

Doktori (PhD) értekezés tézisei

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

Márton Alexandra

Témavezető: Prof. Dr. Karaffa Levente



DEBRECENI EGYETEM

Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola

Debrecen, 2024

1. Bevezetés

A legtöbb növényben, gombában, de még bizonyos emlős sejtekben is a fő légzési lánc mellett egy vagy több alternatív légzési út is található. Az alternatív oxidáz enzim (Aox) egy cianid-rezisztens, citokróm-független alternatív légzési folyamatot biztosít, melynek élettani szerepe sokoldalú (Joseph-Horne és mtsai, 2001). Aktivitása gombák esetében a különböző stresszhatásokkal hozható összefüggésbe, habár még mindig rengeteg kutatást igényel a biokémiai szerepének pontos megismerése. Legtöbb esetben közvetve befolyásolja a metabolikus aktivitást, amivel hozzájárul a gomba környezethez való alkalmazkodásához (Li és mtsai., 2011).

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 előállítás történik vagy az *Acremonium chrysogenum* nevű, cefalosporin-C antibiotikumot előállító faj (Molnár és mtsai., 2018; Kozma és Karaffa, 1996).

Az *Aspergillus* és *Penicillium* nemzetségek alternatív oxidáz génjeinek filogenetikai vizsgálatával olyan információkhoz juthatunk, amelyek nem állnak rendelkezésre a szakirodalomban. A duplikációs

események vizsgálata mellett hasonló fontossággal bírnak a génvesztés jelenségei, melyek együtt formálják az evolúciós eseményeket.

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, amik 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 növényi patogén tartozik ide, egy olyan gén vizsgálata, ami a metabolikus plaszticitás biztosításával a túlélést segíti elő, kiemelkedő jelentőséggel bír.

2. 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.

3. Anyagok és módszerek

3.1 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. 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 génekkel dolgoztunk tovább, melyek kódoló fehérjei 55-65%-os aminosav szekvencia hasonlóságot mutattak.

Az NCBI adatbázisa mellett néhány faj esetében (*A. niger*, *Usti* szekció fajai) 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 *aox* gének közvetlen környezetének feltérképezése a szomszédos gének elhelyezkedésének és lehetséges funkcióinak meghatározása a JGI-ba feltöltött genomszekvenciák segítségével történt.

3.2 Maximum likelihood filogenetikai analízis

A filogenetikai fa létrehozásához az Aox fehérjék többszörös szekvenciaillesztése a MAFFT (Multiple Sequence Alignment with Fast Fourier Transform) 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) szoftverrel történt BLOSUM55 hasonlósági mátrix és 4-es blokkméret használatával. A Maximum Likelihood (ML) filogenetikai fát PhyML 3.0 online programmal LG mátrixot beállítva, gamma szubsztitúciós rátával és 4 szubsztitúcióval hoztuk létre, majd a FigTree (1.4.3 verzió) és Adobe Illustrator 2018 szoftverek segítségével szerkesztettük. Az elágazások valószínűségének értéke az approximate Likelihood Ratio Tests (aLRTs) segítségével lett megadva. Az alternatív oxidáz génszekvenciákból készült filogenetikai fákhhoz szintén a fent említett programokat használtuk.

3.3 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 génekkal/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> – deléción
<i>A. niger</i>	CBS 147343	<i>aoxB1</i> - transzpozón
<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 törzsben az alternatív NADH dehidrogenáz (*andB*) vizsgálatára is sor került.

A törzseket a számukra optimális táptalajon növesztettük: NIG1 minimál táptalajon (6 g/L NaNO₃, 1,5 g/L KH₂PO₄, 0,5 g/L MgSO₄ x 7H₂O, 0,5 g/L KCl + 1% D-glükóz, 20µl nyomelem oldat) és PDA (Potato Dextrose Agar) táptalajon. A törzseket spórák mosása után (0,01% Tween), Erlenmeyer lombikokban sterilizett tápoldatban, 24-48 óráig, 27-38 °C-on rázóasztalon (Infors HT Multitron, Basel, Svájc) 200-250 rpm-en (revolution per minute) tenyésztettük. A kísérletekhez a VWR International Kft. és a Sigma Aldrich analitikai tisztaságú

vegyszereit és a VWR International Kft. eszközeit használtuk (2.táblázat).

