



1949

**Alternatív oxidáz gének evolúciója az *Aspergillaceae*  
gombacsalád fajaiban**

Egyetemi doktori (PhD) értekezés

**Márton Alexandra**

Témavezető: Prof. Dr. Karaffa Levente

DEBRECENI EGYETEM  
Természettudományi és Informatikai Doktori Tanács  
Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola  
Debrecen, 2024

*Ezen értekezést a Debreceni Egyetem Természettudományi és Informatikai Doktori Tanács Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola Fermentációs Biotechnológiai és Biomérnöki programja keretében készítettem a Debreceni Egyetem természettudományi doktori (PhD) fokozatának elnyerése céljából. Nyilatkozom arról, hogy a tézisekben leírt eredmények nem képezik más PhD disszertáció részét.*

*Debrecen, 2024.06.05.*

.....  
*Márton Alexandra*

*Tanúsítom, hogy Márton Alexandra doktorjelölt 2019- 2024 között a fent megnevezett Doktori Iskola Fermentációs Biotechnológiai és Biomérnöki programjának keretében irányításommal végezte munkáját. Az értekezésben foglalt eredményekhez a jelölt önálló alkotó tevékenységével meghatározóan hozzájárult. Nyilatkozom továbbá arról, hogy a tézisekben leírt eredmények nem képezik más PhD disszertáció részét.*

*Az értekezés elfogadását javasolom.*

*Debrecen, 2024.06.05.*

.....  
*Prof. Dr. Karaffa Levente*

# **Alternatív oxidáz gének evolúciója az *Aspergillaceae* gombacsalád fajaiban**

Értekezés a doktori (Ph.D.) fokozat megszerzése érdekében  
a Biológia tudományágban

Írta: Márton Alexandra, okleveles biomérnök

Készült a Debreceni Egyetem Juhász-Nagy Pál doktori iskolája  
(Fermentációs Biotechnológiai és Biomérnöki programja) keretében

Témavezető: Prof. Dr. Karaffa Levente

Az értekezés bírálói:

Dr. ....

Dr. ....

A bírálóbizottság:

elnök: Dr. ....

tagok: Dr. ....

Dr. ....

Dr. ....

Dr. ....

Az értekezés védésének időpontja: 20... . . . . .

## Tartalomjegyzék

1.	Rövidítésjegyzék.....	1
2.	Bevezetés .....	3
3.	Irodalmi áttekintés .....	6
3.1	Gombák légzése: klasszikus légzési lánc .....	6
3.2	Lélegzetelállító evolúció: a respiráció adaptációja a környezethez ..	7
3.2.1	Anaerob légzés .....	7
3.2.2	Alternatív légzési komponensek .....	8
3.3	Alternatív NADH dehidrogenáz (aNDH) .....	10
3.4	Alternatív oxidáz (Aox) .....	13
3.4.1	Aox szerkezete, működése, gén expressziója.....	14
3.4.2	Aox élettani szerepe .....	16
3.4.3	Aox szerepe a biotechnológiai folyamatokban .....	18
3.4.4	Gombának átok, embernek áldás .....	20
3.5	Egy gén élete .....	22
3.5.1	Génduplikáció .....	22
3.5.2	Horizontális géntranszfer .....	23
3.5.3	A duplikálódott gén sorsa.....	24
4.	Célkitűzések.....	26
5.	Anyagok és módszerek .....	27
5.1	Alternatív oxidáz gének keresése, génstruktúra megállapítása .....	27
5.2	Maximum likelihood filogenetikai analízis.....	28
5.3	Alkalmazott gombatörzsek, táptalajok .....	29
5.4	RNS/DNS izolálás, PCR, szekvencia azonosítás .....	32
5.5	Génexpresszió vizsgálata SRA adatokból.....	35
6.	Eredmények .....	36
6.1	Az <i>Aspergillaceae</i> <i>aox</i> gén paralógjainak kialakulása .....	36
6.1.1	<i>aoxB1</i> paralóg eredete .....	41
6.1.2	<i>aoxB2-1</i> ; <i>aoxB2-2</i> paralóg eredete .....	42

6.1.3	Horizontális géntranszfer két különböző taxonómiai csoportba tartozó faj között .....	44
6.1.4	<i>aoxB3</i> – <i>Penicillium</i> nemzetségben született génduplikáció..	46
6.1.5	<i>aoxB4</i> – az Usti szekcióra jellemző paralóg.....	48
6.2	<i>aox</i> paralóg gének expressziója.....	50
6.3	<i>aoxB</i> génvesztés az <i>Aspergillus</i> nemzetségben .....	51
6.4	<i>aoxB1</i> paralóg az <i>A. niger</i> törzsekben .....	55
6.4.1	Az <i>aoxB1</i> szomszédos génje: alternatív NADH dehidrogenáz 57	
6.5	Az <i>A. niger aoxB1</i> gén alléljai .....	60
6.5.1	<i>aoxB1</i> I. allél – vad típus .....	63
6.5.2	<i>aoxB1</i> II. allél – deléción.....	64
6.5.3	<i>aoxB1</i> III. allél – transzpozon inszerción .....	64
6.5.4	<i>aoxB1</i> IV. allél - missense mutáción .....	66
6.5.5	<i>aoxB1</i> V. és VI. allélok – framshift és nonsense mutáción .....	66
6.6	<i>aoxB1</i> pszeudogének az <i>A. tubingensis</i> -ben.....	67
7.	Eredmények megbeszélése .....	68
8.	Összefoglalás .....	74
9.	Summary .....	76
10.	Irodalomjegyzék .....	81
11.	Tudományos tevékenység .....	96
12.	Köszönetnyilvánítás .....	102
13.	Mellékletek .....	103
13.1	Felhasznált primerek .....	103
13.2	SRA adatok .....	106
13.3	Szekvenciaillesztés eredményei .....	108
13.4	Génvesztési mintázat.....	109
13.5	<i>A. niger</i> törzsek csoportosítása <i>aoxB1</i> génallélok szerint .....	112
13.6	Az összes paralógot tartalmazó filogenetikai fa.....	114

## 1. Rövidítésjegyzék

NADH:	Nikotinamid-adenin dinukleotid
ADP/ATP:	Adenozin di/trifoszfát
UQ:	ubikinol
AOX:	Alternatív oxidáz
UCP:	Uncoupling Protein (szétkapcsoló fehérjék)
aNDH:	Alternatív NADH dehidrogenáz
IACA:	7-iodo-acridone-4-carboxylic acid
Ndi:	belső alternatív NADH dehidrogenáz
Nde:	külső alternatív NADH dehidrogenáz
FAD, FMN:	Flavin-Adenin-Dinukleotid, Flavin-Mononukleotid
AMID:	Associated Inducer of Death (apoptózist indukáló faktor)
ROS:	Reactive Oxygen Species (reaktív oxigén gyökök)
DCW:	Dry cell weight (száraz sejttömeg)
AT/ST:	Aflatoxin/Szterigmatocisztin
SSF:	Solid State Fermentation (szilárd fázisú fermentáció)
DO:	Dissolved Oxygen (oldott oxigén)
SHAM:	Salicyl Hydroxamic Acid (Szalicil-hidroxámsav)
HSE/STRE:	Heat Shock Element/Stress Response Element
DNS:	Dezoxiribonukleinsav
RNS:	Ribonukleinsav
HGT/LGT:	Horizontális Gén Transzfer/Laterális Gén Transzfer
NCBI:	National Center of Biotechnology Institute
JGI:	Joint Genome Institute
MAFFT:	Multiple Sequence Alignment with Fast Fourier Transform

BMGE:	Block Mapping and Gathering using Entrophy
ML:	Maximum Likelihood
aLRTs:	approximate Likelihood Ratio Tests
PDA/PDB:	Potato Dextrose Agar/ Potato Dextrose Broth
cDNS:	complementer DNS
PCR:	Polymerase Chain Reaction
SRA:	Sequence Read Archives
<i>aoxA</i> :	mindenhol jelenlévő alternatív oxidáz gén
<i>aoxB1/B2-1/B2-2/B3/B4</i> :	alternatív oxidáz paralógok
bp:	bázispár
kb:	kilobázis
andB:	alternatív NADH dehidrogenáz gén
TSD:	Target Site Duplication
LTR:	Long Terminal Repeat (hosszú terminális ismétlődések)
ORF:	Open Reading Frame

## 2. Bevezetés

A sejtlégzés paradigmája szerint a lebontó folyamatok során keletkezett redukált kofaktorok (NADH) oxidációja révén, az elektronok a mitokondriális légzési lánc komponensein keresztül jutnak el az oxigénig, miközben a létrejött proton gradiens kiegyenlítésével ATP képződik. A legtöbb aerob élőlényben a fő légzési lánc négy komplexből, továbbá az ATP szintázból áll. Ezen kívül számos organizmus rendelkezik elágazó légzési útvonalakkal, ami egy vagy több plusz komponens meglétét eredményezi, ezáltal alternatív légzési folyamatot biztosít (Joseph-Horne és mtsai., 2001).

Az alternatív oxidáz (Aox) enzim a legtöbb növény, gomba, de még bizonyos emlős sejtekben is egy citokróm-független, ún. alternatív légzési útvonalat katalizál, melynek élettani szerepe sokoldalú. Gombák esetében különböző stresszhatások aktiválják, szerepe van a reaktív oxigén gyökök (ROS) eliminálásában, patogénekben pedig képes növelni a fertőzőképességet. Ezen kívül még megannyi funkciója ismert, habár gombák esetében még mindig rengeteg kutatást igényel a biokémiai szerepének pontos megismerése. Legtöbb esetben közvetve befolyásolja a metabolikus aktivitást, amivel hozzájárul a gombakörnyezethez való alkalmazkodásához (Li és mtsai., 2011; Rogov és Zvyagilskaya, 2015).

A genomszekvenciák alapján az *aox* gén erősen konzervatív (=nagy hasonlóságot mutat) a gombák törzsén belül. Vannak olyan fajok, amelyekből hiányzik, ilyen a *Saccharomyces cerevisiae* vagy a *Schizosaccharomyces pombe*, viszont ők sem maradtak alternatív légzés nélkül: három alternatív NADH dehidrogenáz biztosítja a NADH oxidálását (Joseph-Horne és mtsai., 2001).

Az *aox* gén paralógok jelenléte nem gyakori a gombák körében, habár az *Aspergillaceae* család tagjaira jellemző a gének multiplicitása (Flipphi és mtsai., 2023). Az *Aspergillus* és *Penicillium* nemzetségbe olyan iparilag fontos gombák tartoznak, mint az *Aspergillus niger*, ami az ipari citromsav gyártás döntő többségéért felel (Karaffa és Kubicek, 2021), az *A. terreus*, mellyel az itakonsav és a lovasztatin előállítása történik vagy az *Acremonium chrysogenum* nevű, cefalosporin-C antibiotikumot előállító faj (Molnár és mtsai., 2018; Kozma és Karaffa, 1996).

Az *A. niger* első genomszekvenciájának publikálásával (2007) fény derült arra, hogy a gombában egy második *aox* gén is található (Pel és mtsai., 2007). Ma már nagyszámú genomszekvencia áll rendelkezésünkre, amelyek segítségével filogenetikai elemzések végezhetők az *A. niger* második alternatív oxidázával kapcsolatban. Az *aox* gének eredetének és evolúciójának ismerete hozzájárulhat a megfelelő törzsek kialakításához az ipari biotechnológiában (Flipphi és mtsai., 2023).

Az *Aspergillus* és *Penicillium* nemzetségek *aox* génjeinek filogenetikai vizsgálatával olyan információkhoz juthatunk, amelyek nem állnak rendelkezésre a szakirodalomban. Egy gén duplikációja után a paralógok különböző sorsra juthatnak, attól függően, hogy a sejt hasznot tud-e húzni az extra kópiából vagy sem. Az utóbbi esetben a gén eltűnhet a genomból, melyet a pszeudogenizáció folyamata (=a gén inaktívvá válása) előz meg (Magadum és mtsai., 2013). A duplikációk létrejötte mellett hasonló fontossággal bírnak a génvesztés jelenségei, melyek együtt formálják az evolúciós eseményeket. Ez a helyzet az *aox* esetében is.

Doktori értekezésemben összefoglalom az *Aspergillaceae* családba tartozó gombafajok *aox* génjeinek filogenetikai elemzéséből kapott eredményeit, melyek több millió éven át tartó történéseket fednek fel. Négy

génduplikációs esemény mellett számos génvesztési mintázat jött létre, továbbá az *A. niger* törzsek vizsgálatával különböző mutációkat találtunk, melyek a másodlagos *aox* génről átírt fehérjék működését befolyásolják. A filogenetikai analízissel hozzájárultunk az *aox* génnel kapcsolatos ismereteink bővítéséhez, hiszen ebben a megközelítésben nem áll rendelkezésre irodalmi adat sem a gén eredetéről, sem evolúciójáról az *Aspergillaceae* család fajaiban. Mivel számos iparilag fontos gomba, továbbá humán- vagy növény patogén tartozik ide, egy olyan gén vizsgálata, ami a metabolikus plaszticitás biztosításával a túlélést segíti elő, kiemelkedő jelentőséggel bír.

### 3. Irodalmi áttekintés

#### 3.1 Gombák légzése: klasszikus légzési lánc

A gombák több mint egy milliárd évvel ezelőtt jelentek meg a Földön; jelenleg az állatok után az élőlények legdiverzebb csoportját alkotják (Loron és mtsai., 2019). Becslések szerint a fajok száma 2,2 és 3,8 millió közé tehető, melyből mindössze körülbelül 150.000 egyedet azonosítottak (Hyde, 2022). Ahhoz, hogy egy ekkora taxonómiai csoport létrejöjjön és évmilliókig fennmaradjon, a légzési lánc is számos változáson megy keresztül az evolúció során.

Az eukarióta aerob sejtekben a légzés a mitokondrium belső membránján található légzési láncon valósul meg, úgy, hogy a sejt energianyerő folyamatai során keletkezett NADH molekulákról az elektronok a légzési lánc komplexein keresztül jutnak a végső elektron akceptorhoz. Az elektrontranszporttal kapcsolt proton transzlokáció hatására ATP képződés révén jut a sejt energiához (Rich és Maréchal, 2010).

Az oxidatív foszforiláció folyamata öt komplexen keresztül valósul meg. A Komplex I. (NADH:UQ oxidoreduktáz) a NADH oxidálásával az ubikinonra juttatja az elektronokat, miközben protont pumpál a membrán közötti térbe. A Komplex I. gombákban jól tanulmányozott, szerkezetében és működésében nagy hasonlóságot mutat más élőlények ugyanezen enziméhez. Egyes gombákból (pl. *S. cerevisiae*) hiányzik (Matus-Ortega és mtsai., 2015). A Komplex II. (szukcinát:UQ oxidoreduktáz) közvetlenül kapcsolódik a citrát ciklushoz, mint a szukcinát-fumarát oxidációt katalizáló enzim. Az elektronok szintén az ubikinonra jutnak, viszont ebben az esetben proton transzlokáció nem történik (Rich és Maréchal, 2010). A Komplex III. (ubikinol:citokrom c oxidoreduktáz) az ubikinolt oxidálja vissza ubikinonná és proton-pumpálás

mellett juttatja az elektronokat a negyedik komplexre. A Komplex IV. (citokróm c oxidáz) a fő légzési lánc terminális oxidáza, mely biztosítja az elektronok molekuláris oxigénre történő jutását, vízzé redukálva azt (Joseph-Horne és mtsai., 2001). Az elektrontranszport által létrejött protongradiens ATP szintézisre fordítódik az ATP szintáz katalizációja mellett (Deacon, 2006).

## **3.2 Lélegzetelállító evolúció: a respiráció adaptációja a környezethez**

### **3.2.1 Anaerob légzés**

A legtöbb gomba aerob szervezet, viszont a különböző körülményekhez alkalmazkodva a légzésnek alternatívái alakultak ki az évmilliók során. Bizonyos fajok anaerob életkörülményekhez alkalmazkodtak, így oxigén limitáció esetén a nitrát lett a végső elektron akceptor, mely nitrogén-oxiddá redukálódik (denitrifikáció). Anoxikus körülmények között a *Fusarium oxysporum* a denitrifikáció mellett képes ammónia fermentációra is, így fakultatív anaerobként azonnal tud reagálni az oxigénhiányra (Zhou és mtsai., 2002; Takaya, 2009). Az alternatív „külső” terminális elektron akceptor mellett más energianyerési folyamat is létezik. A fermentatív útvonalakon (pl. *S. cerevisiae*) az Embden-Meyerhof-Parnas útvonal folytatódik, mely során 2 ATP képződése mellett etanolt vagy tejsavat szekretálnak a környezetükbe, az előbbinél az acetaldehid az utóbbinál maga a piruvát lesz a „belső” elektron akceptor (Deacon, 2006). Megemlítendő, hogy minden anaerob körülmények között tenyésző faj fermentatív anyagcserét folytat, de nem minden fermentatív faj anaerob (Marcet-Houben és Gabaldo'n, 2011).

Léteznek olyan anaerob respirációval rendelkező fajok, amelyek a mitokondrium helyett más organellel vagy mechanizmussal oldják meg az energianyerés folyamatát. A *Chitrid*-ák hidrogenozómával rendelkeznek,

mely valószínűleg a mitokondriumból alakult ki; ATP szintézisük acetát, hidrogén és szén-dioxid képződése mellett valósul meg (Marcet-Houben és Gabaldo'n, 2011). A *Microsporidiák* mitokondriumhoz hasonló szerveződésű sejtalkotója a mitoszóma, ami energiatermelésre nem képes, a sejt a gazdaszervezettől transzportálja az ATP-t (Williams és mtsai., 2010).

### **3.2.2 Alternatív légzési komponensek**

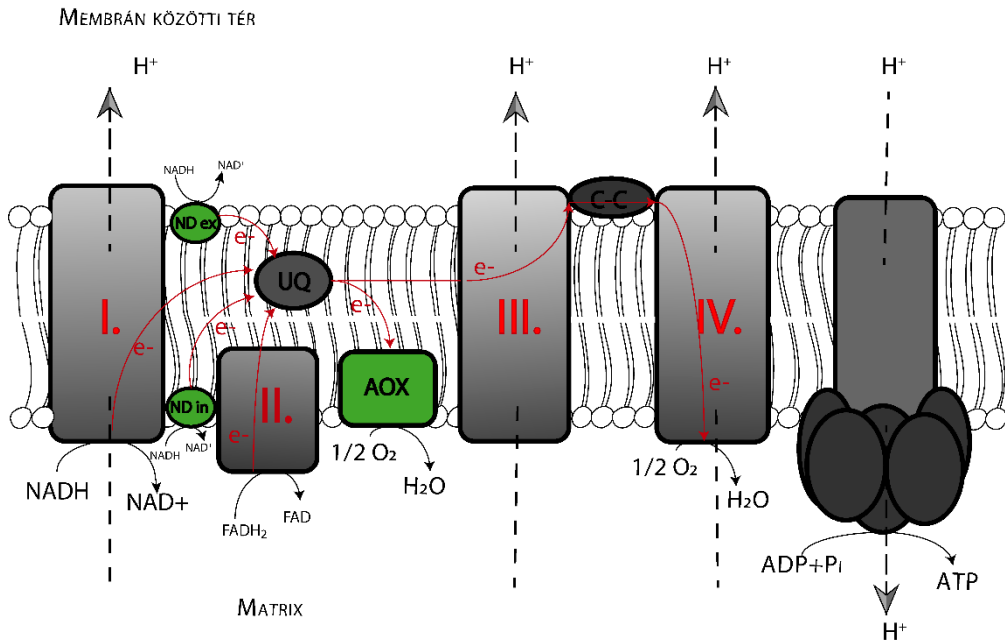
Az endoszimbiózis óta a mitokondrium számtalan változáson ment keresztül. Gének sokasága tűnt el a mitokondriális genomból vagy helyeződött át a nukleáris DNS-be, fokozott védelmet kapva a megnövekvő oxigénszint miatt keletkező ROS ellen (Berry, 2003). Feltehetőleg már az endoszimbiózis során jelen voltak az alternatív út(ak) komponensei a légzési lánc klasszikus komplexei mellett, melyek az evolúció folyamán bizonyos élőlényekből eltűntek vagy újra megjelentek a környezeti változásokhoz adaptálódva (Marcet-Houben és Gabaldo'n, 2011).

A két leggyakoribb alternatív légzést biztosító enzim a gombák körében az alternatív NADH dehidrogenáz és az Aox, melyek a fő légzési lánc komplexeit megkerülve továbbítják az elektronokat az ubikinon vagy a terminális elektron akceptor felé. A fenti két enzimen keresztül proton transzlokáció nem történik, emiatt a sejt kevesebb energiát generál, viszont számos esetben előnyös lehet az ATP-szintézis és az elektrontranszport szétkapcsolása (Larosa és Remacle, 2018).

A szétkapcsoló fehérjék (uncoupling protein = UCP) szintén az ATP képződést gátolják úgy, hogy a kialakult protongradienst eloszlatják, így ATP helyett hő termelődik (Ricquier és Bouillaud, 2000; Bouillaud és mtsai., 2001). Az emlős sejtek barna zsírszövetében működő UCP-eket részletesen tanulmányozták, de számos gombafajban is leírták őket (Jarmuszkiewicz és

mtsai., 2000; Cavalheiro és mtsai., 2004). Jó példa az *A. fumigatus*: mitokondriumának belső membránjában az UCP-n kívül alternatív NADH dehidrogenáz és Aox is segíti a légzést, ha a körülmények úgy kívánják (Tudella és mtsai., 2003).

Az *S. cerevisiae* mitokondriumában a NADH mellett citoszolikus szubsztrátok közvetlen oxidálása is megtörténhet (Grandier-Vazeille és mtsai., 2001). A citoszolikus glicerín-3-foszfátot, a mitokondrium külső membránján átjutva, a belső membránhoz kötött glicerín-3-foszfát ubikinon oxidoreduktáz oxidálja. A laktátok esetében ugyanezt a folyamatot a D-laktát és L-laktát citokróm oxidoreduktáz végzi (Larsson és mtsai., 1998).



**1. ábra** Légzési lánc (saját ábra). A római számok a légzési komplexeket, az UQ az ubikinont, míg a C-C a citokróm-c-t jelöli. Alternatív légzési komponensek: AOX = alternatív oxidáz; ND ex = külső alternatív NADH dehidrogenáz; ND in = belső alternatív NADH dehidrogenáz

### 3.3 Alternatív NADH dehidrogenáz (aNDH)

A NADH:UQ oxidoreduktázok három csoportját különböztethetjük meg. A légzési lánc egyes komplexe (Komplex I), mely az elektronok szállítását indítja el a NADH oxidálásával, az első csoportba sorolható (NDH-1). A kettes csoportot (NDH-2) a növényekben, gombákban, baktériumokban és Archaeákban megtalálható, proton transzlokációra nem képes NADH dehidrogenázok alkotják, míg a harmadik csoport (NQR) egy ritka, csak a baktériumokra jellemző, Na<sup>+</sup> pumpálással kapcsolt aNDH enzim (Joseph-Horne és mtsai., 2001; Martins és mtsai., 2011).

Az NDH-2 enzim jóval egyszerűbb felépítésű, mint a Komplex-I-et alkotó NADH dehidrogenáz; egy alegységből áll, 50-60 kDa méretű, hiányzik belőle a Fe-S klaszter, amit flavin (FAD, FMN) kofaktor helyettesít. A Komplex I. inhibitoraira (rotenon, piericidin A, kapszaicin) érzéketlen, viszont proton gradiens kialakítására nem képes (Melo és mtsai., 2004; Blaza és mtsai., 2017). Specifikus inhibitora nem ismert, növények esetében a platanetint, gombáknál pedig IACA-t használnak a kutatások során (Li és mtsai., 2011). Először *E. coli*-ban mutatták ki az 1960-as években, mellyel bebizonyosodott, hogy a fő légzési lánc komponensein kívül alternatív útvonalakon is megtörténhet az elektronok szállítása (Melo és mtsai., 2004). Eukariótákban a *Trypanosoma brucei*-ben fedezték fel először, melynek eredete feltehetőleg nem az endoszimbiózissal valósult meg: a mitokondriumhoz leginkább hasonlító *Rickettsia prowazekii*-ben nem található meg, így nukleáris eredete valószínűbb (Kerscher, 2000).

Mint légzési komponens, a mitokondrium belső membránjához kötődik a C-terminális részével; ha a mátrix felé helyezkedik el belső NADH dehidrogenázzal beszélünk (Nde), ha pedig a membrán közötti tér felé, akkor külső aNDH-ról (Ndi). Működésük és számuk fajonként eltérő, növényekben

például akár hét NDH-2 is található, míg a gombákra 3-4 kópia jellemző (Melo és mtsai., 2004). Elsőként *Neurospora crassa* esetében találtak egy  $\text{Ca}^{2+}$  függő Nde-t. Néhány esetben az enzim a NADH mellett a NADPH-t is oxidálja (*T. brucei*, *Plasmodium falciparum*), ami nagyobb  $\text{Ca}^{2+}$  felvételt igényel (Antos-Krzeminska és Jarmuszkiewicz, 2019). Aminosav szekvenciák alapján a különböző organizmusok NDH-2 enzimei nem konzerváltak, viszont az ADP kötő rész minden esetben nagyfokú egyezést mutat. Az *Aspergillus* nemzetségen belül viszont jelentős hasonlóság figyelhető meg (Melo és mtsai., 2004). Emlős sejtekben az enzimnek nincs konkrét homológja, viszont az egér szívsejt mitokondriumában találtak egy lehetséges külső aNDH-t (Oliveira és mtsai., 2000). Emberben egy mitokondriális apoptózist indukáló faktor (AMID=Mitochondrion-associated Inducer of Death) lehet a homológja, mivel a korábban említett ADP kötő motívum fellelhető az aminosav szekvenciában (Wu és mtsai., 2002). Természetesen, mint alternatív útvonalat katalizáló enzim nincs jelen a humán sejtekben.

Az aNDH szerepe még nem teljesen tisztázott, viszont számos kutatás jelzi fontosságát. *S. cerevisiae*-ben az egyes komplex hiányzik, így a NADH oxidálását az alternatív NDH-2 enzimek végzik (két Nde és egy Ndi). Mivel a faj fakultatív anaerob, a fő légzési lánc „nem megfelelő” működése nem okoz problémát, ATP igényét erjesztéssel fedezi. Az NDH-2 enzimek a redox egyensúly fenntartásában, a mitokondriális elektrokémiai potenciál helyreállításában játszanak fontos szerepet (Melo és mtsai., 2004). *N. crassa*-ban (2 Nde, 1 Ndi) a cukrok metabolizmusához való alkalmazkodásában lehet szerepe, viszont nem esszenciális enzim (a hiánymutánsok életképesek). A különböző növekedési fázisokban más-más Nde vagy Ndi enzimek működnek, a spórázás során az Ndi1 mutat nagyobb aktivitást (Duarte és mtsai., 2003).

A Komplex I. egyik inhibitora a kapszaicin, amelyet a *Capsicum* növények termelnek patogének ellen (Billing és Sherman, 1998). A gombák kanonikus légzőrendszerét ezzel blokkolni lehet, viszont az alternatív NADH dehidrogenázok révén képesek kivédeni a támadást. *Fusarium*, *Alternia* és *Colletotrichum* fajok Nde és Ndi-vel, vagy csak Ndi-vel rendelkeznek, ami azt jelenti, hogy a növénypatogének körében is széleskörűen elterjedt az NDH-2 (Adams és mtsai., 2020). Fentiek alapján kijelenthető, hogy a sejt túléléséhez hozzájárul az aNDH működése. A redox egyensúly fenntartásán túl a ROS csökkentésében is szerepe van (Guerrero-Castillo és mtsai., 2009). *A. niger* alapú enzim fermentáció során az *ndh-2* hiánymutáns törzsek nagyobb biomasszát és intracelluláris protein szintet hoztak létre, viszont a ROS szint nőtt (Voulgaris és mtsai., 2012). Oxidatív stressz során az aNDH fokozott aktivitást mutat, viszont ezzel csökkent a sejt életképessége és a tenyészet korai pusztulását okozta. Ezzel szemben az enzim IACA-val történő gátlásával a sejt metabolikus aktivitása erősödött. Hiánymutáns törzssel a növekedési ráta nőhet és a fermentációs idő is lecsökkenthető (Antos-Krzeminska és Jarmuszkiewicz, 2019).

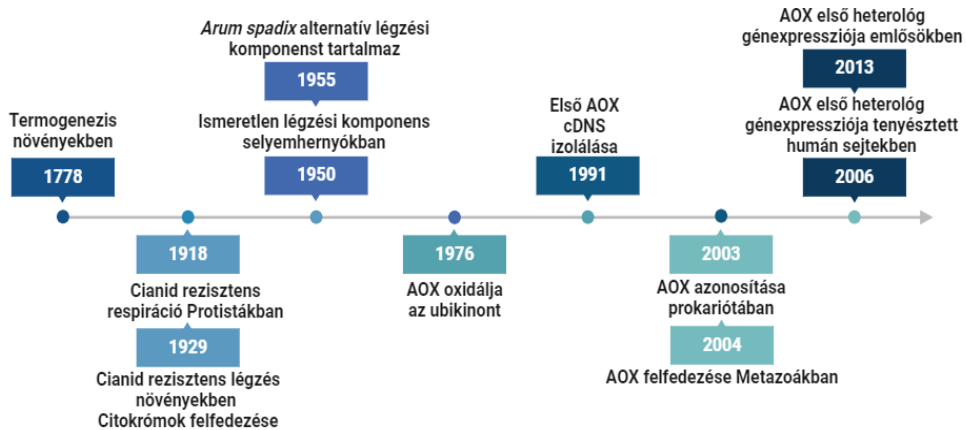
Számos közlemény a korai sejthalállal hozza összefüggésbe az aNDH működését (Cui és mtsai., 2012; Voulgaris és mtsai., 2012; Gonçalves és Videira, 2015). *S. cerevisiae ndi1* génjének overexpressziójával ROS mediált apoptózis következett be (Li és mtsai., 2006), a *N. crassa*-ban pedig a külső *andh*-k kiütésével keletkezett kevesebb szabad gyök (Carneiro és mtsai., 2012). Mégis miért inkább a ROS csökkenéssel hozzák összefüggésbe az alternatív NADH dehidrogenázokat? A válasz abban rejlik, hogy reverz elektronáramlás indulhat meg az ubikininről a Komplex I. felé, ami indukálja a stressz választ (mitohormesis), így megerősödik a sejt, nő az ellenállóképessége, nő az élettartam. Alacsony szintű stressz akár jótékony

hatással is lehet a sejt életképességére. Viszont az a tény sem elhanyagolható, hogy az enzim az apoptózist indukáló faktorok egyik homológja (Gonçalves és Videira, 2015).

Mivel a humán sejtek nem tartalmazzak aNDH-t, egyrészt potenciális célpontja lehet az antimikrobiális/antifungális terápiáknak, másrészt pedig a humán mitokondriális betegségek kezelésére is alkalmas lehet (Melo és mtsai., 2004). *S. cerevisiae* Ndi1 enzimével sikeresen helyreállították a kínai hörcsög (*Cricetulus griseus*) légzését (Seo és mtsai., 1998). Az Ndi1 enzim emberi vesesejtekben is sikeresen kifejeződött, a működőképes enzim a mitokondriális légzési lánchoz kapcsolódott (Seo és mtsai., 1999). Kezelést nyújthat a mitokondriális DNS-ben történt mutációk miatt rosszul működő Komplex I. esetében, de akár a Parkinson-kór vagy a LEBER féle optikus neuropátiában (Antos-Krzeminska és Jarmuszkiewicz, 2019). *Drosophilák* esetében Ndi jelenlétében nőtt az élettartam is (Gospodaryov és mtsai., 2020). Fontos megjegyezni, hogy humán alkalmazása rengeteg kutatást igényel, mivel meg kell bizonyosodni arról, hogy nincs-e hosszútávú káros hatása, hogyan reagál egy külső stresszre; ráadásul minden szövet másképp reagál a stresszhatásokra (Saari és mtsai., 2019).

### **3.4 Alternatív oxidáz (Aox)**

A növények termogenezisét 1778-ban írták le, de a jelenséget okozó mechanizmust még értelemszerűen homály fedte. A 20. század első felében publikálták először a cianid rezisztens légzést, majd az 1950-es években a mitokondriális elhelyezkedése is ismertté vált. Az Aox-ot az elmúlt száz évben számos organizmusokból írták le, megismerték szerkezetét, működését, humán sejtekben fejeztették ki (2. ábra), viszont működésének megértése még várat magára (El-Khoury és mtsai., 2022).



