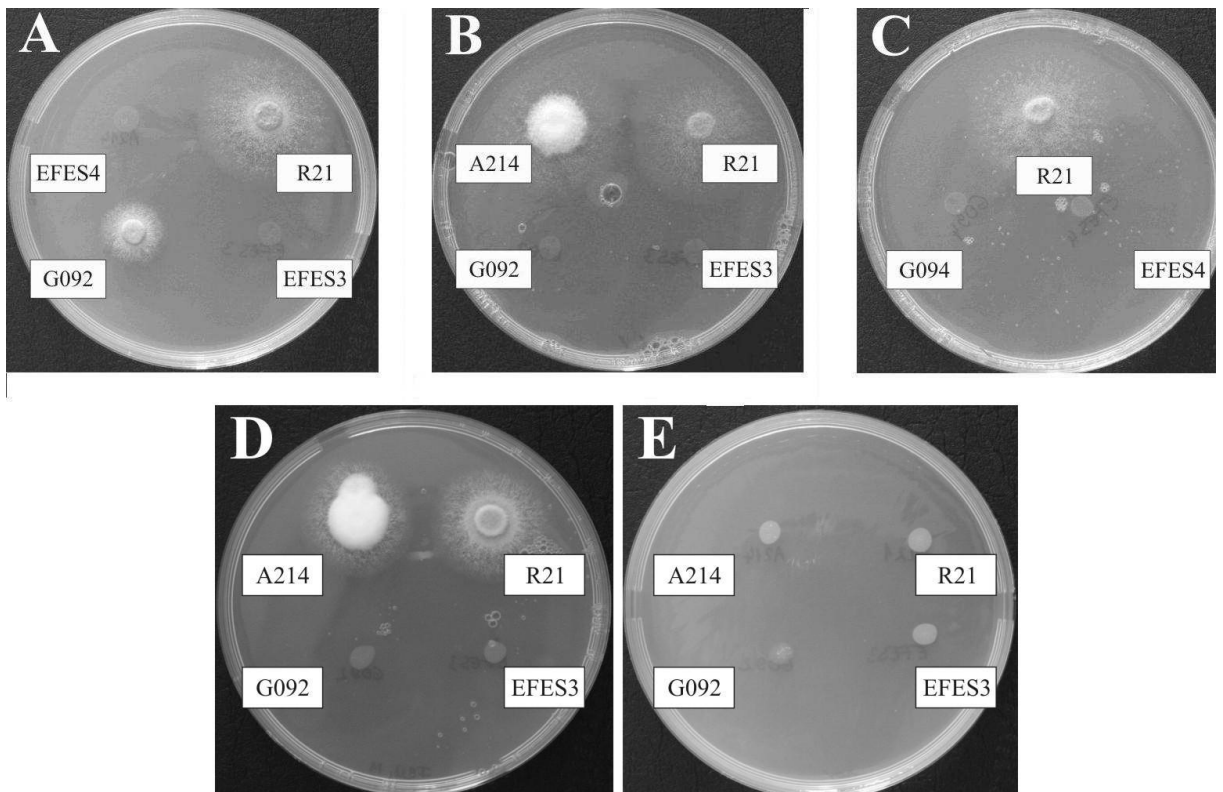
A következőkben arra kerestük a választ, hogy az alternatív galaktóz lebontási út kizárólag galaktitolon át halad-e, avagy létezik egy harmadik utas megoldás is. Ehhez egy L-arabinitol dehidrogenáz / galaktokináz kettős mutánst (*araA1/galE* = EFES4) hoztunk létre. Megközelítésünk lényege, hogy ha a Leloir-útvonalától független galaktóz lebontás kizárólag galaktitolon át megy végbe, akkor galaktokináz negatív genetikai háttérben az L-arabinitol dehidrogenáz mutáns nem fog D-galaktózon nőni. Valóban ez volt a helyzet (**6. A. ábra**); bizonyítékot szereztünk tehát arra, hogy az alternatív galaktóz lebontási út obligát köztese a galaktitol, melyet az L-arabinitol dehidrogenáz alakít tovább.

A második intermedier azonosítása

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

Galaktitolon nőtt vad típusú, galaktokináz és L-arabinitol dehidrogenáz hiánymutáns törzsek dializált sejtmentes kivonatát enzimforrásként használtuk, és az *in vitro* reakció termékeit HPLC és NMR segítségével elemeztük. Mindkét analitikai módszer a reakcióidővel lineárisan növekvő koncentrációjú szorbózt mutatott ki a vad típus és a galaktokináz mutáns esetében, más hexózt nem találtunk a reakcióelegyben. Polarimetriás elemzés révén a szorbózt L-szorbózként azonosítottuk. Rendkívül fontos megfigyelés volt, hogy az *araA1* mutáns esetében reakció végterméket nem találtunk, bármeddig is inkubáltuk az elegyet. Fordított irányba (redukció) játszódta a reakciót, a vad típus és a galaktokináz mutáns dializált sejtmentes kivonatát enzimforrásként használva, NADH (de nem NADPH) jelenlétében az L-szorbózt galaktitollá tudtuk alakítani. Ugyanez a reakció az L-arabinitol dehidrogenáz mutáns dializált sejtmentes kivonatával nem ment végbe. Mindez azt bizonyította, az L-arabinitol

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



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

A második enzimátikus lépés azonosítása

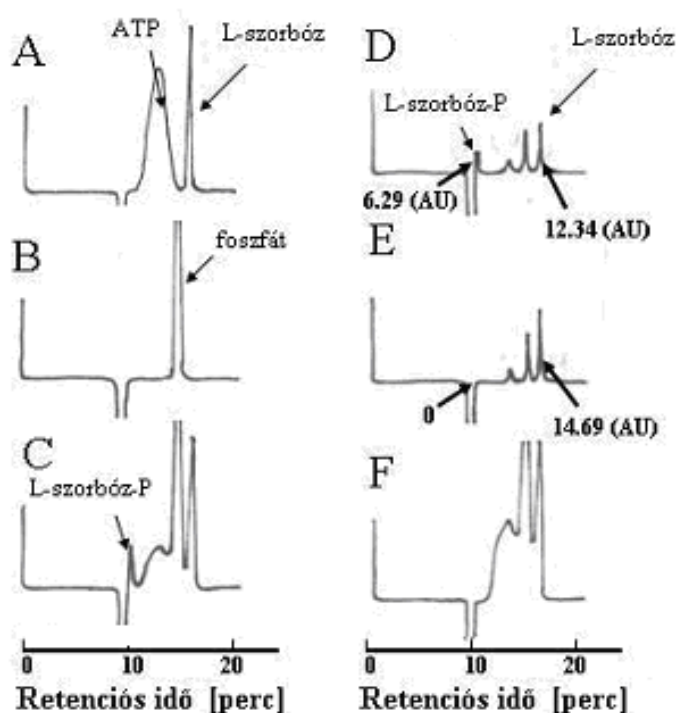
Természetesen kíváncsiak voltunk, hogyan alakul tovább a sejtben az L-szorbóz. Elorza és Arst (1971) közleménye szerint az intracelluláris L-szorbóz előbb D-szorbitollá redukálódik, majd ez D-fruktózzá alakul, ami a hexokináz általi foszforilezés révén lép be az anyagcsere fősodrába. Ahhoz, hogy bizonyítsuk, a hexokináz valóban részt vesz az L-szorbóz anyagcserében és ezáltal az alternatív D-galaktóz lebontási útvonalban, egy *A. nidulans* hexokináz hiánymutáns törzset (*frAI* = G092) elemeztünk. A mutáns valóban nem tudott sem L-szorbózon (**6. D ábra**), sem galaktitolon (**6. B ábra**) nőni.