2. táblázat Tenyésztéshez alkalmazott táptalajok

Törzs	Tenyésztési táptalaj
<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 + 2M NaCl, 2M MgCl ₂
<i>P. rubens</i> <i>A. calidoustus</i>	2 g/L KH ₂ PO ₄ 8 g/L Na ₂ HPO ₄ 0.25 g/L MgSO ₄ 10 g/L (NH ₄) ₂ SO ₄ 1% D- glükóz + nyomelem oldat
<i>A. terreus</i>	0.1 g/L KH ₂ PO ₄ 3 g/L NH ₄ NO ₃ 1 g/L MgSO ₄ x 7H ₂ O 5 g/L CaCl ₂ x 2H ₂ O 1.67 mg/L FeCl ₃ x 6H ₂ O 8 mg/L ZnSO ₄ x 7H ₂ O 15 mg/L CuSO ₄ x 5H ₂ O 60 mM Nátrium-acetát
<i>A.niger</i>	2.5 g/L (NH ₄) ₂ SO ₄ 0.15 g/L KH ₂ PO ₄ 0.15 g/L NaCl 2.25 g/L MgSO ₄ x 7H ₂ O 1.50 mg/L Zn ²⁺ 0.10 mg/L Fe ²⁺ 0.06 mg/L Cu ²⁺ 0.05 mg/L Mn ²⁺ 10 g/L D-glükóz

3.4 RNS/DNS izolálás, PCR, szekvencia azonosítás

A biomassa összegyűjtése 3 független tenyészetből (biológiai replikátum) történt, a micélium folyékony nitrogénen való feltörését követően a genomi DNS kinyerése Macherey-Nagel NucleoSpin Plant II kit-el valósult meg, míg az RNS izoláláshoz az RNA Plant kit-et használtuk (Macherey-Nagel GmbH és Co., KG, Düren, Germany).

Az alternatív oxidáz gének kifejeződésének vizsgálatához a teljes RNS-ből cDNS-t írtunk, ami Oligo(dT) primer használatával a RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit-el történt (Thermo Scientific, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). A 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). A PCR reakció paraméterei a következők voltak: kezdeti denaturáció 95°C, 3 perc majd 30 körben 95°C 30 mp, 54°C 1 perc, 72°C 0,5-1 perc, végezetül poszt-elongáció 72°C 5 perc. A tisztított PCR fragmenseket vektorba klónoztuk (pGEM-T Easy Vector System I, Promega Corporation, Madison, WI, USA), majd 3 független klónt kiválasztva (technikai replikátum) mindkét szálát megszekvenáltuk (Eurofins Genomics, Ebersberg, Germany). A cDNS és genomi DNS szekvenciákat a GenBank adatbázisba töltöttük fel. A génexpresszió további bizonyításához az NCBI SRA (Sequence Read Archive) adatait is felhasználtuk.

4. Új tudományos eredmények

1. Megállapítottuk, hogy az *Aspergillaceae* család tagjai (351 faj, 531 Aox fehérje) négy különböző duplikációs esemény során szereztek meg az *aox* paralógot.

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. A vertikális öröklődésnek köszönhetően a mainál több taxon is tartalmazhatta, bár így is számos *Aspergillus* szekció rendelkezik vele, mint a *Flavi*, *Terrei* vagy *Candidi* fajok.

Az *aoxB2-1* génhez evolúciósan legközelebb eső paralóg az *aoxB2-2* csak néhány *Flavi* fajban maradt fent. Eredetére vonatkozóan kétféle magyarázatot fogalmaztunk meg: vagy az *aoxB2-1* további duplikációjával jött létre, vagy az *aoxA* megkettőződésével az *aoxB2-1*-gyel közel egy időben.

Filogenetikai analízisünkkel bizonyítottuk, hogy az *aoxB2-2* két *Trichoderma* fajban is helyet kapott (*T. asperellum*, *T. asperelloides*). A *Trichoderma*knak alapvetően csak *aoxA* génnel rendelkeznek, melyek 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.

Az *aoxB3* paralóg kialakulása az *Aspergillus* és *Penicillium* nemzetségek szétválása utána történhetett. Analízisünk alapján egy *Penicillium* fajtól laterális géntranszferrel kaphatta meg egy *Aspergillus* ős, majd terjedt el a *Cremeri*, *Aspergillus*, *Circumdati* és *Nidulantes* alnemzetségekben.

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. A duplikáció 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).