2. ábra Aox történelmi áttekintése (saját ábra El-Khoury és mtsai., 2022 alapján)

### 3.4.1 Aox szerkezete, működése, gén expressziója

Az Aox a fő légzési láncról az ubikinol szintjén ágazik le; megkerülve a hármas és négyes komplexet terminális oxidázként képes az oxigént közvetlenül vízzé redukálni. Ilyenkor proton transzlokáció csak a Komplex I - en történik, így az ATP szintézis jelentősen redukálódik. A III. és IV. Komplex inhibitorai (cianid, antimicin, hidrogén-szulfid, nitrogén-oxid) hatástalanok vele szemben, viszont érzékeny a hidroxámsavakra, és az n-propil gallátra (Martins és mtsai., 2011; Rogov és mtsai., 2014).

Eredetét vizsgálva a legelfogadottabb elmélet, hogy az Aox már az endoszimbiózissal megjelent az eukarióta sejtekben, majd vertikális öröklődéssel terjedt el a különböző organizmusokban (Berry, 2003). Más magyarázat szerint a baktériumok horizontális géntranszferrel szereztek meg, viszont az Aox-hoz hasonló fehérje jelenléte az  $\alpha$ -proteobaktériumokban az endoszimbionta elméletet támasztja alá (Vicente és mtsai., 2015). Az anaerob – aerob átállás során szüksége volt a sejteknek egy oxigént redukáló fehérjére, melynek az atmoszférában lévő magas szulfid koncentráció nem akadályozza a működését (Selinski és mtsai., 2018 ).

Az Aox-ot leginkább növényekben tanulmányozzák, de a gombákban történő kutatások is egyre kiterjedtebbek. Rajtuk kívül megtalálható egyes baktériumokban, protistákban, protozoákban, mikrosporidiákban és néhány állatfajban is (Martins és mtsai., 2011).

A fungális Aox szerkezetét tekintve homodimer, a mitokondrium mátrixa felé néző, kb. 32 kDa méretű fehérje, mely tartalmaz egy nem-hem típusú kettős-vas magot, glutamát és hisztidin maradványokkal koordinálva. Növényekkel ellentétben nem az  $\alpha$ -ketosavak indukálják, hanem a különböző purin nukleotidok (Young és mtsai., 2013).

Az aktivitása függ az ubikinon redox állapotától (bizonyos esetekben csak akkor kapcsol be, ha az ubikinon redukciós szintje 40 % fölött van), az oxidálni kívánt szubsztrátumtól és az intracelluláris oxigén koncentrációtól. Oxigénhez való affinitása jóval kisebb, mint a citokróm c oxidáznak (Rogov és mtsai., 2014).

Az *aox* gén a sejtmagban kódolódik. A növényekhez képest kevésbé diverz, egy alsaládja létezik a gombákban. Míg a növények esetében az *aox1* csak stresszhelyzetekben aktiválódik, az *aox2* konstitutív, a gén több kópiája is egy időben fejeződik ki (Albury és mtsai., 2009). A fungális *aox* gén regulációja kevésbé ismert, de fajtól függően eltérő szabályozás figyelhető meg. *A. fumigatus* esetében stressz hatására képződik fehérje (Magnani és mtsai., 2008), viszont az *N. crassa* és *A. niger* esetében folyamatosan képződik transzkriptum, de génproduktum nem (Li és mtsai., 2011). A *C. albicans* is külső hatásokra fejezi ki egyik *aox* génjét, míg a másik konstitutív expresszióval rendelkezik (Huh és Kang, 2001). Az *A. niger*-ben transzkripció szabályozás jellemző, hasonlóan a Tripanoszómához, bár náluk egy policisztron struktúrába rendeződve fejeződnek ki (Honda és mtsai., 2012; Albury és mtsai., 2009). Általánosságban elmondható, hogy az Aox aktivitása

főképp transzkripció és poszttranszlációs mechanizmusokkal szabályozott folyamat (Rogov és mtsai., 2014).

### 3.4.2 Aox élettani szerepe

Az Aox szerepe fajfüggő, de legtöbbször még fajkon belül is többféle lehet. Minden esetben elmondható, hogy a kikerült légzési komponensek inhibitoraival szemben érzéketlen, így túlélést biztosít a sejtnek egyes toxinok jelenlétében (McDonald, 2008; Huang és mtsai., 2002). A legtöbb esetben a ROS képződésének csökkentésével is összefüggésbe hozható (Ruiz és mtsai., 2011; Magnani és mtsai., 2008; Yan és mtsai., 2009). Biztosítja a redukciós egyensúlyt, új környezethez való alkalmazkodáskor a metabolizmus rugalmasságához hozzájárulva szintén a sejt túlélését támogatja (El-Khoury és mtsai., 2022).

Ahogy korábban említettem, növényekben jól tanulmányozott enzim, fiziológiai szerepe sokrétű. Egyik legfontosabb feladata a termogenezis elősegítése azáltal, hogy a felszabaduló szabadenergia hő formájában távozik (ATP szintézis nincs), ami a beporzást végző rovarokat vonzó illatanyagok párolgását fokozza (Zhu és mtsai., 2011). Emellett különböző stressztényezők hatására is fokozott expressziót mutat pl. ozmotikus, oxidatív stressz, szárazság, fényintenzitás változása, patogének támadása vagy tápanyag hiány (Colombatti és mtsai., 2014; Searle és mtsai., 2011; Costa és mtsai., 2010). Hozzá kell tenni, hogy a növények több *aox* gént tartalmaznak, melyek kifejeződése függ a sejttől, a szövetről, életciklustól, továbbá az említett stresszfaktorokra is különböző *aox* gének reagálnak (Rogov és Zvyagilskaya, 2015).

Gombák esetében is egyre többet tudunk meg az Aox szerepéről, viszont a fajspecifikusság még inkább jellemző, és az adott gombafaj életmódja is

meghatározó (Rogov és mtsai., 2014). Az *S. cerevisiae* mitokondriuma nem tartalmaz Aox-ot, ami a fermentatív energianyeréssel lehet összefüggésben, de a teljesen aerob légzést folytató élesztőkben élettani jelentősége bizonyított (Veiga és mtsai., 2003).

Az oxidatív stressz csökkentése az Aox egyik legismertebb funkciója. A *Hansuela anomala* és *Pichia membranifaciens* élesztők ROS jelenlétében nagyobb Aox aktivitást mutattak (Minagawa és mtsai., 1992; Veiga és mtsai., 2003). Az Aox működésével csökkenthető az elektronok túlfolyása a légzési láncon, így kevesebb esély van ROS képződésére (Li és mtsai., 2011). A *fumigatus*-ban ROS generáló vegyületek (paraquat illetve menadion) kezelés hatására is megemelkedett Aox szintet dokumentáltak (Magnani és mtsai., 2008). Az *Acremonium chrysogenum*-ban szintén negatív korrelációt találtak a ROS képződés és Aox működése között, ami ez esetben is a mitokondrium védő szerepére utal (Karaffa és mtsai., 2001).

Az Aox intenzívebb transzlációja a növekedési fázistól és a szénforrás elérhetőségétől is függhet. *Paracoccidioides brasiliensis* esetében például csírázáskor mérhető főképp Aox aktivitás, *P. pastoris*-nál pedig folyamatosan nő, viszont a glükóz kifogyásával az Aox szint is hirtelen lecsökken (Kern és mtsai., 2007; Hernandez és mtsai., 2011). Ezzel ellentétben az *A. flavus* vagy *A. nidulans* aflatoxin és szterigmatocisztin termelése során a késő stacioner fázisban van jelentősége (Molnár és mtsai., 2018). Az aflatoxin bioszintézis sok ATP-t és NADH-t igényel, viszont az ATP gátolja az oxidatív foszforilációt így az Aox el tudja végezni a NADH regenerálását. Az Aox a sejt metabolizmusát a zsírsav szintézis felé irányítja, majd lebontásával a prekursorok biztosítják az AT/ST szintézist (Tian és mtsai., 2020).

Az *Aspergillus* nemzetség fajaiban az Aox aminosav szekvenciája erősen konzervált, mely arra enged következtetni, hogy természetes körülmények

között is fontos szerepe van a nemzetségben. Ebből következik, hogy szerepe a biotechnológiai folyamatokban is meghatározó lehet (Li és mtsai., 2011).

### **3.4.3 Aox szerepe a biotechnológiai folyamatokban**

Számos biotechnológiai folyamatban alkalmaznak élesztőket és fonalas gombákat, melyek produktivitásához elengedhetetlen a magas oxigén tartalmú környezet. Az oxidatív stressz során ROS képződik, melyet a sejt antioxidáns védekező mechanizmusa nem feltétlenül tud semlegesíteni (Li és mtsai., 2009). Ez már az inokulálás során probléma, mivel lombikból fermentorba kerülve a sejtek a nem jól megválasztott levegőztetés mellett elnyújtott lag fázist mutatnak (O'Donnell és mtsai., 2007). Ennek két oka lehet: vagy az Aox működésével nem tud elég ATP keletkezni, vagy a már keletkezett ROS gátolja a glicerin aldehyd-3-foszfátot és akonitázt, ami szintén hátráltatja az energianyerést (Li és mtsai., 2008; Murakami és Yoshino, 1997).

*A. terreus* lovasztatin termelése szilárd-fázisú (SSF) és süllyesztett fermentációs technológiával is történhet (Suryanarayan, 2003). Az SSF-ben a sejtek jobban ki vannak téve az oxigén káros hatásainak, ami korrelál az Aox megnövekedett aktivitásával. Idiofázisban, ahol a ROS koncentráció kritikus, az Aox egészséges határok között tartotta azt (Pérez-Sánchez és mtsai., 2017). Az *A. terreus* itakonsav termelése során is jelentős aktivitást mutatott: alacsony oldott oxigén (DO) szint (2 %) mellett a teljes légzés 15 %-át tette ki, 30 % DO mellett viszont 3-szorosára nőtt a cianid rezisztens légzés aránya. Habár az *A. terreus* két *aox* génnel rendelkezik, csak az *aoxA* fejeződött ki a fermentáció során (Molnár és mtsai., 2018). Az Aox aktivitása foszfát limitáció hatására is nőtt, aminek a metabolikus fluxus fenntartásában lehet fontos szerepe, a limitált ATP szintézis miatt (Songserm és mtsai., 2020).

Oxálsavat termelő *A. niger* törzsben az oxálacetát-hidroláz és *aox* gén overexpressziója nagyobb oxálsav hozamot nem, viszont magasabb glükóz felvételi rátát eredményezett. Az *aox* gén hatékony eszköz lehet más organizmusok genomjába integrálva, mivel elősegítheti azok metabolikus aktivitását (Yoshioka és mtsai., 2020).

### **3.4.3.1 Az Aox szerepe az *A. niger* citromsav fermentációban**

A citromsav a legnagyobb mennyiségben előállított szerves sav a világon. Felhasználása sokrétű: élelmiszeripartól a gyógyszeriparig rengeteg lehetőség van hasznosítására. Termelése szinte teljes mértékben az *A. niger*-rel valósul meg, mely csaknem kvantitatív hozammal (95 %) képes a szénforrás - citromsav átalakításra (Reinfurt és mtsai., 2023). A nagy mennyiségű glükóz gyors lebontásának velejárója az ATP szintézis, mely allosztérikusan gátolja a glikolízis irreverzibilis lépéseit. Az Aox szerepe nyilvánvaló: alternatív légzési utat biztosítva szétkapcsolja a NADH regenerálást és az oxidatív foszforilációt, így a glikolitikus fluxus megerősödik. Az Aox működéséhez fokozott levegőztetés szükséges, ami ROS képződéshez vezetne, de az enzim azok eliminálásával biztosítja a sejt védelmét (Karaffa és Kubicek, 2003; Karaffa és Kubicek, 2019).

Az *A. niger* cianid rezisztens légzésének fontosságát 1980-ban írták le, amikor SHAM-mel kezelt tenyészetek citromsav termelése leromlott, a citokrómos légzési komplex inhibitorai mellett pedig javult, viszont a növekedésük nem változott (Zehentgruber és mtsai., 1980).

*A. niger* WU-2223L törzs esetében is hasonlókat tapasztaltak, továbbá azt, hogy az *aox* gén kifejeződése konstitutív, aktivitása a transzkripció szinttel együtt növekszik, viszont a glükóz koncentrációtól független (Kirimura és mtsai., 2006). Az *aox* gén expressziója már a spórákban is megfigyelhető, ami azért figyelemre méltó, mert több gombában csak stresszhatások indukálják

(Hattori és mtsai., 2008). Az *aox* upstream régiójában stresszre reagáló transzkripciós faktorok kötőhelyei találhatóak (HSE, STRE), melyek az *Aspergillus*-okban nagyfokú hasonlóságot mutatnak. Ezeknek köszönhetően hő- és oxidatív stressz hatására magasabb Aox aktivitás figyelhető meg. Mivel egy fermentáció alatt a gomba folyamatos stresszhatásnak van kitéve, az *aox* gén kifejeződése folyamatos, közvetlenül vagy közvetetten reagálva a káros kondíciókra, biztosítja a magas citromsav kihozatal elérését (Honda és mtsai., 2012). A hozam javítása az *aox* gén overexpressziójával is lehetséges, több kópia a genomban effektívebbnek bizonyul, mint a légzési komponenseket gátló inhibitorok alkalmazása (Hou és mtsai., 2018).

#### **3.4.4 Gombának átok, embernek áldás**

Az Aox potenciális terápiás célpont lehet egyrészt a humán patogének ellen, másrészt a mitokondriális működési zavarok kezelésében.

A humán patogének többek között az Aox segítségével játsszák ki a gazdaszervezetet (Ruiz és mtsai., 2011; Akhter és mtsai., 2003). *C. albicans* esetében megfigyelték, hogy az *aox1* és *aox2* gén is indukálható vassal, deléciós mutánsban ROS felhalmozódás és virulencia csökkenés tapasztalható. Az emberi szervezetben a vastartalom szövetenként eltérő lehet, így a *C. albicans* könnyen tud adaptálódni a metabolikus plaszticitása miatt (Wright és mtsai., 2014; Solis és mtsai., 2023). Mindemellett az egyik *aox* konstitutív, míg a másik stressz hatásra fejeződik ki, főképp abban az esetben, ha a ROS koncentráció magas (melyet az intracelluláris vas tartalom tovább növel). Ha újra alacsony a ROS-szint, nem expresszálódik. Ezzel a szabályozással ATP hiány nem alakulhat ki, mely összességében a gomba növekedését segíti (Sharma és mtsai., 2023).

Az *A. fumigatus* spóráit a tüdő alveólusok makrofágjai ROS termelésével próbálja elpusztítani, viszont az Aox csökkenti a káros hatásokat (Magnani és mtsai., 2008). Egy másik védekezési mód az emlős immunsejtek nitrogén-oxid termelése, ami a fő légzési láncot inhibálja, viszont az Aox alternatív légzési utat biztosítva segít a gomba túlélésében (Martins és mtsai., 2011).

Hasonlóan az antibiotikumokhoz, az antifungális szerekkel szemben is rezisztencia alakul ki, ami új terápiák kidolgozását sürgeti (Ball és mtsai., 2020; Lucas és mtsai., 2015). Az Aox-nak közvetlen szerepe nincs a gazdasejt támadásainak kivédésében, de közvetett viszont igen: a virulencia megerősítéséhez a ROS csökkentésével, metabolikus flexibilitás biztosításával vagy a légzési lánc inhibitorai elleni rezisztenciával járul hozzá. Specifikus inhibitorokkal vagy kombinált terápiákkal új támadási pontja lehet a fertőző ágenseknek (Edrich és mtsai., 2024).

Humán vonatkozásban nemcsak a patogének elleni kezelésben lehet jelentősége, de emberi sejtekbe transzformálva és expresszáltatva segítséget nyújthat egyes mitokondriális eredetű betegségek enyhítésében (Saari és mtsai., 2019; Dassa és mtsai., 2009). *Drosophila melanogaster*-ben, továbbá egér kísérletekben is biztosította a légzést az elektron transzport lánc gátlása során (Fernandez-Ayala és mtsai., 2009; El-Khoury és mtsai., 2013). Parkinson kórhoz hasonló mozgásszervi degeneráció esetében is pozitív eredményt hozott, továbbá az Alzheimerert okozó béta-amiloid termelést is csökkentette (Fernandez-Ayala és mtsai., 2009; El-Khoury és mtsai., 2016). Az *aox* expressziója a szeptikus sokk ellen is védelmet nyújtott, a mitokondriális aktivitás vagy védekezés stimulálásával felgyorsult a gyógyulás folyamata (Szibor és mtsai., 2022).

## 3.5 Egy gén élete

### 3.5.1 Génduplikáció

A növényekkel ellentétben az *aox* gén multiplicitása gombákban erősen fajfüggő. A *S. cerevisiae* és *S. pombe* mitokondriumából teljesen hiányzik, míg a *C. albicans* két teljesen különböző expressziós mintázatot mutat (Flipphi és mtsai., 2023; Huh és Kang, 1999). A *T. brucei* csak egy *aox* génnel rendelkezik, ami ráadásul az egyetlen terminális oxidáz a parazita véráramban megjelenő formája esetében (Huh és Kang, 2001).

Az, hogy egy adott gént hány kópiában tartalmazza a sejt genomja, számos tényezőtől függ. A génduplikáció fontos mechanizmus evolúciós szempontból, segíti az organizmus alkalmazkodását a folyamatosan változó környezethez, akár új funkcióval ellátva a génmásolatot (Long és mtsai., 2003). Ha a duplikált gén ugyanabban a genomban marad, akkor paralógnak, ugyanazt a gént egy másik organizmus genomjában pedig az eredeti gén ortológjának nevezzük (Magadum és mtsai., 2013).

A gének megkettőződése történhet egyenlőtlen crossing-over miatt (tandem duplikáció), aminek következtében géndarabok, a teljes gén vagy akár több gén is egymás mellé kerül. Emiatt a DNS szekvenciák folyamatos ismétlődése és különböző genetikai átrendeződések történnek, ami megváltozott fenotípust eredményezhet (Arguello és mtsai., 2007). További mechanizmus a retrotranszpozíció, mely során mRNS-ből komplementer DNS (cDNS) képződik reverz transzkripcióval, majd a genomba inszertálódik (Brosius, 1991). A retrogének mRNS mivoltuk miatt nem tartalmaznak intronokat, viszont poly-A vagy szignál szekvenciákat igen. A DNS-be történő integrálódásuk random, így nem kapcsolnak az eredeti génnel, viszont jellemző, hogyha kódoló részek közelébe vagy intronokba kerülnek nagyobb

eséllyel íródnak át, mint az azoktól távol eső részeken (Casola és Betrán, 2017). A transzpozíció DNS transzpozonok segítségével is megtörténhet, habár a folyamat még nem teljesen ismert. Nagyobb genomszakaszok duplikációja a szegmentális duplikáció, ha pedig az egész genom megkettőződik és a sejtmagban akár két-három kópia is jelen van, poliploidizációról beszélünk (Lallemand és mtsai., 2020).

### 3.5.2 Horizontális géntranszfer

Ugyanazon gén több kópiában történő megjelenése nem csak a vertikális öröklődés folyamatával valósulhat meg. A horizontális vagy laterális géntranszfer (HGT/LGT) során a genetikai anyag cseréje és integrálódása különböző fajok között történik meg (Doolittle és Ford, 1999). Főképp prokariótákra jellemző mechanizmus, eukariótákban korábban nem tulajdonítottak neki különösebb jelentőséget, (Loftus és mtsai., 2005; Doolittle és Ford, 1998; Eichinger és mtsai., 2005). Ennek megfelelően gombákban sem teljesen tisztázott folyamat, de számos bizonyíték létezik a HGT-vel történő génátvitelre (Heinemann és Sprague, 1989; Bundock és mtsai., 1995; Nevoigt és mtsai., 2000). A bor erjesztése folyamán az *S. cerevisiae* és a bor egyik fő szennyezője a *Zygosaccharomyces bailii* között az ökológiai közelség során történik HGT esemény: az *S. cerevisiae* körülbelül 65 KB genomrészt kapott a *Z. bailii*-tól (Novo és mtsai., 2009). Másik példa az anasztomózis folyamata, amikor két spóra egy speciális hifán keresztül fúzionál, így egy sejtként működve a genetikai anyag cseréje is megtörténhet (Read és mtsai., 2009). Gombák esetében számos transzport és szekretáló protein HGT eredménye, továbbá a megnövekedett metabolikus kapacitáshoz is hozzájárult. Gének százai származnak baktériumokból, de más gombákkal, sőt akár növényekkel is cserélődhet a genetikai információ (Druzhinina és mtsai., 2016). A HGT megvalósulása viszont akadályokba ütközhet, mivel az exogén DNS darabot a

befogadó sejt idegennek ismeri fel, és a védekező mechanizmusok lebonthatják; ha pedig eljut a sejtmagig, annak membránján nem feltétlenül tud bejutni (Fitzpatrick, 2012).

### **3.5.3 A duplikálódott gén sorsa**

A duplikálódott gén betöltheti ugyanazt a szerepet, mint az eredeti kópia: biztosítja a gén funkcióját. A két alapvető működési mód szerint vagy több géntermék keletkezik, amivel megerősít bizonyos folyamatokat a sejtben, vagy megtartja a gén ugyanazt a funkciót, de csak akkor fejeződik ki, ha az eredeti valamiért gátolva van (Ohno, 1970). „Szubfunkcionalizáció” során a két (vagy több) gén megosztja egymás között a feladatát, „neofunkcionalizáció” esetében pedig valamilyen új funkciót kap a replikáció (Magadum és mtsai., 2013).

Evolúciós szempontból a fenti kétféle „génsors” preferált, viszont a sejtnek nincs feltétlenül szüksége két ugyanolyan génre. Ha nem áll fent szelekciós nyomás, a duplikáció után néhány millió évvel megindul a „pszeudogenizáció” folyamata (Lynch és Conery, 2000). A génmásolatban mutációk halmozódnak fel, ami miatt először csak elveszíti működését, majd idővel törlődik a genomból. A mutációkat okozhatják deléciók, inszerciók, amik frameshift-et, a leolvasási keret eltolódását eredményezik. A nonszensz mutáció esetében egy korai stop kodon épül be, a missense mutációk pedig egy bázis cseréjével megváltoztathatják a kódolt aminosavat (Magadum és mtsai., 2013). A génvesztés a legtöbb esetben hosszú folyamat, a pszeudogének a genomba ágyazódnak, funkciójukat veszítve evolúciós bizonyítékként szolgáltatnak információt számunkra (Zhang, 2003). Vannak viszont olyan esetek, amikor egyenlőtlen crossing overrel vagy valamilyen transzpozon mozgásból adódóan egy hirtelen fizikai törléssel következik be a duplikátum elvesztése (Albalat és Cañestro, 2016).

A génvesztés nemcsak a duplikálódott gének sorsa lehet, evolúciós előnyt kialakítva például a jobb adaptáció érdekében is megtörténhet (Albalat és Cañestro, 2016). Több élőlénynél is megfigyelhető a regresszív evolúció jelensége, melynek egy jó példája a C-vitamin bioszintézis utolsó lépéséért felelős gén elvesztése. A C-vitaminban gazdag növények fogyasztásával az állatoknak nem volt szüksége annak szintetizálására, így az energiahatékonyság érdekében funkciójukat veszítették az ehhez szükséges gének (Drouin és mtsai., 2011).

Növényekben az *aox* gének tandem duplikációval és/vagy blokk duplikációval (nagyobb blokk duplázódik meg, de nem tandem módon követik egymást a gének) kettőződhetnek meg. A gén nagy kópiaszámához a tandem járult inkább hozzá, ami után a gének új funkciót kaptak (Pu és mtsai., 2015).

A legtöbb eukariótában és eubaktériumban az *aox* eredete monofiletikus, viszont a gombák esetében más ősrre vezethető vissza. A gombák *aox*-a is két független vonalon öröklődött: az egyikhez az *Ascomycota*-k és *Bazidiomycota*-k tartoznak, a másik csoportot pedig a *Zygomycota*, *Chytridiomycota* és *Microsporidia* fajok alkotják (Pennisi és mtsai., 2016).

## 4. Célkitűzések

Az *Aspergillus* és *Penicillium* nemzetségek tagjai között számos iparilag fontos gomba található, többükkel a Biomérnöki Tanszéken évek óta folynak kutatások. Az alternatív oxidáz vizsgálata sem újkeletű, Tanszéki publikációk sora foglalkozik működésével. Doktori értekezésem alapjául szolgáló célkitűzéseimet ezek alapján fogalmaztam meg:

1. Az NCBI adatbázisában fellelhető összes *Aspergillus* és *Penicillium* faj *aox* génjeinek összegyűjtése, majd az azokról képződött fehérjék (szekvencia alapú) filogenetikai analízise.
2. Az *aox* gének eredetének és evolúciójának feltérképezése az *Aspergillaceae* családon belül.
3. Génvesztési mintázatok feltárása: a paralóg gének eltűnhetnek a genomból, ha a sejt számára nem előnyösek. Emiatt a génduplikációs események mellett a génvesztés vizsgálata is kiemelkedő fontossággal bír.

## 5. Anyagok és módszerek

### 5.1 Alternatív oxidáz gének keresése, génstruktúra megállapítása

Az *aox*-ot kódoló gének összegyűjtése a National Center of Biotechnology Information (NCBI) adatbázisából történt (2022 május), TBLASTN kereső algoritmus révén, melynek a beállításai a következők voltak: adatbázis: Whole Genome Shotgun (WGS) contigs; BLOSUM62 matrix; Expect threshold: 1000; Gap cost: Existence 10, Extension 1; Compositional adjustment: no; Low complexity regions: not filtered. Referenciaként az *Aspergillus niger* WU-2223-L (Kirimura és mtsai., 1999; Kirimura és mtsai., 2006) törzs Aox fehérjének aminosav szekvenciáját használtuk, melyben elsőként határozták meg az Aox teljes hosszúságú cDNS-ét. A keresést az *Aspergillus* és *Penicillium* nemzetségek, és az egyéb *Eurotiomycetidae* alosztályba tartozó gombák (*Eurotiales* és *Onygenales* rend adatbázisban fellelhető összes genomja) körében végeztük, továbbá független csoportként az *Eurotiomycetidae*-hez legközelebbi rokonságban lévő *Lecanoromycetes* osztály fajait választottuk. Azokkal a génekkal dolgoztunk tovább, melyek kódoló fehérjei 55-65 %-os aminosav szekvencia hasonlóságot mutattak. Az intron és exon szerkezetek meghatározása manuálisan történt: a génszekvenciák Word fájlba gyűjtése után mi magunk kerestük meg az intronokat jellegzetes struktúrájukat felismerve (donor, lariat, akceptor) és jelöltük ki a szekvenciában. A nem kódoló részek eltávolítása után az *in silico* fehérje transzlációt az Expasy (<https://web.expasy.org/translate/>) programmal végeztük el, így kizárva az adatbázisba feltöltött pontatlan adatok használatát.

Az alternatív NADH dehidrogenáz keresését ugyanezen paraméterek mellett végeztük el. Az NCBI adatbázisa mellett néhány faj esetében (*A. niger*, *Usti* szekció fajtái) az U.S. Dept. of Energy Joint Genome Institute (JGI) genom

szekvenciáit is felhasználtuk. Az *A. niger* második *aox*-ának blastja az adatbázisban megtalálható (2022 november) összes *A. niger* törzsben megtörtént, az aminosav szekvenciában 50-75 %-os hasonlóságot mutató fehérjék génjeit gyűjtöttük össze. Az *aox* gének közvetlen környezetének feltérképezése a szomszédos gének elhelyezkedésének és lehetséges funkcióinak meghatározása a JGI-ba feltöltött genomszekvenciák segítségével történt.

Különböző törzsek közötti *aox* szekvenciák azonosságát, százalékos egyezésük meghatározását a Clustal Omega online programmal végeztük (<https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher/msa/clustalo>). Az alignmentek azonos aminosav szekvenciáit a Boxshade online szoftver segítségével emeltük ki (<https://junli.netlify.app/apps/boxshade/>). A különböző fajok taxonómiai besorolását Houbraken és munkatársai osztályozása alapján végeztük (Houbraken és mtsai., 2020).

## 5.2 Maximum likelihood filogenetikai analízis

A különböző Aox fehérjék többszörös szekvencia illesztése a MAFFT (Multiple Sequence Alignment with Fast Fourier Transform, 7. verzió; Katoh és Standley, 2013) programmal valósult meg, E-INS-i algoritmus és BLOSUM45 pontozó mátrix alkalmazásával. A filogenetikai következtetésre alkalmas régiók kiválasztása a BMGE (Block Mapping and Gathering using Entrophy; Criscuolo és Gribaldo, 2010) szoftverrel történt BLOSUM55 hasonlósági mátrix és 4-es blokkméret használatával. A BMGE által trimmelt szekvenciákból Maximum Likelihood (ML) filogenetikai fát készítettünk PhyML 3.0 (Stéphane és mtsai., 2008) online programmal LG mátrixot beállítva, gamma szubsztitúciós rátával és 4 szubsztitúcióval. Az ML fák a FigTree (1.4.3 verzió) szoftverben lettek szerkesztve, majd az ábrák

finomhangolását az Adobe Illustrator 2018-ban végeztük. Az elágazások valószínűségének értéke az approximate Likelihood Ratio Tests (aLRTs; Anisimova és Gascuel, 2006) segítségével lett megadva.

Az *aox* génszekvenciákból készült filogenetikai fákhhoz szintén a fent említett programokat használtuk. A szekvenciaillesztésnél 200 PAM, a BGME-ben 250 PAM:4 matricát állítottunk be. A fa készítésénél a szubsztitúciós modellként HKY85-et használtunk gamma szubsztitúciós rátával, a szubsztitúciók száma pedig 4 volt. Az *A. welwitschiae* esetében az egész génszekvenciát (intronokkal együtt), míg az *A. niger* törzsek mutációi esetében a második és harmadik exont használtunk fel.

### 5.3 Alkalmazott gombatörzsek, táptalajok

A különböző duplikációs események során létrejött *aox* paralógok kifejeződését 7 fajban teszteltük, továbbá *A. niger*-ben azok mutációit is bizonyítottuk. Az alkalmazott fajok és *A. niger* törzsek az 1. táblázatban láthatóak a vizsgált génekkel/génallélokkal együtt.

**1. táblázat** Mutációk és *aox* gének kifejeződésének vizsgálatához használt törzsek

Faj	Törzs	Vizsgált gén/génallél
<i>A. terreus</i>	NIH 2624	<i>aoxA</i> , <i>aoxB2-1</i>
<i>A. oryzae</i>	RIB 40	<i>aoxA</i> , <i>aoxB2-1</i>
<i>P. rubens</i>	NRRL 1951	<i>aoxA</i> , <i>aoxB2-1</i>
<i>A. wentii</i>	DTO 134E9	<i>aoxA</i> , <i>aoxB3</i>
<i>A. calidoustus</i>	SF006504	<i>aoxA</i> , <i>aoxB1</i> , <i>aoxB4</i>
<i>A. sydowii</i>	CBS 593.65	<i>aoxA</i> , <i>aoxB2-1</i> , <i>aoxB3</i>
<i>Trichoderma asperellum</i>	CBS 433.97	<i>aoxA</i> , <i>aoxB2-2</i>
<i>A. niger</i>	ATCC 1015	<i>aoxB1</i> – vad törzs
<i>A. niger</i>	CBS 554.65	<i>aoxB1</i> – deléció

<i>A. niger</i>	CBS 147343	<i>aoxB1</i> - transzpozon
<i>A. niger</i>	CBS 630.78	<i>aoxB1</i> – frameshift
<i>A. niger</i>	CBS 769.97	<i>aoxB1</i> - frameshift, nonsense mutáció

Az *A. niger* ATCC 1015 törzsből az *aoxA* kifejeződésének tanulmányozása mellett az alternatív NADH dehidrogenáz (*andB*) vizsgálatára is sor került.

