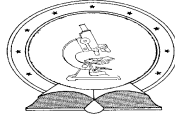


DE TTK



1949

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

Doktori (PhD) értekezés

Készítette:

Kulcsár László

alapokleveles vegyészmérnök

okleveles biomérnök

Témavezető:

Dr. Karaffa Levente

tanszékvezető egyetemi docens

Debreceni Egyetem

Természettudományi Doktori Tanács

Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola

Debrecen, 2019

Ezen értekezést a Debreceni Egyetem Természettudományi Doktori Tanács Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola biológia programja keretében készítettem a Debreceni Egyetem természettudományi doktori (PhD) fokozatának elnyerése céljából.

Debrecen, 2019.01.07.

Kulcsár László

*Tanúsítom, hogy **Kulcsár László** doktorjelölt 2014- 2017. között a fent megnevezett Doktori Iskola biológia programjának keretében irányításommal végezte munkáját. Az értekezésben foglalt eredményekhez a jelölt önálló alkotó tevékenységével meghatározóan hozzájárult. Az értekezés elfogadását javasolom.*

Debrecen, 2019.01.07.

Dr. Karaffa Levente

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

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében a
Mikrobiológia tudományágban

Írta: **Kulcsár László** okleveles **Biomérnök**

Készült a Debreceni Egyetem **Juhász-Nagy Pál** doktori iskolája
(Biológia programja) keretében

Témavezető:

Dr. Karaffa Levente

A doktori szigorlati bizottság:

Elnök: Prof. Dr. Sipiczki Mátyás

Tagok: Dr. Gyémánt Gyöngyi

Kozma-Bognárné Dr. Hamari Zsuzsanna

A doktori szigorlat időpontja: 2018.06.19.

Az értekezés bírálói:

Dr. Máthé Csaba

Dr. Szekeres András

A bírálóbizottság:

Elnök: Prof. Dr. Vasas Gábor

Tagok: Dr. Török Péter

Prof. Dr. Biró Sándor

Dr. Gácsér Attila

Dr. Kredics László

Az értekezés védésének időpontja: 2019.

TARTALOMJEGYZÉK

1	BEVEZETÉS	1
2	IRODALMI ÁTTEKINTÉS	3
2.1	A D-galaktóz foszforilációs (Leloir) lebontási útvonala	3
2.2	Az L-arabinóz pentóz és a D-galaktóz oxidoreduktív metabolikus útvonalak kapcsolata.....	6
2.3	Aldóz-1-epimeráz/galaktóz-mutarotáz	10
2.4	A D-galaktóz és az L-arabinóz katabolizmus struktúrgénjeinek kiválasztása.....	13
3	CÉLKITŰZÉS	16
4	ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	17
4.1	<i>Aspergillus nidulans</i> törzsek, táptalajok és tenyésztési feltételek	17
4.2	Genetikai technikák és transzformálás	23
4.3	Hiánymutáns törzsek létrehozása	24
4.4	A <i>galmA/galmB</i> aldóz-1-epimeráz gének visszatranszformálása a <i>galmA</i> vagy a <i>galmB</i> hiányos háttérrel rendelkező mutánsba.....	25
4.5	Genomi DNS és totál RNS-izolálás.....	26
4.6	Northern- és Southern-blot analízis.....	26
4.7	Analitikai módszerek.....	27
4.7.1	Száraz sejttömeg és cukorkoncentráció meghatározása	27
4.7.2	Aldóz-1-epimeráz aktivitás meghatározása	28

4.8	Reprodukálhatóság	29
4.9	Bioinformatikai analízis	29
5	EREDMÉNYEK	30
5.1	Két feltételezhető D-galaktóz-mutarotáz gén <i>in silico</i> azonosítása az <i>A. nidulans</i> -ban.....	30
5.2	A <i>galmA</i> és <i>galmB</i> funkciójának azonosítása.....	34
5.3	A GalmB egy fiziológiásan jelentős galaktóz mutarotáz	36
5.4	A <i>galmA</i> és a <i>galmB</i> expresszióját pentózok is indukálhatják ..	39
5.5	Az <i>A. nidulans</i> egyidejűleg D-galaktózt és L-arabinózt is képes metabolizálni	41
5.6	A D-galaktóz és az L-arabinóz katabolizmus struktúrgén mutánsok vizsgálata	43
5.7	A D-galaktóz-1-epimeráz, galaktokináz, L-arabinitol-dehidrogenáz és D-xilulokináz gének transzkripció analízise L-arabinózon és/vagy D-galaktózon	46
6	EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA	50
7	ÖSSZEFOGLALÁS	59
8	SUMMARY	64
9	IRODALMI HIVATKOZÁSOK	69
10	TUDOMÁNYOS TEVÉKENYSÉG	83
11	KÖSZÖNYETNYÍLVÁNÍTÁS	85
12	FÜGGELÉK	86
12.1	A munkánk során alkalmazott oligonukleotidok	86

12.2	A pTN2 plazmid vektor felépítése	89
12.3	<i>galmA</i> és <i>galmB</i> túltermelő törzsek kópiaszámainak meghatározása	90

1 BEVEZETÉS

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 fontos alkotóeleme is a D-galaktóz (Free, 2013). A magasabb rendű eukariótákban megtalálható glikoproteinek és glikolipidek hexóz komponense szintén a D-galaktóz (Pomin, 2016).

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 Debreceni Egyetem Biomérnöki Tanszéke megalakulása óta tanulmányozza a biotechnológiában jelentős fonalas gombák szénhidrát, főleg laktóz, D-galaktóz és pentóz anyagcseréjét. A tömlősgombák (*Ascomycoták*) közül az *Aspergillus nidulans* az egyik legfontosabb

modell szervezet, hiszen minimál táptalajon fenntartható, szexuális és paraszexuális életciklusa laboratóriumi körülmények között jól kivitelezhető, a genom szekvenciája ismert. A vele történő munkát az *A. nidulans*-ra kidolgozott adatbázisok, génkönyvtárak, vektorok, mutánsok és DNS chip-ek megkönnyítik.

A sajtgyártás melléktermékeként évi 150 millió tonna tejsavó keletkezik, amely 44–52 g/L laktózt tartalmaz (Johansen és mtsai., 2002). Ennek a több millió tonna laktóznak csupán 15%-át használja fel a fermentációs ipar szénforrásként (Roelfsema és mtsai., 1990). Biotechnológiai felhasználásának azonban néhány tényező gátat szab. A tejsavóban sajnos nagy mennyiségű víz is található, így felhasználás előtt általában koncentrálni kell. Élelmiszeripari felhasználása is korlátozott a sokakat érintő laktóz intolerancia és galaktozémia miatt (Novelli és Reichardt 2000; Campbell és mtsai., 2005). A fel nem használt tejsavó hatalmas környezetvédelmi problémát hordoz magában, hiszen kezeletlenül nagyban fokozhatja természetes vizeink károsodását. Szennyvíztisztító telepeken történő megsemmisítése pedig meglehetősen növeli a tejipar költségeit, ezért mindenképp a biotechnológiai iparban kellene hasznosítani a tejsavó döntő többségét, mint fermentációs szénforrás vagy mint második generációs bioüzemanyagok termelésének alapanyaga (Panesar és Kennedy, 2012). A gomba fermentációkban a laktózon kívül széles szénhidrát paletta áll a rendelkezésünkre. 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.

Laktóz hidrolízis során D-glükóz és D-galaktóz keletkezik. A galaktóz lebontás anyagcserezavarait összefoglalóan galaktozémianak nevezzük, melyekben a galaktóz lebontás Leloir útvonal egyes enzimeinek defektjei okozzák a betegség tüneteit (Timson, 2016). Mivel a galaktóz-mutarotázokról meglehetősen kevés információnk van, humán oldalról akár anyagcserezavarokat is okozhat hiányuk, ezért tanulmányozásuk kiemelkedően fontos.

2 IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1 A D-galaktóz foszforilációs (Leloir) lebontási útvonala

Mind a prokariótákban és mind az eukariótákban közös a Leloir útvonal (foszforilációs), mint jelen ismereteink szerint a legfontosabb galaktóz lebontó útvonal, de a kiegészítő galaktóz degradációs útvonalakban (izomerizációs-oxidoreduktív) gyakran nagy különbségek tapasztalhatóak.

Holden és mtsai (2003) a galaktóz enzim katalizálta mutarotációját (EC 5.1.3.3) a Leloir útvonal első lépésként említik, ezzel szemben Frey, 1996 nem veszi az útvonal részének, csak kiegészítő vagy megelőző lépésként említi. Fontossága, hogy az útvonal következő enzime, a galaktokináz (EC 2.7.1.6) anomer specifikus és csak az α -anomert képes foszforilálni α -D-galaktóz-1-foszfátot generálva.

A galaktóz-1-foszfát-uridiltranszferáz (EC 2.7.7.12) az α -D-galaktóz-1-foszfátot és az UDP glükózt α -D-glükóz-1-foszfáttá és UDP-

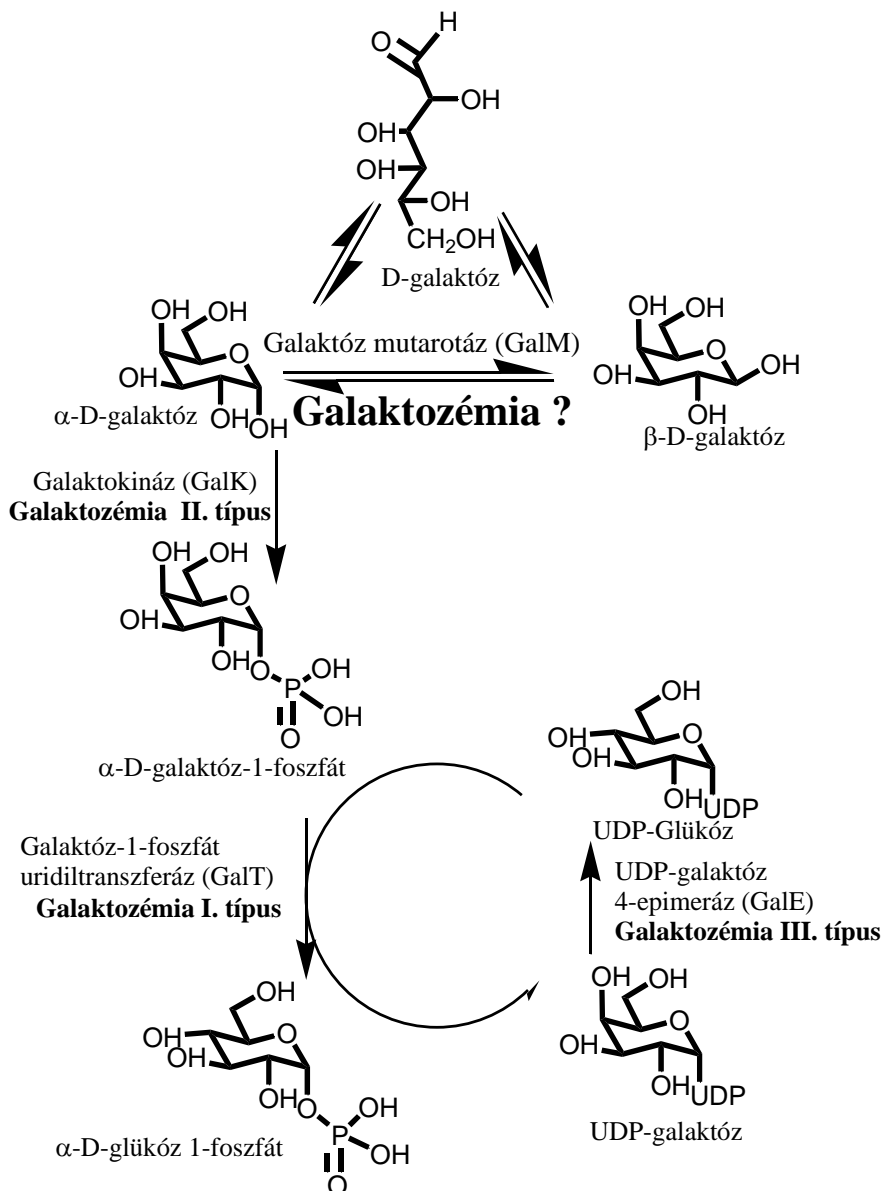
galaktózzá alakítja, miközben az UDP-galaktóz-4-epimeráz (EC 5.1.3.2) visszaalakítja UDP-glükózzá. A foszfooglükomutáz (EC 5.4.2.6) alakítja át az α -D-glükóz-1-foszfátot a glikolízis egyik köztitermékévé, a glükóz-6-foszfáttá. A Leloir útvonal enzimeit összességében epimerizálják a D-galaktóz C-4 hidroxil csoportját, D-glükóz foszforilált származékot nyerve (Roberts 1970; Sellick és mtsai., 2008; Alam és Kaminskyj, 2013), melynek általános sémáját az **1. ábra** szemlélteti.

A galaktozémia olyan betegségek összefoglaló neve, melyek a galaktóz anyagcsere valamely enzimének elégtelen működése vagy annak hiánya miatt alakulnak ki. Jelenleg három típusát különböztetjük meg, a három fő Leloir útvonal enzimeit szerint. A különböző típusok a felfedezésük sorrendjét jelöli. Így beszélhetünk I. típusú (*GalT* defekt), II. típusú (*GalK* defekt) és III. típusú (*GalE* defekt) galaktozémiáról (Timson, 2016).

Klasszikus vagy I. típusú galaktozémia kb. minden 30 000. embert érint és a legsúlyosabb tüneteket produkálja. A tünetek akár a méhen belül is jelentkezhetnek, nem megfelelő kezelés esetén akár halállal is végződhet. A galaktóz-1-foszfát feldúsulása vese, máj, agykárosodást vagy szürke hályogot (katarakta) idézhet elő. II. típusa enyhébb, gyakran csak idősebb korban jelentkeznek tünetek, például a katarakta és vakság, amit a galaktitol feldúsulása okozhat. A III. típusának kialakulása az UDP-galaktóz-4-epimeráz defektusára vezethető vissza. A galaktóz, így például a laktóz étel- és italipari felhasználása nagymértékben korlátozott a galaktozémia jelensége miatt.

Timson és Reece (2003) azonosította a humán aldóz-1-epimerázt, és felvetette, hogy az enzim hiánya akár tüneteket is produkálhat, de azóta ilyen irányú megfigyelésekkel nem találkoztunk, de azt gondoljuk, hogy

főleg hosszútávon akár okozhat is kellemetlen tüneteket és szövődményeket bizonyos betegeknél. A Leloir útvonal és a galaktozémia kapcsolatának sematikus összefoglalása az **1. ábrán** látható.



1. ábra Leloir útvonal, mint a legfontosabb D-galaktóz lebontási anyagcsereút, illetve kapcsolata a galaktozémiával.

2.2 Az L-arabinóz pentóz és a D-galaktóz oxidoreduktív metabolikus útvonalak kapcsolata

Az L-arabinóz és a D-galaktóz reduktív lebontási útvonalak meglehetősen hasonlóak. A két útvonal kapcsolatát a **2. ábra** szemlélteti. Általánosan jellemezve az útvonalakat elmondhatjuk, hogy több oxidációs és redukciós lépés után az L-arabinózból D-xilulózt, a D-galaktózból D-fruktózt kaphatunk. További foszforilálást követően D-xilulóz-5-foszfátot vagy D-fruktóz-6-foszfátot nyerünk, melyek a pentóz-foszfát vagy a glikolízis útvonalakba képesek bekapcsolódni.

Az oxidoreduktív útvonal során az L-arabinóz egy aldóz-reduktáz által először arabinitollá redukálódik. Ezt követően az L-arabinitol-dehidrogenáz enzim oxidálja xilulózzá, amit az L-xilulóz (ketoaldoláz) reduktáz visszaredukál xilitollá. Egy xilitol-dehidrogenáz enzim D-xilulózzá oxidálja a xilitolt, aminek foszforilálását követően D-xilulóz-5-foszfátot kapunk (Flipphi és mtsai., 2009).

A D-galaktóz ilyen módon történő metabolizmusát tanszékünk munkatársainak sikerült először bizonyítani. Az *A. nidulans* galaktokináz (*galE*) hiánymutáns Roberts és mtsai. (1970) vizsgálati körülményei mellett nem volt képes D-galaktózon növekedni, ezzel szemben Fekete és mtsai., 2002 ennek az ellenkezőjét tapasztalták, vagyis a *galE* mutánsok is növekedtek D-galaktózon. A tenyésztési körülményeket jobban megvizsgálva látható, hogy az első kísérleteknél nitrátot, Fekete és mtsai viszont ammónium sókat használtak nitrogénforrásként. Megjegyzendő, hogy a *galE*/*GalE* jelölés gyakran az UDP-galaktóz-4-epimeráz gént/enzimet jelöli, ezzel szemben például a galaktokináz jelölésére is használatos. Nitrát ionok kizárólagos jelenlétében tapasztalható, hogy a

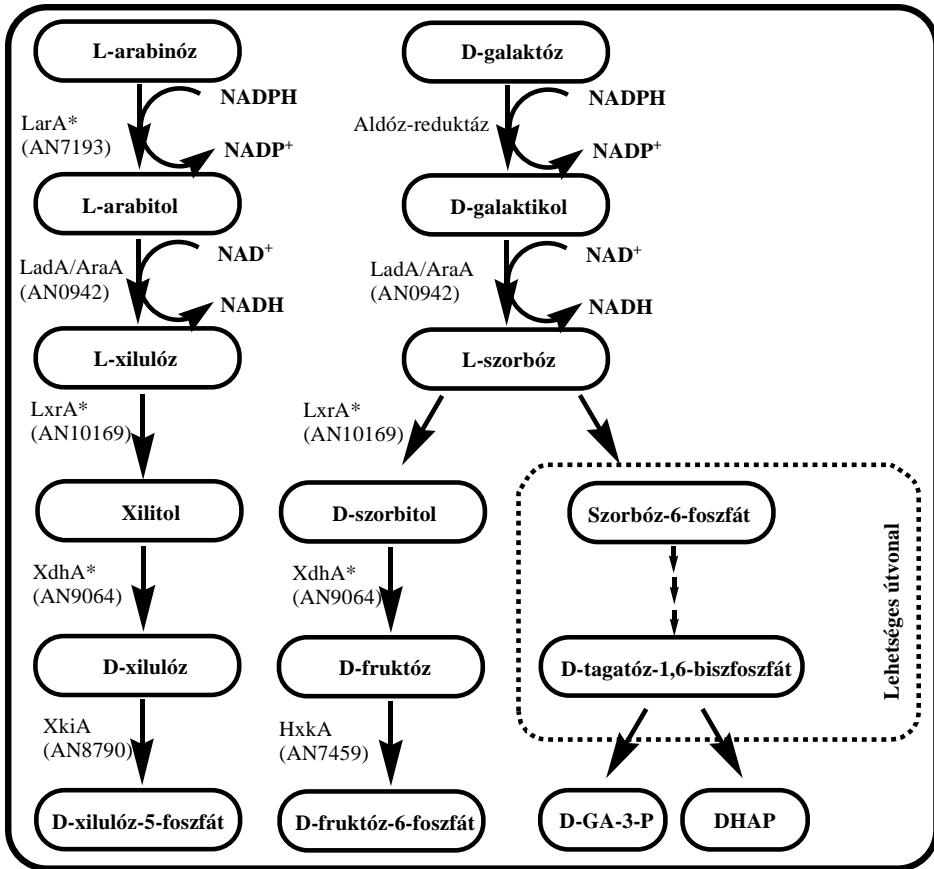
galE mutáns D-galaktóz, az *araA1* mutáns (L-arabinitol hasznosítás képességének hiánya) L-arabinitol és a vad típusú törzs L-szorbóz szénforrásként történő hasznosítása nem detektálható, ammónium sók jelenlétében azonban igen. A jelenség azzal magyarázható, hogy a Leloir útvonal mellett létezik egy alternatív, ún. „oxidoreduktív” útvonal is a D-galaktóz lebontására az *A. nidulans*-ban, amely meglehetősen NADPH függő folyamat, mint a nitrát redukciója is. Az oxidoreduktív” útvonal során először a D-galaktóz redukálódik galaktitollá egy aldóz-reduktáz által. Az L-arabinitol-dehidrogenáz enzim oxidálja L-szorbozzá, amit az L-xilulóz (ketoaldoláz) reduktáz visszaredukál szorbitollá. Végül egy xilitol-dehidrogenáz enzim fruktózzá oxidálja az L-szorbózt. (Fekete és mtsai., 2004). Éppen ezért mondhatjuk, hogy az alkalmazott nitrogénforrás erősen, de valójában csak közvetett módon befolyásolja a *galE* mutáns növekedésének képességét D-galaktózon.