2. Megállapítottuk, hogy a duplikációs események mellett számos génvesztési mintázat is megfigyelhető az alternatív oxidáz paralógok esetében.

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, viszont a génduplikátumok sorsa többféleképpen alakulhat. Az *aoxB2-1*-hez köthető esemény még a testvér nemzetség szétválása előtt történt, így minden *Aspergillus* és *Penicillium* fajnak tartalmaznia kellene. 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.

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 *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. A *Cremeri* és *Circumdati* szekciók több fajában is találtunk *aoxB3* gént, viszont többen csak *aoxA*-val rendelkeznek, az *aoxB2-1* mellett tehát újabb gént szereztek, azonban az előbbit elvesztették. Ezzel szemben a *Flavi*, *Terrei* és *Candidi* szekciók, melyek a *Circumdati* szekcióval együtt a *Circumdati* alnemzetségbe tartoznak, az *aoxB3* helyett az *aoxB2-1* paralógot tartották meg, míg az *aoxB3* eltűnt a genomból.

A *Nidulantes* alnemzetségben (*Nidulantes*, *Usti*, *Ochraceorosei*) is számos génvesztést azonosítottunk. Az *Ochraceorosei* és *Usti* szekciók az *aoxB2-1* és *B3* géneket vesztették el, viszont az *Usti* fajok egy újabb duplikációs eseménnyel tettek szert az *aoxB4* génre. A *Nidulantes* szekció *Stellati*, *Nidulantes*, *Unguium*, *Multicolores*

alszekciói szintén az *aoxB2-1* és *aoxB3* géneket vesztették el, viszont a *Versicolores* alszekció csak az *aoxB3*-at. Bizonyos fajok azonban megőriztek akár két paralógot is az alszekciókon belül.

3. Meghatároztuk, hogy az *A. niger* egy ritka, az *Aspergillaceae* családtól független génduplikációs eseménnyel szerezte a második *aox* gént.

Az általunk *aoxB1* paralógnak nevezett gén mindössze négy különböző fajban található meg: *P. swiecickii*, *A. calidoustus*, *A. implicatus*, *A. niger*. A paralóg filogenetikai fán való elhelyezkedése azt bizonyítja, hogy az *Onygenales* rendtől származik, és közelebbi rokonságot mutat az *Eurotiales* rend más családjaihoz, viszont ezek a fajok nem rendelkeznek második alternatív oxidáz génnel, csak úgy, mint az *Onygenales* rend tagjai. A filogenetikai analízis alapján arra következtethetünk, hogy az *aoxB1* egy horizontális géntranszfer következménye, 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.

4. Azonosítottuk az *A. niger* második alternatív oxidáza mellett elhelyezkedő alternatív NADH dehidrogenáz gént.

Az *aoxB1* paralógot tartalmazó négy faj esetében megfigyelhető, hogy a gén közvetlen szomszédságában, ellentétes orientáltsággal szintén egy alternatív légzési utat biztosító enzim

paralógja található: 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.

A négy faj esetében a géntranszfer valószínűleg együtt történt meg, az *A. niger* és *A. calidoustus* esetében pedig egy négy génből álló klaszter (cink-cluster transzkripció regulátor, alternatív oxidáz, alternatív NADH dehidrogenáz, 3-hidroxiacil-CoA dehidrogenáz) került át.

5. Bizonyítottuk, hogy az *A. niger* törzsek *aox* paralógjai öt különböző mutációt tartalmazhatnak, melyek befolyásolják a géntermék képződését. Mindemellett *A. niger*-ben eddig nem ismert autonóm retrotranszpozont is azonosítottunk.

A 75 vizsgált *A. niger* törzsből mindössze 14 olyan egyedet találtunk, melyekben hibátlan második Aox fehérje keletkezhet. A legdrasztikusabb mutációként a gén első exonját és intronját érintő deléció 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.

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 harmada hiányzik, ami miatt a fehérje nem juthat 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 tripletok 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. tubingensis fajokban (fekete *Aspergillus*, *A. luchuensis* klád) az *aoxB1* mint pszeudogén van jelen, exonjaiban több frameshift mutáció halmozódott fel, ami már a géntesztést megelőző folyamatokat mutathatja.

5. Összefoglalás

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. 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 *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. Az évmilliók során ezek a génduplikátumok el is tűnhetnek 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 alternatív oxidáz szinte fajoként eltérő működését már számos kutató bizonyította, génszintű vizsgálatainkkal az *aox* gének eredetének és evolúciójának feltárásával járultunk hozzá ismereteink bővítéséhez.