A hexokináz esszenciális szerepét az alternatív D-galaktóz lebontási útvonalban egy *A. nidulans* galaktokináz/hexokináz kettős mutáns (*galE/frAI* = EFES3) révén bizonyítottuk. Mint a **6. A** ábra mutatja, a mutáns nem nőtt D-galaktózon, és (a várakozásnak megfelelően) galaktitolon (**6. B ábra**) és L-szorbózon (**6. D. ábra**) sem. Más szénforrásokon (glükóz, glicerol, acetát) a mutáns törzsek vad típusként viselkedtek.

Elorza és Arst (1971) közleménye értelmében a hexokináznak közvetett szerepe van az L-szorbóz anyagcserében, hiszen *de facto* a D-fruktózt foszforilezi. Mivel azonban a hexokináz széles szubsztrátspecificitású enzim (Puri és mtsai 1988), megvizsgáltuk, képes-e az L-szorbózt közvetlenül foszforilezni. Ehhez vad típusú, L-arabinitol dehidrogenáz

hiánymutáns (*ara1*), galaktokináz hiánymutáns (*galE*) és hexokináz hiánymutáns (*fra1*) törzseket fruktózon növesztettünk, és a dializált sejtmentes kivonatot enzimmorrásként használtuk az L-szorbóz *in vitro* foszforilezéséhez. Az enzimreakciót a galaktokináz aktivitás mérésére általunk kifejlesztett HPLC-alapú módszer változatával követtük nyomon. Mint a **7. C ábra** mutatja, a vad, *ara1* és *galE* törzsek ATP-függő módon foszforilezték az L-szorbózt. A reakció termékét ^{31}P NMR-rel L-szorbóz-foszfátként azonosítottuk. További bizonyítékot jelentett, hogy a foszforilált termék alkalikus foszfátáz enzimmel való kezelését követően az L-szorbóz-foszfát eltűnt, viszont sztöchiometrikus mennyiségben megnőtt az elegyben található L-szorbóz mennyisége (**7. D, E ábra**).

Az *fra1* hiánymutáns törzs sejtmentes kivonatát azonban nem tudtuk az L-szorbóz foszforilezéséhez enzimmorrásként használni, mivel még elnyújtott inkubációs idő alatt sem keletkezett L-szorbóz-foszfát (**7. F ábra**). Bizonyítékot szereztünk tehát arra, hogy – legalábbis *in vitro* – a hexokináz képes közvetlenül foszforilezni az L-szorbózt.



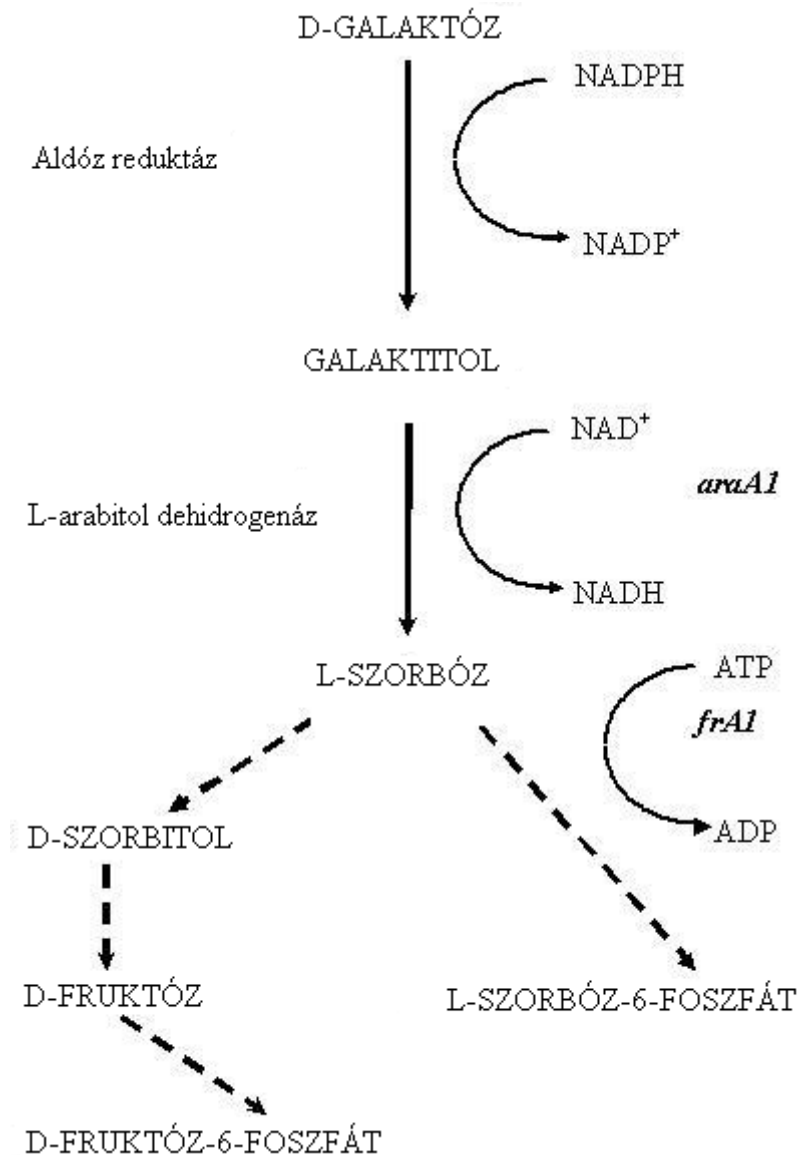
7. ábra. Az L-szorbóz foszforilezésének HPLC-kromatogramjai *A. nidulans*-ban. **A:** ATP és L-szorbóz. **B:** sejtmentes kivonat. **C:** A hexokináz reakció L-szorbóz szubsztrátummal, az *A. nidulans galE* mutáns dializált, sejtmentes kivonatát használva. **D:** Az L-szorbóz-6-foszfát tartalmú elegy alkalikus foszfátázzal való kezelése 0 h időpillanatban. **E:** Az L-szorbóz-6-foszfát tartalmú elegy alkalikus foszfátázzal való kezelése, 3 h időpillanatban. **F:** A hexokináz reakció L-szorbóz szubsztrátummal, az *A. nidulans fra1* mutáns dializált, sejtmentes kivonatát használva 6 h után. AU: arbitrárius egység (Arbitrary Unit)

Hogyan tovább, L-szorbóz?

Az L-szorbóz közel negyven éve szerepel olyan cukorként a szakirodalomban, melyet az *A. nidulans*, bár képes felvenni és metabolizálni, egyedüli szénforrásként nem tud a növekedéséhez felhasználni (Roberts 1963, Elorza és Arst 1971). Néha kifejezetten toxikusnak írták le (MacCabe és mtsai 2003). Ezért volt meglepő az a megfigyelés, miszerint a hexokináz aktivitással rendelkező *A. nidulans* törzsek képesek L-szorbózon nőni mind szilárd, mind folyékony táptalajon. Az idézett közleményekben megadott illetve az általunk

használt tenyészkörülmények összevetése során kiderült, ebben az esetben is a táptalaj nitrogénforrásának kémiai minősége a meghatározó: L-szorbózt és nitrát ionokat tartalmazó AMM táptalajon nincs növekedés (6. E ábra), viszont az L-szorbózt és ammónium ionokat tartalmazón igen (6. D ábra). Tudományos magyarázatot pillanatnyilag nem tudunk adni a jelenségre, csupán azt jegyezzük meg, hogy az L-szorbóz hasznosítás a *galE* mutáns D-galaktózon és az *araA1* mutáns L-arabitolon való növekedése után a harmadik olyan eset, ahol egy szénforrás lebontásának képességét a nitrogénforrás anyagi minősége determinálja.

