

ZÁRÓJELENTÉS

A D048617 sz. OTKA Posztdoktori pályázatról

Dr. Fekete Erzsébet

Debreceni Egyetem, TTK, Genetikai és Alkalmazott Mikrobiológiai Tanszék

Konzulens: Dr. Szentirmai Attila, Professor Emeritus

Előzmények

Munkacsoportunk 2000 nyarán kezdte el tanulmányozni a fonalas tömlősgombák (*Ascomycota*) laktóz és D-galaktóz anyagcseréjének jellemzőit, szabályozási mechanizmusait és a primer-szekunder anyagcserével való kapcsolatát. Noha a laktóz fermentációs ipari felhasználása legalább 60 éves, a kérdéskört tudományos alaposítással korábban egyetlen non-profit munkacsoport sem vizsgálta (a termelői szféra ismereteit lehetetlen megbecsülni, a szabadalmak pedig – sajnos – ritkán nyújtanak használható adatokat). Az eltelt időszak alatt a témából 8 db referált, nemzetközi közlemény jelent meg jó nivójú lapokban, további kettő bírálattal, egy pedig benyújtás előtt áll.

Jómagam 2004-ben védtem meg „Az *Aspergillus nidulans* gomba laktóz és galaktóz anyagcseréjének jellemzése és szabályozása” című PhD értekezésem. Ahogy a címből is kitűnik, kezdetben a fonalas tömlősgomba fajok modell-szervezetének számító *Aspergillus nidulans*-t vizsgáltuk. Ennek magyarázata az a nagyszámú mutáns törzs, melyek ingyen vagy jelképes áron szerezhetők be, jelentősen megkönnyítve a kezdeti adatgyűjtést. A molekuláris biológiai módszerek is kényelmesebben alkalmazhatók egy olyan faj esetében, melynek az elsők között vált hozzáférhetővé a teljes genomszekvenciája.

Posztdoktori kutatásaim (2004-2007) nagymértékben támaszkodtak a korábbi doktori évek eredményeire és megfigyeléseire, de ekkor a hangsúlyt már a gazdaságilag is jelentős gombafajok tanulmányozására helyeztük. A *Trichoderma reesei* és az *Aspergillus niger* a fermentációs ipar legfontosabb mikroorganizmusai közé tartoznak, és mindkettő esetében valós gazdasági jelentősége van a laktóz hasznosítás hatékonyságának.

Az alábbiakban először röviden összefoglaljuk a laktóz anyagcsere főbb jellemzőit, majd rátérünk a két gombafaj (*T. reesei*, *A. niger*) vizsgálatára során kapott eredményekre.

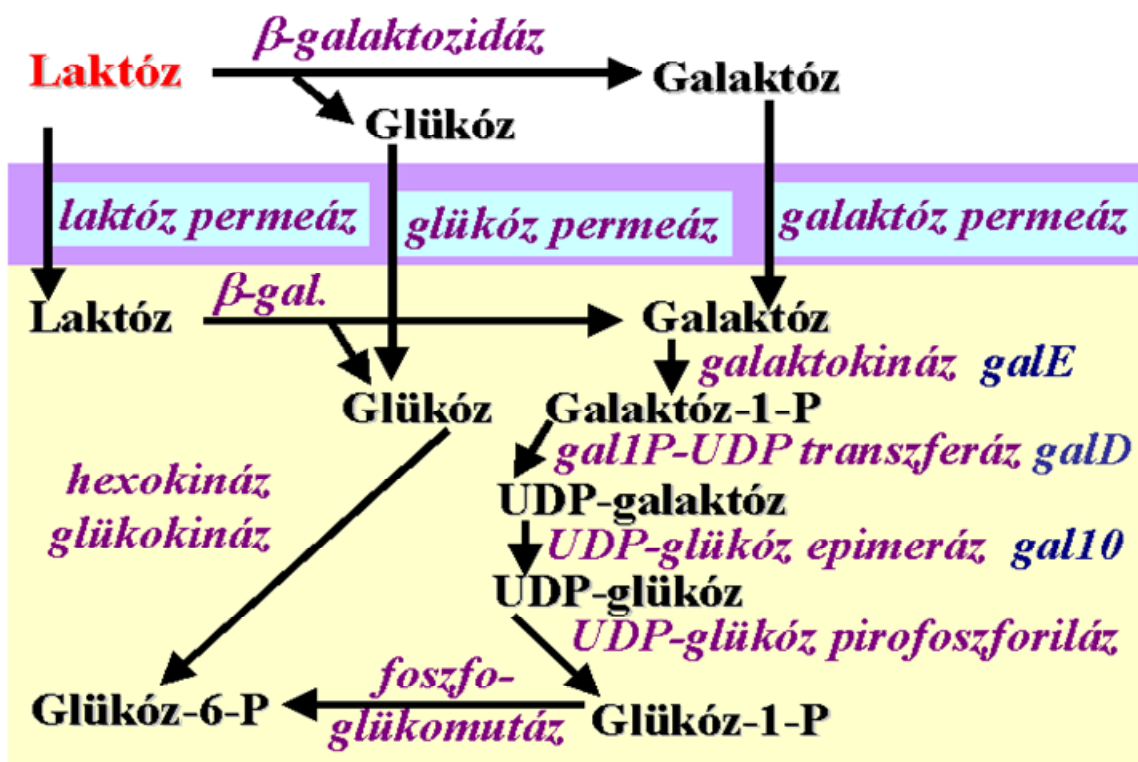
Gombák laktóz anyagcseréjének áttekintése

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

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

1996, Nikolaev és Vinetski 1998, Nagy és mtsai 2001a,b). A glükóz glikolitikusan, a galaktóz pedig jellemzően a Leloir-útvonalon alakul tovább. A *Kluyveromyces lactis* élesztőben (mely azon kevés élesztők egyike, mely képes a laktózt hasznosítani, s ezért ebből a szempontból a legjobban ismert gombafaj) a laktóz hidrolízise intracelluláris, a Leloir-útvonal működése pedig nélkülözhetetlen (Chang és Dickson 1988, Dickson és Riley 1989, Meyer és mtsai 1991, Cardinali és mtsai 1997).

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

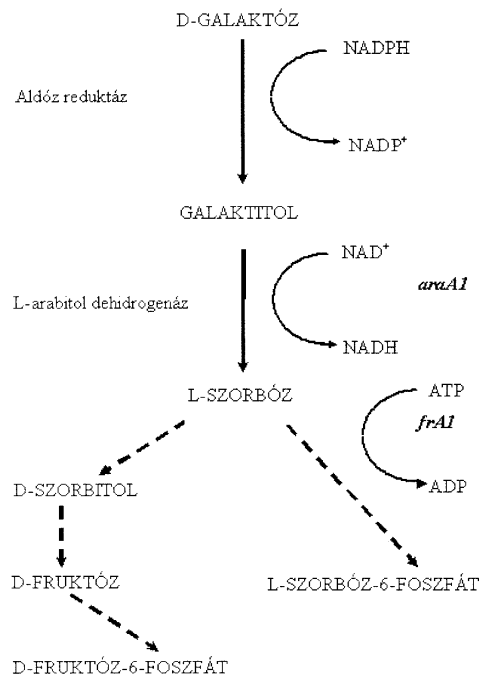


1. ábra. A laktóz lebontás és a Leloir-útvonal általános sémája

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-glükózzal szembe fordított UMP-csoportot helyez, vagyis glükóz-1-foszfátot és UDP-galaktózt hoz létre. Az UDP-galaktóz szubsztrátumként szolgál az UDP-galaktóz-4-epimeráz (EC 5.1.3.2) által katalizált reakciónak, ami az UDP-glükóz regenerálását eredményezi. Az UDP-glükózra az UDP-glükóz-pirofoszforiláz enzim (EC 2.7.7.9) egy pirofoszfát csoportot rak (ezáltal elvonja az UDP-glükózt a D-galaktóz-1-foszfát uridililtranszferáz általi reverzibilis reakcióból), így glükóz-1-foszfát és UTP jön létre. Az előbbi a foszfo-glükomutáz (EC 5.4.2.6) alakítja át a glikolízis közvetlen intermedierjévé, glükóz-6-foszfáttá. A Leloir-útvonal enzimeit tehát a C-4 hidroxil térszerkezetét változtatják meg (epimerizáció). A laktóz anyagcsere, ezen belül a Leloir-útvonal általános vázlatát az 1. ábra szemlélteti. Meg szeretnénk jegyezni, hogy

többek szerint a D-galaktóz-mutarotáz gén illetve enzim is a Leloir-útvonalhoz tartozik, mely a β -D-galaktózt alakítja át α -D-galaktózzá, még a kináz reakció előtt (Bouffard és mtsai 1994). Néhány baktérium (pl. *Lactococcus lactis*) mellett *P. notatum*-ból (Bentley és Bhate 1960a, b) és *A. niger*-ből (Kinoshita és mtsai 1981) is izolálták az aktivitást, ez utóbbiból mint aldóz-1-epimerázt (EC 5.1.3.3).

Munkacsoportunk egyik fontos eredménye volt annak kísérletes bizonyítása, hogy az *A. nidulans* és a *T. reesei* a galaktokináztól függetlenül is képes a D-galaktóz hasznosítására (Fekete és mtsai 2004, Seiboth és mtsai 2004; **2. ábra**). Az első, aldóz redukáz enzimek által katalizált lépés alapján 'reduktív'-nak elkeresztelt útvonal a D-galaktóz dulcitolá (galaktitolá) történő, szigorúan NADPH-függő redukcióját, majd ennek L-szorbózzá történő, NAD^+ -függő, L-arabitol dehidrogenáz katalizálta dehidrogénezését foglalja magába. Az L-szorbóz a celluláz gének kifejeződésének egyik legerősebb induktora. A glikolízisig tartó további reakciókban a fruktokináz enzim is szerepel. A két galaktóz lebontási útvonal (Leloir és reduktív) aktivitásának relatív arányát jelenleg még becsülni sem tudjuk, a fluxus-megoszlást szabályozó mechanizmusokról sincsenek ismereteink.