Lehetséges magyarázat lehet az L-arabinopiarnóz és a D-galaktóz hasonló/megegyező enzimek által történő metabolizmusára, hogy a hemiacetál- vagy hemiketál gyűrűk szénatomjain elhelyezkedő hidroxil-csoportjainak orientáltsága megegyezik (a hatodik $-CH_2OH$ csoportot kivéve). Hasonló analógia figyelhető meg a D-glükóz és a D-xilópiranóz pentóz esetében is.

Bizonyos *Aspergillus* fajokban a galaktóz-oxidáz (EC 1.1.3.9) és a galaktolaktónáz (EC 3.1.1.25) enzimek jelenléte oxidatív útvonalra utalhat. A galaktonát-dehidrogenáz vagy a D-galaktonát-hidroláz (EC 4.2.1.6) minden *Aspergillus* genomban annotálható, de a további metabolizmushoz szükséges kináz (EC 2.7.1.58), ami a foszforilációhoz szükséges, az nem található (Szumiło, 1981). A *Hypocrea jecorina* galaktonát-dehidratáz gén főként a pektin D-galakturonát egységeinek

lebontásában játszik szerepet (Kuorelahti és mtsai., 2006), de a D-galaktóz lebontásban való szerepe még nem tisztázott. Illetve minden *Aspergillus* genomban megtalálható legalább egy II. típusú D-tagatóz-biszfoszfát aldoláz (EC 4.1.2.40), ami dihidroxi-aceton-foszfátot és D-glicerinaldehid-3-foszfátot generálhat D-tagatóz-1,6-biszfátból. A D-galaktóz galaktitolon keresztül az intermedier L-szorbózzá, további foszforileződését és epimerizálódását követően D-tagatóz-1,6-biszfáttá alakulhat. Illetve D-galaktóz közvetlen D-tagatózzá történő epimerizálódását és foszforileződését követően is kaphatunk D-tagatóz-1,6-biszfátot (Flipphi és mtsai 2009). A D-galaktóz alternatív oxidoreduktív és a feltételezett katabolikus útvonal sematikus ábrázolása a **2. ábrán** látható.

A *H. jecorina* (*T. reesei*) is képes az *A. nidulans*-hoz hasonlóan a D-galaktóz metabolizmusára mindkét említett útvonalon (Seiboth és mtsai., 2002a; 2002b; 2004). Az L-arabinitol dehidrogenáz (LadA) enzim felelős a *H. jecorina* (*T. reesei*) és az *A. nidulans* esetében is a galaktitol és az L-arabinitol oxidálásáért. Az *A. niger* oxido-reduktív útvonal galaktitol intermedierének lebontásáért ezzel ellentétben nem a *ladA* géntermék, hanem a *ladB* gén által kódolt galaktitol dehidrogenáz enzim (Mojzita D és mtsai., 2012) a felelős. Az *A. nidulans*, a *H. jecorina* és az *A. niger* fonalas gombákon kívül jelenleg nem bizonyították az alternatív oxido-reduktív útvonal létezését.



2. ábra Az *Aspergillus nidulans* L-arabinóz pentóz-katabolikus útjának (PCP), és a D-galaktóz alternatív oxidoreduktív útvonalának (ORP) bemutatása. Az enzimeket, amelyek bizonyos metabolikus lépéseket katalizálnak megfelelő lókuszsorszámok jelzik. Az *A. nidulans* még nem azonosított vagy meg nem erősített enzimeit (géneket / lókuszsokat) csillaggal jelöltük. A LarA az aldóz reduktáz, a LadA/AraA az L-arabitol dehidrogenáz, a LxrA az L-xilulóz reduktáz, az XdhA a xilitol dehidrogenáz, az XkiA a xilulokinázt, az HxkA a hexokináz, a D-GA-3-P a D-glicerinaldehid-3-foszfát, a DHAP a dihidroxi-aceton-foszfát rövidítése.

2.3 Aldóz-1-epimeráz/galaktóz-mutarotáz

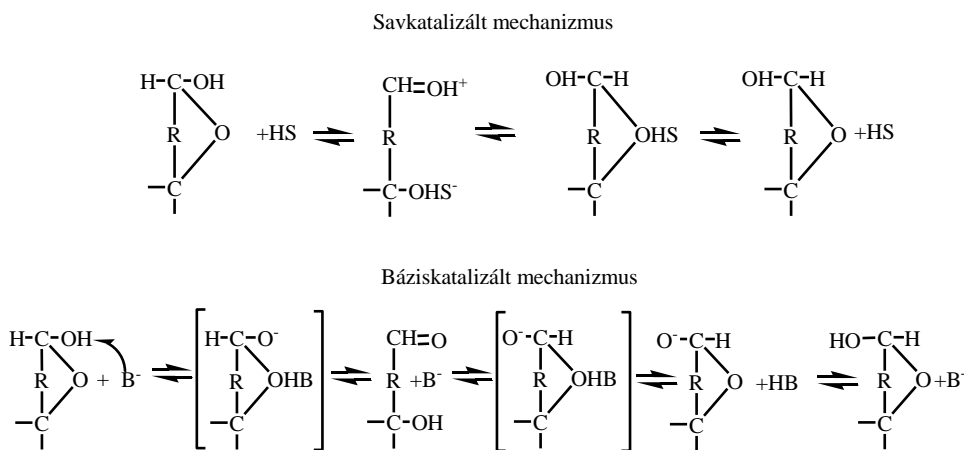
Az izomerizáció egy olyan kémiai vagy biológiai átalakulás, melyben kiindulási anyag és keletkezett termék összegképlete azonos, csak a szerkezetük (konfiguráció, konformáció) különböző. A konfiguráció, a molekulán belüli atomoknak olyan rögzített térbeli elrendeződése, amely csak elsődleges (kovalens) kötések ideiglenes felbontása árán változtatható meg, más molekulát nyerve. Ezzel szemben a konformáció a molekulán belüli atomok olyan térbeli elrendeződése, amely elsődleges kémiai kötések felbontása nélkül, másodlagos kötések (pl.: hidrogénhidak és egyéb van der Waals kölcsönhatások) felszakításával megváltoztatható, aminek köszönhetjük a DNS kettősszálát és a fehérjék másodlagos, harmadlagos és negyedleges szerkezetét is.

Az izomerázok (EC 5) a következő 5 csoportra oszthatóak: epimeráz és racémáz (EC 5.1); cisz-transz izomeráz (EC 5.2); intramolekuláris oxidoreduktáz (EC 5.3); intramolekuláris transzferáz (EC 5.4); intramolekuláris liáz (EC 5.5) és egyéb izomerázok (EC 5.99) (Web, 1992).

Az 5.1.3 csoportba a szénhidrátok és származékainak epimerázait és racémázait soroljuk, melyet jelenleg 25 további csoportra osztható. 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). Az anomer hemiacetál forma kristályos formában stabil, ezzel szemben vizes oldatokban spontán az egyensúlyi elegy összetételéhez konvergál az átalakulás a nyíltláncú cukor

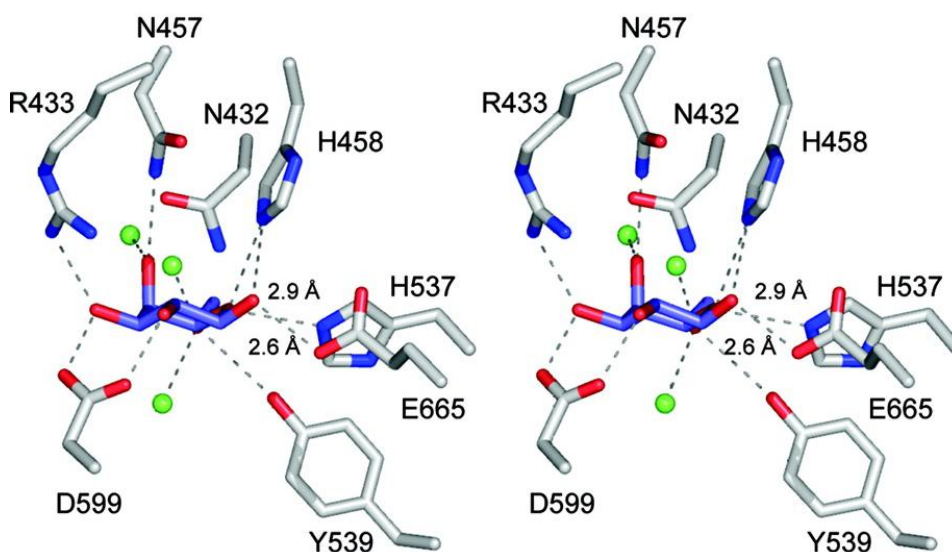
intermedieren keresztül (Grimshaw, 1986, Los és mtsai. 1956, Wertz és mtsai., 1981). A D-glükóz esetében kb. 64 % β -anomer, 36 % α -anomer és kb. 0,01 % nyílt forma alkotja az egyensúlyi vizes oldatot. A mutarotáció jelenségére Augustin-Pierre Dubrunfaut francia vegyész figyelt fel 1846-ban (Fletcher, 1940). A spontán mutarotáció sebessége függhet a pH-tól, a cukor koncentrációtól, az ionerősségtől és a hőmérséklettől is.

Legegyszerűbb elméletek szerint a sav hidrogén ionja képes a félacetál vagy a félketál gyűrő oxigén atomján támadást indítani, ami a nyíltláncú forma kialakulásához vezet. Bázis katalizált reakció során az anomer szén hidroxil csoportjának hidrogén atomjának átrendeződése és a bázishoz való kötődése után a gyűrű szintén felnyílnak. A gyűrű visszarendeződését követően a másik anomerré alakulhat (Isbell és Frush, 1951).



3. ábra Sav- és báziskatalizált mutarotáció mechanizmusok bemutatása. S=sav, B=bázis.

A *Lactococcus lactis*, az *E. coli* és a *S. cerevisiae* galaktóz-mutarotáz kristályos szerkezetének tanulmányozása során megállapítható, hogy az enzim katalizálta reakció is sav-bázis katalizált mechanizmuson keresztül játszódik le. Kulcsfontosságú két hisztidin (H) és egy glutaminsav aminosav jelenléte az aktív centrumban. Az egyik hisztidin képes a cukor gyűrű oxigén atomját protonálni, ami a gyűrű felnyílásához vezet. (Beebe és Frey, 1998; Thoden és Holden, 2002; Timson és Reece, 2003). A galaktóz hidrogénkötéseken keresztül kapcsolódik a fehérje Asn-432, Arg-433, Asn-457, His-458, His-537, Tyr-539, Asp-599 és Glu-665 oldalláncaihoz (4. ábra).



4. ábra A *Saccharomyces cerevisiae* Gal10p mutarotáz doménjében található aktív centruma. A lehetséges hidrogénkötési kölcsönhatásokat a szaggatott vonalak jelzik (Thoden és Holden, 2005).

Habár az aldóz-1-epimeráz enzimek a prokariótáktól az emberig a legtöbb élőlényben megtalálhatóak (Van Overtveldt és mtsai., 2015),

bizonyos élesztőkben, pl.: a *Saccharomyces cerevisiae*-ben a Leloir útvonal első és utolsó enzimét az aldóz-1-epimerázot és az UDP-galaktóz-4-epimerázot ugyanaz a Gal10-nek nevezett polipeptid lánc alkotja, ezzel szemben a legtöbb élőlényben külön gén kódolja ezeket az enzimeket (Brahma és Bhattacharyya, 2004, Majumdar és mtsai, 2004).

2.4 A D-galaktóz és az L-arabinóz katabolizmus struktúrgénjeinek kiválasztása

Az L-arabinóz és a D-galaktóz katabolizmusában részt vevő struktúrgének transzkripciójának tanulmányozására azokat a géneket választotjuk, amelyek fontossága funkcióvesztéses mutánsokkal már bizonyítható volt az *A. nidulans*-ban.

Az úgynevezett Leloir útvonal a D-galaktóz hasznosításakor mindig jelen van, amelyben a D-galaktóz elsősorban D-glükózzá epimerizálódik (C4), aminek első lépése az alfa-D-galaktopiranóz C1 foszforilációja galaktokináz által (GalE: AN4957) (Roberts, 1970; Alam és Kaminskyj, 2013; Orosz és mtsai., 2014). A galaktokináz enzim a galaktopiranóz alfa-anomerjére specifikus (Howard és Heinrich, 1965). Hasonló ilyen szempontból a Leloir útvonal későbbi enzime is, amely a glükóz-1-foszfát alfa-anomerjét glükóz-6-foszfáttá alakítja (Salas és mtsai., 1965; Wuster és Hess, 1974).

Az intracelluláris galaktóz-1-epimeráz (GalM_B) Leloir útvonalban betöltött szerepét a dolgozatban részletezni fogjuk. A Leloir útvonal utolsó része fontos anabolikus szerepet tölt be a gombák sejtfalának, az UDP-glükóz és az UDP-galaktóz építőelemeinek előállításában, így a Leloir útvonal ezen utolsó három enzime konstitutív módon

expresszálódik, és nem indukálja a D-galaktóz (El-Ganiny és mtsai., 2010). Emiatt expressziójukat nem indokolt vizsgálni. Az L-arabinóz az oxidoreduktív útvonalon keresztül katabolizálódik, amelyben a redukációs reakciókat NADPH függő oxidoreduktázok, ezzel szemben az oxidációs reakciókat NAD⁺ függő oxidoreduktázok katalizálják (Chiang és Knight, 1961; Witteveen és mtsai., 1989; de Vries és mtsai., 1994). Ezek a reakciók reverzibilisek, és az egyensúlyi állapotban a közbenső poliolt termékek felhalmozódásához vezethetnek. Az aldóz-reduktázok, amelyek az L-arabinózt L-arabinitollá, valamint a D-xilózt xilitollá redukálják, széles szubsztrátspektrummal rendelkeznek, de kizárólagosan a cukrok lineáris/nyitott vagy szabad aldehid formáját alkalmazzák szubsztrátumként (Grimshaw, 1986; Inagaki és mtsai., 1982; Nidetzky és mtsai., 1999). A D-xilulóz C5 irreverzibilis foszforilációját a xilulokináz (XkiA) vezérli, amely szintén csak a ketóz lineáris formáját képes szubsztrátként hasznosítani (Bunker és mtsai., 2013). Azonban ez a kulcsenzim nem sebességmeghatározó az L-arabinóz katabolizmusában, hiszen az *xkiA* ortológ géntermék túltermeltetése az *A. niger*-ben nem gyorsította a pentóz metabolizmusát (VanKuyk mtsai., 2001). Az oxidoreduktív útvonal enzimei tehát a szubsztrátok lineáris formáján, nem pedig a szénhidrát hemiacetál/hemiketál vagy az anomerek interkonverzióján keresztül képesek működni, így az L-arabinóz katabolizmusában irrelevánsnak tűnnek.

A xilulokináz gént (*xkiA*: *A. nidulans* locus AN8790), a klasszikus *A. niger* *xkiA4* hiánymutáns funkcionális komplementációjával azonosították, amely nem volt képes az L-arabinózt, az L-arabinitolt, a xilitolt vagy a D-xilózt, mint egyedüli szénforrás hasznosítani (Witteveen és mtsai., 1989; VanKuyk mtsai., 2001). A klasszikus technikával

létrehozott *araA1* nevű *A. nidulans* mutáns szintén nem tudott növekedni az L-arabinóz és az L-arabinitol tartalmú táptalajon, és nem volt detektálható L-arabinitol: NAD + dehidrogenáz, valamint az L-xilulóz: NADH reduktáz aktivitása sem, viszont nagy mennyiségű L-arabinitolt akkumulált a táptalajában, amikor L-arabinóz volt a szénforrás (de Vries és mtsai., 1994). Ebben a mutánsban az oxidoreduktív útvonal minden egyéb lépése aktív és megfelelően indukálható volt, ami azt mutatja, hogy a VIII. Kromoszóma *araA1* mutációja hatással van az L-arabinitol-dehidrogenáz (AN0942 lokusz) struktúrgénjére. Érdekes módon az *araA1* L-arabinitol-dehidrogenáz-mutáns nem volt képes növekedni galaktitolon, ami a D-galaktózból az aldóz-reduktázok katalizálta reakcióban képződik (de Vries és mtsai., 1994). Fekete és mtsai. (2004) leírták, hogy az aldóz-reduktáz és az L-arabinitol-dehidrogenáz katalizálja az *A. nidulans* D-galaktóz hasznosítására szolgáló alternatív útvonal első két lépését. Azonosították az L-arabinitol-dehidrogenáz (AraA) galaktitoltól képződő L-szorbóz ketózt (a D-tagatóz helyett), és azt feltételezték, hogy az L-szorbózból D-fruktóz képződhet a D-szorbitolon át történő redukáláson keresztül, ami összhangban van a korábban vizsgált L-szorbóz toxicitás eredményekkel is (Elorza és Arst, 1971). Azt is kimutatták, hogy a D-galaktóz alternatív metabolizmusa csak egy olyan hexokináz mutánsban volt teljesen blokkolva, amely nem volt képes foszforilálni a D-fruktózt (Flippi és mtsai., 2003). Ez csak a galaktokináz és a hexokináz együttes aktivitás csökkenésénél mutatkozott meg D-galaktózon. A korábbi vizsgálatok eredményei azt sugallják, hogy a D-galaktóz alternatív lebontása és az L-arabinóz hasznosítása (legalább) egy enzimben, az L-arabinitol-dehidrogenázban közösen osztoznak. Két *araA1* mutáns törzs (Glasgow G094 és G844 törzs) párhuzamos szekvencia analízise A-C

pontmutációt mutatott, aminek következménye képen, a VIII. kromoszómán elhelyezkedő AN0942 oxidoreduktáz génjében a fehérje C-terminálisához közeli konzervatív Lys367 aminosav kodonja (AAG) egy Glutamin kodonra (CAG) cserélődött (GenBank MH794597). Megjegyzendő, hogy a D-galaktóz alternatív oxidoreduktív útvonalának genetikai elemeit, az L-arabinitol-dehidrogenázon kívül még nem azonosítottak, illetve a hexokináz *A. nidulans*-ban betöltött pontos szerepe sem tisztázott a mai napig.

