

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**Az enzimatis mutarotáció szerepe az *Aspergillus
nidulans* fonalas gomba D-galaktóz
anyagcseréjében**

**Enzyme-catalyzed mutarotation in the metabolism
of D-galactose in the filamentous fungus *Aspergillus
nidulans***

Kulcsár László

Témavezető/Supervisor: **Dr. Karaffa Levente**



DEBRECENI EGYETEM
Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola

Debrecen, 2019

1 BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉS

A tömlősgombák (Ascomycota) Pezizomycotina altörzse számos szaprofita és / vagy növényi patogén gombát tartalmaz, melyek élő vagy elpusztult növényi maradványokat használnak tápanyag forrásként. Mivel a növekedési szubsztrát belső ingadozása meglehetősen diverz, ezért ennek függvényében a hidrolitikus enzim komplexek által irányított, az összes növényi monoszacharid felszabadítását célzó folyamatok meglehetősen komplexek és változatosak, tehát vizsgálatuk bonyolult.

A lignocellulóz a legnagyobb mennyiségben rendelkezésre álló szerves anyag a Földön. A lignocellulóz cellulózból, pektinből és hemicellulózból épül fel. A lignocellulózt számos monoszacharid és azok származékai alkotják, így D-glükóz, D-galaktóz (a glükóz 4-C epimere), L-arabinóz és D-xilóz stb. (Cragg és mtsai., 2015). A D-glükóz és a D-galaktóz megtalálható a tej legfontosabb energiaforrásában, a laktózban is, mely egy β -1,4 kötésű diszacharid. Néhány növényi oligoszacharid, mint például a sztachióz, a raffinóz és a verbaszkóz, ezen kívül a legtöbb *Dikarya* gomba sejtfalának (pl.: arabinogalaktán) fontos alkotóeleme is a D-galaktóz (Free, 2013). A magasabb rendű eukariótákban megtalálható glikoproteinek és glikolipidek hexóz komponense szintén a D-galaktóz (Pomin, 2016). Az L-arabinogalaktán két fő csoportban fordul elő, úgynevezett I- és II típusú arabinogalaktánként. Mindkét formában a heteropolimer gerincét elsősorban β -kötésű D-galaktopiranóz alkotja, az I típusú arabinogalaktánban 1-4, a II típusú arabinogalaktánban 1-3 kötéssel (Sakamoto és Ishimaru, 2013; Knoch és mtsai 2014).

(1.) A jelen munkánk során először vizsgáltuk meg, hogy nagy koncentrációban az *Aspergillus. nidulans* képes-e egyidejűleg metabolizálni a D-galaktózt és az L-arabinózt is, vagy a gomba egyértelműen előnyben részesíti az egyik szénhidrátot a másikkal szemben.

Az *A. nidulans*-ban a D-galaktóz a Leloir és az alternatív oxidoreduktív útvonalon keresztül katabolizálódik (Fekete et al., 2004). A legtöbb pro- és eukariótákban jelen lévő Leloir útvon első lépésében a galaktokináz az alfa-D-galaktopiranózt D-galaktóz-1 –foszfátá alakítja (Frey,

1996; Holden és mtsai, 2003). A galaktokináz enzimek a galaktopiranoz alfa-anomerjére specifikusak (Howard és Heinrich, 1965).

Az aldóz-1-epimerázok (mutarotázok, EC 5.1.3.3) az aldózok hemiketál vagy hemiacetál anomer szénatomján (C-1) lévő hidroxil csoport α és β -anomerek átalakulását katalizálják, az egyensúly irányába irányítva az elegyet (Nelson és Beegle, 1919).

(2.) Ebben a munkában két aldóz-1-epimeráz gént (*galmA* és *galmB*) azonosítunk az *A. nidulans*-ban, és megvizsgáljuk, hogy ezek géntermék fiziológiailag releváns a D-galaktóz anyagcserében.

2 ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

2.1 Aspergillus nidulans törzsek, táptalajok és tenyésztési feltételek

A doktori munkám során az **1. táblázatban** felsorolt törzsekkel végeztünk kísérleteket.

1. táblázat A munkánk során felhasznált *Aspergillus nidulans* törzsek

Törzs	Genotípus	Hivatkozás
R21 ^a	<i>pabaA1; yA2; veA1</i>	Fantes és Roberts, 1973
TN02A3 (FGSC A1149)	<i>pyrG89; pyroA4; $\Delta nkuA::argB$; veA1</i>	Nayak és mtsai., 2006
RJMP155.55	<i>riboB2; wA3; nkuA⁺; Vea⁺</i>	Keller Lab (Madison, WI, USA)
LKEF_005	<i>(pyrG89); pyroA4; $\Delta nkuA::argB$; $\Delta galmA::Tr.pyr4^b$ (uridine prototroph)</i>	Kulcsár és mtsai., 2017

LKEF_006	<i>(pyroA4); pyrG89 ΔnkuA::argB; ΔgalmB::Af.pyroA^c</i> (pyridoxine prototroph)	Kulcsár és mtsai., 2017
LKEF_007	<i>(pyroA4); (pyrG89) ΔnkuA::argB; ΔgalmA::Tr.pyr4; ΔgalmB::Af.pyroA</i> (pyridoxine & uridine prototroph)	Kulcsár és mtsai., 2017
LKEF_002 ^d	<i>(pyroA4); (pyrG89) ΔgalmA::Tr.pyr4; nkuA⁺; riboB2;</i> (pyridoxine & uridine prototroph)	Kulcsár és mtsai., 2017
LKEF_001 ^d	<i>(pyroA4); (pyrG89);(riboB2) ΔgalmA::Tr.pyr4; ΔnkuA::argB; wA3;</i> (pyridoxine, uridine & riboflavin prototroph)	Kulcsár és mtsai., 2017
LKEF_008 ^e	<i>(pyroA4); (pyrG89); ΔgalmB::Af.pyroA; nkuA⁺; riboB2;</i> (pyridoxine & uridine prototroph)	Kulcsár és mtsai., 2017
LKEF_003 ^e	<i>(pyroA4); (pyrG89); (riboB2); ΔgalmB::Af.pyroA; nkuA⁺;</i> (pyridoxine, uridine & riboflavin prototroph)	Kulcsár és mtsai., 2017
LKEF_9.15	<i>(pyroA4); (pyrG89) ΔgalmA::Tr.pyr4 (riboB2); nkuA⁺; Af.riboB^f; galmA²⁺</i> (pyridoxine, uridine & riboflavin prototroph)	Kulcsár és mtsai., 2017
LKEF_10.9	<i>(pyroA4); (pyrG89) ΔgalmB:: Af.pyroA; (riboB2); nkuA⁺; Af.riboB^f; galmB¹⁺</i> (pyridoxine, uridine & riboflavin	Kulcsár és mtsai., 2017

	prototroph)	
LKEF_10.8	(<i>pyroA4</i>); (<i>pyrG89</i>) Δ <i>galmB</i> :: <i>Af.pyroA</i> ; (<i>riboB2</i>); <i>nkuA</i> ⁺ ; <i>Af.riboB</i> ^f ; <i>galmB</i> ³⁺ (pyridoxine, uridine & riboflavin prototroph)	Kulcsár és mtsai., 2017
LKEF_10.22	(<i>pyroA4</i>); (<i>pyrG89</i>) Δ <i>galmB</i> :: <i>Af.pyroA</i> ; (<i>riboB2</i>); <i>nkuA</i> ⁺ ; <i>Af.riboB</i> ^f ; <i>galmB</i> ⁴⁺ (pyridoxine, uridine & riboflavin prototroph)	Kulcsár és mtsai., 2017
LKEF_10.7	(<i>pyroA4</i>); (<i>pyrG89</i>) Δ <i>lacpB</i> :: <i>Af.pyroA</i> ; (<i>riboB2</i>); <i>nkuA</i> ⁺ ; <i>Af.riboB</i> ^f ; <i>galmB</i> ⁵⁺ (pyridoxine, uridine & riboflavin prototroph)	Kulcsár és mtsai., 2017
AOEF_006	<i>pyrG89</i> ; <i>AgalE</i> :: <i>Af.pyroA</i> ^c ; Δ <i>nkuA</i> :: <i>argB</i>	Németh és mtsai., 2018
G094	<i>biA1</i> ; <i>wA3</i> ; <i>araA1</i>	Clutterbuck, 1981; de Vries és mtsai., 1994

Az 1. táblázatban található lábjegyzet magyarázata:

Clutterbuck 1993 évi közleményét követtük a releváns mutációk és egyéb markerek jelölése során.