2. ábra. A reduktív D-galaktóz lebontási útvonal vázlata. A szaggatott nyilak a lehetséges alternatív útvonalakat jelölik

Laboratóriumi körülmények között számos szénforrás (pl. keményítő, növényi olajok, szoforóz, cellobióz, cellulóz) képes hatékonyan indukálni illetve derepresszálni a karbon katabolit represszió alá eső gének kifejeződését, de technikai és gazdasági okok miatt ezek ipari léptékben nem alkalmazhatók. Jelenleg ezért a laktóz a legfontosabb, termelői körülmények között is használható indukáló és derepresszálnó szénforrás.

Problémafelvetés

A fungális celluláz illetve hemicelluláz enzimek fermentációs úton történő előállítására a mikrobiológia tudományosan és gazdaságilag egyaránt fontos folyamatai közé tartozik. A fermentációs ipari gyakorlatban a *T. reesei* (teleomorfi: *Hypocrea jecorina*) fonalas gombát használják celluláz termelésre. A legjobban termelő *T. reesei* törzsek 35 g/L-t meghaladó

koncentrációban képesek extracelluláris fehérjéket kiválasztani, és ezt a mennyiséget jórészt (mintegy 90 %-ban) cellulázok illetve hemicellulázok teszik ki.

A nagy mennyiségű kiválasztott enzim felkeltette az érdeklődést egyes *T. reesei* celluláz promóterek, mint pl. a cellobiohidroláz I és II gén expresszióját szabályozó *cbh1* és *cbh2* iránt is, mivel elvileg felhasználhatók heterológ fehérjék előállítására is. Heterológ fehérjék a *T. reesei*-ben azonban ipari léptékben egyelőre nem termeltethetők. A bizonyított okok közé tartozik a termelt fehérjék összerendeződésének ('folding') és érésének ('maturation') zavarai, valamint a túltermeléshez vezető szénforrás hiánya. Ez utóbbi probléma – kisebb mértékben – a cellulázok és hemicellulázok előállításánál is jelentkezik. A legerősebben indukáló, cellulóz tartalmú, részlegesen vízdékony hidrolizátumok ugyanis olyan maradványokat tartalmaznak, melyek megnehezítik a keletkezett fehérjék tisztítását. Emiatt jelenleg a laktóz az egyetlen szénforrás, mely gyakorlatban is alkalmazható cellulázok, hemicellulázok illetve (egyenelőre csak kísérleti üzemi léptékben) rekombináns fehérjék termeltetésére (Pentillä 1998).

A hemicellulóz kifejezés a növényi sejtfalban a cellulózzal szorosan egybeépült nem-cellulóz jellegű poliszacharidokat takarja. 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 észterkötésben vehetnek részt. Az *A. niger* szintén elsőrangú extracelluláris enzimtermelő gomba, emiatt kísérleti léptékben előszeretettel próbálják növényi biomassza lebontására alkalmazni. A technológiák fejlődését azonban akadályozza az, hogy a gomba nem képes a D-galaktóz hasznosítására. Holland kutatók megfigyelései szerint (Ronald P. de Vries, személyes közlés) a gomba szinte 'körbeeszi' a D-galaktózt, de hasznosítani nem, vagy csak rendkívül lassan tudja. Kutatásainkba ezért ezen megfigyelés lehetséges magyarázatát is bevontuk.

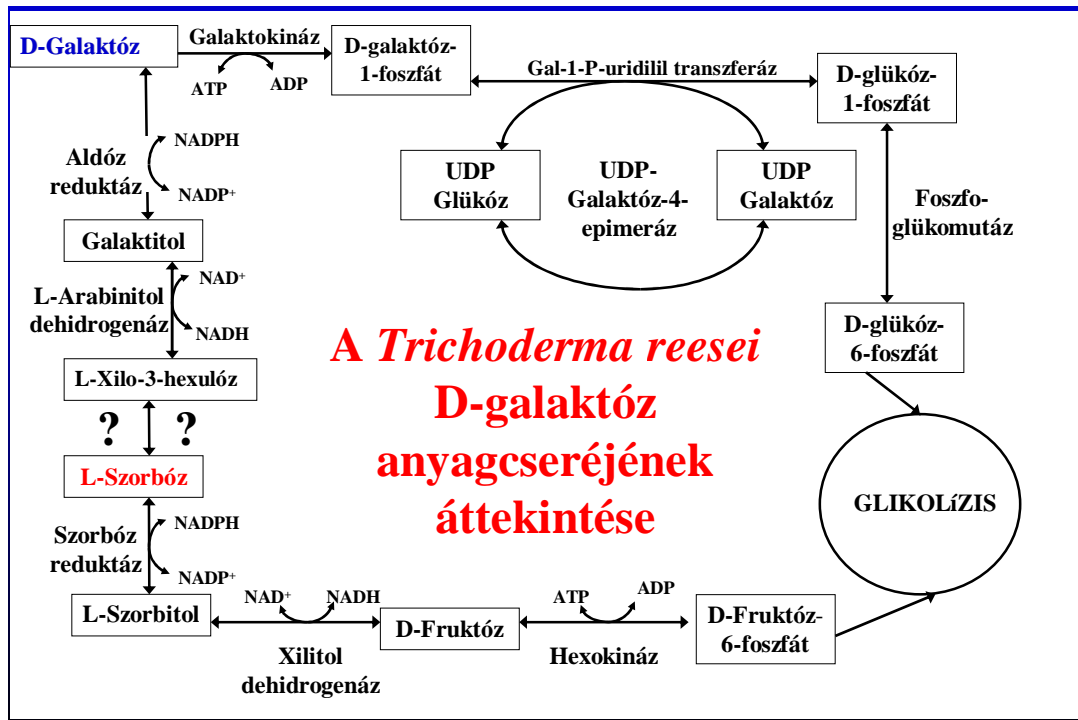
Új tudományos eredmények

A) A specifikus növekedési ráta hatása a cellulázok kifejeződésére

T. reesei-ben a laktóz anyagcsere nyitólépése a laktóz extracelluláris hidrolízise, amit a béta-galaktozidáz enzim végez. A felszabaduló D-glükóz közvetlenül a glikolitikus útvonalra kerül, míg a D-galaktóz monomer – mint korábban említettük – kétféleképpen: a Leoir és a reduktív lebontási úton is metabolizálódhat (**3. ábra**). Első esetben a galaktokináz galaktóz-1-foszfáttá foszforilezi, míg a második esetben az aldóz reduktáz galaktitollá redukálja. A galaktokináz (*gal1*) gén deléciója drámaian lecsökkenti a cellulázok keletkezését laktózon, míg a galaktóz-1-foszfát uridyliltranszferáz (*gal7*) gén deléciója nincs rá hatással. Ezeket az eredményeket úgy értelmeztük, hogy vagy a galaktokináz enzimhez kötődött D-galaktóz, vagy a D-galaktóz-1-foszfát szükséges az indukcióhoz. Amikor azonban a *T. reesei* gombát batch tenyészetben, D-galaktózon tenyésztettük, nem észleltünk celluláz indukciót. A D-galaktóz represszálo szénforrás, vagyis képes indukálni a *cre1* gént, amelynek terméke olyan gének (többek között a *bga1*, *bga2* és *cbh1*) promóteréhez képes specifikusan kötődni, melyek más, lassabban hasznosuló szénforrások lebontásához szükséges enzimeket kódolnak. Celluláz indukciót azonban a karbon derepresszált *T. reesei cre1*-mutánsban sem észleltünk. Azok a mutánsok törzsek, melyekben az extracelluláris béta-galaktozidázt túltermeltettük, gyorsabban nőttek laktózon, de nem tudtak cellulázt képezni. Vagyis akár a D-galaktóz, akár a D-galaktóz-1-foszfát az induktor, a hatása a laktózon jellemző lassú növekedési rátára korlátozódik, aminek oka az alacsony extracelluláris béta-galaktozidáz aktivitás.

A hipotézis teszteléséhez a *T. reesei* gombát D-galaktóz limitált folytonos (kemosztát) tenyészetekben növesztettük, ahol a specifikus növekedési ráta értékét tetszőlegesen be tudtuk állítani. A *cbh2* (cellobiohidroláz 2) promoter kifejeződését egy *cbh2::goxA* (*A. niger* glükóz

oxidáz) riporter törzs segítségével követtük – a vad típusú *Trichoderma*ekben ugyanis nincs glükóz-oxidáz aktivitás, emiatt kiválóan alkalmazható riporter rendszer elemének.



3. ábra. A *Trichoderma reesei* D-galaktóz anyagcseréjének egyesített képe

A *T. reesei* kemosztát tenyészetek kapcsán tett megfigyeléseink jó egyezést mutatnak más gombafajok folytonos tenyészetével. A D-galaktóz mellett laktózon, D-glükózon, galaktitolon és D-galaktóz + galaktitol equimoláris elegyének karbon-limitált táptalaján 4-5 tartózkodási (rezidens) idő kellett a steady-state állapot eléréséhez. A legalacsonyabb, $D = 0,015 \text{ h}^{-1}$ hígítási ráta ($D = \text{dilution rate} = \text{hígítási ráta}$) értéken minimális pellet képződés volt megfigyelhető minden szénforráson. Galaktitolon a $D = 0,015 \text{ h}^{-1}$ értéken nem lehetett stabil steady-state állapotot létrehozni, ennek oka valószínűleg az ezen a szénforráson magasabb 'fenntartási energia' (maintenance energy) lehetett. Laktóz, D-glükóz és D-galaktóz szénforrásokon az egyensúlyi biomassza koncentráció $1,48 \pm 0,20 \text{ g/l}$ érték volt, 3 g/l kiindulási szénforrás koncentráció mellett – az értékek megfelelnek a szakirodalomban más gombafajok esetében leírtaknak. A reziduális szénforrás koncentráció $0,09\text{-}0,12 \text{ mM}$ között volt. A biomasszára kalkulált hozamkonstans minden esetben $45 - 49 \%$ között volt. Mindebből az következett, hogy a különböző hígítási ráta értékek ellenére a gombatenyészetek általános anyagcseréjében nem volt különbség, így a rendszert a vizsgálat céljára alkalmasnak tekintettük.