6. Irodalomjegyzék

- 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.
- Joseph-Horne, T., Hollomon, D. W., & Wood, P. M. (2001). Fungal respiration: a fusion of standard and alternative components. *Biochim. Biophys. Acta* 1504, 179-195.
- Karaffa, L., & Kubicek, C. P. (2021). Production of organic acids by fungi. In O. Zaragoza, & A. Casadevall, *Encyclopedia of Mycology* (old.: Volume 2. 406-419). Amsterdam: Elsevier.
- Kozma, J., & Karaffa, L. (1996). Effect of oxygen on the respiratory system and cephalosporin-C production in *Acremonium chrysogenum*. *J. Biotechnol.* 48, 59–66.
- 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
- 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.
- Molnár, Á. P., Németh, Z., Kolláth, I. S., Fekete, E., Flipphi, 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. Biot.* 102:8799–8808.



Nyilvántartási szám: DEENK/285/2024.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Márton Alexandra
Doktori Iskola: Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10075106

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

Idegen nyelvű tudományos közlemények külföldi folyóiratban (2)

1. Flippi, M., **Márton, A.**, Bíró, V., Ág, N., Karaffa, E. M., Fekete, E., Karaffa, L.: Generation, Transfer, and Loss of Alternative Oxidase Paralogues in the Aspergillaceae Family. *J. Fungi*. 9 (12), 1-18, 2023. EISSN: 2309-608X.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/jof9121195>
IF: 4.7 (2022)
2. Flippi, M., **Márton, A.**, Bíró, V., Ág, N., Karaffa, E. M., Fekete, E., Karaffa, L.: Mutations in the Second Alternative Oxidase Gene: A New Approach to Group *Aspergillus niger* Strains. *J. Fungi*. 9 (5), 1-17, 2023. EISSN: 2309-608X.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/jof9050570>
IF: 4.7 (2022)





További közlemények

Idégen nyelvű tudományos közlemények külföldi folyóiratban (2)

3. Reinfurt, A., Fritsche, S., Bíró, V., **Márton, A.**, Ellena, V., Fekete, E., Karaffa, E. M., Karaffa, L., Steiger, M. G.: Manganese(II) ions suppress the transcription of the citrate exporter encoding gene *cexA* in *Aspergillus niger*.
Front. Bioeng. Biotechnol. 11, 1-11, 2023. EISSN: 2296-4185.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fbioe.2023.1292337>
IF: 5.7 (2022)
4. Fekete, E., Bíró, V., **Márton, A.**, Bakondi-Kovács, I., Németh, Z., Karaffa, E. M., Kovács, B., Fábíán, I., Kubicek, C. P., Tsang, A., Karaffa, L.: Bioreactor as the root cause of the "manganese effect" during *Aspergillus niger* citric acid fermentations.
Front. Bioeng. Biotechnol. 10, 1-12, 2022. EISSN: 2296-4185.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fbioe.2022.935902>
IF: 5.7

A közlő folyóiratok összesített impact faktora: 20,8

A közlő folyóiratok összesített impact faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 9,4

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

Debrecen, 2024.05.22.



Short thesis for the degree of doctor of philosophy (PhD)

**Evolution of alternative oxidase genes in species
of *Aspergillaceae* family**

by Alexandra Márton

Supervisor: Prof. Dr. Levente Karaffa



UNIVERSITY OF DEBRECEN

Juhász-Nagy Pál Doctoral School

Debrecen, 2024

1. Introduction

In most plants, fungi, and even certain mammalian cells, besides the main respiratory chain, one or more alternative respiratory pathways can be found. The alternative oxidase enzyme (Aox) provides a cyanide-resistant, cytochrome-independent alternative respiratory pathway with a diverse physiological role (Joseph-Horne és mtsai, 2001). Its activity in fungi is associated with various stressors, although understanding its biochemical role precisely still requires a lot of research. In most cases, it indirectly influences metabolic activity, contributing to the adaptation of the fungus to the environment (Li és mtsai., 2011).