Az alkalmazott rövidítések:

^a vad típusú referencia törzs; ^b *T. reesei* orotidin-5-foszfát-dekarboxiláz (*pyr4*) génje; ^c *A. fumigatus* piridoxin bioszintézis (*pyroA*) génje; ^d az LKEF005 és az RJMP155.55 törzsek keresztezéséből származó utód; ^e az LKEF006 és az RJMP155.55 törzsek keresztezéséből származó utód. ^f *A. fumigatus* GTP ciklohidroxiláz (*riboB*) génje.

A rázott lombikos tenyésztéseket 500 ml-es Erlenmeyer-lombikokban végeztük 100 ml AMM (Aspergillus Minimal Medium) tápoldatban, 37 °C-on, és 200 percenkénti fordulatszámon (Pontecorvo et al. (1953)). A tenyésztésekhez használt sterilizett tápoldat szénforrásainak kezdeti koncentrációja 1,0 vagy 1,5 % (w/v), a konídium koncentrációja pedig 10⁶ *A. nidulans* konídium/ml volt (Fekete és mtsai., 2002).

A növekedési tesztekhez agarral szilárdított AMM táptalajt is használtunk. A Petri csészékben lévő táptalajt egyetlen pontban sűrű, frissen készített vegetatív spórák szuszpenziójával oltottuk le és 37 °C-on inkubáltuk.

Enzim aktivitás méréshez 1 % glicerint tartalmazó AMM tápoldatban előnövesztettük a törzseket. AMM tápoldatra történő átmosás és az 1 órás éheztetés után 1 % végkoncentrációban D-galaktózt adtunk a tenyészetekhez.

Az indukciós kísérletekhez a micéliumokat 37 °C-on 24 órán át előnövesztettük glicerint (neutrális szénforrást) tartalmazó AMM minimál tápoldatban. A tenyészetek szűrését és steril vízzel történő mosását követően a micéliumot szénforrás nélküli AMM tápoldatba vittük át és további 1 órán át inkubáltuk 200 rpm-en, 37 °C-on. Az 1 órás éheztetést követően a tenyészetekhez adagoltuk a vizsgálandó indukciós szénforrást 1 % (w/v) végkoncentrációban.

2.2 Genetikai technikák és transzformálás

A. nidulans transzformációját Tilburn és mtsai., (1983) alapján végeztük. A kapott transzformánsokat kétszer tisztítottuk, hogy egyetlen sejtből képzett kolóniát kapjunk. A transzformánsokat szelektív minimál táptalajon tartottuk fenn.

2.3 Hiánymutáns törzsek létrehozása

A *galmA*, a *galmB* és a *galE* gének deléciós kazettáit double-joint PCR technikával (Yu és mtsai., 2004) szintetizáltuk meg. A *galmA* deléciós kazetta esetében a *T. reesei* a funkcionális orotidin-5'-monofoszfát-dekarboxiláz (*pyr4*) génjét (Gruber és mtsai., 1990), miközben a *galmB* és a *galE* esetében az *A. fumigatus* *pyroA* génjét (a piridoxin anyagcserében fontos, Nayak és mtsai., 2006) használtuk szelektációs géneként. Az *A. nidulans* TN02A3 törzs (Nayak és mtsai., 2006) protoplasztjait (piridoxin és uridin-auxotróf törzs) 10 µg lineáris deléciós kazettával transzformáltuk, így nyerve

az egyszeres *galmA*, a *galmB* vagy a *galE* hiánymutánsokat. A *galmA/galmB* kettős aldóz-1-epimeráz mutáns létrehozásához az in vitro megszintetizált deléciós kazetták 5-5 µg-ját az *A. nidulans* piridoxin és uracil auxotróf TN02A3 transzformálási törzshez juttattuk. Ez a törzs nem rendelkezik a DNS mindkét láncát érintő törések javításának képességével (*nkuA* hiányos) így a transzformációk hatékonysága jelentősen megnő. A kapott piridoxin- vagy az uridin-prototróf transzformánsokat a *galmA*, a *galmB* vagy a *galE* gén szekvenciájának hiányával azonosítottuk gén specifikus primerekkel, PCR technika segítségével. Több független egyszeres *galmA*, *galmB* és dupla *galmA/galmB* hiányos törzs fenotípusos jegyeit is teszteltük.

2.4 A *galmA/galmB* aldóz-1-epimeráz gének visszatranszformálása a *galmA* vagy a *galmB* hiányos háttérrel rendelkező mutánsba

Egy első generációs, karakterizált *galmA* (LKEF005) vagy *galmB* (LKEF006) hiánymutáns törzset kereszteztünk az RJMP 155.55 törzssel, hogy új auxotrófia markert kapjunk, illetve hogy az *nkuA* deléciótól megszabaduljunk. Piridoxin-prototróf és riboflavin-auxotróf, illetve uridin-prototróf és riboflavin-auxotróf utódokban PCR technika segítségével vizsgáltuk az *nkuA* gén jelenlétét. A már *nkuA* génnel rendelkező második generációs *galmA* vagy *galmB* hiánymutáns törzset 10 µg amplifikált, tisztított *galmA* vagy *galmB* PCR termékkel és 1 µg pTN2 plazmiddal (*A. fumigatus* *riboB* génje, a riboflavin bioszintézisben részt vevő fehérjét kódol; Nayak és mtsai., 2006) ko-transzformáltuk. A riboflavin-prototróf transzformánsok között a visszatranszformált *galmA* vagy a *galmB* gén meglétét PCR, majd később Southern-blot technika segítségével vizsgáltuk. A *galmA* és a *galmB* visszatranszformált/túltermelő (1 vagy több kópiás) törzsek közül néhányat fenotípusosan is jellemeztük.

2.5 Genomi DNS és totál RNS-izolálás

A biomasszát „miracloth” nevű textilszűrőn a lehető leggyorsabban kiszűrtük, hideg steril vízzel alaposan átmostuk, papírtörelő segítségével a víz nagy részét eltávolítottuk, majd folyékony nitrogénben azonnal lefagyasztottuk. A lefagyasztott biomasszát nitrogénnel hűtött mozsárban porrá őröltük. A genomi DNS-t Promega Wizard SV Genomic DNA Purification System Kit segítségével, míg az RNS-t a Promega SV Total RNS-t izoláló kit segítségével nyertük ki.

2.6 Northern- és Southern-blot analízis

A Northern- és a Southern-blot analízis során Sambrook és Russel (2001) által publikált standard eljárásokat használtuk. A hibridizációt Lumi-Film kemilumineszcens detektáló film (Roche Applied Science) segítségével tettük láthatóvá. PCR DIG Probe Synthesis Kit (Roche Applied Science) segítségével szintetizáltuk meg a digoxigeninnel jelölt génspecifikus oligonukleotidokat.

2.7 Analitikai módszerek

A száraz sejtömeget (DCW) meghatározásához 5 ml fermentlevet egy előre lemért tömegű papírszűrőn keresztül leszűrünk, majd többször hideg vízzel átmostunk, végül 80 °C-on tömegállandóságig szárítottuk a biomasszát. A vizsgált szénhidrátok koncentrációját HPLC-vel határoztuk meg egy protoncserélő oszlop és törésmutató (RI) detektor alkalmazásával (Fekete és mtsai., 2002).