Először a D-galaktóz limitált folytonos tenyészeteket elemeztük. Mint az **1. táblázat** mutatja, $D = 0,075 \text{ h}^{-1}$ és $D = 0,030 \text{ h}^{-1}$ értékek között nem volt mérhető glükóz-oxidáz aktivitás, vagyis a *cbh2* gén promótere nem fejeződött ki magas növekedési rátán. Alacsony ($D = 0,015 \text{ h}^{-1}$) hígítási ráta értéken azonban enyhe kifejeződést (glükóz-oxidáz aktivitást) tapasztaltunk. A fenti eredményeket Western-blot analízissel is megerősítettük; a *cbh2* kódolta Cel6A és a *cbh1* kódolta Cel7A fehérjéket nem tudtuk a tápközegből kimutatni magas és közepes, csupán az extrém alacsony $D = 0,015 \text{ h}^{-1}$ értéken (**4. ábra**).

Laktózon azonban más volt a helyzet: már $D = 0,042 \text{ h}^{-1}$ értéken jelentős *cbh1/cbh2* kifejeződést tudtunk mérni (**1. táblázat**), és az expressziós vizsgálatok eredményét a fehérjék közvetlen detektálása is megerősítette (**4. ábra**). Magasabb növekedési ráta értékeknél a

gombasejtek kimosódtak, vagyis a tenyészet növekedése nem tudott lépést tartani a hígítással. A hígítási ráta csökkentése növelte a kifejeződést és a fehérje-produkciót; $D = 0,015 \text{ h}^{-1}$ hígítási ráta értéken a laktóz mintegy négyszer jobb induktornak bizonyult, mint a D-galaktóz. Az eredmény megfelel a fermentációs iparban alkalmazott technológiának; a gyártás során a laktózt alacsony rátával adagolják a már stationer közeli állapotban lévő biomasszához, így a növekedési ráta értéke a lehető legalacsonyabb lesz.

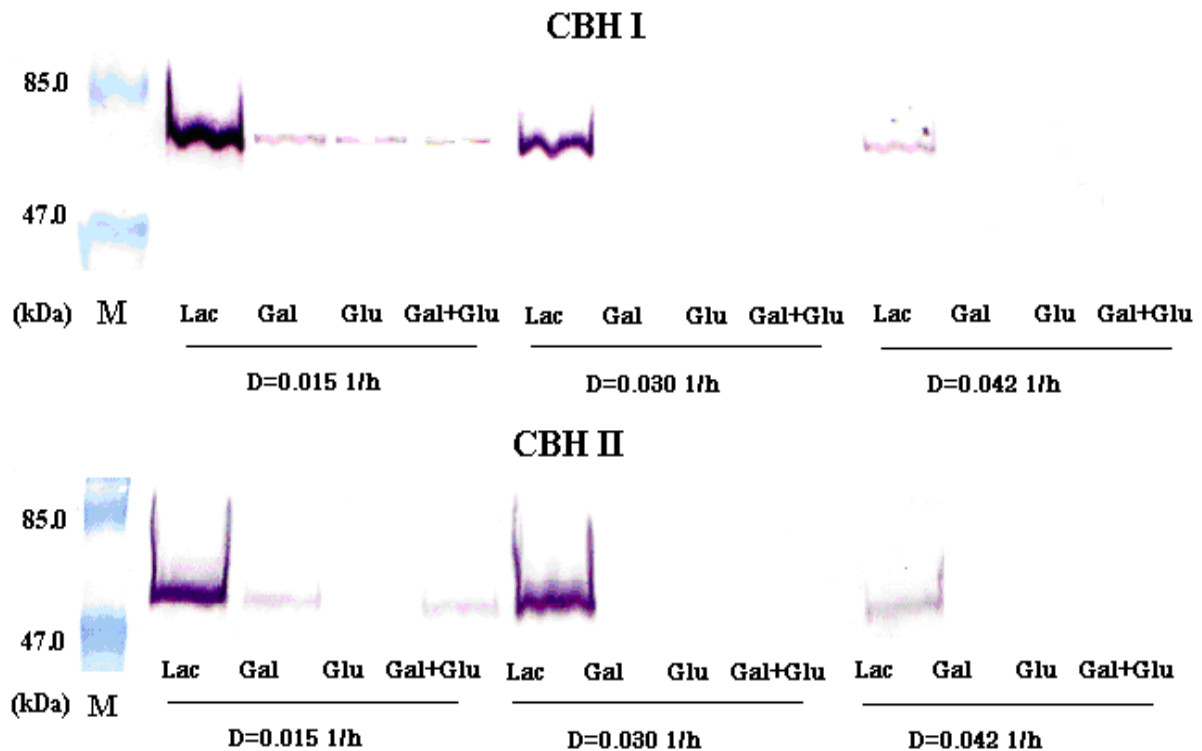
Glükóz oxidáz aktivitás [Uml^{-1}]						
$D \text{ [h}^{-1}\text{]}$	Laktóz	Glükóz	Galaktóz	Galaktóz	Galaktitol	Galaktóz
				+		+
				Glükóz		Galaktitol
0.075	kimosódás	0	0	0	kimosódás	kimosódás
0.050	kimosódás	0	0	0	0	0
0.042	1.2	0	0	0	0	0
0.030	1.68	0	0	0	0	0.51
0.015	2.71	0	0.62	0.55	-	-

1. táblázat. Kemosztát-típusú folytonos tenyészetekben mért glükóz-oxidáz aktivitás (= *cbh2* expresszió) különböző szénforrásokon.

A D-galaktózon kapott eredményeknek elvileg két oka lehetett. A D-galaktóz indukálhatta a *cbh2* gén promóterét, de az is lehetséges volt, hogy csupán az alacsony növekedési rátán általánosan megfigyelhető 'derepressziós' jelenségnek voltunk tanúi. Ahhoz, hogy különbséget tudjunk tenni a két lehetőség között, D-glükóz limitáció mellett is megismételtük a fenti kísérleteket. A D-galaktózon kapott eredményekkel szemben itt $D = 0,015 \text{ h}^{-1}$ hígítási rátánál sem volt *cbh2* kifejeződés, amit megerősített a Cel6A képződés immunokémiai vizsgálata (Western-blot analízis) is. A Cel7A fehérje azonban megjelent ezen körülmények között. Mivel a Cel7A fehérjét kódoló *cbh1* gén bizonyítottan *cre1*-függő karbon katabolit represszió alatt áll (Zeilinger és mtsai, 2003), az eredmények ismeretében kijelenthettük, a *cbh2* kifejeződése D-galaktózon, alacsony hígítási rátán specifikus indukciós hatásnak a következménye.

Annak eldöntésére, hogy a laktóz illetve D-galaktóz általi celluláz indukció mértékében még a legalacsonyabb növekedési rátán is észlelhető különbség magának a laktóznak, avagy két monomerjének köszönhető, D-galaktóz + D-glükóz-limitált kemosztát tenyészeteket hoztunk létre (ne feledjük, a laktóz *T. reesei*-ben kizárólag extracellulárisan metabolizálódik, vagyis számára a laktóz tulajdonképpen 'ismeretlen' szénforrás). A kettős szénforrás alkalmazása során kapott celluláz indukciós eredmények gyakorlatilag

megegyeztek a D-galaktóz-limitált tenyészetekből származókkal (lásd **1. táblázat** és **4. ábra**); magas és közepes növekedési ráta mellett nem észleltünk celluláz génkifejeződést és celluláz fehérje képződést, a legalacsonyabb, $D = 0,015 \text{ h}^{-1}$ értéknél azonban alacsony génkifejeződést / fehérje-produkciót mértünk. Mindezek azt sugallják, hogy a laktóz / galaktóz általi celluláz indukció mértékében mutatkozó különbség magában a laktózban (és nem a két monomerjében) keresendő.



4. ábra. Cel6A és Cel7A fehérjék képződése *T. reesei* folytonos tenyészeiben

Játszik-e szerepet a redukzív D-galaktóz lebontási út a *T. reesei* celluláz génjeinek indukciójában? Mivel ezt az útvonalat mi fedeztük fel (Fekete és mtsai 2004), a kérdés nem csak szigorúan tudományos szempontból volt lényeges számunkra. Megválaszolásához előbb galaktitolon, majd D-galaktóz és galaktitol equimoláris elegyén tenyésztettük a gombát. A két esetben a szénváz fluxusa teljesen vagy (elvileg) félig a redukzív útvonalra terelődik. Noha galaktitolon (mely nagyon lassan hasznosuló szénforrás) nehéz volt folytonos tenyészeteket létrehozni, a vegyes limitáció során, $D = 0,030 \text{ h}^{-1}$ értéken érdekes eredményeket kaptunk: a *cbh2* gén promotere kifejeződött, a Cel7A és a Cel6A fehérjék pedig megjelentek a fermentlében. Mindez az bizonyítja, hogy a redukzív útvonal pozitívan járul hozzá a *T. reesei* celluláz gének indukciójához.

Összefoglalva a specifikus növekedési ráta hatását a celluláz gének kifejeződésére azt mondhatjuk, hogy munkahipotézisünket részlegesen ugyan bizonyítani tudtuk – alacsony ($D = 0,015 \text{ h}^{-1}$) növekedési rátán, galaktózon a *cbh2* és a *cbh1* gének valóban kifejeződtek – de a génexpresszió (valamint a Cel7A és Cel6A produkció) mértéke erősen elmaradt a laktózon tapasztalhatótól. Mi lehet ennek az oka? A választ a következő alpontban olvashatjuk.

B) A mutarotáció szerepe a cellulázok kifejeződésében

Az előző alpont végén lévő kérdést úgy is fel lehet tenni: mi a különbség a szénforrásként adagolt D-galaktóz és a laktózból felszabaduló galaktopiranozil monomer

között? A válasz: az előbbi a mutarotáció miatt az α -és β -anomerek elegye, az utóbbi viszont csak β -anomerből áll (a laktóz szabályos kémiai neve, mint már említettük, 1,4-0- β -D-galaktopiranozil-D-glükóz). Mivel a galaktokináz csak az α -D-galaktózt képes foszforilezni, a β -formának előbb α -formává kell alakulnia. A laktóz hidrolízis lassú, ezért a felszabaduló β -galaktopiranozil monomert a sejt azonnal transzportálja (extracelluláris galaktózt vagy glükózt laktózon növekvő *T. reesei* fermentlevéből nem lehet kimutatni). Ennek a ténynek az adja a jelentőségét, hogy a *T. reesei* fermentlevének kissé savas (pH = 5) kémhatása elvileg fel tudná gyorsítani a spontán mutarotációt (amely protonvezérelt folyamat), de mivel a β -galaktopiranozil monomer minimális időt tölt csak el a savas kémhatású tápközegben, erre nem kerül sor. A spontán mutarotáció ugyan előbb-utóbb intracellulárisan is egyensúlyi állapotot eredményez, de a citoszol közel semleges kémhatása mellett ez több óra hosszat tartó folyamat (Pettersson és Pettersson 2001).