3 CÉLKITŰZÉS

A Biomérnöki Tanszék már megalakulása óta vizsgálja a biotechnológiai jelentőségű fonalas gombák laktóz és D-galaktóz anyagcseréjét, aminek köszönhetően számos kulcsfontosságú gént sikerült már azonosítanunk e szénhidrátok metabolizmusában. Az *A. nidulans*, mint fontos modell mikroorganizmus laktóz és D-galaktóz anyagcseréje még nem teljesen tisztázott, a Leloir útvonalban résztvevő aldóz-1-epimeráz kódoló génekről és géntermékekről fonalas gombákban kevés információnk van, ezért tanszékünk célul tűzte ki a putatív aldóz-1-epimeráz gén/géntermék tanulmányozását. Két feltételezhető aldóz-1-epimeráz sikerült azonosítani TBLAST analízis segítségével az *A. nidulans*-ban, az AN3184 (*galmA*) és az AN3432 (*galmB*)-t. Double-joint PCR technika segítségével szeretnénk egyszeres $\Delta galmA$, $\Delta galmB$ és dupla (mindkét génre nézve deletált) $\Delta galmA$, $\Delta galmB$ génre nézve hiánytörzseket létrehozni. Protoplasztálást követően szeretnénk mutarotáz

negatív háttérbe visszatranszformálni az adott géneket, akár túltermelő törzseket is kapva. Süllyesztett sejt kultúrákban cukorfogyást, a biomassza képződést, a minták mutarotáz aktivitását és a *galmA/galmB* gének expresszióját is szeretnénk vizsgálni, amiből egyértelműen bizonyítható a *galM* gének fontossága és szerepe. Az L-arabinóz és a D-galaktóz oxidoreduktív metabolizmusa meglehetősen hasonló, több oxidációs és redukciós lépés után az L-arabinózból D-xilulózt, a D-galaktózból D-fruktózt kaphatunk. A hemicellulózból és a pektinben a D-galaktóz és az L-arabinóz együttesen jelen is van, ezért a monoszacharid szinergizmusát is meg szeretnénk határozni a D-galaktomutarotáz és galaktokináz hiánymutáns törzseknek. Northern blot segítségével a feltételezett aldóz-1-epimeráz, a D-galaktokináz (*galE*), L-arabinitol-dehidrogenáz (*araA1*) és xilulokináz (*xkiA*) gének expressziós profilját tervezzük vizsgálni csak L-arabinózt, csak D-galaktózt és egyszerre L-arabinózt/D-galaktózt is tartalmazó tápoldatban.

4 ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1 *Aspergillus nidulans* törzsek, táptalajok és tenyésztési feltételek

A doktori munkám során az **1. táblázatban** felsorolt törzsekkel végeztünk kísérleteket, a felsorolt fontosabb markereket és fenotípusokat a **2. táblázat** foglalja össze. Az R21 jelzésű vad típusú törzs Axel A. Brakhage professzor (Institute of Microbiology, Friedrich Schiller University of Jena) laboratóriumából származik. Az FGSC A1149 izolátum, a Fungal

Genetic Stock Center, University of Kansas Medical Center, Kansas City törzsgyűjteményéből ered. Az LKEF jelzéssel rendelkező törzseket a doktori munkám során hoztuk létre.

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; ΔnkuA::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; ΔnkuA::argB; ΔgalmA::Tr.pyr4^b (uridine prototroph)</i>	Kulcsár és mtsai., 2017
LKEF_006	<i>(pyroA4); pyrG89 ΔnkuA::argB; ΔgalmB::Af.pyroA^c (pyridoxine prototroph)</i>	Kulcsár és mtsai., 2017
LKEF_007	<i>(pyroA4); (pyrG89) ΔnkuA::argB; ΔgalmA::Tr.pyr4; ΔgalmB::Af.pyroA (pyridoxine & uridine prototroph)</i>	Kulcsár és mtsai., 2017
LKEF_002 ^d	<i>(pyroA4); (pyrG89) ΔgalmA::Tr.pyr4; nkuA⁺; riboB2; (pyridoxine & uridine prototroph)</i>	Kulcsár és mtsai., 2017
LKEF_001 ^d	<i>(pyroA4); (pyrG89); (riboB2) ΔgalmA::Tr.pyr4; ΔnkuA::argB; wA3; (pyridoxine, uridine & riboflavin prototroph)</i>	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 prototroph)	Kulcsár és mtsai., 2017
LKEF_10.8	<i>(pyroA4); (pyrG89) ΔgalmB:: Af.pyroA; (riboB2); nkuA⁺; Af.riboB^f; galmB³⁺</i> (pyridoxine, uridine & riboflavin prototroph)	Kulcsár és mtsai., 2017
LKEF_10.22	<i>(pyroA4); (pyrG89) ΔgalmB:: Af.pyroA; (riboB2); nkuA⁺; Af.riboB^f; galmB⁴⁺</i> (pyridoxine, uridine & riboflavin prototroph)	Kulcsár és mtsai., 2017
LKEF_10.7	<i>(pyroA4); (pyrG89) ΔlacrB:: Af.pyroA; (riboB2); nkuA⁺; Af.riboB^f; galmB⁵⁺</i> (pyridoxine, uridine & riboflavin prototroph)	Kulcsár és mtsai., 2017
AOEF_006	<i>pyrG89; ΔgalE::Af.pyroA^c; ΔnkuA::argB</i>	Németh és mtsai., 2018
G094	<i>biA1; wA3; 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 zárójelben feltüntetett allélok nem lettek leellenőrizve (keresztezéssel vagy szekvenálással).

2. táblázat Az **1. táblázatban** felsorolt fontosabb markereket és fenotípusokat foglalja össze.

<i>Gén</i>	<i>Fenotípus</i>	<i>Hivatkozás</i>
<i>yA2</i>	sárga konídium	Clutterbuck, 1972
<i>wA3</i>	fehér konídium	Pontecorvo és mtsai., 1953
<i>pabaA1</i>	paba auxotrófia	Fantes és Roberts, 1973
<i>biA1</i>	biotin auxotrófia	Roper, 1950
<i>riboB2</i>	riboflavin auxotrófia	Cove, 1979
<i>pyro A4</i>	piridoxin auxotrófia	Käfer, 1958
<i>pyrG89</i>	uridin auxotrófia	

<i>araA1</i>	L-arabinitol hasznosítás képességének hiánya	Roberts, 1963
<i>veA1</i>	sötétben jól sporulál	
<i>galmA</i>	AN3184 génre hiány- vagy túltermelő mutáns	Kulesár és mtsai., 2017
<i>galmB</i>	AN3432 génre hiány- vagy túltermelő mután	Kulesár és mtsai., 2017
<i>galE</i>	AN4957 génre hiánymutáns	Németh és mtsai., 2018

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

1. A spórátató táptalaj összetétele 1000 ml-re (pH= 6,5):

- 0,092 g di-ammónium-tartarát
- 10 g glükóz
- 20 ml sóoldat
- 15 g agar
- az adott törzs auxotróf markerei (Pontecorvo és mtsai., 1953).

A glükózt 50%-os oldatként használtuk, és külön sterilizáltuk. A vitamin kiegészítők többségét, p-amino-benzoésav [H1-vitamin], piridoxin [B6-vitamin], riboflavin [B2-vitamin] 2 mg/l, az uridint 10 mM-os végkoncentrációban AMM (Aspergillus Minimal Medium; Pontecorvo és mtsai. 1953) tápoldathoz adtuk hozzá.

2. Az AMM tápoldat összetétele 1000 ml-re (pH=6,5):

- 6 g NaNO₃,
- 20 ml sóoldat,
- 10-15 g szénforrás
- az adott törzs auxotróf markere(i)

3. A sóoldat összetétele 1000 ml-re:

- 26 g KCl
- 26 g MgSO₄·7H₂O
- 76 g KH₂PO₄
- 50 ml nyomelemoldat.

4. A nyomelemoldat összetétele 1000 ml-re (pH= 2,0):

- 40 mg Na-borát
- 400 mg CuSO₄·5H₂O
- 714 mg FeSO₄·7H₂O
- 8 mg Na-molibdát
- 800 mg ZnSO₄·7H₂O.

A rázott lombikos tenyésztéseket 500 ml-es Erlenmeyer-lombikokban végeztük 100 ml tápoldatban, 37 °C-on, és 200 percenkénti fordulatszámom (rpm). A tenyésztésekhez használt sterilizett tápoldat szénforrásainak kezdeti koncentrációja 1,0 vagy 1,5 %, 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.

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.

A tenyészetekből mintát vettünk 4, 8, 12 és 24 óra elteltével az indukciós profil vizsgálatához. Előkísérletek alapján megállapítottuk, hogy 4 órányi az indukciós hatást kifejtő szénforrással történő inkubációs idő elegendő a maximális transzkripciós szint eléréséhez. A mintavételi idők során a biomassa koncentrációja érdemben nem változott, ami azt jelenti, hogy az ez idő alatt bekövetkező minimális bepárlódástól eltekinthetünk.

4.2 Genetikai technikák és transzformálás

A génkiütéshez transzformáláson alapuló génmanipulációs technikát alkalmaztunk, hogy homológ rekombinációval az aldóz-1-epimeráz (*galmA* és *galmB*) vagy galaktokináz (*galE*) célgéneket az uridin vagy a piridoxin auxotróf markerrel kicserélhessük. A deléciós konstrukció létrehozásához az ún. double-joint PCR módszert alkalmaztuk (Yu és mtsai., 2004), mely során a kiméra

oligonukleotidokkal amplifikált célgén „flanking” régióival fogják közre a marker gént. Ezek az 5’és 3’ „flanking” régiók biztosítják, hogy a cél lókusznál homológ rekombinációval megtörténjen a génkicserélődés.

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

4.3 Hiánymutáns törzsek létrehozása

A *galmA*, *galmB* és *galE* gének deléciós kazettáit double-joint PCR technikával (Yu és mtsai., 2004) szintetizáltuk meg. Első körben a kivágni kívánt gének 5’ és 3’ „flanking” (800-1000 bp hosszú nem kódoló szakasz) illetve a szelekciós gén fragmenteket felszaporítottuk. A P2 és a P3 kiméra primereknek köszönhetően a második körben összeragaszthatóak a megszentizált fragmentek a következő sorrendben: 5’-flanking - szelekciós gén - 3’ flanking régiók. A harmadik körben a nested primerek segítségével a teljes deléciós kazetta megszentizálható volt. 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 szelekciós génként. Az alkalmazott oligonukleotidokat a **12.1 függelék** tartalmazza. 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 törzsbe 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.

4.4 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 (LKEF002), illetve uridin-prototróf és riboflavin-auxotróf (LKEF008) utódokban PCR technika segítségével vizsgáltuk az *nkuA* gén jelenlétét. Az *nkuA* gén jelenlétében a genom ektópikus helyeire a *galmA* vagy a *galmB* gén több kópiában integrálódhat. A funkcionális *galmA* vagy a *galmB* gént *A. nidulans* R21 genomi DNS-éről amplifikáltuk DNS-specifikus primerpárral (**12.1 függelék**). 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 plazmival (*A. fumigatus* *riboB* génje, a riboflavin bioszintézisben részt vevő fehérjét

kódol; Nayak és mtsai., 2006) ko-transzformáltuk. A pTN2 plazmid szintetizálása során a pBluescript KS plazmid EcoRV hasító helyére az *A. fumigatus riboB* génjét ligálták be (1316 bp) (**12.2 függelék**). 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. A tesztelt mutánsok részletes genotípusa az **1. táblázat**ban fellelhető.

4.5 Genomi DNS és totál RNS-izolálás

A biomasszát „miracloth” nevű textilszűrőn a lehető leggyorsabban kiszűrtük, hideg steril vízzel alaposan átmostuk, papírtörő 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.

4.6 Northern- és Southern-blot analízis

A Northern- és a Southern-blot analízis során Sambrook és Russel (2001) által publikált standard eljárásokat használtuk. NanoDrop 2000 UV-Vis Spektrofotométer (Thermo Scientific) készülékkel segítségével meghatároztuk az RNS és a DNS koncentrációkat. A *galmA* esetében a

ClaI, a *galmB* esetében a SalI restrikciós endonukleázokkal 5 µg gDNS-t 37°C-on 3 óráig emésztettünk. A *galmA* génből a ClaI enzim egy 1160 bp hosszúságú fragmentet, a *galmB* génből a SalI enzim pedig egy 670 bp hosszúságú fragmentet hasít ki. Az agaróz gélekbe 5 µg DNS-t (Southern-blot) illetve RNS-t (Northern-blot) vittünk fel mintánként, majd elválasztottuk őket a gélben. A nukleinsavakat nylon membránra blottoltuk, majd jelölt próbát hibridizáltunk a membránhoz. A hibridizációt Lumi-Film kemilumineszcens detektáló film (Roche Applied Science) segítségével tettük láthatóvá. A Southern esetében az előhívást követően a kópiaszám az $n-1$ képlet alapján határozható meg, n a fragmentek számát jelenti az adott mintában (**12.3 függelék**). PCR DIG Probe Synthesis Kit (Roche Applied Science) segítségével szintetizáltuk meg a digoxigeninnel jelölt génspecifikus oligonukleotidokat (**12.1 függelék**), templátként az R21 genomi DNS-t használtuk.

4.7 Analitikai módszerek

4.7.1 Száraz sejttömeg és cukorkoncentráció meghatározása

A száraz sejttömeget (DCW) meghatározásához 5 ml fermentlevet egy előre lemért tömegű papírszűrőn keresztül leszűrtünk, majd többször hideg vízzel átmostunk, végül 80 °C-on tömegállandóságig szárítottuk a biomasszát. A vizsgált szénhidrátok koncentrációját HPLC-vel határoztuk meg egy protoncserélő oszlop (Bio-Rad Aminex HPX-87H) és törésmutató (RI) detektor alkalmazásával. Az izokratikus elúcióhoz 55 °C-os kolonna hőmérsékletet és 10 mM H₂SO₄ mozgófázist használtunk.

4.7.2 Aldóz-1-epimeráz aktivitás meghatározása

1 % glicerint tartalmazó AMM tápoldatban előnövesztettük a törzseket. AMM tápoldatra történő átmosás és az 1 órás éheztesítés után 1 % végkoncentrációban D-galaktózt adtunk a tenyészetekhez. A tenyészetekből 20-20 ml mintát vettünk, a sejteket centrifugálást követően eltávolítottuk, majd 2 x 20-20 ml 20 mM TRIS-HCl (pH=7,5) pufferben mostuk őket, a minták végtérfogata 5 ml volt. A micéliumot Potter-Elvehjem típusú készülékkel tártuk fel jégen 5 percig. Centrifugálást követően a sejtlyázatot eltávolítottuk a sejtörmeléktől, majd -80 °C-on tartottuk a felhasználásig. A fehérje tartalmat módosított Lowry-féle módszerrel (Peterson, 1983) határoztuk meg, a kalibrációs sor felvételéhez BSA-t (bovin serum albumint) használtunk.

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. Sejtörmelék mentes kivonatot 45 °C-on 5 percig előkezeltük, hogy a fehérje extraktumban lévő NADH oxidáz aktivitást lecsökkentsük. 50 μ l enzimmintát, 940 μ l 0,1 M TRIS-HCl, 3 mM β -NAD, 30 unit β -D-glükóz-dehidrogenáz, pH=7,2 oldatát egy kvarc küvetta mértük, majd 10 μ l frissen készített 50 mM-os α -D-glükóz oldatot a küvetta falára pipettáztunk, a küvetta háromszori megfordításával elindítottuk a reakciót. Az abszorbanciát 340 nm-en 1 percig mértük. A keletkezett β -NADH mennyisége az abszorbancia növekedéssel arányos. 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 1 perc alatt a

spontán mutarotáció felett keletkezett β -D-glükóz mennyisége μmol -ban. A specifikus aktivitás, a mutarotáz aktivitás fehérjetartalomra vonatkoztatott értéke, U/mg fehérjében.

4.8 Reprodukálhatóság

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.

4.9 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 (Kato 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.

5 EREDMÉNYEK

5.1 Két feltételezhető D-galaktóz-mutarotáz gén *in silico* azonosítása az *A. nidulans*-ban

Az első enzim katalizálta mutarotációt a *P. chrysogenum*-ban azonosították (Keilin and Hartree, 1952a & 1952b; Bentley and Bhate, 1960a & 1960b), 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 (az Aspergillus Genome Database – AspGD, 6. annotálási verzióját használtuk a lókuszek azonosítása során; Cerqueira és mtsai., 2014). Ezek a *P. chrysogenum* három génjének felelnek meg, a Pc20g08410-nek (ami 51%-ban hasonló az AN3432 aminosav szekvenciájához), illetve a

Pc13g14400-nak és a Pc20g09570-nek (amik 60 %-ban és 54 %-ban megegyeznek AN3184 génnel), (a *P. chrysogenum* Wisconsin 54-1255 törzset használtuk a keresés során).

A Saccharomycetaceae-áktól, a Debaryomycetaceae-áktól és a Schizosaccharomyces-áktól eltérően egyik mutarotáz lókuszt sem kapcsolódik a Leloir útvonal strukturális génjeihez, inkább a Pezizomycotinaék genomjaiban szétszóródva, mintsem klasztereződve helyezkednek el.

Az **5. ábra** az említett 5 gén által kódolt peptidszekvenciákat mutatja be, amit a *S. cerevisiae* Gal10p (locus YBR019C) (Majumdar és mtsai., 2004; Scott és Timson, 2007; Thoden és Holden, 2005), kettő 1-doménes paralóg mutarotáz doménjéhez (YNR071C és YHR210C, GAL10-től különböző, mindkettő egyéb galaktóz katabolikus génhez kapcsolódhat: Li és mtsai., 2013) és az *E. coli*, a *L. lactis* és a *H. sapiens* (Hucho és Wallenfels, 1971; Beebe és Frey, 1998, Beebe és mtsai 2003, Thoden és Holden, 2002, Timson és Reece, 2003, Thoden és mtsai., 2004) mutarotáz aminosav szekvenciáihoz illesztettünk.

```

Q96C23_HUMAN      1  MA---SVTRAVFG-----ELP[GGGTVEK]Q[---]---QSDLRV[DI]SW[CC]TA[EV]KDRQGR[SD]VV[LG]FAELEG
P0A9C3_ECOLI     1  ML-----NETPALAPDGQP[R]L[LT]RN[NAG]VV[TL]MDWGA[IL]SAR[PL]SDGSVREAL[IC]CASPEC
P.chrysogenum    1  MS-----APEQAAF[FL]PL[GA]R[Q]EF[RV]-----G[CK]NIV[LG]PTQDD
A.nidulans       1  MG-----DHTSVKF[SN]LA[AI]QEF[NV]-----D[QN]IV[QG]TKKEY
S.cerevisiae_B   1  QL-----RGVEARF[SAED]MRYDARF[VT]IGAGTRFQA[FAN]LGAS[IV]DL[RV]-----N[CS]VV[LG]YENE[EG]
S.cerevisiae_1   1  M-----SNSNGDNK[CV]IT[IG]DEKKFQA[AP]LGA[IV]DL[RV]-----N[CS]VV[QG]SNVQD
S.cerevisiae_2   1  M-----SNNKAGGE[EV]IT[IG]DAKK[QA]T[SEL]GA[IV]DL[RV]-----N[NS]IV[LG]PDI[HG]
A.nidulans_P     1  MYVKQ[SL]PAF[VL]GLVASSQ[NV]AAL--PQA--SAA[PS]PVADP[PK]Y[TI]-SAGN[ITAK]IPEGAR[TOLL]PDRDGI[LD]VV[VG]DDPTQ
P.chrysogenum_P1 1  MHFKSYVTAALYGLPALANAVPSPSHSQAAPS[PSAAGSDADH]K[SYT]I-KAEN[ITAK]IPYGAR[TSLL]PDRDGN[IQD]VV[VG]DDPK[KE]
P.chrysogenum_P2 1  MYLKQYIAACL[FV]PIALG-----QGN[SNA]RSVDP[RV]FT[II]-SADN[ITAK]FIPYGAR[ISLL]PDRNGNEQD[VV]VG[DD]PHQ
Q9ZB17_9LACT     1  ME-----IKIRDFGLGSD[IS]LTKAGV[TI]SFTNLGAR[IV]DWQK-----D[CK]HL[IL]G[DS]AKE
-----*-----