A törzsek fenntartása az *A. niger* esetében NIG1 minimál táptalajon történt (6 g/L NaNO<sub>3</sub>, 1,5 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5 g/L MgSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O, 0,5 g/L KCl + 1 % D-glükóz, 20 µl nyomelem oldat (2. táblázat)); a további fajokat PDA (Potato Dextrose Agar) táptalajon növesztettük. Az inkubálás 4-5 napig 27-38 °C-on történt, amit az RNS/DNS izoláláshoz szükséges tenyészetek előkészítése követett, a számukra megfelelő táptalajt használva (2-3. táblázat). A spórákat 0.01 % Tween tartalmazó spóramosó oldattal mostuk, majd az Erlenmeyer-lombikokban sterilizált tápoldathoz adtuk, melyet törzsektől függően 27-38°C-on, 24-48 óráig rázóasztalon (Infors HT Multitron, Basel, Svájc) 200-250 rpm-en (revolution per minute) rázattunk. A kísérletekhez a VWR International Kft. és a Sigma Aldrich analitikai tisztaságú vegyszereit és a VWR International Kft. eszközeit használtuk.

## 2. táblázat Nyomelem oldatok összetétele

<i>A. niger</i> NIG1 táptalaj nyomelemek		<i>P. rubens</i> , <i>A. calidoustus</i> nyomelemek	
EDTA	10 g/L	CaCl <sub>2</sub>	0,1 g/L
ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	4,4 g/L	FeSO <sub>4</sub>	0,1 mg/L
MnCl <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	1,01 g/L	CoCl <sub>2</sub>	1 mg/L
CoCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	0,32 g/L	ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	8,8 mg/L
CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O	0,315 g/L	CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O	0,39 mg/L
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	0,22 g/L	NiSO <sub>4</sub>	0,1 mg/L

CaCl <sub>2</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	1,47 g/L	Na <sub>2</sub> [B <sub>4</sub> O <sub>5</sub> (OH) <sub>4</sub> ] x 8 H <sub>2</sub> O	0,08 mg/L
FeSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	1 g/L	MnCl <sub>2</sub>	0,072 mg/L
		Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	0,037 mg/L

**3. táblázat** Tenyésztéshez alkalmazott táptalajok

<b>Törzs</b>	<b>Tenyésztési táptalaj</b>
<i>A. oryzae</i> <i>T. asperellum</i> <i>A. wentii</i> <i>A. sydowii</i>	PDB (Potato Dextrose Broth) <i>A. oryzae</i> esetében + 1 % Triton X-100 <i>A. sydowii</i> esetében + 2 M NaCl, 2 M MgCl <sub>2</sub>
<i>P. rubens</i> <i>A. calidoustus</i>	2 g/L KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 8 g/L Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,25 g/L MgSO <sub>4</sub> 10 g/L (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 1 % D- glükóz + nyomelem oldat (2. táblázat)
<i>A. terreus</i>	0.1 g/L KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 3 g/L NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 1 g/L MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O 5 g/L CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O 1,67 mg/L FeCl <sub>3</sub> x 6H <sub>2</sub> O 8 mg/L ZnSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O 15 mg/L CuSO <sub>4</sub> x 5H <sub>2</sub> O 60 mM Nátrium-acetát
<i>A. niger</i>	2,5 g/L (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,15 g/L KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,15 g/L NaCl 2,25 g/L MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O 1,50 mg/L Zn <sup>2+</sup> 0,10 mg/L Fe <sup>2+</sup> 0,06 mg/L Cu <sup>2+</sup> 0,05 mg/L Mn <sup>2+</sup> 10 g/L D-glükóz

## 5.4 RNS/DNS izolálás, PCR, szekvencia azonosítás

Az RNS és DNS izoláláshoz a tenyészetek a 5.3 pont alapján lettek leoltva. A biomassza összegyűjtése 3 független tenyészetből (biológiai replikátum) történt, melyeket Miraclon (Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, Németország) való átszűrés után ioncserélt vízzel mostunk, majd azonnal folyékony nitrogénbe mártottunk. A micélium folyékony nitrogénen való feltörését követően a genomi DNS izolálására a Macherey-Nagel NucleoSpin Plant II kit-el került sor, míg az RNS izoláláshoz az RNA Plant kit-et használtuk (Macherey-Nagel GmbH és Co., KG, Düren, Germany).

Az *aox* gének kifejeződésének vizsgálatához a teljes RNS-ből cDNS írására van szükség, ami Oligo(dT) primer használatával a RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit-el történt 42 °C-on, 1 órán keresztül (Thermo Scientific, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). A cDNS és az általunk tervezett génspecifikus primer párok (Integrated DNA Technologies, Leuven, Belgium; 13.2 melléklet) segítségével a megfelelő géneket PCR (Polymerase Chain Reaction) reakcióval szaporítottuk fel, Dream Taq DNS polimerázt (Thermo Scientific, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) használva a T100™ Thermal Cycler PCR készülékben (Bio-Rad, Bio-Rad Hungary Ltd., Budapest, Magyarország).

Az *A. niger aoxB1* mutációk azonosításához genomi DNS-t használtuk. A PCR reakció során a kezdeti DNS denaturációhoz 95 °C-ot 3 percig állítottunk be, amely később körönként 95 °C-ra és 30 mp-re változott. A génszakaszok felszaporítása 30 körben történt meg, a primerek betapadásához 54 °C-ot és 1 percet választottunk az előzetes gradiens PCR alapján, továbbá az elongáció 72 °C-on történt 0,5-1 percig, a fragmensek méretétől függően. A reakció végén 72°C-on, 5 percig poszt-elongáció történt; a PCR termékek ellenőrzése

agaróz gélelektroforézissel valósult meg (SeaKem LE Agarose; Lonza Group Ltd., Basel, Svájc).

Génexpresszió vizsgálata során a reverz transzkripció PCR esetén 35 körben valósult meg a cDNS felszaporítása, ugyanazon paramétereket használva, mint a genomi DNS sokszorosítása során. A különbség mindössze a cDNS mennyiségében volt, melyből 2 µl került bemérésre, 1 µl helyett.

PCR esetében 1,5 % -os agaróz (SeaKem LE Agarose; Lonza Group Ltd., Basel, Svájc) gélt és TAE puffert (Tris-base, Acetic-acid, EDTA), míg RT-PCR termékek ellenőrzéséhez 2 % agarózt és TBE puffert (Tris-base, Boric-acid, EDTA) használtunk.

A tisztított PCR fragmenseket (NucleoSpin Gel & PCR Clean-up, Macherey-Nagel GmbH & Co., KG, Düren, Németország) pGEM-T Easy vektorba klónoztuk (pGEM-T Easy Vector System I, Promega Corporation, Madison, WI, USA), melyek felszaporítása kompetens *E-coli* sejtekben történt (JM109 Mix & Go! Competent Cells, Zymo Research, USA). A plazmid DNS izolálása NucleoSpin Plasmid EasyPure kit-el (Macherey-Nagel GmbH & Co., KG, Düren, Németország) történt, majd 3 független klón kiválasztásával (technikai replikátum) univerzális primerek hibridizációja mellett, mindkét szálát megszekvenáltuk (Eurofins Genomics, Ebersberg, Germany). A szekvenálás eredményeit szekvenciaillesztéssel ellenőriztük a Clustal Omega online programmal (<https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher/msa/clustalo>). A cDNS és genomi DNS szekvenciákat a GenBank adatbázisba töltöttük fel (4-5. táblázat).

4. táblázat Különböző paralógok GenBank kódjai

Fajok	Master kódok	GenBank kódok [cDNA]	
<i>A. terreus</i> NIH 2624	AAJN [GenBank]	<i>aoxA</i>	OR702883
		<i>aoxB2-1</i>	OR702884
<i>A. oryzae</i> RIB40	JZJM [GenBank]	<i>aoxA</i>	OR683635
		<i>aoxB2-1</i>	OR683636
<i>P. rubens</i> ** NRRL 1951	AM920416–64 [EMBL]	<i>aoxA</i>	OR702887
	JAQKAF [GenBank]	<i>aoxB2-1</i>	OR702888
<i>A. wentii</i> DTO 134E9	LJSE [GenBank]	<i>aoxA</i>	OR702885
		<i>aoxB3</i>	OR702886
<i>A. calidoustus</i> SF006504	CDMC [GenBank]	<i>aoxA</i>	OR714815
		<i>aoxB1</i>	OR631741
		<i>aoxB4</i>	OR631740
<i>A. sydowii</i> CBS 593.65	MRCH [GenBank]	<i>aoxA</i>	OR702890
		<i>aoxB2-1</i>	OR702889
		<i>aoxB3</i>	OR702891
<i>T. asperellum</i> CBS 433.97	MBGH [GenBank]	<i>aoxA</i>	OR683637
		<i>aoxB2-2</i>	OR683638
<i>A. niger</i> ATCC 1015	ACJE01 [GenBank]	<i>aoxB1</i>	OQ686795
		<i>andB</i>	OQ689783

## 5. táblázat *aoxB1* génallélok GenBank kódjai

<i>A. niger</i> törzs	Genom Master Kódok	Génallél	GenBank Kódok
ATCC 1015	ACJE01	I. allél – vad típus	OQ606865
CBS 554.65	JAGRPH01	II. allél – delécio	OQ590013
CBS 147343	JAKJMC01	III. allél – transzpozon	OQ633014
CBS 630.78	JAKLX01	V. allél - framshift	OQ633015
CBS 769.97	JAKJMK01	VI. allél – framshift + nonsense	OQ633016

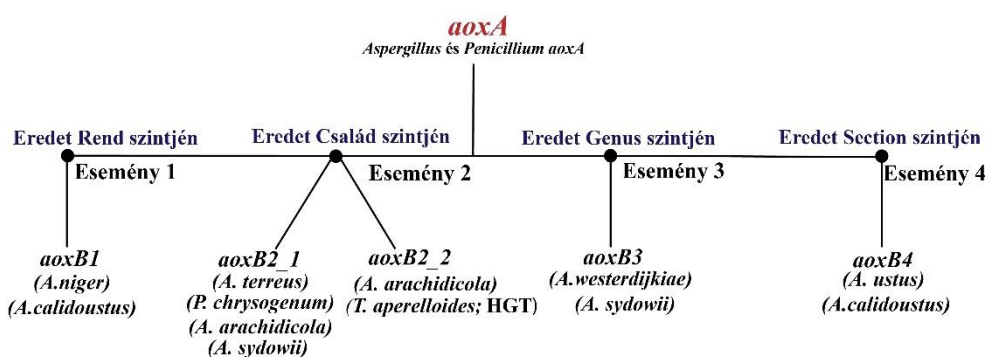
### 5.5 Génexpresszió vizsgálata SRA adatokból

A génexpresszió bizonyításához több törzs esetében az NCBI adatbázisában található Sequence Read Archives (SRAs) adatokat használtuk, melyek megerősítik az intronok kivágódását. A BLAST során 60 nukleotid hosszúságú szekvenciákat alkalmaztunk, melyek két exon fúzióját tartalmazzák. Csak a legalább 98 %-ban azonos SRA adatokat használtuk fel.

## 6. Eredmények

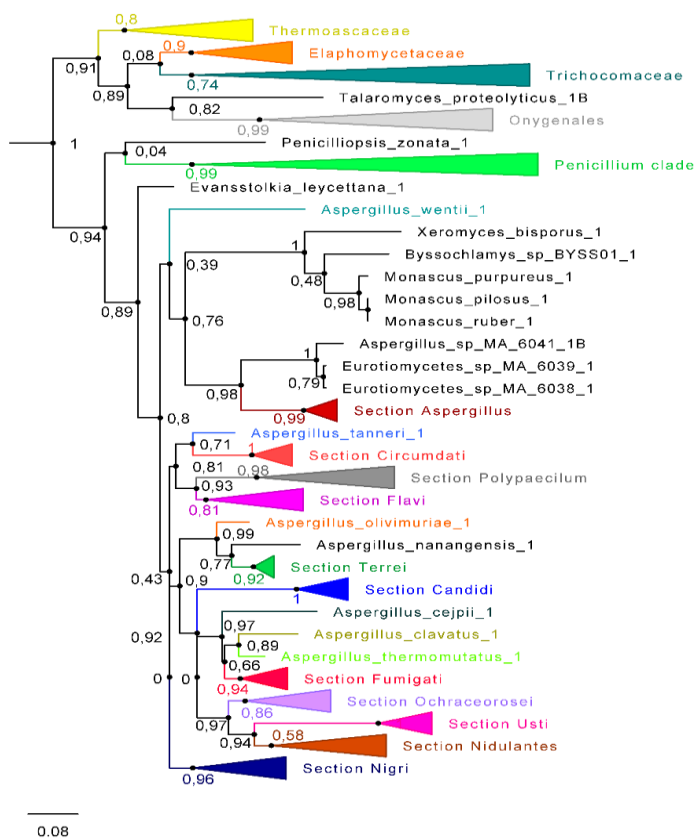
### 6.1 Az *Aspergillaceae* *aox* gén paralógjainak kialakulása

Az *Aspergillus* és *Penicillium* nemzetségek *aox* paralógjaihoz köthető duplikációs események vizsgálata során 531 *aox* génszekvenciát gyűjtöttünk össze az adatbázisokból. A gének 351 fajtól származnak, melyek az *Eurotiomycetidae* alosztályba tartoznak, továbbá külső, független csoportként a *Lecanomyces* bizonyos tagjait választottuk kutatásunkhoz. Az intronok manuális meghatározása és fehérje dedukció után Maximum Likelihood filogenetikai fát hoztunk létre, melyet az említett *Lecanomyces* fajok AoxA (AoxA a minden faj esetében jelenlévő elsődleges Aox fehérje) proteinjeivel gyökerezítettünk (Mellékletek 13.6). A fa vázát a 351 faj AoxA fehérjéje adja, amikhez bizonyos pontokon az AoxB (paralóg, másodlagos vagy akár harmadlagos Aox, melyek duplikációval jöttek létre) fehérjék is bekapcsolódnak. A paralógok helyzete 4 különböző duplikációs eseményre utalnak, melyek eltérő időben alakultak ki és bizonyos fajokra/csoportokra jellemzőek. Sematikus összefoglalásuk a 3. ábrán látható.



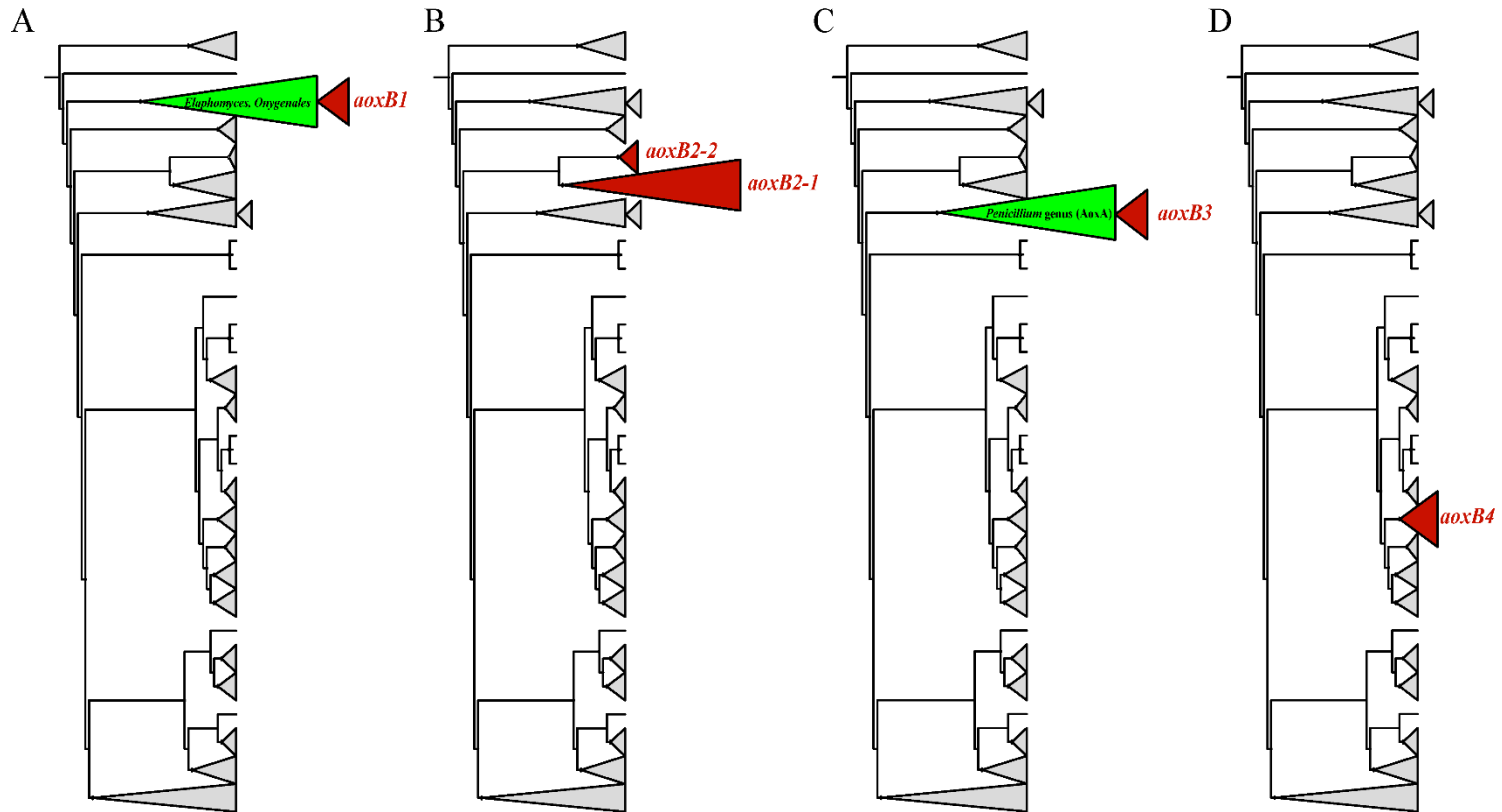
3. ábra *aox* gén duplikációk eredete

A duplikációs eseményekkel keletkezett paralógokat „B” jelzéssel láttuk el, továbbá számokkal jelöltük attól függően, hogy mikor jöttek létre. Bizonyos fajok többször is megszerezték az adott gént, például a Karib-tenger korallzátonyait aszpergillózással fertőző *A. sydowii* (Soler-Hurtado és mtsai., 2016), mely a mindenhol jelenlévő *aoxA* gén mellett az *aoxB2-1* és *aoxB3* géneket is tartalmazza. Természetesen az evolúció során a gének elvesztése is megtörtént, amire bizonyíték, hogy teljes *Aspergillus* szekciókból hiányoznak a duplikátumok. A 4. ábra a mindenhol jelenlévő Aox fehérjékből alkotott filogenetikai fát ábrázolja, melyhez a pontosabb eredmények elérése érdekében az első analízis után egyesével adtuk hozzá azokat az Aox fehérjét melyek a négy különböző csoportot alkotják.



4. ábra AoxA filogenetikai fa

A könnyebb megértés érdekében a különböző duplikációs események AoxA filogenetikai fán történő elhelyezkedését az 5. ábra cladogramjain mutatom be. A cladogram pontos evolúciós kapcsolatokat nem szemléltet, viszont a duplikációs események helye jól látható. Az, hogy a paralógok milyen hasonlóságot mutatnak akár egymáshoz képest akár az AoxA proteinnel, többszörös szekvencia illesztéssel állapítható meg. Az AoxA aminosav szekvenciák erősebben konzerváltak, mint a paralógok, melyekre nagyobb genetikai variabilitás jellemző. Az AoxA esetében az *A. terreus*, *P. chrysogenum*, *A. calidoustus* és *A. sydowii* fajok aminosav szekvenciáit hasonlítottuk össze, mely a különböző szekciók fajai között bizonyítja a szekvenciák nagy hasonlóságát (6-7. ábra). A paralógok esetén az *A. sydowii* és *A. calidoustus* AoxB proteinjeit választottuk, mivel a két faj három-három *aox* génnel rendelkezik, amelyek különböző duplikációs eseményekből származnak. Az összehasonlítást a második exon tirozin (Y) kodonjától kezdtük, mivel a fehérje N-terminális részén mitokondriális szignál található, ami nagyfokú eltérést mutat az Aox fehérjék között. A megegyező aminosavakat fekete háttérrel jelöltük. A pontos hasonlóságot a Mellékletek 13.3 fejezete tartalmazza.



**5. ábra** A különböző duplikációs események által kialakított paralógok elhelyezkedése az *aoxA* filogenetikai fán. A= *aoxB1* eredete az *Aspergillaceae* családon kívül. B= *aoxB2-1* és *aoxB2-2* elhelyezkedése. *aoxB3*= *Penicillium* nemzetségen belüli származás. *aoxB4*= *Ustiliciniaceae* szekcióra jellemző, legkésőbb bekövetkezett duplikációs esemény

```

P_chrys.A YTEEQMOSICAHROIANWSDWIALGTVRFFRWGMDIATGYKHKPKGEQLPARFMTEHKWLNRFVFLSESAGVPGMVGMLRHLRSLRMRKRDNGWIEITLLEAFNERMHLITFLKLAEPGFWMRLMVLGAQGVFFN
A_calido.A YTEEQMLSVKVGHRDAKDWSDWVALGAVRVLRWGMDIATGYKHPTPGQENNPRFMTEKMWLNRFVFLSESAGVPGMVGGLRHLRSLRMRKRDNGWIEITLLEAFNERMHLITFLKLAEPGFWMRLMVLGAQGVFFN
A_sydowii_A YTEEQMHRVTVGHREAKNWSWVALGAVRVLRWGMDIATGYKHPTPGKEHEMKFRMTEQKWLNRFVFLSESAGVPGMVGMLRHLRSLRMRKRDNGWIEITLLEAFNERMHLITFLKLAEPGFWMRLMVLGAQGVFFN
A_terreus_A YTEEQMRQVLAHREAKNWSWVALGTVRMLRWGMDIATGYRHPPGKENDVRFMTEQKWLNRFVFLSESAGVPGMVGMLRHLRSLRMRKRDNGWIEITLLEAFNERMHLITFLKLAEPGFWMRLMVLGAQGVFFN

P_chrys.A GFFLSYLVSPRICHRFVGYLEEEAVITYTRAIELEAGNLPEKDLDAPEIAIKYQWMPGKQRMKDLLLYTRADEAKHREVNHTLGNLQADPNPYQLEAYALSVSHPIKGIINLPEGWQRNLFMGKARTEKS
A_calido.A GFFLSYLVSPRICHRFVGYLEEEAVITYTRAIDLEQGNLPEKWTSEKAPEIAIQYWKMPGHCOTKDLLLYTRADEAKHREVNHTLGNLQVADPNPEAVQYKDEAKPYEGKGLATLKTGWEREDEVII-----
A_sydowii_A GFFLSYLVSEQICHRFVGYLEEEAVITYTRAIKDLEAGRLPGWEALEAECIAIQYWKMPESNRTMKDLLLYTRADEAKHREVNHTLGNLQQAADPNPYSVKIKDPAKSHPGKGLSDLKTGWEREDEVV-----
A_terreus_A GFFLSYLVSPRICHRFVGYLEEEAVITYTRAIKDLENGNLPEKKEAPEIAIQYWKMPGKRTMKDLLLYTRADEAKHREVNHTLGNLQQAADPNPYTSKYKDESKPHSRGMENLKTGWERDEVII-----

```

6. ábra AoxA szekvenciaillesztés a *P. chrysogenum*, *A. calidoustus*, *A. sydowii*, *A. terreus* fajok között

```

syd.B2_1 YTEEQMOSICAHROIANWSDWIALGTVRFFRWGMDIATGYRHSNFASS---TNNTMTEKKWTRFIFLESVAGVPGMVGMLRHLRSLRMRKRDNGWIEITLLEBAYNERMHLITFLKLAEPGRSMRFLMVLGSGQCV
calid.B1 YTEEQMOSICAHROIANWSDWIALGTVRFFRWGMDIATGYRHSNFASS---TNNTMTEKKWTRFIFLESVAGVPGMVGMLRHLRSLRMRKRDNGWIEITLLEBAYNERMHLITFLKLAEPGRSMRFLMVLGSGQCV
syd.B3 YTEEQMOSICAHROIANWSDWIALGTVRFFRWGMDIATGYRHSNFASS---TNNTMTEKKWTRFIFLESVAGVPGMVGMLRHLRSLRMRKRDNGWIEITLLEBAYNERMHLITFLKLAEPGRSMRFLMVLGSGQCV
calid.A YTEEQMLSVKVGHRDAKDWSDWVALGAVRVLRWGMDIATGYKHPTPGQENNPRFMTEKMWLNRFVFLSESAGVPGMVGGLRHLRSLRMRKRDNGWIEITLLEAFNERMHLITFLKLAEPGFWMRLMVLGAQGVFFN
syd.A YTEEQMHRVTVGHREAKNWSWVALGAVRVLRWGMDIATGYKHPTPGKEHEMKFRMTEQKWLNRFVFLSESAGVPGMVGMLRHLRSLRMRKRDNGWIEITLLEBAYNERMHLITFLKLAEPGFWMRLMVLGAQGVFFN
calid.B4 YTEEQMRQVLAHREAKNWSWVALGTVRMLRWGMDIATGYRHPPGKENDVRFMTEQKWLNRFVFLSESAGVPGMVGMLRHLRSLRMRKRDNGWIEITLLEBAYNERMHLITFLKLAEPGFWMRLMVLGAQGVFFN

syd.B2_1 FFNGFVLSYLSPRICHRFVGYLEEEAVITYTRAIDLEQGNLPEKWTSEKAPEIAIQYWKMPGHCOTKDLLLYTRADEAKHREVNHTLGNLQVADPNPEAVQYKDEAKPYEGKGLATLKTGWEREDEVII-----
calid.B1 FFNGFVLSYLSPRICHRFVGYLEEEAVITYTRAIDLEQGNLPEKWTSEKAPEIAIQYWKMPGHCOTKDLLLYTRADEAKHREVNHTLGNLQVADPNPEAVQYKDEAKPYEGKGLATLKTGWEREDEVII-----
syd.B3 FFNGFVLSYLSPRICHRFVGYLEEEAVITYTRAIDLEQGNLPEKWTSEKAPEIAIQYWKMPGHCOTKDLLLYTRADEAKHREVNHTLGNLQVADPNPEAVQYKDEAKPYEGKGLATLKTGWEREDEVII-----
calid.A FFNGFVLSYLSPRICHRFVGYLEEEAVITYTRAIDLEQGNLPEKWTSEKAPEIAIQYWKMPGHCOTKDLLLYTRADEAKHREVNHTLGNLQVADPNPEAVQYKDEAKPYEGKGLATLKTGWEREDEVII-----
syd.A FFNGFVLSYVSEQICHRFVGYLEEEAVITYTRAIKDLEAGRLPGWEALEAECIAIQYWKMPESNRTMKDLLLYTRADEAKHREVNHTLGNLQQAADPNPYSVKIKDPAKSHPGKGLSDLKTGWEREDEVV-----
calid.B4 FFNGFVLSYVSPRICHRFVGYLEEEAVITYTRAIKDLEAGRLPGWEALEAECIAIQYWKMPGKRTMKDLLLYTRADEAKHREVNHTLGNLQQAADPNPYTSKYKDESKPHSRGMENLKTGWERDEVII-----

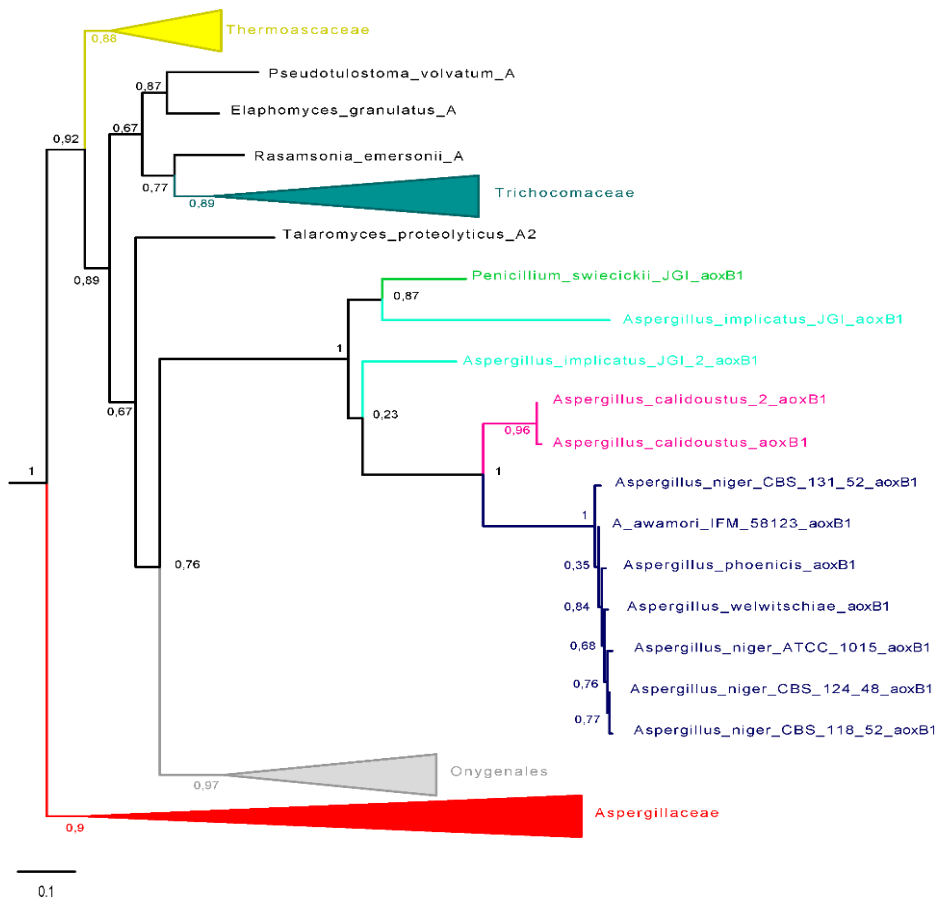
```

7. ábra Paralógok szekvenciaillesztése. Sorban: *A. sydowii\_B2-1*, *A. calidosutus\_B1*, *A. sydowii\_B3*, *A. calidoustus\_A*, *A. sydowii\_A*, *A. calidosutus\_B4*

Az AoxA konzervitását alátámasztja a több mint 70 %-os aminosav szekvencia egyezés. A szekvenciák hasonlósága adja meg a paralógok helyzetét a filogenetikai fán: azon AoxA fehérjékhez kapcsolódnak, melyekhez leginkább hasonlítanak, így ebből levonhatóak a következtetések. Minél jobban hasonlít egy szekvencia az eredeti génhez, az evolúció során annál később történt meg a duplikáció.

### 6.1.1 *aoxB1* paralóg eredete

Az első, összes paralógot tartalmazó elemzés után csak az AoxB1 csoportba tartozó fehérjéket adtuk az AoxA-t tartalmazó fához (8. ábra).



8. ábra *aoxB1* filogenetikai fája

Mindösszesen 4 különböző faj szerezte meg ezzel az eseménnyel a második alternatív oxidázát: *P. swiecickii*, *A. calidoustus*, *A. implicatus*, *A. niger*. A 75 vizsgált *A. niger* törzsek magukba foglalják az *A. niger sensu stricto* komplexet, és azok testvérfajait, az *A. awamori* és *A. welwitschiae* törzseket. A filogenetikai fán a könnyebb átláthatóság érdekében a duplikációs eseményt nem érintő családokat (*Aspergillaceae*, *Trichocomaceae*, *Thermoascaceae*) összevontuk, amiket a különböző háromszögek jelölnek. Már ebből is jól látható, hogy ez a meglehetősen ritka esemény nem az *Aspergillaceae* családdal van kapcsolatban: a duplikátumok az *Onygenales* rend ágáról származtathatóak. Az *Eurotiales* rend többi családjához közelebbi rokonságban áll, viszont ezek a fajok nem rendelkeznek második *aox* génnel, csak úgy, mint az *Onygenales* rend tagjai. Feltehetőleg egy horizontális géntranszfer eredménye lehet az *aoxB1*, mely az *Onygenales* egyik faja és az említett négy *Aspergillaceae* családba tartozó egyedek között valósult meg, és melynek pontos ideje nem határozható meg az általunk alkalmazott módszerekkel. Az *aoxB1* tehát nem az első duplikációs eseménynek számít, az egyes jelző mindössze arra utal, hogy a többi duplikációval ellentétben nem az *Aspergillaceae* családhoz köthető az eredete.