Az eddig vizsgált gombákban a β -anomer – α -anomer átalakulást egy mutarotáz katalizálja, mely az UDP-glükóz epimeráz enzim egyik doménjeként (vagyis nem önálló enzimként) létezik. A *T. reesei* genetikai adatbázisaiban azonban nem találtuk meg a génszakasz homológjait, ebben a gombában ugyanis az UDP-glükóz epimeráz enzim nem tartalmaz mutarotáz domént (Karaffa és mtsai 2006). Emiatt az α -D-galaktóz kialakulása *T. reesei*-ben a többi gombafajhoz képest sokkal lassúbb folyamat (csak a spontán mutarotáció eredményezheti), ami minimálisra csökkenti a D-galaktóz foszforilezés intenzitását, ennek pedig hatása lesz a laktóz-fenotípusra, ideértve a celluláz termelést is. Az alábbiakban ezt a munkahipotézist teszteljük.

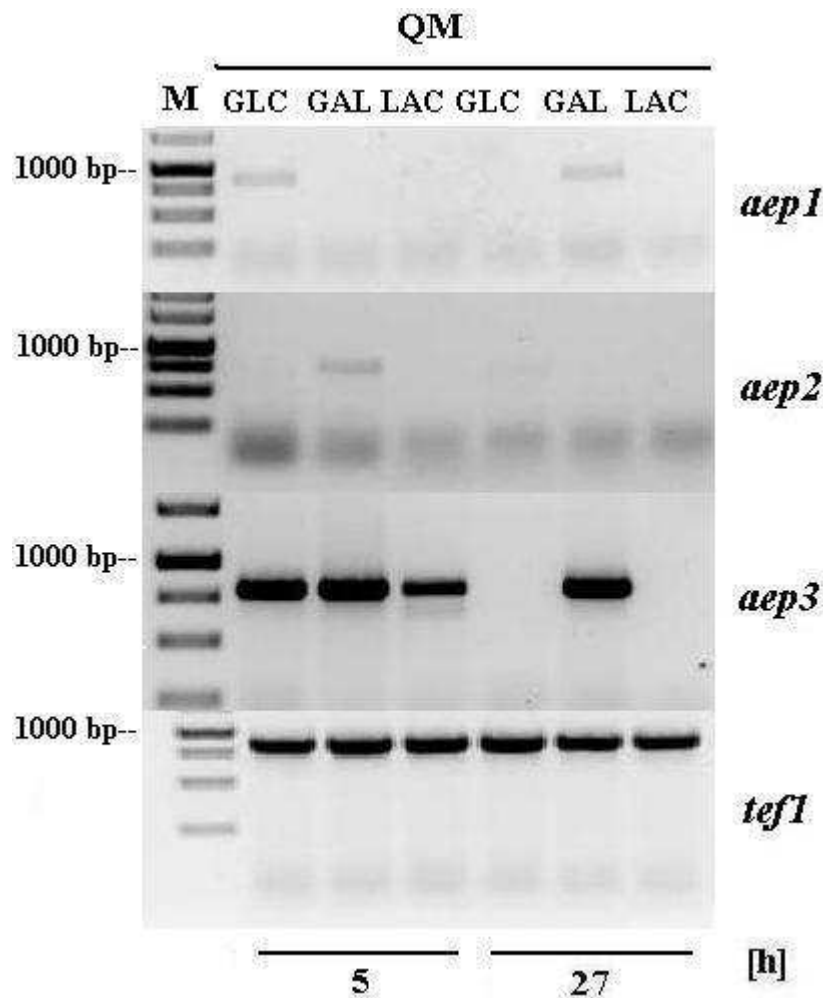
A *T. reesei* genomszekvenciája néhány éve már hozzáférhető (<http://genome.jgi-psf.org/Trire2/Trire2.home.html>). Ebben az adatbázisban három olyan lókuszt találtunk, mely feltételezett aldóz-1-epimerázokat kódol (tre43544, tre44592 és tre19341). A tre43544 lókuszt kódolta fehérje hasonlít leginkább a *Saccharomyces cerevisiae* élesztő kétfunkciós Gal10 protein C-terminális régiójához (35 %), míg a *Gibberella zeae* hipotetikus aldóz-1-epimeráz fehérjéhez 64 %-ban homológ. A másik két feltételezett aldóz-1-epimeráz hasonlósága jóval gyengébb. Mindhárom szekvencia kifejeződik, mivel mindháromhoz találtunk EST-eket a Foreman (2003)-féle kevert *T. reesei* RNS-mintákban. A három feltételezett fehérje jellemzőit a **2. táblázat** mutatja be.

	AEP1	AEP2	AEP3
Genom annotációs név	tre19341	tre43544	tre44592
EST sorszám	4	4	10
Aminosav-hasonlóság a <i>S. cerevisiae</i> Gal10-hez [%]	7	35	23
Aminosavak száma	315	342	383
<i>Mr</i>	33988.2	37074.5	42380.0
Izoelektromos pont	4.99	5.29	6.44
A valószínűsített géntermék helye	intracelluláris	intracelluláris	extracelluláris

2. táblázat. A három valószínűsített *T. reesei* aldóz-1-epimeráz fehérje jellemzése

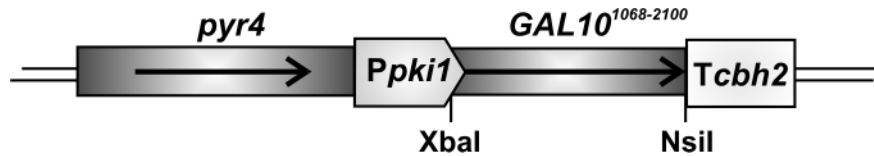
A három *T. reesei* gént *aep1*, *aep2* és *aep3*-nek (aldóz-1-epimeráz) neveztük el; az izoenzimekre vonatkozó nomenklatura szerint az egyes sorszámot az a gén kapta, melynek a levezetett proteinja a legalacsonyabb izoelektromos ponttal rendelkezik. Az AEP3 fehérjén szignálszekvencia található, vagyis ez az enzim extracelluláris. A másik két fehérje vélhetően intracelluláris.

Annak eldöntésére, hogy a három gén valamelyike kifejeződik-e, a gombát laktózon, D-galaktózon és D-glükózon tenyésztettük. Mivel a hagyományos Northern analízis rendkívül gyenge szignálokat eredményezett, RT-PCR technikát alkalmaztunk. Mint látható (5. ábra), az *aep3* viszonylag jól kifejeződött minden szénforráson a tenyésztés korai szakaszában, de laktózon 27 óras korban már nem. A másik két aldóz-1-epimeráz transzkriptum csak kis mennyiségben volt jelen D-glükózon és D-galaktózon, laktózon pedig egyáltalán nem jelent meg. Mindez azt mutatja, hogy *T. reesei*-ben nincs aldóz-1-epimeráz (mutarotáz) aktivitás, ha a gomba laktózon nő. Mivel azonban az, hogy valamit nem tudunk kimutatni még nem jelenti automatikusan azt, hogy valóban nincsen, állításunkat egy független módszerrel is bizonyítani próbáltuk. A mutarotáz aktivitását sem laktózon, sem D-galaktózon nem tudtuk kimutatni, sem a felülúszóból sem a sejtfal-törmeléből, sem intracellulárisan (a pozitív kontroll *S. cerevisiae* jelentős intracelluláris aktivitást mutatott). A mutarotáz kifejeződés, és az ebből következő aktivitáshiányra vonatkozó állításunkat tehát immár bizonyosra vettük.



5. ábra. A *T. reesei* *aep1*, *aep2* és *aep3* gének kifejeződése a szénforrás és a tenyésztési idő függvényében.

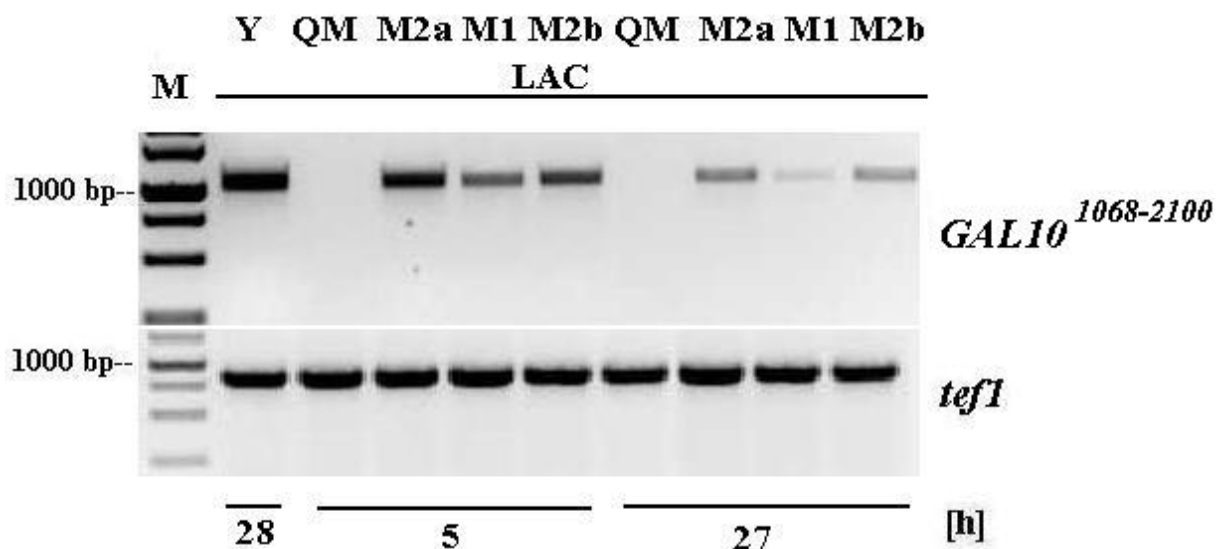
A következőkben a mesterségesen létrehozott mutarotáz aktivitás hatását vizsgáltuk a *T. reesei* gomba laktóz fenotípusára. Ehhez egy olyan *T. reesei* mutánst konstruáltunk, melybe beletranszformáltuk és túltermeltettük a *S. cerevisiae* élesztő bifunkcionális Gal10 fehérje C-terminálisának az 1068 – 2100 bp közötti részét ($GAL10^{1068-2100}$). Promoterként a konstitutív *pyr4*-et (piruvát kináz), terminátorként a *cbh2*-t (cellobiohidroláz 2) használtuk (6. ábra).