```

```

Q96C23_HUMAN      65  YLQ----KQY[FG]AVI[GR]VANR[IA]R[GT]F-KVD[GKE]YH[A]IN--KEPNSLHGCVRG[F]D[V]LWTPRVLSN-----G[V]Q[SR]IS[PD]G---EE
P0A9C3_ECOLI     62  YQD----QAAL[IG]ASIGRYANR[IA]NSRY-TFQ[GET]V[VS]SPS--QC[VQL]HGCGPEG[F]DKRN[QIV]N[QND]-----RQ[V]L[PA]SSD[DG]---DQ
P.chrysogenum    38  YVKH---NSPH[YG]ATIGRYANR[IKD]LIQ[EB]N[QK]IQL[TQ]N--DCPNSLHGCGEK[GV]KRI[FD]GPH[V]Q--RNGHDAL[LR]KYLCKGQ---EE
A.nidulans       36  YEKY---NKP[WF]GATIGRYANR[IK]NGV[INN]N[CRE]YK[E]I[IN]--NPPNALHGGSRC[FG]Q[EF]EGP[TVI]K-RDGKDAL[LR]TYLSPGQ---DN
S.cerevisiae_B   60  YLNP---DSAL[IG]ATIGRYANR[IS]K[CF]-S[CN]KD[YL]Q[TV]N--NCV[AN]ESS[IG]S[PE]RR[FL]GPI[IQ]NPSKDVFTAE[ML]IDN[CK]---DT
S.cerevisiae_1   52  YLT---DGNM[GAT]VGRYANR[IA]R[GV]F-SLD[DG]PHQ[TV]N--NCGNT[NS]SI[SS]P[HL]K[KY]KASKVQ[NPL]DDLYI[VE]TLDDRTL--PN
S.cerevisiae_2   52  YISD---GYN[IG]ATVGRYANR[IA]Y[Q]M[F]-SME[DG]PHQ[TV]N--NCGNT[NS]SI[SS]P[HL]K[KY]KASKVQ[NPL]DDLYI[VE]TLDDRTL--PN
A.nidulans_P     85  YSDD---DNF[YG]PVVGRYANR[IR]N[CT]F-T[IA]G[ET]Y[HT]PKWEND[CLD]T[LG]GCEV[G]YDKRN[WT]VTSYTN-----SS[IT]P[SF]Y-DEA---LQ
P.chrysogenum_P1 89  YLHDSQTNRT[FG]AVVGRYANR[IK]N[GT]F-T[ID]DNE[YE]P[EN]END[AD]TLHGCGF[IG]YDM[NN]WTVTSHSD-----SS[IT]P[TL]L-DGQ---FE
P.chrysogenum_P2 76  YLEDTQTSHT[FG]AVI[GR]IANR[VK]N[GT]F-ELD[GTE]YH[P]KNK-DCVYTLHGCD[IG]YDQ[NN]WTVVASTP-----SS[IT]P[EL]Y-DAE---FQ
Q9ZB17_9LACT     54  YLE----KDA[FG]ATV[GPT]AGRIK[DL]V-K[IS]GKDYI[EN]Q[N]--EC[POT]LHGCEESI[HT]LW[TYE]VTDL--GAEVQ[VR]S[LV]TNDG---TN
-----*-----

```

```

Q96C23_HUMAN      139  GYPGELK[VW]V[YL]DG-GE-----T[IV]N[RA]QA---SQATP[VN]L[TN]ESYFNL[A]CQA--SPN[IND]HEV[T]E-ADTYL[PV]DE-TL
P0A9C3_ECOLI     137  GFPQNLGATVQ[RL]TDDNR-----T[SI]T[RA]IV-----DKPCP[VN]T[TN]EVYFNLD[CE]--QSDV[RN]K[Q]L-AD[EL]P[VD]E-TG
P.chrysogenum    119  GYPGAVEVRWY[TA]SK-E-----GDAKTV[TA]EYEVFTGN[EC]ET[VN]L[TN]ESYFNL[IG]D--GPD[IS]G[TA]Q[LA]-TGDYLP[DS]-TG
A.nidulans       117  GYPGAVELRVY[VV]VSE-EVEG---GLPRS[IN]NE[YE]A[EL]VGDEVBET[VIN]IT[NS]YFNL[SA]--ASAAE[GV]TAKLT-TRDYLP[EN]-GG
S.cerevisiae_B   141  EFPGDLELV[TL]Q[VV]NV-----AQK[S]E[AV]YK[KL]TA--C[ET]P[IN]L[TN]ESYFNL[KPY]-GDT[EG]E[IM]R-SKKS[V]D[DK]-NM
S.cerevisiae_1   135  EFPGDLEVT[V]RYTLNV-----AEMT[D]M[E]YQ[QL]VR--C[ET]P[IN]T[NS]YFNL[NKVK]SEKS[IR]G[E]V[KVC]-SNKS[LE]V[TE]GAL
S.cerevisiae_2   134  EFPGDLEAVN[LR]YTLNV-----ADMT[D]L[E]Y[A]KLVS--C[ET]P[IN]T[NS]YFNL[NK]TMDKKS[IS]G[E]V[R]LC-SDKS[LE]V[SE]GAL
A.nidulans_P     161  GFPGDVLT[HA]Y[TV]DN-----NNP[SG]LPQ--T[IT]KL[V]S[LAL]-T[ET]P[IM]L[NE]IYNNLNAFREP[VLE]GVTLQ[PL]STRF[AT]DG-IL
P.chrysogenum_P1 169  KFPGDVVT[HA]T[FS]VST-EKTQ[SN]PKGLPQ--T[TAK]L[V]L[SL]-T[ET]P[IM]L[NE]IYNNLNAF[KES]NVLKDA[TL]Q[PL]S[OR]F[IG]GDS-IL
P.chrysogenum_P2 155  GFPGDVITQAT[YS]VDT-KATAQ[NP]QGHPR--T[MT]KM[V]S[QAL]-T[ET]P[IM]L[NE]IYNNLNGFQ[QPT]V[ND]LW[Q]P[IS]E[RF]I[AT]DS-IQ
Q9ZB17_9LACT     132  GYPGKLEMSV[TH]S[FDD]YNK-----WKI[HR]E[IS]---DKD[TV]P[ET]G[V]YFNL[NC]DA--SESV[EN]H[GL]R[A]-ASRFV[PL]KQDTE
-----*-----

```

```

Q96C23_HUMAN      207 IPTICEVAPVQGT--AFDLRKEVLEKHLQD-----FHLNGFDHNCCLK-----GSKEK-----HFCARVHHAASGRVLEVYT
P0A9C3_ECOLI     205 IPHDGLKSVAGT---SFDFRSAKILASFLADDDQ---RKVKGYDHAFTLLQ-----AKG-DGKKVAAHVWSADEKIQKRVYIT
P.chrysogenum    194 IPSGGVAKF----PRDVAKPTLBAAG-----AHIDDVVPLE-----SDASKIPLDTRG-LPDRRLAQF SNASTGPHLEVHS
A.nidulans       195 IPLGQIISPHE---SIDDTPQFEFCPEK-----ATFDDCQVVD-----RDLSGVSLDTRN-RPLKLLAEFRHADTRNPLQVHS
S.cerevisiae_B   213 IPTGNIVDREIA--TFNSAKPTVLCPEK-----PQFDCCQVVD-----ENAKPSQINTLN-NELTLIVKAFHPDSNITLLEVLS
S.cerevisiae_1   209 IPTACKIIERNIA--TFDSAKPTVLCPEK-----PQFDCCQVVD-----ANKDLKTTDSVSVNKLVPVFKAYHPESHKKEVST
S.cerevisiae_2   208 IPTGKIVQRKIA--TFDSAKPTVLCPEK-----PIVDYAFIVD-----ENKNLKTDSVSVNKLVPVFKAYHPASRISLEVST
A.nidulans_P     238 IENGTIATVDAY-NGAPDFISPKQVQCQIKNAVGLCGTDCCTCYDNCNLID---R-PTGYSSD---ALI PALYMASKNTGTLLEVAT
P.chrysogenum_P1 250 IENGTIHDVENTYQGALDFASPKQVQCQIEKTYDLCGTGCTGVDTCQFLVD---R-PSYASD---SATVLSAESSSTGTLLEVAT
P.chrysogenum_P2 236 IENGVISTVDETDHQSMDFASGKQVQCQIEYTOQLVGSQVGYDNCQFLID---RDPTSSARD---SLV TALRLNSSLTGTSLMDVAT
Q9ZB17_9LACT     202 IVRGDLVVDIKNT--DLDFRQEKQLSNAFNSNMEQV-QLVKGIDHPFLLDQLGLDKEQARLTLDTS-----ISVFTI
.....D.....*

Q96C23_HUMAN      272 TOPGVQFYTCNFDGTLKGGK-----NGAVYPK---HSGFCLETONMPDAVNPQREPP---VLLRPGBEYDHTMVEKFSVA
P0A9C3_ECOLI     275 TAPALQFYSCNFLGGTPSR-----GTEPYAD---WQCLALESEFLPDSPLNHPERPPQD---CFLRPGBEYSSLAEYQFIAE
P.chrysogenum    261 TEPAFQFYTCGYIDVPSVN-----GAPAHHE---GAGFCVEPSRFVNAINEPEWRSM---VLLRKGQLEFGCKAVYKAWKA
A.nidulans       262 TDPAFQFYTCAGIDVQKADE---ENPARGP---WAGFCLEPSRFVNAINEEKWRHT---VLLRKGERTGSRIMYKAWRG
S.cerevisiae_B   283 TEPFYQFYTCDFLS-----AGYEA---RQGFATPEGRYIDAINQENWKDC---VLLRNGEYVGSKIVYRFS--
S.cerevisiae_1   280 TEPVHLTYCDNLC-----GKFVP---RSGFAVQQGRYVDAINRDEWRGC---VLLRGEVYTSKQRYNFDI-
S.cerevisiae_2   279 TEPVLFYTCDNLC-----DGFTP---RSGFAVEQGRYVDAINRDGWRDC---VLLRGEVYTSKQRYNFAV-
A.nidulans_P     316 NTPALQIYSCNGQDGSDFVKPSQIQRAKQAGYN-GPTTVDK---NACVVVETEGNIDGINQFGWQTDNQIFTPGGLPAVNLAVERGTA
P.chrysogenum_P1 329 NQPALQIYTCGQNGSIATKKSQAKRNEANGGDAGATHVNK---YCGFVIEIETEDNIDGINNPEWRGLPYQIFPGPDDGPAVNWATYQFGTI
P.chrysogenum_P2 315 NQPAVQFFACLNDGTIPVKPSQVERNSGNEE--ATGFVEK---YGLLAEPEEYIESVNPQWQSQSNVYSPETLPAVNLAVERGTV
Q9ZB17_9LACT     270 DQSSVIVITANFGD-----LGTLYHEKQVHVGQITPFCQVSPGSEQIFELGD---ISLRAGEYQVQATYISLHTK
.....Q.....E

```

5. ábra A lehetséges fungális mutarotáz peptidek illesztése a karakterizált humán, *Escherichia coli* és *Lactococcus lactis* mutarotáz enzimeikhez. A *Saccharomyces cerevisiae* Gal10p bifunkciós fehérje (*S. cerevisiae_B*) közül csak a karboxi-terminális domént (Q356-S699) használtuk. A 11 szekvenciát a MAFFT 7-es verziójának alapértelmezett beállításával (hasonlósági mátrix, Blosum 62) illesztettük és CLUSTAL formátumban exportáltuk. A szerkezetileg hasonló vagy azonos szekvenciákat sötét háttérrel emeltük ki, amiből a konzervált szekvenciákra következtethetünk. Az egyértelműség érdekében a humán mutarotáz R82, H107, H176, D243, Q279 és E307 aminosavakat adjuk meg a konszenzusvonalon, a (*) lehetséges konzervált aminosavakat jeleznek.

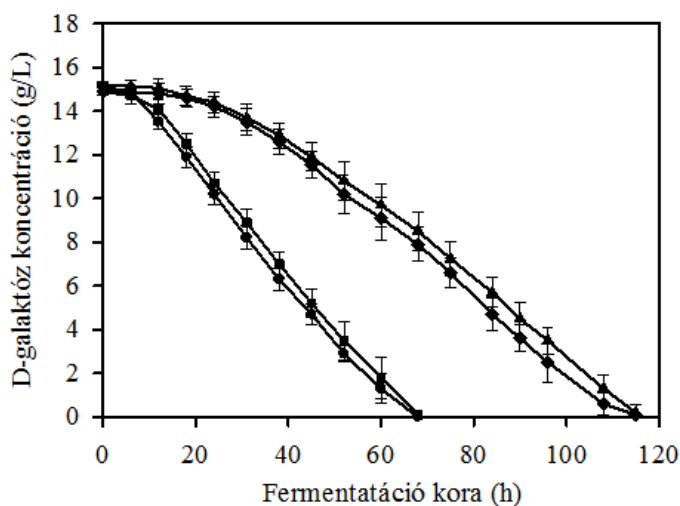
A bakteriális mutarotázokat a galaktóz-operon *galM* génjei kódolják (Bouffard és mtsai., 1994, Grossiord és mtsai, 2003). Érdekes módon az *A. nidulans*-ban azonosított két fehérje mindegyike jobban hasonlít az emberi fehérjéhez, mint egymáshoz. Az emberi mutarotázzal összehasonlítva az AN3432 31 %-ban azonos és 48 % hasonló, míg az AN3184 27 %-ban azonos és 43 % hasonló (AN3432 az AN3184-hez képest: 23 %-ban azonos, 35 %-ban hasonló). Mindazonáltal a szubsztrátkötésben és a katalízisében részt vevő humán enzim hat aminosava (R82, H107, H176, D243, Q279 és E307) az *E. coli*, az öt fonalas gomba fehérjében és az élesztő GAL10p mutarotáz doménjében is megtalálható.

5.2 A *galmA* és *galmB* funkciójának azonosítása

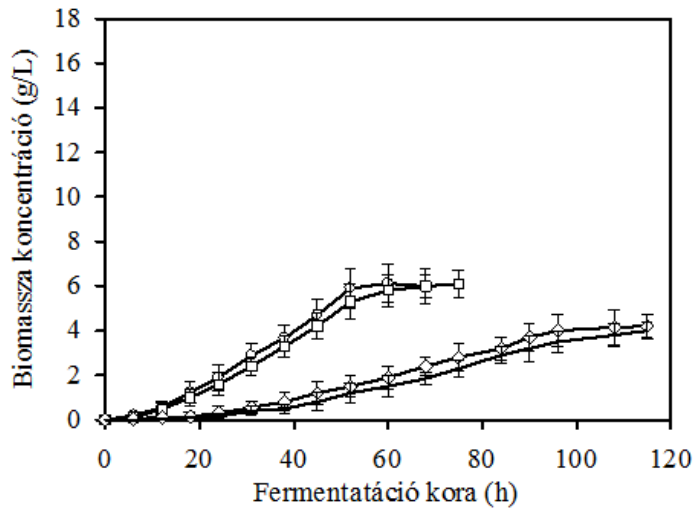
Ahhoz, hogy megállapítsuk, hogy a *galmA* vagy a *galmB* kódolja a fiziológiásan jelentős galaktóz-mutarotázt, mind a két gént külön-külön és egyszerre is deletáltuk a gomba genomjából, így kaptuk a $\Delta galmA$, a $\Delta galmB$ egyszeres, és a $\Delta galmA/\Delta galmB$ dupla hiánymutánsokat. Ezt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

Minden *galm* mutáns különböző szénforrás tartalmú süllyesztett kultúrákban is megvizsgáltuk. Mint ahogy a **6. és a 7 ábrán** látható, a D-galaktóz felvétel és a biomassza képződés szignifikáns lecsökkent a *galmB* hiányában a vad törzshöz képest. Ezzel ellentétben a $\Delta galmA$ süllyesztett sejtenyészetekben a referencia törzshöz képest nem

tapasztaltunk szignifikáns ($p < 0,1 \%$) eltérést a biomassza 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.



6. ábra D-galaktóz koncentráció alakulása *Aspergillus nidulans* vad típus (kör), *galmA* egyszeres (négyzet), *galmB* egyszeres (rombusz) és *galmA/galmB* dupla (háromszög) hiánymutáns törzsek sülyesztett fermentációiban. A tápoldat egyedüli szénforrásként 15 g/L D-galaktózt tartalmazott kiinduláskor, amit konidiospórákkal oltottunk le.

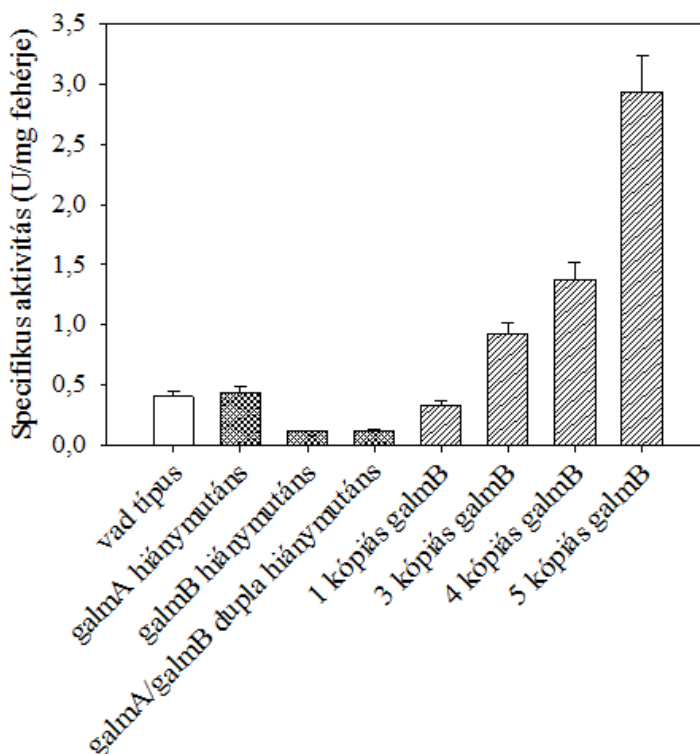


7. ábra A keletkezett biomassza koncentráció alakulása *Aspergillus nidulans* vad típus (kör), *galmA* egyszeres (négyzet), *galmb* egyszeres (rombusz) és *galmA/galmb* dupla (háromszög) hiánymutáns törzsek süllyesztett fermentációiban. A tápoldat egyedüli szénforrásként 15 g/L D-galaktózt tartalmazott kiinduláskor, amit konidiospórákkal oltottunk le.

5.3 A GalmB egy fiziológiásan jelentős galaktóz mutarotáz

Habár D-glükózon (1,5 %) nem volt tapasztalható semmilyen fenotípus változás a *galmb* hiánymutánsban, az enzim katalizálta aldóz-1-epimerizálódás mérésének alapja a D-glükóz mutarotációja (Bouffard és mtsai., 1994; részletek Anyagok és Módszerek fejezetben). A *galmb* egyszeres és dupla *A. nidulans* hiánymutánsok D-galaktózon vagy L-arabinózon növesztett biomasszáik sejtmentes kivonataiban a megfigyelt mutarotáció nem szignifikánsan ($p < 0,1\%$) 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 (8. ábra).

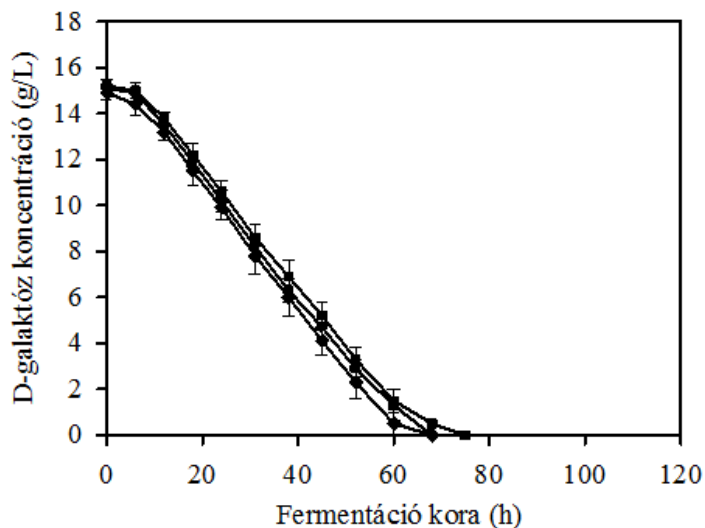


8. ábra Specifikus mutarotáz aktivitás a vad típusú, a *galmA*, a *galmB* and a *galmA/galmB* hiánymutánsokban és az 1-, 3-, 4-, 5 kópiás *galmB* törzsekben. A kereskedelemben elérhető α -D-glükopiranozt használtuk enzimszubsztrátumként. A törzseket előnövesztettük glicerinnel tartalmú tápoldatban, majd D-galaktózzal tartalmú tápoldatba mostuk át a tenyészeteket. Az enzim katalizálta mutarotációt a spontán mutarotációval korrigáltuk, és sejtmentes enzimkivonathól mértük.