Mint említettük, Elorza és Arst (1971) egy L-szorbóz → D-szorbitol → D-fruktóz lebontási útvonalat írtak le. Mivel saját eredményeink szerint az L-szorbózt a hexokináz közvetlenül képes foszforilezni (7. ábra), nem zárható ki, hogy az L-szorbóz-6-foszfát izomerizálódik fruktóz-6-foszfáttá, sőt a két útvonal akár párhuzamosan is működhet (8. ábra).



8. ábra. A redukív D-galaktóz lebontási útvonal vázlata *A. nidulans*-ban. A szaggatott nyilak a lehetséges alternatív útvonalakat jelölik

Eredményeinket összefoglalva, genetikai és biokémiai bizonyítékokat szereztünk egy alternatív (redukív) D-galaktóz lebontási útvonal léteéről *A. nidulans*-ban, melynek során a D-

galaktóz először galaktitollá redukálódik, majd L-szorbózzá oxidálódik, s melyben az L-arabitol dehidrogenáz és a hexokináz enzimek esszenciális szerepet játszanak. Mint a felsorolásból is látszik, még nem azonosítottuk a galaktitol képződésért felelős enzimet. Az *A. nidulans* dializált, sejtmentes kivonata ugyan – szigorúan NADPH, és nem NADH jelenlétében – katalizálta a D-galaktóz galaktitollá történő redukcióját, valamint NADP⁺ és nem NAD⁺ jelenlétében a galaktitol → D-galaktóz oxidációt, sajnos azonban nem ismerünk olyan *A. nidulans* mutánst, mely a fenti aktivitás keletkezésében lenne „loss-of-function”. Ennek az is oka lehet, hogy a fonalas gombák genomjában nem egy, hanem legalább kettő, de inkább még több aldóz reduktáz gén van jelen (Hasper és mtsai 2000).

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

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

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

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

Egyenlőre nehéz megítélni, mennyire jellemző a reduktív D-galaktóz lebontás a gombákra vagy tágabb értelemben az élőlényekre. Az útvonal eddig azonosított enzimeit

általánosan elterjedtek. További érv, hogy az útvonal az *A. nidulans*-tól rendszertanilag viszonylag távol álló *T. reesei*-ben is kimutatható volt.

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

B) A karbon katabolit represszió és a specifikus növekedési ráta kapcsolata *A. nidulans*-ban

A specifikus növekedési ráta bármely sejt/mikróbatenyészet alapvető paramétere, mely döntő hatással van az anyagcserére. Noha jelentőségét korán felismerték, a specifikus növekedési ráta hatását is figyelembe vevő vizsgálati módszerek mégsem terjedtek el a laboratóriumi gyakorlatban. Ennek legfőképpen technikai okai vannak: a növekedési ráta beállítását lehetővé tevő folytonos tenyészetek fenntartása viszonylag bonyolult fermentációs technika. Munkacsoportunk azonban régóta végez folytonos tenyésztésen alapuló kísérleteket, így lehetőség nyílt az egyik legismertebb és legfontosabb szabályozási mechanizmus, a karbon katabolit represszió működésének a specifikus növekedési ráta szempontjából történő tanulmányozására. A fermentációs iparban ugyanis sok mikrobiális metabolit kifejezetten lassan növekedő tenyészet állít elő, sőt a termelésben dolgozó szakemberek sokszor meg is fogalmazzák, hogy az alacsony növekedési ráta számos gén illetve géncsoport kifejeződését derepresszálja. Kísérletes bizonyítékkal azonban eddig senki nem állt elő.

A modell-aktivitás

Korábbi tanulmányaink során (Fekete és mtsai 2002) bizonyítékot szereztünk arra, hogy az intracelluláris béta-galaktozidáz aktivitás képződése CreA-függő karbon katabolit represszió alatt áll. Mivel az enzim aktivitása gyorsan és egyszerűen mérhető, ezt választottuk vizsgálataink modelljéül.

Kontroll-aktivitások

A CreA-függő karbon katabolit represszió által szabályozott béta-galaktozidáz mellett olyan enzimek aktivitását kívántuk tanulmányozni, melyek képződése független a *creA* gén termékétől. Az első az izocitrát liáz volt: az enzim élettani szerepe az izocitromsav hasítása szukcinátra és glioxalátra a glioxiszómákban, az un. glioxálsav-ciklus működése során. Glükózon az izocitrát liáz aktivitás nem jelenik meg, de ennek egy CreA-független mechanizmus az oka: a fehérjét egy glükóz által aktiválódó proteáz eliminálja. A másik enzim a galaktokináz, mely a D-galaktóz lebontás Leloir-útvonalának első enzime; szerepe a D-galaktóz ATP felhasználásával történő foszforilezése galaktóz-1-foszfáttá. A galaktokináz gyakorlatilag konstitutív enzim, aktivitása glükózon és glicerinen állandó, csupán D-galaktóz és L-arabinóz általi, kismértékű indukció révén szabályozódik. A két enzim aktivitásának szénforrás-függését vad típusban illetve karbon katabolit derepresszált mutánsban mutatja a **2.**

táblázat. Az eredményekből kitűnik, hogy mindkét aktivitás keletkezése független a CreA géntermék jelenlététől, így alkalmasak kontroll vizsgálatokra.

Törzs	Enzim- aktivitás U (mg protein) ⁻¹	Szénforrás				
		D-galaktóz	laktóz	acetát	glicerol	D-glükóz
Vad típus	izocitrát liáz	0,004	0,003	0,55	0,004	0,004
	galaktokináz	0,320	0,155	0,130	0,140	0,120
creAΔ4	izocitrát liáz	0,004	0,004	0,69	0,004	0,004
	galaktokináz	0,290	0,185	0,145	0,178	0,140

2. táblázat. Az izocitrát liáz és a galaktokináz aktivitások szénforrás-függése vad típusú és karbon katabolit derepresszált mutáns *A. nidulans* tenyészetben

A vad típusú *A. nidulans* intracelluláris béta-galaktozidáz aktivitása glükózon nem mérhető, míg a karbon derepresszált mutáns törzsekben konstitutív alapaktivitást mutattunk ki ugyanezen a represszálo szénforráson (Fekete és mtsai 2002). Munkahipotézisünk értelmében a gyors növekedési sebesség (magas növekedési ráta) mellett a CreA-függő szabályozás alatt álló béta-galaktozidáz aktivitás képződése represszált lesz, míg alacsony növekedési rátán a konstitutív alapaktivitás meg fog jelenni.

A vad típusú *A. nidulans* tenyészetből a magas növekedési rátákon ($D = 0,095 \text{ h}^{-1}$; $D = 0,068 \text{ h}^{-1}$) nem tudtunk béta-galaktozidáz aktivitást mérni, azonban $D = 0,045 \text{ h}^{-1}$ értéknél az aktivitás megjelent, a legalacsonyabb növekedési rátán ($D = 0,015 \text{ h}^{-1}$) pedig ugyanazt az értéket mértük, amit a karbon derepresszált mutáns törzsekben batch tenyészetben glükózon ($0,12 \pm 0,01 \text{ U / mg protein}$; **3. táblázat**).