6. ábra. A $GAL10^{1068-2100}$ expressziós kazetta sematikus rajza

A transzformáció eredményeként kapott mutánsok közül hármat választottunk ki. Egyikük egy kópiában (M1), a másik kettő két kópiában tartalmazta a $GAL10^{1068-2100}$ régiót (M2a és M2b). Az integrációt PCR-rel, a kópiaszámot Southern analízissel ellenőriztük.

A transzformált szakasz mindhárom mutánsban kifejeződött, ráadásul a kópiaszámnak megfelelő mértékben (7. ábra).



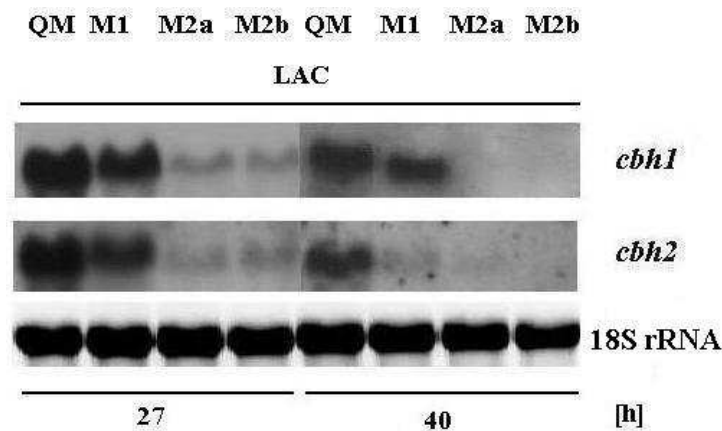
7. ábra. A $GAL10^{1068-2100}$ kifejeződése a *T. reesei* mutánsokban. Y = *S. cerevisiae*, M = marker

Mivel a génkifejeződés nem jelenti automatikusan működő a fehérjék megjelenését is, megmértük a mutánsokban a mutarotáz aktivitásokat. Mindháromban a kópiaszámnak megfelelően alakultak az intracelluláris értékek.

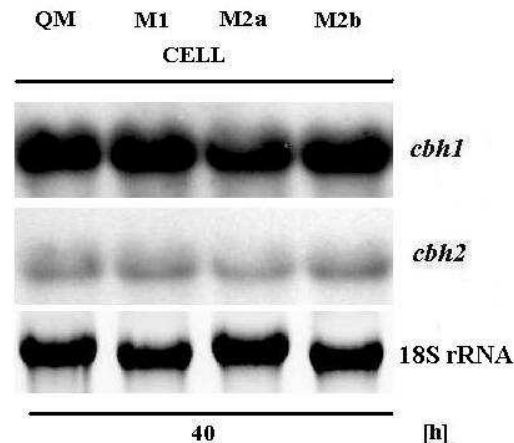
A fő kérdés ezek után az volt, hogy miként alakul a laktóz fenotípus, vagyis a laktóz felvételi ráta, a biomassza gyarapodás és – legfőképpen – a cellulázok kifejeződése a mutáns törzsekben a kontrollhoz képest. A laktóz felvétel gyorsabb lett, és ehhez fokozott biomassza-produkció is társult. Több más szénforráson (L-arabinóz, D-xilóz, D-glükóz, D-galaktóz, D-fruktóz, glicerol) is összehasonlítottuk a fenti paramétereket, de különbségeket nem találtunk. A hatás tehát specifikus volt a laktózra.

Végezetül a laktóz általi celluláz indukció mértékét vetettük össze a referencia illetve a vad típusú törzsből. A *cbh1* és *cbh2* kifejeződés is látványosan visszaesett, és a hatás újból

kópiaszám függőnek bizonyult (**8. ábra**). Azt, hogy a hatás specifikus a laktózra, cellulózon nőtt tenyészetek vizsgálatával bizonyítottuk: cellulózon a három mutáns és a referencia törzs ugyanolyan mértékben fejezte ki a celluláz géneket (**9. ábra**).



8. ábra. A celluláz gének kifejeződése laktózon. QM: referencia törzs.



9. ábra. A celluláz gének kifejeződése cellulózon. QM: referencia törzs.

A fenti eredmények azt mutatják, hogy a mutarotáz interferál a laktóz általi indukció mechanizmusával. A tényleges induktor természete egyelőre nem ismert, de feltételezhető, hogy olyan molekula, mely béta-D-galaktóz monomert (is) tartalmaz.

C) A redukív út szerepe a *T. reesei* béta-galaktozidáz génjének indukciójában

A béta-galaktozidáz (EC 3.2.1.23) enzimek a béta-D-galaktóz egységek hidrolízisét katalizálják a béta-D-galaktozid típusú szaccharidok terminális, nem-redukáló végéről. Ezen enzimek négy különböző glikozid hidroláz családba (GH1, GH2, GH35, GH42; Carbohydrate Active Enzymes Database: <http://www.cazy.org/>) tartoznak, ami jelentős szerkezetbeli különbségekre utal.

A *T. reesei* kizárólag extracellulárisan tudja a laktózt metabolizálni, ami a béta-galaktozidáz enzimet központi helyzetűvé teszi a laktóz anyagcserén belül. A gomba egy GH35 családba tartozó béta-galaktozidázt tartalmaz, melyet a *bgal* gén kódol. Delta-*bgal* (vagyis a *bgal* gént nem tartalmazó) *T. reesei* mutánsokban az eredeti béta-galaktozidáz aktivitásnak csupán kb. 8 %-a mérhető laktózon. Nem ismert, hogy ez az érték egy második béta-galaktozidáznak, avagy más hidrolázok reziduális aktivitásának köszönhető.

A *bgal* kifejeződésének szabályozása kevésbé ismert. A transzkriptum mennyisége L-arabinózon, L-arabinitolon és laktózon a legbősegebb, de D-galaktózon, D-xilózon és ezek polioljain is kimutatható. A transzkripció *cre1*-függő karbon katabolit represszió alatt áll, ami mind a bazális (-alap) aktivitás szintjére, mind a szénforrás általi indukcióra hat.

Mivel a D-galaktóz redukív lebontási útvonala lényegében a hemicellulóz pentózok (L-arabinóz, D-xilóz) lebontását végző enzimeket használja, kíváncsiak lettünk, hogy a redukív útvonalnak van-e szerepe a *bgal* gén indukciójában. Ehhez olyan mutáns *T. reesei* törzseket használtunk, melyek a Leloir illetve a redukív útvonal első lépéseiben (galaktokináz illetve aldóz reduktáz és L-arabinitol-dehidrogenáz) defektsek voltak. A mutánsok régi együttműködő partnerünk, Christian P. Kubicek professzor (TU Wien, Ausztria) laborjában készültek. A három közül az aldóz reduktáz mutánsnak ez volt az első fenotípus-tesztelése, ezért ezzel a törzzsel fokozott érdeklődéssel foglalkoztunk.

A szakirodalomból ismert (Seiboth és mtsai 2005), hogy a *bgal* gén delécióját követően a hiánymutánsban az extracelluláris béta-galaktozidáz aktivitás több, mint 90 %-al lecsökken, ami világosan mutatja, a *T. reesei*-ben a *bgal* gén meghatározó szerepet játszik a béta-galaktozidáz aktivitás képződésében. Ez a tény adta az ötletet, hogy az enzim aktivitását riporterként használjuk fel a *bgal* gén kifejeződésének vizsgálata során, ezzel ugyanis komoly költség-és munkamegtakarítást érhetünk el (a génkifejezések vizsgálatára laborunkban rutinszerűen használt Northern analízis kifejezetten költséges eljárás).

A hipotézis bizonyításához arról kellett meggyőződnünk, hogy a laktózon, 48 óras korban mért irodalmi adat (a teljes és a reziduális béta-galaktozidáz aktivitás aránya) más szénforrásokon illetve növekedési szakaszokban is érvényes. A laktóz mellett ezért D-galaktózon illetve annak poliolján, a galaktitolon tenyésztettük a gomba vad típusát valamint a $\Delta bgal$ mutánst, és a szénforrás teljes elfogyásáig rendszeresen (12 óránként) rögzítettük mindkét tenyészetben az extracelluláris béta-galaktozidáz aktivitások értékeit. Mind a három szénforráson a tenyészidőtől függetlenül a mutáns reziduális aktivitása csupán 4-8 %-a volt a vad típusú törzsben mérhetőnek. Kemosztát tenyészetekben $D = 0,075 \text{ h}^{-1}$ és $D = 0,030 \text{ h}^{-1}$ hígítási ráta értékeken, D-galaktóz valamint galaktitol-limitáció mellett ugyanilyen arány volt mérhető a két *T. reesei* törzs (vad típus és a $\Delta bgal$ mutáns) vonatkozásában. Megállapítottuk tehát, hogy az extracelluláris béta-galaktozidáz aktivitás megjelenése megbízható riportere a *bgal* gén kifejeződésének, ezért ezt a megközelítést alkalmaztuk munkánk során mindvégig.

Mivel batch tenyészetekben a béta-galaktozidáz kifejeződését indukáló legfontosabb szénforrások (laktóz, galaktóz, galaktitol) erősen eltérő növekedési rátákat eredményeznek, a *cbh1-cbh2*-hoz hasonlóan megvizsgáltuk, hogy a változó növekedési ráták befolyásolják-e a *bgal* gén kifejeződését. Ehhez újra kemosztát típusú folytonos tenyészeteket hoztunk létre, öt különböző hígítási ráta értéken. A $D = 0,075 \text{ h}^{-1}$ érték az exponenciális fázisban mérhető gyors, míg a $D = 0,015 \text{ h}^{-1}$ érték a stacioner fázisban mérhető lassú növekedést modellezi; a további három érték ezen két szélső érték között volt.

