

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

A cianid-rezisztens alternatív légzési út élettani szerepe *Aspergillus* gombafajokban

Molnár Ákos Péter

Témavezető: Dr. Fekete Erzsébet



DEBRECENI EGYETEM

Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola

Debrecen, 2018

1. Bevezetés és célkitűzés

Az aerob légzésnél a végső elektronakceptor a légköri oxigén (O₂). A folyamat lejátszódásáért a több komponensből felépülő légzési lánc a felelős, mely eukariótáknál a mitokondrium belső membránjában található. A légzés és az ATP (adenozin-trifoszfát) szintézise szorosan összekapcsolódik ezen élőlényeknél, hiszen elektrontranszport lánc működése közben létrejövő protongradiens a hajtóereje ADP-ATP átalakításnak. Az ATP a mikrobák nélkülözhetetlen komponense, kémiai energiatároló molekula, kiemelt szerepe van az anyagcsere folyamatokban, akár reakciók lejátszódásában, vagy a folyamatok szabályozásában. Egyes gombák rendelkeznek ettől eltérően más respirációs útiránnyal is (Joseph-Horne és mtsai., 2001). Az alternatív oxidáz (AOX) az alternatív légzési útvonal (a citokrómós láncról ágazik le) terminális oxidáza, mely az elektronokat az ubikinonról a molekuláris oxigénre közvetíti és vízzé redukálja azt (Vanlerberghe, 2013). A citokrómós légzési láncsal ellentétben cianidra érzéketlen, működése nem, ill. minimális ATP szintézissel kapcsolható össze. Az alternatív légzést több, rendszertanilag különböző (prokarióta, alacsonyabb-, magasabb rendű eukarióta) élőlényben kimutatták (Bendall és Bonner, 1971; Lambowitz és mtsai., 1989; Siedow és Umbach, 1995; Stenmark és Norlund, 2003; Joseph-Horne és mtsai., 2001; Tudella és mtsai., 2004; Molen és mtsai., 2006; MacDonald és mtsai., 2009). Ennek az útvonalnak a fiziológiában betöltött feladatát már korábban alaposan megvizsgálták és hosszú múltra tekint vissza növényekben.

Az aflatoxinok (AT) természetben előforduló erősen karcinogén hatású vegyületek, gyűjtőnevüket a termelésükre képes *Aspergillus flavus* mikrobáról kapták. A mikotoxinok a metabolitok nagy és diverz osztályát teszik ki, szerkezetüket tekintve poliketidek közé tartoznak (Hopwood és Sherman, 1990). Több potenciális termelő is az *Aspergillus* genus tagja (Rank és mtsai., 2011). Az opportunistá gomba képes a gabonaféléket, más zöldségeket megfertőzni az aratás előtt vagy a tárolás alatt, ezáltal fogyaszthatatlanná téve az élelmiszert, komoly egészségügyi és gazdasági problémát okozva a trópusi országokban (Wilkinson és mtsai., 2004). Az AT-ok májbetegség kialakulását emberben és állatban egyaránt előidézhetik (Wogan, 1992). A kevésbé toxikus sterigmatocisztin (ST) az utolsó előtti intermedier az AT B₁ bioszintézisében, (Yabe és Nakajima, 2004; Klejnstrup és mtsai., 2012), *A. nidulans* esetében a folyamat végtermékeként van jelen, a szekunder metabolizmus eredményeként (Barnes és mtsai., 1994). Az *A. nidulans* szintézis útvonalából hiányzik kettő, az átalakításhoz szükséges enzim kódoló gén (*aflP* és *aflQ*), melyek az *A. flavus* AT génklaszterében jelen vannak (Amaike és Keller, 2011; Yu és mtsai., 2004). Az ST és AT bioszintézise hasonló szabályozó mechanizmussal rendelkezik (beleértve a transzkripciós faktorokat is: AflR and AflJ), így lehetőség nyílik az AT szintézis vizsgálatára *A. nidulans*-ban úgy, hogy nem keletkezik veszélyes mikotoxin (Amaike és mtsai., 2013; Németh és mtsai., 2016). Az AT/ST bioszintézis útja jól karakterizált *A. nidulans*-ba (Barnes és mtsai., 1994; Keller és Adams, 1995; Brown és mtsai., 1996), de számos környezeti faktor, mely a képzési mechanizmust befolyásolhatja továbbra is tisztázatlan (Maggio-Hall és mtsai., 2005; Keller és mtsai., 1997). A fényről- alapvető környezeti inger, széles hatással-már leírták, hogy változást okoz az ST-termelésben (Kato és mtsai., 2003; Atoui és mtsai., 2010; Bayram és mtsai., 2008; Bayram és

mtsai., 2016). A Velvet komplex, a szekunder anyagcsere regulátora, fény által befolyásolt komplex, mely pozitívan szabályozza a ST termelést (Bayram és mtsai., 2008).

Az itakonsav (IA) egy ötszénatomos dikarbonsav, melyet gyakran alkalmaznak építőelemként különböző vegyületek előállítására, elsősorban műanyag- és műgyanta előállításában. Az IA előállítása fermentációs úton történik *Aspergillus terreus* fonalas gombával (Batti és Schweiger 1963), szubmerz technika alkalmazásával. A technológiai paraméterek erőteljesen hasonlítanak az *A. niger* citromsav fermentációkra, beleértve az erőteljes levegőztetést és kevertetést. Az IA szintézis útját megvizsgálva szembetűnik, hogy a citromsavra, mint előanyagra tekinthetünk a folyamatban (Kuenz és Krull 2018). Az *A. niger* fonalas gomba citromsav fermentációja tankönyvi példának számít, ahol kiemelkedő szerepe van az alternatív respirációnak (Karaffa és Kubicek 2003), ennek ellenére még nem vizsgálták funkcióját IA bioszintézisben.

Az AOX, mint számos élőlényben (köztük élesztő és fonalas gombákban) megtalálható alternatív légzési útvonal terminális oxidáza, több funkcióval is rendelkezik, érdekes és fontos eleme lehet a gombaélettannak, karakterizálása a technológiai fejlődéssel egyszerűsödött. A legrégebbi és egyben a legismertebb módszer az alternatív légzés vizsgálatára az oxigén elektródával történő oxigénfogyasztás nyomonkövetése a tápközegből. Napjainkban a lehetőségek tárháza bővült a molekuláris biológia eszközeivel is, elérhetővé téve számunkra az alternatív útvonallal kapcsolatos hipotézisek gyors és pontos vizsgálatát. Több tanulmány foglalkozik az AOX rendeltetésével, az eredmények diverznek mondhatóak, viszont még több kérdést vetnek fel, melyek megválaszolásra várnak.

(1.) Korábbi tanulmányok rámutattak, hogy az *Aspergillus nidulans* fonalas gombán keresztül biztonságosan és reprodukálhatóan tanulmányozható az AT előanyaga, a ST. Növényi olajon az AOX aktivitás és a cephalosporin C (szekunder metabolit) produkció közötti összefüggés már jól leírt jelenség (Karaffa és mtsai., 1999). Az *A. nidulans* eltérően más *Aspergillus* fajokhoz (de nem egyedileg) egyetlen AOX-t kódoló génnel rendelkezik (*aodA*). A ST és az *aodA* közötti kapcsolatáról is találunk publikációt az irodalomban (Leiter mtsai., 2016), ám az AOX ST szintézisben elfoglalt helye továbbra sem tisztázott teljesen. Célul tűztük ki, hogy különböző *aodA* genetikai háttérrel rendelkező mutáns rendszert (saját promoter alkalmazása, hiány és overexpresszált törzsek) hozzunk létre, majd Németh és mtsai. (2016) által kialakított és leírt jól kontrollált körülmények között vizsgáljuk az AOX szerepét az ST bioszintézisben szilárd és folyékony közegben, valamint azt, hogyan változtatja meg az aktivitása a hozamokat.

(2.) A fény szerepéről és kapcsolatáról a ST bioszintézissel számos publikációt találhatunk (pl. Bayram és mtsai., 2008; Bayram és mtsai., 2016). Növényeknél vannak eredmények a fény hatásáról az AOX aktivitásra, gombáknál kifejezetten ezt az összefüggést még nem vizsgálták. A Velvet komplex regulátor fény által szabályozott protein komplex, befolyása az ST termelésre közismert, kísérletek kivitelezésénél meghatározó paraméter. A finoman szabályozott paramétereknél lehetőségünk nyílik arra, hogy megvizsgáljuk rendelkezik-e ráhatással az AOX aktivitás az ST produkcióra fény jelenlétében.

(3.) Az AOX működését a gomba és növény fiziológiában számos tényező befolyásolja (Vanlerberghe 2013). Ha a citokróm respiráció légzésgátló inhibíciója

következtében leáll, az alternatív légzés felerősödik. Az AOX az oxidatív stressz elleni védekezés egyik fegyvere lehet a mikroorganizmusok számára, lehetővé téve a redox-homeosztázis fenntartását, vagy a gyors adaptációt a környezetükhöz, mely egyben a túlélés záloga a mikrobák számára. Az *Aspergillus* nemzetség tagjai között számos olyan fajt találunk melyek iparilag hasznos metabolitokat termelnek (pl. *A. nidulans*, *A. niger*, *A. terreus*, *A. oryzae*), de akad közöttük az egészségre káros mikotoxin producer is (*A. flavus*). Az *A. niger* és *A. fumigatus* alternatív légzésről már adatok állnak a rendelkezésünkre (Kirimura és mtsai 1987; Magnani és mtsai., 2007), viszont a genus többi tagjáról tudásunk ezen a téren még hiányos. A CBS segítségével több *Aspergillus* törzs növekedését vizsgálhattuk meg légzésgátló anyagok jelenlétében, következtetések levonva, hogy az AOX elősegíti-e a gombák adaptációs készségét a kedvezőtlen környezeti tényezőkhez.

(4.) A citromsav előállítása napjainkban *A. niger* fonális gombával történik, jelentős mennyiségben (1,6 millió tonna) előállított szerves sav (Bercovitz és mtsai., 1990). A citrát fermentációjánál a cianid-rezisztens, SHAM érzékeny alternatív oxidáznak a funkciója tisztázott, továbbá a technológiát is meghatározza (Karaffa és Kubicek 2003). Az alternatív respiráció a fermentáció mindegyik szakaszában detektálható (Zehentgruber és mtsai., 1980) és a sejtek energia hozamát csökkenti (Kirimura és mtsai., 2000). Az itakonsav a cis-akonitáton keresztül szintetizálódik citrátból (Kuenz és Krull 2018), a fermentációs technológiáját megvizsgálva párhuzamok fedezhetők fel a citromsavéval. Az *A. terreus* rendelkezik alternatív légzéssel, lovasztatin produkciójánál már vizsgálták (Pérez-Sanchez és mtsai, 2017) és hipotézisünk szerint az IA biológiai úton történő előállításánál is szerepe van az AOX-nak, melyet szeretnénk bizonyítani.

2. Anyagok és módszerek

2.1 *A. nidulans*

A kísérletek során az 1. táblázatban feltüntetett *Aspergillus nidulans* törzseket alkalmaztuk.

Törzs	Genotípus	Hivatkozás
RDIT 9.32 (FGSC A1252)	<i>veA+</i> ; <i>aodA</i> ⁺	Tsitsigiannis és mtsai., 2004
TN02A3 (FGSC A1149)	<i>veA1</i> ; <i>pyroA4</i> ; <i>pyrG</i> ; Δ <i>nkuA</i>	Nayak és mtsai., 2006
RJMP 155.55	<i>veA+</i> ; <i>riboB2</i> ; <i>wA3</i>	Németh és mtsai., 2016
AMEF 001	<i>veA1</i> ; <i>pyroA4</i> ; <i>aodA</i> ⁻ ; Δ <i>nkuA</i>	Molnár és mtsai.,2018
AMZN 1.2 ^a	<i>veA+</i> ; <i>riboB2</i> ; <i>pyroA4</i> ; <i>aodA</i> ⁻ ; <i>wA3</i>	Molnár és mtsai.,2018
AMZN 2.39	<i>veA+</i> ; <i>pyroA4</i> ; <i>aodA</i> ⁷⁺ ; <i>wA3</i>	Molnár és mtsai.,2018
AMZN 3.37 ^b	<i>veA+</i> ; <i>aodA</i> ⁻	Molnár és mtsai.,2018
AMZN 4.7 ^c	<i>veA+</i> ; <i>aodA</i> ²⁺	Molnár és mtsai.,2018
AMZN 5.13 ^d	<i>veA+</i> ; <i>aodA</i> ³⁺	Molnár és mtsai.,2018

1. táblázat: A kísérletekben felhasznált *A. nidulans* törzsek.

aodA⁻: alternatív oxidáz negatív; csökkent alternatív légzési kapacitás,

aodA⁺: alternatív oxidáz pozitív; megnövekedett alternatív légzési kapacitás,

²⁺,³⁺: *aodA* kópiák száma,

^a; AMEF 001 és RJMP 155.55 törzsek keresztezéséből származó utód, ^b; AMZN 1.2 és RDIT 9.32 törzsek keresztezéséből származó utód, ^c; AMZN 2.13 és RDIT 9.32 törzsek keresztezéséből származó utód, ^d; AMZN 2.39 és RDIT 9.32 törzsek keresztezéséből származó utód.

