

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

A laktóz és D-galaktóz anyagcsere molekuláris mechanizmusainak vizsgálata *Aspergillus nidulans* gombában

Examination of molecular mechanism for metabolism of lactose and D-galactose in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*

Kovácsné Orosz Anita

Témavezető/Supervisor: Dr. Fekete Erzsébet



DEBRECENI EGYETEM
Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola
Debrecen
2016

I. BEVEZETÉS

A tejipar nagy mennyiségű folyékony hulladékot halmoz fel (Gänzle és mtsai., 2008). A sajtgyártás során a tej komponenseinek csupán 85%-a kerül felhasználásra, míg a tejsavónak nevezett laktózt tartalmazó melléktermék nem hasznosítható (Marwaha és Kennedy, 1988). Ezért világszerte több mint 1,5 millió tonna halmozódik fel évente (Roelfsema, 2010). A laktóz biotechnológiai felhasználásának nehézségei annak is köszönhető, hogy a tejsavó laktóz koncentrációja alacsony, így a feldolgozási folyamat első lépését annak koncentrációja képezi. Az élelmiszeripar számára a laktóz felhasználása limitált, mivel a laktóz érzékenységben vagy galaktozémiában szenvedők számára arányosan csökken annak felhasználhatósága (Novelli és Reichardt 2000; Campbell és mtsai., 2005). Kezelés vagy felhasználás hiányában a tejsavó környezetvédelmi problémákat okoz, specifikus szennyvízkezelő rendszerek kiépítése pedig költséges. Ezért mindenképpen indokolt olyan folyamatok részévé tenni, melyek során hozzáadott értékű termékek létrehozását szolgálja (Panesar és Kennedy, 2012). A tejsavó hasznosítható a szükséges fermentációs folyamatok optimalizálásához, továbbá alkalmazható a második generációs bioüzemanyag-termelésben történő felhasználáshoz, valamint annak eltávolításához a szennyezett talajból és vízből (bioremediáció).

Példaértékű megoldást jelent az ipari fermentációs biotechnológia, amely a tejsavót a hagyományos értelemben vett olcsó és bőségesen rendelkezésre álló növekedési szubsztrátként és nitrogén forrásként alkalmazza a mikroorganizmusok, gombák számára (Coghill és Moyer, 1947; Silva és mtsai., 2009; Panesar és mtsai., 2006; Kumari és mtsai., 2011; Aghcheh és Kubicek, 2015). Éppen ezért elengedhetetlen fontosságú a laktóz lebontás tanulmányozása számos fonalas gomba, többek között a genetikai modellnek számító *Aspergillus nidulans* talajlakó szaprofita faj esetében.

Az egyetlen természetes laktózforrás az emlősök teje. A heterodiszacharid (1,4-O- β -D-galaktopiranozil-D-glükóz) laktóz a tej legfontosabb szénhidrátkomponense, amely az emlőmirigyek Golgi organellumában szintetizálódik. A laktóz az UDP-galaktózból és D-glükózból keletkezik laktátszintetáz hatására, amely α -laktalbumin és galaktoziltransferáz egységekből épül fel.

Nem minden mikroorganizmus képes a laktóz hasznosítására. Ez azért is érdekes, mert a laktózhasznosítás *lac* operon által történő szabályozása az *Escherichia coli* baktériumban a prokarióta génszabályozás paradigmájává vált, mégis a természetben számos baktérium nem hordozza ezt a tulajdonságot. A fermentációs ipari jelentőségű gombafajok közül a pékélesztő (*Saccharomyces cerevisiae*) és az *Aspergillus niger* képtelen a laktózt katabolizálni (Seiboth és mtsai., 2007; Fekete és mtsai., 2012).

A legtöbb mikroorganizmus ugyan képes hidrolizálni a laktózt D-glükóz és D-galaktóz monomerekre, de a tejcukor mindenképpen lassan hasznosuló szénforrás lesz. Ennek oka az, hogy a mikroorganizmusok természetes élőhelyein nem fordul elő, továbbá megjelenése a természetben evolúciósan későbbre tehető. A lassú laktóz hasznosítás azonban elősegíti a karbon katabolit represszió alatt álló szekunder anyagcseretermékek (metabolitok) és polimer-lebontó enzimek keletkezését, ezért a tejsavót régóta használja a fungális fermentációs biotechnológiai ipar olyan folyamatokhoz, mint a *Trichoderma reesei* fonalas gomba celluláz, vagy a *Penicillium chrysogenum* által történő penicillin termelése; azonban ez csupán a világon évente keletkező mennyiség 15%-át jelenti (Roelfsema és mtsai., 1990). A *T. reesei* esetében olyan génmanipulált törzset hoztak létre, amelynek a celluláz enzimet kódoló génjét egy laktózzal indukálható promóterre cserélték, ezáltal a laktózt rekombináns fehérjék ipari előállítására is használják. A fentiek alapján belátható, hogy több szempontból is hasznos lehet a laktóz asszimiláció mechanizmusainak megértése a gombafermentációkban. A kihívást jelentő probléma megoldásához elengedhetetlen, hogy mélyrehatóan tanulmányozzuk a gombák laktóz katabolizmusának fiziológiáját.

Az a tény, hogy a mikroorganizmusok egy része képes növekedni laktózon laboratóriumi körülmények között sokkal inkább véletlen, mintsem evolúciósan „tervezett” biokémiai folyamat, emiatt gyakori a nemzetség, sőt fajspecifikus biokémiai megoldások aránya.

A laktózt fermentáló *Kluyveromyces lactis* élesztő LAC rendszerének működése az alacsonyabb rendű eukarióták transzkripció szintű szabályozásának egyik paradigmája (Cardinali és mtsai., 1997; Baruffini és mtsai., 2006; Rigamonti és mtsai., 2011). Az Ascomycota fonalas gombákban azonban a laktóz anyagcsere számos kulcsfontosságú metabolikus lépése kevésbé ismert (Seiboth és mtsai., 2007; Karaffa és mtsai., 2013).

Munkacsoportunk az *Ascomycota* törzs, *Pezizomycotina* altörzs, *Eurotiomycetes* osztály; *Eurotiomycetidae* alosztály; *Eurotiales* rendjének; *Aspergillaceae* családjába tartozó *Aspergillus nidulans* (*Emericella nidulans*) fonalas gomba laktóz katabolizmusának tanulmányozását tűzte ki célul.

II. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

A rázott lombikban és a bioreaktorban történő tenyésztési feltételek a következők szerint valósultak meg (lásd Fekete és mtsai. (2002)).

A törzseket 10 g/l glükóz és a törzs auxotrófia igényeit biztosító ún. spóráztató agarra oltottuk le. A növekedés 37°C-on, 3-4 napig történt. Ezt követően a törzseket felhasználásig +4°C-on tároltuk.

1. A spóráztató táptalaj összetétele:

0,092 g/l di-ammónium-tartarát; 10 g/l glükóz; 20 ml/l sóoldat; az adott törzs auxotróf markerei; 15 g/l agar pH=6,5 (Pontecorvo és mtsai., 1953).

Új ferdeagaros tenyészetek leoltásakor mindig ellenőriztük, hogy a genotípus változatlan-e. A glükózt 50%-os oldatként használtuk, és külön sterilizáltuk. A vitamin kiegészítők többségét (p-amino-benzoésav [H1-vitamin], piridoxin [B6-vitamin], riboflavin [B2-vitamin] 2mg/l, a biotint [B7-vitamin] viszont 1 mg/l, az uridint 10 mM-os végkoncentrációban AMM (Aspergillus Minimal Medium; Pontecorvo és mtsai., 1953) tápoldathoz adtuk hozzá.

2. Az AMM tápoldat összetétele:

6g/l NaNO₃, 2 ml sóoldat; 10 g/l szénforrás; az adott törzs auxotróf markere(i); pH=6,5. (Pontecorvo és mtsai., 1953).

3. A sóoldat összetétele:

26 /l KCl; 26 g/l MgSO₄·7H₂O; 76 g/l KH₂PO₄; 50 ml/l nyomelemoldat.

A nyomelemoldat alkotói: 40 mg/l Na-borát; 400 mg/l CuSO₄· 5H₂O; 714 mg/l FeSO₄· 7H₂O; 8 mg/l Na-molibdát; 800 mg/l ZnSO₄· 7H₂O; pH= 2,0.

Az AMM2 tápoldat összetétele elsősorban a nitrogénforrás minőségében tér el. Az AMM2 tápoldat összetétele: 8 g/l NH₄H₂PO₄; 2 ml sóoldat (lásd fent); 10 g/l szénforrás; az adott törzs markere(i); 0,1 g/l CaCl₂; pH=6,5.