### **6.1.2 *aoxB2-1*; *aoxB2-2* paralóg eredete**

Az 531 vizsgált protein közül csaknem 100 paralóg származik ezen duplikációs esemény következtében, ami valószínűleg az *Aspergillaceae* családban az *Aspergillus* és *Penicillium* nemzetségek szétválása előtt történt (9. ábra). A legtöbb *Penicillium* így szerezte meg a második *aox* gént, csak néhány faj rendelkezik csak *aoxA*-val, vagy egyéb *aox* paralóggal. Mivel ősi génduplikációs eseményről van szó, a mainál több taxon is tartalmazhatta, bár így is számos *Aspergillus* szekció rendelkezik vele, mint a *Flavi*, *Terrei* vagy *Candidi* fajok. A *Fumigati*, *Nigri*, *Circumdati*, *Usti* fajaiból hiányzik, továbbá

a *Nidulantes* szekció legtöbb alszekciójából, kivéve a *Versicolores*-t, melyben fent maradt az *aoxB2-1* paralóg. A *Flavi* szekció tagjainak *aoxA* génjében a második intron elvesztését tapasztaltuk. Az *Aspergillus* szekció bizonyos tagjai rendelkeznek a szóban forgó paralóggal, míg másoknak csak *aoxA* génjük van, viszont az *A. cristatus* esetében pseudogénként azonosítottuk az *aoxB2-1*-et.



9. ábra *aoxB2-1* és *aoxB2-2* filogenetikai fája, sárga háttérrel kiemelve a paralógok elhelyezkedését

A filogenetikai fán sárga háttérrel jelöltem a paralógok helyzetét. Jól látható, hogy az *aoxB1*-gyel ellentétben a *B2* az *Aspergillaceae* család *aoxA*-tól származik, a hosszabb ágak a nagyobb genetikai változékonyságot jelzik. *A. terreus* esetében például 66,16 %-os egyezés mutatkozik az eredeti és a paralóg gén között.

Az eddig taglalt *aoxB2-1* mellett viszont észrevehető egy kisebb csoport is, melynek az *aoxB2-2* nevet adtuk. Mindössze három *Aspergillus* fajban van jelen: *A. caelatus*, *A. bombycis*, *A. arachidicola* (*Flavi* szekció), további három *Flavi*-ban pedig erősen degenerált proteint találtunk. Szekvenciák hiányában pontosan nem tudjuk meghatározni, hogy párhuzamosan jött létre az *aoxA*-ból, vagy az *aoxB2-1* génből ered, viszont azok a fajok, melyek tartalmazzák, rendelkeznek *aoxB2-1* paralóggal is. A különbségek egy szekción belül arra engednek következtetni, hogy a legtöbben elvesztették az *aoxB2-2* gént, és az *aoxB2-1*-et tartották meg.

### **6.1.3 Horizontális géntranszfer két különböző taxonómiai csoportba tartozó faj között**

Egy paralóg gén megszerzése ritkábban ugyan, de történhet horizontális vagy laterális transzferrel is, mely két különböző gombafaj, vagy akár baktérium és gomba között is előfordulhat. A 10. ábrán látható, hogy az *aoxB2-2* csoportba nem csak a *Flavi* szekció néhány tagja tartozik, hanem a *T. asperellum* és *T. asperelloides* rejtett fajok is („cryptic species”, melyek nagyon hasonlóak, de genetikailag nem azonosak; Samuels és mtsai., 2010). A *Trichoderma* fajok a *Hypocreaceae* család tagjai, melyek *aox* génjének kódoló részét két phase-zero intron szakítja meg (10. ábra), a középső exon mérete 399 nukleotid, továbbá nem rendelkeznek második *aox* génnel. Az intronokat fázisok szerint három csoportba osztjuk, attól függően, hogy hogyan szakítják meg a kodont. A phase-zero intron nem szakítja meg, a phase-one a kodon első bázisa után, a

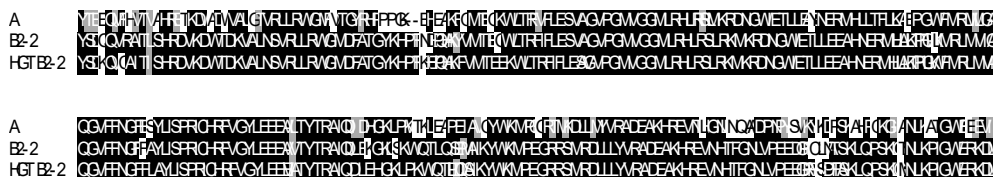
phase-two pedig a kodon második bázisa után épül be (Rogozin és mtsai., 2012).

Ezzel ellentétben *T. asperellum/asperelloides* genomja tartalmaz *aoxB* gént, amit az NCBI adatbázisában fellelhető mind a 12 szekvenciában megtaláltunk.



**10. ábra** Intron pozíciók a *T. asperellum* és *A. arachidicola* fajokban. Piros színnel a *T. asperellum* *aoxA* gén phase-zero intronjait, míg zölddel az *A. arachidicola* *aoxA* és *aoxB2-2* gének phase-two és a *T. asperellum* HGT-vel szerzett *aoxB2-2* phase-two intronjait jelöltük

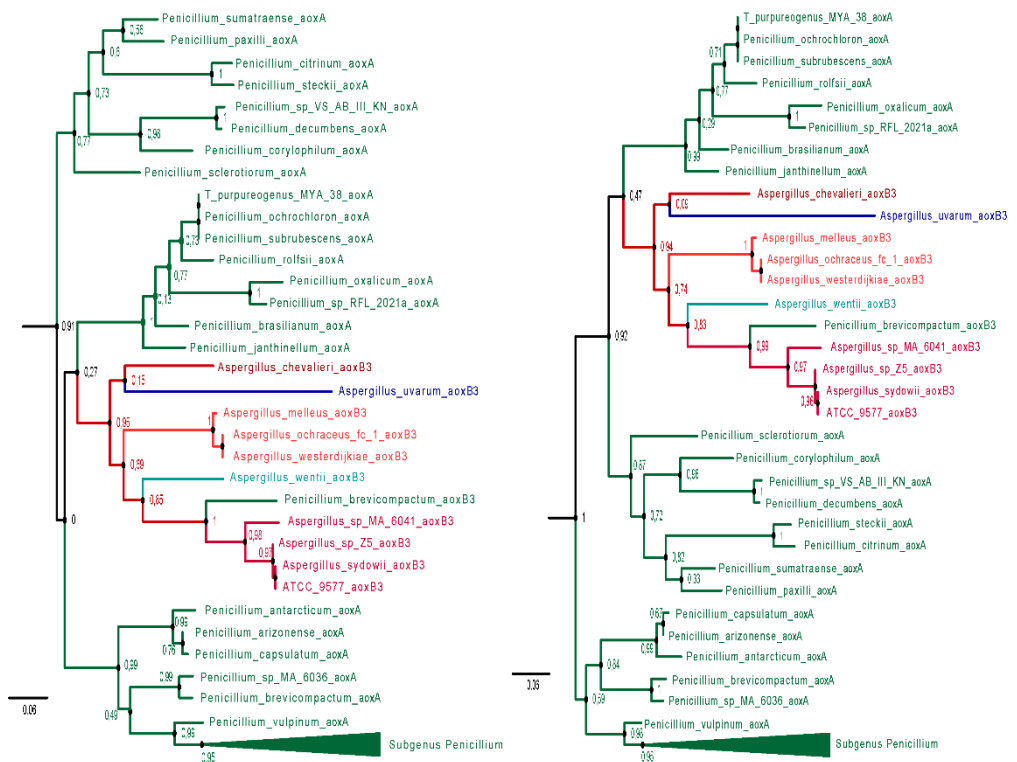
Ráadásul a génstruktúrája megegyezik az *Aspergillus* és *Penicillium* fajokban lévő paralóggal: kettő phase-two intron, köztük 297 nukleotidból álló exonnal. A *T. asperellum/asperelloides* második *aox* génje a legnagyobb hasonlóságot az *A. arachidicola* *aoxB2-2* génjével mutatja. A teljes fehérje szekvenciájuk 86 %-ban azonos, mitokondriális szignál nélkül ez 93 %-ra nő. A 11. ábrán látható szekvenciák közül az első sor az *A. arachidicola* AoxA fehérjéje, a második az AoxB2-2 (köztük az egyezés 71,8 %), az utolsó pedig a *T. asperellum* AoxB2-2 fehérje.

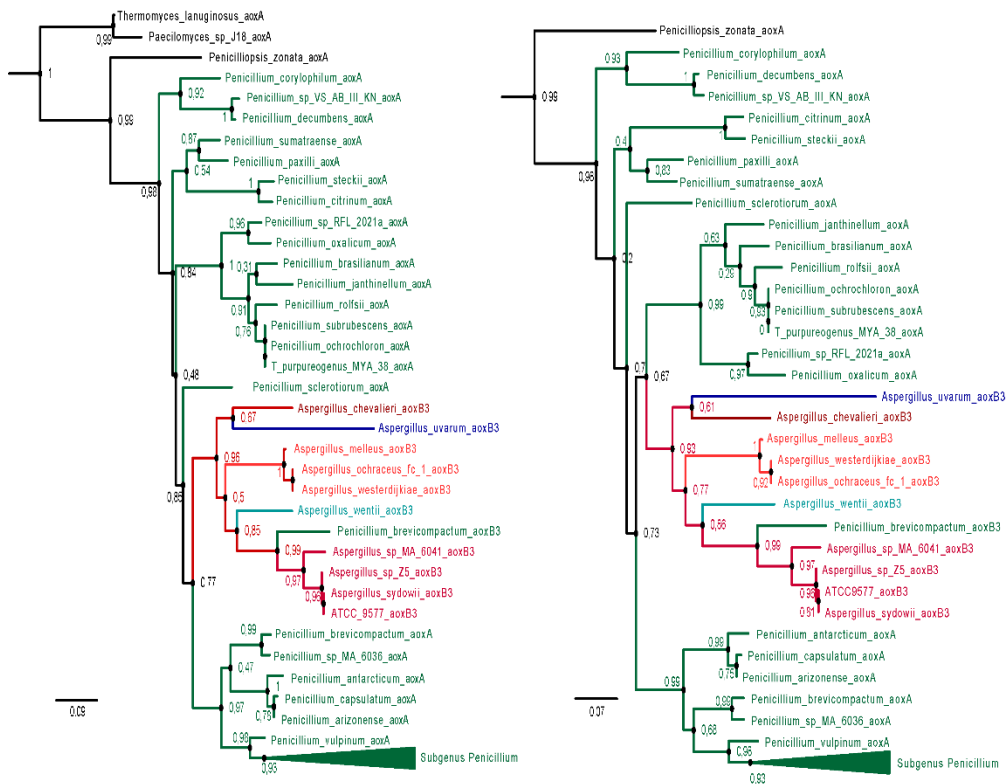


**11. ábra** *T. asperellum* és *A. arachidicola* *aoxB2-2* alignment. A fekete háttér a génekben megegyező nukleotidokat jelöli

### 6.1.4 *aoxB3* – *Penicillium* nemzetségben született génduplikáció

A harmadik duplikációs eseménnyel létrejött *aoxB3* paralóg tíz *Aspergillus* és egy *Penicillium* faj genomjában maradt fent (12. ábra). Az *Aspergillus* fajok öt különböző szekcióból származnak, viszont nem található meg minden fajban az adott szekción belül. A *Circumdati* szekcióban három faj rendelkezik vele (NCBI adatbázisban elérhető fajok): *A. melleus*, *A. weterdijkiae*, *A. ochraceus*, viszont három másik faj nem tartalmazza. A népesnek számító *Nigri* szekcióban mindössze az *A. uvarum*, míg a *Nidulantes*-ek közül is csak két faj, az *A. sydowii* és *A. versicolor* rendelkezik *aoxB3* génnel. Azonban a *Versicolor* alszekció néhány tagjának (*A. jensenii*, *A. tennesseensis* és *A. creber*) genomjában található egy maradvány az *aoxB3* génből, mely arra enged következtetni, hogy a többi *Versicolores* faj is rendelkezett vele, de az idők folyamán elvesztették azt.





12. ábra *aoxB3* paralógok lehetséges helyzetei

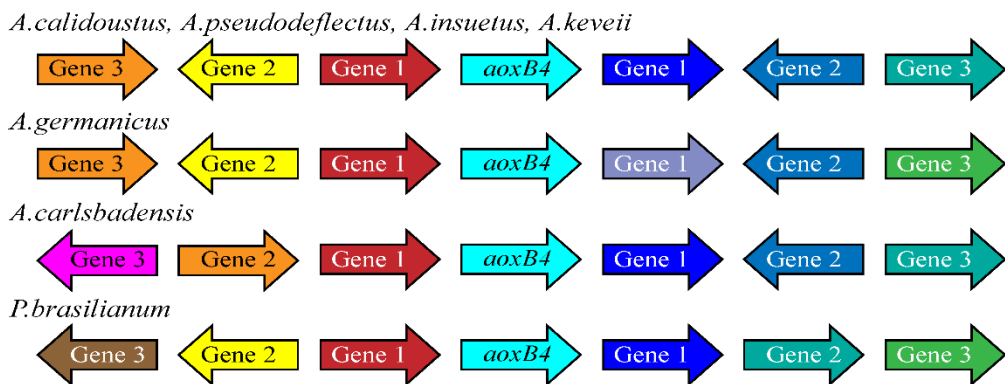
A filogenetikai analízisben részt vevő fehérjék számának változtatásával négy különböző filogenetikai fát kaptunk, melyek az *aoxB3* paralóg lehetséges eredetét szemléltetik. A fák csak azokat a *Penicillium* fajokat tartalmazzák, melyek közvetlenül kapcsolódnak az általunk vizsgált duplikátumhoz: a *Penicillium* alnemzetség további fajait összehúztuk, az *Aspergillus*-okat pedig eltávolítottuk ebben az esetben.

Valószínűsíthetőleg az *aoxB3* paralóg egy *Penicillium* fajtól származik, az esemény ideje már az *Aspergillus*-ok és *Penicillium*-ok elválása utánra tehető, és teljesen független a már tárgyalt *aoxB2-1* duplikációtól. A különböző filogenetikai fák vagy a *Penicillium* alnemzetségből, vagy az *Asperelloides* alnemzetségből való eredetet támasztják alá, így teljesen pontos képet nem tudunk alkotni a gén eredetéről. Viszont a különböző kapcsolódási pontok arra

engednek következtetni, hogy az esemény a két alnemzetség szétválásának az időpontja körül történt. Az biztos, hogy a gén egy közös *Penicillium* őstől származik laterális transzfer által, majd vertikálisan öröklődött tovább néhány *Aspergillus* szekcióban, viszont az idők folyamán a legtöbb faj elvesztette. A *P. brevicompactum* esetében egy másodlagos laterális transzfer állhat a háttérben, ahol egy *Aspergillus* faj adhatta át az *aoxB3* gént.

### **6.1.5 *aoxB4* – az Usti szekcióra jellemző paralóg**

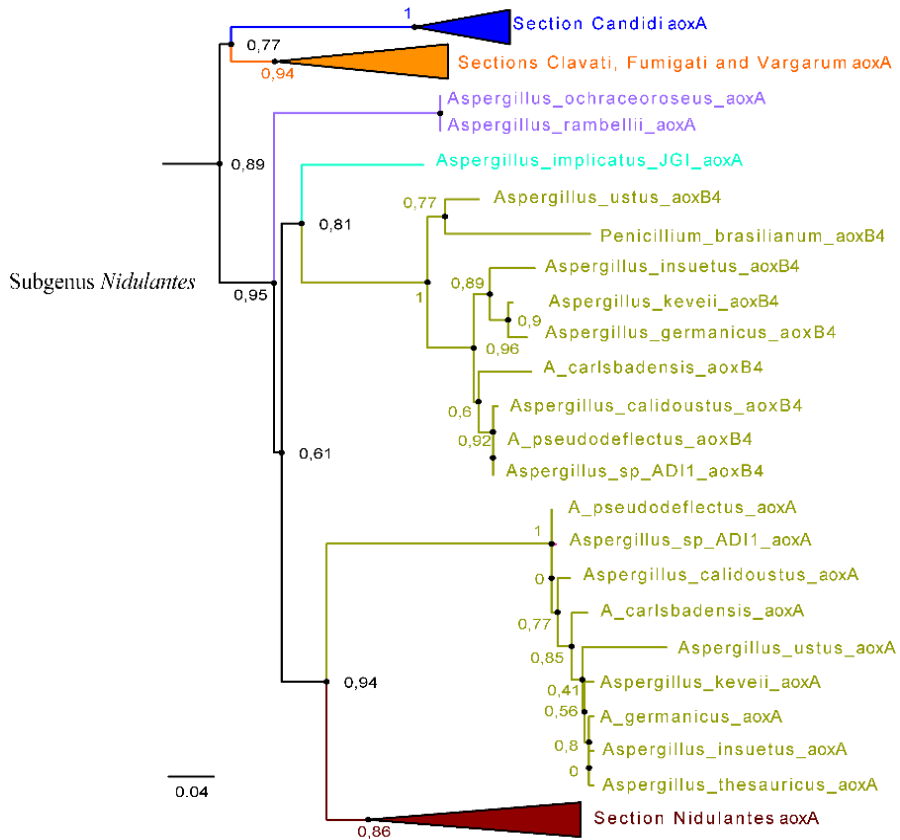
Az *aoxB4* gént létrehozó duplikációs esemény egyedül az *Aspergillus* nemzetség *Usti* szekciójában történt, továbbá a *P. brasilianum* is ugyanezzel a génnel rendelkezik. Mivel csak egy szekción belüli történésről van szó, arra következtethetünk, hogy a „közelmúltban” valósult meg a gén megkettőződése, feltehetőleg az *Usti* és *Ochraceorosei* szekciók szétválása után, körülbelül 40-50 millió évvel ezelőtt (az *Aspergillus* és *Penicillium* nemzetségek szétválása 94 millió évvel ezelőttre tehető; Steenwyk és mtsai., 2019). Az említettekre további bizonyíték néhány faj *aoxB4* környezetének vizsgálata, ami során a legtöbb esetben ugyanazokat a génszomszédokat találtuk (13. ábra). Ennek egy lehetséges magyarázata, hogy a génnek „nem volt még ideje” mozogni a genomban, ezért a környezete megegyezik minden fajban, ahol megtörtént az adott esemény.



**13. ábra** *aoxB4* szomszédos génjei. A nyilak iránya a gének orientációját, míg az azonos színek a homológ géneket jelölik

A 13. ábrán az ugyanazon funkciókat ellátó fehérjéket kódoló géneket ugyanazon színekkel jelöltük, ami jól szemlélteti a hasonlóságot különböző fajok között. A korábbi duplikációs eseményeknél a gén környezetének ilyen szintű hasonlósága nem volt megfigyelhető, ami azok ősbibb eredetére utal.

A filogenetikai fából (14. ábra) jelen esetben is a számunkra informatív részt emeltük ki. A *Nidulantes* alnemzetség más fajaiban valószínűleg nem történt meg a duplikációs esemény, viszont egy *Penicillium* faj tartalmazza. A *P. brasilianum* valószínűleg horizontális transzferrel kapta valamilyen *Usti* fajtól, az *aoxB4* duplikáció bekövetkezése után, viszont a szomszédos gének vizsgálatánál látszik, hogy egy nagyobb genomszakasz átvitele történt. A géntszferre a csaknem 90 %-os aminosav szekvencia egyezés (mitokondriális szignál nélkül) is egyértelmű bizonyíték.



14. ábra *aoxB4* filogenetikai fája, csak az Usti szekciót kiemelve

Érdekes megfigyelés, hogy az *aoxB4* gént tartalmazó fajok esetében az *aoxA* gén egy harmadik intront szerzett az evolúció során, ami a *Nidulantes*-ekre nem jellemző phase-zero típusú intron.

## 6.2 *aox* paralóg gének expressziója

Növények esetében jól tanulmányozott, hogy a különböző paralógok vagy együtt fejeződnek ki az *aoxA* génnel, vagy adott életkörülménytől függően a megfelelő metabolikus aktivitásra vagy stresszválaszra reagálva fejeződnek ki. Az *Aspergillus* és *Penicillium* nemzetség fajaiban előfordul akár három *aox* gén jelenléte is, így ezekből a fajokból, továbbá a két *aox* gént tartalmazókból

kiválasztottunk hetet, hogy a génexpressziót laboratóriumi körülmények között vizsgáljuk meg, hogy valóban történik-e kifejeződés. Ezt megelőzően SRA adatokkal próbáltunk bizonyítékot találni az RNS splicing eseményre (Melléklet 13.2). Az exon-exon fúziók minden vizsgált *aox* génben azonosíthatóak az adott fajspecifikus SRA adatbázisban, ami arra enged következtetni, hogy a vizsgált fajokon belül egyidőben fejeződnek ki az *aox* gének. Az SRA adatokat szekvenálással támasztottuk alá, a cDNS szekvenciákat a GenBank adatbázisába töltöttük fel, melyek kódjai a 4. táblázatban találhatóak.

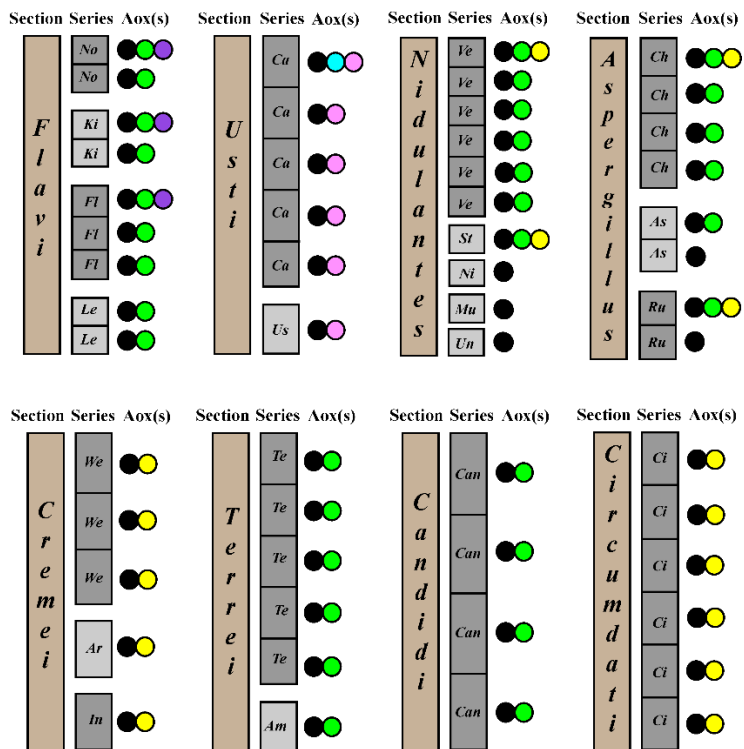
### **6.3 *aoxB* génvesztés az *Aspergillus* nemzetségben**

Az *aoxA* gén minden *Aspergillus* és *Penicillium* fajban jelen van, nincs arra példa, hogy a gén törlődött volna a genomból és/vagy egy paralóg átvette volna szerepét. A génduplikációval létrejött gének sorsa viszont többféleképpen alakulhat. A korábbiakban már említettük, hogy az *aoxB2-1*-hez köthető esemény még azelőtt történt, mielőtt a két testvér nemzetség (*Aspergillus-Penicillium*) szétvált volna, továbbá azt, hogy nagyszámú fajban történt meg a duplikáció. Ezáltal arra következtethetünk, hogy az evolúció során az új fajok mindegyike megörökölte vertikálisan az *aoxB2-1* gént, viszont (analízisünk szerint) a 351 fajból csak körülbelül 100 tartalmazza. Az *aoxB2-2* esetében a *Flavi* szekció több tagjában találtunk protein maradványokat, így évmilliókkal ezelőtt ez a gén is elterjedtebb lehetett. Az *aoxB3* egy *Penicillium* faj *aoxA* génjéből származhat, ami különböző alnemzetségekben jelent meg, így valószínűleg egy közös őstől öröklődhetett tovább, bár jelenleg csak néhány faj rendelkezik vele.

A génvesztés folyamata része az evolúciónak, az adott sejt/szervezet, ha nem veszi hasznát a génduplikációval létrejött génnek, elveszíti azt. Az

*Aspergillus* nemzetség génvesztési folyamatához kibővítettük keresésünket és olyan fajok *aox* génjeit is megvizsgáltuk, melyeket a filogenetikai analízisünk nem tartalmazott (JGI proposal ID: 1307 – *Aspergillus* whole-genus sequencing project). A különböző szekciók és azon belül alszekciók génvesztési mintázata a 15. ábrán láthatóak.

A *Flavi* szekció esetében a már korábban taglalt génvesztés jól alátámasztható a 15. ábrával: az *aoxB2-2* három alszekciójának egy-egy fájában megvan a mai napig, míg ugyanezen alszekciók más tagjai elvesztették azokat. Az *Aspergillus* szekció néhány tagja még rendelkezik az *aoxB3* duplikációval, viszont az *Aspergillus* és *Rubri* alszekció fajaiban már az *aoxB2-1* elvesztése is megtörtént, így már csak az *aoxA* génnel rendelkeznek. Hasonló génvesztési mintázat figyelhető meg a *Nidulantes* szekció esetében is, ahol a *Nidulantes* és *Stellati* alszekcióban található egy-egy faj, melyek három *aox* gént is birtokolnak. A *Cremeri* és *Circumdati* szekciók több fájában is találtunk *aoxB3* gént, viszont többen csak *aoxA*-val rendelkeznek, az *aoxB2-1* mellett tehát újabb gént szereztek, azonban az előbbit elvesztették (a 15. ábra nem tartalmazza ezeket a fajokat). Ezzel szemben a *Flavi*, *Terrei* és *Candidi* szekciók, melyek a *Circumdati* szekcióval együtt a *Circumdati* alnemzetségbe tartoznak, az *aoxB3* helyett az *aoxB2-1* paralogot tartották meg, míg az *aoxB3* eltűnt a genomból.



**15. ábra** *aoxB* génvesztés *Aspergillus*-okban. A pöttyök a különböző duplikációs eseménnyel létrejött *aox* paralógokat jelölik: fekete=*aoxB1*; kék=*aoxB2-1*; lila=*aoxB2-2*; sárga=*aoxB3*; magenta=*aoxB4*. Alszekciók rövidítései: No: *Nomiarum*; Ki: *Kitamyces*; Fl: *Flavi*; Le: *Leporum*; Ca: *Calidoustii*; Us: *Usti*; Ve: *Versicolores*; St: *Stellati*; Ni: *Nidulantes*; Mu: *Multicolores*; Un: *Unguium*; Ch: *Chevalierorum*; As: *Aspergillus (series)*; Ru: *Rubri*; We: *Wentiorum*; Ar: *Arxiorum*; In: *Inflati*; Te: *Terrei*; Am: *Ambigui*; Can: *Candidi*; Ci: *Circumdati*

A *Nidulantes* alnemzetségben (*Nidulantes*, *Usti*, *Ochraceorosei*) bonyolultabb génvesztési események következtek be, melyet a 16. ábra szemléltet. Az *aoxB2-1* és *aoxB3* gén az alnemzetség egy közös ősében már valószínűleg jelen volt, viszont az *Usti* és *Ochraceorosei* szekciók szétválása után mindkét szekció fajai elvesztették azokat, de a *Nidulantes* szekcióban megmaradtak. Az *Usti* szekció viszont egy későbbi duplikációs eseménnyel újra szert tett egy második *aox* génre (*aoxB4*). Viszont az *A. calidoustus* esetében az *aoxB2-1* és *aoxB3* nem csak az *aoxB4* génnel lett helyettesítve, de a ritka, *aoxB1* paralógot is megtartotta. A *Nidulantes* szekció több

alszekciójában is megtörtént az *aoxB2-1* és *B3* elvesztése, de valószínűleg más-más időben. Mivel azonban a fajok csak az *aoxA*-val rendelkeznek, arra következtethetünk, hogy minden paralóg eltűnt az evolúció során (pl. *A. nidulans*). A *Versicolores* alszekció fajainak továbbra is a genom része az *aoxB2-1* gén, de például az *A. sydowii* az *aoxB3* gént is megőrizte. A *Nidulantes* szekcióban tehát hét különböző génvesztést azonosítottunk:

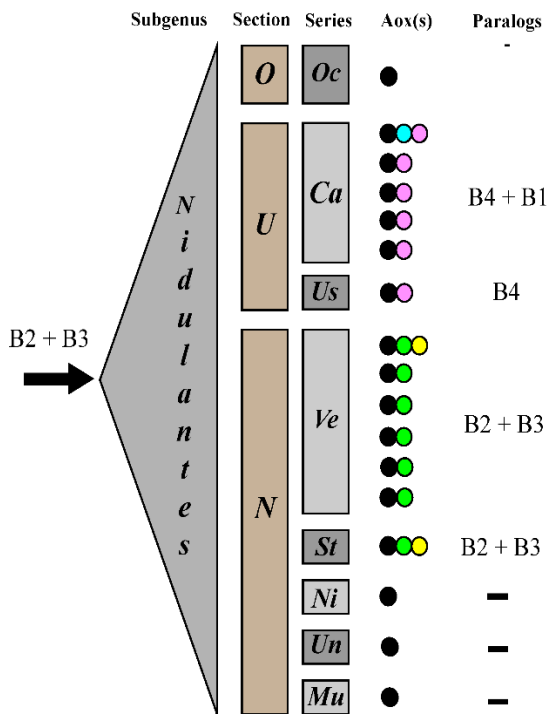
1-2) *Ochraceorosei* szekció *aoxB2-1* és *aoxB3*

3-4) *Usti* szekció *aoxB2-1* és *aoxB3*

5-6) *Nidulantes* szekció, *Stellati*, *Nidulantes Unguium*, *Multicolores* alszekció *aoxB2-1* és *aoxB3*

7) *Versicolores* alszekció *aoxB3*

A 15. és 16. ábrához tartozó törzsek listája a Mellékletek 13.4 fejezetében találhatóak.

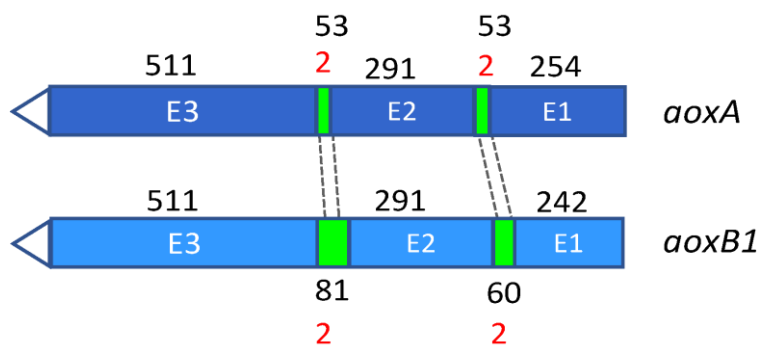


**16. ábra** *Nidulantes* alnemzetség génvesztése. A rövidítések jelentése: O: Ochraceorosei; U: Usti; N: *Nidulantes* (szekciók), Oc: Ochraceorosei; Ca: *Calidousti*; Us: Usti; Ve: *Versicolores*; St: *Stellati*; Ni: *Nidulantes*; Un: *Unguium*; Mu: *Multicolores*; Un: *Unguium* (alszekciók); B1-B4: különböző duplikációs eseménnyel létrejött paralógok. A pöttyök szintén a különböző duplikációs eseménnyel létrejött aox paralógokat jelölik: fekete=aoxA; kék=aoxB1; zöld=aoxB2-1; lila=aoxB2-2; sárga=aoxB3; magenta=aoxB4

#### 6.4 aoxB1 paralóg az *A. niger* törzsekben

Az *A. niger* második aox génjének eredete az általunk egyesnek nevezett génduplikációs eseményhez köthető (*aoxB1*), mely az *A. calidoustus*, *A. implicatus* és *P. swiecickii* fajokban is megtörtént. Az *A. niger* ATCC 1015 citromsav termelő törzs AoxB1 fehérje 347 aminosavból áll, csakúgy, mint az *A. welwitschiae* CCMB 674 (Duarte és mtsai., 2018) és *A. awamori* IFM 58123 (Shimizu és mtsai., 2019) törzsek második Aox fehérjéje. Génszinten az egyezés az *A. awamori*-val 98 %-os az *A. welwitschiae* törzssel pedig 96 %-os, ezen kívül az *A. niger* NNRL3 és N402 törzsek tökéletes (100 %)

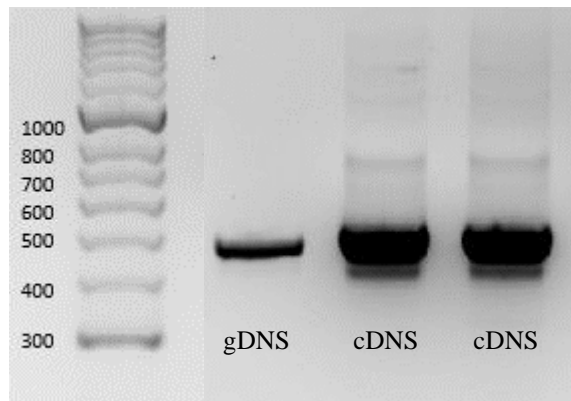
azonosságot mutatnak az ATCC 1015 törzssel. Az *aoxB1* gén két phase-two intront tartalmaz (a kodont a második bázis után szakítja meg), pozíciójuk megegyezik az *aoxA* génben lévő intronokéval, amik egy 291 bp hosszúságú exont határolnak, továbbá a 3' exon hosszúsága szintén megegyezik mindkét génben (17. ábra).