Az AMEF 001-es törzset transzformációs technika segítségével hoztuk létre TN02A3 törzsből. Az AMEF 001 *aodA* negatív, mely a célgén uridin auxotróf (*pyrG*; orotidin-5'-

foszfát dekarboxiláz) markerre történő cseréjével valósult meg a homológ rekombináció során. A géndelécíóhoz szükséges kazettát double-joint PCR segítségével állítottuk elő (Yu és mtsai., 2004). A transzformációt Tilburn és mtsai. (1983) alapján végeztük. A sejtfal líziséhez Glucanex (Novozymes, Koppenhága, Dánia) enzimet használtunk 2,5%-ban (w/v). A mutánsokat kétszeresen tisztítottuk és egy sejtből származó kolóniát hoztunk létre. Az *aodA* gén hiányát PCR segítségével ellenőriztük.

Az AMEF 001 és az RJMP 155.55 keresztezése révén AMZN 1.2 törzset kaptuk, mely *veA*⁺ és *aodA* negatív. Az AMZN 1.2 és az RDIT 9.32 keresztezéséből létrejött az izogenikus AMZN 3.37. A több *aodA* kópiával rendelkező AMZN 2.39 az AMZN 1.2 transzformálásával jött létre. A transzformálás során 10 µg *aodA* fragmentet (2836 bp, azon belül promoter 905 bp és terminátor 836 bp szekvencia mérettel) és 1 µg pTN2 plazmidot alkalmaztunk, mely *A. fumigatus* *riboB2* marker génjét (riboflavin szintézisben résztvevő fehérjét kódol) tartalmazza (Nayak és mtsai., 2006). Az így kapott AMZN 2.13 és 2.39 jelzésű törzseket RDIT 9.32 törzsszel keresztezve kaptuk az izogenikus AMZN 4.7 és 5.13 törzseket. Az *aodA* gén jelenlétét PCR módszerrel, a kópiák számát Southern blot segítségével ellenőriztük.

2.1.1. Tenyésztési körülmények

A rázatott lombikos, süllyesztett fermentációs kísérletek AMM2 táptalajon végeztük (Fekete és mtsai., 2016). Az AMM2 alapvetően nitrogénforrásban tér el az AMM táptalajtól. Szilárd fázisú kísérletek szintén bakterológiai agar (1,5% w/v) felhasználásával történtek. A szénforrást és a marker törzsoldatokat Millipore Millex 0,22 µm-es szűrő (Merk, Darmstadt, Németország) segítségével csíramentesítettük és külön adtuk minden esetben a tápközeghez. A kísérleteknél 50%-os (w/v) D-glükóz és glicerin törzsoldatokból mértük ki a szénforrásokat.

A folyékony közegnél a leoltás 10⁶ db *A. nidulans* konídium/ mL mennyiségben történt. A rázott lombikos tenyésztéseknél 500 mL-es Erlenmeyer lombikokat (VWR International Kft., Debrecen, Magyarország) használtunk, melyeket 100 mL táptalajjal töltöttünk fel. Szénforrás a minimál táptalajban 1,5% (w/v) D-glükóz volt. A lombikos növesztések horizontális rázógépből (Infors AG, Bottmingen, Svájc) 200 rpm-en és 37°C-on zajlottak. A szénforrást és a marker törzsoldatokat Millipore Millex 0,22 µm-es szűrő segítségével csíramentesítettük a fermentorba juttatás előtt.

A fermentációk inokuluma 1%-ban (w/v) glicerint tartalmazott. Az inokulum mennyisége a fermentor térfogatának 10%-át tette ki. 24 H-s korban az előnövesztett tenyészetet zsugorított üvegszűrőn szűrtük és mostuk, majd a micéliumot átkanalaztuk a leoltó lombikba és a fermentorba jutattuk. A fermentációk esetében a D-glükóz kiindulási koncentrációja 15 g/L volt. A szénforrást és az egyéb markereket steril törzsoldatokból adtuk hozzá a táptalajhoz. A batch fermentációkat 2,5 L teljes és 2 L hasznos térfogattal rendelkező üvegfermentorokkal végeztük (Sartorius, Göttingen, Németország). A fermentációk szabályozott körülmények között zajlottak- 37°C-on; pH=6,5; betáplált levegő mennyisége=0,5vvm; 30%-os oldott oxigénszint (DO) tartása mellett. Az állandó hőmérsékletet a belső hőcserélő segítségével biztosítottuk, a DO (%) szintet a keverő (6 lapátos Rushton turbina) fordulatszámának változtatásával értük el, a pH szabályozása pedig 3M-os H₃PO₄ és NaOH oldatok adagolásával történt. A fermentáció párolgásának elkerülése érdekében golyós visszahűtőn (4°C-on) keresztül vezettük át az elmenő levegőt. A tenyészetet

a fénytől elzártuk a fermentortest becsomagolásával, vagy folyamatos fehér fényben növesztettük (fényintenzitás: $25 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

Szilárd táptalajra $1,45 \times 10^6$ db konídiumot oltottunk majd a szélesztés követően sötétben inkubáltuk 37°C -on 5-7 napig.

2.1.2. Analitikai módszerek

A száraz sejttömeg meghatározása 3,5-10 mL fermentléből történt. A micéliumot előre lemért szűrőpapírra vittük, majd vákuum segítségével leszűrtük a folyadék fázist, mostuk és súlyállandóságig szárítottuk 80°C -on. A száraz sejttömeg adatai két különböző mérés átlagából származnak, értékeinek átlagos eltérései nem haladták meg a 14%-ot. A növekedési rátát (g_{DCW}/h) két időpontban levett mintának (mintázási pontokban) DCW növekedésből számoltuk; a legmagasabb elért értéket tekintettük a tenyészet specifikus növekedési rátájának. A folyékony tenyészetekből vett minták D-glükóz tartalmát HPLC segítségével határoztuk meg. A készülék törésmutató (RI) detektorral rendelkezik. Az elválasztáshoz ioncserélő oszlopot alkalmaztunk (Bio-Rad Aminex HPX-87H+; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), izokratikus elúcióval ($10\text{mM H}_2\text{SO}_4$, 55°C -os kolonna hőmérséklet). A glükóz hasznosítást (g/h) azon két mintavételi pont között számoltuk, ahol a legnagyobb volt a koncentráció csökkenés. A sterigmatocisztin vegyületet folyékony közegnél (táptalaj+biomassza) 20 mL térfogatú mintákból nyertük ki, etil-acetátos (3×10 mL) extrakcióval. A szerves fázist összegyűjtöttük, majd vákuum bepárló segítségével szárítottuk, végül a mintát 1 mL acetonitrilben oldottuk vissza. Szilárd fázisból történő izoláció során is hasonlóan jártunk el, mint folyadékfázis esetén, annyi eltéréssel, hogy a kivágott agardarabokat felolvastottuk az extrakciós lépés előtt. A ST mennyiségének detektálására reverz fázisú HPLC-t (RP-HPLC-UV; HP 1090 Series L/M Liquid Chromatographs, Agilent-Technologies, Waldbronn, Németország) használtunk, mely UV dektorral (245nm -nél mértük az elnyelést) van ellátva. Az ST csúcsok azonosítása standard addíciós módszerrel történt, mennyiségét pedig az ST standard oldat 4 pontos kalibrációs egyeneséből számoltuk. Reverz fázisú C18 kolonna segítette az elválasztást, az izokratikus elúció során, a mozgófázist víz és acetonitril 4:6 (v/v) arányú, ecetsavval és Na-acetáttal puffereelt elegye alkotta ($\text{pH}=4,8$). Az áramlási sebességet $0,5$ mL/percen, a kolonna hőmérsékletét pedig 55°C -on tartottuk.

Az *A. nidulans* törzsek légzésének vizsgálatát 24 óras korban végeztük el (ekkor volt a legintenzívebb a légzés, de ezen kívül több időpontban is vizsgáltuk a respirációt), AMM2 táptalajon 15 g/L D-glükóz szénforráson. A mérések során Strathkelvin 782 2-Chanel Oxygen rendszert használtunk (Strathkelvin Instruments Kft., North Lanarkshire, Skócia). Az elektróda és termosztált (37°C) mintatartó segítségével $3,5$ mL mintából detektáltuk az oxigénfogyasztást. A citokrómox légzési lánc szétkapcsolásához kálium-cianidot (KCN), az alternatív légzés blokkolásához szalicilhidroxámsavat (SHAM) adagoltunk a mintához. A gátlószereket 10 mM-os végkoncentrációban alkalmaztuk. A teljes (gátolatlan) légzés a vegyszerek nélkül mért légzési értékek, az alternatív légzési értékek a KCN jelenlétében mért oxigénfogyasztás mínusz a KCN+SHAM jelenlétében mért fogyasztás. A reziduális légzést a KCN+SHAM jelenlétében mért légzési értékeként definiáltuk. A DCW-t minden mérés után meghatároztuk. A légzési értékeket a Strathkelvin 782 Oxygen system számítógépes programjával számoltuk.

2.1.3. Genomi DNS izolálása, Southern blot

A tenyészetet miracloth anyagon szűrtük át, majd hideg, steril ioncserélt vízzel mostuk. A vizet alaposan eltávolítottuk és folyékony nitrogénben fagyasztottuk le a mintákat. A sejtfeltáráshoz dörzsmozsarokat használtunk, melyet szintén folyékony nitrogénnel hűtöttünk. A keletkezett finom törmelékből NucleoSpin Plant II Kit (Macherey-Nagel, Düren, Németország) segítségével nyertük ki a genomi DNS-t. A Southern blot analízis során a Sambrook és Russel (2001) által leírt alapvető eljárást követtük. A DNS mennyiségét NanoDrop 2000 UV-Vis Spektrofotométerrel (Thermo Scientific) mértük meg. Az agaróz gélelektroforézisnél 5 µg-nyi DNS-t vittünk be a zsebekbe, a digoxigeninnel jelölt specifikus oligonukleotidokat pedig PCR DIG Probe Synthesis Kit (Roche Applied Science) felhasználásával készítettük el, templánként az RDIT 9.32 jelzésű törzs genomi DNS-t használtuk. A hibridizáció eredményét Lumi-Film kemilumineszcens detektáló filmmel (Roche Applied Science) azonosítottuk.

2.2. CBS törzsek

A munka során a 2. táblázatban felsorolt törzsekkel dolgoztunk.

Faj	Törzs	Hivatkozás
<i>Aspergillus niger</i>	ATCC1015	Andersen és mtsai., 2011
<i>Aspergillus niger</i>	CBS513.88	Pel és mtsai., 2007
<i>Aspergillus luchuensis</i>	CBS106.47	de Vries és mtsai., 2017
<i>Aspergillus tubingensis</i>	CBS134.48	de Vries és mtsai., 2017
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	CBS101740	de Vries és mtsai., 2017
<i>Aspergillus carbonarius</i>	CBS141172	de Vries és mtsai., 2017
<i>Aspergillus aculeatus</i>	CBS172.66	de Vries és mtsai., 2017
<i>Aspergillus versicolor</i>	CBS795.97	de Vries és mtsai., 2017
<i>Aspergillus sydowii</i>	CBS593.65	de Vries és mtsai., 2017
<i>Aspergillus nidulans</i>	FGSC A4	Galagan és mtsai., 2005
<i>Aspergillus oryzae</i>	RIB40	Machida és mtsai., 2005
<i>Aspergillus terreus</i>	NIH2624	Arnaud és mtsai., 2012
<i>Aspergillus fischeri</i>	NRRL181	Fedorova és mtsai., 2008
<i>Aspergillus clavatus</i>	NRRL1	Fedorova és mtsai., 2008
<i>Aspergillus glaucus</i>	CBS516.65	de Vries és mtsai., 2017
<i>Aspergillus wentii</i>	CBS141173	de Vries és mtsai., 2017
<i>Aspergillus zonatus</i>	CBS506.65	de Vries és mtsai., 2017

2. táblázat: A kísérletben alkalmazott *Aspergillus* törzsek.

2.2.1. Kísérleti körülmények

A kísérleteinket kizárólag szilárd MAE táptalajon (3. táblázat, *A. glaucus* gombánál NaCl-ot adtunk a közeghez) végeztük, melyhez légzésgátló vegyszereket adtunk, 10 mM-os végkoncentrációig-KCN, SHAM és KCN+SHAM kombinációkban. Agarkorongokat vágunk ki a tenyészetekből és friss MAE táptalajra tettük. 2 napos előnövesztést követően ismét agarkorongokat vágunk ki a tenyészet micéliumos részéből és áthelyeztük a gátlóanyagokat

tartalmazó MAE táptalajokra (a kontroll nem tartalmazott légzésgátló anyagokat). A törzseket 30°C-on, 9-12 napig inkubáltuk, naponta, meghatározott időpontokban mértük a tenyészetek átmérőjét, valamint fényképezéssel dokumentáltuk a növekedést.

MAE táptalaj összetétele^a	
Alkotóelemek	Koncentrációk (g/L)
malátakivonat	30
pepton	15
agar	15

3. táblázat: A MAE táptalaj összetétele.

2.3. *A. terreus*

A kísérletekben a NRRL-1960 jelzésű törzset használtuk (4. táblázat).

Törzs	Jellemző	Hivatkozás
NRRL 1960 (CBS 116.46, ATCC 10020)	standard itakonsav túltermelő törzs	Karaffa és mtsai., 2015

4. táblázat: A kísérletekben felhasznált *A. terreus* törzs.