A mutarotáz aktivitást Bouffard és mtsai., 1994-ben publikált közleménye alapján határoztuk meg. A β -glükóz-dehidrogenáz (*Pseudomonas sp.*, Sigma Aldrich) enzim szinte csak a β -anomert képes oxidálni, miközben a β -NAD, β -NADH-vá redukálódik. Mivel az α -D-glükóz spontán is képes β -D-glükózzá alakulni, ezért ezzel a β -D-glükóz mennyiséggel korrigálni kell a számításnál. 1 egység, az pH=7,2, 25 °C-on, 1 perc alatt a spontán mutarotáció felett keletkezett β -D-glükóz mennyisége μ mol-ban. A specifikus aktivitás, a mutarotáz aktivitás fehérjetartalomra vonatkoztatott értéke, U/mg fehérjében.

Az analitikai és biokémiai eredmények 3-5 független kísérlet átlagából származnak. Az adatok elemzése és számszerűsítése SigmaPlot szoftver (Jandel Scientific) segítségével valósult meg. Minden kísérletsorozaton belül standard eltéréseket (SDs) határoztunk meg.

2.8 Bioinformatikai analízis

Az *E. coli* és a humán (fehérje azonosító szám: P0A9C3 és Q96C23) és a *S. cerevisiae* Gal10p C-terminális domént (P04397: 356–699 aleggység) használtuk a TBLASTN keresés során (Basic Local Alignment Search Tool algoritmus, mely egy fehérje szekvenciát keres minden olvasási keretben: Altschul és mtsai., 1997). A szerkezetileg rokon Ascomycete fehérjéket kódoló génekhez a National Center for Biotechnology Information (NCBI) és

az US Dept. of Energy Joint Genome Institute (JGI) által rendelkezésre bocsátott nukleotid adatbázisokból fértünk hozzá 2015 tavaszán. A filogenetikai analízis evolúciós alapjainak biztosítása érdekében az ilyen géneket a Dikaryákon kívül besorolt gombákban is azonosítottuk. A génmodelleket és az analízis végeredményét manuálisan korrigáltuk. Az így kapott 791 peptidszekvenciát a MAFFT 7-es verziójával (Katoh és Standley, 2013), az E-INS-i algoritmussal (több konzervált domén felismerésére fejlesztve) és egy BLOSUM 45 hasonlósági mátrixszal illesztettük. A fehérjeszekvenciákat a doktori disszertációmban nem tüntetem fel. A kapott illesztést az Entropy 1.12 verziójának (BLOSUM 45 hasonlóságú mátrix, 4 blokk méretű blokk, Criscuolo és Gribaldo, 2010) segítségével válogattuk, 162 informatív egységet eredményezve.

3 Új tudományos eredmények

- Két lehetséges mutarotáz gént azonosítottunk, az intronmentes AN3184-et, amit *galmA*-nak, és a két exont tartalmazó AN3432-öt, amit *galmB*-nek neveztünk el.
- A D-galaktóz felvétel és a biomassza képződés szignifikáns lecsökkent a *galmB* hiányában a vad törzshöz képest.
- A $\Delta galmA$ süllyesztett sejtenyészetekben a referencia törzshöz képest nem tapasztaltunk szignifikáns eltérést a biomassza képződésben vagy a D-galaktóz koncentráció alakulásában sem.
- A *galmB* egyszeres és a dupla *galmA/galmB* *A. nidulans* hiánymutánsok D-galaktózon vagy L-arabinózon növesztett biomasszáik sejtmentes kivonataiban a megfigyelt mutarotáció nem szignifikánsan haladta meg a spontán mutarotáció mértékét a reakció pufferben.
- A *galmB* túltermelő törzsekben a vad típushoz képest szignifikánsan nagyobb enzimaktivitás volt mérhető, a specifikus aktivitás a kópiaszámmal arányosan változott.
- A *galmB* túltermelő mutánsainál a biomassza képződés vagy a cukorfelvétel sebessége nem nőtt, ez azt jelenti, hogy a tesztelt körülmények mellett a mutarotáció a D-galaktóz katabolizmusban nem sebességmeghatározó a vad típusú törzsből.
- Az *A. nidulans* képes egyidejűleg és hasonló sebességgel metabolizálni a D-galaktózt és az L-arabinózt is.
- Az alternatív oxidoreduktív útvonal becslésünk szerint 12,5-44,2 % -ban járul a D-galaktóz hasznosításához.
- A pentózok és a D-galaktóz az ORP, PCP és Leloir útvonal egyes katabolikus génjeit indukálják függetlenül attól, hogy a kódolt enzim(ek) valójában részt vesz(nek) az adott szénhidrát metabolizmusában

4 ÖSSZEFOGLALÁS

Az első enzim katalizálta mutarotációt a *P. chrysogenum*-ban azonosították ami nagyon közeli rokona az *A. nidulans*-nak. Ezért mind az *A. nidulans* és mind a *P. chrysogenum* genomját megvizsgáltuk lehetséges aldóz-1-epimerázokat kutatva. Amikor a humán vagy az *E. coli* GalM fehérjét vagy a *S. cerevisiae* Gal10 bifunkcionális fehérje C-terminális részének szekvenciáját használtuk TBLASTN során, két lehetséges gént azonosítottunk, az intronmentes AN3184-et, amit *galmA*-nak, és a két exont tartalmazó AN3432-öt, amit *galmB*-nek neveztünk el.

Ahhoz, hogy megállapítsuk, hogy a *galmA* vagy a *galmB* kódolja a fiziológián jelentős galaktóz-mutarotáz, mind a két gént külön-külön és egyszerre is deletáltuk a gomba genomjából, így kaptuk a $\Delta galmA$, a $\Delta galmB$ egyszeres, és a $\Delta galmA/\Delta galmB$ dupla hiánymutánsokat. Ezt követően az egyszeres hiánymutáns törzsekbe visszajuttattuk az előzően deletált lehetséges mutarotáz kódoló géneket. Ezen visszatranszformált, túltermelő törzsek kópiaszámát Southern-blot analízissel határoztuk meg.

Minden *galm* mutáns különböző szénforrás tartalmú sülyesztett kultúrákban is megvizsgáltuk. A D-galaktóz felvétel és a biomassa képződés szignifikáns lecsökkent a *galmB* hiányában a vad törzshöz képest. Ezzel ellentétben a $\Delta galmA$ sülyesztett sejttenyészetekben a referencia törzshöz képest nem tapasztaltunk szignifikáns eltérést a biomassa képződésben vagy a D-galaktóz koncentráció alakulásában sem. A $\Delta galmA/\Delta galmB$ dupla hiánymutáns fenotípusa a *galmB* deléciós mutánséhoz hasonlított. Egyéb szénforrásokon, így D-glükózon, illetve glicerinen, L-arabinózon nem volt tapasztalható a cukorfogyásban lényeges különbség a vizsgált mutánsok között.

A *galmB* egyszeres és a dupla *galmA/galmB* *A. nidulans* hiánymutánsok D-galaktózon vagy L-arabinózon növesztett biomasszáik sejtmentes kivonataiban a megfigyelt mutarotáció nem szignifikánsan haladta meg a spontán mutarotáció mértékét a reakció pufferben. Ezzel szemben a *galmB* túltermelő törzsekben a vad típushoz képest szignifikánsan nagyobb enzimaktivitás volt mérhető, a specifikus aktivitás a kópiaszámmal arányosan változott.

Mindazonáltal a *galmB* túltermelő mutánsai nem befolyásolták a biomassza képződés vagy a cukorfelvétel sebességét, ez alól kivételt képez a *galmB* deléciós törzsei. Ez azt jelenti, hogy a tesztelt körülmények mellett a mutarotáció a D-galaktóz katabolizmusban nem sebességmeghatározó a vad típusú törzsben.

Érdekes módon a *galmA* túltermelő mutánsainál, így a D-galaktózon vagy a D-glükózon alapuló növekedési profilban vagy az aldóz-1-epimeráz aktivitás alakulásában sem volt fiziológiásan megfigyelhető különbség.