The presence of paralogs of the *aox* gene is not common among fungi, although gene multiplicity is characteristic of the *Aspergillaceae* family (Flipphi et al., 2023). The *Aspergillus* and *Penicillium* genera include industrially important fungi such as *Aspergillus niger*, which is responsible for the majority of industrial citric acid production (Karaffa & Kubicek, 2021), *Aspergillus terreus*, used in the production of itaconic acid and lovastatin, or *Acremonium chrysogenum*, which produces the antibiotic cephalosporin-C (Molnár et al., 2018; Kozma & Karaffa, 1996).

Phylogenetic analysis of alternative oxidase genes in the *Aspergillus* and *Penicillium* genera provides information that is not available in the literature. In addition to the study of duplication events,

gene loss are of similar importance, which together shape evolutionary events.

In my PhD thesis, I summarise the results of a phylogenetic analysis of the *aox* genes of fungal species of the family *Aspergillaceae*, revealing events that have been occurring over millions of years. Alongside four gene duplication events, numerous patterns of gene loss have emerged. Additionally, through the examination of *Aspergillus niger* strains, various mutations influencing the function of proteins transcribed from the secondary *aox* gene have been identified. Our phylogenetic analysis has contributed to expanding our knowledge of the *aox* gene, since there is no literature data available on either the origin or evolution of this gene in species of the *Aspergillaceae* family in this approach. Given that numerous industrially important fungi, as well as human or plant pathogens, belong to this family, the study of a gene that facilitates survival through metabolic plasticity holds paramount significance.

2. Objectives

Members of the *Aspergillus* and *Penicillium* genera include a number of industrially important fungi, several of which have been the subject of research at the Department of Biochemical Engineering for many years. Investigation of alternative oxidase is also not new, a number of publications in the Department dealing with its function. The objectives of my doctoral thesis are based on the following:

1. Collect all the *aox* genes of *Aspergillus* and *Penicillium* species available in the NCBI database, then perform a phylogenetic analysis of the proteins generated from these genes (sequence-based).
2. Investigation of the origin and evolution of *aox* genes within the family *Aspergillaceae*.
3. Investigation of gene loss patterns: Paralogous genes can disappear from the genome if they are not advantageous for the cell. Therefore, in addition to gene duplication events, the study of gene loss is also of paramount importance.

3. Materials and methods

3.1 Mining of alternative oxidase genes, gene syntheny

The coding sequences of alternative oxidase genes collected from the National Center of Biotechnology Information (NCBI) database using the TBLASTN search algorithm (May of 2022). For reference, we used the amino acid sequence of the Aox protein of *Aspergillus niger* strain WU-2223-L (Kirimura et al., 1999; Kirimura et al., 2006), which was the first to determine the full-length cDNA of the alternative oxidase. The search was conducted among the *Aspergillus* and *Penicillium* genera and other fungi belonging to the subclass *Eurotiomycetidae* (including the *Eurotiales* and *Onygenales* species), as an independent group we selected species from the *Lecanoromycetes* class, which is most closely related to *Eurotiomycetidae*. We further worked with genes whose coding proteins showed 55-65% amino acid sequence similarity.

In addition to the NCBI database, genome sequences from the U.S. Dept. of Energy Joint Genome Insitute (JGI) were used for some species (*Aspergillus niger*, section *Usti* species). The blast of the second *aox* of *Aspergillus niger* was performed in all *A. niger* strains in the database (November of 2022). The determination of the possible functions of neighboring genes of *aox* were carried out using the genome sequences uploaded to the Joint Genome Institute (JGI).

3.2 Maximum likelihood phylogenetic analysis

To generate the phylogenetic tree, multiple sequence alignment of Aox proteins was performed using MAFFT (Multiple Sequence Alignment with Fast Fourier Transform), E-INS algorithm and BLOSUM45 scoring matrix. The resulting multiple sequence alignments were subsequently trimmed using BMGE (Block Mapping and Gathering using Entropy) to select of regions suitable for phylogenetic inference. The Maximum Likelihood (ML) phylogenetic tree was constructed by the PhyML 3.0 online program, setting the LG matrix, gamma substitution rate, and 4 substitutions. ML trees were drawn with FigTree (version 1.4.3) and edited by Adobe Illustrator 2018. Branch stability was determined with approximate Likelihood Ratio Tests (aLRTs). For phylogenetic trees from alternative oxidase gene sequences, the above programs were also used.

3.3 Fungal strains and cultivation conditions

The expression of various *aox* paralogs was tested in seven species, and mutations were also confirmed in *A. niger*. The species and *A. niger* strains used are shown in Table 1. together with the examined genes/gene alleles.