Törzs	Enzimaktivitás	Hígítási ráta (= specifikus növekedési ráta; h^{-1})			
		D = 0,095	D = 0,068	D = 0,045	D = 0,015
Vad típus	β -galaktozidáz	< 0,001	< 0,001	0,110	0,170
creAΔ4	β -galaktozidáz	0,191	0,189	0,184	0,194

3. táblázat. béta-galaktozidáz aktivitás a növekedési ráta függvényében, glükóz-limitált kemosztát tenyészetekben, vad típusú és karbon katabolit derepresszált *A. nidulans* tenyészetekben

A folytonos fermentációkat az *A. nidulans creA* nullmutánsal megismételve minden hígítási ráta értéken mérési hibán belül ugyanazt az aktivitási értéket kaptuk, amit batch

tenyészetben glükózon, a vad típusnál pedig $D = 0,015 \text{ h}^{-1}$ hígítási rátájú kemosztátban, glükózon (**3. táblázat**). Az eredmények alátámasztják a béta-galaktozidáz enzim glükóz általi szabályozásáról eddig elmondottakat. Látható, hogy kellően alacsony ($D = 0,015 \text{ h}^{-1}$) specifikus növekedési rátánál a béta-galaktozidáz alapaktivitás képződése még D-glükóz jelenlétében is teljesen mentesül a CreA-függő karbon katabolit represszió hatásától.

Kontroll aktivitások képződése folytonos tenyészetekben

Annak eldöntésére, hogy a fenti eredmények specifikusak-e a CreA-függő karbon katabolit represszióra, a két kontroll intracelluláris enzim (izocitrát liáz és galaktokináz) aktivitásait is meghatároztuk mindegyik folytonos tenyészetből. Mint a **4. táblázat** adatai mutatják, sem a specifikus növekedési rátának, sem a *creA* lókuszt jelenlétének nem volt hatása az aktivitási értékekre D-glükóz szénforráson.

Törzs	Enzimaktivitás	Hígítási ráta (= specifikus növekedési ráta; h^{-1})			
		D = 0,095	D = 0,068	D = 0,045	D = 0,015
Vad típus	izocitrát liáz	0,003	0,003	0,003	0,003
	galaktokináz	0,181	0,162	0,158	0,178
creA Δ 4	izocitrát liáz	0,003	0,003	0,003	0,003
	galaktokináz	0,193	0,172	0,161	0,180

4. táblázat. Az izocitrát liáz és a galaktokináz enzimek aktivitásának alakulása a növekedési ráta függvényében, glükóz-limitált kemosztát tenyészetekben, vad típusú és karbon derepresszált *A. nidulans* tenyészetekben

Eredményeink bizonyítják, hogy a glükóz kiváltotta, CreA által közvetített karbon katabolit represszió hatása leküzdhető, ha a sejteket kellően alacsony növekedési rátán tenyésztjük, vagyis *A. nidulans*-ban a specifikus növekedési ráta determinánsa a karbon katabolit represszióknak. Jelenleg még nem ismerjük kellőképpen azt a mechanizmust, mely a glükóz szignált a karbon katabolit represszióhoz kapcsolja, így megfigyelésünket nem tudjuk egy meghatározott molekuláris lépéshez kötni. Mivel azonban az extracelluláris D-glükóz koncentráció minden kemosztát tenyészet esetében többé-kevésbé azonos volt, a külső glükóz szint valószínűleg nem játszik szerepet. Ugyanez mondható el a glükóz transzportjáról is: a szubsztrátumok felvétele mindig függ a külső koncentrációtól, így a glükóz felvétel sem lehet kiváltó lépése a karbon katabolit represszióknak. Ezt erősítik meg azon korábbi megfigyelések, miszerint a D-glükóz nem-metabolizálható analógjai nem tudnak karbon katabolit repressziót kiváltani (Strauss és mtsai 1999).

Feltételezésünk szerint a glükóz lebontás valamely intermedierjének steady-state koncentrációjában növekedési ráta-függő módon bekövetkező változás állhat a jelenség hátterében. *Saccharomyces cerevisiae*-vel és *A. niger*-rel végzett tanulmányok azt mutatták, hogy a glikolízis két intermedierje, a glükóz-6-foszfát és a fruktóz-6-foszfát steady-state koncentrációja növekedési ráta függő, ráadásul az alacsonyabb növekedési ráta értékeknél mutatnak kisebb értékeket. A glükóz-6-foszfát karbon katabolit represszióban betöltött szerepére utalhat az is, hogy a 2-deoxiglükóz (melyet a sejt képes foszforilezni, de tovább

metabolizálni nem) képes karbon repressziót kiváltani (Strauss 1999), míg a glükokináz és hexokináz enzimeket kódoló gének egyidejű kiütése represszálo szénforrásokon is karbon derepressziót eredményez *A. nidulans*-ban. A glükóz-6-foszfátot a szabályozási mechanizmus középpontjába helyező modell azt is megmagyarázná, miért képesek karbon katabolit repressziót kiváltani olyan nem-glikolitikus szénforrások mint pl. a glicerol: a glükóz-6-foszfát a glikoneogenetikus útnak is köztése, így megfelelő körülmények között belőlük is keletkezhet kritikus koncentrációjú szignál molekula.

Munkánknak metodikai vonatkozásai is vannak. Mikrobiológiai laboratóriumokban sokszor a rázott lombik számít a legfontosabb tenyésztési technikának. A fenti eredmények tükrében ez a technika mindenképpen mellőzendő a karbon represszió tanulmányozása során, hiszen nem tudhatjuk, hogy az egyes szénforrásokon mennyi a kritikus, már derepressziót okozó növekedési ráta. Hasonlóképpen, a különböző fizikai és kémiai paraméterek (kémhatás, hőmérséklet, táptalaj-komponens koncentráció) karbon katabolit represszióra gyakorolt hatása is kritikusán szemlélendő, hiszen ezen paraméterek is végső soron a növekedési rátára hatnak. Az előnövesztett, majd friss tápfolyadékba áthelyezett micéliumok vizsgálata is óvatosságot igényel, mivel fontos, hogy a szénforrás felvételi rátája állandó (összehasonlítható) legyen a különböző tenyészetekben. Egyértelműen kijelenthetjük tehát, hogy a karbon katabolit represszió mechanizmusának tanulmányozására a kemosztát típusú folytonos tenyészetek jelentik a legjobb, legbiztosabb módszert.