A jelen munkánk során először vizsgáltuk meg, hogy nagy koncentrációban az *A. nidulans* képes-e egyidejűleg metabolizálni a D-galaktózt és az L-arabinózt is, vagy a gomba egyértelműen előnyben részesíti az egyik szénhidrátot a másikkal szemben. A gomba a két cukrot egyidejűleg vette fel, és többé-kevésbé hasonló sebességgel fogyasztotta. A két monoszacharid felhasználásnak sebessége meglehetősen hasonlóknak tűnik, mindkét szénforrást kb. 72 óra (3 nap) alatt hasznosította a mikroba. Mindazonáltal úgy tűnik, hogy a vegyes tenyészetben a pentóz némileg gyorsabban hasznosul, mint a hexóz.

Az L-arabinóz és a D-galaktóz katabolizmusában részt vevő struktúrgének transzkripciójának tanulmányozására azokat a géneket választottuk, amelyek fontossága funkcióvesztéses galaktokináz (*galE*), mutarotáz (*galmB*) és arabitól-dehidrogenáz (*araI*) mutánsokkal már bizonyítható volt az *A. nidulans*-ban.

Mindhárom mutáció befolyásolja a D-galaktóz hasznosítás sebességét. A legnagyobb gátló hatás *ΔgalE* esetében volt, a rendelkezésre álló szénforrásnak csak 20% -át fogyasztotta 120 órával a beoltás után. Az *araAI* mutánsban az alternatív útvonal L-arabinitol (galaktitol):NAD⁺ dehidrogenáz enzim hiánya lelassította a növekedést, így a galaktóz kimerülése a 3 nap helyett 5 napig tartott. Ezekből az adatokból az alternatív oxidoreduktív útvonal becslésünk szerint 12,5-44,2 % -ban járul a D-galaktóz hasznosításához. A mutarotáz hiánytörzs (*ΔgalmB*) D-galaktóz fogyasztása nagyon hasonlít az L-arabinitol-dehidrogenáz null mutánséhoz, sokkal kevésbé korlátozva azt, mint a galaktokináz deletált mutánst.

Másrészt a galaktokináz és galaktóz mutarotáz deléciók nem mutatnak jelentős hatást az L-arabinóz hasznosíthatóságára. Három nappal a beoltás

után a pentóz mindig kimerült a vad típusú, a galaktokináz- és a mutarotázhiánymutánsok esetében, míg az L-arabinitol-dehidrogenáz-mutánsnál 3 nap után mintegy 75 %-a és 5 napos rázatás után a szénforrás körülbelül 40 %-a maradt meg.

A galaktóz metabolizmusban funkcionálisan részt vevő három gén transzkripciójával párhuzamosan a D-xilulokináz (*xkiA*) gént is vizsgáltuk, ami csak a pentóz lebontásban játszik szerepet, de elengedhetetlen a pentóz-foszfát nem oxidatív részében. Glicerinen előnövesztett tenyészeteket glicerint, csak D-galaktózt, csak L-arabinozt és együtt D-galaktózt, L-arabinozt tartalmazó tápoldatba mostuk át. Amint vártuk, az L-arabinitol-dehidrogenáz gén (*araA*) a vizsgált szénhidrátokon kifejeződött, mivel az feltételezhetően mindkét cukor metabolizmusában részt vesz. Az L-arabinnal indukált tenyészetekben az expresszió szint hamarabb elérte a maximumot, mint D-galaktózon. Az aldóz katabolizmusban az oxidoreduktív útvonal Leloir útvonalhoz képest kisebb arányban játszik szerepet. A xilulokináz (*xkiA*) gén minden vizsgált szénforráson (kontrol glicerinen is) indukálódott, és némileg nagyobb mértékű génexpresszió csak 8 órával L-arabinnal történő átoltás után volt megfigyelhető. Ezzel ellentétben a galaktokináz (*galE*) és az *araA1* gén kifejeződésére úgy tűnik, hogy mindkét szénhidrát hatással volt, az L-arabinnal tenyészetekben az expressziós szint hamarabb elérte a maximumot, mint D-galaktózon. Érdekes módon a Northern blot eredménye azt mutatja, hogy a pentózok hasonló hatást mutatnak, mint a vizsgált aldóz. Ez azért figyelemre méltó, mert a *GalE* nem vesz részt az oxidoreduktív L-arabinnal metabolizmusában, mivel a Leloir útvonal első lépésében az alfa-D-galaktopiranozid C1 pozíciójában irreverzibilis foszforilációját katalizálja.

Ezenkívül a galaktóz 1-epimeráz (*galM*) génjének a pentózokon tapasztalható indukció nagysága nagyobb, mint a D-galaktóz jelenlétében. A *galM* transzkriptuma alig kimutatható a glicerinnel kontroll mintáiban. Funkcionális értelemben a *galM* L-arabinnal generált hiperindukciója fiziológiailag aberránsnak tűnik, mivel a gén deléciója nem vezetett a növekedés gátláshoz vagy csökkenéshez a pentózon. Ami olyan szempontból logikus, hogy az oxidoreduktív útvonal mind az öt enzime kizárólagos szubsztrátja az aldóz és a ketóz intermedierek szabad aldehid, azaz a cukrok

lineáris, és nem anomer hemiacetál vagy hemiketál formája. A szabad aldehidforma az anomer interkonverzió közbenső terméke, de a mutarotáz enzimhez kötődik, azaz a mutarotáz elméletileg nem növeli a szabad aldehid forma koncentrációját a sejtben.

Az együttesen L-arabinózt és D-galaktózt is tartalmazó tápoldatokra átmosott 8 órás tenyészet négy kiválasztott génje alapvetően hasonlóan viselkedett, mint pentózon. A 24 órás *galmB* és *araA* indukciós szintjei hasonlóak voltak, mint csak L-arabinózos tenyészetekben, egyértelműen jobban expresszálódtak, mint csak az aldózon önmagában. A *galE*-t a kevert szénforráson talán némileg jobban fejeződött ki, mint az önmagában L-arabinózon vagy D-galaktózon. Eredményeinkből azonban nem tudjuk megállapítani, hogy a galaktokináz gén kizárólag a D-galaktózra reagál-e 24 órával az indukció után, vagy van esetleg additív hatása az L-arabinóz együttes jelenlétének is.

5 Introduction and objectives

Pezizomycotina is a subphylum of Ascomycota which comprises many saprophytic and/or plant pathogenic fungi, feeding on living or dead plant material. The fungal degradation of (plant) polysaccharides involves complexes of hydrolytic enzymes that act in synergy to liberate all the constituent monosaccharides for internal turnover of the growth substrate

D-galactose – the C-4 epimer of D-glucose – is the only constituent monosaccharide common to all three major classes of hemicellulose, that together with cellulose and pectin makes up lignocellulose, the most abundant organic material on Earth (for a recent review, see Cragg et al., 2015). The disaccharide lactose, the major carbohydrate of milk, consist of galactose and glucose linked by a *beta*-1,4 bond. Moreover, D-galactose is part of a variety of plant hetero-oligosaccharides such as stachyose, raffinose and verbascose, and also occurs prominently in the cell walls (for example in L-arabinogalactan) of fungi of most Dikarya taxa (Free, 2013). Finally, as part of the sugar residues of certain glycoproteins and glycolipids, it is involved in some vital cellular functions in higher eukaryots (Pomin, 2016). L-Arabinogalactan occurs in two main configurations called type I- and type II arabinogalactan. In both forms, the backbone of the heteropolymer contains principally beta-linked D-galactopyranose, linked [1,4] in type I arabinogalactan and [1,3] in type II arabinogalactan (Sakamoto and Ishimaru, 2013; Knoch et al., 2014).

(1.) In this work, we sought to investigate whether the monosaccharides that constitute plant hemicellulolytic or pectic heteropolysaccharides are taken up and catabolised simultaneously and whether these sugars actively facilitate the catabolism of each other to efficiently use the available growth substrate. We chose to study the possible catabolic synergism at the regulatory level with the two principal monosaccharide components of the plant cell wall heteropolysaccharide L-arabinogalactan, L-arabinose and D-galactose.