Mint azt az **3. táblázat** adatai mutatják, megegyező hígítási ráta értékeken a galaktóz szénforrás lényegesen magasabb béta-galaktozidáz aktivitásokat eredményezett, mint a laktóz. $D = 0,042 \text{ h}^{-1}$ érték fölött egyébként laktózon nem lehetett egyensúlyi tenyészetet létrehozni, mivel a tenyészet ezen érték fölött kimosódott a fermentorból. Másik megállapításunk az volt, hogy a D-galaktóz által indukált *bgal* génkifejeződés szigorúan növekedési ráta-függő: a legalacsonyabb és a legmagasabb növekedési rátaához tartozó értékek között mintegy ötszörös volt a különbség a gyorsan növekvő tenyészet javára.

A galaktitolról korábban leírták (Seiboth és mtsai 2005), hogy a laktóznál gyöngébben ugyan, de képes indukálni a *bgal* gén kifejeződését *T. reesei*-ben. A galaktitol azonban batch tenyészetben csak alacsony növekedési ráta elérését teszi lehetővé, szakaszos tenyészetekben ezért problematikus a többi szénforrással való összevetése. A megoldást ez esetben is a kemosztát típusú folytonos tenyészetek létrehozása jelentette. Mint látható (**3. táblázat**), a

galaktitollal nem lehetett $D = 0,015 \text{ h}^{-1}$ hígítási rátánál egyensúlyi tenyészetet létrehozni, melynek valószínűleg a lassabb metabolizmusból következő magasabb fenntartási energia (maintenance energy) igény az oka. Valóban, galaktitolon csak valamivel alacsonyabb ($1.36 \pm 0.17 \text{ g l}^{-1}$) egyensúlyi biomassa koncentrációt lehetett elérni a laktózhoz illetve galaktózhoz képest. Amikor azonban olyan hígítási rátát alkalmaztunk galaktitol limitáció, amelyen fenntartható volt az egyensúlyi állapot, a *bgal* gén kifejeződése még a galaktózon mért értékeket is felülmúlta. Az aktivitási értékek a hígítási rátával párhuzamosan emelkedtek, vagyis a génkifejeződés galaktitolon is növekedési ráta függőnek bizonyult.

EXTRACELLULÁRIS B-GALAKTOZIDÁZ AKTIVITÁS [U ML ⁻¹]						D [h ⁻¹]
Laktóz	Galaktóz	Galaktitol	Galaktóz + Galaktitol	Glükóz	Galaktóz + Glükóz	
kimosódás	10,12	kimosódás	kimosódás	0	0	0,075
kimosódás	8,88	9,01	9,14	0	0	0,050
6,74	8,45	8,78	8,12	0	0	0,042
4,07	5,98	6,45	6,02	0	0,75	0,030
1,24	2,12	instabil	instabil	0,81	2,72	0,015

3. táblázat. *T. reesei* szénforrás-limitált kemosztát tenyészeiben mérhető extracelluláris béta-galaktózidáz aktivitások

Amikor limitáló szénforrásként equimoláris mennyiségű galaktózt és galaktitolt alkalmaztunk (**3. táblázat**), a *bgal* gén kifejeződése valamivel visszaesett a csak galaktitolon mért értékekhez képest, a csökkenés azonban a mérési hibahatár körül mozgott. Ez azt sugallta, hogy a galaktóz és a galaktitol ugyanazt a transzkripciós aktivátort stimulálja, vagy – még általánosabban megfogalmazva – ugyanazon mechanizmus szerint indukálják a *bgal* gént.

Egy korábbi közleményünkben leírtuk (Ilyés és mtsai 2004), hogy a karbon katabolit represszió determinánsa a specifikus növekedési ráta, ezért represszálo szénforráson – amilyen a D-galaktóz – a *creA/creI* függő gének kifejeződésének a specifikus növekedési rátával fordított arányosságban kell lennie. Valóban, alacsony növekedési rátán glükóz-limitáció mellett számos gén derepressziót szenved. Az ellentmondás feloldása céljából megvizsgáltuk, hogy D-glükózon (a legerősebb represszálo szénforráson) hogyan alakul a növekedési ráta függvényében a *bgal* gén kifejeződése. Mint az **3. táblázatból** kiolvasható, széles tartományban nem volt *bgal* expresszió, azonban a legalacsonyabb, $D = 0,015 \text{ h}^{-1}$ hígítási ráta értéken viszonylag nagymértékű átíródást tapasztaltunk. Az érték az ugyanilyen körülmények között laktózon mérhetőnek 55 %-a, a galaktózon mérhetőnek 30 %-a volt.

Végezetül a D-glükóz és D-galaktóz együttes limitációjának hatását vizsgáltuk meg. Mint látható (**3. táblázat**), $D = 0,015 \text{ h}^{-1}$ hígítási rátánál a *bgal* kifejeződése számottevően megnövekedett a csak glükóz által limitált tenyészethez képest, $D = 0,030 \text{ h}^{-1}$ hígítási rátánál pedig alacsony mértékű génkifejeződést tapasztaltunk. Az eredmények egyértelműen azt mutatják, hogy a D-glükóz hatása interferál a D-galaktózával a *bgal* gén kifejeződése szempontjából, és magasabb ($D > 0,030 \text{ h}^{-1}$) hígítási ráta értékeknél egyértelműen represszál. A legalacsonyabb, derepresszáló hígítási ráta értéknél azonban a glükóz represszáló hatása megszűnik, a derepresszió pedig additívan járul hozzá a D-galaktóz indukciós hatásához.

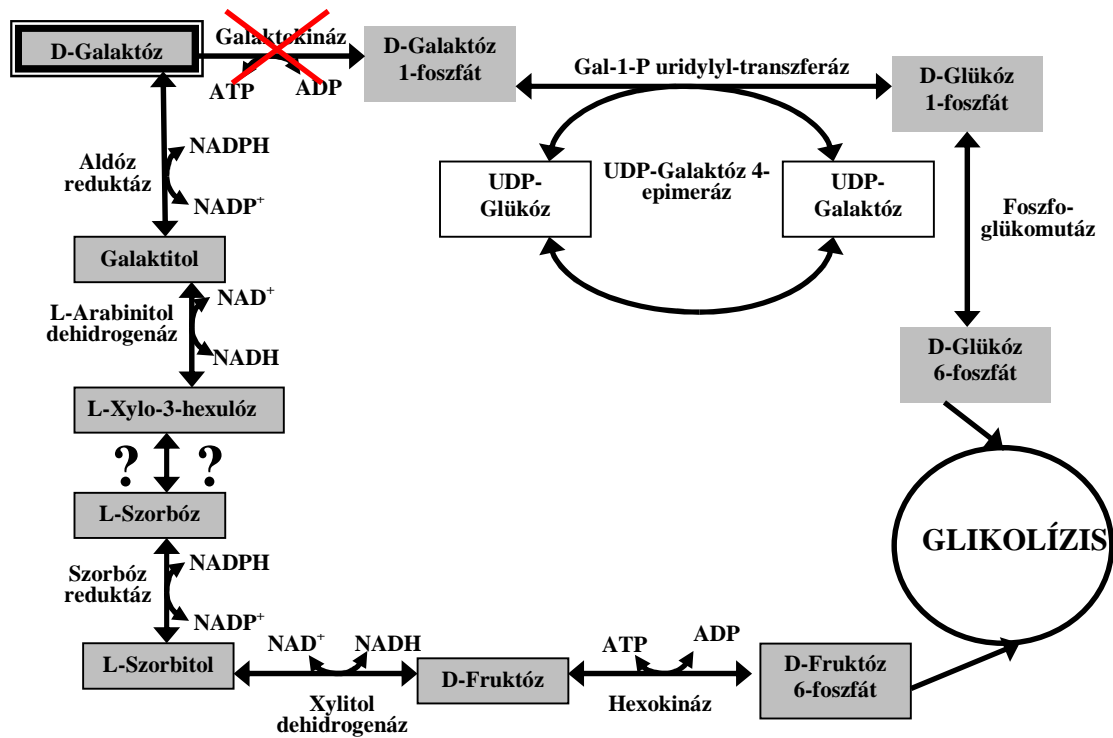
Melyik galaktóz lebontási útvonal generálja a *bgal* induktorát?

Az inducer azonosításához vezető út első állomása annak tisztázása volt, hogy a D-galaktóz önmagában indukál, avagy valamelyik lebontási útvonal generálja az induktort. A kérdés megválaszolásához két mutáns törzset használtunk: az egyik a Leloir-útvonal első lépését jelentő galaktokináz aktivitásban volt hiányos, a másik a reduktív út első enzimében, az aldóz reduktázban. A két mutáns galaktóz anyagcseréjének összehasonlítását a **10. és 11. ábrák** könnyítik meg.