C) A laktóz permeáz és a béta-galaktozidáz gének vizsgálata *A. nidulans*-ban

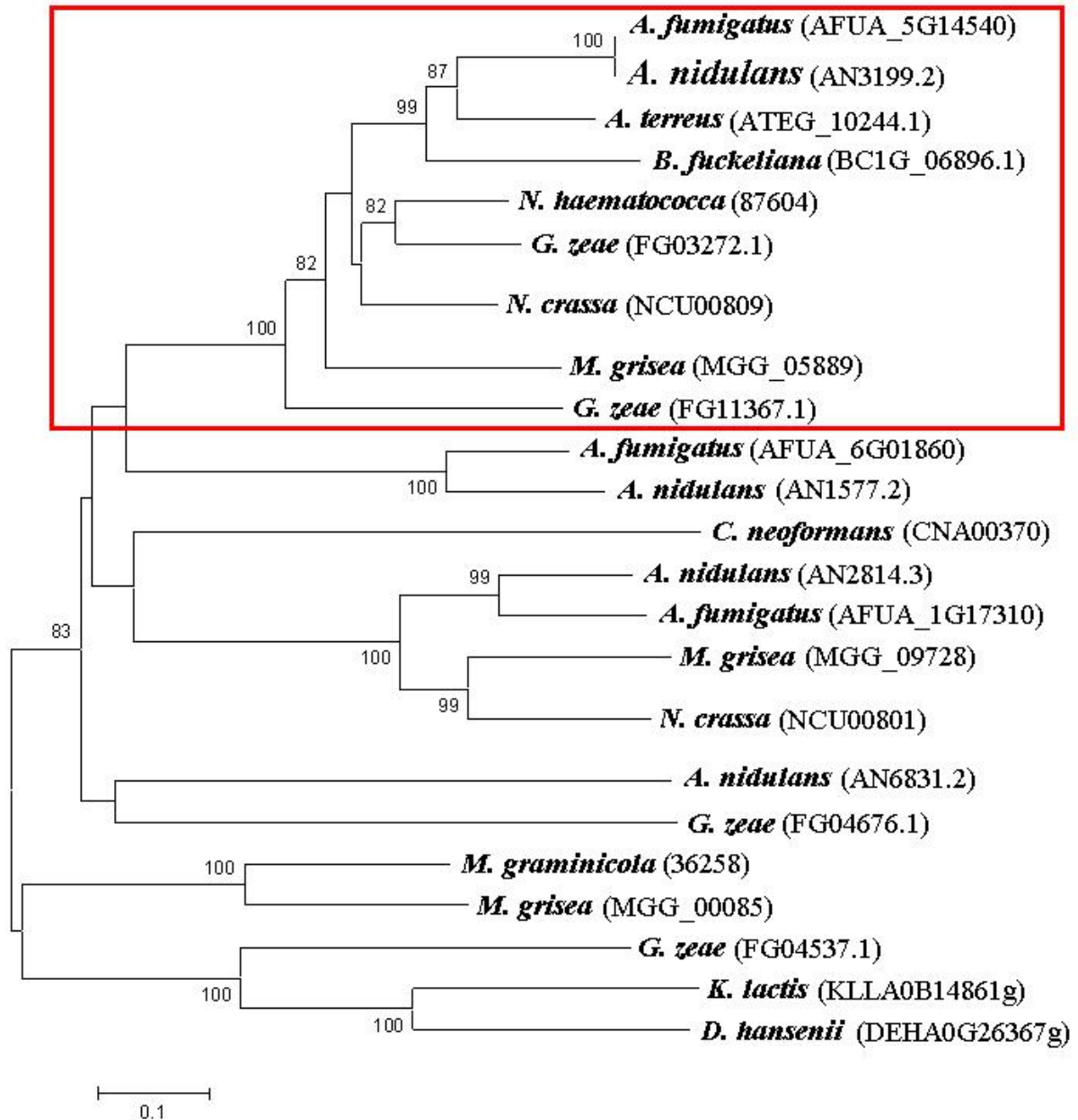
A laktóz permeáz-béta galaktozidáz génklaszter azonosítása

Aminosav szekvenciájának ismeretében viszonylag könnyen meg lehet egy fehérjéről állapítani, hogy a cukor transzporterek közé tartozik-e, a ténylegesen transzportált cukor azonosítása azonban nehéz feladat. A laktóz permeáz azonosításához először az NCBI genom adatbázisban végeztünk TBLASTN analízist. Ennek eredménye 11 db szekvencia lett, melyek BLAST valószínűsége $6e^{-94}$ és $2e^{-46}$ közé esett. Más gombafajokból származó feltételezett szekvenciákkal egyetemben Neighbour Joining (NJ) alapú filogenetikai törzsfát készítettünk belőlük, mely több jól alátámasztott (bootstrap koeficiens $> 75\%$) csoportra (clade) oszlott. Az egyik csoport a *Kluyveromyces lactis* és *K. marxianus* élesztők jól ismert laktóz permeáz szekvenciáit is tartalmazta, ezért azt gondoltuk, ez a clade tartalmazza majd az *A. nidulans* ortológot is. Mivel azonban négy *A. nidulans* szekvencia is ebbe a clade-be esett, lehetetlen volt megmondani, hogy közülük melyik (vagy melyikek) a ténylegesen laktózt transzportáló permeáz(ok). Másfajta stratégia kellett tehát a laktóz permeáz azonosításához.

K. lactis-ban a *LAC12* lókuszt közvetlenül a *LAC4* lókuszt mellett található 5' irányba. A *LAC4* egy GH2-családban (GH = glikozid hidroláz) tartozó béta-galaktozidáz enzimet kódoló gén; a két gén közös, kétirányú promoterral rendelkezik. Feltételeztük, hogy a két gén ezen kapcsolata megőrződött az evolúció során, vagy legalábbis fizikailag közel maradtak egymáshoz. Megvizsgáltuk tehát, hogy található-e valamelyik laktóz permeáz-jelölt közelében egy GH2 családba tartozó hidroláz. Egy ilyet találtunk; a VI. kromoszóma 52. kontigjának 3' végén n lévő AN 3199.2 szekvenciától nem messze izoláltuk a AN3201.3 jelű gént, mely ugyan az 53. kontigon volt, de ugyanazon a kromoszómán.

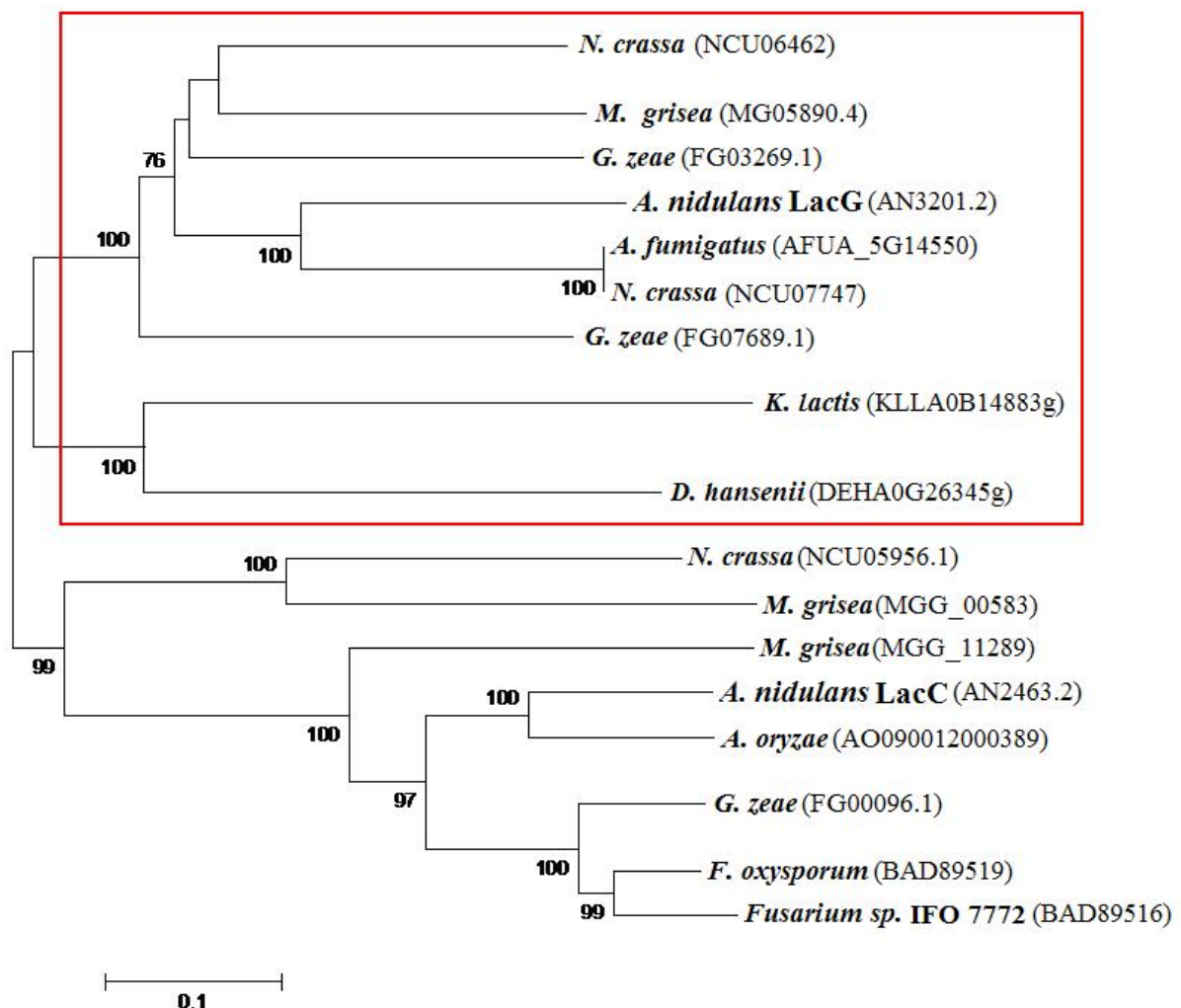
Mivel az *Aspergillus* az egyik legfiatalabb gombanemzetség, feltételeztük, hogy a fenn jellemzett szinténia más, régebbi nemzetségekben is megőrződött. Megvizsgáltuk tehát, hogy az AN 3199.2 szekvencia ortológjai genombeli elhelyezkedésük alapján szinteniát mutatnak-e valamely béta-galaktozidázzal más gombákban. Ezért több *Aspergillus*-faj, a *Neurospora crassa*, a *Magnaporthe grisea*, a *Botryoploidia fuckeliana*, a *Gibberella zeae*, a *Nectria haematococca*, a *Mycosphaerella graminicola* és a *Trichoderma reesei* adatbázisában is TBLASTN vizsgálatot végeztünk az AN 3199.2 és az AN 3201.3-re vonatkozóan. Az