**17. ábra** *aoxA* és *aoxB1* génmodell az *A. niger* ATCC1015 törzsben. Az E betű az exonokat jelzi, míg a zöld sávok az intronokat. Az exonok és intronok feletti fekete számok a nukleotidok számát jelölik, míg pirossal az intronok fázisai láthatóak

Az ATCC 1015 törzs AoxB1 fehérje 57 %-ban azonos az AoxA fehérjével - a mitokondriális szignál eltávolításával ez az érték 63 %-ra nő –, viszont az *Onygenales* rend fajaival 65 %-nál nagyobb az egyezés. Az ATCC 1015 törzs *aox* paralógja nagyfokú hasonlóságot mutat az *A. calidoustus aoxB1* génjével is (70 %); második és harmadik exonja hasonlóképpen 291, illetve 511 bp hosszúságú, fehérje szinten az egyezés 83 %-os (mitokondriális szignál nélkül). Ez azért érdekes, mert az *A. calidoustus* a *Nidulantes* alnemzetség tagja, azon belül az *Usti* szekcióba tartozik, míg az *A. niger* a *Circumdati* alnemzetség tagja. További *Usti* fajokban nem azonosítottuk az *aoxB1* paralógot, ahogyan más fekete *Aspergillus* fajokban sem találtunk erre példát. Megfigyeléseink alátámasztják a már korábban említett *aoxB1* paralóg különös eredetét, miszerint laterális transzferrel kerülhetett át négy fajba egy nem-*Aspergillaceae* közös őstől. Az *aoxB1* génmodellek érvényességét

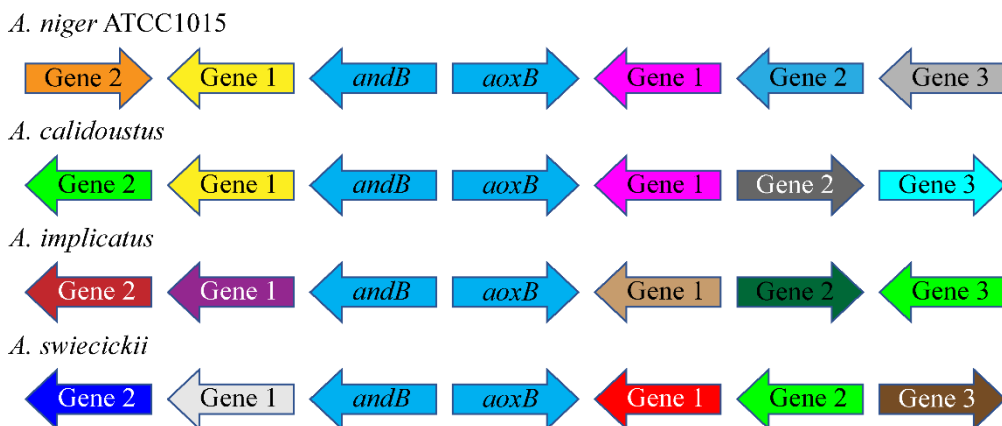
szekvenálással mi is bizonyítottuk, továbbá RT-PCR-rel a génexpressziót is igazoltuk az ATCC 1015 törzs (18. ábra) és az *A. calidoustus* (5.4 fejezet, 4. táblázat) esetében is.



**18. ábra** *A. niger* ATCC 1015 törzs *aoxB1* RT-PCR eredménye. Az első sávban a genomi DNS (478 bp) látható, a második és harmadik sávban az *aoxB1* cDNS-e (397 bp), felette pedig a pre-mRNS, melyben még nem történt meg az intron kivágódása

#### 6.4.1 Az *aoxB1* szomszédos génje: alternatív NADH dehidrogenáz

Az *A. niger* második Aox-ának alaposabb vizsgálata érdekében a JGI adatbázisából összegyűjtöttük az *aoxB1* közvetlen környezetében helyet foglaló géneket (hármát a 3' irányból, hármát az 5' irányból), amit a paralógot tartalmazó további három gombában is elvégeztünk (19. ábra).



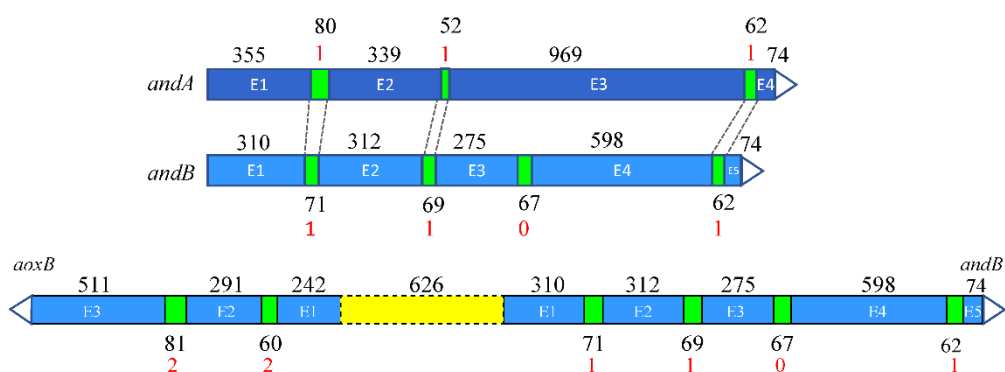
19. ábra Az *aoxB1* szomszédos génjei. A nyilak iránya a gének orientációját, míg az azonos színek a homológ géneket jelölik

Mind a négy faj esetében megfigyelhető, hogy az *aoxB1* mellett ellentétes orientáltsággal ugyanaz a gén található, ami szintén egy alternatív légzési utat biztosító enzim paralógja: egy kettes típusú NADH dehidrogenáz vagy alternatív NADH:ubikinon reduktáz. Az általunk vizsgált 350 fajban nem találtunk további példát arra, hogy az alternatív NADH dehidrogenáz gén (*andB*) és az *aoxB* gén ugyanilyen módon helyezkedjen el a genomban. Az *A. niger* ATCC 1015 és *A. calidoustus* fajokban az *andB* mellett további két gén is egyezik az *aoxB1* szomszédságában, ami arra enged következtetni, hogy egy négy génből álló klaszter öröklődhetett horizontálisan az adott fajokban. A 20. ábrán rózsaszínnel jelölt gén egy cink-cluster transzkripciós regulátor proteint kódol, ami 60 %-ban egyezik a két fajban. Az *andB* mellett sárgával jelölt, körülbelül 600 aminosavat tartalmazó 3-hidroxiacil-CoA dehidrogenáz fehérjét kódoló gén pedig több mint 80 %-os hasonlóságot mutat.

A NADH dehidrogenáz (*andA*) a fő légzési lánc része, a vizsgált fajok mindegyike tartalmazza (a külső csoportként vett *Lecanoromycetes*-ek is), konzerváltságát az *A. niger* és *A. nidulans* közötti több mint 85 %-os aminosav szekvencia hasonlóság is mutatja. Az *A. niger* és vele együtt az *A. calidoustus*

AndA és AndB fehérjéje 51 %-os hasonlóságot mutat, a két faj AndB proteinje 67 %-ban, míg az AndA 83 %-ban egyezik.

Az *andA* és *andB* génmodelljein szembeötlő különbség, hogy a mindenhol jelenlévő gén elvesztette a harmadik phase-zero intronját, míg a paralóg tartalmazza azt. A 20. ábrán látható az *A. niger* ATCC 1015 törzs *aoxB* és *andB* génjeinek ellentétes orientáltsága, melyek start kodonjai között lévő 623 bp hosszúságú szekvencia adja a közös promótert és szabályozó régiókat.



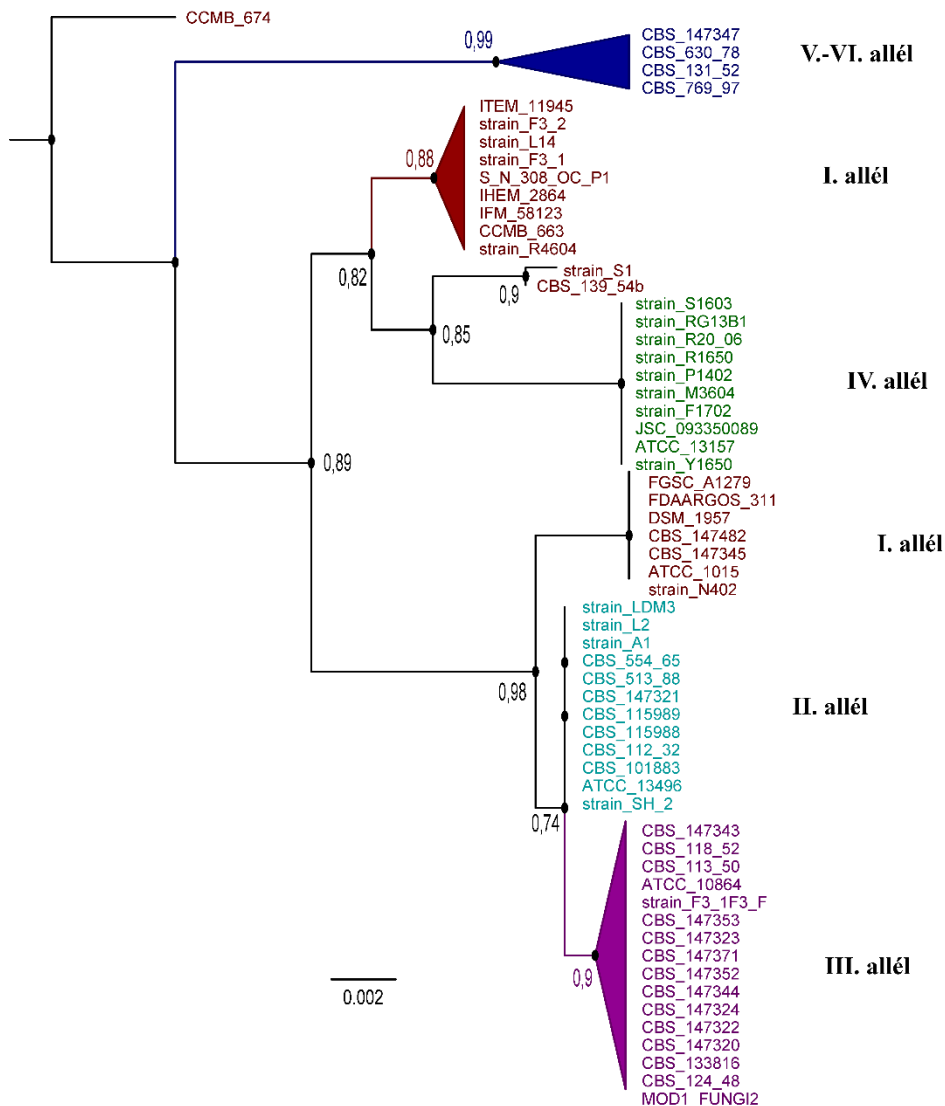
**20. ábra** *andB* és *aoxB* génmodellje *A. niger* ATCC1015 törzsben. Az E betű az exonokat jelzi, míg a zöld sávok az intronokat. Az exonok és intronok feletti fekete számok a nukleotidok számát jelölik, míg pirossal az intronok fázisai láthatóak. Sárgával az intergenikus régiót jelöltük

Hasonlóan az *aoxB1* expressziójának a vizsgálatához, az *andB* gén esetében is SRA adatokkal (Melléklet 13.2) támasztottuk alá a fehérjeképződést, majd a laboratóriumban is tesztelt gének genomi DNS és cDNS szekvenciáit a GenBank-ba töltöttük fel. Az SRA adatok bizonyították az *andB* gén kifejeződését *A. niger*, *A. calidoustus* és *A. implicatus* esetében is, habár az utóbbi esetében csak a kettes és négyes intron kivágódására találtunk információt. A gén kifejeződése nagyban függ a tenyésztési körülményektől, melyet nem csak az SRA adatok, de a laboratóriumban végzett munka is alátámaszt.

## 6.5 Az *A. niger aoxB1* gén alléljai

A 75 *A. niger* törzs AoxB1 fehérjéi nagyobb variabilitást mutattak a filogenetikai fán, mint a mindenhol jelen lévő AoxA, ami még inkább ösztönözte a mélyebbre ható vizsgálatot gén szinten is. Az *aoxB1* géneket elemezve különböző mutációkra lettünk figyelmesek, mely összesen hat allél jelenlétét mutatja a vizsgált *A. niger* törzsekben (2022 májusában fellelhető szekvenciák az NCBI adatbázisában). Az öt mutáció a géntermék működését nagyban befolyásolhatja, vagy teljes mértékben el is lehetetleníti.

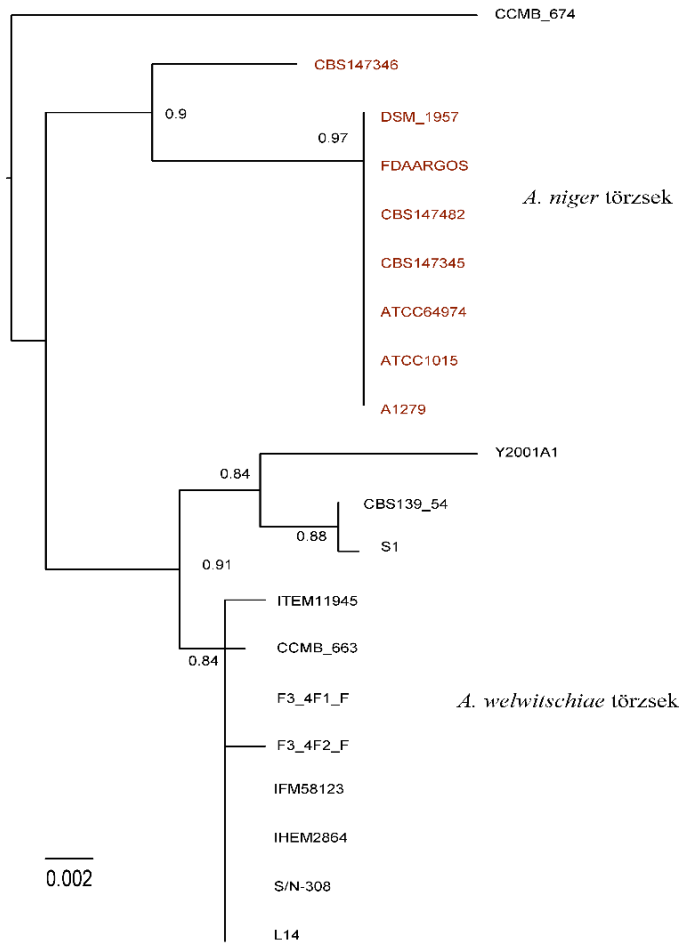
Az *A. niger* törzsek génszekvenciáit felhasználva (intronok nélkül) Maximum Likelihood filogenetikai fát hoztunk létre (21. ábra), amin jól elkülönültek a különböző allélok csoportjai (a talált pszeudogéneket nem tartalmazza az elemzés).



21. ábra *A. niger aoxB1* filogenetikai elemzése, génszekvenciák alapján a különböző génallélok különböző csoportokat alkotva

A törzsek allélok szerinti besorolása a Mellékletek 13.5 részében látható. Az egyes allél, ami a vad típusú törzseket foglalja magába, két csoportot alkot, melynek oka az analízishez használt *A. welwitschiae* és *A. awamori* testvérfajok, melyek között csak minimális genombeli különbségek mutatkoznak (22. ábra). Az *A. welwitschiae aoxB1* génjében több olyan SNP

(single nucleotide polymorphism) található, melyek funkcióbeli változást nem eredményeznek.

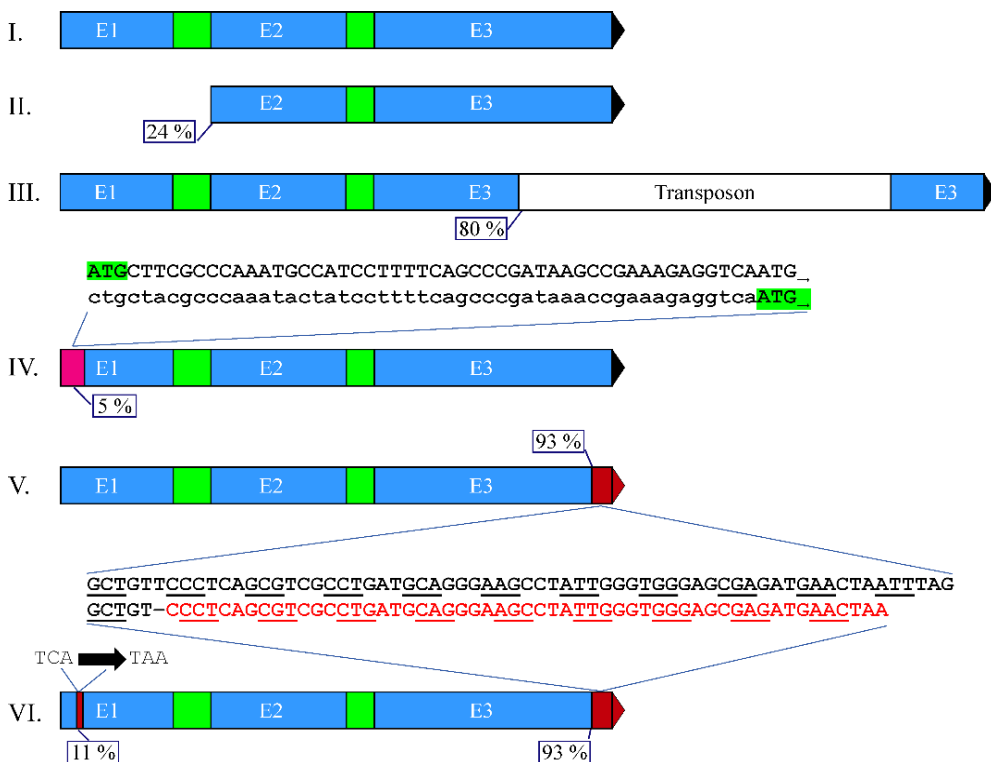


22. ábra *A. niger* és *A. welwitschiae* törzsek elkülönülése

A különböző mutációkat laboratóriumi körülmények között, a gének szekvenálásával is bizonyítottuk, mivel az adatbázisban található információkat kellő körültekintéssel szükséges kezelni: egy pontmutáció akár szekvenálási hiba is lehet, így annak kísérletes reprodukálása a pontos és megbízható eredményhez elengedhetetlen.

### 6.5.1 *aoxB1* I. allél – vad típus

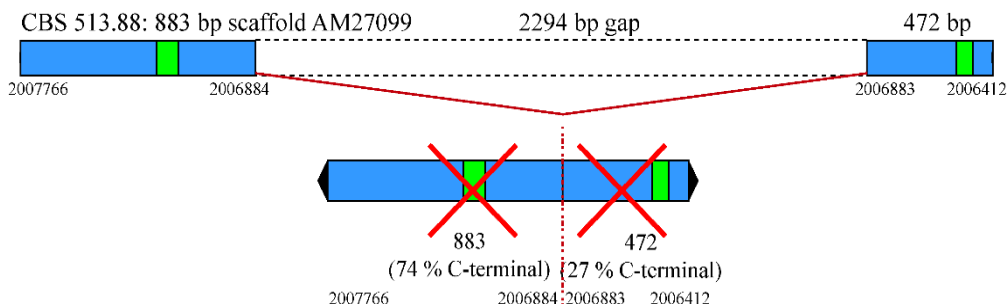
Az első csoportba tartozó törzsek *aoxB1* génjei a vad típusú gén allélnek számítanak, mivel ebben az esetben teljes értékű fehérje képződik, ami 347 aminosavból áll. Tartalmazza az *A. niger* ATCC 1015 citromsavtermelő törzs, továbbá a vizsgált *A. awamori* és *A. welwitschiae* fajok is. A gén N-terminális része, ami a mitokondriális célszekvenciát kódolja, minimálisan eltér az *aoxA* géntől, mivel az 351 aminosavat tartalmaz. Meglepő módon a vad típusú allél mindössze 14 törzsben van jelen a vizsgált 75 *A. niger* közül, ami azt jelenti, hogy a fajok 72 %-ban a gén mutálni kezdett. Ez egy pszeudogenizációs folyamat kezdete is lehet, ami hosszabb távon génesztéshez is vezethet.



23. ábra Az *aoxB1* allélok összefoglaló ábrája. Az E betű az exonokat jelzi, míg a zöld sávok az intronokat. Pirossal a pontmutációk helyzetét jelöltük, a százalékok pedig a mutációk pontos helyét határozzák meg a génben

## 6.5.2 *aoxB1* II. allél – deléció

A legdrasztikusabb mutációs esemény az *aoxB1* gén első exonjának és intronjának törlődése, mely nem csak az *aox*-ot, de a vele ellentétes orientáltságú *andB* gént is érinti. A két génből összesen 2294 bp távolítódott el, ami magába foglalja a 626 bp hosszúságú intergenikus régió teljes egészét.



**24. ábra** *aoxB1* deléció. Az E betű az exonokat jelzi, míg a zöld sávok az intronokat. A törlődött génszakaszt a szaggatott vonal jelöli, alatta pedig a bázispárok pontos számával látható a deléció

A deléció során az *andB* gén 74 %-a törlődött, így egyik gén expressziójára sincs lehetőség. Az esemény az elsőként szekvenált *A. niger* CBS 513.88 törzsben is megtörtént (Pel és mtsai., 2007), továbbá a CBS 554.65 neotípusában is, amit mi magunk is megszekvenáltunk és bizonyítottuk a mutáció létezését. A deléció 13 vizsgált törzsben van jelen.

## 6.5.3 *aoxB1* III. allél – transzpozon inszerció

Az *A. niger* második *aox* génjét 16 törzs esetében egy nem-autonóm retrotranszpozon beékelődése változtatta meg. A körülbelül 13 kb hosszúságú mozgó genetikai elem a harmadik exont annak kb. 80 %-ánál szakítja meg. A beépülés helyét egy 7 nukleotid hosszúságú „target site” duplikáció (TSD, 5' GAGAATG) jelöli. A retrotranszpozon hosszú terminális ismétlődései (LTR=long terminal repeats) 158-162 bp hosszúak, és 72,84 %-ban azonosak.



LTR-ével (a TSD is azonos). Ez azt sugallja, hogy a retrotranszpozon - vélhetően rekombinációval - törlődött a CBS 133816-ból.

#### **6.5.4 *aoxB1* IV. allél - missense mutáció**

Kilenc *A. niger* törzs esetében a missense mutáció egy pontmutációt jelent a start kodonban. A pontmutáció során a metionin adenin nukleotidja citozinra cserélődött, leucin aminosavat létrehozva ezáltal. Emiatt a fehérje vagy a 18-as vagy a 23-as metioninnal kezdődhet, aminek a következménye, hogy a gén N-terminális részén kódolt mitokondriális target szignál egyharmada elvész. Kísérleti adatunk nincs erre vonatkozólag, de az Aox fehérjék a sejtmagban kódolódnak, így a 17 aminosav hiánya miatt a fehérje nem feltétlenül tud eljutni a működési helyére a mitokondriumon belül.

#### **6.5.5 *aoxB1* V. és VI. allélok – frameshift és nonsense mutáció**

A negyedik mutációt egy timin bázis deléciója okozta, ami a harmadik exon 3' végéhez közeledve, körülbelül a génszekvencia 95 %-nál következett be. Egy bázis törlődésével megváltoznak a tripletek, ami miatt a leolvasási keret eltolódik. Ebben az esetben a C-terminális végen lévő 16 aminosav teljesen megváltozik, ami hibás fehérjeképződéshez vezet. A frameshift mutáció mindössze négy fajban van jelen, melyek közül az *A. niger* 630.78 törzsben mi magunk is megszekvenáltuk a gént, ezzel kizárva az adatbázisba esetlegesen hibás szekvenálással felkerült gént.

```

630.78 a.   GTTGCTTTATGTTTCGGGCGGATGAAGCGAAGCATCGCGAGGTTAACCATACTTTGGGAAA
630.78 sz.  GTTGCTTTATGTTTCGGGCGGATGAAGCGAAGCATCGCGAGGTTAACCATACTTTGGGAAA
1015       GTTGCTTTATGTTTCGGGCGGATGAAGCGAAGCATCGCGAGGTTAACCATACTTTGGGAAA
          *****

630.78 a.   CTTAGACCAGCATGAAGATCCCAATCCTTATACTGCGCTTATCAGCATGGGAATAATGC
630.78 sz.  CTTAGACCAGCATGAAGATCCCAATCCTTATACTGCGCTTATCAGCATGGGAATAATGC
1015       CTTAGACCAGCATGAAGATCCCAATCCTTATACTGCGCTTATCAGCATGGGAATAATGC
          *****

630.78 a.   TGT-CCGTCAGCGTCGCCTGATGCAGGGAAGCCTATTGGGTGGGAGCGAGATGAACTAAT
630.78 az.  TGT-CCCTCAGCGTCGCCTGATGCAGGGAAGCCTATTGGGTGGGAGCGAGATGAACTAAT
1015       TGT-CCGTCAGCGTCGCCCGATGCAGGGAAGCCATTGGGTGGGAGCGAGATGAACTAAT
          *** *****

630.78 a.   TTAG
630.78 sz.  TTAG
1015       TTAG
          ****

```

**26. ábra** *A. niger* 630.78 törzs frameshift mutáció bizonyítása, összehasonlítja a vad típusú alléllal. 1. sor: adatbázisban található génszekvencia. 2. sor: általunk szekvenált génszekvencia. 3. sor: *A. niger* ATCC 1015 génszekvencia

Két törzsben a CBS 131.52 és CBS 769.97-ben a frameshift mutáció mellett egy másik mutáció is helyett kapott, ami a hatodik génallélt eredményezi. Ebben az esetben egy nonsense mutáció történt az első exon 11 %-ánál, ahol egy szerin (TCA) citozinja adeninre cserélődött, így egy korai stopkodont (TAA) létrehozva. Egyértelmű, hogy a fehérjeképződés így már a transláció elején leáll, tehát e két törzs esetében nem létezik az AoxB1 fehérje.

## 6.6 *aoxB1* pszeudogének az *A. tubingensis*-ben

Az *aoxB* és *andB* gének transzfere még valószínűleg azelőtt történt, mielőtt a *Nigri* alszekcióban az *A. niger* és *A. luchuensis* (Hong és mtsai., 2013) kládok szétváltak volna. Az *A. luchuensis* klád *A. tubingensis* törzseiben bizonyítékot találtunk arra, hogy a már *A. niger* ATCC 1015 törzs esetében említett négy génből álló génklaszter maradványai megtalálhatóak a genomban. A cink-cluster transzkripció regulátor és 3-hidroxiacil-CoA húsz fekete *Aspergillus* izolátumban sértetlenül fennmaradt. Az *andB* gén viszont számos frameshift és deléción révén minden törzsben erősen mutálódott. Az

*aoxB* gén szintén számos mutációt szenvedett el, a pszeudogén két vagy három frameshift mutációt tartalmaz. Az *A. tubingensis* pszeudogénje a teljesen ép *aoxB* génnel (*A. awamori*) 85 %-os egyezést mutat. Az *A. luchuensis* klád további fajai viszont nem tartalmazzák a génklaszter tagjainak ortológjait, ami arra utal, hogy az *A. luchuensis* kládon belül határozottan elkülönülnek az *A. tubingensis* törzsek.

## 7. Eredmények megbeszélése

Kutatómunkám során az *Aspergillus* és *Penicillium* fajok *aox* génjének filogenetikai analízisét tűztem ki célul, különös tekintettel az *A. niger* törzsekre. A korábbi *aox* filogenetikai elemzések a teljes élővilágra terjedtek ki (McDonald és Vanlerberghe 2006; Weaver és McDonald, 2023). Növények esetében is inkább az átfogó elemzések a jellemzőek, főképp az *aox1* és *aox2* elterjedését vizsgálják, melyek teljesen elkülöníthető funkciókkal bírnak (Pu és mtsai., 2015; Costa és mtsai., 2017; Considine és mtsai., 2002). Filogenetikai analízisünk az *Aspergillaceae* család tagjaira korlátozódott, azt kutatva, hogy mikor, milyen fajok között alakultak ki a paralógok, és mi lett a sorsuk az evolúció során. Az *Eurotiomycetidae* alnemzetség egyéb fajaival együtt 351 faj 531 fehérjéjéből végzett filogenetikai analízis alapján négy különböző duplikációs eseménnyel létrejött *aox* paralógot találtunk.

A legősibb génduplikáció valószínűleg az *Aspergillus* és *Penicillium* nemzetségek szétválása előtt történhetett, melyre bizonyíték az, hogy körülbelül 100 faj rendelkezik az általunk *aoxB2-1*-nek nevezett génnel. Mivel egy közös ősből történt a paralóg létrejötte, a vertikális öröklődés miatt a fajok nagy részének meg kellett szereznie a második gént is. Azonban az evolúció során, ha a sejt/szervezet nem kovácsol hasznot abból, hogy egy génből két példány is szerepel a genomban, a duplikátum idővel mutációkon megy

keresztül, hibás fehérje képződik róla, esetleg később törlődik is a DNS-ből (Zhang, 2013). Az *aoxB2-1* paralóg számos szekcióból tűnt el (*Usti*, *Aspergillus*, *Circumdati* és *Nidulantes* szekció bizonyos alszekciói), viszont a hozzá evolúciósan közel eső paralóg, az *aoxB2-2* csak néhány *Flavi* fajban maradt fent. Viszont bizonyos szekciókban, mint a *Candidi*, *Terrei* vagy *Flavi* - melyek fontos képviselői közé tartozik az *A. flavus* (az aszpergillózis egyik fő okozója) vagy az *A. terreus* (a biotechnológia egyik fontos platformja) - az *aoxB2-1* paralóg fennmaradt az évmilliók során. Az *aoxB2-2* eredetét nem tudjuk pontosan meghatározni a rendelkezésre álló minimális szekvencia adat miatt. Két lehetséges magyarázat lehet: vagy az *aoxB2-1* további duplikációjával jött létre, vagy az *aoxA* megkettőződésével az *aoxB2-1*-gyel közel egy időben.

Az *aoxB2-2* nem csak *Aspergillus* fajokban, hanem két *Trichoderma* (*T. asperellum*/ *T. asperelloides*) fajban is helyet kapott. A *Trichoderma* fajok alapvetően csak *aoxA* génnel rendelkeznek, aminek génmodellje eltérő az *Aspergillaceae* fajokétól. A *T. asperellum* és *T. asperelloides* fajok második *aox* génje az *A. arachidicola* *aoxB2-2* génnel 93 %-os hasonlóságot mutat (mitokondriális szignál nélkül), ami közvetlen horizontális géntranszferre utal. A *Trichoderma* fajokat széles körben alkalmazzák úgynevezett biokontrollként, melyek közvetetten vagy közvetlenül védik a növényeket a patogének ellen (Harman és mtsai., 2004). A *T. asperelloides* hatékonyabbnak bizonyult a fehérpenész elleni védelemben, mint két *T. harzianum* törzsből készült kereskedelmi termék (Sumida és mtsai., 2018). Pontos adatok nincsenek a *Trichoderma* Aox fehérjével kapcsolatban, de a *T. asperelloides*-ben fennmaradt *aox* paralóg akár további kutatások célpontja is lehet a növényi patogének elleni védelmi mechanizmusban.

Egy másik *aox* paralóg (*aoxB3*) kialakulása már a nemzetségek szétválása után történhetett egy *Penicillium* fajtól laterális géntranszferrel, mivel csak a *Cremeri*, *Aspergillus*, *Circumdati* és *Nidulantes* alnemzetségekben terjedt el. Viszont az alnemzetségeken belül nem csak a szekciókban, de még alszekciókra lebontva is számos génvesztési mintázat figyelhető meg az *aoxB3*-mal kapcsolatban. A *Circumdati* és *Cremeri* szekciókban csak ez a paralóg maradt fent (az *aoxA* mellett), viszont a *Nidulantes* szekcióban csak a *Versicolores* és *Stellati* alszekcióban található példa az *aoxB3* jelenlétére, ezekben az esetekben az *aoxB2-1* gén is jelen van a genomban. Ugyanez igaz az *Aspergillus* szekcióra is, két alszekció egy-egy fájában mindkét paralóg megőrzésre került.