In this fungus, D-galactose is catabolized via the Leloir and the alternative oxido-reductive pathways (Fekete et al., 2004). The Leloir pathway – which is operative in most pro- and eukaryotes – begins with

ATP-dependent phosphorylation of alpha-D-galactopyranose to D-galactose-1-phosphate by galactokinase as the first dedicated reaction (see Frey, 1996; Holden et al., 2003 for reviews). A physiologically important characteristic of galactokinase is that the enzyme only acts on α -D-galactopyranose (Howard and Heinrich 1965).

Mutarotases (systematic name: aldose 1-epimerase; EC 5.1.3.3) catalyze the interconversion of α - and β -anomers of aldoses) Nelson and Beegle, 1919).

(2) In this work, we identify two aldose-1-epimerase genes (*galmA* and *galmB*) in *A. nidulans* and investigate that the gene products are physiologically relevant for the utilization of D-galactose.

6 MATERIALS AND METHODS

6.1 *Aspergillus nidulans* strains used in this study

A. nidulans strains used in this study are listed in Table 1.

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

Strain	Genotype	References
R21 ^a	<i>pabaA1; yA2; veA1</i>	Fantes and Roberts, 1973
TN02A3 (FGSC A1149)	<i>pyrG89; pyroA4; ΔnkuA::argB; veA1</i>	Nayak et al., 2006
RJMP155.55	<i>riboB2; wA3; nkuA⁺; Vea⁺</i>	Keller Lab (Madison, WI, USA)
LKEF_005	<i>(pyrG89); pyroA4; ΔnkuA::argB;</i>	Kulesár et al.,

	<i>ΔgalmA::Tr.pyr4^b</i> (uridine prototroph)	2017
LKEF_006	<i>(pyroA4); pyrG89 ΔnkuA::argB; ΔgalmB::Af.pyroA^c</i> (pyridoxine prototroph)	Kulcsár et al., 2017
LKEF_007	<i>(pyroA4); (pyrG89) ΔnkuA::argB; ΔgalmA::Tr.pyr4; ΔgalmB::Af.pyroA</i> (pyridoxine & uridine prototroph)	Kulcsár et al., 2017
LKEF_002 ^d	<i>(pyroA4); (pyrG89) ΔgalmA::Tr.pyr4; nkuA⁺; riboB2;</i> (pyridoxine & uridine prototroph)	Kulcsár et al., 2017
LKEF_001 ^d	<i>(pyroA4); (pyrG89);(riboB2) ΔgalmA::Tr.pyr4; ΔnkuA::argB; wA3;</i> (pyridoxine, uridine & riboflavin prototroph)	Kulcsár et al., 2017
LKEF_008 ^e	<i>(pyroA4); (pyrG89); ΔgalmB::Af.pyroA; nkuA⁺; riboB2;</i> (pyridoxine & uridine prototroph)	Kulcsár et al., 2017
LKEF_003 ^e	<i>(pyroA4); (pyrG89); (riboB2); ΔgalmB::Af.pyroA; nkuA⁺;</i> (pyridoxine, uridine & riboflavin prototroph)	Kulcsár et al., 2017
LKEF_9.15	<i>(pyroA4); (pyrG89) ΔgalmA::Tr.pyr4 (riboB2); nkuA⁺; Af.riboB^f; galmA²⁺</i> (pyridoxine, uridine & riboflavin prototroph)	Kulcsár et al., 2017
LKEF_10.9	<i>(pyroA4); (pyrG89) ΔgalmB::</i>	Kulcsár et al., 2017

	<i>Af.pyroA</i> ; (<i>riboB2</i>); <i>nkuA</i> ⁺ ; <i>Af.riboB</i> ^f ; <i>galmB</i>^{l+} (pyridoxine, uridine & riboflavin prototroph)	
LKEF_10.8	(<i>pyroA4</i>); (<i>pyrG89</i>) Δ <i>galmB</i> :: <i>Af.pyroA</i> ; (<i>riboB2</i>); <i>nkuA</i> ⁺ ; <i>Af.riboB</i> ^f ; <i>galmB</i>³⁺ (pyridoxine, uridine & riboflavin prototroph)	Kulcsár et al., 2017
LKEF_10.22	(<i>pyroA4</i>); (<i>pyrG89</i>) Δ <i>galmB</i> :: <i>Af.pyroA</i> ; (<i>riboB2</i>); <i>nkuA</i> ⁺ ; <i>Af.riboB</i> ^f ; <i>galmB</i>⁴⁺ (pyridoxine, uridine & riboflavin prototroph)	Kulcsár et al., 2017
LKEF_10.7	(<i>pyroA4</i>); (<i>pyrG89</i>) Δ <i>lacpB</i> :: <i>Af.pyroA</i> ; (<i>riboB2</i>); <i>nkuA</i> ⁺ ; <i>Af.riboB</i> ^f ; <i>galmB</i>⁵⁺ (pyridoxine, uridine & riboflavin prototroph)	Kulcsár et al., 2017
AOEF_006	<i>pyrG89</i> ; <i>Δgale</i> :: <i>Af.pyroA</i> ^c ; Δ <i>nkuA</i> :: <i>argB</i>	Németh et al., 2018
G094	<i>biA1</i> ; <i>wA3</i> ; <i>araA1</i>	Clutterbuck, 1981; de Vries et al., 1994

Footnotes:

The references given refer to the mutations relevant to this work; other markers are in standard use (Clutterbuck, A.J., 1993).

Indexes used: ^a wild-type reference for lactose utilization; ^b *T. reesei* orotidine-5-phosphate decarboxylase (*pyr4*) gene; ^c *A. fumigatus* pyridoxine

biosynthesis (*pyroA*) gene; gene; ^d Offspring of a cross between LKEF005 and RJMP155.55; ^e Offspring of a cross between LKEF006 and RJMP155.55. ^f *A. fumigatus* GTP cyclohydrolase (*riboB*).

Aspergillus Minimal Medium (AMM) for shake-flask cultures was described by Pontecorvo et al. (1953). Carbon sources were used at 1.0 or 1.5 % (w/v) initial concentration. Cultures were inoculated with 10^6 *A. nidulans* conidia (ml medium)⁻¹. Shake-flask cultures were incubated at 37 °C in 500 ml Erlenmeyer flasks containing 100 ml culture aliquots in a rotary shaker at 200 rpm.

Agar-solidified AMM medium was used for growth tests; plates were “point” inoculated with a single drop of a freshly prepared suspension of vegetative spores at low density and incubated at 37 °C.

For enzyme activity determinations, replacement cultures were used for which mycelia were pre-grown for 24 h in AMM containing glycerol, and harvested by filtration. After washing the biomass with cold sterile water, mycelia were transferred to flasks with carbon-free AMM and were incubated for 1 h in a rotary shaker at 200 rpm, after which carbon sources were added.

For transcript analysis, mycelia were pre-grown for 24 h in AMM containing glycerol and after thorough washing, transferred to fresh medium containing 1 (w/v) carbon source.

6.2 Classical genetic techniques and transformation

A. nidulans transformations were performed as described by Tilburn et al. (1983). Transformants were purified twice to single cell colonies and maintained on selective minimal medium plates.

6.3 Generation of knockout mutant strains

A gene deletion cassette was constructed using the double-joint PCR method (Yu et al., 2004). The *galmA* deletion cassette contained the *pyr4* gene from *T. reesei* (Gruber et al., 1990), while in the *galE* and the *galmB* deletion cassette, the *A. fumigatus pyroA* gene (Nayak et al., 2006) was used as primary selection marker. The oligonucleotide primers used are listed in Supplementary Table S2. Protoplasts of *A. nidulans* uridine- and pyridoxine-auxotroph strain TN02A3 were transformed with 10 µg of the linear deletion

cassette. This transformation host facilitates the acquisition of gene knock-outs due to the absence of functional non-homologous end-joining machinery (Nayak et al. 2006). Pyridoxine- or uridine-prototroph transformants were probed for the absence of *galmA* or *galmB* coding sequences by PCR, using gene-specific primers. For the creation of the double mutarotase deletion mutants (*galmA/galmB*), the same *galmA* and *galmB* replacement constructs (5 µg of each) as described above were co-introduced into TN02A3. Selected pyridoxine and uridine-prototroph, double deletion mutant strains were verified by PCR and then crossed out to reacquire the wild type *nkuA* gene. Offspring of two independently isolated primary double mutarotase mutants were routinely tested.