2.3.1. Mn mentesítés

A mangánion koncentrációjának csökkentésére Dowex 50 W-X8 (100/200-mesh) kation cserélő gyantával töltött oszlopon engedték át az ioncserélt vizet és a D-glükóz oldatot. Az egyéb komponenseket ebben a vízben oldottuk fel. A végső mangánion koncentrációt $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ törzsoldat segítségével állítottuk be.

2.3.2. Tenyésztési körülmények

Az itakonsav termelés és a Northern blot vizsgálatokhoz Kuenz és társai (2012) által publikált táptalajt alkalmaztuk. A kísérleteknél 5×10^6 *A. terreus* konídium / táptalaj mL-jével oltottunk le minden esetben. A tenyésztési körülmények 33°C-on történtek, pH=3-on. A kísérleteknél 18%-os D-glükóz koncentrációt alkalmaztunk. Lombikoknál a rázó gép fordulatszámát 100-250 rpm között változtattuk.

RNS izoláláshoz a kísérleteknél 24 h-ig 1% (w/v) D-glicerinnel tartalmú minimál táptalajon növesztettük elő a tenyészetet, majd friss minimál táptalajra mostuk át a gombát, mely szénforrásként 1%-ban (w/v) tartalmazott D-glükózt. 1 h-s inkubálást követően adtuk hozzá különböző kiegészítőket (D- glükóz, D-szorbitol, KCl). A szénhidrátokat 0,1-20%-os (w/v) koncentrációban alkalmaztuk, a KCl végső koncentrációja 1 M volt.

A bioreaktoros tenyésztéseknél 2,5 L teljes, 2 L munkatérfogatú üvegfermentorokat (Sartorius, Göttingen, Németország) használtunk, melyek 6 lapátos Rushton-tárcsás keverővel rendelkeznek. A kiindulási pH érték 3 volt, pH szabályozást nem alkalmaztunk. A betáplált levegő mennyiségét 0,75 vvm-re, a hőmérsékletet 33°C-ra állítottuk. Az elmenő levegőt golyós visszahűtőn (4°C) keresztül vezettük át. A különböző DO (%) szinteket állítottunk be a fermentációk során (0-2-30%), melyeket a keverő fordulatszámának változtatásával értünk el. Az optimális tenyésztéshez szükséges paramétereket a fermentor vezérlőegysége szabályozta.

2.3.3. Analitikai módszerek

A DCW-t 5-10 mL tenyészetből határoztuk meg, a korábbi fejezetben leírtak szerint (lásd. Anyagok és módszerek A. *nidulans*). A D-glükóz és az IA mennyiségét HPLC-s módszerrel határoztuk meg, szintén a korábban leírt eszközökkel és paraméterekkel. Mn-ion meghatározás Karaffa és mtsai., (2015) leírtak szerint történt.

2.3.4. RNS izolálás, Northern blot

A mintákat miracloth-on szűrtük le, steril hideg vízzel mostuk, majd folyékony nitrogénben fagyasztottuk. A mintákat folyékony nitrogénnel hűtött dörzsmozsarakban tártuk fel és az RNS-t pedig NucleoSpin RNA Plant Kit (Macherey-Nagel, Németország) segítségével nyertük ki. A RNS mennyiségét és minőségét NanoDrop 2000 spektrofotométerrel (Thermo Scientific) és agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük. A Northern blot során is a Sambrook és Russel (2001) által leírt alapvető eljárást követtük. A denaturáló agaróz gélelektroforézisnél 5 µg-nyi RNS-t vittünk be a zsebekbe, a digoxigeninnel jelölt specifikus oligonukleotidokat pedig PCR DIG Probe Synthesis Kit (Roche Applied Science) felhasználásával készítettük el, templánként az NRRL-1960 jelzésű törzs genomi DNS-t használtuk. A hibridizáció eredményét Lumi-Film kemilumineszcens detektáló filmmel (Roche Applied Science) azonosítottuk.

2.4. Bioinformatikai elemzés

A nukleotidszekvenciákat National Center for Biotechnology Information (NCBI) és a Joint Genome Institute (JGI) adatbázisokból gyűjtöttük ki.

2.5. Felhasznált vegyszerek

Kísérleteinkben analitikai tisztaságú vegyszereket használtunk. A táptalajkomponensek és a finomvegyyszereket Sigma-Aldrich Kft.-től, a molekuláris biológiai munka során felhasznált anyagokat pedig a Roche Magyarország Kft.-től szereztük be, minden más eset pedig megemlítésre kerül.

2.6. Reprodukálhatóság

A publikált eredmények legalább 3-5 független biológiai kísérlet átlagából származnak. Az adatokat SIGMAPLOT programmal (Jandel Scientific, San Jose, CA, USA) értékeltük ki és vizualizáltuk. A kísérletsorozatokon belül standard eltéréseket (SDs) határoztunk meg. A SD eltérés mindig kevesebb volt, mint az átlag 14%-a. Szignifikancia vizsgálatára a légzési értékekben, DCW-ben, valamint D-glükóz koncentrációra a táptalajban az *aodA* mutáns törzsekben (viszonyukat a kontroll törzshöz képest) Student féle t-tesztet végeztünk, a probabilitás adatait (p) az Eredmények fejezetben kerültek feltüntetésre.

3. Új tudományos eredmények

3.1. *A. nidulans*

- Az *aodA* egy fiziológiailag releváns, SHAM érzékeny, cianid-rezisztens terminális oxidáz kódol *A. nidulans* gombában, melynek aktivitását meghatározhatjuk a cianid jelenlétében történő oxigén felvétellel.
- Az *aodA* gén kópiaszáma nem befolyásolja a specifikus növekedési rátát.
- Az *aodA* gén hiánya nincs hatással a D-glükóz felvételre.
- A ST képződés függ *aodA* kópiaszámtól az *A. nidulans* gombában, de csak fény hiányában.
- Az alapvető ST produkciós szint ("stage 1") független az AOX jelenlététől vagy hiányától megvilágított tenyészetekben.
- Az ST bioszintézisben a "stage 2" (emelkedett szint) expressziója irányított a velvet komplex által és a "stage 1" (alapszint) expressziójához nem szükséges velvet protein.

3.2. *Aspergillus* törzsek (CBS)

- Az *Aspergillus* törzsek többsége 1-3 AOX izoenzimmel rendelkezhetnek.
- AOX aktivitásának szerepe lehet a micéliális növekedésben és konidiospóra képzésben.

3.3. *A. terreus*

- *A. terreus* gomba 2 feltételezett AOX izoenzimmel rendelkezik.
- A cianid –rezisztens légzésért valószínűsíthetően az *aodA* gén a felelős.
- Az itakonsav hozama függ az alternatív oxidáz aktivitásától.

4. Összegzés

Az *Aspergillus* genus tagjai fontos helyet foglalnak el biotechnológiában (De Vries és mtsai., 2017), termeljenek akár hasznos metabolitokat, vagy veszélyes toxinokat. A kísérleteinkben lehetőségünk nyílt a nemzetség fajainak vizsgálatára, melynek során a cianid-rezisztens alternatív oxidáz (AOX) funkcióját tanulmányoztuk a gombafiziológiában, valamint kapcsolatát primer és szekunder metabolit termeléssel. Az alternatív légzést vizsgálták már növényekben stressz alatt, továbbá válaszát a fényre is megfigyelték (Vanlerberghe 2013; Xu és mtsai., 2011).

Az *A. nidulans* sterigmatocisztin (ST) produkciója révén biztonságosan vizsgálható az aflatoxinok bioszintézise (AT) laboratóriumi körülmények között (Amaike és mtsai., 2013; Németh és mtsai., 2016). Az AOX és ST bioszintézis kapcsolatát korábban vizsgálták (Leiter és mtsai., 2016), ahol a nitrát-indukálható promotert használó, szabályozatlan deregulációja az AOX-nak negatív hatással volt az ST hozamra-ennek ellenére az eredmények kérdéseket vetettek fel bennünk. Célul tűztük ki, hogy alaposan megvizsgáljuk, milyen hatással rendelkezik az AOX aktivitás a ST bioszintézisre, hogyan változnak meg a termékhozamok jelenlétében vagy hiányában, figyelembe véve a fény hatását, mint külső ingert. Kutatásunkhoz elengedhetetlen volt, hogy megfelelő *aodA* (AOX-t kódó gén; locus AN2099) genetikai háttérrel rendelkező mutáns rendszert hozzunk létre (*aodA* hiány- és több kópiás törzsek). A következő lépésben **bizonyítottuk, hogy az *aodA* egy fiziológiai releváns cianid-rezisztens AOX-t kódol**, melyet légzésméréssel erősítettünk meg. A hiánymutáns alternatív légzési értékei cianid jelenlétében erőteljesen visszaestek a vad törzshöz képest, ehhez képest az OE törzseknél pedig növekedést detektáltunk, mely arányos volt a kópiaszámmal (statisztikailag alátamásztva). A légzési értékek függetlenek voltak attól, hogy fényben vagy sötétben történtek a tenyésztéseink. A törzsek között a növekedési rátában nem, viszont a D-glükóz hasznosításában különbségeket találtunk; a hiánymutáns vadhoz képest hasonlóan, míg az OE törzsek intenzívebben vették fel a környezetükben található szénforrást. A korábban Németh és mtsai (2016) által megtervezett fermentációs körülményekkel végeztük el kísérleteinket folyékony és szilárd fázison a mutánsokkal, figyelemmel kísérve az ST termelést fényben vagy annak hiányában. Érdekes módon, az OE törzsek alternatív légzési kapacitása jelentősen megemelkedett a késői stacioner növekedési fázisban a vad és *aodA* hiánymutánséhoz képest. **Az eredményeink azt mutatták, hogy a sterigmatocisztin képződés függ *aodA* kópiaszámtól *A. nidulans* gombában, de csak fény hiányában**, mind szubmerz, mind szilárd felületen történő tenyésztésnél. A ST produkcióban két szakaszt különítettünk el („stage 1” és „stage 2”). Az eredményeink azt mutatják, hogy fényben az *ΔaodA* tenyészetekben az ST mennyisége a „stage 1” alapszintre csökkent vissza (hasonlóan a sötétben is). Ez azt sejteti, hogy a fény jelenlétének csak a „stage 2” fázisban (mikor az ST mennyisége elkezd emelkedni) van szerepe, továbbá azt is, hogy azon AOX-zal rendelkező törzsek produktivitása növekszik, amelyeknél lehetséges a citokróm- és alternatív légzés közötti arány változtatása. Úgy gondoljuk, hogy **az AOX többfajta módon járulhat hozzá az ST bioszintézishez: a NADH visszaoxidálását végzi, így nem keletkezik ATP, hozzájárulva a szénváz fluxus fenntartásához. A másik kapcsolódási pont a ROS elleni védekezésben elfoglalt funkciója lehet; bár az AOX nem mérsékli a ROS mennyiségét és nem kapcsolódik antioxidáns bioszintézishez, a redox egyensúly fenntartásáért működik,**

amikor a TCA és a citokrómos légzési láncon áthaladó fluxust csökkenti, redukálva így a ROS vegyületek képződését. A NADPH, mint redukáló ágens, a pentóz-foszfát útvonal oxidatív részében keletkezik (Chen és mtsai., 2015; Wasylenko és mtsai., 2015), a glükóz-6-foszfát ellátottságát igényli, melyhez a glükoneogenezis megnövekedett fluxusa is hozzájárul, amikor az elsődleges szénforrás (D-glükóz) kimerül. Az *A. nidulans* az *acuM* és *acuK* regulátor gének az *aodA* és mitokondriális carriereket kódoló géneket szabályozzák. *P. anserina* gombában is tanulmányozták (Rse2 és Rse3 néven); az AOX overexpressziójára, a glükoneogenezis kulcsenzimjeire, a NADH:ubikinon oxidoreduktázra vannak hatással. **Feltételezzük így, hogy az AOX az anabolikus redukáló ágensek formációjában járulhat hozzá a ST bioszintéziséhez.**

Az AOX expresszióját és aktivitását légzésgátló anyagok, valamint más stressz hatások felerősíthetik (Yukioka és mtsai., 1998; Tanton és mtsai., 2003; Leiter és mtsai., 2016). A kálium-cianid (KCN) a citokrómos légzési lánc szétkapcsolását (Slater 1967), míg a szalicil-hidroxámsav (SHAM) az alternatív oxidáz inhibícióját végzi (Murphy és Lang-Unnasch 1999). A kísérletekben alkalmazott CBS-es *Aspergillus* fajok mindegyike rendelkezik legalább egy AOX-t kódoló génnel, egyes esetekben akár 2- vagy 3-mal. **A rokonsági viszonyokat megvizsgálva, azt vehetjük észre, hogy a szorosabb (közelebbi) kapcsolatban álló fajoknál az izoenzimek számában (így a kódoló génekben is) a hasonlóság jellemző.** Szilárd malátakivonatot tartalmazó táptalaj felhasználásával tettük lehetővé az AOX aktivitás kiteljesedését, az egyes sorozatokban pedig KCN-ot vagy SHAM-ot, valamint a kettő kombinációját alkalmaztuk. A KCN tartalmú táptalajon a sejtek nem voltak képesek a kontroll ütemében növekedni, hiszen a légzést szétkapcsoló szernek következtében lényegesen kevesebb ATP előállítása történhetett. A SHAM-on a növekedés gyorsasága szintén elmaradt a kontrolltól, viszont KCN-ostól is. Esetünkben a KCN+SHAM tartalmú táptalajon a növekedés mértéke erősen redukálódott, bizonyos esetekben megállt. Tapasztalataink szerint nem volt olyan eset, hogy a tenyészetek kizárólag KCN jelenlétében nem képeztek konidiospórát, ezzel ellentétben SHAM-on több törzsnél is elmaradt a spóraformálás, mely felvetheti az AOX szerepét a gomba életciklusában. Kísérleteinkben a 2 AOX izoproteines fajok tenyésztete gyorsabban növekedett, valamint a *Nigri* szekcióba tartozóké, ami **AOX növekedésben betöltött szerepére enged következtetni.** A biotechnológiai iparban jelentős mikroszkópikus gombák javarészt 2 AOX fehérjével rendelkeznek, találunk köztük potenciális toxin előállítókat, valamint hasznos szekunder metabolit termelőket is. **Egy illetve a második AOX-t kódoló gén birtoklása fiziológias előnyt jelenthet az *Aspergillus* nemzettség tagjainak.**