A negyedik duplikációs esemény által létrehozott gén (*aoxB4*) csak az *Usti* szekció fajaira jellemző, ami egy közelmúltban történt jelenségre utal; az *aoxB4* szomszédos génjeinek hasonlósága tovább erősíti ezt a tényt. Az *Usti* fajok génvesztési mintázata is különös módon történt. Jelenleg a legtöbb faj csak az *aoxB4* gént tartalmazza az *aoxA* mellett, az *aoxB2* és *B3* géneket elvesztették, viszont később egy újabb duplikációs eseménnyel újra két *aox* génnel rendelkeznek. 2000 óta egyre több irodalmi adat jelenik meg az *Usti* szekció tagjai által okozott aszpergillózisról, melyek természetes rezisztenciát mutatnak az azol tartalmú antimikotikumokkal szemben (Glampedakis és mtsai., 2021; Seroy és mtsai., 2017). Nem található irodalmi adat azzal kapcsolatban, hogy az *Aox*-nak köszönhető-e, viszont az újra megszerzett paralóg és annak megtartása segítheti a gomba túlélését az ellene irányuló kezelések ellen. Az *A. calidoustus* genomja a *B4* gén mellett a csak néhány fajra jellemző *aoxB1* gént is tartalmazza.

A *Nidulantes* alnemzetség tehát igen komplex génvesztési és génszerzési mintázattal rendelkezik, összesen hét olyan esemény történt, ami

során a paralóg gének eltűntek a genomból. Bizonyos fajok, mint az *A. sydowii* vagy *A. calidoustus* három *aox* gént is tartalmaznak, viszont például az egyik legismertebb képviselője, az *A. nidulans* csak az *aoxA* gént tartotta meg. Fontos megjegyezni, hogy a vizsgált fajok mindegyikében jelen van az *aoxA* gén, semmilyen esetben sem történik meg a paralógokkal való kiváltása. Munkánk során hét fajban a különböző duplikációs eseményekkel létrejött gének expresszióját laboratóriumban is bizonyítottuk (a cDNS szekvenciákat a GenBank adatbázisába töltöttük fel), továbbá SRA adatok is rendelkezésre állnak a gének kifejeződéséről.

Több fajban is azonosítottunk akár három *aox* gént is (*A. sydowii*, *A. calidoustus*, *A. caelatus*, *A. chevaileri*, *P. brevicompactum*), amelyek különböző szekciókból származnak, és ahol legfeljebb az extrém életkörülmények indokolják a paralógok szükségességét. Az *A. sydowii* felelős a Karib-tenger korallzátonyait pusztító aszpergillózisért, élőhelye tehát a tenger, ami fokozott sótűrést igényel (Soler-Hurtado és mtsai., 2016). Az *A. calidoustus* és *A. caelatus* a magasabb hőmérséklethez alkalmazkodott (Glampedakis és mtsai., 2020; Le Pape és mtsai., 2019), míg az *A. chevaileri* extrém szárazságban is képes növekedni csak úgy, mint a *P. brevicompactum* (Chen és mtsai., 2017), (Ndagijimana és mtsai., 2007). Ezen kívül nem találtunk összefüggést a fajok között. Ezzel ellentétben ugyanezen szekcióba vagy akár alszekcióba tartozó fajok mindössze egy *aox* génnel rendelkeznek (*A. nidulans*, *A. ustus*, *A. glaucus*).

Az *A. niger* törzsek (CBS 513.88, ATCC 1015, ATCC 9029) teljes genom szekvenálása során két fontos gén, az *aox* és a citrát szintáz paralógjait azonosították. Filogenetikai elemzés alapján az *aox* gének két különálló kládba csoportosultak a paralógok szerint, azonban az *A. niger* törzsek már itt is a többi *Aspergillus* fajtól eltérő ágon helyezkednek el (Sun és mtsai., 2007).

Filogenetikai analízisünk alátámasztja, hogy az *A. niger* második alternatív oxidáza az eddigiektől eltérő módon az *Aspergillaceae* családon kívülről, egy horizontális géntranszferrel kerülhetett a genomba, valószínűleg egy *Onygenales* rendbe tartozó fajtól. Az *A. niger*-en kívül mindössze három fajban található meg az *aoxB1*-gyel jelölt paralóg, melyekben közös, hogy az *aoxB1* mellett ellentétesen orientálva egy alternatív NADH dehidrogenáz (*andB*) gén kapott helyet. A géntranszfer valószínűleg együtt történt meg, az *A. niger* és *A. calidoustus* esetében pedig egy négy génből álló klaszter került át. A közös őstől való származást alátámasztja az is, hogy az *A. niger* és *A. calidoustus* *aoxB1* proteinje 83 %-os hasonlóságot, míg a gének 70 %-os egyezést mutatnak annak ellenére, hogy a fajok két eltérő alnemzetségből származnak.

Az *A. niger* második *aox*-ának vizsgálata során 6 különböző allélt fedeztünk fel, amik kialakulásához öt mutáció járult hozzá. A 75 vizsgált törzsből mindössze 14 olyan *A. niger*-t találtunk, ahol az *aoxB1* gén expressziója akadálymentes. A legdrasztikusabb mutációként a gén első exonját és intronját érintő deléciót azonosítottuk, ami az *andB* gén jelentős részét (74 %-át) is eltávolította. Az egyik génallélba egy nem autonóm retrotranszpozon ékelődött, ami szintén hatással van a gén kifejeződésére. Egy törzs esetében egy autonóm kópiát találtunk, mely LTR-e (Long Terminal Repeat) különbözik a már *A. niger*-ben azonosított AniTa1 transzpozontól, így az általunk felfedezett mozgó genetikai elem az AniTa2 nevet kapta (Braumann és mtsai., 2007).

A további allélok létrejötte pontmutációkhoz köthető. Missense mutáció esetében a startkodon adenin bázisa citozinre cserélődött, ami miatt a fehérje képződést egy későbbi startkodon indítja. A hiba miatt az N-terminális részen kódolt mitokondriális szignál hiányzik, ami miatt a fehérje nem

feltétlenül jut be működési helyére. Az ötödik allélt egy frameshiftet okozó pontmutáció hozta létre a harmadik exon végén, ami miatt a C-terminális vég utolsó 16 aminosavát a vad típustól eltérő tripletek kódolják. A hatodik allél szintén tartalmazza a frameshift mutációt, továbbá egy nonsense mutáció lehetetleníti el a géntermék létrejöttét, ami során az első exonban egy szerin aminosav citozinja adeninre cserélődött, így egy korai stop kodont létrehozva.

*A. niger* korábbi filogenetikai analízise során 33 törzsben 7718 ortológ fehérjét felhasználva hoztak létre filogenetikai fát, mely során három különböző csoportra különültek el a törzsek (Seekles és mtsai., 2022). Az egyik kládot 9 főképp fehérje/enzim termelő *A. niger* törzs alkotja, melyből hét törzs az általunk második allélként azonosított csoportba tartozik. Ezek alapján a deléción a fehérjetermelő törzsekre jellemző, továbbá az *aox*-on kívül más gének is megkülönböztetik a többi *A. niger*-től. A második csoportban 11 *A. niger* törzs közül 8-ban transzpozon inszerció történt, melyek főképp ételből és vízből lettek izolálva. A harmadik csoportot szerves sav termelő fajok alkotják, melyek között vad típusú allélal, transzpozon inszercióval és pontmutációkkal rendelkező törzsek találhatóak. Tehát szerves sav termelő törzsek között több mutáció is befolyásolhatja a második *aox* gén kifejeződését.

*A. tubingensis* fajokban (fekete *Aspergillus*, *A. luchuensis* klád) az *aoxB1* mint pszeudogén van jelen, exonjaiban több frameshift mutáció halmozódott fel, továbbá az *A. niger*-hez és *A. calidoustus*-hoz hasonlóan az *aoxB1* ugyanazzal a génklaszterrel került a genomba. Az *A. tubingensis* *aoxB1* paralógja tehát már a génvesztést megelőző folyamatokban vesz részt.

## 8. Összefoglalás

Az Aox egy alternatív légzési utat katalizáló enzim, mely növényekben, gombákban és bizonyos állati sejtekben a fő légzési lánc mellett extra komponensként van jelen. A genomban több kópiája is létezhet, növényekben akár 4-5 paralógot is azonosítottak, melyek esetükben már jól tanulmányozottak, és evolúciósan is sok információ áll rendelkezésre a különböző homológok kialakulásával kapcsolatban. Noha az alternatív légzés gombákban is régóta ismert, konkrét filogenetikai elemzésekre kevés példa található a szakirodalomban. A teljes gomba királyság filogenetikai analízise azt mutatja, hogy az *aox* gén multiplicitása nem jellemző, viszont az *Eurotiales* rendben, azon belül is az *Aspergillaceae* családban több paralógot is tartalmaznak bizonyos fajok. Az *Aspergillaceae* család *Aspergillus* és *Penicillium* nemzetsége számos, a biotechnológiában fontos fajt tartalmaz (pl: *A. niger*, *A. terreus*, *A. oryzae*, *P. chrysogenum*), melyek alternatív oxidázának működése a legtöbb esetben nélkülözhetetlen anyagcsere termékeik ipari léptékű felhalmozásához. A fehérje pontos biokémiai működése a folyamatos kutatások ellenére még nem teljesen tisztázott, viszont a nyilvános genetikai adatbázisok vizsgálata az eredetét és evolúcióját tekintve is értékes információkat nyújthat.

Az *A. niger* törzsekben talált mutációk választ adnak arra, hogy miért áll kevés adat rendelkezésünkre a második *aox* kifejeződésével kapcsolatban. A vizsgált törzsek mindössze 18 %-a rendelkezik ép génnel, expressziójuk nem minden körülmény között történik meg, amire az SRA adatok is bizonyítékot szolgáltatnak. Az *A. niger* törzsek a mutációk által hat különböző csoportba sorolhatóak, ami akár előnyös is lehet bizonyos klinikai esetek feltárásában. A *Flavi* szekció után a *Nigri* szekció tagjai okozzák a legtöbb aszpergillózissal összefüggő betegséget, viszont a diagnózis során a fajok/törzsek konkrét

azonosítására már nem kerül sor. Az ok abban keresendő, hogy a fekete *Aspergillus*-ok morfológiailag nem különíthetők el, genomszekvenciájuk is nagymértékben egyezik. Az általunk azonosított *aoxB1* allélok alapján viszont az *A. niger*-t és testvérfajait (*A. awamori*, *A. welwitschiae*, *A. tubingensis*) megkülönböztethetjük, így célzott terápiával hatékonyabb gyógyítás érhető el.

Az *aox* gén négy duplikációs eseménye és az *A. niger aoxB1* részletesebb vizsgálata tökéletesen leírják egy gén sorsát a genomban. Az *Aspergillus* és *Penicillium* nemzetség tagjai nagy egyedszámmal rendelkeznek, így a paralógok elterjedése az evolúció során különböző mintázatokat mutat. A legkorábban létrejött duplikáció vertikális öröklődéssel minden fajban jelen lehet, viszont időben később történt eseményekkel keletkezett géneket már jóval kevesebb faj tartalmazhatja. A feltételes mód nem véletlen, hiszen az évmilliók során a paralóg gének eltűnhetnek a genomból, ha azok már nem hasznosak a sejt számára. Így a génvesztés vizsgálata legalább olyan fontos, mint a duplikációs események meghatározása, hiszen az evolúciót mindkettő befolyásolja, az élőlények fejlődése és a folyamatosan változó környezethez való alkalmazkodásuk megértése csak az együttes hatásukkal vizsgálható.

A gén duplikációját az elvesztés előtt a pszeudogenizáció folyamata követi, ami mutációk felhalmozódását eredményezi az adott génben. Az *A. niger* törzsek mutációi talán már ezt a folyamatot indítják el, amire közvetlen bizonyíték lehet az *A. tubingensis*-ben talált pszeudogének jelenléte.

Az Aox fehérje működése, funkciói közvetetten és közvetlenül is egyedülállónak tekinthetők, melyek révén a fajok számos előnyre tehetnek szert. A fehérjét kódoló gén az *Aspergillaceae* fajokban többször is átesett duplikációs eseményeken, ami nem lehet véletlen az organizmusok metabolizmusának szempontjából. Rengeteg faj genomja meg is őrizte a

különböző eseményekkel létrejött paralógokat, míg mások elvesztették azokat, vagy újra megszerezték. A *Nidulantes* alnemzetségben például hét különböző génesztési folyamat történt, alszekciókon belül is eltérő mintázat rajzolódik. Az *Aox* különlegességét kutatásaink még inkább mutatják; a gének eredete és evolúciója arra enged következtetni, hogy fajoként is eltérő működésű fehérjék expresszálnak. Bizonyos esetekben három kópiára is szükség lehet, viszont sokszor egy is ellátja az adott feladatot. A kutatásokat ezek alapján a hasonló génduplikációs eseményekkel létrejött génekre lehet fókuszálni, összefüggést lehet keresni azon fajok között, melyek három gént is tartalmaznak. Vajon a különböző stresszfaktorokra ugyanúgy reagálnak? A különböző *Aspergillus* és *Penicillium* fajok ezáltal másképp is csoportosíthatóak? Számos kérdés nyitott marad, de kutatásunk segíthet más megvilágításba hozni az *aox* géneket és azoknak eredetének, evolúciójának feltárásával hozzájárultunk a génnel kapcsolatos ismeretink bővítéséhez.

## 9. Summary

The alternative oxidase can provide for an alternative respiratory pathway, serving as an additional component alongside the main respiratory chain in plants, fungi, and certain animal cells. It has been well studied in plants, but there is also a growing interest in fungi. However, there are just a few examples of specific phylogenetic analyses having been performed. Phylogenetic analysis of the entire fungal kingdom reveals that the multiplicity of the *aox* gene is rare, but certain species in the *Eurotiales* order, specifically in the *Aspergillaceae* family, contain several paralogs. The *Aspergillaceae* family, which includes genera such as *Aspergillus* and *Penicillium*, harbors several platform species crucially important in biotechnology (e.g., *A. niger*, *A. terreus*, *A. oryzae*, *P. chrysogenum*), whose alternative oxidase function is in

most cases essential for the accumulation of the metabolic products. The exact biochemical function of this protein is not yet fully understood, but studies on its origin and evolution may provide valuable informations.

During our research a phylogenetic analysis of the *aox* genes in *Aspergillus* and *Penicillium* species was undertaken, with a particular emphasis on *A. niger* strains. Based on the phylogenetic analysis of 531 proteins from 351 species (including other species within the *Eurotiomycetidae* subclass), we identified four distinct paralogs of the *aox* gene resulting from different duplication events. The four duplication events of the *aox* gene and the detailed examination of *A. niger* perfectly describe the evolutionary fate of a gene in the genome. Members of the *Aspergillus* and *Penicillium* genera have large population sizes, resulting in various patterns of paralog distribution during evolution.

The most ancient gene duplication occurred before the divergence of the sister genera, as evidenced by approximately 100 species possessing the gene we refer to as *aoxB2-1*. We cannot precisely determine the origin of *aoxB2-2* due to the limited sequence data available. There are two possible explanations: it may have arisen either from further duplication of *aoxB2-1* or almost the same time with the duplication of *aoxA*. The presence of *aoxB2-2* is not limited to *Aspergillus* species but is also found in two *Trichoderma* species (*T. asperellum*/*T. asperelloides*). *Trichoderma* species typically possess only the *aoxA* gene, which has a different gene model compared to *Aspergillaceae* species. The second *aox* gene in *T. asperellum* and *T. asperelloides* shows 93 % similarity to the *A. arachidicola* *aoxB2-2* gene (without mitochondrial signal), indicating a direct horizontal gene transfer.

The formation of another *aox* paralog (*aoxB3*) likely occurred after the divergence of the genera, possibly through lateral gene transfer from a

*Penicillium* species. The presence of this *aoxB3* gene is observed only in the *Cremeri*, *Aspergillus*, *Circumdati*, and *Nidulantes* subgenera. The gene created by the fourth duplication event (*aoxB4*) is specific to the *Usti* section, indicating a recent phenomenon. The similarity of *aoxB4* to neighboring genes further strengthens this fact.

Over millions of years, paralogous genes can disappear from the genome if they are no longer useful for the cell. The *aoxB2-1* paralog has disappeared from several sections (*Usti*, *Aspergillus*, *Circumdati*, and certain series within the *Nidulantes* section). However, in certain sections such as *Candidi*, *Terrei*, or *Flavi* - which include important representatives like *A. flavus* (a major cause of aspergillosis) or *A. terreus* (a significant platform in biotechnology) - the *aoxB2-1* paralog has been retained over millions of years. In the *Circumdati* and *Cremeri* sections, only the *aoxB3* paralog remains alongside *aoxA*. Most *Usti* species have lost the *aoxB2* and *B3* genes, but later regained two *aox* genes through another duplication event. The genome of *A. calidoustus* contains the *B4* gene and the *aoxB1* gene, which is specific to only a few species. The *Nidulantes* subgenus exhibits a complex pattern of gene loss and gain, with a total of seven events resulting in the disappearance of paralogous genes from the genome. The investigation of gene loss is at least as important as determining duplication events since both influence evolution. Understanding the development of organisms and their adaptation to continuously changing environments can only be comprehensively explored by examining their combined effects.

The second alternative oxidase of *A. niger* likely entered the genome through horizontal gene transfer from a species belonging to the *Onygenales* order, outside the *Aspergillaceae* family. This is supported by phylogenetic analysis, indicating its presence in only three other species. Besides *aoxB1*, we

also discovered an oppositely oriented alternative NADH dehydrogenase gene (*andB*).

During the investigation of the second alternative oxidase in *A. niger*, we identified six different alleles, with five mutations contributing to their formation. The most dramatic mutation we identified was a deletion affecting the first exon and intron of the *aoxB1* gene, and removed a significant portion (74 %) of the *andB* gene too. Additionally, in one gene allele, a non-autonomous retrotransposon inserted, also affecting the gene's expression. In the case of one strain, we found an autonomous copy that differs in its Long Terminal Repeat (LTR) from the AniTa1 transposon previously identified in *A. niger*. Therefore, we named the mobile genetic element we discovered AniTa2. The formation of additional alleles is associated with point mutations. In the case of a missense mutation, the adenine base of the start codon was replaced by cytosine, causing protein synthesis to be initiated from a later start codon. Due to this error, the mitochondrial signal encoded in the N-terminal region is missing. The fifth allele was created by a point mutation causing a frameshift at the end of the third exon, resulting in the last 16 amino acids of the C-terminal end being encoded by triplets different from the wild type. The sixth allele also contains the frameshift mutation, and additionally, a nonsense mutation prevents the generation of the gene product, resulting in an early stop codon in the first exon.

In *A. tubingensis* species (black *Aspergillus*, *A. luchuensis* clade), *aoxB1* is present as a pseudogene, accumulating multiple frameshift mutations in its exons. These mutations suggest a process preceding gene loss.

The *A. niger* strains can be classified into six different groups based on mutations, which could potentially be advantageous in uncovering specific clinical cases. Following the *Flavi* section, members of the *Nigri* section are

responsible for the majority of aspergillosis-related diseases. However, during diagnosis, there is no specific identification of species/strains. This is because black *Aspergillus* species cannot be morphologically distinguished, and their genome sequences also show a high similarity. However, based on the *aoxB1* alleles we identified *A. niger* and its sibling species (*A. awamori*, *A. welwitschiae*, *A. tubingensis*) can be distinguished, allowing for more effective treatment with targeted therapy.

The functions of the alternative oxidase protein can be considered unique, both directly and indirectly, offering numerous advantages to species that possess it. The gene encoding this protein has undergone multiple duplication events in *Aspergillaceae* species, which cannot be a coincidence from the perspective of organism metabolism. Genomes of many species have retained paralogs created by various events, while others have lost them or regained them. In the *Nidulantes* subgenus, for example, seven different gene loss processes have occurred, with varying patterns even within series. Our research further enhances the uniqueness of the alternative oxidase, suggesting that proteins with different functionalities are expressed in each species. In some cases, three copies may be necessary, but often one copy is sufficient for the given task. Our research can contribute to shedding light on the alternative oxidase genes and their origin and evolution.

## 10. Irodalomjegyzék

- Adams, C. A., Zimmerman, K., Fenstermacher, K., Thompson, M. G., Skyrud, W., Behie, S., & Pringle, A. (2020). Fungal seed pathogens of wild chili peppers possess multiple mechanisms to tolerate capsaicinoids. *Appl. Environ. Microbiol.* 86:e01697-19.
- Albalat, R., & Cañestro, C. (2016). Evolution by gene loss. *Nat. Rev. Genet.* 17, 379–391 .
- Albury, M. S., Elliott, C., & Moore, A. L. (2009). Towards a structural elucidation of the alternative oxidase in plants. *Physiol. Plant.* 137: 316–327.
- Anisimova, M., & Gascuel, O. (2006). Approximate likelihood-ratio test for branches: A fast, accurate, and powerful alternative. *Syst. Biol.* 55, 539–552.
- Antos-Krzeminska, N., & Jarmuszkiewicz, W. (2019). Alternative type II NAD(P)H dehydrogenases in the mitochondria of protists and fungi. *Protist* Vol. 170 21–37.
- Arguello, J. R., Fan, C., Wang, W., & Long, M. (2007). Origination of chimeric genes through DNA-level recombination. *Genome Dyn.* 3:131-146.
- Ball, B., Langille, M., & Geddes-McAlistera, J. (2020). Fun(gi)omics: advanced and diverse technologies to explore emerging fungal pathogens and define mechanisms of antifungal resistance. *mBio.* 11:e01020-20.
- Berry, S. (2003). Endosymbiosis and the design of eukaryotic electron transport. *Biochim. Biophys. Acta* 1606, 57-72.
- Billing, J., & Sherman, P. W. (1998). Antimicrobial functions of spices: why some like it hot. *Q Rev. Biol.* 73(1):3-49.
- Blaza, J. N., Bridges, H. R., Aragão, D., Dunn, E. A., Heikal, A., Cook, G. M., et al. (2017). The mechanism of catalysis by type-II NADH:quinone oxidoreductases. *Sci. Rep.* 7, 40165.
- Bouillaud, F., Couplan, E., Pecqueur, C., & Ricquier, D. (2001). Homologues of the uncoupling protein from brown adipose tissue (UCP1): UCP2, UCP3, BMCP1 and UCP4. *Biochim. Biophys. Acta* 1504(1):107-119.

- Braumann, I., Berg, M. v., & Kempken, F. (2007). Transposons in biotechnologically relevant strains of *Aspergillus niger* and *Penicillium chrysogenum*. *Fungal. Genet. Biol.* 44(12):1399-414.
- Brosius, J. (1991). Retroposons-seeds of evolution. *Science* 251(4995):753.
- Bundock, P., den Dulk-Ras, A., Beijersbergen, A., & Hooykaas, P. (1995). Trans-kingdom T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 14(13), 3206-3214.
- Carneiro, P., Duarte, M., & Videira, A. (2012). Disruption of alternative NAD(P)H dehydrogenases leads to decreased mitochondrial ROS in *Neurospora crassa*. *Free Radic. Biol. Med.* 52(2):402-9.
- Casola, C., & Betrán, E. (2017). The genomic impact of gene retrocopies: What have we learned from comparative genomics, population genomics, and transcriptomic analyses? *Genome Biol. Evol.* 9(6):1351-1373.
- Cavalheiro, R., Fortes, F., Borecký, J., Faustini, V., Schreiber, A., & Vercesi, A. (2004). Respiration, oxidative phosphorylation, and uncoupling protein in *Candida albicans*. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 37(10) 1455-1461.
- Chen, A. J., Hubka, V., Frisvad, J. C., Visagie, C. M., Houbraeken, J., Meijer, M. et al. (2017). Polyphasic taxonomy of *Aspergillus* section *Aspergillus* (formerly *Eurotium*), and its occurrence in indoor environments and food. *Stud. Mycol.* 88, 37-135.
- Colombatti, F., Gonzalez, D. H., & Welchen, E. (2014). Plant mitochondria under pathogen attack: a sigh of relief or a last breath? *Mitochondrion Pt B*:238-44.
- Considine, M. J., Holtzapffel, R. C., Day, D. A., Whelan, J., & Millar, A. H. (2002). Molecular distinction between alternative oxidase from monocots and dicots. *Plant Physiol.* 129(3), 949-953.
- Costa, J. H., Dos Santos, C. P., e Lima, B. D. S., Netto, A. N. M., da Cruz Saraiva, K. D., & Arnholdt-Schmitt, B. (2017). In silico identification of alternative oxidase 2 (AOX2) in monocots: A new evolutionary scenario. *J. Plant Physiol.* 210, 58-63.
- Costa, J. H., Mota, E. F., Cambursano, M. V., Lauxmann, M. A., Oliveira, L. M. N., Lima, M. D. G. S. et al. (2010). Stress-induced co-expression of

- two alternative oxidase (*VuAox1* and *2b*) genes in *Vigna unguiculata*. *J. Plant Physiol.* 167(7):561-70.
- Criscuolo, A., & Gribaldo, S. (2010). BMGE (Block Mapping and Gathering with Entropy): A new software for selection of phylogenetic informative regions from multiple sequence alignments. *BMC Evol. Biol.* 10, 210.
- Cui, Y., Zhao, S., Wu, Z., Dai, P., & Zhou, B. (2012). Mitochondrial release of the NADH dehydrogenase Ndi1 induces apoptosis in yeast. *Mol. Biol. Cell.* 23(22): 4373–4382.
- Daboussi, M.-J., & Capy, P. (2003). Transposable elements in filamentous fungi. *Annu. Rev. Microbiol.* 57:275-99.
- Dassa, E. P., Dufour, E., Goncalves, S., Jacobs, H. T., & Rustin, P. (2009). The alternative oxidase, a tool for compensating cytochrome c oxidase deficiency in human cells. *Physiol. Plant* 137(4):427-34.
- Deacon, J. (2006). Fungal Biology. In J. Deacon, *Fungal Biology* (old.: 129-132).
- Doolittle, W. (1999). Lateral genomics. *Trends Cell Biol.* 9(12):M5-M9.
- Doolittle, W. F. (1998). You are what you eat: a gene transfer ratchet could account for bacterial genes in eukaryotic nuclear genomes. *Trends Genet.* 14(8):307-11.
- Drouin, G., Godin, J.-R., & Pagé, B. (2011). The Genetics of Vitamin C Loss in Vertebrates. *Curr. Genomics* 12(5): 371–378.
- Druzhinina, I. S., Kubicek, E. M., & Kubicek, C. P. (2016). Several steps of lateral gene transfer followed by events of ‘birth-and-death’ evolution shaped a fungal sorbicillinoid biosynthetic gene cluster. *BMC Evol. Biol.* 16:269.
- Duarte, M., Peters, M., Schulte, U., & Videira, A. (2003). The internal alternative NADH dehydrogenase of *Neurospora crassa* mitochondria. *Biochem. J.* 371, 1005–1011.
- Duarte, E.A.A., Damasceno, C.L., de Oliveira, T.A.S., Barbosa, L.O., Martins, F.M., de Queiroz, Silva, JR., de Lima, T.E.F., da Silva, R.M., Kato, R.B., Bortolini, D.E., Azevedo, V., Góes-Neto, A., Soares, A.C.F. (2018). Putting the mess in order: *Aspergillus welwitschiae* (and Not A.

- niger*) is the etiological agent of sisal bole rot disease in Brazil. *Front. Microbiol.* 9:1227.
- Edrich, E. S., Duvenage, L., & Gourlay, C. W. (2024). Alternative Oxidase – Aid or obstacle to combat the rise of fungal pathogens? *BBA - Bioenergetics* 1865, 149031.
- Eichinger, L., Pachebat, J. A., Glöckner, G., Rajandream, M.-A., Sucgang, R., Berriman, M., . . . Kuspa, A. (2005). The genome of the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Nature* 435(7038):43-5.
- El-Khoury, R., Dufour, E., Rak, M., Ramanantsoa, N., Grandchamp, N., Csaba, Z. et al. (2013). Alternative oxidase expression in the mouse enables bypassing cytochrome c oxidase blockade and limits mitochondrial ROS overproduction. *PLoS Genet.* 9(1):e1003182.
- El-Khoury, R., Kaulio, E., Lassila, K. A., Crowther, D. C., Jacobs, H. T., & Rustin, P. (2016). Expression of the alternative oxidase mitigates beta-amyloid production and toxicity in model systems. *Free Radic. Biol. Med.* 96:57-66.
- El-Khoury, R., Rak, M., B'énit, P., Jacobs, H. T., & Rustin, P. (2022). Cyanide resistant respiration and the alternative oxidase pathway: A journey from plants to mammals. *BBA - Bioenergetics* 1863, 148567.
- Fernandez-Ayala, D. J., Sanz, A., Vartiainen, S., Kemppainen, K. K., Babusiak, M., Mustalahti, E., . . . Jacobs, H. T. (2009). Expression of the *Ciona intestinalis* alternative oxidase (AOX) in *Drosophila complements* defects in mitochondrial oxidative phosphorylation. *Cell Metab.* 9(5):449-60.
- Fitzpatrick, D. A. (2012). Horizontal gene transfer in fungi. *FEMS Microbiol. Lett.* 329, 1-8.
- Flipphi, M., Márton, A., Bíró, V., Ág, N., Sándor, E., Fekete, E., & Karaffa, L. (2023). Generation, transfer, and loss of alternative oxidase paralogues in the *Aspergillaceae* Family. *J. Fungi* 9, 1195.
- Flipphi, M., Márton, A., Bíró, V., Ág, N., Sándor, E., Fekete, E., & Karaffa, L. (2023). Mutations in the second alternative oxidase gene: A new approach to group *Aspergillus niger* strains. *J. Fungi* 9, 570.
- Glampedakis, E., Cassaing, S., Fekkar, A., Dannaoui, E., Bougnoux, M. E., Bretagne, S. et al. (2021). Invasive aspergillosis due to *Aspergillus*

- section *Usti*: a multicenter retrospective study. *Clin. Infect. Dis.* 72(8), 1379-1385.
- Glampedakis, E., Erard, V., & Lamoth, F. (2020). Clinical relevance and characteristics of *Aspergillus calidoustus* and other *Aspergillus* species of section *Usti*. *J. Fungi* 6(2), 84.
- Gonçalves, A. P., & Videira, A. (2015). Mitochondrial type II NAD(P)H dehydrogenases in fungal cell death. *Microbial Cell.* 2(3): 68-73.
- Gospodaryov, D. V., Strilbytska, O. M., Semaniuk, U. V., Perkhulyn, N. V., Rovenko, B. M., Yurkevych, I. S. et al. (2020). Alternative NADH dehydrogenase extends lifespan and increases resistance to xenobiotics in *Drosophila*. *Biogerontology* 21:155–171.
- Grandier-Vazeille, X., Bathany, K., Chaignepain, S., Camougrand, N., Manon, S., & Schmitter, J.-M. (2001). Yeast mitochondrial dehydrogenases are associated in a supramolecular complex. *Biochemistry* 40, 9758-9769.
- Guerrero-Castillo, S., Vázquez-Acevedo, M., González-Halphen, D., & Uribe-Carvajal, S. (2009). In *Yarrowia lipolytica* mitochondria, the alternative NADH dehydrogenase interacts specifically with the cytochrome complexes of the classic respiratory pathway. *Biochim. Biophys. Acta.* 1787(2):75-85.
- Harman, G. E., Howell, C. R., Viterbo, A., Chet, I., & Lorito, M. (2004). *Trichoderma* species—opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nat. Rev. Microbiol.* 2(1), 43-56.
- Hattori, T., Honda, Y., Kino, K., & Kirimura, K. (2008). Expression of alternative oxidase gene (*aox1*) at the stage of single-cell conidium in citric acid-producing *Aspergillus niger*. *J. Biosci. Bioeng.* Vol. 105, No. 1, 55–57.
- Heinemann, J. A., & Sprague Jr, G. F. (1989). Bacterial conjugative plasmids mobilize DNA transfer between bacteria and yeast. *Nature* 340, 205–209.
- Hernandez, O., Garcia, A. M., Almeida, A. J., Tamayo, D., Gonzalez, A., Restrepo, A., & McEwen, J. G. (2011). Gene expression during activation of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. *Yeast* 28(11):771-81.