6.4 Reintroduction of *galmA/galmB* into gene-deleted backgrounds

Characterized first generation deletion mutants of *galmA* (LKEF005) or *galmB* (LKEF006) were each crossed with strain RJMP155.55 to exchange auxotrophic markers and rid the *nkuA* deletion. Pyridoxine/uridine-prototroph and riboflavin-auxotroph offsprings were verified by PCR for the presence of *nkuA*. Specific primers were used to amplify *galmA* and *galmB*. 10 µg amplification product was co-transformed with 1 µg pTN2 (carrying the *A. fumigatus riboB* gene; Nayak et al., 2006) into the appropriate *AnkuA*-cured gene deleted strain. Among the riboflavin-prototroph transformants, the presence of the reintroduced gene was probed by PCR. The *galm* copy number was estimated by Southern blot analysis, and selected strains that had acquired functional *galmA/galmB* in one or more copies were phenotypically characterized.

6.5 Genomic DNA and total RNA isolation

Mycelia were harvested by filtration, frozen in liquid nitrogen and ground to powder. Genomic DNA was extracted using a NucleoSpin Plant II kit whereas total RNA was isolated with a NucleoSpin RNA Plant kit (both kits from Macherey-Nagel). The concentration and purity were determined with a NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA).

6.6 Southern and Northern blot analysis

Standard procedures (Sambrook and Russell, 2001) were used. Probes were digoxigenin-labelled using a PCR DIG Probe Synthesis Kit (Roche;

Supplementary Table S2). Hybridization was visualized with Lumi-Film Chemiluminescent Detection Film (Roche).

6.7 Analytical methods

DCW (dry cell weight) was determined from 5 ml culture aliquots. Biomass was harvested onto a pre-weighted glass wool filter by suction filtration and washed with cold tap water after which the filter was air dried at 80 °C. The medium concentration of sugars was determined by HPLC with refractive index detection as described by Fekete et al. (2002).

The specific activity of mutarotase was measured by coupling the anomer epimerization of freshly solubilized *alpha*-D-glucose to an oxidation reaction catalyzed by the D-glucose dehydrogenase from a *Pseudomonas sp.* (EC. 1.1.1.47). This enzyme is specific for the β -anomer and uses NAD⁺ (Bouffard et al., 1994). The reaction was set up as described by Fekete et al. (2008). Initial epimerization rates in the absence of *A. nidulans* cell free extract were subtracted to correct for the spontaneous mutarotation occurring under assay conditions. One unit of mutarotase activity is defined as the amount of enzyme converting 1 μ mol of α -D-glucose at 25 °C, pH 7.2, in 1 min. Specific enzyme activities are reported per mg protein.

Kinetic data presented are the means of three independent fermentations (biological replicates), where two samples (technical replicates) were taken from each culture at every time point. Data were analyzed and visualized with SigmaPlot (Jandel Scientific), and for each procedure, standard deviations (SDs) were determined. The significance of changes relative to the control (wild-type) cultures was assessed as above.

6.8 Bioinformatic methods

Mutarotases from *E. coli* and human (protein accessions P0A9C3 and Q96C23, respectively) and the C-terminal mutarotase domain of *S. cerevisiae* Gal10p (P04397: residues 356–699), were used as queries in TBLASTN screening (Altschul et al., 1997). Ascomycete genes encoding structurally related proteins were extracted from nucleotide databases available at the National Center for Biotechnology Information in the spring of 2015. Gene models and products were deduced manually. To provide an evolutionary basis for phylogenetic analysis, structurally related genes were also identified in fungi classified outside the Dikarya. The 667 peptidic

sequences obtained are listed in Fasta format in the Supplementary materials. These proteins were aligned with MAFFT (Katoh and Standley, 2013) using the E-INS-i algorithm and a BLOSUM 45 similarity matrix. The alignment was curated with Block Mapping and Gathering using Entropy (Criscuolo and Gribaldo, 2010) employing a BLOSUM 45 similarity matrix and a block size of 4.

7 NEW SCIENTIFIC RESULTS

- Two putative mutarotase genes were identified in *A. nidulans*: an intronless gene at locus AN3184 we have called *galmA* and a two-exon gene at locus AN3432, *galmB*.
- The absence of *galmB* resulted in a considerable decrease in the amounts of D-galactose taken up while biomass formation was significantly delayed
 - Time profiles of biomass formation as well as D-galactose residual concentrations of the *galmA* deletion mutant cultures were not different from those of the wild-type reference.
 - Assaying cell free extracts from D-galactose-grown or L-arabinose-grown biomass of the *galmB* single- and *galm* double *A. nidulans* mutants, the observed mutarotation did not significantly exceed the spontaneous anomer conversion
 - *galmB* multicopy strains displayed significantly higher enzyme activities than the wild type, increasing with the copy number
 - Overexpressing (multi-copy) mutants of *galmB* did not affect the growth or sugar uptake, implying that catalyzed mutarotation is not rate-limiting for D-galactose catabolism in the wild type background
 - The fungus takes up and consumes the L-arabinose and the D-galactose concomitantly at more or less comparable rates
 - One can estimate the contribution of the alternative oxidoreductive route to the growth on galactose when both pathways are operative at 12.5-44.2 %.

- Each catabolic gene of the ORP, PCP and Leloir pathway will be responding by increased levels of expression to the presence of either pentose or D-galactose, irrespective of whether the enzymes encoded are actually involved in the catabolism of the given sugar.

8 SUMMARY

The organism in which enzyme-catalyzed mutarotation was first discovered, *Penicillium chrysogenum*, is closely related to *A. nidulans*. We screened the genome sequences of *A. nidulans* and *P. chrysogenum* for putative homologues of characterized galactose mutarotases. Regardless whether we employed the human enzyme, *E. coli* GalM or the C-terminal domain of the *S. cerevisiae* Gal10p bifunctional protein as the query in TBLASTN screening, two genes were identified in *A. nidulans*: an intronless gene at locus AN3184 we have called *galmA* – in concordance with the *E. coli* galactose operon gene for mutarotase, *galM* – and a two-exon gene at locus AN3432, *galmB*.

To investigate whether *galmA* and *galmB* encode physiologically relevant D-galactose mutarotases, the two genes were knocked out individually – giving rise to deletion strains $\Delta galmA$ and $\Delta galmB$ – as well as simultaneously, resulting in $\Delta galmA/\Delta galmB$ double mutants. Strains in which the functional *galm* genes were re-introduced in their respective single gene-deleted backgrounds were also generated. These latter strains carry one or more (i.e., two, three, four or five) gene copies at ectopic loci as revealed by Southern-blot analysis.

All these *galm* mutant strains were subjected to phenotypic analysis in submerged cultivations. The absence of *galmB* resulted in a considerable decrease in the amounts of D-galactose taken up while biomass formation was significantly delayed as compared to the wild-type control. In contrast, time profiles of biomass formation as well as D-galactose residual concentrations of the *galmA* deletion mutant cultures were not different from those of the wild-type reference. Double *galmA/galmB* deletion mutants grew as good as the single *galmB* deletion mutants on D-galactose.

Assaying cell free extracts from D-galactose-grown or D-glucose-grown biomass of the *galmB* single- and *galm* double *A. nidulans* mutants, the observed mutarotation did not significantly exceed the spontaneous anomer conversion found in the reaction buffer or in heat-inactivated cell free extracts. On the contrary, *galmB* multicopy strains displayed significantly higher enzyme activities than the wild type, increasing with the copy number. Nevertheless, overexpressing (multi-copy) mutants of *galmB* did not affect the growth or sugar uptake, implying that catalyzed mutarotation is not rate-limiting for D-galactose catabolism in the wild type background under the tested conditions. On the other hand, overexpression of *galmA* from multiple copies did not have any physiological effect on growth on D-galactose or on D-glucose mutarotation either. Importantly, both *galm* genes were expressed under the growth conditions used in this study on D-glucose as well as on D-galactose. No physiological effects were observed from *galm* overexpression on any of the other growth substrates tested (D-glucose, D-fructose, glycerol).