Az *A. terreus* gombával történő itakonsav (IA) előállításnak a körülményeit több tanulmány is taglalja (Boruta és Bizukojc 2017; Kuenz és Krull 2018). *A. niger* citromsav fermentációknál korábban megfigyelték a cianid-rezisztens légzést (Zehentgruber és mtsai. 1980; Kirimura és mtsai., 1987), melynek inhibíciója a produktivitás csökkenésével járt (Kirimura és mtsai., 2000), ezzel szemben *A. terreus* IA fermentációknál ilyen részletesen még nem vizsgálták az AOX szerepét. A megfelelő levegőztetés fontos kritérium az IA *A. terreus*-szal végzett előállításnál, a levegőztetés leállításának csökkent produktivitást vagy a teljes leállítását eredményezheti az IA termelésnek (Gyamerah 1995; Nelson és mtsai 1952), valamint korábban már rámutattak, hogy a tenyészet megfelelő és folyamatos levegőztetése elengedhetetlen a termelői fázis alatt (Kuenz és mtsai., 2012). DO (%) szabályozott

fermentációknál tanulmányoztuk az AOX aktivitását (expressziós analízis és légzésmérés) és az IA produkciót. Az IA képződésnek az alacsony DO (%) szint nem kedvez, magasabb oxigénszaturáció alkalmazásával jobb hozamok érhetőek el. Ebből adódóan az eredményeink (az irodalmi adatokat figyelembe véve) azt is sugallják, hogy a túlzottan megemelt DO (%) szint nem jár együtt feltétlen a magas IA titerrel, tehát a **DO (%) szint ideális beállítása javasolt az *A. terreus* IA fermentációk során. Az eredményeinkből arra tudunk következtetni, hogy az IA hozama függ az oldott oxigénszinttől és az AOX aktivitástól.** Gyanítható, hogy az *aodA* génnek az IA produkció alatt-hasonlóan az *A. niger aox1* génjéhez-konstans az expressziója (bár nem vizsgáltuk végig a fermentáció ideje alatt) és az alternatív légzés szintén végigkíséri a fermentáció mindegyik szakaszát. Az *aox2* géntermék (*A. niger*-ben) nem expresszálódott citrát termelő körülmények között, csak úgy, mint az *aodB* gén, *A. terreus*-ban. Egyéb sokknál (ozmotikus-, sóstressznél) konstitutív expressziót tapasztaltunk, viszont ehhez nem kapcsolódott az alternatív légzés kapacitásának növekedése, ami arra utal, hogy a kifejeződés folyamatos, viszont a transzláció folyamata nem indult meg. Az irodalmi adatok és saját eredményeink között összecsengés fedezhető fel, mely arra enged következtetni, hogy az **AOX-nak hasonló funkciója lehet IA biológiai előállításában, mint citromsavéban.** Az AOX szerepének bizonyításához és megértéséhez elengedhetetlen a jövőben az *aodA* és *aodB* géndeléciós mutánsok a tesztelése az IA termelékenység kapcsán.

5. Introduction and objectives

In aerobic respiration the final electron acceptor is the atmospheric oxygen (O₂). Respiratory system responsible for this process, belongs to eukaryotes located in the inner mitochondrial membrane and builds up of several components. Respiration linked tightly to ATP synthesis in these organisms, because the formed proton gradient is the impulsion of the ADP-ATP conversion. ATP is an essential component for microbes, stores the chemical energy and has emphasized function in metabolism, plays role in reactions or in regulation of the processes. Also some fungi can possess another respiratory system. (Joseph-Horne et al., 2001). The alternative oxidase (AOX) is the terminal oxidase of the alternative respiratory pathway (branches from the cytochromic pathway) donates the electrons from the ubiquinone pool to the molecular oxygen and reduces them to water (Vanlerberghe, 2013). Unlike the cytochromic respiratory chain, insensitive to cyanide, and its operation linked to no /or minimal ATP synthesis. The alternative respiration has been found and detected in many organisms (prokaryotes, lower or higher order of eukaryotes; Bendall and Bonner, 1971; Lambowitz et al., 1989; Siedow and Umbach, 1995; Stenmark and Norlund, 2003; Joseph-Horne et al., 2001; Tudella et al., 2004; Molen et al., 2006; MacDonald et al., 2009). In the past, the physiological function of this pathway has been examined and described well in plants.

Aflatoxins (AT) are among the most carcinogenic natural substances known to man. These mycotoxins belong to a large and diverse class of metabolites known as polyketides (Hopwood and Sherman, 1990), and are produced by a variety of fungi, mainly from the genus *Aspergillus* (Rank et al. 2011). These opportunistic fungi can contaminate cereal crops and other staple commodities before harvest or during storage, leading to economic losses and even famine in tropical countries (Wilkinson et al. 2004). Upon exposure, ATs can cause acute hepatic failure in humans and animals (Wogan 1992). A less toxic fungal compound named sterigmatocystin (ST) is the penultimate intermediate in the biosynthesis of AT B₁ (Yabe and Nakajima, 2004; Klejnstrup et al., 2012). However, in *A. nidulans*, ST is the stable end product of the corresponding secondary metabolism pathway (Barnes et al. 1994), as it lacks the genes encoding the enzymes for the final two conversions (*aflP* and *aflQ*) from the AT gene cluster in *A. flavus* (Amaike and Keller, 2011; Yu et al., 2004). Biosynthesis of ST and AT share similar regulatory mechanisms, including the two pathway-specific transcription factors AflR and AflJ (AflS) thus allowing the study of AT biosynthesis in *A. nidulans* without producing the potent mycotoxin itself (Amaike és mtsai., 2013; Németh és mtsai., 2016). The AT/ST biosynthetic pathway is well-characterized in *A. nidulans* (Barnes et al., 1994; Keller and Adams, 1995; Brown et al, 1996), but many of the mechanisms by which environmental factors influence mycotoxin formation remain enigmatic (Maggio-Hall et al., 2005; Keller et al., 1997). Light – a fundamental environmental stimulus with broad effects – has been reported to cause diverse changes in AT/ST production (Kato et al., 2003; Atoui et al., 2010; Bayram et al., 2008; Bayram et al., 2016). with data largely supporting an inhibitory impact of light on AT/ST biosynthesis through a conserved heteromeric complex known as the Velvet Complex (Bayram et al., 2008).

Itaconic acid is a five-carbon dicarboxylic acid, frequently used as a building block for the synthesis of a variety of compounds with a broad range of applications. It is biologically

produced by large-scale submerged fermentations employing the filamentous Ascomycete fungus *Aspergillus terreus* (Batti and Schweiger 1963). The process technologies currently used are similar to those applied for industrial citric acid production by the related species *Aspergillus niger*, including strong aeration and agitation of the fermenter. Citric acid is an early intermediate of itaconic acid synthesis (Kuenz és Krull 2018), and for the current study we assumed that the reason for high dissolved oxygen levels in itaconic acid production would be similar to the one in citric acid production.

The AOX as a terminal oxidase of the alternative pathway belongs to many organisms (including yeasts and filamentous fungi) and has several functions which can be an important item of fungal physiology, and its characterization has become simpler by technological development. Earlier the most well-known method to examine the alternative oxidase activity was oxygen consumption measurements from the medium with polarographic oxygen electrode. Nowadays, the molecular biological methods contribute to punctually and rapidly examination of the hypothesis belong to alternative respiratory pathway. Many studies pay attention to function of AOX, results show diversity; however raise more questions thus we need to answer them.

(1.) Previous studies show that the ST-precursor of AT- can be examined safety and reproducibly in *Aspergillus nidulans*. It was described that AOX activity was heavily stimulated when the sugar-based growth medium was supplemented with plant oils, and this coincided with increased levels of cephalosporin C (secondary metabolite) production (Karaffa et al., 1999). Many species of *Aspergillus* have more than one *aod* gene (our unpublished data). However, *A. nidulans* harbours a single AOX-encoding gene. Although we can find a study of the relationship between AOX and ST (Leiter et. al, 2016), but role of the AOX in ST biosynthesis is remained still unclear. To find the function of AOX we make decision to create mutant system with well characterised genetically background (all copies of *aodA* are expressed from its genuine promoter; *aodA* deletant and overexpressing strains), then examine the effect of AOX to ST productivity in fine regulated fermenters (Németh et al., 2016) on both of liquid and solid phase.

(2.) Several publications described that the light affects on the ST biosynthesis (e.g. Bayram et al., 2008; Bayram et al., 2016). The effect of the light on AOX activity is examined well in plants, but less information available of this context in filamentous fungi. Velvet complex is light regulated protein complex, influences regulation of the ST synthesis and also determinates the experiments. In the next research stage, we would like to demonstrate simultaneous effect of light and AOX activity on ST productivity using fine controlled parameters.

(3.) In plant and fungal physiology many factors have influence on the AOX activity (Vanlerberghe 2013). If the mitochondrial respiratory system is blocked with inhibitor, the alternative respiration increases. The AOX can be equipment in the stress defences mechanism for the microorganism against oxidative shock, allows maintaining redox balance and rapid adaptation to the environment, which is essential for them to survive. The members of the *Aspergillus* genus can produces industrially important metabolites (e.g. *A. nidulans*, *A. niger*, *A. terreus*, *A. oryzae*), or carcinogenic mycotoxins (*A. flavus*) and some of them are

photogenic for humans. The alternative respiration of *A. niger* and *A. fumigatus* has investigated before (Kirimura et al. 1987; Magnani et al., 2007), but on the other hand we have no adequate information of the other *Aspergillus* species yet. To examine the AOX activity and the adaptation capability to adverse factor in different *Aspergilli*, we performed growth test in presence of KCN, SHAM or KCN+SHAM.

(4.) In the present, the industrial volume quantity of citric acid is produced by *Aspergillus niger* (Bercovitz et al., 1990). During citric acid fermentations the AOX has unclear function which determined the technology (Karaffa és Kubicek 2003). The alternative respiration was detected in all phase of citric biosynthesis (Zehentgruber et al., 1980) and decreased the energy level of the cell (Kirimura et al., 2000). Itaconic acid is synthesised from citrate through cis-akonitate (Kuenz and Krull 2018), the parameters of fermentation is similar to citric acid production. *A. terreus* owns alternative respiration; it has been investigated during lovastatin synthesis (Pérez-Sanchez et al., 2017). Thus we would like give evidence that the AOX activity determines the IA yield in *A. terreus* fermentations.

6. Material and methods

6.1. *A. nidulans*

Aspergillus nidulans strains used in this study listed in table 1.

Strains	Genotype	Reference
RDIT 9.32 (FGSC A1252)	<i>veA</i> ⁺ ; <i>aodA</i> ⁺	Tsitsigiannis et al., 2004
TN02A3 (FGSC A1149)	<i>veA1</i> ; <i>pyroA4</i> ; <i>pyrG</i> ; <i>ΔnkuA</i>	Nayak et al., 2006
RJMP 155.55	<i>veA</i> ⁺ ; <i>riboB2</i> ; <i>wA3</i>	Németh et al., 2016
AMEF 001	<i>veA1</i> ; <i>pyroA4</i> ; <i>aodA</i> ⁻ ; <i>ΔnkuA</i>	Molnár et al., 2018
AMZN 1.2 ^a	<i>veA</i> ⁺ ; <i>riboB2</i> ; <i>pyroA4</i> ; <i>aodA</i> ⁻ ; <i>wA3</i>	Molnár et al., 2018
AMZN 2.39	<i>veA</i> ⁺ ; <i>pyroA4</i> ; <i>aodA</i> ⁷⁺ ; <i>wA3</i>	Molnár et al., 2018
AMZN 3.37 ^b	<i>veA</i> ⁺ ; <i>aodA</i> ⁻	Molnár et al., 2018
AMZN 4.7 ^c	<i>veA</i> ⁺ ; <i>aodA</i> ²⁺	Molnár et al., 2018
AMZN 5.13 ^d	<i>veA</i> ⁺ ; <i>aodA</i> ³⁺	Molnár et al., 2018

Table 1. *Aspergillus nidulans* strains used in this study.

All strains descended from FGSC A4, a genome sequenced strain.

aodA⁻: alternative oxidase negative; decreased cyanide-resistant respiratory rate.

aodA⁺: alternative oxidase positive. ²⁺; ³⁺: number of *aodA* copies

¹ Offspring from a cross between AMEF 001 and RJMP 155.55.

² Offspring from a cross between AMZN 1.2 and RDIT 9.32.