Az alkalmazott szénforrások kezdeti koncentrációja 1,5%. A tenyésztésekhez használt sterilizett tápoldatok beoltása 10^6 *A. nidulans* konídium/ml mennyiséggel történt. A rázott lombikos tenyészeteket 500 ml-es Erlenmeyer-lombikokban végeztük 100 ml tápoldatban, 37 °C-on, 200 percenkénti fordulatszámon (rpm).

Az indukciós kísérletekhez a micéliumokat 37 °C-on 24 órán át előtenyésztettük glicerinnel semleges szénforrást tartalmazó AMM2 minimál tápoldaton, majd a tenyészetet egy zsugorított üvegszűrőn történő szűrését és steril vízzel történő mosását követően szénforrás nélküli AMM2 tápoldatba vittük át és további 1 órán át inkubáltuk 200 rpm rázatás mellett 37 °C-on. Az 1 órás éheztesítés után a tenyészethez adagoltuk a vizsgálandó indukciós szénforrást 25 mM-os végső koncentrációban.

A tenyészetekből mintát vettünk 3, 6 és 12 óra elteltével az indukciós képesség vizsgálatához.

2. Laktóz felvételi kísérletek

A konídiospórával leoltott tápoldat inokulálása egy éjszakán át, 15 g/l glicerinnel szénforrás jelenlétében történt. A felnövesztett micéliumot alapos átmosást követően friss, egyedüli szénforrásként laktózt (15 g/l) tartalmazó AMM2 tápoldaton növesztettük tovább 24 órán át.

Ezt követően a micéliumot steril „miracloth” segítségével átszűrtük, majd alapos átmosást követően 500 ml-es Erlenmeyer-lombikban lévő friss szénforrás nélküli AMM2 tápoldatba szuszpendáltuk, így a végső biomassza koncentrációja 1 g/l. A laktózt 0,2 mM, 0,5 mM és 2 mM végkoncentrációban adagoltuk a tenyészetbe, majd 6 órán át figyelemmel kísértük a diszacharid fogyását, miközben a tenyészeteket 37°C-on és 200 rpm fordulatszámon rázógéppel inkubáltuk. A mintavételek szabályos időközönként történtek. A sejttenyészetet egy Eppendorf-centrifugában (10.000 g, 5 perc) lecentrifugáltuk, és a maradék laktóz koncentrációt a felülúszóból határoztuk meg nagynyomású folyadék-kromatográfia segítségével (HPLC; lásd alább). A kontroll tenyészet esetén D-glükózzal szénforrást alkalmaztunk 2 mM-os végkoncentrációban. Meghatároztuk a biomasszával-korrigált laktóz felvételt, $\mu\text{mol/gramm}$ száraz sejtömegegben kifejezve (DCW).

A specifikus felvételi rátát az idő függvényében, a percenként felvett laktóz mennyiségét μmol -ban, és a DCW értékét grammban fejeztük ki.

3. Genetikai technikák és transzformálás

A génkiütéshez transzformáláson alapuló génmanipulációs technikát alkalmaztunk, hogy a laktóz permeáz (*lacpB*) célgénét a piridoxin auxotróf markerrel kicseréljük a homológ rekombináció révén. A deléciós konstrukció létrehozásához az ún. double-joint PCR módszert alkalmaztunk (Yu és mtsai., 2004). A módszer alapja, hogy egy szelektív marker gén homológ rekombinációra alkalmas, kiméra oligonukleotidokkal felamplifikált *lacpB* gén „flanking” régióival fogjuk közre a marker gént. Ezek az „upstream” és „downstream” régiók biztosítják, hogy a cél lókusznál homológ rekombináció által megtörténjen a génkicserélődés.

A. nidulans transzformációját Tilburn és mtsai., (1983) alapján végeztük és a Glucanex (Novozymes) enzimet 2,5%-ban (w/v) alkalmaztuk a sejtfal líziséhez. A transzformánsokat kétszeres tisztításnak vetettük alá, hogy egyetlen sejtből képzett kolóniát kapjunk. A transzformánsokat szelektív minimál táptalajon tartottuk fent.

4. A genomi DNS és totál RNS-izolálás

A begyűjtött micéliumot a lehető leggyorsabban „miracloth” nevű áteresztő textil segítségével átszűrtük, miközben hideg steril vízzel alaposan átmostuk a micéliumot. Ezt követően az átszűrt biomasszát papírtörő segítségével vízmentesítettük, majd folyékony nitrogénben azonnal lefagyasztottuk. A lefagyasztott biomasszát nitrogénnel hűtött mozsárban száraz porrá őröltük. A genomi DNS-t Promega Wizard SV Genomic DNA Purification System Kit segítségével extraháltuk ki, míg a total RNS-t a Promega SV Total RNS-t izoláló kit alkalmazásával nyertük ki.

5. Northern és Southern blot analízis

A Sambrook és Russel (2001) által közölt standard eljárásokat használtuk a NanoDrop 2000 UV-Vis Spektrofotométer (Thermo Scientific) készülékkel történő RNS, DNS mennyiségi meghatározásra, denaturálásra, gél elválasztásra és a nukleinsavak nylon membránra történő blotolására a membrán hibridizációja során. Az agaróz gélekre 5 µg DNS-t (Southern blot) illetve RNS-t (Northern blot) vittünk fel zsebenként.

A génspecifikus oligonukleotidokat digoxigeninnel jelöltük meg a PCR DIG Probe Synthesis Kit (Roche Applied Science) segítségével templátként R21 genomi DNS-t használtunk. A hibridizációt Lumi-Film kemilumineszcens detektáló film (Roche Applied Science) segítségével tettük láthatóvá. A cDNS-t 1 µg DNáz I-el kezelt totál-RNS-ből szintetizáltunk.

6. Hiánymutáns törzsek létrehozása

A gén kiütésére szolgáló deléciós kazettát *in vitro* hoztuk létre az ún. double-joint PCR módszerrel (Yu és mtsai., 2004). A kazetta egy 840 bp-ból álló nem kódoló régiót tartalmaz az *A. nidulans lacpB* gén „flanking” régiójából, valamint egy funkcionális *pyroA* gént az *A. fumigatus* genomból, mely a piridoxin bioszintézis egyik enzimét kódoló gén. Az *A. nidulans* piridoxin-auxotróf törzs TN02A3 protoplasztjait (Nayak és mtsai., 2006) 10 µg lineáris deléciós kazettával transzformáltuk. A génkiütésekhez *nkuA*-hiányos mutánst használtunk; a törzs nem rendelkezik a DNS mindkét láncát érintő törések javításának képességével, így a transzformációk hatékonysága jelentősen megnő. A piridoxin-prototróf transzformánsok tesztelését a *lacpB* gén kódoló szekvenciájának hiányával azonosítottuk PCR segítségével gén specifikus primereket használva. Több független *lacpB* hiányos törzs fenotípusos vizsgálata is megtörtént.

A kettős transzporter mutáns létrehozásához (*lacpA/lacpB*) a pTN1 plazmidot használtunk (Nayak és mtsai., 2006; Berl R. Oakley-től kaptuk), amelynek mérete 4721 bp. A pBluescript KS plazmid az EcoRV helyen lett hasítva, ahová beligálták az *A. fumigatus pyroA* marker génjét (1736 bp). A ligálás eredménye a pTN1 plazmid. Az így létrehozott plazmid vektort használtuk templátként a szelekciós fragment felamplifikálásához. Az *in vitro* létrehozott *lacpB* gén cseréjére alkalmas kazettát a piridoxin-auxotróf EFLK_161/9 ($\Delta lacpA/\Delta nkuA$) hiánymutáns törzsbe transzformáltuk.

7. A *lacpB* gén visszatranszformálása a *lacpB* hiányos háttérrel rendelkező mutánsba

Egy karakterizált első generációs *lacpB* hiánymutáns törzset kereszteztünk az RJMP 155,55 törzzsel. Uridin-prototróf és riboflavin-auxotróf utódot azonosítottunk PCR segítségével (AOEF010), valamint az *nkuA* gén jelenlétét is detektáltuk, *nkuA* génre specifikus primerpárral (amely lehetővé teszi a *lacpB* gén több kópiába történő visszaintegrálódását ektópikus helyekre). Az amplifikált, tisztított *lacpB* PCR termékből 10 µg mennyiséget ko-transzformáltunk 1 µg pTN2 riboflavint hordozó plazmid vektorral (*A. fumigatus* *riboB* génje, a riboflavin bioszintézisben részt vevő riboflavin fehérjét kódol; Nayak és mtsai., 2006; Berl R. Oakley-től kaptuk) a már *nkuA* génnel rendelkező második generációs *lacpB* hiánymutáns törzsbe. A riboflavin-prototróf transzformánsok között a visszatranszformált *lacpB* gén meglétét PCR segítségével vizsgáltuk.