Table 1. Strains used for examination of mutations and expression of *aox* genes

Species	Strain	Gene/Gene allele
<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> – wild type
<i>A. niger</i>	CBS 554.65	<i>aoxB1</i> – deletion
<i>A. niger</i>	CBS 147343	<i>aoxB1</i> - transposon
<i>A. niger</i>	CBS 630.78	<i>aoxB1</i> – frameshift
<i>A. niger</i>	CBS 769.97	<i>aoxB1</i> - frameshift, nonsense mutation

The alternative NADH dehydrogenase (*andB*) was also tested in *A. niger* ATCC 1015.

The strains were cultivated on the optimal medium: NIG1 minimal medium (6 g/L NaNO₃, 1,5 g/L KH₂PO₄, 0,5 g/L MgSO₄ x 7H₂O, 0,5 g/L KCl + 1% D-glucose, 20µl trace elements) and PDA (Potato Dextrose Agar) medium. After the spore washing (0,01% Tween), the strains were inoculated on sterilized medium in Erlenmeyer flasks for 24-48 hours at 27-38 °C in a rotary shaker (Infors HT Multitron, Basel, Svájč) at 200-250 rpm (revolution per minute). For the experiments we used the equipment and chemicals from VWR International Kft. and Sigma Aldrich (Table 2.).

Table 2. Culture media

Species	Media
<i>A. oryzae</i> <i>T. asperellum</i> <i>A. wentii</i> <i>A. sydowii</i>	PDB (Potato Dextrose Broth) <i>A. oryzae</i> + 1 % Triton X-100 <i>A. sydowii</i> + 2M NaCl, 2M MgCl ₂
<i>P. rubens</i> <i>A. calidouustus</i>	2 g/L KH ₂ PO ₄ 8 g/L Na ₂ HPO ₄ 0.25 g/L MgSO ₄ 10 g/L (NH ₄) ₂ SO ₄ 1% D- glucose + trace elements
<i>A. terreus</i>	0.1 g/L KH ₂ PO ₄ 3 g/L NH ₄ NO ₃ 1 g/L MgSO ₄ x 7H ₂ O 5 g/L CaCl ₂ x 2H ₂ O 1.67 mg/L FeCl ₃ x 6H ₂ O 8 mg/L ZnSO ₄ x 7H ₂ O 15 mg/L CuSO ₄ x 5H ₂ O 60 mM Sodium-acetate
<i>A.niger</i>	2.5 g/L (NH ₄) ₂ SO ₄ 0.15 g/L KH ₂ PO ₄ 0.15 g/L NaCl 2.25 g/L MgSO ₄ x 7H ₂ O 1.50 mg/L Zn ²⁺ 0.10 mg/L Fe ²⁺ 0.06 mg/L Cu ²⁺ 0.05 mg/L Mn ²⁺ 10 g/L D-glucose

3.4 RNA/DNA isolations, PCR, sequence analyses

Mycelia were harvested from three independent cultures (biological replicates), DNA was isolated from powdered deep frozen biomass using Macherey-Nagel NucleoSpin Plant II kit, and for the

RNA we used the RNA Plant kit (Macherey-Nagel GmbH és Co., KG, Düren, Germany).

For the examination of alternative oxidase gene expression first-strand cDNA was synthesized from total RNA with an Oligo(dT) primer using the RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). The genes were amplified by PCR (Polymerase Chain Reaction) using DreamTaq DNA polymerase (Thermo Scientific, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) in the T100™ Thermal Cycler PCR (Bio-Rad, Bio-Rad Hungary Ltd., Budapest, Hungary). The cycling conditions after initial denaturation at 95°C (3 min) were: 30 cycles of 95 °C for 30 s, 54 °C for 1 min, 72 °C for 0,5-1 min and finally post-cyclic elongation at 72 °C for 5 min. The purified PCR fragments were cloned into bacterial vector (pGEM-T Easy Vector System I, Promega Corporation, Madison, WI, USA), and three independent clones (technical replicates) were selected for sequencing (Eurofins Genomics, Ebersberg, Germany). We uploaded the cDNA and genomic DNA sequences to the GenBank database. We also used NCBI SRA (Sequence Read Archive) data to further evidence for gene expression.

4. New scientific results

1. We determined that species of the *Aspergillaceae* family (351 species, 531 Aox proteins) acquired the *aox* paralog through four different duplication events.