³ Offspring from a cross between AMZN 2.13 and RDIT 9.32.

⁴ Offspring from a cross between AMZN 2.39 and RDIT 9.32.

A gene deletion cassette was created *in vitro* with the double-joint PCR method (Yu et al., 2004) to delete the alternative oxidase (*aodA*) gene (locus AN2099). The cassette contained the *Aspergillus fumigatus* orotidine-5'-phosphate decarboxylase (*pyrG*) gene as primary selection marker. *A. nidulans* transformation was performed essentially as described by Tilburn et al. (1983), using Glucanex (Novozymes; Copenhagen, Denmark) as cell-wall

lysing agent. Host strain TN02A3 was transformed with 10 µg of the linear deletion cassette. Uridine-prototroph transformants were tested for the absence of *aodA* by PCR using genomic DNA and specific oligonucleotide primers (Table S2). Transformants from which the *aod* gene was absent were purified twice to single cell colonies and maintained on selective minimal medium plates. The $\Delta aodA$ deletion mutant AMEF-001 (which has a *veA1*, *pyrA4* and $\Delta nkuA$ -deleted background) was crossed with RJMP 155.55, a strain carrying the intact *nkuA* gene, resulting in AMZN 1.2. This strain harbours the wild type *nkuA* gene and is auxotroph for pyridoxine and riboflavin. Strains with more copies of *aodA* (two or three; further on referred to as overexpressing [OE] mutants) were generated using a full-length gene fragment, PCR-amplified off genomic DNA (2836 bp, including a 905-bp long “promoter” (i.e., before the ATG) and an 836-bp long “terminator” (i.e., behind the STOP codon) sequence). Riboflavin auxotroph strain AMZN 1.2 was co-transformed with 10 µg of *aodA* fragment and 1 µg of pTN2 plasmid containing the *A. fumigatus riboB* gene (Nayak et al., 2006) to yield riboflavin-prototroph primary transformants. These were PCR-verified for the presence of *A. fumigatus pyrG* and the *A. nidulans aodA* coding regions. The *aodA* copy number was subsequently estimated by Southern blot analysis in selected offspring.

Like almost all laboratory strains of *A. nidulans*, TN02A3 carries a missense mutation in the start codon of the *velvet* (*veA*) gene known as *veA1*. This gene encodes a key regulator of sexual development and ST synthesis, and is involved in responses to light. Strains lacking the *veA* gene are reportedly unable to produce ST under any condition. For the current study, we generated strains that are wild type for *velvet* by meiotic recombination. The genetic background of the *aodA*-deleted (AMZN 1.2) and the thereof derived *aodA*-OE strains (AMZN 2.13 and AMZN 2.39, respectively) was equalised by sexual recombination, crossing each of them with RDIT 9.32, wild type for *velvet*. Offspring was selected for which all known genotypic markers other than *aodA* (i.e., auxotrophies, spore color) were identical. These strains then were verified for the absence or presence of *aodA* and *velvet* by PCR, and the *veA*⁺ strains that had acquired *aodA* in one or more copies or lacked this gene, were studied on plates for apparent growth phenotypes: Strains AMZN 3.37 ($\Delta aodA$), AMZN 4.7 (two copies of *aodA*) and AMZN 5.13 (three copies of *aodA*) were selected to be used in the fermentation experiments.

6.1.1. Culture conditions

AMM2 is standard Aspergillus Minimal Medium (AMM) in which nitrate is substituted with 0.92 g di-ammonium tartrate L⁻¹ while 0.1 g calcium chloride L⁻¹ is also included. AMM2-based synthetic growth media used for submerged bioreactor cultivations – 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. D-Glucose was used at 1.5 % (w/v) initial concentration. Agar-solidified complete medium was used to obtain vegetative spores and consisted of AMM2 supplemented with yeast extract (5 g L⁻¹); peptone (10 g L⁻¹) and corn steep liquor (10 g L⁻¹). To quantitatively assess specific growth rates, biomass and ST yields, fermentations were carried out in 2.5- L glass vessels (Sartorius AG, Göttingen, Germany) with a culture volume of 2 L, 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 min⁻¹). The dissolved oxygen (DO) level was maintained

at 30 % 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.

To investigate relations between alternative respiration and ST synthesis, well known negative regulatory effects on ST formation by light were taken into account, hence, fermentations – including inoculation and sampling – were performed either in the dark or in continuous white light (25 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) and the results were compared.

Shake flask cultures in 100 mL AMM2 with glycerol (1 % v/v) as the carbon source in 500 mL glass Erlenmeyer flasks (VWR International Ltd., Debrecen, Hungary) grown for 24 h at 200 rpm and 37 °C in a rotary shaker (Infors AG, Bottmingen, Switzerland) were used as inoculum. These seed cultures were started with 10^6 mL^{-1} freshly harvested *A. nidulans* conidiospores suspended in a sterile 1/10,000 Tween 20 solution, while 2- L bioreactors were inoculated with the biomass from 2 seed cultures. Thereto the pre-grown mycelia were harvested by filtration over a sintered glass funnel, thoroughly washed with cold sterile tap water and transferred under aseptic conditions into the fermenter.

6.1.2. Analytical methods

Dry Cell Weight (DCW) was determined from 10-mL culture aliquots as described by Fekete et al. (2016) . The biomass was harvested on a pre-weighted glass wool filter and washed with cold tap water, after which the filter was dried at 80 °C until constant weight. Dry weight data reported in Results are the means of two separate measurements, which never deviated by more than 14%. Residual D-glucose concentrations were determined by HPLC with refractive index (RI) detection, as described by Fekete et al. 2002. Biomass production rates ($\text{g}_{\text{DCW}}/\text{h}$) were calculated from the increase in DCW over the time elapsed between two subsequent samplings (i.e., sampling time points); the highest of the thus obtained values was taken as the maximal specific growth rate of the culture. Likewise, glucose utilization rates (g/h) were calculated from the highest decrease in residual concentrations between two subsequent samplings.

The measurement of the mycelial respiration rates, including that of the alternative respiration, was performed with an oxygraphic electrode (Strathkelvin Instruments Ltd., North Lanarkshire, Scotland) at 37 °C, according to the manufacturer's instructions. Potassium cyanide (1 mM) and salicyl hydroxamic acid (SHAM: 10 mM) were used to selectively inhibit the cytochrome C oxidase and the alternative oxidase, respectively. After these oxygen consumption measurements, the used biomass was harvested and DCW was determined, allowing calculation of the specific oxygen uptake rates.

Extraction of ST from the fungal culture (= medium plus biomass) and determination of its concentration was carried out as described by Németh et al. 2016.

6.1.3. Genomic DNA isolation and Southern blot analysis

Mycelia were harvested by filtration over nylon mesh and thoroughly washed with sterile distilled water. Excess liquid was removed by squeezing the mycelia between paper sheets, and the biomass was rapidly frozen in liquid nitrogen. For nucleic acid isolation, frozen biomass was ground to a dry powder using a liquid nitrogen-chilled mortar and pestle. Genomic DNA was extracted using a NucleoSpin Plant II kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany). Biomass sampling, genomic DNA isolation, DNA quality verification, quantification and Southern blot analysis were all performed as described by Fekete et al 2016.

6.2. CBS strains

Aspergillus strains used in this study listed in table 2.

Species	Strains	Reference
<i>Aspergillus niger</i>	ATCC1015	Andersen et al., 2011
<i>Aspergillus niger</i>	CBS513.88	Pel et al., 2007
<i>Aspergillus luchuensis</i>	CBS106.47	de Vries et al., 2017
<i>Aspergillus tubingensis</i>	CBS134.48	de Vries et al., 2017
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	CBS101740	de Vries et al., 2017
<i>Aspergillus carbonarius</i>	CBS141172	de Vries et al., 2017
<i>Aspergillus aculeatus</i>	CBS172.66	de Vries et al., 2017
<i>Aspergillus versicolor</i>	CBS795.97	de Vries et al., 2017
<i>Aspergillus sydowii</i>	CBS593.65	de Vries et al., 2017
<i>Aspergillus nidulans</i>	FGSC A4	Galagan et al., 2005
<i>Aspergillus oryzae</i>	RIB40	Machida et al., 2005
<i>Aspergillus terreus</i>	NIH2624	Arnaud et al., 2012
<i>Aspergillus fischeri</i>	NRRL181	Fedorova et al., 2008
<i>Aspergillus clavatus</i>	NRRL1	Fedorova et al., 2008
<i>Aspergillus glaucus</i>	CBS516.65	de Vries et al., 2017
<i>Aspergillus wentii</i>	CBS141173	de Vries et al., 2017
<i>Aspergillus zonatus</i>	CBS506.65	de Vries et al., 2017

Table 2: *Aspergillus* strains used in this study

6.2.1. Culture conditions, growth tests

Strains was pregrown on solid MAE medium (30 gL⁻¹ malt extract, 15 gL⁻¹ peptone, 15 gL⁻¹ agar) for 2 days. Fresh mycelia plug was cut off and cultivated on solid MAE supplemented with 10mM of KCN or SHAM or combination of KCN+SHAM. Strains were incubated on 30 °C for 9-12 days. The diameters of colonies were measured daily and pictures were taken of the cultures.

6.3. *A. terreus*

NRRL-1960 strain was used in this study.

Strain	Reference
NRRL 1960 (CBS 116.46, ATCC 10020)	standard IA overproducer Karaffa et al., 2015

Table 3: *A. terreus* strain used in this study.

6.3.1. Reduction of Mn

The reduction of manganese ion was carried out in water and D-glucose solution using Dowex 50 W-X8 cation exchange resin (Karaffa et al. 2015).

6.3.2. Culture conditions

The medium for submerged cultivation was dissolved in distilled water contained 0.1gL⁻¹ KH₂PO₄, 3 g L⁻¹ NH₄NO₃, 1 g L⁻¹ MgSO₄×7H₂O, 5 g L⁻¹ CaCl₂×2H₂O, 1.67 mg L⁻¹ FeCl₃×6H₂O, 8 mg L⁻¹ ZnSO₄×7H₂O, and 15 mg L⁻¹ CuSO₄×7H₂O. The carbon sources (100-180 g/L) and other supplements were added from steril stock

Shaken flasks cultivations were performed in 500 mL Erlenmeyer flasks (VWR International Ltd., Debrecen, Hungary) filled with 100 mL medium. Flasks were incubated in horizontal rotary shaker (Infors AG, Bottmingen, Switzerland) in 33 °C and 200 rpm. For Northern blot cultures were pregrown on 1,5 % (w/v) glycerol for 24 h. Mycelia were harvested and washed with sterile cold tap water and transferred to Erlenmeyer flasks contained fresh medium contained 1% (w/v) D-glucose as carbon source and different supplements were added as required. Supplements (D-glucose, D-sorbitol, KCl) were used in different concentration (1-20% or 1 M). To apply the mild-control of the parameters (i.e. dissolved oxygen level), submerged cultures were performed in 2.5 L glass vessels called fermenters (Sartorius AG, Göttingen, Germany) equipped with one six-blade Rushton disc turbine impeller using 2 L of working volume. The operation conditions were 33 °C and 0.75 vvm aeration, maintaining different level of dissolved oxygen saturation (DO [%]; 0-30%) controlled by the speed of the impeller. Initial pH was adjusted to 3.00 and not controlled during the fermentation process. The waste gas was cooled at 4°C by reflux condenser to

minimize the medium loss. Cultures were inoculated uniformly with 5×10^6 conidia per mL of medium.

6.3.3. Genomic DNA and total RNA isolation, Northern blot

Mycelia were harvested, filtrated by nylon mesh and washed with sterile distilled water. Surplus water was removed by squeezing mycelia with paper towels and samples were frozen immediately in liquid nitrogen. Frozen biomass was grounded with liquid nitrogen-chilled pestle and mortal. DNA was extracted applying NucleoSpin Plant II Kit, for RNA isolation NucleoSpin RNA Plant kit was used (both of them from Macherey-Nagel, Düren, Germany). The quality of RNA was evaluated upon electrophoresis in native 2 % agarose gels and concentration of samples was determined by a NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). Standard procedures were used for the quantification, denaturation, gel separation and nylon blotting of nucleic acids, and the hybridization of the membranes (Sambrook and Russell, 2011). 5 µg/ slot of RNA were charged in the agarose gel. To prepare the digoxigenin-labelled probe PCR DIG probe synthesis kit (Roche Applied Science, Penzberg, Germany) was used applied genomic DNA and special primers (TableS). The result of the hybridization was followed on Lumi-Film chemiluminescent detection film (Roche Applied Science, Penzberg, Germany).

6.3.4. Analytical methods

Mycelial dry weight was determined from 10 mL culture aliquots. Biomass was harvested and washed twice on preweighted glass wool filter using suction filtration and dried in oven at 80°C until reaching of the constant weight. D-glucose and itaconic acid concentration was determined by HPLC (Gilson) method using proton exchange column (Bio-Rad Aminex HPX-87H+; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) applied isocratic elution with 10mM H₂SO₄ at 55°C and refractive index detector. Manganese ion concentration was determined as described by Karaffa et al (2015).

Respiration rates of mycelia was measured with an oxygraphic electrode (Strathkelvin Instruments Ltd., North Lanarkshire, Scotland) at 33 °C according to the manufacturers' s instruction. Potassium cyanide (1 mM) and salicyl hidroxamic acid (10 mM; Lambowitz and Slayman, 1971) was added to cultures blocking selectively the cythochrome C oxidase or alterantive oxidase. The mycelial dry weight was determined in all experiment allowing the calculation of specific oxygen uptake rates.