8. Analitikai módszerek

A száraz sejttömeg (DCW) meghatározása 10 ml biomasszából történt. A micéliumot egy előre lemért tömegű papírszűrőn keresztül, zsugorított üvegszűrő segítségével szűrtük le, majd többször hideg vízzel átmostuk a biomasszát, ezt követően 80 °C-on tömegállandóságig szárítottuk. A száraz sejttömeg adatait az Eredmények fejezetben közöljük, amely két különböző mérés átlagából származik. Ezek értékei alulmúlták az átlagok 14%-át. A D-glükóz, D-galaktóz és laktóz mennyiségét HPLC-vel határoztuk meg egy protoncserélő oszlop (Bio-Rad Aminex HPX-87H) és törésmutató (RI) detektor alkalmazásával, izokratikus elúció révén 10 mM H₂SO₄ mozgófázist alkalmazva, 55 °C-os kolonna hőmérsékleten.

9. Reprodukálhatóság

Minden analitikai és biokémiai eredmény 3-5 független kísérlet átlagából származik. Az adatok elemzése és számszerűsítése SigmaPlot szoftver (Jandel Scientific) segítségével történt. Minden kísérletsorozaton belül standard eltéréseket (SDs) határoztunk meg. Az indukciós kísérleteknél a változások szignifikancia-vizsgálatát a nem indukált adatokhoz képest Student-féle t-teszttel végeztük; a probabilitás (p) adatait az Eredmények részben adjuk meg.

10. Felhasznált vegyszerek

Munkánk során analitikai tisztaságú vegyszereket használtunk. A finomvegzszereket és táptalajkomponenseket a Sigma-Aldrich Kft.-től (Budapest, Magyarország), a molekuláris biológiai kísérletekhez szükséges anyagokat a Roche Magyarország Kft.-től vásároltuk meg.

11. Bioinformatikai módszerek

Az *A. nidulans* laktóz permeáz A (*lacpA*) (Fekete és mtsai., 2012) génjét használtuk mintának („bait”) a TBLASTN típusú lekérdezéshez, hogy szerkezetileg rokon MFS-transzmembrán proteint kódoló géneket keressünk az *Aspergillus* nemzetség mintegy három tucat faja között. A nukleotid adatbázisok elérhetők a National Center for Biotechnology Information (NCBI) és az Energy Joint Genome Institute (JGI) honlapjáról. A gén modellek és termékek levezetése manuálisan történt. Gén modell alatt a génen belüli intron-exon arány értendő. Azokat a fehérjéket tekintettük további analízisre alkalmasnak, amelyek minimum 30%-os azonosságot („identity”) mutattak a LacpA fehérjével. A feltételnek 92 fehérje szekvencia felelt meg. A szekvenciák illesztésére a MAFFT program (7-es verzió; Katoh és Toh, 2010) esetén a G-INS-i algoritmus (képzett globális homológ) beállítást választottuk a nagyobb inzerció és delécio mutációk helyes kezelése (kiszűrése) érdekében. A BLOSUM 35, 45 valamint a 62-es lehetséges beállítások mindegyikét kipróbáltuk, végül a BLOSUM 45 hasonlósági mátrix segítségével végzett elemzést alkalmaztuk, mivel ez tűnt a leginformatívabbnak. A fehérjeszekvenciákat a Blokk Mapping és Gathering programok segítségével az Entropy szoftver révén határoztuk meg (BMGE verzió 1,12; Criscuolo és Gribaldo, 2010), BLOSUM 35 hasonlósági mátrix alkalmazásával és 3-as blokk mérettel, ami fehérjénként 477 informatív aminosavat eredményezett. Ezt követően a BMGE által meghatározott fehérjeszekvenciákat a PhyML 3.0 verzióval kalkuláltuk ki a maximum likelihood fát a WAG szubsztitúciós modell alkalmazásával, ahol a „gamma shape” értéke becsült értékre volt állítva (Guindon és mtsai., 2010). A filogenetikai törzsfát a FigTree programmal rajzoltuk meg. A hozzávetőleges valószínűség („likelihood”) arányt (Anisimova és Gascuel, 2006) integráltan, a PhyML segítségével számítottuk ki, Chi2-alapú parametrikus programot használva; az aLRT értékek (0-1) a fa összekötő csomópontjaiban láthatók.

III. AZ ÉRTEKEZÉS ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEI

1. A *bgaD/lacpA* génpár élettani induktora a D-galaktóz, és nem a D-galaktóz lebontás valamelyik köztese.
2. A LacpA és a LacpB transzporterek együttesen felelősek a laktóz sejtbe juttatásáért.
3. A *lacpA* és *lacpB* gének laktózzal és D-galaktózzal indukálhatók, de a cellobióz és a szoforóz csak a *lacpB* gént indukálják.
4. A *lacpB* géntermék élettani szerepe a laktóz és a cellobióz transzportja.

IV. ÖSSZEFOGLALÁS

A laktóz hidrolízise D-glükózt és D-galaktózt eredményez. Az aszkusszos fonalas gombákban a D-galaktóz lebontása a közismert Leloir útvonalán, illetve az alternatív oxido-reduktív útvonalon, amely hasonlít az L-arabinóz katabolizmusához. Fekete és mtsai. (2012) azonosítottak két egymással klasztereződő, divergensen átíródó gént, melyek egy intracelluláris β -galaktozidázt (*bgaD*) és egy laktóz permeázt (*lacpA*) kódolnak. Fonalas gombákban nem szokatlan, hogy a lebontó útvonalakat egy lebontási köztes, és nem maga a növekedési szubsztrát indukálja. Megvizsgáltuk ezért, hogy a *bgaD* és a *lacpA* gének D-galaktóz általi indukciója során a D-galaktóz lebontó anyagcseréje szükséges, vagy nélkülözhető.

A kétféle D-galaktóz lebontás közteseinek induktív képességét olyan hiánymutások révén vizsgáltuk, melyek a Leloir útvonal első (galaktóz-1-kináz) illetve az oxido-reduktív útvonal második (NAD-függő galaktitol dehidrogenáz) lépésében defektesek. A vizsgálatok során a két génről átíródó transzkriptumok megjelenését követtük nyomon. A *bgaD/lacpA* gén klaszter mindkét mutánsban kifejeződött D-galaktóz hatására, jelezve, a két enzim után lévő katabolikus intermedierek nem játszanak szerepet az indukcióban.

A D-galaktóz-galaktitol átalakulásában defektes mutáns törzs hiányát megkerülve a két gén indukálhatóságát galaktitolon teszteltük. A galaktitol nem volt képes indukálni a *bgaD/lacpA* kifejeződését, a növekedés aktuális szakaszától függetlenül.

Összeségében a kísérleteink azt bizonyították, hogy a D-galaktóz lebontás – akár a Leloir-, akár az oxido-reduktív útvonalon történik – nem szükséges a *bgaD/lacpA* génklaszter indukációjához D-galaktóz jelenlétében.

A. *nidulans* esetében a laktóz katabolizmus sebességmeghatározó lépése, a laktóz hidrolízise. A laktóz permeáz A gén hiánya csökkenti a laktózon történő növekedést, míg az említett gén overexpressziója gyorsabb laktóz hasznosítást eredményezett a vad típusú törzshöz képest. Egy második fiziológiailag releváns laktóz transzportert azonosítottunk, a *lacpB* gént. A *lacpB* hiánymutáns törzs glicerinen előnövesztett micéliuma laktóz tartalmú táptalajon, csupán minimális mennyiségű diszacharid felvételére képes a fermentáció első 60 órája alatt, míg a *lacpA/lacpB* kettős mutáns ugyanezen körülmények között képtelen új biomassza képzésére. A *lacp* gének átíródását a laktóz erősen indukálja, azonban a két gén indukációs profilja jelentősen eltér.

A *lacpB* gén szintén erős expressziós választ mutat a cellobióz és a szoforóz glükopiranoz dimerek jelenlétében is, míg a cellulotikus rendszer ezen inducerei nem gyakorolnak expressziós hatást a *lacpA* génre. Másrészt, a D-galaktóz monoszacharid a *lacpA* gén esetében fejt ki erősebb indukciós választ, a *lacpB* génre gyakorolt hatása elenyésző. A *lacpA*-negatív háttérben a cellobióz erősebben indukálja a *lacpB* gént a vad típusú törzshöz képest, következésképpen a cellobióz felvétel és a biomasszaképződés gyorsabb volt a *lacpA* hiánymutáns esetén. Ellentétben a *lacpB* hiánymutáns törzsben, a növekedési ráta és a cellobióz felvétel jelentősen csökkent a vad típushoz képest, jelezve, hogy a cellulóz és a laktóz katabolizmus rendszere közös elemekre épül.