For the present work, we therefore first assessed whether *A. nidulans* grows simultaneously on D-galactose and L-arabinose or whether the fungus has a clear preference for one of them on a mixed carbon source of these sugars at high concentration. The fungus takes up and consumes these two sugars concomitantly at more or less comparable rates. The performance of the two sugars appears rather similar when cultured individually, as both are exhausted by 72 h (3 days) of cultivation. Nevertheless, in the mixed culture, the pentose appeared to be consumed faster than the aldose.

To monitor the transcription of structural genes involved in catabolism of L-arabinose and D-galactose in response to these two sugars, we selected those genes whose involvement was proven with loss-of-function galactokinase ($\Delta galE$) galactose-1-epimerase ($\Delta galmB$) and L-arabitol dehydrogenase (*araAI*) mutants in *A. nidulans*.

All three mutations had effects on the consumption of D-galactose, *GalE* having the biggest impact, although residual growth by means of the alternative pathway persists. Lack of the alternative pathway enzyme L-arabitol (galactitol):NAD⁺ dehydrogenase (*araAI* mutant) slows down the growth such that it takes 5 days instead of 3 days before the galactose is

exhausted, while the culture in which the Leloir path is blocked (*ΔgalE*) had consumed only 20 % of the available carbon source at 120 h after inoculation. From these data one can estimate the contribution of the alternative oxidoreductive route to the growth on galactose when both pathways are operative at 12.5-44.2 %. The performance of the strain lacking mutarotase (*ΔgalmB*) is more similar to that of the L-arabitol dehydrogenase null mutant, far less restricted than the galactokinase deletant. On the other hand, the galactokinase and galactose mutarotase deletions do not appear to have considerable effects on the performance on L-arabinose with the pentose exhausted three days after inoculation, while growth by the L-arabitol dehydrogenase loss-of-function mutant is clearly delayed, with some 75 % of the carbon source still available by the time the L-arabinose is exhausted in the wild type, the galactokinase- and the mutarotase loss-of-function mutants, and some 40 % left after 5 days of cultivation.

We probed the transcription of the three genes functionally involved in galactose catabolism in parallel with that of the D-xylulokinase (*xkiA*) gene, which is only involved in pentose catabolism but is essential for the flux into the nonoxidative part of the pentose phosphate pathway, during batch cultivation of the *A. nidulans* wild type strain. The glycerol-grown mycelia were transferred to fresh minimal medium with either L-arabinose, D-galactose, the mixed carbon source L-arabinose plus D-galactose or glycerol as the sole carbon source.

As can be expected, expression of the L-arabitol dehydrogenase gene (*araA*) is induced by both tested sugars as it is implicated in the catabolisms of either, albeit in the L-arabinose cultures it is expressed to higher levels and earlier after inoculation than in the D-galactose cultures. The oxidoreductive pathway is the minor alternative of the Leloir route for catabolism of the aldose. The xylulokinase (*xkiA*) gene has a high basal level of expression and some overexpression is only apparent on L-arabinose, 8 h after medium transfer. In contrast, the galactokinase (*galE*) gene appears to respond to both sugars, again seemingly earlier in the L-arabinose cultures than in the D-galactose cultures. Interestingly, the Northern suggests that the overall response to the pentose is of the same order as that to the aldose. This is remarkable because GalE is not involved in oxidoreductive L-arabinose

catabolism as it catalyses the first dedicated step of the Leloir path: the irreversible phosphorylation of alpha-D-galactopyranoside at C1. Furthermore, the response of the galactose 1-epimerase (*galmB*) gene to the pentose sugar appears to be one order of a magnitude higher than the induction observed in the presence of D-galactose, the anomers of which are the principal substrates of the intracellular mutarotase. *galmB* does respond to D-galactose as transcript is hardly visible in the glycerol control samples. In functional terms, this hyperinduction of *galmB* on L-arabinose seems physiologically aberrant as deletion of the gene does not lead to a growth phenotype on the pentose which is logical because all five enzymes of the oxidoreductive path are exclusively active on the free aldehyde of the aldose and ketose intermediates, and not on their anomeric hemiacetal or hemiketal forms. The free aldehyde form is the intermediate of anomer interconversion but it remains bound to the mutarotase enzyme.

On the mixed carbon source of L-arabinose and D-galactose after 8 h of contact time, the four diagnostic genes essentially behaved like they did in response to the pentose alone. At 24 h after medium transfer, the *galmB* and *araA* induction levels remained similar to their respective responses in the L-arabinose-alone cultures, clearly better expressed than on the aldose alone. Conversely, *galE* is now expressed to higher levels on the mixed carbon source than in the biomass grown on L-arabinose alone and the transcript level rather seems more similar to that in D-galactose-only cultures. However, from our results we cannot conclude whether the galactokinase gene is responding exclusively to D-galactose at 24 h after transfer or whether there is an additive effect from the co-presence of L-arabinose.

9 IRODALMI HIVATKOZÁSOK / REFERENCES

1. Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., & Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**, 3389-3402.
2. Bouffard, G. G., Rudd, K. E. & Adhya, S. L. (1994). Dependence of lactose metabolism upon mutarotase encoded in the gal operon in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **244**, 269–278.
3. Clutterbuck, A. J. (1981). An arabinose non-utilizing mutant *araA1*. *Asp Newslett* **15**, 6.
4. Clutterbuck, A. J. (1993). *A. nidulans*, nuclear genes. In: O'Brien, S. J. (Ed.), Genetic Maps: Locus Maps of Complex Genomes, Vol. 3. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp. 3.71–3.84.
5. Cragg, S. M., Beckham, G. T., Bruce, N. C., Bugg, T. D. H., Distel, D. L., Dupree, P., Etxabe, A. G., Goodell, B. S., Jellison, J., McGeehan, J. E., McQueen-Mason, S J, Schnorr, K., Walton, P. H., Watts, J. E. M. & Zimmer, M. (2015). Lignocellulose degradation mechanisms across the Tree of Life. *Curr Opin Chem Biol* **29**, 108-119.
6. 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.
7. de Vries, R. P., Flipphi M. J. A., Witteveen, C. F. B. & Visser, J. (1994). Characterization of an *Aspergillus nidulans* L-arabitol dehydrogenase mutant. *FEMS Microbiol Lett* **123**, 83-90.
8. Fantes, P. A., & Roberts, C. F. (1973). β -Galactosidase Activity and Lactose Utilization in *Aspergillus nidulans*. *Microbiology* **77**, 471-486.
9. Fekete, E., Karaffa, L., Sándor, E., Seiboth, B., Biró, S., Szentirmai, A., & Kubicek, C. P. (2002). Regulation of formation of the intracellular β -galactosidase activity of *Aspergillus nidulans*. *Archs Microbiol* **179**, 7-14.

10. **Fekete, E., Karaffa, L., Sándor, E., Bányai, I., Seiboth, B., Gyémánt, Gy., Sepsi, A., Szentirmai, A. & Kubicek, C. P.** (2004). The alternative D-galactose degrading pathway of *Aspergillus nidulans* proceeds via L-sorbose. *Arch Microbiol* **181**, 35-44.
11. **Free, S. J.** (2013). Fungal cell wall organization and biosynthesis. *Adv Genet* **81**, 33–82.
12. **Frey, P. A.** (1996). The Leloir pathway: a mechanistic imperative for three enzymes to change the stereochemical configuration of a single carbon in galactose. *FASEB J* **10**, 461-470.
13. **Gruber, F., Visser, J., Kubicek, C. P. & de Graaff, L. H.** (1990). Cloning of the *Trichoderma reesei* *pyrG* gene and its use as a homologous marker for a high-frequency transformation system. *Curr Genet* **18**, 447–451.
14. **Holden, H. M., Rayment, I. & Thoden, J. B.** (2003). Structure and function of enzymes of the Leloir pathway for galactose metabolism. *J Biol Chem* **278**, 43885–43888.
15. **Howard, S. M. & Heinrich, M. R.** (1965). The anomeric specificity of yeast galactokinase. *Arch Biochem Biophys* **110**, 395–400.
16. **Katoh, K., & Standley, D. M.** (2013). MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol Biol Evol* **30**, 772-780.
17. **Knoch, E., Dilokpimol, A., & Geshi, N.** (2014). Arabinogalactan proteins: focus on carbohydrate active enzymes. *Front Plant Sci*, **5**, 198.
18. **Nayak, T., Szewczyk, E., Oakley, C. E., Osmani, A., Ukil, L., Murray, S. L., Hynes, M. J., Osmani, S. A. & Oakley, B. R.** (2006). A versatile and efficient gene-targeting system for *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **172**, 1557–1566.
19. **Nelson, J. M. & Beegle, F. M.** (1919). Mutarotation of glucose and fructose. *J Am Chem Soc* **41**, 559–575.
20. **Pomin, V. H.** (2016). Phylogeny, structure, function, biosynthesis and evolution of sulfated galactose-containing glycans. *Int J Biol Macromol* **84**, 372-379.
21. **Pontecorvo, G., Roper, J. A., Hemmons, L. M., Macdonald, K. D. & Button, A. W. J.** (1953). The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Adv Genet* **5**, 141–238.