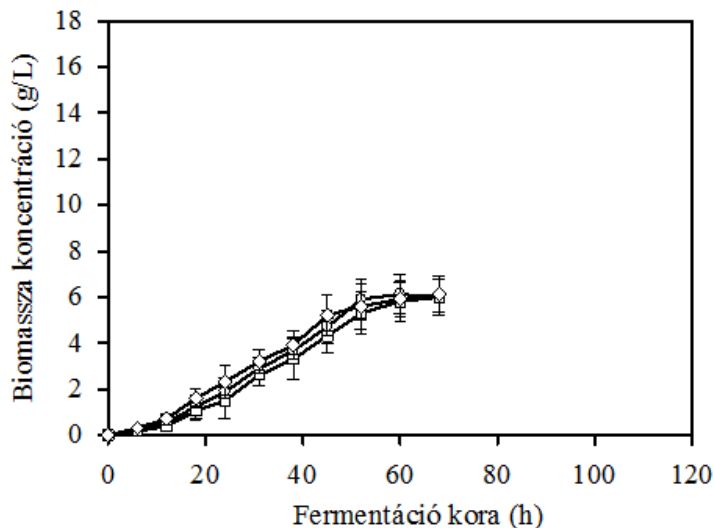
Mindazonáltal a *galmB* túltermelő mutánsai nem befolyásolták a biomassza képződés vagy a cukorfelvétel sebességét, ez alól kivételt képez a *galmB* deléciós törzsei. Ez azt jelenti, hogy a tesztelt

körülmények mellett a mutarotáció a D-galaktóz katabolizmusban nem sebességmeghatározó a vad típusú törzsben (9. és 10. ábra).

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.



9. ábra D-galaktóz koncentráció alakulása *Aspergillus nidulans* vad típus (kör) *galmA* 2 kópiás (négyzet) és *galmB* 3 kópiás (rombusz) törzsek sült szőlőszőlő fermentációiban. A tápoldat egyedüli szénforrásként 15 g/L D-galaktózt tartalmazott kiinduláskor, amit konidiospórákkal oltottunk le.



10. ábra A keletkezett biomassza koncentráció alakulása *Aspergillus nidulans* vad típus (kör) *galmA* 2 kópiás (négyzet) és *galmB* 3 kópiás (rombusz) törzsek süllyesztett fermentációiban. A tápoldat egyedüli szénforrásként 15 g/L D-galaktózt tartalmazott kiinduláskor, amit konidiospórákkal oltottunk le.

5.4 A *galmA* és a *galmB* expresszióját pentózok is indukálhatják

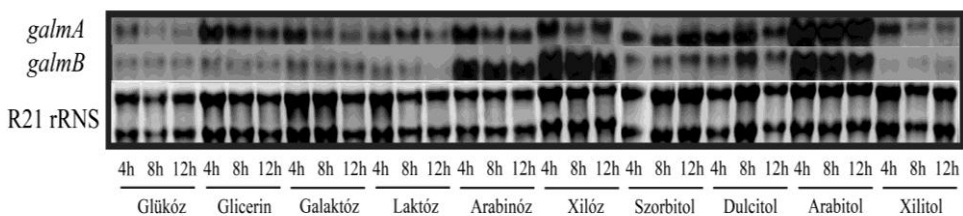
A biomasszát glicerinnel tartalmú tápoldatban 24 óráig előnövesztettük, hogy elkerüljük a két vizsgált monoszacharid okozta csírázásbeli különbséget (a közeli rokon *A. niger* például nem képes csírázni a D-galaktózon, Fekete és mtsai., 2012). Ezt követően szénforrás nélküli minimál tápoldatra mostuk át a tenyészeteket, majd az adott szachariddal vagy poliollal indukáltuk a vizsgált gének expresszióját.

Mint ahogy **11. ábrán** látható a *galmA* legerősebb induktora a 4-12 h korban az arabinitol volt, ezzel szemben a *galmB* L-arabinózon, poliollján L-arabinitolon és D-xilózon expresszáldott legerősebben.

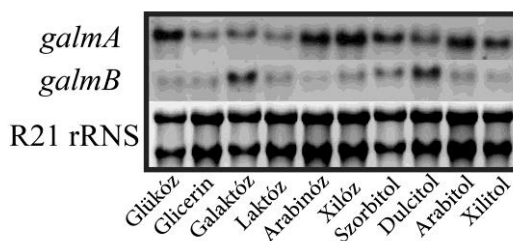
A D-glükóz hatékonyan represszálja a *S. cerevisiae* teljes galaktóz katabolizmus gén klaszter expresszióját, a bifunkcionális *GAL10* gén expresszióját is beleértve, amely egy galaktóz mutarotáz domént is kódol (lásd például Sellick és mtsai., 2008 és a cikkben található hivatkozások). A *galmA* gén a 24 h-s mintában D-glükózon expresszálódott, ami azzal magyarázható, hogy a *galmA* promóterében 9, míg a *galmB* promóterében 2 *CreaA* kötőhely található. A *galmB* esetében D-galaktózon és poliolján, dulcitolon volt látható erőteljesebb expresszió 24 h után (**12. ábra**).

A *galm* gének pentózokon történő kifejeződése azt engedi következtetni, hogy az L-arabinóz és a D-xilóz anyagcserében is lehet fontos hatása. Habár eddig nem sikerült xilóz-izomeráz vagy arabinóz izomeráz enzimeket kódoló géneket azonosítani fonalas gombákban (Flippi és mtsai, 2009).

A *L. lactis* élesztőben (Erlandson és mtsai, 2001) a xilán degradációs útvonal részeként említenek egy aldóz-1-epimeráz enzimet, amely xilózra specifikus. Illetve bizonyos transzporterek is lehetnek anomer specifikusak, lehetséges, hogy sejtfalhoz kötött enzim a GalmA.



11. ábra Az *Aspergillus nidulans galmA* és *galmB* expressziós profiljának meghatározása a vad típusú törzsben Northern-blot analízissel 4, 8, 12 h korban. A 18 S és 28 S riboszómális RNS-t etidium-bromiddal tettük láthatóvá.

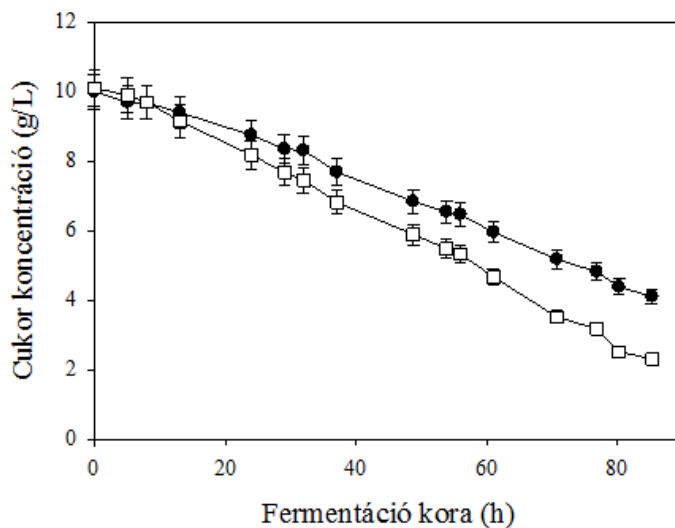


12. ábra Az *Aspergillus nidulans* *galmA* és *galmB* expressziós profiljának meghatározása a vad típusú törzsben Northern-blot analízissel 24 h korban. A 18 S és 28 S riboszómális RNS-t etidium-bromiddal tettük láthatóvá.

5.5 Az *A. nidulans* egyidejűleg D-galaktózt és L-arabinózt is képes metabolizálni

Kevert, D-glükóz és L-ramnóz szénforrást is tartalmazó rázatott lombikos kísérletekben, az utóbbi cukrot addig nem veszi fel az *A. nidulans*, mielőtt a "preferált" szénforrás, a D-glükóz teljesen ki nem merül, függetlenül attól, hogy a törzs vad típusú vagy egy szén-derepresszált *creA* mutáns (Tamayo-Ramos és mtsai., 2012). Az L-ramnóz hasznosítását egy olyan represszálo mechanizmus gátolja, amely nem foglalja magában az általános karbon-katabolit-represszió DNS-kötő represszorát, a CreA-t. 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. Megjegyezzük, hogy a tenyészetek inokulálásakor a cukrok egyenlő tömegszázalékban voltak jelen, azaz nem ekvimoláris mennyiségben. A **13. ábrán** az látható, hogy a gomba a két cukrot egyidejűleg vette fel, és többé-kevésbé hasonló sebességgel fogyasztotta a

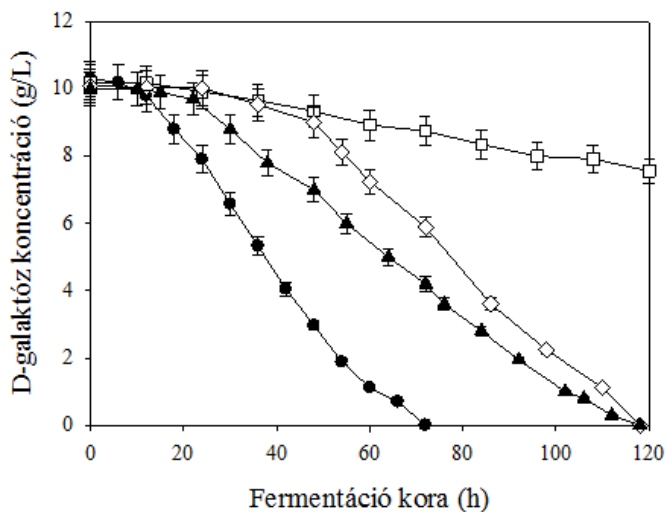
D-glükóz és az L-ramnóz esetével ellentétben. A két monoszacharid felhasználásnak sebessége meglehetősen hasonlóknak tűnik, ha külön-külön adagoljuk 10-10 g/L koncentrációban, mindkét szénforrást kb. 72 óra (3 nap) alatt hasznosította a mikroba. Mindazonáltal úgy tűnik, hogy a vegyes tenyészetben (10 + 10 g/L) a pentóz némileg gyorsabban hasznosul, mint a hexóz, így a vegyes tenyészetben az L-arabinóz a D-galaktózhoz képest hamarabb kimerült. Tehát az L-arabinogalaktán növényi heteropolimer főkomponenseit tartalmazó batch kultúrák kiválóan használhatóak a cukor katabolizmus bármely szinergikus hatásának vizsgálatára anélkül, hogy kemosztát és alacsony koncentrációjú szénforrású tápoldatban kellene tenyészteni a mikrobát a karbon katabolit represszió legfőbb hatásainak megkerülése miatt. Nem volt bizonyítható, hogy nagy koncentrációban a D-galaktóz vagy az L-arabinóz kizárná a másik szénforrás metabolizmusát (**13. ábra**).



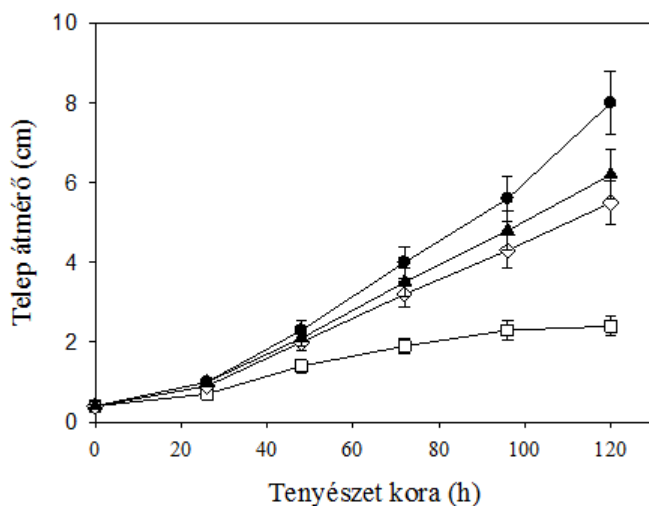
13. ábra D-galaktóz (kör) és L-arabinóz (négyzet) mennyiségének alakulása az *Aspergillus nidulans* R21 (vad típus) törzs 10-10 g/L L-arabinózt és D-galaktózt tartalmazó minimál tápoldatú süllyesztett fermentációban.

5.6 A D-galaktóz és az L-arabinóz katabolizmus struktúrgén mutánsok vizsgálata

A **14. és a 15. ábrán** látható, hogy mindhárom mutáció befolyásolja a D-galaktóz hasznosítás sebességét. A legnagyobb gátló hatás *ΔgalE* esetében volt (a vad típusú cukorfogyási rátájának kb. 12% -a maradt meg), a rendelkezésre álló szénforrásnak csak 20% -át fogyasztotta 120 órával a beoltás után. Ezzel szemben az alternatív útvonal által biztosított növekedés továbbra is fennállt, ahogy az Fekete és mtsai. (2004) eredményeiből az várható is volt. 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 (*ΔgalM*) D-galaktóz fogyasztása nagyon hasonlít az L-arabinitol-dehidrogenáz null mutánséhoz, sokkal kevésbé korlátozva azt, mint a galaktokináz deletált mutánst.

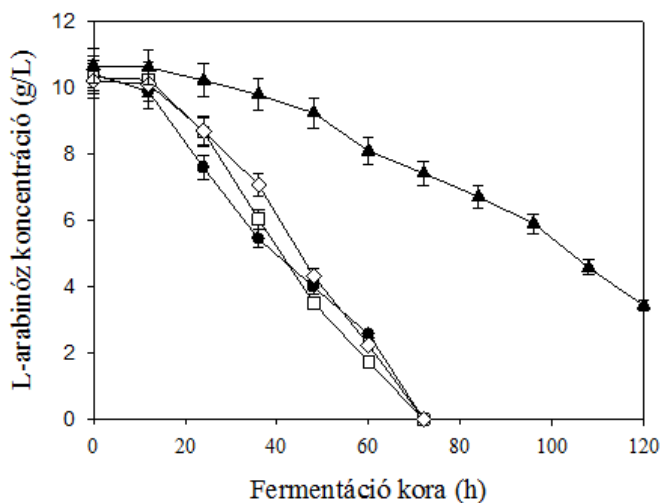


14. ábra D-galaktóz koncentráció alakulása *Aspergillus nidulans* vad típus (kör), *galE* (négyzet), *araAI* (háromszög) és *galMB* hiánymutáns (rombusz) süllyesztett fermentációiban. A tápoldat egyedüli szénforrásként 10 g/L **D-galaktózt** tartalmazott kiinduláskor, amit friss konidiosporákkal oltottunk le.

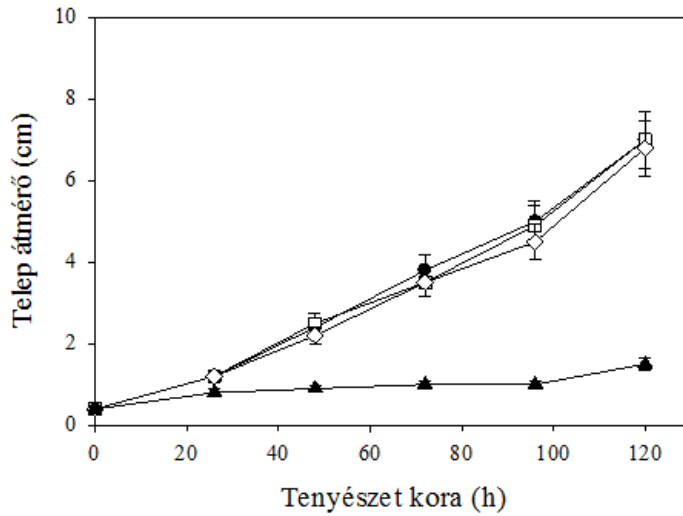


15. ábra Telep átmérők alakulása *Aspergillus nidulans* vad típus (kör), *galE*- (négyzet), *araAI*- (háromszög) és *galMB* hiánymutáns (rombusz) egy ponton leoltott szilárd táptalajú tenyészeteknek. A táptalaj egyedüli szénforrásként 10 g/L **D-galaktózt** tartalmazott kiinduláskor, amit friss konidiosporákkal oltottunk le.

Másrészt a galaktokináz és a 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 mutarotáz-hiánymutánsok 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 (**16. és 17. ábra**).



16. ábra L-arabinóz koncentráció alakulása *Aspergillus nidulans* vad típus (kör), *galE*- (négyzet), *araA1*- (háromszög) és *galM B* hiánymutáns (rombusz) süllyesztett fermentációiban. A tápoldat egyedüli szénforrásként 10 g/L **L-arabinózt** tartalmazott kiinduláskor, amit friss konidiospórákkal oltottunk le.



17. ábra Telep átmérők alakulása *Aspergillus nidulans* vad típus (kör), *galE*⁻ (négyzet), *araA1*⁻ (háromszög) és *galM*⁻ hiánymutáns (rombusz) egy ponton leoltott szilárd táptalajú tenyészeteknek. A tápoldat egyedüli szénforrásként 10 g/L **L-arabinózt** tartalmazott kiinduláskor, amit friss konidiospórákkal oltottunk le.

5.7 A D-galaktóz-1-epimeráz, galaktokináz, L-arabinitol-dehidrogenáz és D-xilulokináz gének transzkripciós analízise L-arabinózon és/vagy D-galaktózon

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.

Amint vártuk, az L-arabinitol-dehidrogenáz gén (*araA*) a vizsgált szénhidrátokon kifejeződött, mivel az feltételezhetően mindkét cukor metabolizmusában részt vesz (**18. ábra**). Az L-arabinózzal 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. Tanszékünkön sikerült azt bizonyítani, hogy a galaktitol helyett a D-galaktóz az alternatív lebontás jobb induktora (Orosz és mtsai., 2014).

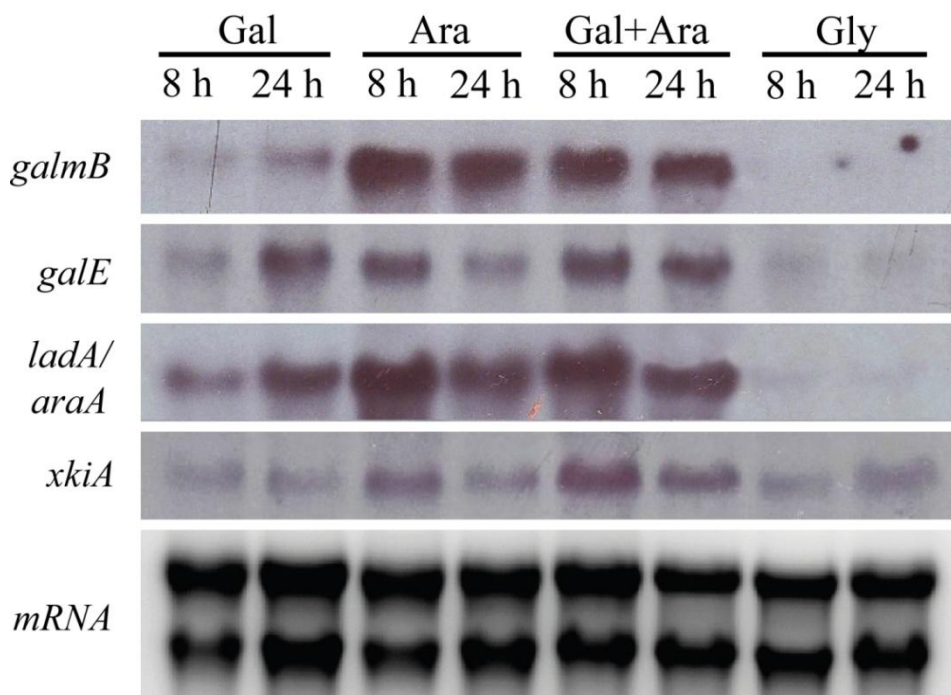
A xilulokináz (*xkiA*) gén minden vizsgált szénforráson (kontrol glicerinen is) indukálódott, és némileg nagyobb mértékű génexpresszió csak 8 órával L-arabinózra történő áttöltés után volt megfigyelhető. Ezzel ellentétben a galaktokináz (*galE*) és az *araA1* gén kifejeződésére úgy tűnik, hogy mindkét szénhidrát hatással volt, az L-arabinóz 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-arabinóz metabolizmusában, mivel a Leloir útvonal első lépésében az alfa-D-galaktopiranozid C1 pozíciójű 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 glicerin kontroll mintáiban. Funkcionális értelemben a *galM* L-arabinóz generálta hiperindukciója fiziológiailag aberránsnak tűnik, mivel a gén delécióna 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 közben

terméke, de a mutarotáz enzimhez (Thoden és mtsai., 2003) 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 expresszázódtak, mint csak az aldózon önmagában. A *galE*-t a kevert szénforráson talán némileg jobban fejeződött ki, mint az önmagában L-arabinózon vagy D-galaktózon. Mindkét cukor még mindig jelen van a táptalajban 24 órás micélium átoltása után is. Eredményeinkből azonban nem tudjuk megállapítani, hogy a galaktokináz gén kizárólag a D-galaktózra reagál-e 24 órával az indukció után, vagy van esetleg additív hatás az L-arabinóz együttes jelenlétének is.