6.4. Bioinformatic analysis

Nucleotide sequences were mined form databases of National Center for Biotechnology Information (NCBI) and Energy Joint Genome Institute (JGI).

6.5. Chemicals

All chemicals were of analytical grade, and except where noted otherwise, were purchased from Sigma-Aldrich Kft., Budapest, Hungary.

6.6. Reproducibility

All the data presented are means of at least three independent experiments (= biological replicates). The data were analyzed and visualized by SIGMAPLOT (Jandel Scientific, San

Jose, CA), and standard deviations (SDs) were determined for each procedure. The SD values were always < 14% of the mean values. The significance of changes in oxygen uptake, as well as in DCW-, ST yield and D-glucose concentrations in the growth medium of the alternative oxidase deletion mutant or the overexpressing (OE) strains, relative to the control cultures (RDIT 9.32), was assessed using Student's t-test with probability (p) values.

7. New Scientific Results

7.1. *A. nidulans*

- The *aodA* encodes the sole physiologically relevant SHAM-inhibited terminal oxidase in *A. nidulans*, and its activity can be reliably determined by monitoring oxygen uptake in the presence of cyanide.
- The copies of *aodA* did not affect the specific growth rates.
- The lack of alternative oxidase activity did not affect the D-glucose uptake rate.
- Sterigmatocystin formation in *A. nidulans* is dependent on the *aodA*-copy number, but only in the absence of light.
- The basal level production of ST under illumination (“stage 1”) is essentially unchanged regardless the absence or presence of AOX.
- We suggest that only “stage 2” expression is mediated by the Velvet Complex, and that “stage 1” (basal level) expression may not require the velvet protein (to act) *per se*.

7.2. *Aspergillus starins* (CBS)

- Most of the *Aspergilli* can possess 1-3 putative AOX isoenzymes.
- The AOX can play roles in the growth of the mycelia and conidiospore formation.

7.3. *A. terreus*

- *A. terreus* harbours 2 putative AOX isoenzymes in its genome.
- Cyanide- resistant alternative oxidase putatively is encoded by *aodA*.
- Itaconic acid yields depend on AOX activity.

8. Summary

Alternative oxidase (AOX) (oxygen oxidoreductase, nonelectrogenic; EC 1.10.3.11) occurs in many organisms: in plants and fungi, but also in animals and protists (Bendall and Bonner, 1971; Lambowitz et al., 1989; Siedow and Umbach, 1995; Stenmark and Norlund, 2003; Joseph-Horne et al., 2001; Tudella et al., 2004; Molen et al., 2006; MacDonald et al., 2009). This cyanide-resistant terminal oxidase is located on the matrix side of the mitochondrial inner membrane. Unlike most of the cytochrome C oxidase (COX) subunits, alternative oxidase is encoded in the nuclear genome and it provides an “alternative” for the electron flow opposite to the canonical cytochrome-dependent pathway (Joseph-Horne et al., 2001) The branching point is at the level of coenzyme Q (ubiquinone/ubiquinol), thus complexes III and IV of the electron transport system are bypassed. As a consequence, the alternative pathway after NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I), which oxidizes NADH to NAD⁺ and reduces ubiquinone to ubiquinol while translocating four protons, moves fewer protons across the inner mitochondrial membrane to generate a proton gradient, and thus provides less ATP by oxidative phosphorylation (Del-Saz et al. 2018). The energy of the four-electron oxidation of ubiquinol by oxygen to water is dissipated as heat. Additionally, the alternative respiration route is resistant to inhibitors of cytochrome complexes III and IV such as antimycin A, cyanide, or azide. AOX can be selectively blocked by aromatic hydroxamic acids such as salicylhydroxamate (SHAM; Vanlerberghe and McIntosh, 1997). Most of the *Aspergilli* species harbour two or even three homologue genes encoding an AOX in their genome—*A. nidulans* owns single gene and *A. terreus* possess two isoenzymes.

This thesis describes the the role of AOX in different and its physiological functions in different *Aspergillus* species and its role in sterigmatocystin (ST) and itaconic acid (IA) biosynthesis in *A. nidulans* and *A. terreus*.

1. The relationship between AOX activity and ST synthesis in light and dark. To verify that *aodA* (locus AN2099) indeed encodes a physiologically relevant AOX in *A. nidulans*, we compared the specific respiration rates of the deletion ($\Delta aodA$) and overexpressed (OE) mutants to a wild-type reference strain. Results were unequivocal and confirmed our thesis. After that, the *A. nidulans* strains were studied in liquid (submerged, batch) cultures, employing well-controlled cultivation conditions conducive to ST synthesis in bioreactors. Kinetics of growth in our D-glucose minimal medium was similar in every *A. nidulans* strain investigated in this thesis, while D-glucose utilization rates as well as AOX activity—both early in the rapid growth stage and late in the carbon-depleted, stationary phase of cultures—were proportional to the *aodA* copy number, regardless of the presence or absence of light. The copy number of the *aodA* gene in the OE mutants was positively correlated to the observed D-glucose uptake, that is, the cyanide-resistant alternative respiration and the D-glucose uptake rate increased in parallel. It should be noted, however, that residual D-glucose concentrations did not significantly differ between the wild-type reference and the *aodA* deletant, that is, the lack of alternative oxidase activity did not affect the D-glucose uptake rate. To analyse the relationship between the aforementioned parameters and ST formation in *A. nidulans*, we monitored ST concentrations in the cultures (medium and biomass). Interestingly, the alternative respiratory rates increased significantly during late stationary growth phase in OE strains compare to wild type and *aodA* deletant strains. In

qualitative terms, these time profiles were similar in that ST production did not occur before the complete depletion of D-glucose and the cessation of growth. Quantitatively, however, statistically significant differences were found. ST volumetric yield (mgL^{-1}) of the *A. nidulans aodA* deletant strain was about half (50%) of that of the wild-type reference when grown in the dark. By contrast, *aodA* OE mutants featured a 50–70% increase in ST yield relative to the control strain, again in a copy-number-dependent manner. Importantly, results were quite different when cultures were continuously illuminated: ST volumetric yields of all cultures went down to about a third of what the control strain produced when grown in the dark, and were statistically unvarying, regardless of the presence, absence, or the copy number of *aodA*. We supposed that, the AOX contributes different mechanisms to ST production. Recycling of the catabolic reducing equivalents (NADH) released during the mobilization of reserve carbon sources by COX would result in high ATP formation. However, in the absence of growth, mycelia do not require high(er) energy levels, and oxidative phosphorylation under such conditions inhibits further carbon catabolism. A switch from COX to AOX would enable the fungus to reoxidize NADH and maintain redox homeostasis without concomitant ATP production under low-energy-requiring conditions. Another aspect of the contribution of AOX to ST biosynthesis could be related to the formation of the anabolic reducing equivalents. NADPH is mostly generated by the oxidative part of the pentose phosphate pathway (Chen et al., 2015; Wasylenko et al., 2015), which requires the continuous availability of glucose-6-phosphate, and this is facilitated by the increased flux through gluconeogenesis when the primary carbon source (D-glucose) is exhausted. In *A. nidulans*, mutations in the regulator genes *acuM* and *acuK* do not allow growth on acetate, nor on other C2 and C4 carbon sources that need the tricarboxylic acid (TCA) cycle to be catabolized (Suzuki et al., 2012). Apart from phosphoenolpyruvate carboxykinase (*AcuF*) and fructose-1,6-bisphosphatase (*AcuG*), they—importantly—also control *aodA* and genes encoding mitochondrial carriers. These two zinc-cluster regulators have also been studied in *P. anserina*—known there as Rse2 and Rse3—where they are likewise responsible for the overexpression of AOX, the key enzymes of gluconeogenesis, as well as a NADH:ubiquinone oxidoreductase (EC 1.6.5.9) that allows bypassing of complex I of the electron transport chain (Bovier et al., 2014, Sellem et al., 2009). Gluconeogenesis and AOX are thus controlled integrally by the same regulon that facilitates a shift of the metabolic flux towards fatty acid biosynthesis from the TCA cycle. Another possibility may lie in the potential protection from reactive oxygen species (ROS). We should note, AOX does not actively reduce ROS, nor is directly implicated in the production of antioxidant, but operates to maintain the redox balance while lowering the flux through the TCA cycle and the cytochrome electron transport chain such that less ROS will be produced in the mitochondria.

Irrespective of the mechanisms by which AOX activity stimulates ST synthesis, this incentive is clearly subordinate to antagonistic effects associated with the presence of light. The canonical theory is that the velvet transcription factor, on which ST synthesis strictly depends (Kato et al., 2003), is concentrated in the nucleus when the fungus grows in the darkness on a minimal D-glucose medium, but resides in the cytosol when the fungus grows in the light. Our results with the *aodA* mutant backgrounds imply that a basal level production under illumination (“stage 1”) is essentially unchanged regardless of the absence or presence of AOX, or its exact amount; that is, it seems insensitive to the ratio of the alternative/total

respiration. Intriguingly, essentially the same levels of ST were detected in cultures of the *ΔaodA* deletion strain—devoid of alternative respiration—when cultivated protected from light, both in liquid and on plates. Our results further suggest that any increase in ST synthesis over the basal level (“stage 2”) can only be realized in the darkness (at 37°C and 1.5% (w/v) initial glucose concentration) in genetic backgrounds that express AOX, that is, in strains that allow varying the ratio between alternative respiration and cytochrome-mediated respiration. We therefore speculate that only “stage 2” expression is mediated by the velvet complex, and that “stage 1” (basal level) expression may not require the velvet protein (to act) *per se*.

2. Physiological function of the AOX in different *Aspergilli*. All examined strains showed the presence of at least one AOX encoding gene. Growth experiments were performed using potassium-cyanide (KCN) and SHAM or their combination. Results of the experiments confirmed that, the *Aspergillus* species could grow well in presence of KCN, better than in case of addition of SHAM. The worst growth was detected on SHAM and KCN. Lack of the conidiospore formation was visible in presence of SHAM in some species, but solely on KCN was not detected, implying the function of AOX in spore formation. *Nigri* section and those strains, which possess 2 AOX isoenzymes presented higher tolerance to KCN and SHAM and grew faster than others. In some fungi it is proved AOX has effect on the growth (Juarez et al., 2006; Xu et al., 2012) therefore our data suggest that, the AOX has an important role in growth of the mycelia in these *Aspergillus* species. Our experiments imply that the second alternative oxidase presents a physiological advantage to species of *Aspergillus* which are important producers of toxic as well as beneficial secondary metabolites, fermentation agents to make food-proof products and enzymes.

3. The relationship between AOX and IA production. The biotechnical production of IA is studied well recently (Boruta and Bizukojc 2017; Kuenz and Krull 2018). Citric acid is an early intermediate of itaconic acid synthesis, and we assumed that the reason for high dissolved oxygen levels in itaconic acid production would be similar to the one in citric acid production. The cyanide-resistant alternative respiration has been observed during the citric acid fermentations (Zehentgruber et al., 1980; Kirimura et al., 1987), the inhibition of AOX led to decreased citric acid yields (Kirimura et al., 2000) and nonetheless, the role of the AOX has not been investigated in IA fermentations yet. The process technologies currently used are similar to those applied for industrial citric acid production by the related species *A. niger*, including strong aeration and agitation of the fermenter. To this end we demonstrated that *A. terreus* is capable of growth-supporting respiration in the presence of cyanide ions, and that this activity proportionally and significantly increases with dissolved oxygen levels in the growth medium. The genome of *A. terreus* specifies two paralog genes (*aodA* and *aodB*), each putatively encoding an alternative oxidase. In our experiments, the AOX activity (respiratory measurements and expression profile) and concentration of IA were examined in dissolved oxygen (DO %) controlled fermentations. Lower saturation of oxygen (DO (%)=0) has a negative effect on IA production and respiratory rates (both of total and alternative) in contrast the increased DO (%) levels correlated with higher IA yield and oxygen uptake values. We conclude that (considering the earlier study, Park et al. 1993) the well increased DO (%) is not necessary (after a certain level) to contribute higher IA yields, therefore the fine regulation of dissolved oxygen level is suggested. Results imply the IA production depends on the AOX activity which required high oxygen saturation. We supposed that, the AOX

encoding gene is expressed during the IA fermentation similar to *aox1* gene in citric acid fermentations carried out with *A. niger*. Such as *aox2* gene product in *A. niger*, we could not detect the *aodB* in *A. terreus*. On the other hand, *aodA* was expressed in treated cultures (osmotic- and salt shock), although minimal cyanide-resistant respiration was measured in this conditions suggests that the translation process is not implemented. Our supposition is the cyanide-resistant respiration plays the same function in *A. terreus* like in *A. niger* citric acid fermentations. To examine and prove the role of AOX in IA production is indispensable to create and test *aodA* and *aodB* deletant mutants in the future.