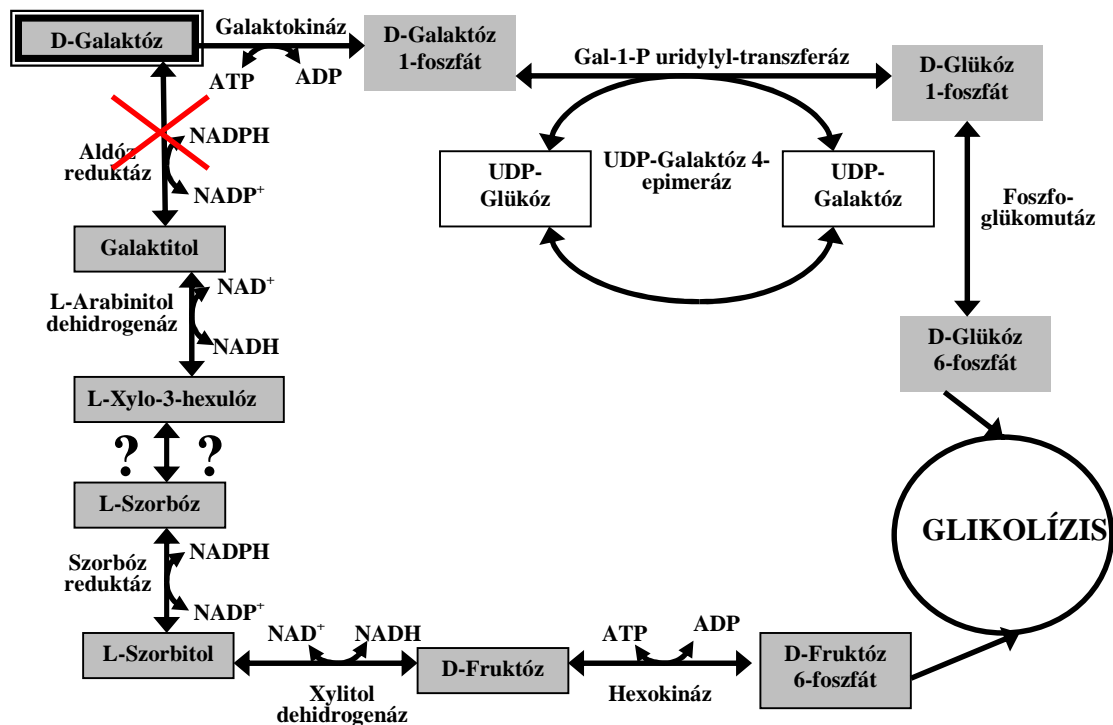
Mivel a mutációk megváltoztatták a törzsek maximális növekedési rátáit a vizsgált szénforrásokon, valamint (véltetően) az intracelluláris metabolitok minőségét és mennyiségét is, nem lett volna értelme folytonos kemosztát tenyészetekben összehasonlítani a béta-galaktozidáz aktivitásokkal jelzett *bgal* kifejeződési értékeket. A következő kísérleteket ezért rázott lombikokban végeztük. Mint a **4. táblázat** mutatja, a $\Delta xy11$ törzs galaktitolon a vad típusal összevethető béta-galaktozidáz aktivitásokat mutatott, ami jelezte, a galaktitol Leloir-útvonalon történő metabolizmusa (vagyis a galaktitol – galaktóz átalakulás) szükségtelen az indukcióhoz. Ezzel szemben D-galaktózon a $\Delta xy11$ törzs gyakorlatilag nem mutatott béta-galaktozidáz aktivitást, ami világosan mutatta, a galaktóz – galaktitol átalakulás viszont szükséges a konverzióhoz. Fontos megjegyezni, hogy a $\Delta xy11$ törzs a vad típusnál gyengébben ugyan, de képes volt mindkét vizsgált szénforráson növekedni.

<i>T. reesei</i> törzsek	Extracelluláris β -galaktozidáz aktivitás [nkat mg^{-1} DCW]		
	D-galaktóz	Galaktitol	D-glükóz
QM9414 (vad típus)	68	83	< 0.1
$\Delta xy11$	2	53	< 0.1
$\Delta gal1$	20	70	< 0.1
$\Delta lad1$	60	115	< 0.1

4. táblázat. Galaktóz anyagcserében sérült *T. reesei* törzsek *bgal* kifejeződésének összehasonlítása a szénforrás függvényében.



10. ábra. *T. reesei* galaktokináz hiányos mutáns galaktóz anyagcseréjének vázlatja



11. ábra. *T. reesei* aldóz reduktáz hiányos mutáns galaktóz anyagcseréjének vázlatja

A vizsgálat tükröképét jelentette, amikor a $\Delta gal1$ mutánst galaktózon és galaktitolon növesztettük (a kontrollt jelentő glükóz szénforráson egyik mutáns sem mutatott *bgal* kifejeződést; **4. táblázat**). Minőségi értelemben a mutáns mindkét szénforráson expressziót mutatott, ami jelezte, a galaktokináz enzim és a Leloir-útvonal köztesei nem esszenciálisak az indukcióhoz. Az erősen lecsökkent aktivitások valószínűleg annak tudhatók be, hogy ez a mutáns gyengén nőtt galaktózon és galaktitolon. Az eredményeket összevetve kijelenthetjük, a Leloir-útvonal nem esszenciális a *bgal* gén D-galaktóz általi indukciójában.

A *bgal* gén valódi inducere

A reduktív D-galaktóz lebontási útvonal második enzime az L-arabinitol 4-dehidrogenáz. Annak eldöntéséhez, hogy maga a galaktitol, esetleg egy lebontása során képződő későbbi metabolit felelős-e a *bgal* gén indukciójáért, egy $\Delta lad1$ törzset növesztettünk galaktitol illetve galaktóz tartalmú minimál táptalajon. A $\Delta lad1$ törzs nem nő galaktitolon, míg galaktózon csaknem olyan jól nő, mint a vad típus. A **4. táblázat** adatai mutatják, hogy a béta-galaktozidáz aktivitás (= a *bgal* génexpresszió) hasonló mértékű volt galaktózon, mint a vad típusnál, galaktitolon pedig még meg is haladta azt. Ezek az eredmények világosan mutatják, hogy a galaktitol önmagában, a galaktóz redukciója során képződve, képes a *bgal* gén indukciójának kiváltására.

Összefoglalóan elmondhatjuk, hogy a *T. reesei* gomba laktózon való növekedésének képessége nagymértékben függ a *bgal* gén által kódolt extracelluláris béta-galaktozidáz enzim keletkezésétől. Rázott lombikos tenyészetek elemzése azt mutatta, hogy a *bgal* expreszióját a laktóz, a galaktóz, valamint (kisebb mértékben) a galaktitol is képes indukálni. Szénforrás-limitált kemosztát típusú folytonos tenyészetek elemzése azt mutatta, hogy az indukciós adatok nagymértékben függenek az adott szénforráson elérhető maximális növekedési ráta értékétől; megegyező hígítási rátákon a galaktitol és a galaktóz volt a legerősebb induktor. Az indukció mértéke minden esetben pozitívan korrelált a növekedési rátával. A galaktokináz hiányos törzs indukálható volt D-galaktózzal és galaktitollal, viszont az aldóz reduktáz hiányos mutáns *bgal* génje már csak galaktózzal volt indukálható. A reduktív út második lépésében hiányos L-arabinitol 4-dehidrogenáz mutáns viszont mindkét szénforrás által indukálható maradt. Megállapítottuk tehát, hogy a *bgal* gén induktora a galaktitol.

D) Az *Aspergillus niger* galaktóz-negatív fenotípusának analízise

Mint a Problémafelvetés részben láttuk, a D-galaktózt az *A. niger* gomba nem, vagy csak gyengén tudja hasznosítani. Ennek okáról munkánk kezdetéig mindössze egy közlemény jelent meg (Elshafei és Abdel-Fatah 2001). Eszerint az *A. niger* sejtmentes kivonatát enzimforrásként használva a D-galaktóz nem foszforilezhető. A jelenséget a galaktokináz gén mutációjával magyarázták, de genetikai vizsgálatokat nem végeztek.

Vizsgálataink során a galaktokináz gén illetve a galaktokináz aktivitás meglétét illetve hiányát próbáltuk meg egyértelműen bizonyítani. Kontrollként az *A. nidulans* gomba szolgált, melyről korábban munkacsoportunk bebizonyította, hogy ép LeLoir-útvonallal rendelkezik (Fekete és mtsai 2002). Negatív kontrollként az *A. nidulans* definiált galaktokináz negatív mutáns törzsét (A214) használtuk.

Munkánk első lépéseként ellenőriztük az *A. niger* galaktóz negatív fenotípusát egy vad típusú törzs (N402) felhasználásával. Galaktózt egyedüli szénforrásként tartalmazó táptalajon az *A. niger* konidiumok nem voltak képesek felvenni a D-galaktózt. Ezzel szemben az *A. nidulans* vad típus viszonylag jól nőtt D-galaktóz szénforráson. Nitrogénforrásként egyedül nitrátot tartalmazó táptalajon az *A. nidulans* galaktokináz mutáns – az irodalmi adatokkal

összhangban (Fekete és mtsai 2004) – nem tudott nőni, vagyis a D-galaktóz felvételi illetve biomassza produkciós profilja az *A. niger* vad típusú törzshöz hasonlított.

Az *A. niger* negatív fenotípusa – az általunk vizsgált szénforrások közül – kizárólag a D-galaktózra vonatkozott. D-glükóz, L-arabinóz, glicerin, D-xilóz, galaktitol, D-fruktóz és szacharóz szénforrásokon nem volt számottevő különbség az *A. nidulans* vad típusú törzsének növekedéséhez képest. Laktózon valamivel gyengébben nőtt a tenyészet az *A. nidulans*-hoz képest, agarral szilárdított laktóz-minimál táptalajon azonban teljes életciklusát befutotta. A fenotípust így laktózon pozitívnak nyilvánítottuk, viszont bizonyítva láttuk a D-galaktóz negatív fenotípus meglétét.

Az *A. niger* galaktokináz aktivitásának képződésével kapcsolatos egyetlen irodalmi adat (Elshafei és Abdel-Fatah 2001) szerint ez a faj *in vitro* nem képes foszforilezni a D-galaktózt. A munkacsoportunk által kifejlesztett HPLC-alapú módszer segítségével (Fekete és mtsai 2002) görcső alá vettük ezt a megállapítást.

Gombatörzs	Szénforrás				
	D-galaktóz	Laktóz	L-arabinóz	glicerol	D-glükóz
<i>Aspergillus nidulans</i> R21	0.320	0.155	0.298	0.140	0.120
<i>Aspergillus niger</i> N-402	0.285	0.192	0.198	0.106	0.084
<i>Aspergillus nidulans</i> A214	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001

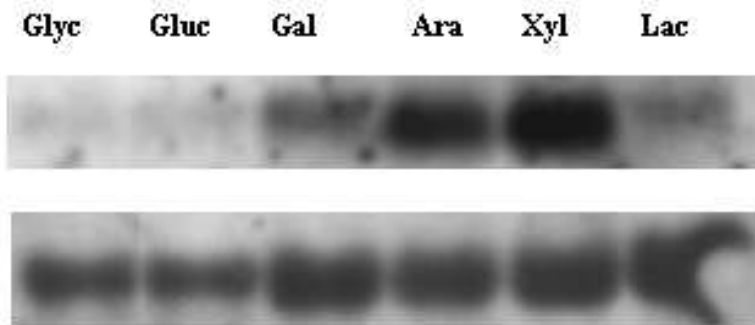
5. táblázat. Az *A. nidulans* és az *A. niger* vad típusú törzsek intracelluláris galaktokináz aktivitása különböző szénforrásokon

Mint látható, az intracelluláris galaktokináz aktivitás minden vizsgált szénforráson megjelent. A szénforrás-profil hasonlított az *A. nidulans*-hoz, amennyiben D-galaktózon és L-arabinózon valamivel magasabb volt, mint D-glükózon. A számszerű értékek valamivel kisebbek voltak az *A. nidulans* esetében tapasztaltaknál, de ettől függetlenül egyértelműen kijelenthettük, az *A. niger* rendelkezik intracelluláris galaktokináz aktivitással. Kontrollként az *A. nidulans* galaktokináz hiányos mutáns törzse (A214) szolgált. Az analitikai módszer megbízhatóságát jelzi, hogy ebben a törzsben nem tudtunk galaktokináz aktivitást detektálni.