Nyilvántartási szám: DEENK/85/2016.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Orosz Anita

Neptun kód: PNJTX7

Doktori Iskola: Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola

MTMT azonosító: 10047417

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

Idegen nyelvű tudományos közlemény(ek) külföldi folyóiratban (2)

1. Fekete, E., **Orosz, A.**, Kulcsár, L., Kavalecz, N., Flipphi, M., Karaffa, L.: Characterization of a second physiologically relevant lactose permease gene (*lacpB*) in *Aspergillus nidulans*. *Microbiology-(UK). Epub ahead of print*, 2016. ISSN: 1350-0872.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.000267>
IF:2.557 (2014)
2. **Orosz, A.**, Fekete, E., Flipphi, M., Karaffa, L.: Metabolism of D-galactose is dispensable for the induction of the beta-galactosidase- (*bgaD*) and lactose permease (*lacpA*) genes in *Aspergillus nidulans*. *FEMS Microbiol. Lett.* 359 (1), 19-25, 2014. ISSN: 0378-1097.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/1574-6968.12555>
IF:2.121





További közlemények

Idegen nyelvű közlemény(ek) külföldi folyóiratban (1)

3. Fekete, E., Karaffa, L., Karimi Aghcheh, R., Németh, Z., Fekete, É., **Orosz, A.**, Pahlócsék, M., Stágel, A., Kubicek, C.P.: The transcriptome of *lae1* mutants of *Trichoderma reesei* cultivated at constant growth rates reveals new targets of LAE1 function.
BMC Genomics. 15, Art. No. 447, 2014. ISSN: 1471-2164.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-15-447>
IF:3.986

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 8,664

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 4,678

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2016.04.01.



I. INTRODUCTION

Dairy industry generates prodigious amounts of liquid waste (Gänzle *et al.*, 2008). Some 85 % of the components of the milk destined for cheese manufacture are eventually discarded as a watery lactose-rich by-product called whey (Marwaha & Kennedy, 1988). Generated at over 1.5 million tons per year worldwide (Roelfsema, 2010), raw, untreated whey poses huge environmental challenges, as current and past wastewater treatment technologies are expensive. An alternative to disposal is utilizing the whey residue in downstream (industrial) processes by which value-added products are or can be manufactured (Panesar & Kennedy, 2012). A prime example is industrial-scale fermentation biotechnology for which whey is traditionally considered a cheap and abundant growth substrate and nitrogen source for micro-organisms, fungi in particular (Coghill & Moyer, 1947; Silva *et al.*, 2009; Panesar *et al.*, 2006; Kumari *et al.*, 2011; Aghcheh & Kubicek, 2015).

Lactose (1,4-O- β -D-galactopyranosyl-D-glucose; milk sugar) is the main carbohydrate in whey. Mammalian milk is the only source of lactose in nature. For most micro-organisms that can hydrolyze it into D-glucose and D-galactose, lactose is a slowly assimilated, gratuitous carbon source not encountered in their natural habitats. This characteristic considerably facilitates the (over)production of secondary metabolites and hydrolytic enzymes by saprophytic- and plant-pathogenic fungi that apparently grow under laboratory conditions on lactose by chance rather than by design. Operation of the *LAC* regulon of the lactose-fermenting yeast *Kluyveromyces lactis* is a paradigm for transcriptional control in lower eukaryotes (Cardinali *et al.*, 1997; Baruffini *et al.*, 2006; Rigamonte *et al.*, 2011).

Nevertheless, several key aspects of fungal lactose metabolism in less substrate-adapted ascomycete filamentous fungi (including potent cell factories) are poorly understood (see e.g., Seiboth *et al.*, 2007; Karaffa *et al.*, 2013).

To optimize fermentation processes that use whey residue, and to further its use in second-generation biofuel generation and its removal from contaminated soil and water (bioremediation), we study lactose catabolism in several filamentous fungi including the genetic model *Aspergillus nidulans*, a soil-borne saprophyte.

Two strategies have been described for the catabolism of lactose in fungi: extracellular hydrolysis and subsequent uptake of the resulting monomers, i.e., D-glucose and D-galactose, and uptake of the disaccharide followed by intracellular hydrolysis (reviewed by, e.g., Seiboth *et al.*, 2007). In analogy with the *K. lactis* lactose assimilation system (e.g., Gödecke *et al.*, 1991; Diniz *et al.*, 2012), we identified and characterized two clustered, divergently transcribed genes in *A. nidulans*, encoding an intracellular β -galactosidase of the Glycoside Hydrolase family 2 (*bgaD*) and a lactose permease belonging to the Major Facilitator Superfamily of transmembrane proteins (*lacpA*), respectively (Fekete *et al.*, 2012). These two genes were expressed to basal levels in carbon-derepressed (*creA*^d) mutant backgrounds, even when the strongly repressing sugar D-glucose was the only growth substrate present. By creating deletion mutants, we provided evidence that *bgaD* is the only hydrolase in *A. nidulans* that acts on the chromogenic substrate X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside) – generally regarded as a typical albeit artificial β -galactosidase substrate. Moreover, we demonstrated that LacpA – the first physiologically relevant, fungal lactose permease described outside the *Saccharomycetales* – mediates high affinity uptake of lactose. Such a β -galactosidase/lactose permease gene cluster was found conserved in at least 15 other filamentous ascomycetes (*Pezizomycotina*) (Fekete *et al.*, 2012). Furthermore, evidence was provided that transport rather than hydrolysis is the limiting step of lactose catabolism in *A. nidulans*, as overexpression of *lacpA* allows multiple copy transformants to grow considerably faster on the disaccharide than wild-type strains can.

Although LacpA is responsible for a considerable part of the lactose uptake in this fungus, *lacpA* knock-out strains still grow on it (Fekete *et al.*, 2012) implying that at least one additional uptake system must be operative. In this report, we identify and functionally analyze a second physiologically relevant lactose permease gene in *A. nidulans* that we have named *lacpB*.

II. MATERIALS AND METHODS

1. *A. nidulans* strains, media and culture conditions

Minimal media (AMM2) for shake flask and bioreactor cultivations (the latter henceforth referred to as fermentations) were formulated and inoculated as described by Fekete *et al.* (2002). Vitamins and other supplements were added from sterile stock solutions. Carbon sources were used at 1.5 % (w/v) initial concentration unless stated differently. Cultures were inoculated with 10^6 *A. nidulans* conidia per ml of medium. Shake-flask cultures were incubated at 37 °C in 500 mL Erlenmeyer flasks containing 100 mL of culture medium in a rotary shaker at 200 rotations per minute (rpm).

Fermentations were carried out in a 2.5 L glass vessel (Sartorius, Göttingen, Germany) with a culture volume of 2 L, and equipped with one six-blade Rushton disc turbine impeller. Operating conditions were pH 6.5, 37 °C, and 0.5 vvm (volumes of air per volume of liquid per minute). The dissolved oxygen level was maintained at 20 % saturation and was controlled by means of the agitation rate. To minimize medium loss, the waste gas was cooled in a reflux condenser connected to an external cooling bath (4 °C) before exiting the system.

For induction experiments (also referred to as expression- or transcript analysis), replacement cultures were used for which mycelia were pregrown for 24 h in AMM2 medium containing glycerol as the carbon source, and harvested by filtration over a sintered glass funnel. After thoroughly washing the biomass with cold sterile water, mycelia were transferred to flasks with carbon-free, fresh AMM2 and were pre-incubated for 1 h in a rotary shaker at 200 rpm, after which the carbon sources to be tested were added to the cultures in final concentrations up to 25 mM. Samples were taken after 3, 6 and 12 h of further incubation to assess inductory ability. Preliminary trials had established that 3 h of contact is the time lapse in which maximal induced transcript levels were achieved, with a minimal variation in the biomass concentration.

2. Lactose uptake experiments

Conidiospores were inoculated overnight on 15 g/L glycerol as the carbon source. Grown mycelia were transferred first to AMM2 medium containing lactose (15 g/L) as a sole carbon source for 24 h. Mycelia were subsequently harvested by gentle filtration over sterile cheese cloth, thoroughly washed with carbon-free AMM2 and resuspended in 500 mL Erlenmeyer-flasks containing AMM2 to yield a final biomass concentration of 1 g/L. Lactose was administered to final concentrations of 0.2 mM, 0.5 mM and 2 mM, and the cultures were incubated for further 6 h in a rotary shaker (37 °C, 200 rpm) to monitor sugar consumption. Samples were withdrawn at regular intervals, cellular debris was spun down in an Eppendorf centrifuge (10.000 g, 5 min), and residual lactose in the supernatant was determined by High Performance Liquid Chromatography (HPLC; see below). D-Glucose in a final concentration of 2 mM was used for the control cultures. Biomass-corrected uptake was expressed in μ moles per gram of dry cellular weight (DCW). Specific uptakes rates were calculated from the specific uptake plotted against time, and were expressed in μ moles of lactose per minute and gram of DCW.

3. Classical genetic techniques and transformation

Conventional genetic techniques were employed to exchange markers by meiotic recombination (Clutterbuck, 1974). Progeny of sexual crosses was tested for known auxothrophies using standard techniques.