- Honda, Y., Hattori, T., & Kirimura, K. (2012). Visual expression analysis of the responses of the alternative oxidase gene (*aox1*) to heat shock, oxidative, and osmotic stresses in conidia of citric acid-producing *Aspergillus niger*. *J. Biosci. Bioeng.* VOL. 113 No. 3, 338–342.
- Hong, S.-B., Lee, M., Kim, D.-H., Varga, J., Frisvad, J. C., Perrone, G., . . . Samson, R. A. (2013). *Aspergillus luchuensis*, an industrially important black *Aspergillus* in East Asia. *PLoS One.* 28; 8(5):e63769.
- Hou, L., Liu, L., Zhang, H., Zhang, L., Zhang, L., Zhang, J. et al. (2018). Functional analysis of the mitochondrial alternative oxidase gene (*aox1*) from *Aspergillus niger* CGMCC 10142 and its effects on citric acid production. *Appl. Microbiol. Biot.* 102:7981–7995.
- Houbraken, J., Kocsubé, S., Visagie, C., Yilmaz, N., Wang, X.-C., Meijer, M. et al. (2020). Classification of *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces* and related genera (*Eurotiales*): An overview of families, genera, subgenera sections, series and species. *Stud. Mycol.* 95:5–169.
- Huang, X., Rad, U. v., & Durner, J. (2002). Nitric oxide induces transcriptional activation of the nitric oxide-tolerant alternative oxidase in *Arabidopsis* suspension cells. *Planta* Vol. 215, pages 914–923.
- Huh, W.-K., & Kang, S.-O. (1999). Molecular cloning and functional expression of alternative oxidase from *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* 181(13):4098-102.
- Huh, W.-K., & Kang, S.-O. (2001). Characterization of the gene family encoding alternative oxidase from *Candida albicans*. *Biochem. J.* 356, 595–604.
- Huh, W.-K., & Kang, S.-O. (1999). Molecular cloning and functional expression of alternative oxidase from *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* 181(13):4098-102.
- Hyde, K. D. (2022). The numbers of fungi. *Fungal Diversity*, 114:1.
- Joseph-Horne, T., Hollomon, D. W., & Wood, P. M. (2001). Fungal respiration: a fusion of standard and alternative components. *Biochim. Biophys. Acta* 179-195.
- Karaffa, L., & Kubicek, C. P. (2003). *Aspergillus niger* citric acid accumulation: do we understand this well working black box? *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 61:189–196.

- Karaffa, L., & Kubicek, C. P. (2019). Citric acid and itaconic acid accumulation: variations of the same story? *Appl. Microbiol. Biot.* 103:2889–2902.
- Karaffa, L., & Kubicek, C. P. (2021). Production of organic acids by fungi. In O. Zaragoza, & A. Casadevall, *Encyclopedia of Mycology* (old.: Vol. 2. 406-419). Amsterdam: Elsevier.
- Karaffa, L., Váczy, K., Erzsébet Sándor, S. B., Szentirmai, A., & Pócsi, I. (2001). Cyanide-resistant alternative respiration is strictly correlated to intracellular peroxide levels in *Acremonium chrysogenum*. *Free Rad. Res.* Vol. 34, pp. 405-416.
- Katoh, K., & Standley, D. M. (2013). MAFFT multiple sequence alignment software version 7: Improvements in performance and usability. *Mol. Biol. Evol.* 30, 772–780.
- Kern, A., Hartner, F. S., Freigassner, M., Spielhofer, J., Rumpf, C., Leitner, L. et al. (2007). *Pichia pastoris* "just in time" alternative respiration. *Microbiology* 153(Pt 4):1250-1260.
- Kerscher, S. J. (2000). Diversity and origin of alternative NADH:ubiquinone oxidoreductases. *Biochim. Biophys. Acta* 1459 , 274-283.
- Kirimura, K., Ogawa, S., Hattori, T., & Kino, K. (2006). Expression analysis of alternative oxidase gene (*aox1*) with enhanced green fluorescent protein as marker in citric acid-producing *Aspergillus niger*. *J. Biosci. Bioeng.* Vol. 102, No. 3, 210–214.
- Kirimura, K., Yoda, M., & Usami, S. (1999). Cloning and expression of the cDNA encoding an alternative oxidase gene from *Aspergillus niger* WU-2223L. *Curr. Genet.* 34: 472–477.
- Kozma, J., & Karaffa, L. (1996). Effect of oxygen on the respiratory system and cephalosporin-C production in *Acremonium chrysogenum*. *J. Biotechnol.* 48, 59–66.
- Lallemand, T., Leduc, M., Landès, C., Rizzon, C., & Lerat, E. (2020). An overview of duplicated gene detection methods: Why the duplication mechanism has to be accounted for in their choice. *Genes* 11, 1046 .
- Larosa, V., & Remacle, C. (2018). Insights into the respiratory chain and oxidative stress. *Biosci. Rep.* 38 (5): BSR20171492.

- Larsson, C., Pahlman, I.-L., Ansell, R., Rigoulet, M., Adler, L., & Gustafsson, L. (1998). The importance of the glycerol 3-phosphate shuttle during aerobic growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 14: 347–357.
- Le Pape, P., Ximenes, R. M., Ariza, B., Iriarte, J., Alvarado, J., Robert, E. et al. (2019). First case of *Aspergillus caelatus* airway colonization in a Chronic Obstructive Pulmonary Disease patient. *Int. J. Infect. Dis.* 81, 85-90.
- Li, Q., Abrashev, R., Harvey, L. M., & McNeil, B. (2008). Oxidative stress-associated impairment of glucose and ammonia metabolism in the filamentous fungus, *Aspergillus niger* B1-D. *Mycol. Res.* 112(Pt 9):1049-55.
- Li, Q., Bai, Z., O'Donnell, A., A, L. M., Hoskisson, & McNeil, B. (2011). Oxidative stress in fungal fermentation processes: the roles of alternative respiration. *Biotechnol. Lett.* 33:457–467.
- Li, Q., Harvey, L. M., & McNeil, B. (2009). Oxidative stress in industrial fungi. *Crit. Rev. Biotechnol.* 29(3):199-213.
- Li, W., Sun, L., Liang, Q., Wang, J., Mo, W., & Zhou, B. (2006). Yeast AMID homologue Ndi1p displays respiration-restricted apoptotic activity and is involved in chronological aging. *Mol. Biol. Cell.* 17(4): 1802–1811.
- Loftus, B., Anderson, I., Davies, R., Alsmark, U. C., Samuelson, J., Amedeo, P. et al. (2005). The genome of the protist parasite *Entamoeba histolytica*. *Nature* 433(7028):865-8.
- Long, M., Betrán, E., Thornton, K., & Wang, W. (2003). The origin of new genes: glimpses from the young and old. *Nat. Rev. Genet.* 4:865–875.
- Loron, C. C., François, C., Rainbird, R. H., Turner, E. C., Borensztajn, S., & Javaux, E. J. (2019). Early fungi from the Proterozoic era in Arctic. *Nature* 570, 232-235.
- Lucas, J. A., Hawkins, N. J., & Fraaije, B. A. (2015). Chapter Two - The Evolution of Fungicide Resistance. *Adv. App. Microbiol.* 90: 29-92.
- Lynch, M., & Conery, J. S. (2000). The evolutionary fate and consequences of duplicate genes. *Science* 290(5494):1151-5.
- Magadum, S., Banerjee, U., & Murugan, P. (2013). Gene duplication as a major force in evolution. *J. Genet.* 92, 155–161.

- Magnani, T., Soriani, F. M., Martins, V. d., Policarpo, A. C., Sorgi, C. A., Faccioli, L. H., . . . Uyemura, S. A. (2008). Silencing of mitochondrial alternative oxidase gene of *Aspergillus fumigatus* enhances reactive oxygen species production and killing of the fungus by macrophages. *J. Bioenerg. Biomembr.* 40:631–636.
- Marcet-Houben, M., & Gabaldo'n, T. (2011). Evolution of Fungi and Their Respiratory Metabolism. In *Evolutionary Biology – Concepts, Biodiversity, Macroevolution and Genome Evolution* (old.: Chapter 15. 257-272).
- Martins, V. d., Dinamarco, T. M., Curti, C., & Uyemura, S. A. (2011). Classical and alternative components of the mitochondrial respiratory chain in pathogenic fungi as potential therapeutic targets. *J. Bioenerg. Biomembr.* 43:81-88.
- Matus-Ortega, M. G., Cárdenas-Monroy, C. A., Flores-Herrera, O., Mendoza-Hernández, G., Miranda, M., González-Pedrajo, B. et al. (2015). New complexes containing the internal alternative NADH dehydrogenase (Ndi1) in mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 32: 629–641.
- McDonald, A. E. (2008). Alternative oxidase: an inter-kingdom perspective on the function and regulation of this broadly distributed ‘cyanide-resistant’ terminal oxidase. *Funct.l Plant Biol.* 35, 535-552.
- McDonald, A. E., & Vanlerberghe, G. C. (2006). Origins, evolutionary history, and taxonomic distribution of alternative oxidase and plastoquinol terminal oxidase. *Comp. Biochem. Physiol. D.* 1(3), 357-364.
- Melo, A. M., Bandejas, T. M., & Teixeira, M. (2004). New Insights into Type II NAD(P)H:Quinone Oxidoreductases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68(4):603.
- Minagawa, N., Koga, S., Nakano, M., Sakajo, S., & Yoshimoto, A. (1992). Possible involvement of superoxide anion in the induction of cyanide-resistant respiration in *Hansenula anomala*. *FEBS Letters* 302(3): 217-219.
- Molnár, Á. P., Németh, Z., Fekete, E., Flipphi, M., Keller, N. P., & Karaffa, L. (2018). Analysis of the relationship between alternative respiration and serigmatocystin formation in *Aspergillus nidulans*. *Toxins* 10, 168 .

- Molnár, Á. P., Németh, Z., Kolláth, I. S., Fekete, E., Flippi, M., Ág, N. et al. (2018). High oxygen tension increases itaconic acid accumulation, glucose consumption, and the expression and activity of alternative oxidase in *Aspergillus terreus*. *Appl. Microbiol. Biotech.* 102:8799–8808.
- Murakami, K., & Yoshino, M. (1997). Inactivation of aconitase in yeast exposed to oxidative stress. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 41(3):481-6.
- Ndagijimana, M., Chaves-López, C., Corsetti, A., Tofalo, R., Sergi, M., Paparella, A., ... & Suzzi, G. (2008). Growth and metabolites production by *Penicillium brevicompactum* in yoghurt. *Int. J. Food Microbiol.* 127(3), 276-283.
- Nevoigt, E., Fassbender, A., & Stahl, U. (2000). Cells of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* are transformable by DNA under non-artificial conditions. *Yeast* 16(12):1107-10.
- Novo, M., Bigey, F., Beyne, E., Galeote, V., Gavory, F., Mallet, S., . . . Dequin, S. (2009). Eukaryote-to-eukaryote gene transfer events revealed by the genome sequence of the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae* EC1118. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106(38):16333-8.
- O'Donnell, A., Bai, Y., Bai, Z., McNeil, B., & Harvey, L. M. (2007). Introduction to bioreactors of shake-flask inocula leads to development of oxidative stress in *Aspergillus niger*. *Biotechnol. Lett.* 29, 895–900.
- Ohno, S. (1970). *Evolution by Gene Duplication*. New York: Springer science+ business media .
- Oliveira, P. J., Santos, D. J., & Moreno, A. J. (2000). Carvedilol inhibits the exogenous NADH dehydrogenase in rat heart mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* 374(2):279-285.
- Orville Hernández Ruiz, A. G., Almeida, A. J., Tamayo, D., Garcia, A. M., Restrepo, A., & McEwen, J. G. (2011). Alternative oxidase mediates pathogen resistance in *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 5(10): e1353.
- Pel, H. J., Winde, J. H., Archer, D. B., Dyer, P. S., Hofmann, G., Schaap, P. J. et al. (2007). Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory *Aspergillus niger* CBS 513.88. *Nat. Biotechnol.* 25(2):221-31.

- Pennisi, R., Salvi, D., Brandi, V., Angelini, R., Ascenzi, P., & Polticelli, F. (2016). Molecular evolution of alternative oxidase proteins: A phylogenetic and structure modeling approach. *J. Mol. Evol.* 82:207–218.
- Pérez-Sánchez, A., Uribe-Carvajal, S., Cabrera-Orefice, A., & Barrios-González, J. (2017). Key role of alternative oxidase in lovastatin solid-state fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 101:7347–7356.
- Pu, X.-j., Lv, X., & Lin, H.-h. (2015). Unraveling the evolution and regulation of the alternative oxidase gene family in plants. *Dev. Genes Evol.* 225:331–339.
- Read, N. D., Lichius, A., Shoji, J.-y., & Goryachev, A. B. (2009). Self-signalling and self-fusion in filamentous fungi. *Curr. Opin. Microbiol.* 12(6):608-15.
- Reinfurt, A., Fritsche, S., Bíró, V., Márton, A., Ellena, V., Fekete, E. et al. (2023). Manganese(II) ions suppress the transcription of the citrate exporter encoding gene *cexA* in *Aspergillus niger*. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 11:1292337.
- Rich, P. R., & Maréchal, A. (2010). The mitochondrial respiratory chain. *Essays Biochem.* 47. 1-23.
- Ricquier, D., & Bouillaud, F. (2000). The uncoupling protein homologues: UCP1, UCP2, UCP3, StUCP and AtUCP. *Biochem. J.* 345, 161–179 .
- Rogov, A. G., & Zvyagilskaya, R. A. (2015). Physiological role of alternative oxidase (from Yeasts to Plants). *Biochemistry (Moscow)* Vol. 80, No. 4, pp. 400-407.
- Rogov, A. G., Sukhanova, E. I., Uralskaya, L. A., Aliverdieva, D. A., & Zvyagilskaya, R. A. (2014). Alternative oxidase: distribution, induction, properties, structure, regulation, and functions. *Biochemistry (Moscow)*, Vol. 79, No. 13, pp. 1615-1634.
- Rogozin, I. B., Carmel, L., Csuros, M., & Koonin, E. V. (2012). Origin and evolution of spliceosomal introns. *Biol. Direct* 7,11.
- Saari, S., Garcia, G. S., Bremer, K., Chioda, M. M., Andjelković, A., Debes, P. V. et al. (2019). Alternative respiratory chain enzymes: Therapeutic potential and possible pitfalls. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis. Dis.* 1865(4):854-866.

- Samuels, G. J., Ismaiel, A., Bon, M.-C., Respinis, S. D., & Petrini, O. (2010). *Trichoderma asperellum sensu lato* consists of two cryptic species. *Mycologia*, 102:4, 944-966.
- Searle, S. Y., Thomas, S., Griffin, K. L., Horton, T., Kornfeld, A., Yakir, D. et al. (2011). Leaf respiration and alternative oxidase in field-grown alpine grasses respond to natural changes in temperature and light. *New Phytol.* 189(4):1027-1039.
- Seekles, S. J., Punt, M., Savelkoel, N., Houbraeken, J., Wösten, H. A., Ohm, R. A., & Ram, A. F. (2022). Genome sequences of 24 *Aspergillus niger sensu stricto* strains to study strain diversity, heterokaryon compatibility, and sexual reproduction. *G3* 12(7), jkac124.
- Selinski, J., Scheibe, R., Day, D. A., & Whelan, J. (2018 ). Alternative oxidase is positive for plant performance. *Trends Plant Sci.* 23(7):588-597.
- Seroy, J., Antiporta, P., Grim, S. A., Proia, L. A., Singh, K., & Clark, N. M. (2017). *Aspergillus calidoustus* case series and review of the literature. *Transpl. Infect. Dis.* 19(5), e12755.
- Seo, B. B., Kitajima-Ihara, T., Chan, E. K., Scheffler, I. E., Matsuno-Yagi, A., & Yagi, T. (1998). Molecular remedy of complex I defects: Rotenone-insensitive internal NADH-quinone oxidoreductase of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria restores the NADH oxidase activity of complex I-deficient mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95(16): 9167–9171.
- Seo, B. B., Matsuno-Yagi, A., & Yagi, T. (1999). Modulation of oxidative phosphorylation of human kidney 293 cells by transfection with the internal rotenone-insensitive NADH-quinone oxidoreductase (NDI1) gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1412(1):56-65.
- Shamima Akhter, H. C., Gorlach, J. M., Heinrich, G., Cox, G. M., & Perfect, J. R. (2003). Role of alternative oxidase gene in pathogenesis of *Cryptococcus neoformans*. *Infect. Immun.* 71(10): 5794–5802.
- Sharma, R., Gibb, A. A., Barnts, K., Elrod, J. W., & Puri, S. (2023). Alternative oxidase promotes high iron tolerance in *Candida albicans*. *Microbiol. Spectr.* 11(6):e0215723.

- Shimizu, M., Kusuya, Y., Alimu, Y., Bian, C., Takahashi, H., & Yaguchi, T. (2019). Draft genome sequence of *Aspergillus awamori* IFM 58123NT. *Microbiol. Resour. Announc.* 8(4): e01453-18.
- Soler-Hurtado, M. M., Sandoval-Sierra, J. V., Machordom, A., & DieÂguez-Uribeondo, J. (2016). *Aspergillus sydowii* and other potential fungal pathogens in gorgonian octocorals of the Ecuadorian Pacific. *Ecuadorian Pacific. PLoS ONE* 11(11): e0165992.
- Solis, N. V., Wakade, R. S., Filler, S. G., & Krysan, D. J. (2023). *Candida albicans* oropharyngeal infection is an exception to iron-based nutritional immunity. *mBio.* 14(2):e0009523.
- Songserm, P., Srimongkol, P., Thitiprasert, S., Tanasupawat, S., Cheirsilp, B., Assabumrungrat, S. et al. (2020). Differential gene expression analysis of *Aspergillus terreus* reveals metabolic response and transcription suppression under dissolved oxygen and pH stress. *J. Evol. Biochem. Phys.* Vol. 56, No. 6, pp. 577–586.
- Steenwyk, J. L., Shen, X.-X., Lind, A. L., Goldman, G. H., & Rokasa, A. (2019). A robust phylogenomic time tree for biotechnologically and medically important fungi in the genera *Aspergillus* and *Penicillium*. *mBio.*, 10:e00925-19.
- Stéphanie, G., Jean-François, D., Vincent, L., Maria, A., Wim, H., & Olivier, G. (2008). New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: Assessing the performance of PhyML 3.0. *Mol. Biol. Evol.* 25, 1307-1320.
- Sumida, C. H., Daniel, J. F., Araujod, A. P. C., Peitl, D. C., Abreu, L. M., Dekker, R. F., & Canteri, M. G. (2018). *Trichoderma asperelloides* antagonism to nine *Sclerotinia sclerotiorum* strains and biological control of white mold disease in soybean plants. *Biocontrol Sci. Tech.* 28(2), 142-156.
- Sun, J., Lu, X., Rinas, U., & Zeng, A. P. (2007). Metabolic peculiarities of *Aspergillus niger* disclosed by comparative metabolic genomics. *Genome Biol.* 8, 1-13.
- Suryanarayan, S. (2003). Current industrial practice in solid state fermentations for secondary metabolite production: the Biocon India experience. *Biochem. Eng. J.* 13(2-3):189-195.

- Szibor, M., Schenkl, C., Barsottini, M. R., Young, L., & Moore, A. L. (2022). Targeting the alternative oxidase (AOX) for human health and food security, a pharmaceutical and agrochemical target or a rescue mechanism? *Biochem. J.* 479 1337–1359.
- Takaya, N. (2009). Response to hypoxia, reduction of electron acceptors and subsequent survival by filamentous fungus. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 73 (1) 1-8.
- Tian, F., Lee, S. Y., Woo, S. Y., & Chun, H. S. (2020). Alternative oxidase: A potential target for controlling aflatoxin contamination and propagation of *Aspergillus flavus*. *Front. Microbiol.* 11:419.
- Tudella, V. G., Curti, C., Soriani, F. M., Santos, A. C., & Uyemura, S. A. (2003). In situ evidence of an alternative oxidase and an uncoupling protein in the respiratory chain of *Aspergillus fumigatus*. *Int. J. Biochem. Cell B.* 36, 162–172.
- Veiga, A., Arrabaça, J. D., & Loureiro-Dias, M. C. (2003). Cyanide-resistant respiration, a very frequent metabolic pathway in yeasts. *FEMS Yeast Res.* 3(3): 239-245.
- Veiga, A., Arrabaça, J., & Loureiro-Dias, M. (2003). Stress situations induce cyanide-resistant respiration in spoilage yeasts. *J. Appl. Microbiol.* 95(2): 364-371.
- Vicente, C., Costa, J. H., & Arnholdt-Schmitt, B. (2015). Bacterial AOX: a provocative lack of interest! In *Alternative Respiratory Pathways in Higher Plants* (old.: Chapter 14.5).
- Voulgaris, I., O'Donnell, A., Harvey, L. M., & McNeil, B. (2012). Inactivating alternative NADH dehydrogenases: enhancing fungal bioprocesses by improving growth and biomass yield? *Sci. Rep.* 2 322.
- Weaver, R. J., & McDonald, A. E. (2023). Mitochondrial alternative oxidase across the tree of life: Presence, absence, and putative cases of lateral gene transfer. *BBA-Bioenergetics* 1864(4), 149003.
- Wiesława Jarmuszkiewicz, G. M., Fortes, F., Schreiber, A. Z., Sluse, F. E., & Vercesi, A. E. (2000). First evidence and characterization of an uncoupling protein in fungi kingdom: CpUCP of *Candida parapsilosis*. *Febs Lett.* 467(2-3):145-149.

- Williams, B. A., Elliot, C., Burri, L., Kido, Y., Kita, K., Moore, A. L., & Keeling, P. J. (2010). A Broad distribution of the alternative oxidase in *Microsporidian* parasites. *PLoS Pathog.* 6(2): e1000761.
- Wright, J. A., Richards, T., & Srail, S. K. (2014). The role of iron in the skin and cutaneous wound healing. *Front. Pharmacol.* 5: 156.
- Wu, M., Xu, L.-G., Li, X., Zhai, Z., & Shu, H.-B. (2002). AMID, an apoptosis-inducing factor-homologous mitochondrion-associated protein, induces caspase-independent apoptosis. *J. Biol. Chem.* 277(28):25617-23.
- Yan, L., Li, M., Cao, Y., Gao, P., Cao, Y., Wang, Y., & Jiang, Y. (2009). The alternative oxidase of *Candida albicans* causes reduced fluconazole susceptibility. *J. Antimicrob. Chemoth.* 64(4): 764-773.
- Yoshioka, I., Kobayashi, K., & Kirimura, K. (2020). Overexpression of the gene encoding alternative oxidase for enhanced glucose consumption in oxalic acid producing *Aspergillus niger* expressing oxaloacetate hydrolase gene. *J. Biosci. Bioeng.* 129 (2): 172-176 .
- Young, L., Shiba, T., Harada, S., Kita, K., Albury, M. S., & Moore, A. L. (2013). The alternative oxidases: simple oxidoreductase proteins with complex functions. *Biochem. Soc. Trans.* 41, 1305-1311.
- Zehentgruber, O., Kubicek, C., & Rohr, M. (1980). Alternative respiration of *Aspergillus niger*. *FEMS Microbiol. Lett.* 8, 71-74.
- Zhang, J. (2003). Evolution by gene duplication: an update. *Trends Ecol. Evol.* 19(6):292-298.
- Zhou, Z., Takaya, N., Nakamura, A., Yamaguchi, M., Takeo, K., & Shoun, H. (2002). Ammonia fermentation, a novel anoxic metabolism of nitrate. *J. Biol. Chem.* Vol. 277, No. 3, Issue of January 18, pp. 1892–1896.
- Zhu, Y., Lu, J., Wang, J., Chen, F., Leng, F., & Li, H. (2011). Regulation of thermogenesis in plants: the interaction of alternative oxidase and plant uncoupling mitochondrial protein. *J. Integr. Plant. Biol.* 53(1):7-13.

## 11. Tudományos tevékenység

### Az értekezés alapját képező publikációk:

Flippi\*, M., **Márton\***, A., Bíró, V., Ág, N., Sándor, E., Fekete, E., & Karaffa, L. (2023). Mutations in the second alternative oxidase gene: a new approach to group *Aspergillus niger* strains. *Journal of Fungi*, 9(5), 570.

Flippi\*, M., **Márton\***, A., Bíró, V., Ág, N., Sándor, E., Fekete, E., & Karaffa, L. (2023). Generation, transfer, and loss of alternative oxidase paralogues in the *Aspergillaceae* family. *Journal of Fungi*, 9(12), 1195.

\*megosztott elsőszereplőség (joint first authorship)

### További közlemények:

Reinfurt, A., Fritsche, S., Bíró, V., **Márton, A.**, Ellena, V., Fekete, E., Sándor, E., Karaffa, L. & Steiger, M. G. (2023). Manganese (II) ions suppress the transcription of the citrate exporter encoding gene *cexA* in *Aspergillus niger*. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 11.

Fekete, E., Bíró, V., **Márton, A.**, Bakondi-Kovács, I., Németh, Z., Sándor, E., Kovács, B., Fábrián, I., Kubicek, C.P., Tsang, A. & Karaffa, L. (2022). Bioreactor as the root cause of the “manganese effect” during *Aspergillus niger* citric acid fermentations. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10, 935902.

## Az értekezés témájában elhangzott előadások

### **Márton Alexandra**

Egy alternatív terminális oxidázt kódoló gén (*aoxb*) filogenetikája és evolúciója az *Aspergillus* genusban. (2022)

Előadás, 'Rising Stars 2022' – Tehetséges fiatal biológusok bemutatkozása, MTA DAB Székház, Csokonai Terem

**Márton Alexandra**; Bíró Vivien; Kramcsák Katica; Kun Andrea; Fekete Erzsébet; Michel Flipphi; Karaffa Levente

A második alternatív oxidáz enzimet kódoló *aoxb* gén mutációi *Aspergillus niger* gombában. Paper: FKE-4 (2022)

Előadás, A Magyar Mikrobiológiai Társaság 2022. évi Nagygyűlése és a XV. Fermentációs Kollokvium, Kecskemét

**Alexandra Márton**; Michel Flipphi; Vivien Bíró; Norbert Ág; Viktória Ág - Rácz; Erzsébet Fekete; Levente Karaffa

Mutations in the second alternative oxidase gene: a new approach to group *Aspergillus niger* strains. Paper: BSP-3 (2023)

Előadás, 19<sup>th</sup> International Congress of the Hungarian Society for Microbiology, Eötvös Loránd University, Budapest, Hungary, 2023

**Márton Alexandra**; Bíró Vivien; Flipphi Michel; Fekete Erzsébet; Karaffa Levente

Insights into the evolution and mutations of second alternative oxidase genes in *Aspergillaceae*

Előadás, 6<sup>th</sup> National Conference of Young Biotechnologists, HUN-REN ATK Martonvásár, 4-5. April 2024

## **Az értekezés témájával kapcsolatos poszterek**

**Márton Alexandra**; Bíró Vivien; Fejes Balázs; Fekete Erzsébet; My Pham Thi Thanh; Adrian Tsang; Karaffa Levente

Alternatív oxidázok szerepe az *Aspergillus niger* citromsav termelésében (2020)

Poszter, A Magyar Mikrobiológiai Társaság 2020. évi Nagygyűlése és a XIV. Fermentációs Kollokvium, Aranyhomok Szálló, Kecskemét

Bíró Vivien; **Márton Alexandra**; Kramcsák Katica; Kun Andrea; Fekete Erzsébet; Flippi Michel; Karaffa Levente

Alternatív oxidáz paralóg gének *Aspergillaceae* fajokban. Paper: fkp-2 (2022) poszter, A Magyar Mikrobiológiai Társaság 2022. évi Nagygyűlése és a XV. Fermentációs Kollokvium, Aranyhomok Szálló, Kecskemét

Levente Karaffa; Flippi Michel; **Alexandra Márton**; Vivien Bíró; István Bakondi-Kovács; Viktória Ág-Rácz; Norbert Ág; Erzsébet Fekete

Second Alternative Oxidase Genes in *Aspergillaceae*: Genesis, Loss and Mutations. Paper: 782A (2024)

poszter, GSA – The 32th Fungal Genetics Conference at Asilomar, Pacific Grove, CA, Egyesült Államok, március 13, 2024

## **Az értekezéshez szorosan nem kapcsolódó előadások és poszterek**

Bíró Vivien; **Márton Alexandra**; Fekete Erzsébet; Karaffa Levente  
Az *Aspergillus terreus* itakonsav fermentáció mangán (II) ion érzékenységének vizsgálata (2020)

Előadás, A Magyar Mikrobiológiai Társaság 2020. évi Nagygyűlése és a XIV. Fermentációs Kollokvium, Aranyhomok Szálló, Kecskemét

Karaffa Levente; **Márton Alexandra**; Bíró Vivien; Bakondi-Kovács István; Fekete Erzsébet

Bioreactor as a source of manganese (II) ion contamination during citric acid fermentation by *Aspergillus niger*

Előadás, „FIBOK 2022”: Fiatal Biotechnológusok V. Országos Konferenciája Gödöllő, Magyarország: MATE Genetika és Biotechnológia Intézet (2022)  
125 p. pp. 75-75. Paper: EEM#, 1 p.

Bíró Vivien; **Márton Alexandra**; Kramcsák Katica; Kun Andrea; Fekete Erzsébet; Flipphe Michel; Karaffa Levente

Fémionok szerepe a citromsav és az itakonsav túltermelésében paper: fke-2 (2022)

Előadás, A Magyar Mikrobiológiai Társaság 2022. évi Nagygyűlése és a XV. Fermentációs Kollokvium, Aranyhomok Szálló, Kecskemét

Levente Karaffa; Vivien Bíró; **Alexandra Márton**; István Bakondi-Kovács; Andrea Kun; Erzsébet Fekete; Christian Peter Kubicek; Adrian Tsang  
The „manganese effect” during *Aspergillus niger* citric acid fermentation is dependent on the cultivation stage. Paper: cs3.2.2 (2023)

Előadás, 16<sup>th</sup> European Conference on Fungal Genetics, Innsbruck, Austria

Erzsébet Fekete; Norbert Ág; Viktória Ág-Rácz; **Alexandra Márton**; Vivien Bíró; Michel Flipphe; Levente Karaffa

Continual propagation of [D1,2] stwintrons in divergent *Xylariales* Paper: 60 (2024)

Előadás, GSA – The 32th Fungal Genetics Conference at Asilomar, Pacific Grove, CA, Egyesült Államok, március 13, 2024, RNA Biology

**Alexandra Márton**; Vivien Bíró; István Bakondi-Kovács; Erzsébet Fekete; Levente Karaffa

The final 30 percent: optimizing the *Aspergillus niger* citric acid fermentation up to the theoretical maximum. Paper: IMP-7 (2021)  
Poszter, 6th Central European Forum for Microbiology, CEFORM 2021, Aranyhomok szálló, Kecskemét

**Márton Alexandra**; Bíró Vivien; Kramcsák Katica; Kun Andrea; Fekete Erzsébet; Karaffa Levente

A saválló acél minőségének és a termék hozamának kapcsolata *Aspergillus niger* citromsav fermentáció során. Paper: fkp-3 (2022)  
Poszter, A Magyar Mikrobiológiai Társaság 2022. évi Nagygyűlése és a XV. Fermentációs Kollokvium, Aranyhomok Szálló, Kecskemét

Aline Reinfurt; Vivien Bíró; **Alexandra Márton**; Valeria Ellena; Erzsébet Fekete; Levente Karaffa; Matthias Steiger

Manganese and its regulatory role on the citrate transporter *cexa* – exploring the citric acid production mechanism of *Aspergillus niger*. Paper: cs3.2.3 (2023)

Poszter, 16<sup>th</sup> European Conference on Fungal Genetics, Innsbruck, Austria

Vivien Bíró; **Alexandra Márton**; István Bakondi-Kovács; Andrea Kun; Erzsébet Fekete; Christian Peter Kubicek; Levente Karaffa

Trace metal ions in fungal organic acid fermentations. paper: cs3.2.22 (2023)  
Poszter, 16<sup>th</sup> European Conference on Fungal Genetics, Innsbruck, Austria

Erzsébet Fekete; Norbert Ág; Viktória Ág-Rácz; **Alexandra Márton**; Vivien Bíró; Michel Flippi; Levente Karaffa

Continual propagation of [D1,2] stwintrons in divergent *Xylariales*. Paper: 417A (2024)

Poszter, GSA – The 32th Fungal Genetics Conference at Asilomar, Pacific Grove, CA, Egyesült Államok, March 13, 2024, RNA Biology

Levente Karaffa; Vivien Bíró; **Alexandra Márton**; István Bakondi-Kovács, Nicholas Geoffrion; Adrian Tsang; Christian P. Kubicek; Erzsébet Fekete  
Transcriptome analysis of manganese(II) ion depletion during high-yield citric acid fermentation in *Aspergillus niger*. Paper: 29 (2024)

Poszter, The 20th International Aspergillus Meeting, Asperfest20, March 11-12, 2024, Asilomar Conference Center, Pacific Grove CA, USA

Bíró Vivien; **Márton Alexandra**; Fekete Erzsébet; Karaffa Levente  
Manganese effect on citric acid production by *Aspergillus niger*: unlocking an efficiency boosting hidden key

Poszter, 6<sup>th</sup> National Conference of Young Biotechnologists, HUN-REN ATK Martonvásár, 4-5. April 2024

## 12. Köszönetnyilvánítás

Hatalmas köszönettel tartozom **Prof. Dr. Karaffa Levente**, tanszékvezető egyetemi tanárnak, témavezetőmnek, amiért már BSc-s hallgatóként bizalmat szavazott nekem, és hallgatói pályámon egyengette utamat. Hasonló köszönet illeti **Prof. Dr. Fekete Erzsébet** egyetemi tanárt, aki mondhatni második témavezetőmként támogatott kutatásaim során. Köszönöm Nektek a fejlődési lehetőséget, a beszélgetéseket, szakmai konzultációkat, tanszéki bulikat; Nélkületek nem tarthatnék itt.