Az *Aspergillus niger* galaktokináz gén izolálása és expressziója

A DSM nevű holland cégtől megkaptuk az Open Reading Frame teljes szekvenciáját (4.695 bp), mely három exont tartalmaz. A gén erősen homológ a *Saccharomyces cerevisiae* élesztő galaktokinázához. A gén megléte jelentős előrelépés volt annak bizonyításában, hogy

a galaktokináz aktivitás hiánya nem lehet oka a galaktóz negatív fenotípusnak *A. niger*-ben. A génnek azonban ki is kell fejeződnie ahhoz, hogy hozzá rendelhessük az előzőekben tárgyalt galaktokináz aktivitásokat. A Northern analízis eredményei a **12. ábrán** láthatók.



12. ábra. Az *A. niger* N402 törzs galaktokináz génjének kifejeződése különböző szénforrásokon. Glyc=glicerin; Gluc=D-glükóz; Gal=D-galaktóz; Ara=L-arabinóz; Xyl=D-xilóz; Lac=laktóz. Az alsó ábrarész a 18S rRNS mennyiségét mutatja, amit kontrollként használtunk.

Mint látható, D-galaktóz, L-arabinóz, laktóz és D-xilóz szénforrásokon erőteljes, glicerinen és D-glükózon gyengébb, de azért egyértelmű galaktokináz génexpressziót detektáltunk. Az eredmények jellege megegyezik a galaktokináz aktivitásokéval, ahol D-glükózon és glicerinen szintén valamivel alacsonyabb aktivitásokat kaptunk a D-galaktózhoz és L-arabinózhhoz képest. Megállapítható tehát, hogy az *A. niger* gomba (a) rendelkezik galaktokináz génnel, (b) a gén kifejeződik, és (c) galaktokináz enzimaktivitást is mutat. Mindezek együtt azt sugallják, hogy az *A. niger* D-galaktóz negatív fenotípusa nem a galaktokináz rendszer számlájára írható.

Az *Aspergillus niger* micélium növekedése D-galaktózon

A galaktóz anyagcsere első, alapvető lépése a transzport, melynek során a külső térből a molekula sejten belülre kerül. A D-galaktóz egy specifikus permeáz révén kerül be a sejtbe. A már ismertetett kísérletek azt mutatták, hogy a konidiospórák nem tudják felvenni a D-galaktózt. Kíváncsiak voltunk, hogy a vegetatív gombamicéliumok képesek-e rá. A kérdés eldöntéséhez glicerines táptalajban előnövesztettük az *A. niger* spórákat, és az exponenciális fázisban lévő tenyészeteket D-galaktózt tartalmazó táptalajba mostuk át. Meglepetésünkre a tenyészet, ha nem is gyorsan, de felvette a D-galaktózt és biomasszát képzett rajta. Mindez azt jelenti, hogy az *A. niger* genetikailag alkalmas a D-galaktóz hasznosítására, a D-galaktóz negatív fenotípusnak egy adott növekedési szakaszhoz (a spóra csírázáshoz) köthető élettani okai vannak.

Összefoglalás

A fentiekben vázolt eredmények – reményeink szerint – igazolják véleményünket, miszerint az élettani megfigyelések molekuláris biológiai módszerekkel történő vizsgálata még nagyon sok újdonságot tartalmazhat egy olyan „rég”, jól ismert fermentációs ipari szénforrás esetében is, mint amilyen a laktóz. A gombák számára a laktóz nem természetes szubsztrátum, hiszen a természetben emlőstejjel elvétele találkozunk, ráadásul evolúciósan is jóval korábban alakultak ki. Másfelől azonban a laktóz szén-és energiaforrás, amit a gombák lehetőség szerint igyekeznek hasznosítani. Nem meglepő tehát, hogy a lebontásnak több variációja alakult ki, és ezek több fontos ponton is kölcsönhatnak az általános anyagcserével. Noha közel 8 esztendeje foglalkozom a laktóz és D-galaktóz anyagcsere tulajdonságaival és szabályozásával, úgy érzem, még mindig számos érdekes rejtélyt tartalmaz ez a terület.

Hivatkozások

- 1) Bentley R, Bhate DS (1960 b): Mutarotase from *Penicillium notatum*. II. The mechanism of the mutarotation reaction. *J. Biol. Chem.* 235: 1225-1233.
- 2) Bettenbrock K, Alpert CA (1998): The *gal* genes for the Leloir pathway of *Lactobacillus casei* 64H. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 2013 – 2019.
- 3) Bentley R, Bhate DS (1960 a): Mutarotase from *Penicillium notatum*. I. Purification, assay, and general properties of the enzyme. *J. Biol. Chem.* 235: 1219-1224.
- 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) Cardinali G, Vollenbroich V, Jeon MS, de Graaf AA, Hollenberg CP (1997): Constitutive expression in *gal7* mutants of *Kluyveromyces lactis* is due to internal production of galactose as an inducer of the *Gal/Lac* regulon. *Mol. Cell. Biol.* 17: 1722 -1730.
- 6) Chang YD, Dickinson RC (1988): Primary structure of the lactose permease gene from the yeast *Kluyveromyces lactis*. Presence of an unusual transcript structure *J. Biol. Chem.* 263: 16696-16703.
- 7) Chassy BM, Thompson J (1983): Regulation and characterization of the galactose-phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system in *Lactobacillus casei*. *J. Bacteriol.* 154: 1204 -1214.
- 8) Dey PM (1983): Galactokinase of *Vicia faba* seeds. *Eur. J. Biochem.* 136: 155-159.
- 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) Elshafei AM, Abdel-Fatah OM (2001): Evidence for a non-phosphorylated route of galactose breakdown in cell-free extracts of *Aspergillus niger*. *Enzyme Microb. Technol.* 29: 76-83.
- 12) 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.
- 13) Fekete E, Karaffa L, Sándor E, Bányai I, Seiboth B, Gyémánt G, Sepsi A, Szentirmai A, Kubicek CP (2004): The alternative D-galactose degrading pathway of *Aspergillus nidulans* proceeds via L-sorbose. *Arch. Microbiol.* 18: 35-44.
- 14) Foreman PK (2003) Transcriptional regulation of biomass-degrading enzymes in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *J. Biol. Chem.* 278: 31988-31997.
- 15) Frey PA (1996): The Leloir pathway: a mechanistic imperative for three enzymes to change the stereochemical configuration of a single carbon in galactose. *FASEB J.* 10: 461-470.
- 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) 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.
- 18) Karaffa L, Fekete E, Gamauf C, Szentirmai A, Kubicek CP, Seiboth B (2006): D-Galactose induces cellulase gene expression in *Hypocrea jecorina* at low growth rates. *Microbiology-SGM*, 152: 1507-1514.
- 19) Kinoshita S, Kadota K, Taguchi H (1981): Purification and properties of aldose 1-epimerase from *Aspergillus niger*. *Biochim. Biophys. Acta* 662: 285-290.

- 20) Meyer J, Walker-Jonah A, Hollenberg CP (1991): Galactokinase encoded by *GAL1* is a bifunctional protein required for the induction of the *GAL* genes in *Kluyveromyces lactis* and is able to suppress the *gal3* phenotype of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 11: 5454-5461.
- 21) 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.
- 22) 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.
- 23) Nikolaev IV, Vienzski YP (1998): L-arabinose induces synthesis of secreted β -galactosidase in the filamentous fungus *Penicillium canescens*. *Biochem. (Moscow)* 63: 1294-1298.
- 24) Penttilä M. (1998): Heterologous protein production *Trichoderma*. In: *Trichoderma and Gliocladium Vol. 2, Enzymes, biological control and commercial applications*, ed: Harman GE, Kubicek CP, pp 365-383. Taylor and Francis Ltd., London, UK.
- 25) Pettersson H, Pettersson G (2001) Kinetics of the coupled reaction catalysed by a fusion protein of beta-galactosidase and galactose dehydrogenase. *Biochim Biophys Acta.* 1549:155-60
- 26) Roelfsema WA, Kuster FM, Plum H (1990): Lactose and derivatives. Elvers B, Hawkins S, Schulz G (eds) *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, 4th ed. pp 107-114. VCH Weinheim FRG.
- 27) Seiboth B, Hartl L, Pail M, Fekete E, Karaffa L, Kubicek CP (2004): The galactokinase of *Hypocrea jecorina* is essential for cellulase induction by lactose but dispensable for growth on D-galactose. *Mol. Microbiol.*, 51: 1015-1025.
- 28) Seiboth B, Hartl L, Salovuori N, Lanthaler K, Robson GD, Vehmaanpera J, Penttilä ME, Kubicek CP (2005): Role of the *bga1*-encoded extracellular {beta}-galactosidase of *Hypocrea jecorina* in cellulase induction by lactose. *Appl Environ Microbiol.* 71: 851-857.
- 29) Shuster CW, Doudoroff M (1967): Purification of 2-keto-3-deoxy-6-phosphohexonate aldolases of *Pseudomonas saccharophila*. *Arch. Mikrobiol.* 59: 279-86.
- 30) Zeilinger S, Schmoll M, Pail M, Mach RL, Kubicek CP. (2003): Nucleosome transactions on the *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*) cellulase promoter *cbh2* associated with cellulase induction. *Mol. Genet. Genom.* 270: 46-55.