A. nidulans transformations were performed basically as described by Tilburn *et al.* (1983), using Glucanex (Novozymes) as cell-wall lysing agent. Transformants were purified twice to single cell colonies and maintained on selective minimal medium plates.

4. Genomic DNA and total RNA isolation

Mycelia were harvested by filtration over nylon mesh and thoroughly washed with sterile distilled water. Excess liquid was removed by squeezing between paper sheets and the biomass was rapidly frozen in liquid nitrogen. For nucleic acid isolation, frozen biomass was ground to dry powder using liquid nitrogen-chilled mortar and pestle. Genomic DNA was extracted using Promega's Wizard SV Genomic DNA Purification System while total RNA was isolated with Promega's SV Total RNA Isolation System.

5. Northern and Southern blot analysis

Standard procedures (Sambrook and Russell, 2001) were used for the quantification, denaturation, gel separation and nylon blotting of nucleic acids, and the hybridization of the membranes. Agarose gels were charged with 5 µg DNA/RNA per slot. Probes were digoxigenin-labelled using the PCR DIG Probe Synthesis Kit (Roche Applied Science) primed with gene-specific oligonucleotides off R21 genomic DNA. Hybridization was visualized with Lumi-Film Chemiluminescent Detection film (Roche Applied Science).

cDNA was synthesized from 1 µg of DNase I-treated total RNA using Oligo(dT) as a primer and Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (NB. Enzymes and primer by Fermentas).

6. Generation of knock-out mutants strains

A gene deletion cassette was constructed *in vitro* according to the double-joint PCR method (Yu *et al.*, 2004). The cassette consisted of 840 bp of the terminal, noncoding regions of *A. nidulans lacpB* flanking the functional *A. fumigatus pyroA* gene involved in pyridoxine 177 biosynthesis (Nayak *et al.*, 2006). Protoplasts of *A. nidulans* pyridoxine-auxotroph strain TN02A3 were transformed with 10 µg of the linear deletion cassette. This transformation host greatly facilitates the obtention of gene knockouts due to the absence of a functional Nonhomologous End-Joining machinery in the *nkuA* deleted background (Nayak *et al.*, 2006). Pyridoxine-prototroph transformants were probed for the absence of *lacpB* coding sequences by PCR, primed off genomic DNA using gene-specific primers.

For the creation of the double transporter mutant (*lacpA/lacpB*), plasmid pTN1 carrying the *A. fumigatus pyroA* gene – encoding a protein involved in pyridoxine biosynthesis (Nayak *et al.*, 2006) – was used to generate an *in vitro lacpB* replacement construct which was introduced into one of the pyridoxine-auxotroph $\Delta lacpA/\Delta nkuA$ strains by transformation. The knockout cassette further consisted of 729 bp of the terminal noncoding regions of *A. nidulans lacpB*. Selected pyridoxine-prototroph, double deletant strains were verified by Southern blot analysis and then crossed out to rid the *nkuA* deletion. Throughout this work two independent double transporter mutants were tested.

7. Re-introduction of *lcpB* into gene-deleted backgrounds

A characterised first generation deletant of *lcpB* was crossed with strain RJMP155.55. Uridine-prototroph and riboflavin-auxotroph offspring was verified by PCR for the presence of the *nkuA* gene (to allow for the integration of *lcpB* copies at ectopic sites as described in continuation). A functional *lcpB* gene was amplified off *A. nidulans* R21 genomic DNA using specific primers. 10 µg of the amplification product was co-transformed with 1 µg of pTN2 (carrying the *A. fumigatus* *riboB* gene encoding a protein involved in riboflavin biosynthesis; Nayak *et al.*, 2006) into one of the $\Delta nkuA$ -cured, second generation gene-deleted strains. Among the riboflavin-prototroph transformants, the presence of the re-introduced gene was probed by PCR. The *lcpB* copy number was subsequently estimated by Southern blot analysis, and selected strains that had re-acquired functional *lcpB* in one or more copies, were phenotypically characterized.

8. Analytical methods

DCW was determined from 10 ml culture aliquots. The biomass was harvested and washed on a preweighted glass wool filter by suction filtration, washed with cold tap water and the filter dried at 80 °C until constant weight. Dry weight data reported in the Results section are the average of the two separate measurements, which never deviated more than 14 %. D-glucose, D-galactose and lactose were determined by HPLC with a proton exchange column (Bio-Rad Aminex HPX-87H) using isocratic elution with 10 mM H₂SO₄ at 55 °C and refractive index detection.

9. Reproducibility

All the analytical and biochemical data presented are the means of three to five independent experiments (NB. Biological replicates). Data were analyzed and visualized with SigmaPlot software (Jandel Scientific), and for each procedure, standard deviations (SDs) were determined. The significance of changes in biomass and in residual lactose concentration in the growth medium of mutant- or complemented deletant strains relative to the control cultures, was assessed using Student's t-test with probability (p) values given in the Results section.

10. Chemicals

Except where specified, chemicals used in this study were of analytical grade and purchased from Sigma-Aldrich Kft. (Budapest, Hungary).

11. Bio-informatics methods

A. nidulans lactose permease A (LacpA) (Fekete *et al.*, 2012) was used as the query in TBLASTN mining of genes encoding structurally related major facilitator superfamily transmembrane proteins in some three dozen species of the genus *Aspergillus*, from nucleotide databases available at the National Center for Biotechnology Information (NCBI) and the US Dept. of Energy Joint Genome Institute (JGI). Gene models and products were deduced manually. The 92 peptidic sequences most similar to *A. nidulans* LacpA were aligned with MAFFT version 7 (Kato and Toh, 2010) using the G-INS-i algorithm (trained on global homology) and a BLOSUM 45 similarity matrix. Protein input is available from the corresponding author upon request. The alignment was curated with Block Mapping and Gathering using Entropy (BMGE version 1.12; Criscuolo and Gribaldo, 2010) employing a BLOSUM 35 similarity matrix and a block size of 3, yielding 477 informative residues per protein.

A maximum likelihood tree was then calculated with PhyML version 3.0 applying the WAG substitution model (Guindon *et al.*, 2010) and drawn with FigTree (available at : <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>). Approximate likelihood ratio tests (Anisimova and Gascuel, 2006) were calculated integrally by PhyML using Chi2-based parametrics; aLRT values (0–1) are given at the connecting nodes in the tree.

III. NEW SCIENTIFIC RESULTS

1. Our experiments showed that D-galactose catabolism – either via the canonical Leloir pathway or the alternative oxido-reductive pathway – was not necessary for the induction of the *bgaD-lacpA* gene cluster to occur in the presence of D-glactose.
2. The LacpA and LacpB transporters appear to be jointly responsible for lactose uptake in *A. nidulans* under physiological conditions.
3. The *lacpA* and *lacpB* are strongly induced by lactose and D-galactose but just the *lacpB* gene is induced by cellobiose and sophorose.
4. The physiological role of the *lacpB* gene product are the transport of lactose and cellobiose.

IV. SUMMARY

During our work we analyze the expression of the *Aspergillus nidulans bgaD-lacpA* gene couple (encoding an intracellular beta-galactosidase and a lactose permease) in the presence of D-galactose. This monosaccharide can be catabolized via alternative, independent pathways in this model organism. The inductive capabilities of intermediates of the two alternative routes of D-galactose utilization were addressed in loss-of-function mutants defective in a defined step in one of the two pathways. In a galactokinase (*galE9*) mutant, the cluster is strongly induced by D-galactose, suggesting that formation of Leloir pathway intermediates is not required. The expression profiles of *bgaD* and *lacpA* were similar in wild type, L-arabinitol dehydrogenase (*araA1*) and hexose kinase (*hxA1*) negative backgrounds, indicating that intermediates of the oxido-reductive pathway downstream of galactitol are not necessary either. Furthermore, *bgaD-lacpA* transcription was not induced in any of the tested strains when galactitol was provided as the growth substrate. An *hxA1/galE9* double mutant cannot grow on D-galactose at all, but still produced *bgaD* and *lacpA* transcripts upon transfer onto D-galactose.

We therefore concluded that the physiological inducer of the *bgaD-lacpA* gene cluster in *A. nidulans* upon growth on D-galactose is the non-metabolized sugar itself.

In *Aspergillus nidulans*, uptake rather than hydrolysis is the rate-limiting step of lactose catabolism. Deletion of the lactose permease A (*lacpA*) gene reduces the growth rate on lactose while its overexpression enables faster growth than wild type strains are capable of. We have identified a second physiologically relevant lactose transporter, LacpB. Glycerol-grown mycelia from mutants deleted for *lacpB* appear to take up only minute amounts of lactose during the first 60 hours after a medium transfer, while mycelia of double *lacpA/lacpB* deletant strains are unable to produce new biomass from lactose.