Hálás köszönettel tartozom **Dr. Michel Flippi** egyetemi tanársegédnek, akivel együtt dolgoztunk a doktori értekezésem alapjául szolgáló cikkeken és megmutatta a bioinformatikában rejlő lehetőségeket. Thank you Michel, thanks for your advices and patience!

Szeretném megköszönni **Fekete Zoltán** tanszéki mérnöknek a sok segítséget és természetesen a kávézásokat! Köszönöm minden jelenlegi és volt Tanszéki dolgozónak, szakdolgozómnak, volt PhD hallgatótársaimnak a segítséget kiemelve **Dr. Ág Norbertet, Dr. Szabó-Pénzes Fruzsínát, Dr. Kavalecz Napsugarat, Dr. Kolláth István Sándort és Dr. Németh Zoltánt.**

Köszönöm szüleimnek, nagymamámnak, testvéremnek, **Nikinek** és barátaimnak, **Stanczinak, Reninek, Szandinak és Pattinak**, hogy egy-egy biztató szóval mindig támogattak az utam során.

Végül de nem utolsó sorban, a legnagyobb hálával **Bíró Vivien** egyetemi tanársegédnek tartozom, aki mindig mellettem állt kutatótársamként és barátként is. A bizonyos „*terreus*” kísérlet óta, verhetetlen csapatot alkotva a Tanszék oszlopos tagjaivá váltunk, ami egymás segítése nélkül nem valósulhatott volna meg. A kísérletek közös megbeszélése, kivitelezése hozzájárult nem csak szakmai, de személyiségem fejlődéséhez is, a közös sörözések pedig minden mélypontból kihúztak. Köszönök mindent!

## 13. Mellékletek

### 13.1 Felhasznált primerek

6. táblázat *A. niger* törzsekhez használt primerpárok

Törzs	Primer	Szekvencia (5'-)
<i>A. niger</i> ATCC 1015 <i>aoxB</i> és cDNS	1015- <i>aoxB</i> -5prime-Fw1	CGTTCGATCTTCTCGCTAAG
	1015- <i>aoxB</i> -intern-Rv1	GTGTATAGGTAATGACAGCT
	1015- <i>aoxB</i> -intern-Fw2	GTGCACTGATTTTCGTGACTG
	1015- <i>aoxB</i> -3prime-Rv2	CCATAAAGAATAACACCTGA
	1015- <i>aoxB</i> -5prime-cDNA-Fw1	ATCCCTGCCGAGGTGTCCAA
	1015- <i>aoxB</i> -5prime-cDNA2-Fw1	GAGACAGCTATTGTCTGGAA
	1015- <i>aoxB</i> -intern-cDNA-Rv1	TGACAGCTTCTTCCTCCAGG
<i>A. niger</i> ATCC 1015 <i>andB</i> gén és cDNS	1015- <i>andB</i> -3prime-Fw1	GCTCGGTACCGAGGAAAGT
	1015- <i>andB</i> -intern-Rv1	GAGCAGAATGACACTGAGCT
	1015- <i>andB</i> -intern-Fw2	GGAAACAGTCTCTGTACATC
	1015- <i>andB</i> -5prime-Rv2	GAACCAGGCCAGATATACAGC
	1015- <i>andB</i> -5prime-cDNA1-Rv2	AGTAGAGGCAGATCCGTCAA
	1015- <i>andB</i> -5prime-cDNA2-Rv2	CCAGGCCAGATATACAGCCTA
<i>A. niger</i> CBS 554.65 <i>aoxB</i> és <i>andB</i>	1015- <i>andB</i> -3prime-Fw1	GCTCGGTACCGAGGAAAGT
	1015- <i>aoxB</i> -intern-Rv1	GTGTATAGGTAATGACAGCT
	554-65 <i>andB</i> -special-Fw1	GCAAGAGATCCTTGGTGAGT
	554-65 <i>andB</i> -special-Fw2	AGTTGCACTGTATCTCGTTG
<i>A. niger</i> CBS 147343 <i>aoxB</i>	1015- <i>aoxB</i> -5prime-Fw1	CGTTCGATCTTCTCGCTAAG
	554-65 <i>aoxB</i> -intern-Rv1	GTGTATAGGTGATGACAGCT
	1015- <i>aoxB</i> -intern-Fw2	GTGCACTGATTTTCGTGACTG
	124-48 transposon-Rv1	CTACAGGGTTACTACCTCAA
	124-48 transposon-Fw1	CCGCCTGTAGCGTTTCGAACA
	1015- <i>aoxB</i> -3prime-Rv2	CCATAAAGAATAACACCTGA
<i>A. niger</i> CBS 630.78 <i>aoxB</i>	630-78- <i>aoxB</i> -5prime-Fw1	CGTTTGATCTTCTCGCTAAG
	1015- <i>aoxB</i> -intern-Rv1	GTGTATAGGTAATGACAGCT
	1015- <i>aoxB</i> -intern-Fw2	GTGCACTGATTTTCGTGACTG
	630-78- <i>aoxB</i> -3prime-Rw2	CCATAAGAATAACACCTGAA
<i>A. niger</i> CBS 769.97 <i>aoxB</i>	630-78- <i>aoxB</i> -5prime-Fw1	CGTTTGATCTTCTCGCTAAG
	1015- <i>aoxB</i> -intern-Rv1	GTGTATAGGTAATGACAGCT
	1015- <i>aoxB</i> -intern-Fw2	GTGCACTGATTTTCGTGACTG
	630-78- <i>aoxB</i> -3prime-Rw2	CCATAAGAATAACACCTGAA

**7. táblázat** *Aspergillus* és *Penicillium* *aox* génexpresszió igazolásához használt primerpárok

<b>Törzs</b>	<b>Primer</b>	<b>Szekvencia (5'-)</b>
<i>A. terreus</i> NIH2624_A	Aterreus-aoxA-Fw	CCTCATTCAACGTTTCATCGA
	Aterreus-aoxA-Rv	CTCAAAGGTACCTGGTCCCA
	Aterreus-aoxA-Bridge-Rv	CCAGTAGCGTTTCGATCCAT
<i>A. terreus</i> NIH2624_B2-1	Aterreus-aoxB2-1-Fw	CTAAAGAGTGGACCGCTCT
	Aterreus-aoxB2-1-Rv	ATGTAGGGCATTACACAGACA
	Aterreus-aoxB1-1-Bridge-Rv	GAGGAGGGTTTCGATCCA
<i>A. oryzae</i> RIB40_A	Aoryzae-aoxA-Fw	GTAGCTTCCCAATGTCCAGT
	Aoryzae-aoxA-Rv	CACAGTCCATAATGTGGATGAC
<i>A. oryzae</i> RIB40_B2-1	Aoryzae-aoxB2-1-Fw	GTACTCTTTCTCATCTGTCTCAG
	Aoryzae-aoxB2-1-Rv	AGAGGCAGAATTCTAGACCAA
	Aoryzae-aoxB2-1-Bridge-Rv	CCAGGAGTGTCTCAATCCA
<i>P. rubens</i> NRRL1951_A	Prubens-aoxA-Fw	CTCTCTGTCATTGGTTCCATC
	Prubens-aoxA-Rv	GAGATGCTATTCAAATGACCAA
	Prubens-aoxA-Bridge-Rv	TCGAGCAGGGTTTCAATCCA
<i>Penicillium rubens</i> NRRL1951_B2-1	Prubens-aoxB2-1-Fw	CCTTGTGCAAGTCTCAAGAC
	Prubens-aoxB2-1-Rv	GATAGACCAGTTGAGGTCAA
	Prubens-aoxB2-1-Bridge-Rv	TCGAGGAGGGTTTCTATCCAT
<i>A. wentii</i> DTO 134E9_A	Awentii-aoxA-Fw	TCATCCATACGCATCAACCA
	Awentii-aoxA-Rv	CACGACGACAATGAGAAGGA
	Awentii-aoxA-Bridge-Rv	CTTCCAAAAGGGTTTCGATCCA
<i>A. wentii</i> DTO 134E9_B3	Awentii-aoxB3-Fw	CAGTATCAACTATTAAGCGACTA
	Awentii-aoxB3-Rv	CTGACATATATCCGTGGTTCG
	Awentii-aoxB3-Bridge-Rv	CTAACTGTGTTTCAATCCAGC
<i>A. calidoustus</i> SF006504_A	Acalido-aoxA-Fw	CAGTACAACACTACGATCCA
	Acalido-aoxA-Rv	CCATAGCCTTTATCGTGTCA
	Acalido-aoxA-Bridge-Rv	CCAACAACGTTTCAATCCA
<i>A. calidoustus</i> SF006504_B1	Acalido-aoxB1-Fw	TGTTTGTGCTAGCAACTTCCA
	Acalido-aoxB1-Rv	GGTAACTCCATATGAAAGTCC
	Acalido-aoxB1-Bridge-Rv	CAATCAGCGATTCAATCCAT
<i>A. calidoustus</i> SF006504_B4	Acalido-aoxB4-Fw	CTTCTCGAATTCGGTCCAT
	Acalido-aoxB4-Rv	TGTACACAACACCTCCAAC
	Acalido-aoxB4-Bridge-Rv	CCAAAAGCGTTTCGATCCA
<i>A. sydowii</i> CBS 593.65_A	Asydowii-aoxA-Fw	CGATACATCCAATATCCAACCT
	Asydowii-aoxA-Rv	CGTCTTGACCAGTGAATG

	Asydowii-aoxA-Bridge-Rv	TCCAGCAAGGTCTCGATCCAT
<i>A. sydowii</i> CBS 593.65_B2-1	Asydowii-aoxB2-1-Fw	GGTACAACCTCACAGTCAAG
	Asydowii-aoxB2-1-Rv	CAGGTCATCAAGCGTCTAC
	Asydowii-aoxB2-1-Bridge	CAAGTAGTGTTTCAATCCA
<i>A. sydowii</i> CBS 593.65_B3	Asydowii-aoxB3-Fw	CGTTACTTGTTTGTATAGACATC
	Asydowii-aoxB3-Rv	CTCAAGAAATAGAACTATCGCAA
	Asydowii-aoxB3-Bridge	CGAGGAGCGTTTCTATCCA
<i>T. asperellum</i> CBS 433.97_A	Tasperellum-aoxA-Fw	CCACAGCTATATTTAGCTTTCAC
	Tasperellum-aoxA-Rv	ACACA ACTTCGTTTCTTGAGTCT
<i>T. asperellum</i> CBS 433.97_B2-2	Tasperellum-aoxB2-2-Fw	GGATTGACATTAATAGCCAG
	Tasperellum-aoxB2-2-Rv	CACCTTGATAAAAACGGTACA
	Tasperellum-aoxB2-2-Bridge	CTAGCAGTGTCTCGATCCA

## 13.2 SRA adatok

8. táblázat SRA adatok az *aox* gén kifejeződésének igazolásához

Törzsek / gén / intron szám	exon fúzió	NCBI SRA adatbázis	SRA olvasat	Törzsek / gén / intron szám	exon fúzió	NCBI SRA adatbázis	SRA olvasat
<b><i>A. calidoustus</i></b>				<b><i>A. terreus</i></b>			
<i>aoxA</i> intron 1	CCAGTTTAT	ERX631988	ERR677097.21482935.1	<i>aoxA</i> intron 1	CCTGTCAT	SRX7896641	SRR11291067.6645117.1
intron 2	GGATGGATT	ERX631988	ERR677097.21338014.1	intron 2	GGATGGATC	SRX7896641	SRR11291067.4382190.1
intron 3	CCTTCTCAA	ERX631988	ERR677097.21534348.1	<i>aoxB2-1</i> intron 1	CCAGTGAC	SRX7896641	SRR11291067.4577324.1
<i>aoxB1</i> intron 1	CCAATCTAC	ERX631988	ERR677097.19174082.1	intron 2	GGCTGGATC	SRX7896641	SRR11291067.6484527.1
intron 2	GGATGGATT	ERX631988	ERR677097.383320.1	<b><i>A. wentii</i></b>			
<i>aoxB4</i> intron 1	CCGGTGAC	ERX631988	ERR677097.4402296.2	<i>aoxA</i> intron 1	CCTGTTTAC	Aspwe1 [JGI]	No excision detected Locus2300v1rpkm79.34
intron 2	GGCTGGATC	ERX631988	ERR677097.11324119.1	intron 2	GGATGGATC	Aspwe1 [JGI]	Locus5976v1rpkm17.33 [EST contig]
<b><i>A. oryzae</i></b>				<i>aoxB2-1</i> intron 1	CCAGTATAC	Aspwe1 [JGI]	Locus8961v1rpkm3.92 [EST contig]
<i>aoxA*</i> intron 1	CCTGTTTAT	DRX169184	DRR178658.23709178.1	intron 2	GGCTGGATT	Aspwe1 [JGI]	Locus8961v1rpkm3.92 [EST contig]
<i>aoxB2-1</i> intron 1	CCTGATATAC	DRX169184	DRR178658.3184879.2	<b><i>P. rubens</i></b>			
intron 2	GGATGGATT	DRX169184	DRR178658.21178077.1	<i>aoxA</i> intron 1	CCAGTATAC	SRX7124595	SRR10428551.21351875.1
<b><i>A. sydowii</i></b>				intron 2	GGATGGATT	SRX7124595	SRR10428551.1426888.1
<i>aoxA</i> intron 1	CCTGTCAT	SRX13745574	SRR17576387.22532111.1	<i>aoxB2-1</i> intron 1	CCCGTATAC	SRX7124595	SRR10428551.4681329.1
intron 2	GGATGGATC	SRX13745574	SRR17576387.22175180.1	intron 2	GGATGGATA	SRX7124595	SRR10428551.20234005.1
<i>aoxB2-1</i> intron 1	CCAGTATAC	SRX13745574	SRR17576387.21790899.1	<b><i>T. asperellum</i></b>			
intron 2	GGATGGATT	SRX13745574	SRR17576387.19454217.1	<i>aoxA</i> intron 1	AATGGCTTGT	SRX19144862	SRR23195941.7227219.2
<i>aoxB3</i> intron 1	CCAGTATAC	SRX13745574	SRR17576387.22181706.1	intron 2	TTCAATACTG	SRX19144862	SRR23195941.2092837.1
intron 2	GGGTGGATA	SRX13745574	SRR17576387.22515080.1	<i>aoxB2-2</i> intron 1	CCGGTGAC	SRX19144862	SRR23195941.7589312.2
				intron 2	GGTGGATC	SRX19144862	SRR23195941.13228317.1

9. táblázat SRA adatok az *aoxB1* génexpresszió igazolására

Törzsek / Gén Intron	Adatbázis (NCBI)	SRA olvasatok	Törzsek / Gén Intron	Adatbázis (NCBI)	SRA olvasatok
<b><i>A. calidoustus</i></b> andB intron 1 TTAGGCACT	ERX631993	ERR677102.16649058.2	<b><i>A. calidoustus</i></b> aoxB1 intron 1 CCAATCTAC	ERX631996	ERR677105.6854148.2
	ERX631995	ERR677104.15682812.1 ERR677104.15682812.2		ERX631995	ERR677104.2332297.1
	ERX631996	ERR677105.2162584.1 ERR677105.2162584.2		ERX631994	ERR677103.2510794.2 ERR677103.1656912.1 ERR677103.900396.2
<b><i>A. calidoustus</i></b> andB intron 2 TTTGGGATT	ERX631988	ERR677097.373254.2	<b><i>A. calidoustus</i></b> aoxB1 intron 1 CCAATCTAC	ERX631993	ERR677102.2082084.2
	ERX631990	ERR677099.18680577.2 ERR677099.18680577.1 ERR677099.2869718.1		ERX631992	ERR677101.10577410.1 ERR677101.8218975.1 ERR677101.8193533.1
	ERX631993	ERR677102.14622834.2			
	ERX631991	ERR677100.9382643.1			
	ERX631996	ERR677105.17252672.2 ERR677105.17252672.1			
<b><i>A. calidoustus</i></b> andB intron 3 CCTTCTGTGCTT	ERX631989	ERR677098.13859357.2 ERR677098.2998495.2 ERR677098.2998495.1 ERR677098.22770266.2 ERR677098.13859357.1	<b><i>A. calidoustus</i></b> aoxB1 intron 2 GGATGGATT	ERX631996	ERR677105.2013743.2
		ERX631995		ERR677104.16482873.2 ERR677104.16482873.1	
<b><i>A. calidoustus</i></b> andB intron 4 AGTGC CCGG	ERX631992	ERR677101.1542532.2 ERR677101.1542532.1	<b><i>A. calidoustus</i></b> aoxB1 intron 2 GGATGGATT	ERX631994	ERR677103.1971655.2
	ERX631994	ERR677103.6474623.1 ERR677103.6474623.2		ERX631993	ERR677102.23350232.2 ERR677102.10276109.2 ERR677102.4764038.2 ERR677102.4764038.1
	ERX631993	ERR677102.17188126.1 ERR677102.17188126.2 ERR677102.12370809.2		ERX631992	ERR677101.7231996.1
<b><i>A. niger</i></b> aoxB1 intron 1 CCAATCTAC	SRX9722265	SRR13293334.22709813.2	<b><i>A. niger</i></b> andB1 intron 1 AGTGCCTAA	SRX11975055	SRR15678655.579521.2
				SRX11975055	SRR15678655.579521.1

<b>A.niger aoxB1 intron 2</b> GGATGGATC	SRX11975789	SRR15679403.6264149.1	<b>A.niger andB intron 2</b> TATCCAAA	SRX12789281	SRR16587860.708123.1
				SRX15688375	SRR19638148.2825246.1
<b>A. implicatus andB intron 1</b> CTGGCACT	SRX5208515	-	<b>A.niger andB intron 3</b> TAGGACAGA	SRX12789281	SRR16587860.3272965.1
<b>A. implicatus andB intron 2</b> TTTGAATC	SRX5208515	SRR8399217.21403927.2 SRR8399217.387016.1	<b>A.niger andB intron 4</b> CCGAGAGCT	SRX18320010	SRR22348904.213785.1
<b>A. implicatus andB intron 3</b> CCCTCGATTTTA	SRX5208515	-	<b>A. implicatus aoxB intron 1</b> CCAACTAT	SRX5208515	SRR8399217.6320403.2
<b>A. implicatus andB intron 4</b> AGTGTCCAG	SRX5208515	SRR8399217.2264778.1 SRR8399217.25258407.1 SRR8399217.992531.1 SRR8399217.23243498.1	<b>A. implicatus aoxB intron 2</b> GGATGGATC	SRX5208515	SRR8399217.23319380.2 SRR8399217.8293776.1 SRR8399217.6320403.1

### 13.3 Szekvenciaillesztés eredményei

#### 10. táblázat Paralógok szekvenciaillesztése

Hasonlóság (%)	<i>A. calidoustus</i> _A	<i>A. sydowii</i> _A	<i>A. terreus</i> _A			
<i>P. chrysogenum</i> _A	<b>70.3</b>	<b>72.18</b>	<b>75.19</b>			
<i>A. calidoustus</i> _A	-	<b>79.7</b>	<b>80.83</b>			
<i>A. sydowii</i> _A	-	-	<b>84.96</b>			
Hasonlóság (%)	<i>A. calidoustus</i> _B1	<i>A. sydowii</i> _B3	<i>A. calidoustus</i> _A	<i>A. sydowii</i> _A	<i>A. calidoustus</i> _B4	
<i>A. sydowii</i> _B2_1	<b>61,07</b>	<b>59,32</b>	<b>59,54</b>	<b>61,45</b>	<b>62,6</b>	
<i>A. calidoustus</i> _B1	-	<b>63,16</b>	<b>64,66</b>	<b>66,54</b>	<b>67,29</b>	
<i>A. sydowii</i> _B3	-	-	<b>68,42</b>	<b>68,8</b>	<b>70,3</b>	
<i>A. calidoustus</i> _A	-	-	-	<b>79,7</b>	<b>79,32</b>	
<i>A. sydowii</i> _A	-	-	-	-	<b>81,2</b>	

### 13.4 Génvesztési mintázat

11. táblázat *Aspergillus* fajok génvesztési mintázata

Törzs	Szekció	Alszekció	<i>aoxA</i>	<i>aoxB1</i>	<i>aoxB2-1</i>	<i>aoxB2-2</i>	<i>aoxB3</i>	<i>aoxB4</i>
<i>A. bombycis</i>	Flavi	<i>Nomiarum</i>	X		X	X		
<i>A. nomiae</i>		<i>Nomiarum</i>	X		X			
<i>A. caelatus</i>		<i>Kitamyces</i>	X		X	X		
<i>A. tamarü</i>		<i>Kitamyces</i>	X		X			
<i>A. arachidicola</i>		<i>Flavi</i>	X		X	X		
<i>A. parasiticus</i>		<i>Flavi</i>	X		X			
<i>A. flavus</i>		<i>Flavi</i>	X		X			
<i>A. leporis</i>		<i>Leporum</i>	X		X			
<i>A. hancockii</i>		<i>Leporum</i>	X		X			
<i>A. alliaceus</i>		<i>Alliacei</i>	X		X			
<i>A. bertholletiae</i>		<i>Bertholletiarum</i>	X		X			
<i>A. calidoustus</i>	Usti	<i>Calidousti</i>	X	X				X
<i>A. pseudodeflectus</i>			X					X
<i>A. germanicus</i>			X					X
<i>A. keveii</i>			X					X
<i>A. insuetus</i>			X					X
<i>A. carlsbadensis</i>			X					X
<i>A. ustus</i>		<i>Usti</i>	X					X
<i>A. chevalieri</i>	Chevalierorum		X		X		X	
<i>A. montevidensis</i>			X		X			
<i>A. intermedius</i>			X		X			
<i>A. caperatus</i>			X		X			

<i>A. cibarius</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus</i>	X		X				
<i>A. glaucus</i>		<i>Aspergillus</i>	X						
<i>A. cumulatus</i>		<i>Rubri</i>	X		X		X		
<i>A. ruber</i>		<i>Rubri</i>	X						
<i>A. xerophilus</i>		<i>Xerophili</i>	X		X				
<i>A. punctus</i>	NA	NA	X		X				
<i>A. penicilloides</i>	<i>Restricti</i>	<i>Penicillioides</i>	X		X				
<i>A. implicatus</i>	<i>Sparsi</i>	<i>Implicati</i>	X	XX					
<i>Aspergillus</i> sp. MA 6041	NA	NA	X		X		X		
<i>A. sydowii</i>	<i>Nidulantes</i>	<i>Versicolores</i>	X		X		X		
<i>A. creber</i>			X		X				
<i>A. teennsseensis</i>			X		X				
<i>A. jensenii</i>			X		X				
<i>A. austroafricanus</i>			X		X				
<i>A. amoeneus</i>			X		X				
<i>A. protuberus</i>			X		X				
<i>A. versicolor</i>			X		X				
<i>A. subversicolor</i>			X		X				
<i>A. angustatus</i>			<i>Stellati</i>	X		X		X	
<i>A. wentii</i>			<i>Cremeri</i>	<i>Wentiorum</i>	X				X
<i>A. sepultus</i>					X				X
<i>A. dimorphicus</i>		X						X	
<i>A. arxii</i>	<i>Arxiorum</i>	X					X		
<i>A. inflatus</i>	<i>Inflati</i>	X					X		
<i>A. insolitus</i>	<i>Polypaecilum</i>	<i>Polypaecilum</i>	X		X				

<i>A. hortai</i>	Terrei	Terrei	X		X			
<i>A. pseudoterreus</i>			X		X			
<i>A. terreus</i>			X		X			
<i>A. alabamensis</i>			X		X			
<i>A. floccosus</i>			X		X			
<i>A. auroterreus</i>			X		X			
<i>A. ambiguus</i>		Ambigui	X		X			
<i>A. candidus</i>	Candidi	Candidi	X		X			
<i>A. campestris</i>			X		X			
<i>A. taichungensis</i>			X		X			
<i>A. subalbidus</i>			X		X			
<i>A. triticus (A. tritici)</i>			X		X			
<i>A. westerdijkiae</i>	Circumdati	Circumdati	X				X	
<i>A. ochraceus</i>			X				X	
<i>A. melleus</i>			X				X	
<i>A. ostianus</i>			X				X	
<i>A. sesamicola</i>			X				X	
<i>A. westlandensis</i>			X				X	
<i>A. subauricomus</i>			X				X	
<i>A. petrakii</i>	NA	NA	X				X	
<i>A. neoauricomus</i>	NA	NA	X				X	
<i>A. uvarum</i>	Nigri	Japonici	X		X			
<i>P. brevicompactum</i>	Brevicompecta	Brevicompecta	X		X		X	
<i>P. brasilianum</i>	Lavata- Divaricata	Simplicissima	X		X			X
<i>P. swiecickii</i>	Ramosum	Lanosa	X	X	X			

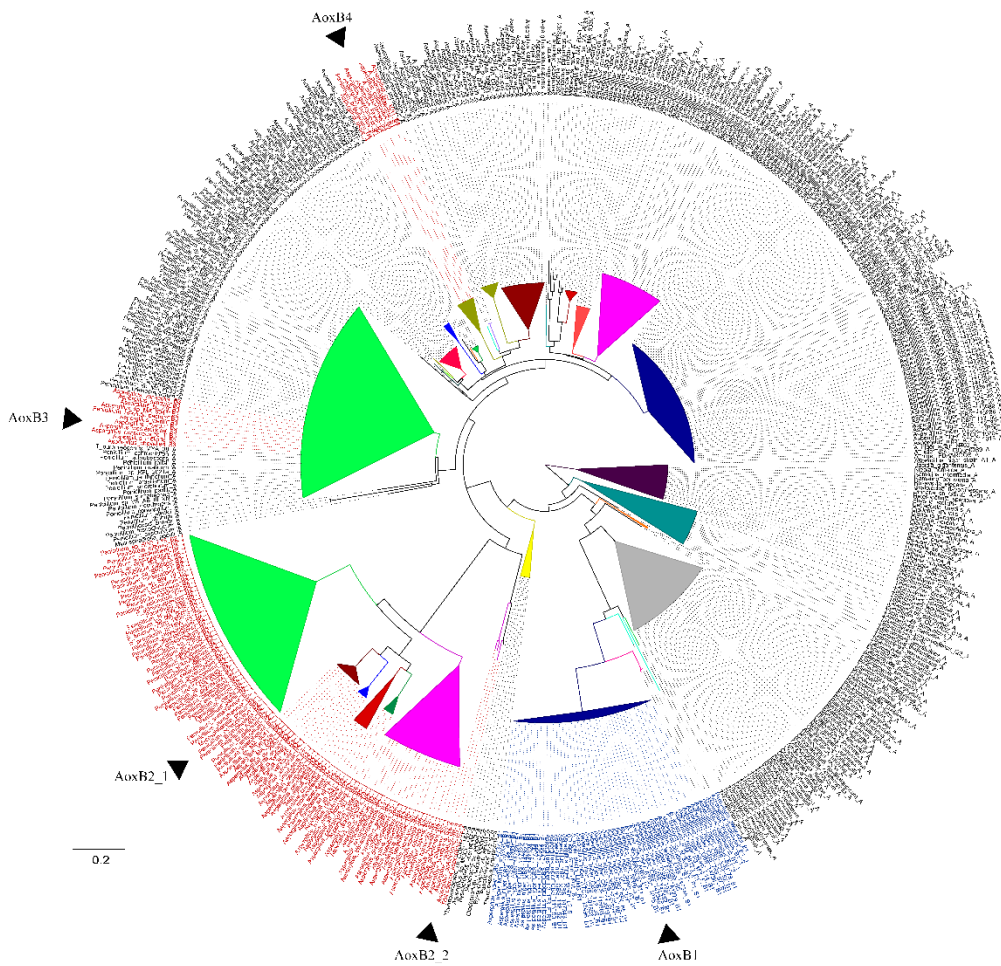
### 13.5 *A. niger* törzsek csoportosítása *aoxB1* génallélok szerint

12. táblázat *A. niger* törzsek csoportosítása *aoxB1* génallélok szerint

I. allél	II. allél	III. allél	IV. allél	V. allél	VI. allél	
vad típus	Deléción	Retrotransposon inszerción	Missense mutáción	Frameshift mutáción	Frameshift és nonsense mutáción	<i>A. tubingensis</i> pszeudogén
IFM 58123 ( <i>A. awamori</i> )	ATCC 13496	CBS 113.50	ATCC 13157 ( <i>A. phoenicis</i> )	CBS 630.78	CBS 131.52	" <i>A. niger</i> " strain An76
<b>ATCC 1015</b>	CBS 101883 ( <i>A. lacticoffeatus</i> )	CBS 118.52	strain JSC-093350089	CBS 147347	CBS 769.97	" <i>A. niger</i> " strain 3.316
ATCC 64974 [N402]	CBS 112.32	CBS 124.48	strain F1702			<i>A. tubingensis</i> WU-2223L
CBS 147345	CBS 115988	CBS 147322	strain M3604			<i>A. costaricensis</i> FKII-L6-BK-DRAB1
CBS 147346	CBS 115989	CBS 147323	strain R1650			<i>A. tubingensis</i> S/N-304-OC-P1
CBS 147482	CBS 147321	CBS 147324	strain R20-06			<i>A. tubingensis</i> S/N-308-IC-B1
CBS_139.54b ( <i>A. welwitschiae</i> )	<b>CBS 513.88</b>	CBS 147343	strain RG13B1			<i>A. tubingensis</i> VS III B KN t
CCMB 663 ( <i>A. welwitschiae</i> )	CBS 554.65 ( <i>A. niger</i> neotype)	CBS 147344	strain S1603			<i>A. tubingensis</i> S/N-302-OC-P2
CCMB 674 ( <i>A. welwitschiae</i> )	strain A1	CBS 147371	strain Y1650			<i>A. tubingensis</i> strain JS3-R1

DSM 1957	strain H915-1	strain F3_1F3_F				<i>A.tubingensis</i> strain JS3-P2
FDAARGOS_311	strain L2	ATCC 10864 (2 contigs)#				<i>A.tubingensis</i> strain C2-2
FGSC A1279	strain LDM3	CBS 133816 (2 contigs)#				strain Y4002A
IHEM 2864 ( <i>A.welwitschiae</i> )	strain SH-2	CBS 147320 (2 contigs)#				strain S3103
ITEM 11945 ( <i>A.welwitschiae</i> )		CBS 147352 (2 contigs)#				strain BSC-1
NRRL 3 [CBS 120.49; N400]		CBS 147353 (2 contigs)#				strain S1133
“ <i>Penicillium</i> <i>fimorum</i> ” S/N-308-OC-P1*		strain MOD1- FUNGI2 (2 contigs)#				strain F8013-2
strain F3_4F1_F						strain S1118
strain F3_4F2_F						strain P1003-2
strain L14						strain PG3607
strain P1402						strain B7004A
strain S1						
strain Y2001A1						

### 13.6 Az összes paralógot tartalmazó filogenetikai fa



27. ábra Az Eurotiomycetidae fajok filogenetikai analízise az összes paralóggal