eredményeket a **8. ábra** mutatja. A szintenikus klaszter megmaradt *A. terreus*-ban, *A. fumigatus*-ban, *N. crassa*-ban, *B. fuckeliana*-ban, *M. grisea*-ban, *N. haematococca*-ban és *M. graminicola*-ban. Más gombafajokban más volt a helyzet: a két gén ugyanazon a kontigon van *G. zeae*-ban, de három, ismeretlen funkciójú gén választja el őket, és ugyanabba az irányba íródnak át. *A. clavatus*-ban a két gént különböző, klasztereződést kizáró pozícióban találtuk. Végezetül, az *A. niger*, *A. oryzae* és *T. reesei* fajokban nem találtunk homológ géneket; azok a fehérjék, melyek valamilyen szintű hasonlóságot mégis mutattak, a fa eltérő klasztereiben bukkantak fel. A *M. graminicola* esetét leszámítva az összes fehérje, melynek a génje a GH2 glikozidáz génnel klasztereződött, ugyanazon csoportba került, mint a 3199.2 gén.

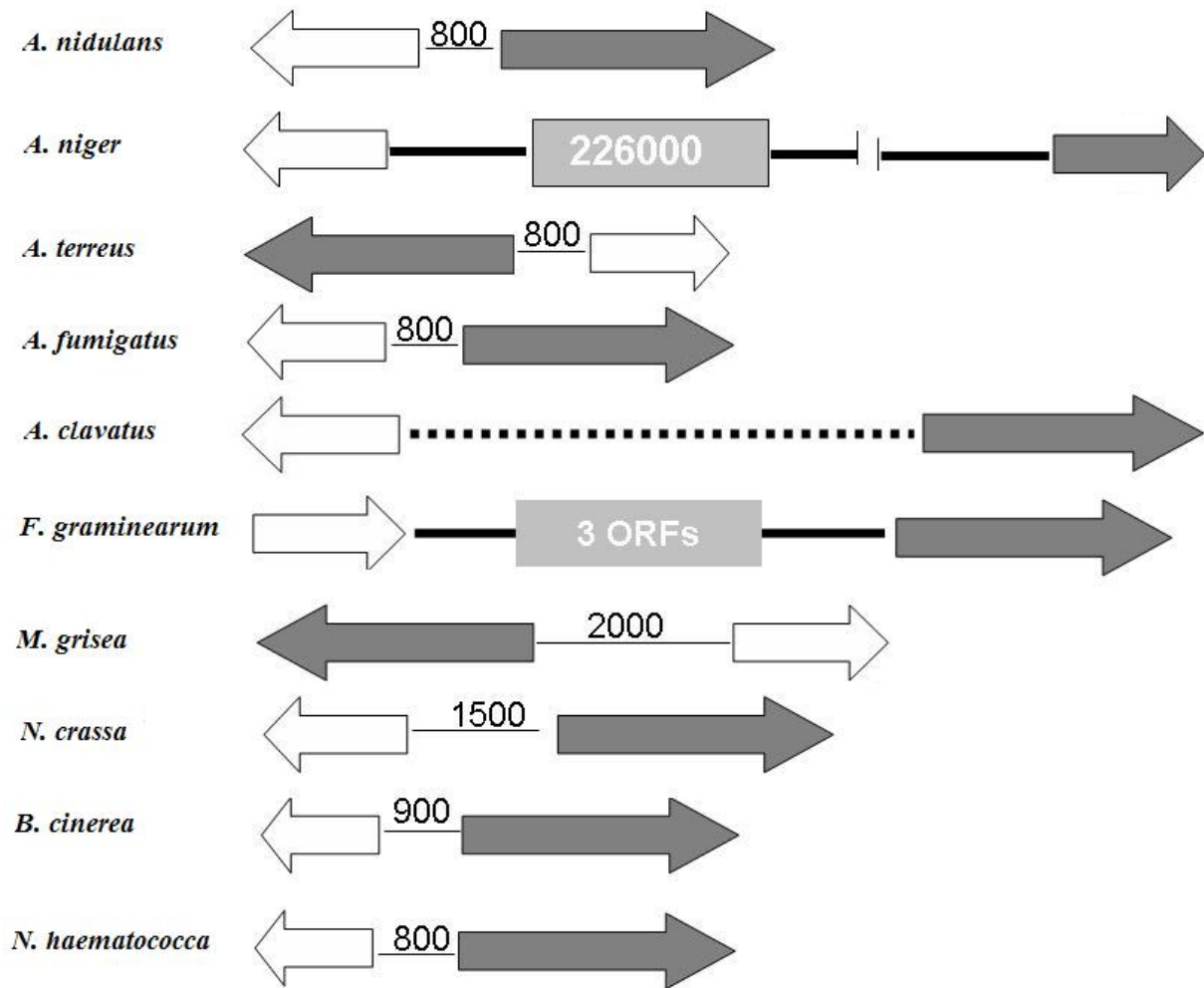


8. ábra. Laktóz permeáz-béta galaktozidáz szintenia különböző gombákban. A pirossal határolt régió fajaiban őrződött meg a *K. lactis*-féle génklaszter.

Végezetül azt vizsgáltuk meg, hogy az *A. nidulans* GH2-béta galaktozidáz, mely a feltételezett laktóz permeáz közelében található, ortológja-e a *K. lactis* Lac4p fehérjének. *A. nidulans*-ban 4 db béta-galaktozidáz gén található, ebből kettő GH2 családba tartozó fehérjét kódol. Mind a kettő hasonló a *K. lactis* Lac4p fehérjéhez. A kérdést újfent bioinformatikai módszerekkel válaszoltuk meg: TBLASTN révén összegyűjtöttük a hasonló szekvenciákat a GenBank-ból, és NJ módszerrel az aminosavak alapján filogenetikai törzsfát rajzoltunk (9. ábra). Mint látható, két clade-et kaptunk, melyek közül az egyik alapágként tartalmazza a *K. lactis* fehérjét. Ebben a clade-ben található a *lacG* nevű intracelluláris béta-galaktozidáz lókus, melyet még a „hőskorban” azonosítottak (Fantes és Roberts 1973), és amely azonos a *lacA* közelében lévő GH2-hidrolázzal. Összefoglalóan, ezek a bioinformatikai módszerek erős (bár indirekt) bizonyítékot jelentettek arra nézve, hogy a *lacA-lacG* lókus jelenti *A. nidulans*-ban a *K. lactis* permeáz-galaktozidáz megfelelőjét. A következőkben mutatjuk be a közvetlen bizonyítékokat.