Although transcription of both *lcp* genes was strongly induced by lactose, their inducer profiles differ markedly. *lcpB* responded also strongly to beta-linked glucopyranose dimers cellobiose and sophorose, while these inducers of the cellulolytic system did not provoke any *lcpA* response. On the other hand, *lcpA* but not *lcpB* expression was high in D-galactose cultures. In a *lcpA*-negative background, *lcpB* was overinduced by cellobiose in comparison to wild type; consequently, cellobiose uptake was faster and biomass formation accelerated in *lcpA* deletants.

In contrast, in *lcpB* knockout strains, growth rate and cellobiose uptake were considerably reduced relative to wild type, indicating that the cellulose- and lactose catabolic systems employ common elements. Nevertheless, our permease mutants still grew on cellobiose which suggests that its uptake in *A. nidulans* prominently involves hitherto unknown transport systems.

V. IRODALOMJEGYZÉK/REFERENCES

1. Aghcheh RK, Kubicek CP (2015): Epigenetics as an emerging tool for improvement of fungal strains used in biotechnology. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99: 6167-6181.
2. Alam K, Kaminskyj SGW (2013): *Aspergillus* galactose metabolism in more complex than that of *Saccharomyces*: the story of GalD^{GAL7} and GalE^{GAL1}. *Botany.* 91: 467-477.
3. Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang, J, Zhang, Z, Miller W, Lipman DJ (1997): Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic. Acids. Res.* 25: 3389-3402.
4. Anisimova M, Gascuel O (2006): Approximate likelihood-ratio test for branches: A fast, accurate, and powerful alternative. *Syst. Biol.* 55: 539-552.
5. Arst Jr HN, Peñalva MA (2003): pH regulation in *Aspergillus* and parallels with higher eukaryotic regulatory systems. *Trends. Genet.* 19: 224-231.
6. Baruffini E, Goffrini P, Donnini C, Lodi T (2006): Galactose transport in *Kluyveromyces lactis*: Major role of the glucose permease Hgt1. *FEMS Yeast Res.* 6: 1235-1242.
7. Bates WK, Hedman SC, Woodward DO (1967): Comparative inductive responses of two β -galactosidases of *Neurospora*. *J. Bacteriol.* 93: 1631-1637.
8. Bischof R, Fournis L, Limbeck A, Gamauf C, Seiboth B, Kubicek CP (2013): Comparative analysis of the *Trichoderma reesei* transcriptome during growth on the cellulase inducing substrates wheat straw and lactose. *Biotechnol. Biofuels.* 6: 127.
9. Cai P, Wang B, Ji J, Jiang Y, Wan L, Tian C, Ma Y (2015): The putative cellodextrin transporter-like protein CLP1 is involved in cellulase induction in *Neurospora crassa*. *J. Biol. Chem.* 290: 788-796.
10. Campbell AK, Waud JP, Matthews SB (2005): The molecular basis of lactose intolerance. *Science. Progress.* 88: 157-202.
11. 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.
12. Cerqueira GC, Arnaud MB, Inglis DO, Skrzypek MS, Binkley G, Simison M, Miyasato SR, Binkley J, Orvis J, Shah P, Wymore F, Sherlock G, Wortman JR (2013): The *Aspergillus* Genome Database: multispecies curation and incorporation of RNA-Seq data to improve structural gene annotations. *Nucleic. Acids. Res.* 42: 705-710.
13. Christensen AD, Kádár Z, Oleskiewicz-Popiel P, Thomsen MH (2011): Production of bioethanol from organic whey using *Kluyveromyces marxianus*. *J. Industrial. Microbi. Biotech.* 38: 283-289.
14. Clutterbuck AJ (1974): *Aspergillus nidulans*. In: King, R.C. (Ed.), Handbook of Genetics, Bacteria, Bacteriophages, and Fungi, vol. 1. Plenum Press, New York, 447-510.
15. Clutterbuck AJ (1981): An arabinose non-utilizing mutant *araA1*. *Asp. Newslett.* 15: 21.
16. Clutterbuck AJ (1997): The validity of the *Aspergillus nidulans* linkage map. *Fung. Genet. Biol.* 21: 267-277.
17. Coghill RD, Moyer AJ (1947): Method for production of increased yields of penicillin. *US Patent 2,423,873*.

18. Criscuolo A, Gribaldo S (2010): BMGE (Block Mapping and Gathering with Entropy): a new software for selection of phylogenetic informative regions from multiple sequence alignments. *BMC Evol. Biol.* 10: 210.
19. De Vries RP, Flipphi MJA, Witteveen CFB, Visser J (1994): Characterization of an *Aspergillus nidulans* L-arabitol dehydrogenase mutant. *FEMS Microbiol. Letts.* 123: 83-90.
20. Diniz RHS, Silveira WB, Fietto LG, Passos FML (2012): The high fermentative metabolism of *Kluyveromyces marxianus* UFV-3 relies on the increased expression of key lactose metabolic enzymes. *Antonie van Leeuwenhoek Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* 10: 540-550.
21. El-Ganiny AM, Sanders DAR, Kaminskyj SGW (2008): *Aspergillus nidulans* UDP-galactopyranose mutase, encoded by *ugmA* plays key roles in colony growth, hyphal morphogenesis, and conidiation. *Fung. Genet. Biol.* 45: 1533-1542.
22. El-Ganiny AM, Sheoran I, Sanders DAR, Kaminskyj SGW (2010): *Aspergillus nidulans* UDP-glucose-4-epimerase UgeA has multiple roles in wall architecture, hyphal morphogenesis, and asexual development. *Fung. Genet. Biol.* 47: 629-635.
23. Elshafei AM, Abdel-Fatah OM (2001): Evidence for a nonphosphorylated route of galactose breakdown in cell-free extracts of *Aspergillus niger*. *Enzyme and Microbial Tech.* 29: 76-83.
24. Fantes PA, Roberts CF (1973): β -Galactosidase activity and lactose utilization in *Aspergillus nidulans*. *J. Gen. Microbiol.* 77: 471-486.
25. 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.
26. Fekete E, Karaffa L, Sándor E, Bányai I, Seiboth B, Gyémánt Gy, Sepsi A, Szentirmai A, Kubicek CP (2004): The alternative D-galactose degrading pathway of *Aspergillus nidulans* proceeds via L-sorbose. *Arch. Microbiol.* 18: 35-44.
27. Fekete E, Padra J, Szentirmai A, Karaffa L (2008): Lactose and D-galactose catabolism into the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Acta Microbiol. et Immuno. Hungari.* 55: 119-124.
28. Fekete E, Karaffa L, Seiboth B, Fekete É, Kubicek CP, Flipphi M (2012): Identification of a permease gene involved in lactose utilisation in *Aspergillus nidulans*. *Fung. Genet. Biol.* 49: 415-425.
29. Fekete E, Orosz A, Kulcsár L, Kavalecz N, Flipphi M, Karaffa L (2016): Characterization of a second physiologically relevant lactose permease gene (*lacpB*) in *Aspergillus nidulans*. *Microbiology-SGM* doi: 10.1099/mic.0.000267.
30. Felenbok B, Flipphi M, Nikolaev I (2001): Ethanol catabolism in *Aspergillus nidulans*: A model system for studying gene regulation. *Prog. Nucleic. Acid. Res. Mol. Biol.* 69: 149-204.
31. Flipphi M, Mathieu M, Cirpus I, Panozzo C, Felenbok B (2001): Regulation of the aldehyde dehydrogenase gene (*aldA*) and its role in the control of the coinducer level necessary for induction of the ethanol utilization pathway in *Aspergillus nidulans*. *J. Biol. Chem.* 276: 6950-6958.
32. Flipphi M, Van de Vondervoort PJI, Ruijter GJG, Visser J, Arst Jr HN, Felenbok B (2003): Onset of carbon catabolite repression in *Aspergillus nidulans*: Parallel involvement of hexokinase and glucokinase in sugar signalling. *J. Biol. Chem.* 278: 11849-11857.
33. Flipphi M, Sun J, Robellet X, Karaffa L, Fekete E, Zeng AP, Kubicek CP (2009): Biodiversity and evolution of primary carbon metabolism in *Aspergillus nidulans* and other *Aspergillus spp.* *Fung. Genet. Biol.* 46: 19-44.