22. **Sakamoto, T., & Ishimaru, M.** (2013). Peculiarities and applications of galactanolytic enzymes that act on type I and II arabinogalactans. *Appl Microbiol Biot* **97**, 5201-5213.
23. **Sambrook, J. & Russell, D. W.** (2001). *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 3rd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
24. **Tilburn, J., Scazzocchio, C., Taylor, G. G., Zabicky-Zissman, J. H., Lockington, R. A. & Davies, R. W.** (1983). Transformation by integration in *Aspergillus nidulans*. *Gene* **26**, 205-221.



Nyilvántartási szám: DEENK/2/2019.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Kulcsár László
Neptun kód: Y8G600
Doktori Iskola: Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10047423

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

Idegen nyelvű tudományos közlemények külföldi folyóiratban (2)

1. Németh, Z., **Kulcsár, L.**, Flipphi, M., Orosz, A., Aguilar-Pontes, M. V., De Vries, R. P., Karaffa, L., Fekete, E.: L-Arabinose induces D-galactose catabolism via the Leloir pathway in *Aspergillus nidulans*.
Fungal Genet. Biol. 123, 53-59, 2019. ISSN: 1087-1845.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fgb.2018.11.004>
IF: 3.476 (2017)
2. **Kulcsár, L.**, Flipphi, M., Jónás, Á., Sándor, E., Fekete, E., Karaffa, L.: Identification of a mutarotase gene involved in D-galactose utilization in *Aspergillus nidulans*.
FEMS Microbiol. Lett. 364, 1-7, 2017. ISSN: 0378-1097.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/femsle/fnx202>
IF: 1.735





További közlemények

Idegen nyelvű tudományos közlemények külföldi folyóiratban (2)

3. Fekete, E., Orosz, A., **Kulcsár, L.**, Kavalecz, N., Flipphi, M., Karaffa, L.: Characterization of a second physiologically relevant lactose permease gene (lacpB) in *Aspergillus nidulans*.

Microbiology (Reading, Engl.). 162, 837-847, 2016. ISSN: 1350-0872.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.000267>

IF: 2.151

4. Somsák, L., Bokor, É., Czibere, B., Czifrák, K., Koppány, C., **Kulcsár, L.**, Kun, S., Szilágyi, E., Tóth, M., Docsa, T., Gergely, P.: Synthesis of C-xylopyranosyl- and xylopyranosylidene-spiro-heterocycles as potential inhibitors of glycogen phosphorylase.

Carbohydr. Res. 399, 38-48, 2014. ISSN: 0008-6215.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carres.2014.05.020>

IF: 1.929

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 9,291

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapján szolgáló közleményekre):

5,211

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

Debrecen, 2019.01.02.





Registry number: DEENK/2/2019.PL
Subject: PhD Publikációs Lista

Candidate: László Kulcsár

Neptun ID: Y8G600

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

MTMT ID: 10047423

List of publications related to the dissertation

Foreign language scientific articles in international journals (2)

1. Németh, Z., **Kulcsár, L.**, Flippi, M., Orosz, A., Aguilar-Pontes, M. V., De Vries, R. P., Karaffa, L., Fekete, E.: L-Arabinose induces D-galactose catabolism via the Leloir pathway in *Aspergillus nidulans*.

Fungal Genet. Biol. 123, 53-59, 2019. ISSN: 1087-1845.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fgb.2018.11.004>

IF: 3.476 (2017)

2. **Kulcsár, L.**, Flippi, M., Jónás, Á., Sándor, E., Fekete, E., Karaffa, L.: Identification of a mutarotase gene involved in D-galactose utilization in *Aspergillus nidulans*.

FEMS Microbiol. Lett. 364, 1-7, 2017. ISSN: 0378-1097.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/femsle/fnx202>

IF: 1.735





List of other publications

Foreign language scientific articles in international journals (2)

3. Fekete, E., Orosz, A., **Kulcsár, L.**, Kavalecz, N., Flipphi, M., Karaffa, L.: Characterization of a second physiologically relevant lactose permease gene (*lacpB*) in *Aspergillus nidulans*. *Microbiology (Reading, Engl.)*. 162, 837-847, 2016. ISSN: 1350-0872.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.000267>
IF: 2.151
4. Somsák, L., Bokor, É., Czibere, B., Czifrák, K., Koppány, C., **Kulcsár, L.**, Kun, S., Szilágyi, E., Tóth, M., Docsa, T., Gergely, P.: Synthesis of C-xylopyranosyl- and xylopyranosylidene-spiro-heterocycles as potential inhibitors of glycogen phosphorylase. *Carbohydr. Res.* 399, 38-48, 2014. ISSN: 0008-6215.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carres.2014.05.020>
IF: 1.929

Total IF of journals (all publications): 9,291

Total IF of journals (publications related to the dissertation): 5,211

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

02 January, 2019



Poszterek/Posters:

1. Fekete E, Kulcsár L, Flippi M, Németh Z, Aguilar-Pontes MV, de Vries RP, Karaffa L: D-galactose, L-arabinose and D-xylose cross-induce their respective catabolic pathways in *Aspergillus nidulans* (11th International Mycological Congress, San Juan, Puerto Rico, 2018).
2. Kulcsár L, Fekete E, Jónás Á, Flippi M, Karaffa L: Identification of a mutarotase gene involved in D-galactose utilization in *Aspergillus nidulans* (2nd Symposium on Plant Biomass Conversion by Fungi, Utrecht, Hollandia, (2017).
3. Kulcsár L, Orosz A, Kavalecz N, Flippi M, Fekete E, Karaffa L: Lactose uptake is mediated by differentially regulated permeases in *Aspergillus nidulans*, one of which is also involved in cellobiose catabolism: 13th European Conference of Fungal Genetics, Franciaország, Párizs (2016).
4. Fekete E, Orosz A, Kulcsár L, Flippi M, Karaffa L: Lactose transport in *Aspergillus nidulans*: Identification and expression of a second permease gene: Asperfest12 és GSA – The 28th Fungal Genetics Conference at Asilomar, Amerikai Egyesült Államok, Pacific Grove, CA (2015).
5. Orosz A, Kulcsár L, Fekete E, Flippi M, Karaffa L: Identification of a second lactose permease gene (*lacpB*) in *Aspergillus nidulans*: 6th Congress of European Microbiologists, Hollandia, Maastricht (2015).

Előadások/Presentations:

1. Kulcsár L: Egy D-galaktóz lebontásban szerepet játszó mutarotáz gén jellemzése *Aspergillus nidulans*-ban: A Magyar Mikrobiológiai Társaság Nagygyűlése és a XII. Fermentációs Kollokvium, Magyarország, előadás, Keszthely (2016).
2. Kulcsár L: Identification and expression analysis of a second lactose permease that completes the uptake of this sugar in *Aspergillus nidulans*: InterTalent UNIDEB, Magyarország, Debrecen (2016).