9. ábra. Gombák béta galaktozidáz fehérje szekvenciái alapján rajzolt filogenetikai törzsfá különböző gombákban. A pirossal határolt régió tartalmazza a *K. lactis*-féle 'alap'-fehérjét.



10. ábra. Béta-galaktoszidáz és laktóz permeáz elhelyezkedése különböző gombák genomjában.

A *LacA* gén laktóz permeázt kódoló funkciójának bizonyítása

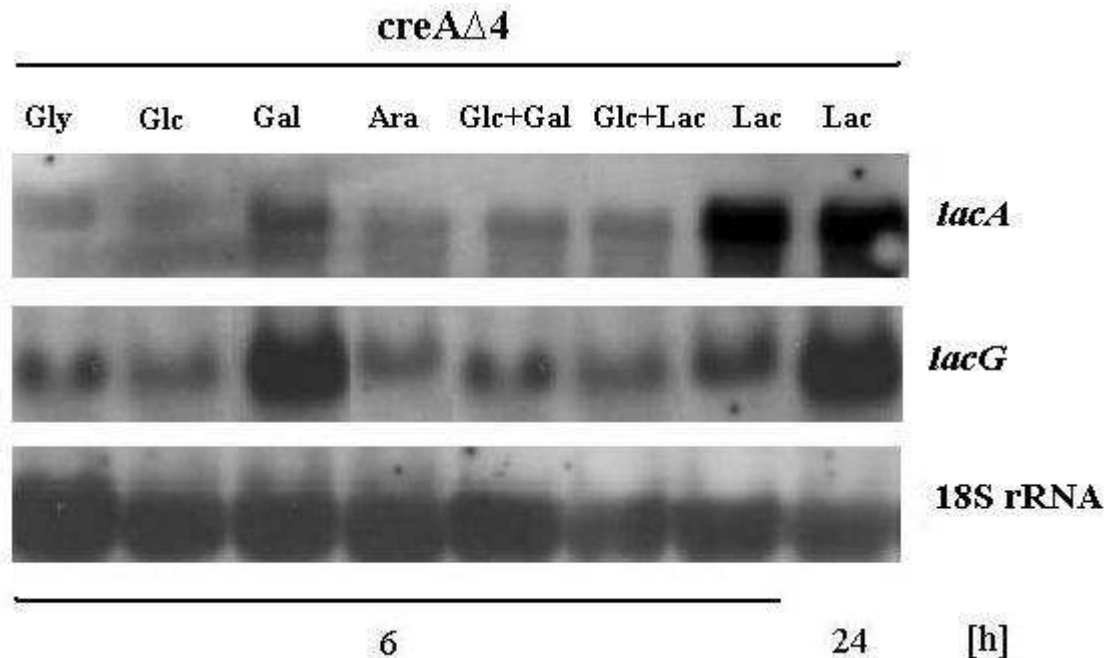
A *lacA* gén kiütése és az így kapott *A. nidulans* nullmutáns fenotípus elemzése volt a legmegbízhatóbb módszer a kódolt fehérje funkciójának bizonyítására. A *lacA* nullmutáns növekedése erősen, mintegy 50 %-al visszaesett laktózon a referencia törzshöz képest, míg más vizsgált szénforrásokon (D-glükóz, D-galaktóz, L-arabinóz, D-xilóz, glicerol) változatlan maradt. Megállapítottuk tehát, hogy a *LacA* gén valóban egy laktóz permeázt kódol, mely meghatározó szerepet játszik a laktóz felvételében, de nem kizárólagosan végzi azt.

A laktóz permeáz kinetikai vizsgálata

Jelölt (^{14}C) laktózt tartalmazó táptalajon a deléciós *A. nidulans* mutáns és a referencia törzs összehasonlítása hasonló eredményeket hozott, mint a növekedés elemzése. A laktóz felvétel kb. 40 %-ban maradt meg a mutánsban. Feltételeztük tehát, hogy egy második laktóz permeáz is van a gombában, vagy legalábbis olyan fehérje (fehérjék), mely (melyek) képesek laktózt transzportálni.

Mivel más cukrok és gombák esetében már leírták, hogy magas és alacsony affinitású permeázok vesznek részt a transzportban, megvizsgáltuk a ^{14}C laktóz transzport koncentrációfüggését, 2, 0,5 és 0,1 mM értékek mellett. A legalacsonyabb koncentráció esetén a laktóz

Mivel D-glükózon nem tudtunk *LacA* vagy *LacG* transzkriptumot kimutatni, sőt még a laktóz hatását is elnyomta, felmerült a karbon katabolit szabályozás meglétének lehetősége. A vizsgálatokhoz a már ismert *creA*-mutáns törzset használtuk. Mint a **12. ábra** mutatja, ebben a törzsben mind a *lacA*, mind a *lacG* kifejeződik D-glükózon, ami bizonyítja, hogy a közös promotor CreA-függő karbon katabolit represszió alatt áll.



12. ábra. *lacA* és a *lacG* gének kifejeződése *A. nidulans creA* mutáns törzsben

Összefoglalás

Az eredetileg négy éves, végül öt évig (2003 – 2007) futó pályázat a fonalas gombák modell-szervezetében, az *Aspergillus nidulans*-ban célozta meg a laktóz és a D-galaktóz anyagcsere molekuláris szintű megismerését. Ennek megfelelően részletesen vizsgáltuk a laktóz permeáz és a laktózt hasító béta-galaktózidáz szabályozását. Elsőként szolgáltatunk bizonyítékot a CreA-függő karbon katabolit represszió specifikus növekedési ráta függésére. Talán legérdekesebb eredményünk egy új D-galaktóz lebontási útvonal leírása és jellemzése volt.

Noha a pályázat címében és az eredeti munkatervben nem szerepelt, kutatásainkat a celluláz enzim termelése miatt fermentációs ipari jelentőségű *Trichoderma reesei* gombára is kiterjesztettük. Biokémiai és genetikai bizonyítékot szolgáltatunk arra, hogy *T. reesei*-ben a redukzív D-galaktóz lebontási útvonal döntő szerepet játszik a béta-galaktózidáz kódoló gén, a *bgal* indukciójában, mivel az induktor molekulát – a galaktitolt – ezen útvonal generálja. Megállapítottuk továbbá, hogy a redukzív útvonalnak a celluláz gének indukciójában is döntő szerepe van. *T. reesei*-ben a Leloir útvonal első enzime, a béta-D-galaktózt alfa-D-galaktózzá alakító mutarotáz hiányzik, és emiatt a szénváz fluxusa a redukzív útvonalra terelődik. Ennek következtében az útvonal karakterisztikus köztése, az L-szorbóz indukálni tudja a celluláz géneket.

A *T. reesei*-vel kapcsolatos kutatásokat jelen pályázat és a **D 048617** számú OTKA Posztdoktori pályázat (2004-2007, témavezető: **Dr. Fekete Erzsébet**) közösen finanszírozta, a nagyobbik rész azonban a posztdoktori projektekre esett. A két pályázat eddig 8 db megjelent, és 2 db közlésre benyújtott referált nemzetközi közleményt eredményezett.