34. Gajewski W, Litwińska J, Paszewski A, Chojnacki T (1972): Isolation and characterization of lactose non-utilizing mutants in *Aspergillus nidulans*. *MGG* 116: 99-106.
35. Galazka JM, Tian C, Beeson WT, Martinez B, Glass NL, Cate JH (2010): Cellodextrin transport in yeast for improved biofuel production. *Science* 330: 84-86.
36. Gamauf C, Marchetti M, Kallio J, Vehmaanperä J, Allmaier G, Kubicek CP, Seiboth B (2007): Characterization of the *bgal*-encoded glycoside hydrolase family 35 β -galactosidase of *Hypocrea jecorina* with galacto- β -D-galactanase activity. *FEBS J.* 274: 1691-1700.
37. Gänzle MG, Haase G, Jelen P (2008): Lactose: Crystallization, hydrolysis and value-added derivatives. *Int. Dairy J.* 18: 685-694.
38. Gielkens MM, Dekkers E, Visser J, de Graaff LH (1999): Two cellobiohydrolase-encoding genes from *Aspergillus niger* require D-xylose and the xylanolytic transcriptional activator XlnR for their expression. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 4340-4345.
39. Gödecke A, Zachariae W, Arvanitidis A, Breunig KD (1991): Coregulation of the *Kluyveromyces lactis* lactose permease and β -galactosidase genes is achieved by interaction of multiple LAC9 binding sites in a 2.6 kbp divergent promoter. *Nucleic Acids. Res.* 19: 5351-5358.
40. Gruben BS, Zhou M, De Vries RP (2012): GalX regulates the D-galactose oxidoreductive pathway in *Aspergillus niger*. *FEBS Letts.* 586: 3980-3985.
41. Gruber F, Visser J, Kubicek CP, de Graaff LH (1990): Cloning of the *Trichoderma reesei pyrG* gene and its use as a homologous marker for a high-frequency transformation system. *Curr. Genet.* 18: 447-451.
42. Guindon S, Dufayard JF, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W, Gascuel O (2010): New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst. Biol.* 59: 307-321.
43. 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.
44. Ilyés H, Fekete E, Karaffa L, Fekete É, Sándor E, Szentirmai A, Kubicek CP (2004): CreA-mediated carbon catabolite repression of β -galactosidase formation in *Aspergillus nidulans* is growth rate dependent. *FEMS Microbiol. Letts.* 235: 147-151.
45. Ishikawa E, Sakai T, Ikemura H, Matsumoto H, Abe H (2005): Identification, cloning, and characterization of a *Sporobolomyces singularis* β -galactosidase-like enzyme involved in galacto-oligosaccharide production. *J. Biosci. Bioeng.* 99: 331-339.
46. Ivanova C, Bååth JA, Seiboth B, Kubicek CP (2013): Systems analysis of lactose metabolism in *Trichoderma reesei* identifies a lactose permease that is essential for cellulase induction. *PLoS ONE* 8:62631
47. Jónás Á, Fekete E, Flippi M, Sándor E, Jäger Sz, Molnár ÁP, Szentirmai A, Karaffa L (2014): Extra- and intracellular lactose catabolism in *Penicillium chrysogenum*: phylogenetic and expression analysis of the putative permease and hydrolase genes. *J. Antibiotics* 67: 489-497.
48. Karaffa L, Coulier L, Fekete E, Overkamp KM, Druzhinina IS, Mikus M, Seiboth B, Novák L, Punt PJ, Kubicek CP (2013): The intracellular galactoglycome in *Trichoderma reesei* during growth on lactose. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97: 5447-5456.
49. Karaffa L, Diaz R, Papp B, Fekete E, Sándor E, Kubicek CP (2015): A deficiency of manganese ions in the presence of high sugar concentrations is the critical parameter

- for achieving high yields of itaconic acid by *Aspergillus terreus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99: 7937-7944.
50. Katoh K, Toh H (2010): Parallelization of the MAFFT multiple sequence alignment program. *Bioinformatics* 26: 1899-1900.
 51. Kumari S, Panesar PS, Panesar R (2011): Production of β -galactosidase using novel yeast isolate from whey. *Int. J. Dairy Sci.* 6: 150-157.
 52. Lester G, Byers A (1965): Properties of two β -galactosidases of *Neurospora crassa*. *Biochem. and Biophys. res. com.* 18: 5-6.
 53. Lodi T, Donnini C (2005): Lactose-induced cell death of β -galactosidase mutants in *Kluyveromyces lactis*. *FEMS Yeast Res.* 5: 727-734.
 54. Marwaha SS, Kennedy JF (1988): Review: whey pollution problem and potential utilization. *Int. J. Food Sci. Technol.* 23: 323-336.
 55. Michalak M, Thomassen LV, Roytio H, Ouwehand AC, Meyer AS, Mikkelsen JD (2012): Expression and characterization of an endo-1,4- β -galactanase from *Emericella nidulans* in *Pichia pastoris* for enzymatic design of potentially prebiotic oligosaccharides from potato galactans. *Enzyme. Microb. Technol.* 50: 121-129.
 56. Mojzita D, Koivistoinen OM, Maaheimo H, Penttilä M, Ruohonen L, Richard P (2012): Identification of the galactitol dehydrogenase, LadB, that is part of the oxidoreductive D-galactose catabolic pathway in *Aspergillus niger*. *Fungal. Genet. Biol.* 49:152-159.
 57. Mustapha A, Jiang T, Savaiano DA (1997): Improvement of Lactose Digestion by Humans Following Ingestion of Unfermented Acidophilus Milk: Influence of Bile Sensitivity, Lactose Transport, and Acid Tolerance of *Lactobacillus acidophilus*. *J. Dairy Sci.* 80: 1537-1545.
 58. Nayak T, Szewczyk E, Oakley CE, Osmani A, Ukil L, Murray SL, Hynes MJ, Osmani SA, Oakley BR (2006): A versatile and efficient gene-targeting system for *Aspergillus nidulans*. *Genetics* 172: 1557-1566.
 59. Nevalainen KMH (1981): Induction, isolation, and characterization of *Aspergillus niger* mutant strains producing elevated levels of β -galactosidase. *Appl. Environ. Microbiol.* 41: 593-596.
 60. Novelli G, Reichardt JK (2000): Molecular basis of disorders of human galactose metabolism: past, present, and future. *Molecular Genetics and Metabolism* 71: 62-65.
 61. O'Connell S, Walsh G (2010): A novel acid-stable, acid-active β -galactosidase potentially suited to the alleviation of lactose intolerance. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 86: 517-524.
 62. Otten H, Michalak M, Mikkelsen JD, Larsen S (2013): The binding of zinc ions to *Emericella nidulans* endo- β -1,4-galactanase is essential for crystal formation. *Acta Crystallogr. Sect. F. Struct. Biol. Cryst. Commun.* 69: 850-854.
 63. Panesar PS, Panesar R, Singh RS, Kennedy JF, Kumar H (2006): Microbial production, immobilization and applications of β -D-galactosidase. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 81: 530-543.
 64. Panesar PS, Kennedy JF (2012): Biotechnological approaches for the value addition of whey. *Crit. Rev. Biotechnol.* 32: 327-348.
 65. Paszewski A, Chojnacki T, Litwinska J, Gajewski W (1970): Regulation of lactose utilization in *Aspergillus nidulans*. *Acta Biochim. Pol.* 17: 385-391.
 66. Peterson GL (1983): Determination of total protein. *Methods. Enzymol.* 91: 86-105.
 67. Rigamonte TA, Silveira WB, Fietto LG, Castro IM, Breunig KD, Passos FML (2011): Restricted sugar uptake by sugar-induced internalization of the yeast lactose/galactose permease Lac12. *FEMS Yeast Res.* 11: 243-251.