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*. Due to vertical inheritance, multiple taxa could have contained it, although it is still present in many *Aspergillus* sections, such as *Flavi*, *Terrei* and *Candidi* species. The *aoxB2-2* gene is the closest evolutionary paralog to the *aoxB2-1* gene, which is retained only in a few *Flavi* species. Regarding its origin, we formulated two 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 section *Usti*, indicating a recent phenomenon. The similarity of *aoxB4* to neighboring genes further strengthens this fact. The duplication likely occurred after the divergence of the *Usti* and *Ochraceorosei* sections, approximately 40-50 million years ago (the divergence of the *Aspergillus* and *Penicillium* genera split around 94 million years ago).

2. We observed that, in addition to duplication events, several gene loss patterns are also observed in alternative oxidase paralogs.

The *aoxA* gene is present in all *Aspergillus* and *Penicillium* species, and there are no examples of the gene being deleted from the genome and/or replaced by a paralog. However gene duplicates can have different fates. The event associated with *aoxB2-1* occurred even before the divergence of the sister genera, so every *Aspergillus* and *Penicillium* species should contain it. However, during evolution, if the cell/organism does not benefit from having two copies of a gene in the genome, the duplicate will undergoes mutations over time, resulting a defective protein, and possibly be deleted from the DNA.

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.

Some members of the section *Aspergillus* still have the *aoxB3* paralog, but species of the series *Aspergillus* and *Rubri* have lost *aoxB2-1* and now only have the *aoxA* gene. In several species of the section *Cremeri* and *Circumdati*, we found the *aoxB3* gene, but many of them only possess *aoxA*, indicating the acquisition of a new gene, but the former has been lost. In contrast, the *Flavi*, *Terrei*, and *Candidi* sections, which belong to the *Circumdati* subgenus together with the section *Circumdati*, retained the *aoxB2-1* paralog instead of *aoxB3*, while *aoxB3* disappeared from the genome.

Several gene losses have also been identified in the subgenus *Nidulantes* (*Nidulantes*, *Usti*, *Ochraceorosei*). Section *Ochraceorosei* and *Usti* lost the *aoxB2-1* and *B3* genes, but the *Usti* species gained the *aoxB4* gene with a recent duplication event. The *Stellati*, *Nidulantes*, *Unguium*, and *Multicolores* series of the section *Nidulantes* also lost the *aoxB2-1* and *aoxB3* genes, while the series *Versicolores* lost only *aoxB3*. However, certain species retained up to two paralogs within the series.

3. We determined that *A. niger* acquired the second alternative oxidase gene by a rare gene duplication event independent of the *Aspergillaceae* family.

The *aoxB1* paralog is found in only four different species: *P. swiecickii*, *A. calidoustus*, *A. implicatus*, *A. niger*. The position of the paralog on the phylogenetic tree demonstrates that it is derived from the *Onygenales* order and is more closely related to other families of the *Eurotiales* order. However, these species do not possess a second alternative oxidase gene, similar to species of the *Onygenales* order. Phylogenetic analysis suggests that *aoxB1* is the result of a horizontal gene transfer between a species of the *Onygenales* and the four species of *Aspergillaceae*. The exact time of this event can not be determined using the methods we applied.

4. We identified an alternative NADH dehydrogenase gene located adjacent to the second alternative oxidase in *A. niger*.

In the four species containing the *aoxB1* paralog, it is observed that the gene is also immediately adjacent to a paralog of an alternative respiratory pathway enzyme with opposite orientation: a type two NADH dehydrogenase or alternative NADH:ubiquinone reductase. Among the 350 species we examined, we did not find any additional examples where the alternative NADH dehydrogenase gene (*andB*) and the *aoxB* gene are positioned in the same orientation.

In the case of the four species, gene transfer probably occurred together, in the case of *A. niger* and *A. calidoustus*, a cluster of four genes (zinc-cluster transcriptional regulator, alternative oxidase,

alternative NADH dehydrogenase, 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase) was transferred.

5. It was confirmed that the aox paralogs of *A. niger* strains may contain five different mutations that affect the formation of the gene product. In addition, we have identified a previously unknown autonomous retrotransposon in *A. niger*.

Of the 75 *A. niger* strains tested, only 14 were found to produce a fully intact second alternative oxidase protein. 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.

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.