18. ábra Az *Aspergillus nidulans* *galmB*, *galE*, *ladA/araA* és *xkiA* expressziós profiljának meghatározása a vad típusú törzsben Northern-blot analízissel 8 és 24 h korban D-galaktóz (Gal), L-arabinóz (Ara), D-galaktóz+L-arabinóz (Gal+Ara). Represszió vagy indukció szempontjából semleges szénforrásként glicerint alkalmaztunk. A 18 S és 28 S riboszómális RNS-t etídium-bromiddal tettük láthatóvá.

6 EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA

Az *A. nidulans* D-galaktóz katabolizmusa két metabolikus útvonalon keresztül játszódhat le. A Leloir útvonal első enzime a galaktokináz csak az α -D-galaktózt képes foszforilálni, a β -anomert pedig nem (Howard és Heinrich 1965; Conway és Voglmeir, 2016). Ezzel szemben az aldóz-reduktázok (EC 1.1.1.21) a hemiacetál formán nem képesek hatni, inkább a szénhidrátok nyílt aldehid formát redukálják poliol formájukká vagy oxidálják tovább egy reverzibilis reakcióban (Inagaki és mtsai., 1982; Grimshaw, 1986; Nidetzky és mtsai., 1999). A mutarotázok nem szabadítják fel a "szabad aldehid" intermediert, hogy a "gyűrűnyílás" után a következő "gyűrű záró" reakcióhoz ez az aktív helyen maradjon (Thoden és mtsai., 2003). Ez valószínűtlenné teszi, hogy a mutarotázok gyorsítsanak az oxido-reduktív úton történő katabolizmust, mivel a mutarotáz aktivitása nem növeli az aldóz-reduktáz szubsztrátum hozzáférhetőségét. Az oxido-reduktív útvonal ammónium sók jelenlétében aktív, ezzel szemben nitrát nitrogénforrás alkalmazásával blokkolható. Az *A. nidulans* D-galaktokináz mutánsai kizárólagos szénforrásként D-galaktózt, nitrogénforrásként nitrátot tartalmazó tápközegben nem képesek növekedésre (Fekete és mtsai., 2004; Alam and Kaminskyj, 2013). Ahhoz, hogy az oxido-reduktív útvonalat inaktiváljuk, a standard nátrium-nitrát nitrogénforrást tartalmazó AMM (Pontecorvo és mtsai., 1953) minimál tápközeget használtunk a vizsgálatok során.

Az extracelluláris mutarotáció a vizsgált gombatenyészetek táptalajában lényegében megegyezett a sterilizált folyékony tápközeg azonos körülmények között inkubált mutarotációjával, jelezve a kísérleti rendszeren belül a spontán mutarotáció alacsony mértékét és a katalizált

mutarotáció D-galaktózon/nitráton a növekedés minden szakaszában intracellulárisan lokalizálódik. Azonban nem zárhatjuk ki azt a lehetőséget, hogy a GalmA aktivitása azért nem mutatható ki β -D-glükóz-dehidrogenáz alapú enzimaktivitás méréssel, mivel a GalmA nem képes az α -D-glükóz szubsztrátumként történő hasznosítására. A *S. cerevisiae* Gal10p mutarotáz domén *in vitro* 100-szor gyorsabban alakítja át a D-galaktóz anomerjeit, mint a D-glükózt, illetve az utóbbi konverziós rátája is nem sokkal magasabb, mint a minta puffer spontán mutarotációs sebessége (Scott és Timson, 2007).

Ez azt is sugallhatja, hogy a fonalas gombák bizonyos galaktóz 1-epimeráz enzimeinek glükóz anomerizációja nem specifikus kölcsönhatás eredménye is lehet. Ennek megfelelően, a vizsgált *galM* gének delécioja vagy túltermelése (saját promotereivel) nem volt hatással a D-glükóz szénforrásként történő hasznosítására.

A hexokináz (glukokináz) a C6-os pozícióban mindkét anomert érintő foszforilációjának (Wurster és Hess, 1974) és a glükóz-6-foszfát (G6P) aldóz-ketóz-izomerizációjának (EC 5.3.1.19) mechanizmusa is a hemiacetál / hemiketál gyűrű felnyílásával jár együtt, de ezzel szemben a G6P α -anomere kb. 20x gyorsabban képes izomerizálódni (Schray és mtsai., 1973). A gombák, a növények és a baktériumok is rendelkezhetnek G6P-ra specifikus (EC 5.1.3.15) mutarotázokkal, amely nem foszforilált cukrokra is hathatnak (Wurster és Hess, 1972 és 1973; Ymy9-et élesztőben: Graille és mtsai., 2006, YeaD-t baktériumban: Chittori és mtsai., 2007).

A D-glükóz hatékonyan represszálja a *S. cerevisiae* teljes galaktóz katabolizmus gén klaszter expresszióját, a bifunkcionális *GAL10* gén

expresszióját is beleértve, amely egy galaktóz mutarotáz domént is kódol (lásd például Sellick és mtsai., 2008 és a cikkben található hivatkozások).

A *galmB* expresszióját a D-galaktózon kívül az L-arabinóz, az arabinitol és a D-xilóz is fokozta, holott elméletileg ez az enzim nem játszik szerepet a pentózok lebontásában. Ennek logikus magyarázata lehet, hogy a D-galaktóz nem fordul elő önállóan a természetben, hanem más szacharidokkal együtt alkotnak pl. sejtfal komponenseket.

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. Az oldalláncok főleg α -kapcsolt L-arabinofuranóz egységekből állnak (Sakamoto és Ishimaru, 2013; Knoch és mtsai., 2014). A polimer szerkezete tehát olyan, hogy a gerinchálózat elérése előtt először az oldalláncot kell eltávolítani az α -L-arabinofuranozidáz B (AbfB, EC 3.2.1.55, GH 54 család) katalizálta nem redukáló, terminális L-arabinofuranózt tartalmazó $\alpha(1-5)$, $\alpha(1,3)$ és $\alpha(1,2)$ kötések hidrolizálásának segítségével (Rombouts és mtsai., 1988; Flippi és mtsai., 1993). Az *A. niger*-ben ezt az enzimet heteropoliszacharidok, például arabinogalaktán, de az L-arabinóz monomer és az L-arabinitol, mint a katabolizmus első intermedierje is indukálja (vd Veen és mtsai., 1991 és 1993). Az I. típusú arabinogalaktán főlánc bontását endo- β -1,4-galaktonáz (EC 3.2.1.89, GH 53 család) irányítja, amely végül D-galaktózt és β -1,4-galaktobiózt szolgáltat (Michalak és mtsai., 2012; de Vries és mtsai., 2002). Az *A. niger*-ben a dimer extracelluláris GH 35 béta-galaktozidázok (EC 3.2.1.23) által hasításra kerül, miközben a

galaktobiózt az *A. nidulans*-felveszi, majd intracellulárisan működő GH 2 béta-galaktozidáz (BgaD) katalizálta reakcióban monomerekké alakítja.

Korábban a GH2 enzimet és a transzportért felelős génklasztert már tanulmányozták (Fekete és mások, 2012), mely szerint a BgaD β -galaktozidáz és a LacpA laktóz-permeáz expresszióját transzkripció szinten a D-galaktóz, valamint az L-arabinóz is indukálják. Lehetséges magyarázat lehet, hogy a hemiacetál- vagy hemiketál gyűrűk szénatomjain elhelyezkedő hidroxil-csoportjainak orientáltsága a D-galaktózban és az L-arabinózban megegyezik (a hatodik $-\text{CH}_2\text{OH}$ csoportot kivéve), tehát az aldóz és a pentóz szerkezete nagyon egybevág. Hasonló analógia figyelhető meg a D-glükóz és a D-xilóz pentóz esetében is. Ez a szerkezeti hasonlóság valószínűleg azt okozza, hogy az *Aspergillus* AbfB β -D-galaktofuranozidázként (Tefsen és mtsai., 2012), a BgaD pedig α -L-arabinopiranozidázként is működhet. Megfigyeltük azt is, hogy az *A. nidulans*-ban a BgaD-hez leginkább hasonló szintén GH2 csoporthoz tartozó AN2463 gént L-arabinóz indukálja (Fekete és mtsai., 2012). Azonban a GH2 enzimek L-arabinózzal történő indukálása azt is jelentheti, hogy például az L-arabinogalaktán heteropoliszacharidok tápanyagforrás esetén, az L-arabinózt és D-galaktózt is tartalmaz. Tehát az L-arabinóz is indukálhatja a D-galaktóz lebontásáért felelős Leloir útvonal enzimeinek kifejeződését.

Az L-arabinóz és a D-galaktóz vegyes szénforrás tanulmányozásának másik analógiája az L-arabinóz és a D-xilóz esete. Az arabinoxilán heteropolimer szerkezete az I. típusú arabinogalaktánhoz hasonló, mivel a polimer gerincét β -1,4-kapcsolt D-xilopiranoz egységek alkotják, míg az α -kapcsolt L-arabinofuranózok alkotják az oldalláncokat. A gombákban az L-arabinóz és a D-xilóz pentózok az oxidoreduktív

útvonalon keresztül metabolizálódnak, amelyben a xilitol és a D-xilulóz is közös intermedier a C5 foszforilációt megelőzően, ami mindkét szénhidrát pentóz-foszfát ciklusba történő bejutását készíti elő (Chiang és Knight, 1961; Witteveen és mtsai., 1989; de Vries és mtsai., 1994). Mindkét pentóz esetében az első reakció a megfelelő lineáris poliolla, L-arabinitolra és xilitolra történő redukció. Ezt a reverzibilis reakciót egy széles szubsztrátspektrumú aldóz reduktáz enzim (EC 1.1.1.21) katalizálja, ami azt jelenti, hogy nincsenek D-xilózra vagy L-arabinózra specifikus aldóz-reduktázok. Tehát az L-arabinóz vagy az L-arabinitol teljes katabolikus útjának indukciója lehetővé teszi a D-xilóz katabolizmusát is. Mindazonáltal a pentóz metabolizmusok különféle specifikus transzkripciós aktivátorokkal rendelkeznek, amit XlnR és AraR-ként azonosítanak (Kowalczyk és mtsai., 2015). A D-xilóz szigorúan csak az oxidoreduktív útvonal utolsó részét indukálja, tehát az L-arabinóz katabolizmus "specifikus" enzimeket, így a NAD⁺-függő L-arabinitol-dehidrogenázt (EC 1.1.1.12) és a NADPH-függő L-xilulóz-reduktázt (EC 1.1.1.10) pedig nem (de Vries és mtsai., 1994). Ez arra enged következtetni, hogy az L-arabinóz katabolizmus D-xilóz általi keresztindukciója nem gyakran fordul elő laboratóriumi körülmények között, ahol a monomer cukrok nagy koncentrációban vannak jelen.

Valóban sikerült bizonyítani, hogy a poliszacharidok degradációban részt vevő számos xilóz által indukálható gén expresszióját ténylegesen elnyomhatja a túl sok D-xilóz (de Vries és mtsai., 1999). A kereszt indukciót egy olyan D-xilulokináz mutánsban (EC 2.7.1.17, *A. niger*) tanulmányozták, ahol az egyik pentóz sem lehet szénforrás (Witteveen és mtsai., 1989), az L-arabinitol a xilitollal együtt felhalmozódik a

gombában, így a xilóz nem képes a karbon katabolit repressziót kiváltani az abból származó katabolikus fluxos hiánya miatt.

Az L-arabinogalaktán két fő monoszacharid egysége közül először az oldalláncokat alkotó cukrok szabadulnak fel, csak ezután következik ennek a növényi heteropolimer gerincének a bontása. A mi vizsgálataink konzisztensnek tűnnek, miszerint a Leloir útvonal első két enzimét kódoló gének (katabolikus irányban) mind az arabinogalaktán oldalláncát alkotó L-arabinóz és a főlánc gerincét adó D-galaktóz is indukálhatja. Ezt az a megfigyelés is alátámasztja, hogy a D-galaktózhoz képest az L-arabinózza adott expressziós válaszok már a 8 órás mintákban erőteljesebbek (hamarabb indukál), beleértve a vegyes szénforrásra adott indukciókat is. Kísérleteink tehát erősen azt támasztják alá, hogy az L-arabinóz hatékonyan indukálja a D-galaktóz Leloir útvonalon keresztül történő katabolizmus enzimeinek expresszióját, ezzel megkönnyítve a közeledő egyidejű felvételüket és tápanyagként való hasznosításukat. Ez a jelenség figyelhető meg a pentózokkal indukálható glikozid-hidrolázoknál, mint az endo- β -1,4-galaktanáznál (*galA* az *A. niger*-ben) és a β -1,4-galaktozidáznál (*bgaD* az *A. nidulans*-ban), valamint néhány oligoszacharid permeáznál (*lacpA* az *A. nidulans*-ban) is, amelyek közvetlenül részt vesznek a galaktánváz monomerekké történő lebontásában.

Első pillantásra ellentmondás mutatkozik L-arabinóz általi Leloir keresztindukálása és a galaktóz mutarotáz általi hiperindukciója között, és az a tény között, miszerint az L-arabinóz D-galaktózt is tartalmazó körülmények mellett gyorsabban hasznosul, mint amikor csak egyedüli szénforrásként jelenik meg. A megfigyelések egyik lehetséges magyarázata az lehet, hogy a pentóz metabolizmusa az oxidoreduktív

útvonal (L-arabinitol-dehidrogenáz) teljes kapacitásán keresztül megy végbe a vegyes szénforrás esetében, miközben az egyidejű D-galaktóz hasznosítás inkább a Leloir útvonalon keresztül történik, mely út az L-arabinóz általi kereszt indukcióval gyorsítható. Más szóval, a D-galaktóznak vegyes tenyészetekben, galaktitolon keresztül végbemenő oxidoreduktív (ORP) lebontása nem jelentős. Az L-arabinóz hasznosítása során az L-Arabinitol felhalmozódik (de Vries és mtsai., 1994), így a vegyes tenyészetekben a galaktitollal versenyezhetnek. Megállapították, hogy az *A. niger*-ben lévő paralóg LadA (az oxidoreduktáz géntermékének ortológja az AN0942) és LadB (a géntermék ortológja az AN4336) L-arabinitol-dehidrogenáz nagyobb affinitást mutat L-arabinitolra, mint a galaktitolra, de a kódoló homológ géneket különböző módon indukálják (Mojzita és mtsai., 2012). További utalás lehet még a vegyes szénforrást tartalmazó kísérletek eredménye is, amikor az L-arabinóz kimerülést követő maradék D-galaktóz hasznosítás hirtelen fokozódott, ilyenkor a pentóz által indukált az oxidoreduktív útvonal enzimek teljes potenciálja lehetővé teszik a D-galaktóz galaktitolon történő azonnali lebontását.

Elmondhatjuk, hogy vegyes tenyészetekben az L-arabinóz hasznosítása a D-galaktóz Leloir útvonalon történő egyidejű metabolizációjához előnyös. A gomba sejtfa főbb építőelemeinek tekinthető UDP-glükóz és UDP-galaktóz a Leloir útvonal glükóz-6-foszfát kulcsfontosságú intermedieréből szintetizálható, de D-galaktóz metabolizmusa esetében ellenkező (anabolikus) irányba is végbemehet ez a folyamat. A foszfolükomutáz aktivitással nem rendelkező *A. nidulans* mutánsokat (a D-galaktóz Leloir útvonal metabolizmus legutolsó enzime) izolálták, amelyek csak D-galaktózon vagy más szénforráson (beleértve a

glükózt is) nem voltak képesek növekedni, kivételt képez, ha D-galaktózt és más szénforrást együttesen tartalmazott a táptalaj (Boschloo és Roberts, 1979). A vegyes, D-galaktóz és egyéb nem glikolitikus szubsztrát szénforrásokon a radioaktívan jelölt galaktóz elsősorban a gombák sejtfalában realizálódott (Katz és Rosenberger, 1970). Ebből kifolyólag az L-arabinóz és a D-galaktóz vegyes szénforrások esetében a pentóz nem feltétlenül szükséges a gomba sejtfalának szintéziséhez.

A D-galaktóz kosubsztrát jelenlétének másik előnye lehet, hogy alternatív, közvetlenebb G6P forrás, ami a pentóz-foszfát útvonal (PPP) oxidatív részének kiindulási metabolitja is. A PPP oxidatív részén keresztül NADPH kofaktor termelődhet, ami a pentózok például az L-arabinóz PCP-n keresztüli metabolizációját segítheti (Wasylenko és mtsai., 2015). Az L-Arabinóz, D-xilulózzá történő átalakítása két NADPH-t igényel, miközben a G6P ribulóz-5-foszfát-oxidációja két NADPH-t szolgáltat. Általában a G6P-t glükoneogenezisnek kell előállítani a PPP nonoxidatív részéből származó fruktóz-6-foszfátból, amelynek a D-xilulóz-5-foszfát a kulcsfontosságú köztiterméke. A G6P a D-galaktózból Leloir útvonalon keresztül történő (közvetlen) szintézise lehetővé teszi az L-arabinóz oxidoreduktív katabolizmusában alkalmazott NADPH regenerálásához szükséges glükoneogén reakciót, és így *de facto* felgyorsítja a pentóz hasznosítását. Ennek a hipotézisnek a teszteléséhez a vad típusú törzsből az intracelluláris galaktóz-1-epimeráz (*galM*) génjének expresszióját vizsgáltuk három másik PCP-ben metabolizált szénforrással, azaz L-arabinitollal (1 NADPH szükséges), D-xilózzal (szintén 1 NADPH-t igényel) és xilitollal (NADPH-t nem igényel). Azt találtuk, hogy a *galM* valóban erőteljesebben expresszálódik az L-arabinóz, a D-xilóz vagy L-arabinitol tartalmú tápoldatra történő átmosást

követően, xilitol esetében ez nem volt megfigyelhető. Eredményeink azt sugallják, hogy az *A. nidulans*-ban a NADPH redukciójához szükséges szénforrások aktív módon elősegítik a D-galaktóz UDP-galaktózon keresztül végbemenő G6P-tá történő konvertálását, még a tényleges D-galaktóz hiányában is.

Sajnos még nem teljesen tisztázott, hogy az L-arabinóz magában, vagy kevert szénforrást tartalmazó tápoldatokban miért indukálja egy olyan galaktóz-1-epimeráz génjének expresszióját, ami valójában a cirkuláris galaktóz anomer hidroxil csoportjának reverzibilis átalakulását katalizálja a vizes oldatokban, ami igazából egy spontán lejátszódó reakció is egyben.

7 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 fiziológiásan jelentős galaktóz-mutarotázt, 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* mutánszt különböző szénforrás tartalmú süllyesztett kultúrákban is megvizsgáltuk. A D-galaktóz felvétel és a biomassa képződés szignifikáns lecsökkent a *galmB* hiányában a vad törzshöz képest. Ezzel ellentétben a $\Delta galmA$ süllyesztett sejtenyészetekben 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 mutánshoz 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 dupla *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 (*galM*) és arabitól-dehidrogenáz (*araI*) mutánsokkal már bizonyítható volt az *A. nidulans*-ban.