68. Riley MI, Sreekrishna K, Bhairi S, Dickson RC (1987): Isolation and characterization of mutants of *Kluyveromyces lactis* defective in lactose transport. *Mol. Gen. Genet.* 208: 145-151.
69. Roberts CF (1963): The genetic analysis of carbohydrate utilization in *Aspergillus nidulans*. *J. Gen. Microbiol.* 31: 45-58.
70. Roberts CF (1970): Enzyme lesions in galactose non-utilising mutants of *Aspergillus nidulans*. *BBA - General Subjects* 201: 267-283.
71. Roelfsema WA, Kuster FM, Pluim H (1990): Lactose and derivatives. In: Elvers, B., Hawkins, S., Schulz, G. (eds): *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, 4th ed. VCH Weinheim FRG, 107-114
72. Roelfsema WA, Kuster BFM, Heslinga MC, Pluim H & Verhage M (2010): Lactose and Derivatives. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, 7th ed. (Wiley & Sons, New York, NY).
73. Sambrook J, Russell DW (2001): Molecular Cloning: a Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory, New York.*
74. Samson RA, Visagie CM, Houbraeken J, Hong SB, Hubka V, Klaassen CH, Perrone G, Seifert KA, Susca A, Tanney JB, Varga J, Kocsubé S, Szigeti G, Yaguchi T, Frisvad JC (2014) *Stud. Mycol.* 78: 141-173.
75. Seiboth B, Hofmann G, Kubicek CP (2002a): Lactose metabolism and cellulase production in *Hypocrea jecorina*: the gal7 gene, encoding galactose-1-phosphate uridylyltransferase, is essential for growth on galactose but not for cellulase induction. *Mol. Gene. and Geno.* 267: 124-132.
76. Seiboth B, Karaffa L, Sandor E, Kubicek CP (2002b): The *Hypocrea jecorina* gal10 (uridine 50-diphosphate-glucose 4-epimerase- encoding) gene differs from yeast homologues in structure, genomic organization and expression. *Gene.* 295: 143-149.
77. 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.
78. Seiboth B, Pakdaman BS, Hartl L, Kubicek CP (2007): Lactose metabolism in filamentous fungi: how to deal with an unknown substrate. *Fung. Biol. Rev.* 21: 42-48.
79. Silva MF, Fornari RCG, Mazutti MA, de Oliveira D, Padilha FF, Cichoski AJ, Cansian RL, Di Luccio M, Treichel H (2009): Production and characterization of xanthan gum by *Xanthomonas campestris* using cheese whey as sole carbon source. *J. Food Eng.* 90: 119-123.
80. Sternberg D, Mandels GR (1980): Regulation of the cellulolytic system in *Trichoderma reesei* by sophorose: induction of cellulase and repression of β -glucosidase. *J. Bacteriol.* 144: 1197-1199.
81. Tilburn J, Scazzocchio C, Taylor GG, Zabicky-Zissman JH, Lockington RA, Davies RW (1983): Transformation by integration in *Aspergillus nidulans*. *Gene* 26: 205-221.
82. Wortman JR, Gilsenan JM, Joardar V, Deegan J, Clutterbuck J, Andersen MR, Archer D, Bencina M, Braus G, Coutinho P, von Döhren H, Doonan J, Driessen AJ, Durek P, Espeso E, Fekete E, Flipphi M, Estrada CG, Geysens S, Goldman G, de Groot PW, Hansen K, Harris SD, Heinekamp T, Helmstaedt K, Henrissat B, Hofmann G, Homan T, Horio T, Horiuchi H, James S, Jones M, Karaffa L, Karányi Z, Kato M, Keller N, Kelly DE, Kiel JA, Kim JM, van der Klei IJ, Klis FM, Kovalchuk A, Krasevec N, Kubicek CP, Liu B, Maccabe A, Meyer V, Mirabito P, Miskei M, Mos M, Mullins J, Nelson DR, Nielsen J, Oakley BR, Osmani SA, Pakula T, Paszewski A, Paulsen I, Pilsyk S, Pócsi I, Punt PJ, Ram AF, Ren Q, Robellet X, Robson G, Seiboth B, van Solingen P, Specht T, Sun J, Taheri-Talesh N, Takeshita N, Ussery D, van Kuyk PA, Visser H, van de Vondervoort PJ, de Vries RP, Walton J, Xiang X, Xiong Y, Zeng

- AP, Brandt BW, Cornell MJ, van den Hondel CA, Visser J, Oliver SG, Turner G (2009): The 2008 update of the *Aspergillus nidulans* genome annotation: a community effort. *Fungal. Genet. Biol.* 46: 2-13.
83. Wray LV Jr, Witte MM, Dickson RC, Riley MI (1987): Characterization of a positive regulatory gene, LAC9, that controls induction of the lactose-galactose regulon of *Kluyveromyces lactis*: structural and functional relationships to GAL4 of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 7: 1111-1121.
84. Wucherpfennig T, Hestler T, Krull R (2011): Morphology engineering-osmolality and its effect on *Aspergillus niger* morphology and productivity. *Microb. Cell Fact.* 10: 58.
85. Yu JH, Hamari Z, Han KH, Seo JA, Reyes-Domínguez Y, Scazzocchio C (2004): Double-joint PCR: a PCR-based molecular tool for gene manipulations in filamentous fungi. *Fungal. Genet. Biol.* 41: 973-981.
86. Zhang W, Kou Y, Xu J, Cao Y, Zhao G, Shao J, Wang H, Wang Z, Bao X, Chen G, Liu W (2013): Two major facilitator superfamily sugar transporters from *Trichoderma reesei* and their roles in induction of cellulase biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 288: 32861-32872.
87. Znameroski EA, Coradetti ST, Roche CM, Tsai JC, Iavarone AT, Cate JHD, Glass NL (2012): Induction of lignocellulose-degrading enzymes in *Neurospora crassa* by cellodextrins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109: 6012-6017.



Registry number: DEENK/85/2016.PL
Subject: Ph.D. List of Publications

Candidate: Anita Orosz

Neptun ID: PNJTX7

Doctoral School: Pál Juhász-Nagy Doctoral School of Biology and Environmental Sciences

MTMT ID: 10047417

List of publications related to the dissertation

Foreign language scientific article(s) in international journal(s) (2)

1. Fekete, E., **Orosz, A.**, Kulcsár, L., Kavalecz, N., Flippi, M., Karaffa, L.: Characterization of a second physiologically relevant lactose permease gene (*lacpB*) in *Aspergillus nidulans*. *Microbiology-(UK)*. *Epub ahead of print*, 2016. ISSN: 1350-0872.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.000267>
IF:2.557 (2014)
2. **Orosz, A.**, Fekete, E., Flippi, M., Karaffa, L.: Metabolism of D-galactose is dispensable for the induction of the beta-galactosidase- (*bgaD*) and lactose permease (*lacpA*) genes in *Aspergillus nidulans*. *FEMS Microbiol. Lett.* 359 (1), 19-25, 2014. ISSN: 0378-1097.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/1574-6968.12555>
IF:2.121





List of other publications

Foreign language scientific article(s) in international journal(s) (1)

3. Fekete, E., Karaffa, L., Karimi Aghcheh, R., Németh, Z., Fekete, É., **Orosz, A.**, Paholcsek, M., Stágel, A., Kubicek, C.P.: The transcriptome of *lae1* mutants of *Trichoderma reesei* cultivated at constant growth rates reveals new targets of LAE1 function.
BMC Genomics. 15, Art. No. 447, 2014. ISSN: 1471-2164.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-15-447>
IF:3.986

Total IF of journals (all publications): 8,664

Total IF of journals (publications related to the dissertation): 4,678

The Candidate's publication data submitted to the iDEa Tudóstér have been validated by DEENK on the basis of Web of Science, Scopus and Journal Citation Report (Impact Factor) databases.

01 April, 2016



X. TUDOMÁNYOS TEVÉKENYSÉG

Referált, angol nyelvű közlemények:

- 1) **Orosz A**, Fekete E, Flippi M, Karaffa L (2014): Metabolism of D-galactose is dispensable for the induction of the beta-galactosidase- (*bgaD*) and lactose permease (*lacpA*) genes in *Aspergillus nidulans*. *FEMS Microbiology Letters*, 359: 19–25.

Impakt faktor: 2,121

- 2) Fekete E, Karaffa L, Karimi Aghcheh R, Németh Z, Fekete É, **Orosz A**, Paholcsek M, Stágel A, Kubicek CP (2014): The transcriptome of *lae1* mutants of *Trichoderma reesei* cultivated at constant growth rates reveals new targets of LAE1 function. *BMC Genomics*, 15: Art. No. 447.

Impakt faktor: 3,986

- 3) Fekete E, **Orosz A**, Kulcsár L, Kavalecz N, Flippi M, Karaffa L (2016): Characterization of a second physiologically relevant lactose permease gene (*lacpB*) in *Aspergillus nidulans*. *Microbiology-SGM* doi: 10.1099/mic.0.000267.

Impakt faktor: 2,557

Idegen nyelvű poszterek:

- 1) **Orosz A.**, Ondecs Á., Matolcsi Cs., Németh Z., Karaffa L., Fekete E.: Identification of the true inducer of the *bgaD* (beta-galactosidase-encoding) gene in *Aspergillus nidulans* upon growth on D-galactose (4th Central European Forum for Microbiology [CEFARM], Keszthely, 2013).
- 2) **Orosz A.**, Bodnár G., Ondecs Á., Nielsen J.B., Karaffa L., Mortensen U.H., Fekete E.: The ultimate test: does NADPH-availability indeed control the oxido-reductive pathway of D-galactose catabolism in *Aspergillus nidulans*? (4th Central European Forum for Microbiology [CEFARM], Keszthely, 2013).

- 3) Jónás Á., **Orosz A.**, Bíró E., Fekete E., Karaffa L.: Carbon source profiling the expression of the Leloir-pathway genes in *Penicillium chrysogenum* (4th Central European Forum for Microbiology [CEFOM], Keszthely, 2013).
- 4) **Orosz A.**, Ondecs Á., Matolcsi C., Németh Z., Karaffa L., Fekete E.: Identification of the inducer of the *bgaD* (beta-galactosidase-encoding) gene in *Aspergillus nidulans* upon growth on D-galactose (12th European Conference of Fungal Genetics, Sevilla, Spanyolország, 2014).

Konferencia előadás:

- 1) **Orosz A:** A *bgaD* gén kifejeződésének vizsgálata *Aspergillus nidulans* fonalas gombában (Fiatal Biotechnológusok Országos Konferenciája, Szeged, 2014).