Hivatkozások

- 1) Ai Y, Zheng Z, O'Brien-Jenkins A, Bernard DJ, Wynshaw-Boris T, Ning C, Reynolds R, Segal S, Huang K, Stambolian D (2000): A mouse model of galactose-induced cataracts. *Hum. Mol. Genet.* 9: 1821-1827.
- 2) Banditelli S, Boldrini E, Vilardo PG, Cecconi I, Cappiello M, Dal Monte M, Marini I, Del Corso A, Mura U (1999): A new approach against sugar cataract through aldose reductase inhibitors. *Exp. Eye Res.* 69: 533-538.
- 3) Boles E, Liebetrau W, Hofmann M, Zimmermann FK (1994): A family of hexosephosphate mutases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* 220: 83-96.
- 4) Bouffard GG, Rudd KE, Adhya SL (1994): Dependence of lactose metabolism upon mutarotase encoded in the *gal* operon in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 244: 269-78.
- 5) Chassy BM, Thompson J (1983): Regulation and characterization of the galactose-phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system in *Lactobacillus casei*. *J. Bacteriol.* 154: 1204 -1214.
- 6) Clutterbuck AJ (1981): An arabinose non-utilizing mutant *araA1*. *Asp. Newslett.* 15: 21.
- 7) De Vries RP, Flipphi MJ, Witteveen CFB, Visser J (1994): Characterization of an *Aspergillus nidulans* L-arabitol dehydrogenase mutant. *FEMS Microbiol. Letts.* 123: 83-90.
- 8) Davies RW (1991): In *Molecular Industrial Mycology*. pp 45-81. Marcel Dekker, N.Y.
- 9) Diaz M, Pedregosa AM, de Lucas JR, Torralba S, Monistrol IF, Laborda F (1996): Purification and properties of β -galactosidase from *Aspergillus nidulans*. *Microbiologia* 12: 585-592.
- 10) Dickson R. C, Riley MI (1989): The lactose-galactose regulon of *Kluyveromyces lactis*. *Biotechnol.* 13:19-40
- 11) Elorza MV, Arst HN Jr (1971): Sorbose resistant mutants of *Aspergillus nidulans*. *Mol. Gen. Genet.* 111: 185-193.
- 12) Eriksson KE, Blanchette R.A, Ander P (1990): *Microbial and Enzymatic Degradation of Wood and Wood Components*. Springer-Verlag, Berlin, Németország.
- 13) Fantes PA, Roberts CF (1973): β -Galactosidase activity and lactose utilization in *Aspergillus nidulans*. *J. Gen. Microbiol.* 77: 471-486.
- 14) Fekete E, Karaffa L, Sándor E, Seiboth B, Biró S, Szentirmai A, Kubicek CP (2002): Regulation of formation of the intracellular β -galactosidase activity of *Aspergillus nidulans*. *Arch. Microbiol.* 179: 7-14.
- 15) Gancedo JM (1998): Yeast carbon catabolite repression. *Microb. Mol. Biol. Rev.* 62: 334-361.
- 16) Gross KC, Pharr DM (1982): A potential pathway for galactose metabolism in *Cucumis sativus L.*, a stachyose transporting species. *Plant. Physiol.* 69: 117-121.
- 17) Hasper AA, Visser J, de Graaff LH (2000): The *Aspergillus niger* transcriptional activator XlnR, which is involved in the degradation of the polysaccharides xylan and cellulose, also regulates D-xylose reductase gene expression. *Mol. Microbiol.* 36: 193-200.
- 18) Holden HM, Rayment I, Thoden JB (2003): Structure and function of enzymes of the Leloir pathway for galactose metabolism. *J. Biol. Chem.* 278: 43885-43888.
- 19) Ilmen M, Thrane C, Penttilä M (1996): The glucose repressor gene *cre1* of *Trichoderma*: isolation and expression of a full-length and a truncated mutant form. *Mol. Gen. Genet.* 251: 451-460.
- 20) Käfer E (1977): Meiotic and mitotic recombination in *Aspergillus* and its chromosomal aberrations. *Adv. Genet.* 19: 33-131.

- 21) Kinoshita S, Kadota K, Taguchi H (1981): Purification and properties of aldose 1-epimerase from *Aspergillus niger*. *Biochim. Biophys. Acta* 662: 285-290.
- 22) Kubicek CP (1992): The cellulase proteins of *Trichoderma reesei*: storage, multiplicity, mode of action and regulation of formation. *Adv. Biochem. Engin. Biotechnol.* 45: 1-27.
- 23) Lichtentaler FW (1998): Towards improving the utility of ketoses as organic raw materials. *Carbohydrate Res.* 313: 69-89.
- 24) MacCabe AP, Miro P, Ventura L, Ramon D (2003): Glucose uptake in germinating *Aspergillus nidulans* conidia: involvement of the *creA* and *sorA* genes. *Microbiology* 149: 2129-2136.
- 25) Nagy Z, Keresztessy Z, Szentirmai A, Biró S (2001a): Carbon source regulation of beta-galactosidase biosynthesis in *Penicillium chrysogenum*. *J. Basic Microbiol.* 41: 351-362.
- 26) Nagy Z, Kiss T, Szentirmai A, Biró S (2001b): Beta-galactosidase of *Penicillium chrysogenum*: production, purification, and characterization of the enzyme. *Protein Expr. Purif.* 21: 24-29.
- 27) Nikolaev IV, Vienzski YP (1998): L-arabinose induces synthesis of secreted β -galactosidase in the filamentous fungus *Penicillium canescens*. *Biochem. (Moscow)* 63: 1294-1298.
- 28) Nogawa M, Goto M, Okada H, Morikawa Y (2001): L-Sorbose induces cellulase gene transcription in the cellulolytic fungus *Trichoderma reesei*. *Curr. Genet.* 38: 329-334.
- 29) Puri RN, Bhatnagar D, Roskoski R Jr (1988): Inactivation of yeast hexokinase by o-phthalaldehyde: evidence for the presence of a cysteine and a lysine at or near the active site. *Biochim. Biophys. Acta* 957: 34-46.
- 30) Roberts CF (1963): The genetic analysis of carbohydrate utilization in *Aspergillus nidulans*. *J. Gen. Microbiol.* 31:45-58.
- 31) Shroff RA, O'Connor SM, Hynes MJ, Lockington RA, Kelly JA (1997): Null alleles of *creA*, the regulator of carbon catabolite repression in *Aspergillus nidulans*. *Fung. Gen. Biol.* 22: 28-38.
- 32) Shuster CW, Doudoroff M (1967): Purification of 2-keto-3-deoxy-6-phosphohexonate aldolases of *Pseudomonas saccharophila*. *Arch. Mikrobiol.* 59: 279-86.
- 33) Shi NQ, Prahl K, Hendrick J, Cruz J, Lu P, Cho JY, Jones S, Jeffries T (2000): Characterization and complementation of a *Pichia stipitis* mutant unable to grow on D-xylose or L-arabinose. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 84: 201-216.
- 34) Singh A, Schügerl K (1992): Induction and regulation of D-xylose catabolizing enzymes in *Fusarium oxysporum*. *Biochem. Int.* 28: 481-488.
- 35) Strauss J, Horvath HK, Abdallah BM, Kindermann J, Mach RL, Kubicek CP (1999): The function of *CreA*, the carbon catabolite repressor of *Aspergillus nidulans*, is regulated at the transcriptional and post-transcriptional level. *Mol. Microbiol.* 32: 169-178.
- 36) Suominen P, Rainikainen T (1993): eds. *Trichoderma reesei* cellulases and other hydrolases. Enzyme structures, biochemistry, genetics and applications. Foundation for Biotechnical and Industrial Fermentation Research Vol. 8. Fagepaino Oy Helsinki.
- 37) Witteveen CFB, Busink R, van der Vondervoort P, Dijkema C, Swart K, Visser J (1989): L-arabinose and D-xylose catabolism in *Aspergillus niger*. *J. Gen. Microbiol.* 135: 2163-2171.
- 38) Yebra MJ, Perez-Martinez G (2002): Cross-talk between the L-sorbose and D-sorbitol (D-glucitol) metabolic pathways in *Lactobacillus casei*. *Microbiol. UK.* 148: 2351-2359.