5. Summary

The phylogenetic analysis of the entire fungal kingdom indicates that the multiplicity of the *aox* gene is not characteristic. However, within the order *Eurotiales*, specifically in the *Aspergillaceae* family, certain species contain multiple paralogs. Despite ongoing research, the exact biochemistry of the protein is not yet fully understood, but the study of public genetic databases can provide valuable information on its origin and evolution.

The four duplication events of the *aox* gene and a more detailed study of *A. niger aoxB1* perfectly describe the fate of a gene in the genome. The *Aspergillus* and *Penicillium* genera contain numerous species so the spread of paralogs shows different patterns during evolution. Over millions of years, these gene duplicates may disappear from the genome if they are no longer useful to the cell. The study of gene loss is as important as the determination of duplication events, since both influence evolution. Understanding the development of

organisms and their adaptation to constantly changing environments can only be examined through their combined effects.

The duplication of a gene is followed by a process of pseudogenisation before loss, which results in the accumulation of mutations in that gene. The mutations in *A. niger* strains may already initiate this process, which is supported by the presence of pseudogenes found in *A. tubingensis*.

Numerous researchers have demonstrated the species-specific functionality of alternative oxidase. With our investigations, we contributed to expanding our knowledge by uncovering the origin and evolution of *aox* genes.

6. References

- 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.
- Joseph-Horne, T., Hollomon, D. W., & Wood, P. M. (2001). Fungal respiration: a fusion of standard and alternative components. *Biochim. Biophys. Acta* 1504, 179-195.
- Karaffa, L., & Kubicek, C. P. (2021). Production of organic acids by fungi. In O. Zaragoza, & A. Casadevall, *Encyclopedia of Mycology* (old.: Volume 2. 406-419). Amsterdam: Elsevier.
- Kozma, J., & Karaffa, L. (1996). Effect of oxygen on the respiratory system and cephalosporin-C production in *Acremonium chrysogenum*. *J. Biotechnol.* 48, 59–66.
- 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
- 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.
- Molnár, Á. P., Németh, Z., Kolláth, I. S., Fekete, E., Flipphi, 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. Biot.* 102:8799–8808.



Registry number: DEENK/285/2024.PL
Subject: PhD Publication List

Candidate: Alexandra Márton

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

MTMT ID: 10075106

List of publications related to the dissertation

Foreign language scientific articles in international journals (2)

1. Flippi, M., **Márton, A.**, Bíró, V., Ág, N., Karaffa, E. M., Fekete, E., Karaffa, L.: Generation, Transfer, and Loss of Alternative Oxidase Paralogues in the Aspergillaceae Family. *J. Fungi*. 9 (12), 1-18, 2023. EISSN: 2309-608X.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/jof9121195>
IF: 4.7 (2022)
2. Flippi, M., **Márton, A.**, Bíró, V., Ág, N., Karaffa, E. M., Fekete, E., Karaffa, L.: Mutations in the Second Alternative Oxidase Gene: A New Approach to Group *Aspergillus niger* Strains. *J. Fungi*. 9 (5), 1-17, 2023. EISSN: 2309-608X.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/jof9050570>
IF: 4.7 (2022)





List of other publications

Foreign language scientific articles in international journals (2)

3. Reinfurt, A., Fritsche, S., Biró, V., **Márton, A.**, Ellena, V., Fekete, E., Karaffa, E. M., Karaffa, L., Steiger, M. G.: Manganese(II) ions suppress the transcription of the citrate exporter encoding gene *cexA* in *Aspergillus niger*.
Front. Bioeng. Biotechnol. 11, 1-11, 2023. EISSN: 2296-4185.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fbioe.2023.1292337>
IF: 5.7 (2022)
4. Fekete, E., Biró, V., **Márton, A.**, Bakondi-Kovács, I., Németh, Z., Karaffa, E. M., Kovács, B., Fábíán, I., Kubicek, C. P., Tsang, A., Karaffa, L.: Bioreactor as the root cause of the "manganese effect" during *Aspergillus niger* citric acid fermentations.
Front. Bioeng. Biotechnol. 10, 1-12, 2022. EISSN: 2296-4185.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fbioe.2022.935902>
IF: 5.7

Total IF of journals (all publications): 20,8

Total IF of journals (publications related to the dissertation): 9,4

The Candidate's publication data submitted to the iDEa Tudóstér have been validated by DEENK on the basis of the Journal Citation Report (Impact Factor) database.

22 May, 2024