9. Irodalomjegyzék / References

1. Amaike S, Affeldt KJ, Keller NP: Genetics, Biosynthesis, and Regulation of Aflatoxins and other *Aspergillus flavus* Secondary Metabolites. In: Agricultural Applications. Edited by Kempken F. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2013: 59-74.
2. Amaike S, Keller NP: *Aspergillus flavus*. *Annu Rev Phytopathol* 2011, 49:107-133.
3. Andersen MR, et al.: Comparative genomics of citric-acid-producing *Aspergillus niger* ATCC 1015 versus enzyme-producing CBS 513.88. *Genome Res* 2011, 21(6):885-897.
4. Arnaud MB, et al.: The *Aspergillus* Genome Database (AspGD): recent developments in comprehensive multispecies curation, comparative genomics and community resources. *Nucleic Acids Res* 2012, 40(Database issue):D653-659.
5. Atoui A, Kastner C, Larey CM, Thokala R, Etxebeste O, Espeso EA, Fischer R, Calvo AM: Cross-talk between light and glucose regulation controls toxin production and morphogenesis in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Biol* 2010, 47(12):962-972.
6. Bayram O, Feussner K, Dumkow M, Herrfurth C, Feussner I, Braus GH: Changes of global gene expression and secondary metabolite accumulation during light-dependent *Aspergillus nidulans* development. *Fungal Genet Biol* 2016, 87:30-53.
7. Bayram O, et al.: VelB/VeA/LaeA complex coordinates light signal with fungal development and secondary metabolism. *Science* 2008, 320(5882):1504-1506.
8. Bendall DS, Bonner WD: Cyanide-insensitive Respiration in Plant Mitochondria. *Plant Physiology* 1971, 47(2):236-245.
9. Bercovitz A, Peleg Y, Battat E, Rokem JS, Goldberg I: Localization of pyruvate carboxylase in organic acid-producing *Aspergillus* strains. *Appl Environ Microbiol* 1990, 56(6):1594-1597.
10. Boruta T, Bizukojc M: Production of lovastatin and itaconic acid by *Aspergillus terreus*: a comparative perspective. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 2017, 33(2):34.
11. Bovier E, Sellem CH, Humbert A, Sainsard-Chanet A: Genetic and functional investigation of Zn(2)Cys(6) transcription factors RSE2 and RSE3 in *Podospira anserina*. *Eukaryot Cell* 2014, 13(1):53-65.
12. Brown DW, Adams TH, Keller NP: *Aspergillus* has distinct fatty acid synthases for primary and secondary metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996, 93(25):14873-14877.
13. Chen H, Hao G, Wang L, Wang H, Gu Z, Liu L, Zhang H, Chen W, Chen YQ: Identification of a critical determinant that enables efficient fatty acid synthesis in oleaginous fungi. *Sci Rep* 2015, 5:11247.
14. de Vries RP, et al.: Comparative genomics reveals high biological diversity and specific adaptations in the industrially and medically important fungal genus *Aspergillus*. *Genome Biol* 2017, 18(1):28.
15. Fedorova ND, et al.: Genomic islands in the pathogenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. *PLoS Genet* 2008, 4(4):e1000046.

16. Fekete, E.; Karaffa, L.; Sándor, E.; Seiboth, B.; Bíró, S.; Szentirmai, A.; Kubicek, Regulation of the intracellular *beta*-galactosidase activity of *Aspergillus nidulans*. *Arch. Microbiol.* **2002**, *179*, 7–14.
17. 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* **2016**, *162*, 837–847.
18. Galagan JE, et al.: Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae*. *Nature* 2005, 438(7071):1105-1115.
19. Gyamerah M: Factors affecting the growth form of *Aspergillus terreus* NRRL 1960 in relation to itaconic acid fermentation. *Appl Microbiol Biotechnol* 1995, 44(3):356-361.
20. Hopwood DA, Sherman DH: Molecular genetics of polyketides and its comparison to fatty acid biosynthesis. *Annu Rev Genet* 1990, 24:37-66.
21. Joseph-Horne T, Hollomon DW, Wood PM: Fungal respiration: a fusion of standard and alternative components. *Biochim Biophys Acta* 2001, 1504(2-3):179-195.
22. Juarez O, Guerra G, Velazquez I, Flores-Herrera O, Rivera-Perez RE, Pardo JP: The physiologic role of alternative oxidase in *Ustilago maydis*. *Febs j* 2006, 273(20):4603-4615.
23. Karaffa L, Diaz R, Papp B, Fekete E, Sandor E, Kubicek CP: 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* 2015, 99(19):7937-7944.
24. Karaffa L, Kubicek CP: *Aspergillus niger* citric acid accumulation: do we understand this well working black box? *Appl Microbiol Biotechnol* 2003, 61(3):189-196.
25. Karaffa L, Sandor E, Kozma J, Kubicek CP, Szentirmai A: The role of the alternative respiratory pathway in the stimulation of cephalosporin C formation by soybean oil in *Acremonium chrysogenum*. *Appl Microbiol Biotechnol* 1999, 51(5):633-638.
26. Kato N, Brooks W, Calvo AM: The expression of sterigmatocystin and penicillin genes in *Aspergillus nidulans* is controlled by *veA*, a gene required for sexual development. *Eukaryot Cell* 2003, 2(6):1178-1186.
27. Keller NP, Adams TH: Analysis of a mycotoxin gene cluster in *Aspergillus nidulans*. *SAAS bulletin, biochemistry and biotechnology* 1995, 8:14-21.
28. Keller NP, Nesbitt C, Sarr B, Phillips TD, Burow GB: pH Regulation of Sterigmatocystin and Aflatoxin Biosynthesis in *Aspergillus* spp. *Phytopathology* 1997, 87(6):643-648.
29. Kirimura K, Hirowatari Y, Usami S: Alterations of Respiratory Systems in *Aspergillus niger* under the Conditions of Citric Acid Fermentation, vol. 51; 1987.
30. Kirimura K, Yoda M, Shimizu H, Sugano S, Mizuno M, Kino K, Usami S: Contribution of cyanide-insensitive respiratory pathway, catalyzed by the alternative oxidase, to citric acid production in *Aspergillus niger*. *Biosci Biotechnol Biochem* 2000, 64(10):2034-2039.
31. Klejnstrup ML, Frandsen RJ, Holm DK, Nielsen MT, Mortensen UH, Larsen TO, Nielsen JB: Genetics of Polyketide Metabolism in *Aspergillus nidulans*. *Metabolites* 2012, 2(1):100-133.

32. Kuenz A, Gallenmuller Y, Willke T, Vorlop KD: Microbial production of itaconic acid: developing a stable platform for high product concentrations. *Appl Microbiol Biotechnol* 2012, 96(5):1209-1216.
33. Kuenz A, Krull S: Biotechnological production of itaconic acid-things you have to know. *Appl Microbiol Biotechnol* 2018, 102(9):3901-3914.
34. Lambowitz AM, Sabourin JR, Bertrand H, Nickels R, McIntosh L: Immunological identification of the alternative oxidase of *Neurospora crassa* mitochondria. *Mol Cell Biol* 1989, 9(3):1362-1364.
35. Lambowitz AM, Slayman CW: Cyanide-resistant respiration in *Neurospora crassa*. *J Bacteriol* 1971, 108(3):1087-1096.
36. Leiter E, et al.: Characterization of the *aodA*, *dnmA*, *mnSOD* and *pimA* genes in *Aspergillus nidulans*. *Sci Rep* 2016, 6:20523.
37. Machida M, et al.: Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae*. *Nature* 2005, 438(7071):1157-1161.
38. Maggio-Hall LA, Wilson RA, Keller NP: Fundamental contribution of beta-oxidation to polyketide mycotoxin production in planta. *Mol Plant Microbe Interact* 2005, 18(8):783-793.
39. Magnani T, Soriani FM, Martins VP, Nascimento AM, Tudella VG, Curti C, Uyemura SA: Cloning and functional expression of the mitochondrial alternative oxidase of *Aspergillus fumigatus* and its induction by oxidative stress. *FEMS Microbiol Lett* 2007, 271(2):230-238.
40. Mario B, Schweiger LB: Process for the production of itaconic acid. In.: US Patent 3,078,217; 1963.
41. McDonald AE, Vanlerberghe GC, Staples JF: Alternative oxidase in animals: unique characteristics and taxonomic distribution. *Journal of Experimental Biology* 2009, 212(16):2627.
42. Molen Teresa A, Dominic R, Sarah P, P. MD: Characterization of the alternative oxidase of *Chlamydomonas reinhardtii* in response to oxidative stress and a shift in nitrogen source. *Physiol Plant* 2006, 127(1):74-86.
43. Molnár Á, Németh Z, Fekete E, Flipphi M, Keller N, Karaffa L: Analysis of the Relationship between Alternative Respiration and Sterigmatocystin Formation in *Aspergillus nidulans*. *Toxins (Basel)* 2018, 10(4):168.
44. Murphy AD, Lang-Unnasch N: Alternative oxidase inhibitors potentiate the activity of atovaquone against *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob Agents Chemother* 1999, 43(3):651-654.
45. Nayak T, Szewczyk E, Oakley CE, Osmani A, Ukil L, Murray SL, Hynes MJ, Osmani SA, Oakley BR: A versatile and efficient gene-targeting system for *Aspergillus nidulans*. *Genetics* 2006, 172(3):1557-1566.
46. Nelson GEN, Traufler DH, Kelley SE, Lockwood LB: Production of Itaconic Acid by *Aspergillus terreus* in 20-Liter Fermentors. *Industrial & Engineering Chemistry* 1952, 44(5):1166-1168.
47. Nemeth Z, Molnar AP, Fejes B, Novak L, Karaffa L, Keller NP, Fekete E: Growth-Phase Sterigmatocystin Formation on Lactose Is Mediated via Low Specific Growth Rates in *Aspergillus nidulans*. *Toxins (Basel)* 2016, 8(12).

48. Pel HJ, et al.: Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory *Aspergillus niger* CBS 513.88. *Nat Biotechnol* 2007, 25(2):221-231.
49. Perez-Sanchez A, Uribe-Carvajal S, Cabrera-Orefice A, Barrios-Gonzalez J: Key role of alternative oxidase in lovastatin solid-state fermentation. *Appl Microbiol Biotechnol* 2017, 101(19):7347-7356.
50. Rank C, Nielsen KF, Larsen TO, Varga J, Samson RA, Frisvad JC: Distribution of sterigmatocystin in filamentous fungi. *Fungal Biol* 2011, 115(4-5):406-420.
51. Sellem CH, Bovier E, Lorin S, Sainsard-Chanet A: Mutations in two zinc-cluster proteins activate alternative respiratory and gluconeogenic pathways and restore senescence in long-lived respiratory mutants of *Podospora anserina*. *Genetics* 2009, 182(1):69-78.
52. Sambrook J., Russel D. W. (2001). *Molecular Cloning: a Laboratory Manual 3rd edn* Cold Spring Harbour, NY Cold Spring Harbor Laboratory.
53. Siedow JN, Umbach AL: Plant Mitochondrial Electron Transfer and Molecular Biology. *Plant Cell* 1995, 7(7):821-831.
54. Slater EC: [8] Application of inhibitors and uncouplers for a study of oxidative phosphorylation. In: *Methods in Enzymology*. vol. 10: Academic Press; 1967: 48-57.
55. Stenmark P, Nordlund P: A prokaryotic alternative oxidase present in the bacterium *Novosphingobium aromaticivorans*. *FEBS Lett* 2003, 552(2-3):189-192.
56. Tanton LL, Nargang CE, Kessler KE, Li Q, Nargang FE: Alternative oxidase expression in *Neurospora crassa*. *Fungal Genet Biol* 2003, 39(2):176-190.
57. Tilburn J, Scazzocchio C, Taylor GG, Zabicky-Zissman JH, Lockington RA, Davies RW: Transformation by integration in *Aspergillus nidulans*. *Gene* 1983, 26(2-3):205-221.
58. Tsitsigiannis DI, Kowieski TM, Zarnowski R, Keller NP: Endogenous lipogenic regulators of spore balance in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot Cell* 2004, 3(6):1398-1411.
59. Tudella VG, Curti C, Soriani FM, Santos AC, Uyemura SA: In situ evidence of an alternative oxidase and an uncoupling protein in the respiratory chain of *Aspergillus fumigatus*. *Int J Biochem Cell Biol* 2004, 36(1):162-172.
60. Vanlerberghe GC: Alternative oxidase: a mitochondrial respiratory pathway to maintain metabolic and signaling homeostasis during abiotic and biotic stress in plants. *Int J Mol Sci* 2013, 14(4):6805-6847.
61. Vanlerberghe GC, McIntosh L: ALTERNATIVE OXIDASE: From Gene to Function. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 1997, 48:703-734.
62. Wasylenko TM, Ahn WS, Stephanopoulos G: The oxidative pentose phosphate pathway is the primary source of NADPH for lipid overproduction from glucose in *Yarrowia lipolytica*. *Metab Eng* 2015, 30:27-39.
63. Wilkinson HH, Ramaswamy A, Sim SC, Keller NP: Increased conidiation associated with progression along the sterigmatocystin biosynthetic pathway. *Mycologia* 2004, 96(6):1190-1198.
64. Wogan GN: Aflatoxins as risk factors for hepatocellular carcinoma in humans. *Cancer Res* 1992, 52(7 Suppl):2114s-2118s.