Mindhárom mutáció befolyásolja a D-galaktóz hasznosítás sebességét. A legnagyobb gátló hatás $\Delta galE$ 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 ($\Delta galM$) 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 mutarotáz-hiánymutánsok 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-arabinózt és együtt D-galaktózt, L-arabinózt 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-arabinózzal 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-arabinózra történő áttöltés után volt megfigyelhető. Ezzel ellentétben a galaktokináz (*galE*) és az *araA1* gén kifejeződésére úgy tűnik, hogy mindkét szénhidrát hatással volt, az L-arabinóz 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-arabinóz metabolizmusában, mivel a Leloir útvonal első lépésében az alfa-D-galaktopiranozid C1 pozíciójú 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-arabinóz által generált hiperindukciója fiziológiailag aberránsnak tűnik, mivel a gén deléciónak 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 közben

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 expresszázódtak, 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.

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 ($\Delta galM$) and L-arabitol dehydrogenase (*araAI*) mutants in *A. nidulans*.

All three mutations had effects on the consumption of D-galactose, $\Delta galE$ 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 ($\Delta galE$) 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 ($\Delta galM$) is more similar to that of the L-arabitol dehydrogenase null mutant, far less restricted than the galactokinase deletion. 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

1. **Alam, M. K. & Kaminskyj, S. G. W.** (2013). *Aspergillus* galactose metabolism is more complex than that of *Saccharomyces*: the story of GalD^{GAL7} and GalE^{GAL1}. *Botany* **91**, 467–477.
2. **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.
3. **Beebe, J. A. & Frey, P. A.** (1998). Galactose mutarotase: Purification, characterization, and investigations of two important histidine residues. *Biochemistry* **37**, 14989–14997.
4. **Beebe, J. A., Arabshahi, A., Clifton, J. G., Ringe, D., Petsko, G. A. & Frey, P. A.** (2003). Galactose mutarotase: pH dependence of enzymatic mutarotation. *Biochemistry* **42**, 4414-4420.
5. **Bentley, R. & Bhate, D. S.** (1960a). Mutarotase from *Penicillium notatum*. I. Purification, assay, and general properties of the enzyme. *J Biol Chem* **235**, 1219–1224.
6. **Bentley, R. & Bhate, D. S.** (1960b). Mutarotase from *Penicillium notatum*. II. The mechanism of the mutarotation reaction. *J Biol Chem* **235**, 1225–1233.
7. **Boschloo, J. G., & Roberts, C. F.** (1979). D-Galactose requiring mutants in *Aspergillus nidulans* lacking phosphoglucomutase. *FEBS Lett* **104**, 17-20.
8. **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.

9. **Brahma, A., & Bhattacharyya, D.** (2004). UDP-galactose 4-epimerase from *Kluyveromyces fragilis*: Evidence for independent mutarotation site. *Eur J Biochem* **271**, 58-68.
10. **Bunker, R. D., Bulloch, E. M., Dickson, J. M., Loomes, K. M., & Baker, E. N.** (2013). Structure and function of human xylulokinase, an enzyme with important roles in carbohydrate metabolism. *J Biol Chem* **288**, 1643-1652.
11. **Campbell, A. K., Waud, J. P., & Matthews, S. B.** (2005). The molecular basis of lactose intolerance. *Sci Prog*, **88**, 157-202.
12. **Cerqueira, G. C., Arnaud, M. B., Inglis, D. O., Skrzypek, M. S., Binkley, G., Simison, M., ... & Wymore, F.** (2013). The Aspergillus Genome Database: multispecies curation and incorporation of RNA-Seq data to improve structural gene annotations. *Nucleic Acids Res* **42**, D705-D710.
13. **Chiang, C., & Knight, S. G.** (1961). L-Arabinose metabolism by cell-free extracts of *Penicillium chrysogenum*. *Biochim Biophys Acta* **46**, 271-278.
14. **Chittori, S., Simanshu, D. K., Savithri, H. S., & Murthy, M. R. N.** (2007). Structure of the putative mutarotase YeaD from *Salmonella typhimurium*: structural comparison with galactose mutarotases. *Acta Crystallogr D* **63**, 197-205.
15. **Clutterbuck, A. J.** (1972). Absence of laccase from yellow-spored mutants of *Aspergillus nidulans*. *Microbiology* **70**, 423-435.
16. **Clutterbuck, A. J.** (1981). An arabinose non-utilizing mutant *araA1*. *Asp Newslett* **15**, 6.

17. **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.
18. **Conway, L. P. & Voglmeir, J.** (2016). Functional analysis of anomeric sugar kinases. *Carbohydr Res* **432**, 23–30.
19. **Cove, D. J.** (1979). Genetic studies of nitrate assimilation in *Aspergillus nidulans*. *Biol Rev* **54**, 291-327.
20. **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.
21. **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.
22. **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.
23. **de Vries, R. P., Visser, J., & de Graaff, L. H.** (1999). CreA modulates the XlnR-induced expression on xylose of *Aspergillus niger* genes involved in xylan degradation. *Res Microbiol* **150**, 281-285.
24. **de Vries, R. P., Pařenicová, L., Hinz, S. W., Kester, H. C., Beldman, G., Benen, J. A., & Visser, J.** (2002). The β -1,4-endogalactanase A gene from *Aspergillus niger* is specifically induced on arabinose and galacturonic acid and plays an important role in the degradation of pectic hairy regions. *Eur J Biochem* **269**, 4985-4993.

25. **El-Ganiny, A. M., Sheoran, I., Sanders, D. A., & Kaminskyj, S. G.** (2010). *Aspergillus nidulans* UDP-glucose-4-epimerase UgeA has multiple roles in wall architecture, hyphal morphogenesis, and asexual development. *Fungal Genet Biol* **47**, 629-635.
26. **Elorza, M. V., & Arst, H. N.** (1971). Sorbose resistant mutants of *Aspergillus nidulans*. *Mol Gen Genet* **111**, 185-193.
27. **Erlanson, K. A., Delamarre, S. C., & Batt, C. A.** (2001). Genetic evidence for a defective xylan degradation pathway in *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microb* **67**, 1445-1452.
28. **Fantes, P. A., & Roberts, C. F.** (1973). β -Galactosidase Activity and Lactose Utilization in *Aspergillus nidulans*. *Microbiology* **77**, 471-486.
29. **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.
30. **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.
31. **Fekete, E., De Vries, R. P., Seiboth, B., VanKuyk, P. A., Sándor, E., Fekete, É., ... & Karaffa, L.** (2012). D-Galactose uptake is nonfunctional in the conidiospores of *Aspergillus niger*. *FEMS Microbiol Lett* **329**, 198-203.
32. **Fletcher, H. G.** (1940). Augustin-Pierre Dubrunfaut—An early sugar chemist. *J Chem Educ* **17**, 153.

33. **Flipphi, M. J., van Heuvel, M., van der Veen, P., Visser, J., & de Graaff, L. H.** (1993). Cloning and characterization of the *abfB* gene coding for the major α -L-arabinofuranosidase (ABF B) of *Aspergillus niger*. *Curr Genet* **24**, 525-532.
34. **Flipphi, M., van de Vondervoort, P. J., Ruijter, G. J., Visser, J., Arst, H. N., & Felenbok, B.** (2003). Onset of carbon catabolite repression in *Aspergillus nidulans* parallel involvement of hexokinase and glucokinase in sugar signaling. *J Biol Chem* **278**, 11849-11857.
35. **Flipphi, M., Sun, J., Robellet, X., Karaffa, L., Fekete, E., Zeng, A. P. & Kubicek, C. P.** (2009). Biodiversity and evolution of primary carbon metabolism in *Aspergillus nidulans* and other *Aspergillus* spp. *Fungal Genet Biol* **46**, S19-S44.
36. **Free, S. J.** (2013). Fungal cell wall organization and biosynthesis. *Adv Genet* **81**, 33-82.
37. **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.
38. **Graille, M., Baltaze, J. P., Leulliot, N., Liger, D., Quevillon-Cheruel, S., & van Tilbeurgh, H.** (2006). Structure-based functional annotation: Yeast *ymr099cp* codes for a D-hexose-6-phosphate mutarotase. *J Biol Chem* **281**, 30175-85.
39. **Grimshaw, C. E.** (1986). Direct measurement of the rate of ring opening of D-glucose by enzyme-catalyzed reduction. *Carbohydr Res* **148**, 345-348.
40. **Grossiord, B. P., Luesink, E. J., Vaughan, E. E., Arnaud, A. & de Vos, W. M.** (2003). Characterization, expression, and mutation of the

Lactococcus lactis galPMKTE genes, involved in galactose utilization via the Leloir pathway. *J Bacteriol* **185**, 870–878.

41. **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.
42. **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.
43. **Howard, S. M. & Heinrich, M. R.** (1965). The anomeric specificity of yeast galactokinase. *Arch Biochem Biophys* **110**, 395–400.
44. **Hucho, F. & Wallenfels, K.** (1971). The enzymatically catalyzed mutarotation. The mechanism of action of mutarotase (aldose 1-epimerase) from *Escherichia coli*. *Eur J Biochem* **23**, 489–496.
45. **Inagaki, K., Miwa, I. & Okuda, J.** (1982). Affinity purification and glucose specificity of aldose reductase from bovine lens. *Arch Biochem Biophys* **216**, 337–344.
46. **Isbell, H. S. & Frush H. L.** (1951). Mechanisms for the mutarotation and hydrolysis of the glycosylamines and the mutarotation of the sugars. *J Res Natl Bur Stand* **46**, 132–144.
47. **Johansen, A. G., Vegarud, G. E., & Skeie, S.** (2002). Seasonal and regional variation in the composition of whey from Norwegian Cheddar-type and Dutch-type cheeses. *Int Dairy J* **12**, 621-629.
48. **Käfer, E.** (1958). An 8-chromosome map of *Aspergillus nidulans*. *In Advances in Genetics* (Vol. 9, pp. 105-145). Academic Press.

49. **Katoh, K., & Standley, D. M.** (2013). MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol Biol Evol* **30**, 772-780.
50. **Katz, D., & Rosenberger, R. F.** (1970). The utilisation of galactose by an *Aspergillus nidulans* mutant lacking galactose phosphate-UDP glucose transferase and its relation to cell wall synthesis. *Arch Mikrobiol* **74**, 41-51.
51. **Keilin, D. & Hartree, E. F.** (1952a). Specificity of glucose oxidase (notatin). *Biochem J* **50**, 331-341.
52. **Keilin, D. & Hartree, E. F.** (1952b). Biological catalysis of mutarotation of glucose. *Biochem J* **50**, 341-348.
53. **Knoch, E., Dilokpimol, A., & Geshi, N.** (2014). Arabinogalactan proteins: focus on carbohydrate active enzymes. *Front Plant Sci*, **5**, 198.
54. **Kowalczyk, J. E., Gruben, B. S., Battaglia, E., Wiebenga, A., Majoor, E., & de Vries, R. P.** (2015). Genetic Interaction of *Aspergillus nidulans galR, xlnR* and *araR* in regulating D-Galactose and L-Arabinose release and catabolism gene expression. *PLoS One* **10**, e0143200.
55. **Kuorelahti, S., Jouhten, P., Maaheimo, H., Penttilä, M., & Richard, P.** (2006). L-galactonate dehydratase is part of the fungal path for D-galacturonic acid catabolism. *Mol Microbiol* **61**, 1060-1068.
56. **Li, S., Ha, S. J., Kim, H. J., Galazka, J. M., Cate, J. H. D., Jin, Y. S. & Zhao, H.** (2013). Investigation of the functional role of aldose 1-epimerase in engineered cellobiose utilization. *J Biotechnol* **168**, 1-6.
57. **Los, J. M., Simpson, L. B. & Wiesner, K.** (1956). The kinetics of mutarotation of D-glucose with consideration of an intermediate free-aldehyde form. *J Am Chem Soc* **78**, 1564-1568.

58. **Majumdar, S., Ghatak, J., Mukherji, S., Bhattacharjee, H. & Bhaduri, A.** (2004). UDPgalactose 4-epimerase from *Saccharomyces cerevisiae*. A bifunctional enzyme with aldose 1-epimerase activity. *Eur J Biochem* **271**, 753–759.
59. **Michalak, M., Thomassen, L. V., Roytio, H., Ouwehand, A. C., Meyer, A. S., & Mikkelsen, J. D.** (2012). Expression and characterization of an endo-1, 4- β -galactanase from *Emericella nidulans* in *Pichia pastoris* for enzymatic design of potentially prebiotic oligosaccharides from potato galactans. *Enzyme Microb Tech* **50**, 121-129.
60. **Mojzita, D., Koivistoinen, O. M., Maaheimo, H., Penttilä, M., Ruohonen, L., & Richard, P.** (2012). Identification of the galactitol dehydrogenase, LadB, that is part of the oxido-reductive D-galactose catabolic pathway in *Aspergillus niger*. *Fungal Genet Biol* **49**, 152-159.
61. **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.
62. **Nelson, J. M. & Beegle, F. M.** (1919). Mutarotation of glucose and fructose. *J Am Chem Soc* **41**, 559–575.
63. **Nidetzky, B., Mayr, P., Hadwiger, P. & Stütz, A. E.** (1999). Binding energy and specificity in the catalytic mechanism of yeast aldose reductases. *Biochem J* **344**, 101–107.
64. **Novelli, G., & Reichardt, J. K.** (2000). Molecular basis of disorders of human galactose metabolism: past, present, and future. *Mol Genet Metab* **71**, 62-65.

65. **Orosz, A., Fekete, E., Flippi, M., & Karaffa, L.** (2014). Metabolism of D-galactose is dispensable for the induction of the beta-galactosidase (*bgaD*) and lactose permease (*lacpA*) genes in *Aspergillus nidulans*. *FEMS Microbiol Lett* **359**, 19-25.
66. **Panesar, P. S., & Kennedy, J. F.** (2012). Biotechnological approaches for the value addition of whey. *Crit Rev Biotechnol* **32**, 327-348.
67. **Peterson, G. L.** (1983). Determination of total protein. *Methods Enzymol* **91**, 86–105.
68. **Pomin, V. H.** (2016). Phylogeny, structure, function, biosynthesis and evolution of sulfated galactose-containing glycans. *Int J Biol Macromol* **84**, 372-379.
69. **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.
70. **Roberts, C. F.** (1963). The genetic analysis of carbohydrate utilization in *Aspergillus nidulans*. *Microbiology* **31**, 45-58.
71. **Roberts, C. F.** (1970). Enzyme lesions in galactose non-utilising mutants of *Aspergillus nidulans*. *BBA-Gene Subjects* **201**, 267-283.
72. **Roelfsema, W. A., Kuster F. M. & Pluim H.** (1990). Lactose and derivatives. In: Elvers, B., Hawkins, S., Schulz, G. (eds): Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 4th ed. VCH Weinheim FRG, 107–114.
73. **Rombouts, F. M., Voragen, A. G. J., Searle-van Leeuwen, M. F., Geraeds, C. C. J. M., Schols, H. A., & Pilnik, W.** (1988). The arabinanases of *Aspergillus niger*—purification and characterisation of

two α -l-arabinofuranosidases and an endo-1, 5- α -l-arabinanase. *Carbohydr Polym* **9**, 25-47.

74. **Roper, J. A.** (1950). Search for linkage between genes determining a vitamin requirement. *Nature* **166**, 956.

75. **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.

76. **Salas, M., Vinuela, E., & Sols, A.** (1965). Spontaneous and enzymatically catalyzed anomerization of glucose 6-phosphate and anomeric specificity of related enzymes. *J Biol Chem* **240**, 561-568.

77. **Sambrook, J. & Russell, D. W.** (2001). *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 3rd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.

78. **Schray, K. J., Benkovic, S. J., Benkovic, P. A., & Rose, I. A.** (1973). Catalytic reactions of phosphoglucose isomerase with cyclic forms of glucose 6-phosphate and fructose 6-phosphate. *J Biol Chem* **248**, 2219-2224.

79. **Scott, A. & Timson, D. J.** (2007). Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* galactose mutarotase/UDP-galactose 4-epimerase protein, Gal10p. *FEMS Yeast Res* **7**, 366–371.

80. **Seiboth, B., Hofmann, G., & Kubicek, C.** (2002a). Lactose metabolism and cellulase production in *Hypocrea jecorina*: the *gal7* gene, encoding galactose-1-phosphate uridylyltransferase, is essential for growth on galactose but not for cellulase induction. *Mol Genet Genomics* **267**, 124-132.

81. **Seiboth, B., Karaffa, L., Sándor, E., & Kubicek, C. P.** (2002b). The *Hypocrea jecorina gal10* (uridine 5'-diphosphate-glucose 4-

epimerase-encoding) gene differs from yeast homologues in structure, genomic organization and expression. *Gene* **295**, 143-149.

82. **Seiboth, B., Hartl, L., Pail, M., Fekete, E., Karaffa, L., & Kubicek, C. P.** (2004). The galactokinase of *Hypocrea jecorina* is essential for cellulase induction by lactose but dispensable for growth on d-galactose. *Mol Microbiol* **51**, 1015-1025.

83. **Sellick, C. A., Campbell, R. N., & Reece, R. J.** (2008). Galactose metabolism in yeast—structure and regulation of the Leloir pathway enzymes and the genes encoding them. *Intl Rev Cel Mol Bio*, **269**, 111-150.

84. **Szumilo, T.** (1981). Purification and properties of D-galactonate dehydratase from *Mycobacterium butyricum*. *BBA-Enzymology* **661**, 240-246.

85. **Tamayo-Ramos, J. A., Flipphi, M., Pardo, E., Manzanares, P., & Orejas, M.** (2012). L-Rhamnose induction of *Aspergillus nidulans* α -L-rhamnosidase genes is glucose repressed via a CreA-independent mechanism acting at the level of inducer uptake. *Microb Cell Fact* **11**, 26.

86. **Tefsen, B., Lagendijk, E. L., Park, J., Akeroyd, M., Schachtschabel, D., Winkler, R., ... & Ram, A. F.** (2012). Fungal α -arabinofuranosidases of glycosyl hydrolase families 51 and 54 show a dual arabinofuranosyl- and galactofuranosyl-hydrolyzing activity. *Biol Chem*. **393**, 767-75.

87. **Timson, D. J., & Reece, R. J.** (2003). Identification and characterisation of human aldose 1-epimerase. *FEBS letters* **543**, 21-24.

88. **Timson, D. J.** (2016). The molecular basis of galactosemia—Past, present and future. *Gene* **589**, 133-141.

89. **Thoden, J. B. & Holden, H. M.** (2002). High resolution X-ray structure of galactose mutarotase from *Lactococcus lactis*. *J Biol Chem* **277**, 20854–20861.
90. **Thoden, J. B., Kim, J., Raushel, F. M. & Holden, H. M.** (2003). The catalytic mechanism of galactose mutarotase. *Protein Sci* **12**, 1051–1059.
91. **Thoden, J. B., Timson, D. J., Reece, R. J. & Holden, H. M.** (2004). Molecular structure of human galactose mutarotase. *J Biol Chem* **279**, 23431–23437.
92. **Thoden, J. B. & Holden, H. M.** (2005). The molecular architecture of galactose mutarotase/UDP-galactose 4-epimerase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **280**, 21900-21907.
93. **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.
94. **vd Veen, P., Flipphi, M. J., Voragen, A. G., & Visser, J.** (1991). Induction, purification and characterisation of arabinases produced by *Aspergillus niger*. *Arch Microbiol* **157**, 23-28.
95. **vd Veen, P., Flipphi, M. J., Voragen, A. G., & Visser, J.** (1993). Induction of extracellular arabinases on monomeric substrates in *Aspergillus niger*. *Arch Microbiol* **159**, 66-71.
96. **vanKuyk, P. A., de Groot, M. J., Ruijter, G. J., de Vries, R. P., & Visser, J.** (2001). The *Aspergillus niger* D-xylulose kinase gene is co-expressed with genes encoding arabinan degrading enzymes, and is essential for growth on D-xylose and L-arabinose. *Eur j biochem* **268**, 5414-5423.