65. Xu F, Yuan S, Lin H-H: Response of mitochondrial alternative oxidase (AOX) to light signals. *Plant Signaling & Behavior* 2011, 6(1):55-58.
66. Xu T, Yao F, Liang WS, Li YH, Li DR, Wang H, Wang ZY: Involvement of alternative oxidase in the regulation of growth, development, and resistance to oxidative stress of *Sclerotinia sclerotiorum*. *J Microbiol* 2012, 50(4):594-602.
67. Yabe K, Nakajima H: Enzyme reactions and genes in aflatoxin biosynthesis. *Appl Microbiol Biotechnol* 2004, 64(6):745-755.
68. Yu J, Chang PK, Ehrlich KC, Cary JW, Bhatnagar D, Cleveland TE, Payne GA, Linz JE, Woloshuk CP, Bennett JW: Clustered pathway genes in aflatoxin biosynthesis. *Appl Environ Microbiol* 2004, 70(3):1253-1262.
69. Yukioka H, Inagaki S, Tanaka R, Katoh K, Miki N, Mizutani A, Masuko M: Transcriptional activation of the alternative oxidase gene of the fungus *Magnaporthe grisea* by a respiratory-inhibiting fungicide and hydrogen peroxide. *Biochim Biophys Acta* 1998, 1442(2-3):161-169.
70. Zehentgruber O, Kubicek CP, Röhr M: Alternative respiration of *Aspergillus niger*. *FEMS Microbiol Lett* 1980, 8(2):71-74.
71. Sambrook J., Russell D. W. (2001). *Molecular Cloning: a Laboratory Manual* 3rd edn Cold Spring Harbor, NY Cold Spring Harbor Laboratory.



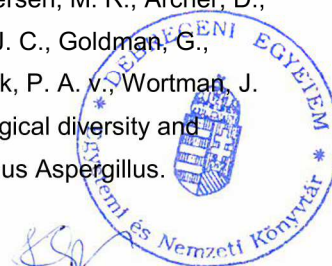
Nyilvántartási szám: DEENK/245/2018.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Molnár Ákos Péter
Neptun kód: LVMKII
Doktori Iskola: Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10047415

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

Idegen nyelvű tudományos közlemények külföldi folyóiratban (2)

1. **Molnár, Á. P.**, Németh, Z., Fekete, E., Flipphi, M., Keller, N. P., Karaffa, L.: Analysis of the relationship between alternative respiration and sterigmatocystin formation in *Aspergillus nidulans*.
Toxins. 10 (4), 168, 2018. ISSN: 2072-6651.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/toxins10040168>
IF: 3.03 (2016)
2. Vries, R. P. d., Riley, R., Wiebenga, A., Aguilar-Osorio, G., Amillis, S., Akemi Uchima, C., Anderluh, G., Asadollahi, M., Askin, M., Barry, K., Battaglia, E., Bayram, Ö., Benocci, T., Braus-Stromeyer, S. A., Caldana, C., Cánovas, D., Cerqueira, G. C., Chen, F., Chen, W., Choi, C., Clum, A., Corrêa dos, S. R. A., Lima Damásio, A. R. d., Diallinas, G., Emri, T., Fekete, E., Flipphi, M., Freyberg, S., Gallo, A., Gournas, C., Habgood, R., Hainaut, M., Harispe, M. L., Henrissat, B., Hildén, K. S., Hope, R., Hossain, A., Karabika, E., Karaffa, L., Karányi, Z., Kraševc, N., Kuo, A., Kusch, H., LaButti, K., Legendijk, E. L., Lapidus, A., Lvasseur, A., Lindquist, E., Lipzen, A., Logrieco, A. F., MacCabe, A., Mäkelä, M. R., Malavazi, I., Melin, P., Meyer, V., Mielnichuk, N., Miskei, M., **Molnár, Á. P.**, Mulé, G., Ngan, C. Y., Orejas, M., Orosz, E., Ouedraogo, J. P., Overkamp, K. M., Park, H. S., Perrone, G., Piumi, F., Punt, P. J., Ram, A. F., Ramón, A., Rauscher, S., Record, E., Riaño-Pachón, D. M., Robert, V., Röhrig, J., Ruller, R., Salamov, A., Salih, N. S., Samson, R. A., Sándor, E., Sanguinetti, M., Schütze, T., Sepčić, K., Shelest, E., Sherlock, G., Sophianopoulou, V., Squina, F. M., Sun, H., Susca, A., Todd, R. B., Tsang, A., Unkles, S. E., Wiele, N. v. d., Rossen-Uffink, D. v., Velasco de, C. O. J., Vesth, T. C., Visser, J., Yu, J. H., Zhou, M., Andersen, M. R., Archer, D., Baker, S. E., Benoit, I., Brakhage, A. A., Braus, G., Fischer, R., Frisvad, J. C., Goldman, G., Houbraken, J., Oakley, B. R., Pócsi, I., Scazzocchio, C., Seiboth, B., Kuyk, P. A. v., Wortman, J. R., Dyer, P. S., Grigoriev, I. V.: Comparative genomics reveals high biological diversity and specific adaptations in the industrially and medically important fungal genus *Aspergillus*.
Genome Biol. 18 (28), 1-45, 2017. ISSN: 1474-760X.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/s13059-017-1151-0>
IF: 11.908 (2016)





További közlemények

Idegen nyelvű tudományos közlemények külföldi folyóiratban (2)

3. Németh, Z., **Molnár, Á. P.**, Fejes, B., Novák, L., Karaffa, L., Keller, N. P., Fekete, E.: Growth-phase sterigmatocystin formation on lactose is mediated via low specific growth rates in *Aspergillus nidulans*.
Toxins. 8 (12), 354, 2016. ISSN: 2072-6651.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/toxins8120354>
IF: 3.03
4. Jónás, Á., Fekete, E., Flippi, M., Sándor, E., Jäger, S., **Molnár, Á. P.**, Szentirmai, A., Karaffa, L.: Extra- and intracellular lactose catabolism in *Penicillium chrysogenum*: phylogenetic and expression analysis of the putative permease and hydrolase genes.
J. Antibiot. 67, 489-497, 2014. ISSN: 0021-8820.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/ja.2014.26>
IF: 1.73

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 19,698

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
14,938**

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, 2018.06.04.





Registry number: DEENK/245/2018.PL
Subject: PhD Publikációs Lista

Candidate: Ákos Péter Molnár

Neptun ID: LVMKII

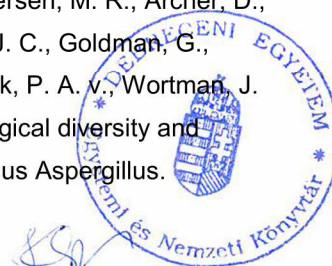
Doctoral School: Pál Juhász-Nagy Doctoral School of Biology and Environmental Sciences

MTMT ID: 10047415

List of publications related to the dissertation

Foreign language scientific articles in international journals (2)

1. **Molnár, Á. P.**, Németh, Z., Fekete, E., Flipphi, M., Keller, N. P., Karaffa, L.: Analysis of the relationship between alternative respiration and sterigmatocystin formation in *Aspergillus nidulans*.
Toxins. 10 (4), 168, 2018. ISSN: 2072-6651.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/toxins10040168>
IF: 3.03 (2016)
2. Vries, R. P. d., Riley, R., Wiebenga, A., Aguilar-Osorio, G., Amillis, S., Akemi Uchima, C., Anderluh, G., Asadollahi, M., Askin, M., Barry, K., Battaglia, E., Bayram, Ö., Benocci, T., Braus-Stromeier, S. A., Caldana, C., Cánovas, D., Cerqueira, G. C., Chen, F., Chen, W., Choi, C., Clum, A., Corrêa dos, S. R. A., Lima Damásio, A. R. d., Diallinas, G., Emri, T., Fekete, E., Flipphi, M., Freyberg, S., Gallo, A., Gournas, C., Habgood, R., Hainaut, M., Harispe, M. L., Henrissat, B., Hildén, K. S., Hope, R., Hossain, A., Karabika, E., Karaffa, L., Karányi, Z., Kraševc, N., Kuo, A., Kusch, H., LaButti, K., Legendijk, E. L., Lapidus, A., Lvasseur, A., Lindquist, E., Lipzen, A., Logrieco, A. F., MacCabe, A., Mäkelä, M. R., Malavazi, I., Melin, P., Meyer, V., Mielnichuk, N., Miskei, M., **Molnár, Á. P.**, Mulé, G., Ngan, C. Y., Orejas, M., Orosz, E., Ouedraogo, J. P., Overkamp, K. M., Park, H. S., Perrone, G., Piumi, F., Punt, P. J., Ram, A. F., Ramón, A., Rauscher, S., Record, E., Riaño-Pachón, D. M., Robert, V., Röhrig, J., Ruller, R., Salamov, A., Salih, N. S., Samson, R. A., Sándor, E., Sanguinetti, M., Schütze, T., Sepčić, K., Shelest, E., Sherlock, G., Sophianopoulou, V., Squina, F. M., Sun, H., Susca, A., Todd, R. B., Tsang, A., Unkles, S. E., Wiele, N. v. d., Rossen-Uffink, D. v., Velasco de, C. O. J., Vesth, T. C., Visser, J., Yu, J. H., Zhou, M., Andersen, M. R., Archer, D., Baker, S. E., Benoit, I., Brakhage, A. A., Braus, G., Fischer, R., Frisvad, J. C., Goldman, G., Houbraken, J., Oakley, B. R., Pócsi, I., Scazzocchio, C., Seiboth, B., Kuyk, P. A. v., Wortman, J. R., Dyer, P. S., Grigoriev, I. V.: Comparative genomics reveals high biological diversity and specific adaptations in the industrially and medically important fungal genus *Aspergillus*.
Genome Biol. 18 (28), 1-45, 2017. ISSN: 1474-760X.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/s13059-017-1151-0>
IF: 11.908 (2016)





List of other publications

Foreign language scientific articles in international journals (2)

3. Németh, Z., **Molnár, Á. P.**, Fejes, B., Novák, L., Karaffa, L., Keller, N. P., Fekete, E.: Growth-phase sterigmatocystin formation on lactose is mediated via low specific growth rates in *Aspergillus nidulans*.
Toxins. 8 (12), 354, 2016. ISSN: 2072-6651.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/toxins8120354>
IF: 3.03
4. Jónás, Á., Fekete, E., Flippi, M., Sándor, E., Jäger, S., **Molnár, Á. P.**, Szentirmai, A., Karaffa, L.: Extra- and intracellular lactose catabolism in *Penicillium chrysogenum*: phylogenetic and expression analysis of the putative permease and hydrolase genes.
J. Antibiot. 67, 489-497, 2014. ISSN: 0021-8820.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/ja.2014.26>
IF: 1.73

Total IF of journals (all publications): 19,698

Total IF of journals (publications related to the dissertation): 14,938

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.

04 June, 2018



Előadások / Presentations

Molnár Á P

Aspergillus terreus fermentációk során az oldott oxigén szint pozitívan korrelál az alternatív oxidáz kifejeződésével és a végső hozammal.

A Magyar Mikrobiológiai Társaság Nagygyűlése és a XII. Fermentációs Kollokvium, Keszthely (2016)

Molnár Á P

Az alternatív oxidáz gén expressziójának vizsgálata két stresszhatásnak kitett fonalas Ascomycota fajban.

A Magyar Mikrobiológiai Társaság Nagygyűlése, Keszthely (2014)

Poszterek / Posters

1. **Molnár Á P**, Asadollahi M, Fekete E, Flippi M, Sándor E, Karaffa L

Expression analysis of alternative oxidase gene (aodA) in *Aspergillus nidulans* in response to high osmolarity stress.

15th Iranian& International Congress of Microbiology, Teherán (2014)

2. Jónás Á, Fekete E, Flippi M, Sándor E, Jäger SZ, **Molnár Á P**, Karaffa L

Lactose catabolism in *Penicillium chrysogenum*: phylogenetic and expression analysis of the putative permease and hydrolase genes.

12th European Conference of Fungal Genetics, Sevilla, Spanyolország (2014)

3. Fekete E, **Molnár Á P**, Asadollahi M, Balázs SZ, Sándor E , Karaffa L
Analysis of the physiology of an *Aspergillus nidulans* mutant lacking the *aodA* (cyanide-resistant alternative oxidase encoding) gene.
16th European Congress on Biotechnology, Edinburgh, Skócia (2014)

4. Asadollahi M, **Molnár Á P**, Fekete E, Karaffa L, Flippi M, Sándor E
Distribution of the cyanide-resistant alternative oxidase in the fungal class of Eurotiomycetes (Ascomycota, Pezizomycotina).
15th Iranian & International Congress of Microbiology, Teherán (2014)

5. Kolláth I S, **Molnár Á P**, Fekete E, Sándor E, Soós Á, Kovács B, Kubicek CP, Karaffa L
Production of itaconic acid from D-xylose by *Aspergillus terreus*.
5th Central European Forum for Microbiology [CEFOM] Keszthely (2017)

6. Karaffa L, Németh Z, **Molnár Á P**, Fejes B, Novák L, Keller N P, Fekete E
Growth-phase sterigmatocystin formation on lactose is mediated via low specific growth rates in *Aspergillus nidulans*.
29th Fungal Genetics Conference at Asilomar, Pacific Grove, CA (2017)

7. Kolláth I S, **Molnár Á P**, Fekete E, Sándor E, Soós Á, Kovács B, Kubicek CP, Karaffa L
Production of itaconic acid from D-xylose by *Aspergillus terreus*.
2nd Symposium on Plant Biomass Conversion by Fungi, Utrecht, Hollandia (2017)

8. Kolláth I S, **Molnár Á P**, Fekete E, Karaffa L
Itaconic acid production from D – xylose by *Aspergillus terreus*.
14th European Conference of Fungal Genetics, Haifa, Izrael (2018)