97. **Van Overtveldt, S., Verhaeghe, T., Joosten, H. J., van den Bergh, T., Beerens, K. & Desmet, T.** (2015). A structural classification of carbohydrate epimerases: From mechanistic insights to practical applications. *Biotechnol Adv* **33**, 1814-1828.
98. **Wasylenko, T. M., Ahn, W. S., & Stephanopoulos, G.** (2015). The oxidative pentose phosphate pathway is the primary source of NADPH for lipid overproduction from glucose in *Yarrowia lipolytica*. *Metab Eng*, **30**, 27-39.
99. **Webb, E. C.** (1992). Enzyme nomenclature 1992. Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the Nomenclature and Classification of Enzymes (No. Ed. 6). Academic Press.
100. **Wertz, P. W., Gamer, J. C. & Anderson, L.** (1981). Anatomy of a complex mutarotation. Kinetics of tautomerization of a-D-galactopyranose and b-D-galactopyranose in water. *J Am Chem Soc* **103**, 3916–3922.
101. **Witteveen, C. F. B., Busink, R., Van de Vondervoort, P., Dijkema, C., Swart, K., & Visser, J.** (1989). L-Arabinose and D-xylose catabolism in *Aspergillus niger*. *Microbiology* **135**, 2163-2171.
102. **Wurster, B., & Hess, B.** (1972). Glucose-6-phosphate-1-epimerase from baker's yeast. A new enzyme. *FEBS Lett*, **23**, 341-344.
103. **Wurster, B., & Hess, B.** (1973). Enzyme-catalyzed anomerization of D-glucose-6-phosphate. *FEBS Lett* **38**, 33-36.
104. **Wurster, B., & Hess, B.** (1974). Anomeric specificity of enzymes of D-glucose metabolism. *FEBS Lett* **40**, S105-S111.
105. **Yu, J. H., Hamari, Z., Han, K. H., Seo, J. A., Reyes-Domínguez, Y. & Scazzocchio, C.** (2004). Double-joint PCR: a PCR-

based molecular tool for gene manipulations in filamentous fungi. *Fungal Genet Biol* **41**, 973–981.

10 TUDOMÁNYOS TEVÉKENYSÉG

Referált, angol nyelvű közlemények:

- 1 Németh Z, Kulcsár L, Flippi M, Orosz A, Aguilar-Pontes M V, de Vries R, Karaffa L, Fekete E (2019): L-Arabinose induces D-galactose catabolism via the Leloir pathway in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet. Biol.* 123,53-59
- 2 Kulcsár L, Flippi M, Jónás Á, Sándor E, Fekete E, Karaffa L (2017): Identification of a mutarotase gene involved in D-galactose utilization in *Aspergillus nidulans*. *FEMS Microbiol. Lett.* 364, 1-7
- 3 Fekete E, Orosz A, Kulcsár L, Kavalecz N, Flippi M, Karaffa L (2016): Characterization of a second physiologically relevant lactose permease gene (*lacpB*) in *Aspergillus nidulans*. *Microbiology* 162, 837-847
- 4 Somsák L, Bokor É, Czibere B, Czifrák K, Koppány Cs, Kulcsár L, Kun S, Szilágyi E, Tóth M, Docsa T, Gergely P (2014): Synthesis of C-xylopyranosyl- and xylopyranosylidene-spiro-heterocycles as potential inhibitors of glycogen phosphorylase. *Carbohydr. Res.* 399, 38-48

Idegen nyelvű poszterek:

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).

Konferencia előadás:

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).

11 KÖSZÖNYETNYÍLVÁNÍTÁS

Hálásan köszönöm témavezetőmnek **Dr. Karaffa Levente** tanszékvezető egyetemi docensnek és **Dr. Fekete Erzsébet** tanszékvezető-helyettes egyetemi docensnek, hogy munkámat állandó figyelemmel kísérték és segítségükre mindig számíthattam.

Köszönettel tartozom **Kovácsné Dr. Orosz Anita**, **Vasasné Dr. Jónás Ágota**, **Dr. Ág Norbert** volt PhD hallgatónak, illetve **Dr. Németh Zoltán** tanársegédnek, **Dr. Michel Flippi** és **Fekete Zoltán** tanszéki munkatársnak, a munkám során nyújtott hasznos tanácsaikért, és baráti támogatásukért. Köszönettel tartozom **Kun Roland Sándor**, **Kavalecz Napsugár**, **Fülöp Katalin Boglárka**, **Tamasik Dániel**, **Szatmári Enikő**, **Lipcsák Nikoletta** illetve **Sáfrány Daniella** biomérnök hallgatónak a közös munkájukért, illetve szeretném megköszönni a Biomérnöki Tanszék valamennyi tagjának a támogatást és a segítséget.

A doktori disszertációm az Emberi Erőforrások Minisztériuma Új Nemzeti Kiválóság Programjának támogatásával készült.

A kutatás a GINOP-2.3.2-15-2016-00008 számú projekt keretében, az Európai Unió támogatásával, az Európai Regionális Fejlesztési Alap társfinanszírozásával valósult meg.

Mindezekon felül hatalmas hálával tartozom szüleimnek, akik folyamatosan támogattak és bíztattak a tanulmányaim során. Köszönöm feleségem sok türelmét, szeretetét és segítségét.

12 FÜGGELÉK

12.1 A munkánk során alkalmazott oligonukleotidok.

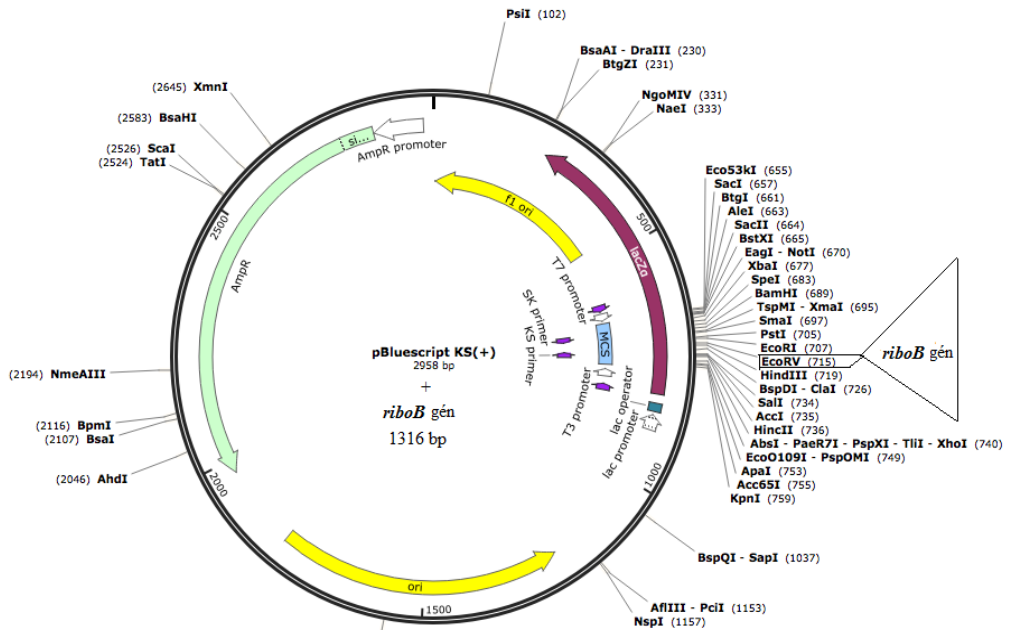
Gén azonosító	Oligonukleotid szekvencia (5' - 3')	Amp. mérete, bp	Hivatkozás	Alkalmazása
AN3184 (<i>galmA</i>)	AN3184fw: 5'- ACTGCTACATCTTCATTGGAG -3' AN3184rv: 5'- TCAAGGGTAATGCCAGTGTTTC -3'	985	Kulcsár és mtsai., 2017	Northern, Southern blot
AN3432 (<i>galmB</i>)	AN3432fw: 5'- GGTTTGGACGGCAGGAGTTTG -3' AN3432rv: 5'- CGTACCGACTGGGCTCAATGC -3'	700	Kulcsár és mtsai., 2017	Northern, Southern-blot
AN3184 (<i>galmA</i>)	P1galmA-fw: 5'- GGCTGAGATTGATGCGTTTC -3' P2galmA-rv: 5'- CGGTTGAGCCGTTTCAGGTACAGT ACATAC TCCAATGAAGATGTAGCAG -3'	1024	Kulcsár és mtsai., 2017	<i>galmA</i> 5' célzókar
AN3184 (<i>galmA</i>)	P3galmA-fw: 5'- TATGGTCCTGACATATCTGGTGG ATCTCGA GACTGAGGGATGGATTG -3' P4galmA-rv: 5'- ATACACTTCTCAGCCTCCCAC -3'	1027	Kulcsár és mtsai., 2017	<i>galmA</i> 3' célzókar
AN3184 (<i>galmA</i>)	P7galmA-fw: 5'- AATGCGACCGAGTTTCTGGG -3' P8galmA-rv: 5'- TATCGCAATCAACACCACATCC-	3925	Kulcsár és mtsai., 2017	<i>galmA</i> deléciós kazetta

	3'			
AN3184 (<i>galmA</i>)	P1galmA-fw: 5'- GGCTGAGATTGATGCGTTTC -3' P4galmA-rv: 5'- ATACACTTCTCAGCCTCCCAC -3'	3161	Kulcsár és mtsai., 2017	<i>galmA</i> visszatranszfo rmálása hiánymutáns törzsbe
AN3432 (<i>galmB</i>)	P1galmB-fw: 5'- AACGGCTGAACGCTTACAATG -3' P2galmB-rv: 5'- ACCATAGTAATCCAGCATCTTGA TGTTCCGG CGGAGATTG-3	866	Kulcsár és mtsai., 2017	<i>galmB</i> 5' célzókar
AN3432 (<i>galmB</i>)	P3galmB-fw: 5'- TTCATTATGTAGACACTCGGAAG GGAGA GAAGTATGGAAG-3' P4galmB-rv: 5'- AGATGTCGATGGTGGAGTAAG -3'	998	Kulcsár és mtsai., 2017	<i>galmB</i> 3' célzókar
AN3432 (<i>galmB</i>)	P7galmB-fw: 5'- GCACGGATTCCGGATGATAAG-3' P8galmB-rv: 5'- GAAGGTGAAGAAGGATGTTTGG- 3'	3424	Kulcsár és mtsai., 2017	<i>galmB</i> deléciós kazetta
AN3432 (<i>galmB</i>)	P1galmB-fw: 5'- AACGGCTGAACGCTTACAATG -3' P4galmB-rv: 5'- AGATGTCGATGGTGGAGTAAG -3'	2943	Kulcsár és mtsai., 2017	<i>galmB</i> visszatranszfo rmálása hiánymutáns törzsbe
<i>pyr4</i> (<i>T. reesei</i>)	P5pyr4-fw: 5'- ATGTACTGTACCTGAACCG -3'	2278	Kulcsár és	<i>galmA</i> szelektációs

	P6pyr4-rv: 5'- AGATCCACCAGATATGTCAG -3'		mtsai., 2017	génje
<i>pyroA</i> (<i>A. fumigates</i>)	P5pyroA-AFU-fw: 5'- GATGCTGGATTACTATGGT -3' P6pyroA-AFU-rv: 5'- CGAGTGTCTACATATTGAA -3'	1727	Kulcsár és mtsai., 2017	<i>galmB</i> szelekciós génje
AN0942 (<i>araA</i> or <i>ladA</i>)	AN0942_F: AAGAGGTGAAGAGTGGTGAAAG AN0942_R: ATCTCATTCTTGCCGACTCC	876	Németh és mtsai., 2018	Northern blot
AN3432 (<i>galmB</i>)	AN3432_F: AGAACGGTGTTCATCAATAAC AN3432_R : CATACTTCTCTCCCTTCTTC	850	Németh és mtsai., 2018	Northern blot
AN4957 (<i>galE</i>)	AN4957_F: TTCCTCCTGGTGGTGGTATC AN4957_R: ATGTTCTCCTGCCTTGCCTGCG	895	Németh és mtsai., 2018	Northern blot
AN8790 (<i>xkiA</i>)	AN8790_F: CTGAAGACGGAGGCATCGAC AN8790_R: ACGCCTCCTTCTGATAGCCG	897	Németh és mtsai., 2018	Northern blot
AN4957 (<i>galE</i>)	galE_5flank_Fw: CGGGGAGAGAGTAGCAAAGTC galE_5flank_Rv: CAGCATCGGGTAAACTGAGACTG ACGGTG	933	Németh és mtsai., 2018	<i>galE</i> 5' célzókar
AN4957 (<i>galE</i>)	galE_3flank_Fw: TTCATTATGTAGACTCGGCGG CGAGCGGAAAATGATA galE_3flank_Rv:	966	Németh és mtsai., 2018	<i>galE</i> 3' célzókar

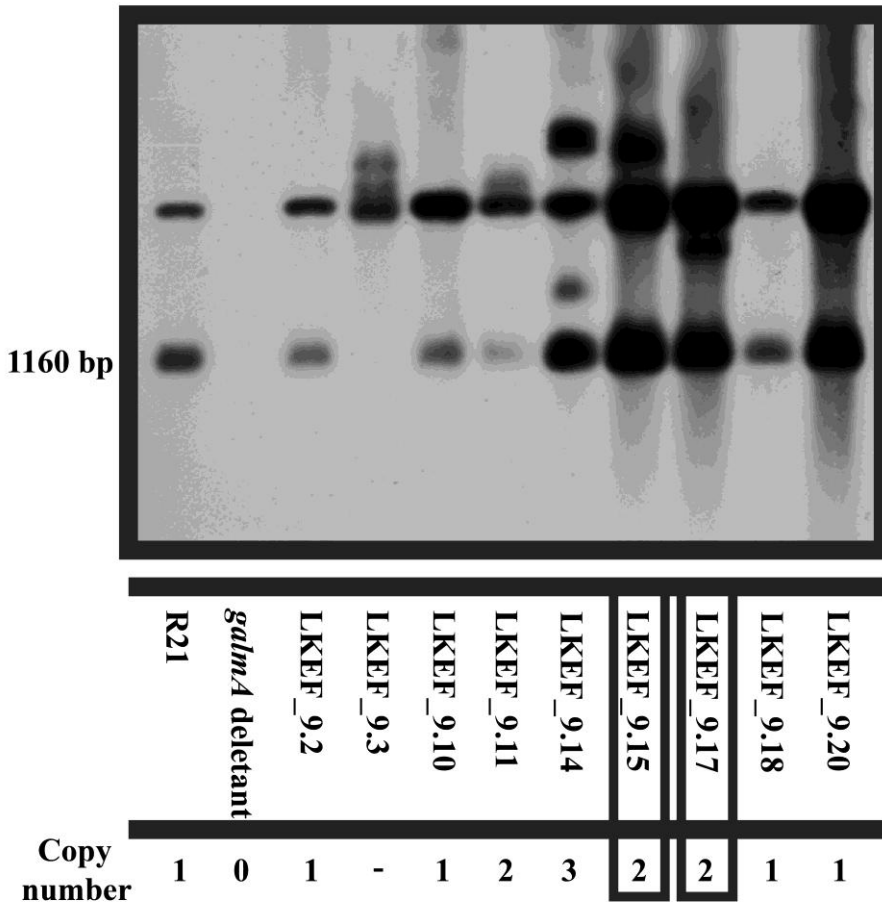
	GAAAGCAACGACACGCAATCTA CATC			
<i>pyroA</i> (<i>A. fumigatus</i>)	pyroA_AFU_Fw: GATGCTGGATTACTATGGT pyroA_AFU_Rv: CGAGTGTCTACATATTGAA	1727	Németh és mtsai., 2018	<i>galE</i> szelekciós génje
AN4957 (<i>galE</i>)	Nested_AN4957_Fw: GAAAATGAACGCCCGATGAT Nested_AN4957_Rv: GCCACTGAAGAACTCCCA	3558	Németh és mtsai., 2018	<i>galE</i> deléziós kazetta

12.2 A pTN2 plazmid vektor felépítése

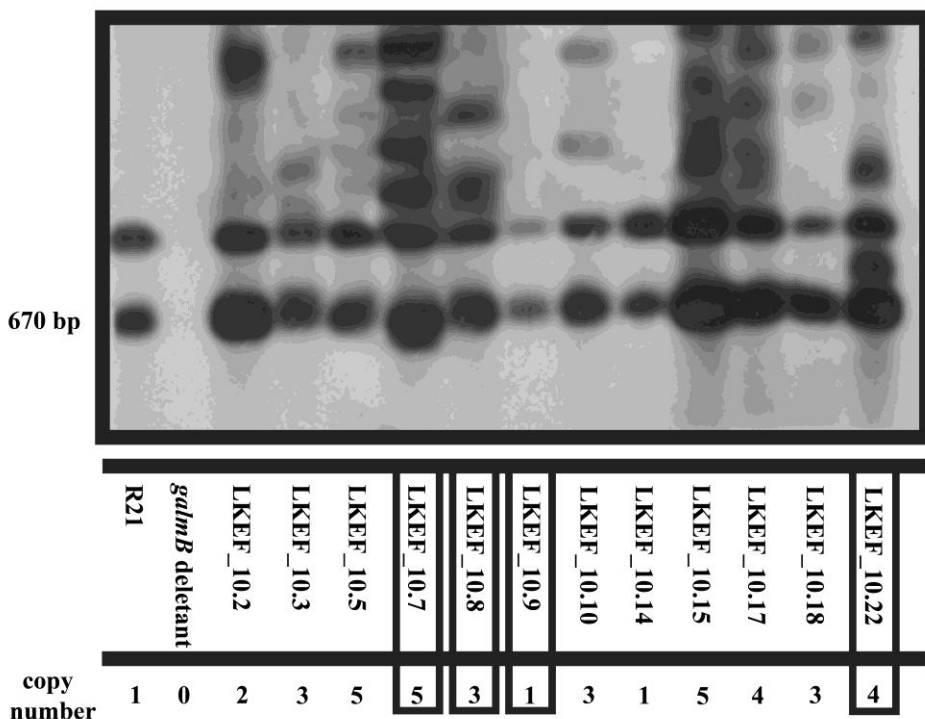


19. ábra A pTN2 plazmid vektor felépítése, amely a pBluescript KS plazmid és az *Aspergillus fumigatus* *riboB* génjéből áll.

12.3 *galmA* és *galmB* túltermelő törzsek kópiaszámainak meghatározása



20. ábra Néhány *galmA* visszatranszformált törzs *galmA* gén kópiaszámának meghatározása Southern-blot analízissel. A tisztított genomi DNS-eket *Cla*I restriktációs enzimmal emésztettük. Az R21 referencia törzs és az LKEF_9.2, LKEF_9.10, LKEF_9.18 törzsek 1 kópiában, az LKEF_9.11, LKEF_9.15, LKEF_9.17 törzs 2 kópiában, az LKEF_9.14 *galmA* törzs 3 kópiában tartalmazzák a *galmA* gén. A *galmA* hiánytörzs (LKEF_002) nem tartalmazza a funkcionális *galmA* gént.



21. ábra Néhány *galM* visszatranszformált törzs *galM* gén kópiaszámának meghatározása Southern-blot analízissel. A tisztított genomi DNS-eket *Sal*I restrikciós enzimmel emésztettük. Az R21 referencia törzs és az LKEF_10.9, az LKEF_10.14 törzs 1-kópiában, az LKEF_10.2 törzs 2-kópiában, az LKEF_10.3, az LKEF_10.8, az LKEF_10.10, az LKEF_10.18 törzs 3-kópiában, az LKEF_10.17, az LKEF_10.22 törzs 4-kópiában, az LKEF_10.5, az LKEF_10.7 és az LKEF_10.15 törzs 5 kópiában tartalmazzák a *galM* gén. A *galM* hiánytörzs (LKEF_008) nem tartalmazta a funkcionális *galM* gént.