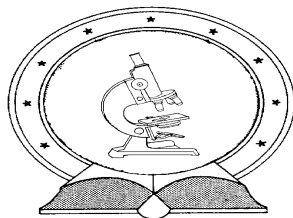


**DE TTK**



**1949**

**A Velvet komplexet felépítő fehérjék szerepe az  
*Aspergillus nidulans* és a *Trichoderma reesei*  
gombafajok metabolit termelésében**

Egyetemi doktori (PhD) értekezés

**Németh Zoltán**

Témavezető: **Dr. Fekete Erzsébet**

egyetemi docens

Debreceni Egyetem

Természettudományi Doktori Tanács

Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola

Debrecen, 2017

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.

Nyilatkozom arról, hogy a tézisekben leírt eredmények nem képezik más PhD disszertáció részét.

Debrecen, 2017. június 21.

-----  
Németh Zoltán

Tanúsítom, hogy **Németh Zoltán** doktorjelölt 2017. február – 2017. május között a **Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola Biológia** programjának keretében irányítással végezte munkáját. Az értekezésben foglalt eredményekhez a jelölt önálló alkotó tevékenységével meghatározóan hozzájárult. Nyilatkozom továbbá arról, hogy a tézisekben leírt eredmények nem képezik más PhD disszertáció részét.

Az értekezés elfogadását javasolom.

Debrecen, 2017. június 21.

-----  
Dr. Fekete Erzsébet

**A Velvet komplexet felépítő fehérjék szerepe az *Aspergillus nidulans* és a *Trichoderma reesei* gombafajok metabolit termelésében**

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében

a Biológia tudományágban

Írta: Németh Zoltán okleveles biomérnök

Készült a Debreceni Egyetem Juhász-Nagy Pál Doktori Iskolája (biológia programja) keretében

Témavezető: Dr. Fekete Erzsébet

A doktori komplex vizsga bizottság:

elnök: Prof. Dr. Sipiczki Mátyás

tagok: Prof. Dr. Bíró Sándor

Dr. Domonkos Dávid

Dr. Hamari Zsuzsanna

A komplex vizsga időpontja: 2017. február 27.

Az értekezés bírálói:

Dr.....

Dr. ....

A bírálóbizottság:

elnök: Dr. ....

tagok: Dr. ....

Dr. ....

Dr. ....

Dr. ....

Dr. ....

Dr. ....

Az értekezés védésének időpontja: 2017.

# Tartalomjegyzék

1. Bevezetés.....	1
2. Irodalmi áttekintés .....	4
2.1. Szekunder metabolitok bioszintézisének szabályozása.....	4
2.2. A Velvet komplexet felépítő proteinek funkciója a fonalas gombákban .....	8
2.2.1. Velvet doménnel rendelkező proteinek .....	9
2.2.2. Feltételezett SAM-függő metiltranszferáz, LaeA .....	14
2.3. <i>Trichoderma reesei</i> extracelluláris enzimtermelése.....	16
2.4. Az <i>Aspergillus nidulans</i> által termelt sterigmatocisztin .....	18
3. Célkitűzések .....	22
4. Anyagok és módszerek .....	26
4.1. Felhasznált <i>Aspergillus nidulans</i> és <i>Trichoderma reesei</i> törzsek.....	26
4.2. Törzsfenntartás .....	29
4.3. Tenyésztési körülmények.....	30
4.3.1. <i>Aspergillus nidulans</i> .....	30
4.3.2. <i>Trichoderma reesei</i> .....	31
4.3.3. Kemosztát feremntációk.....	33
4.4. Analitikai módszerek .....	34
4.5. Morfológiai vizsgálat .....	38
4.6. Szexuális és aszexuális spóráképzés vizsgálata.....	38
4.7. Bioinformatikai elemzés .....	39
5. Eredmények.....	40
5.1. <i>Trichoderma reesei</i> VEL1 funkciójának vizsgálata: a VEL1 hatása a gomba egyedfejlődésére és celluláz enzimtermelésére .....	40
5.2. A <i>Trichoderma reesei</i> LAE1 funkciójának vizsgálata konstans növekedési rátákon .....	54

5.3. Sterigmatocisztin képződésének vizsgálata vad típusú <i>veA</i> gént horodzó <i>A. nidulans</i> süllyesztett tenyészetében .....	61
6. Eredmények megbeszélése .....	72
6.1. A <i>Trichoderma reesei</i> VEL1 proteinjének hatása az egyedfejlődésre és extracelluláris enzimtermelésre .....	72
6.2. A <i>Trichoderma reesei</i> LAE1 funkciója konstans növekedési rátákon	76
6.3. <i>Aspergillus nidulans</i> sterigmatocisztin termelésének növekedési ráta függése. ....	80
7. Összefoglalás .....	84
8. Summary .....	88
10. Irodalmi hivatkozások.....	92
11. Tudományos tevékenység .....	108
12. Köszönetnyilvánítás .....	111
13. Függelék.....	113

# 1. Bevezetés

A valódi gombák legnagyobb fajsámú rendszertani egységét, melybe az összes gombafaj mintegy 30 %-a tartozik Ascomycota (tömlősgombák) törzsnek nevezzük. Az Ascomycota gombák a növényekhez hasonlóan helyhez kötött élőlények, és így az őket fogyasztó élőlények elleni harcban és az élőhelyért folytatott versenyben a hihetetlenül változatos metabolizmusukkal, primer- és szekunder metabolitokkal, valamint extracelluláris enzimek termelésével juthatnak előnyökhöz. A fonalas gombák által előállított szekunder metabolitok egy tekintélyes része biotechnológiai jelentőséggel bír, de egyes metabolitok károsak is lehetnek humán szervezet számára. A hasznos vegyületek között találunk antibakteriális (pl. penicillin), antifungális (pl. caspofungin), rákellenes (pl. taxol), immunszuppresszív (pl. ciklosporin), koleszterinszint csökkentő (pl. lovastatin) hatásúakat is (Newman és Cragg, 2012). Azonban káros metabolitokat is előállíthatnak a gombák, melyek leginkább az *Aspergillus*ok, *Penicillium*ok és *Fusarium* genus fajaitól származtathatóak, de legismertebbek az egyes *Aspergillus*-ok által termelt aflatoxinok. A fonalas gombákat nem csak a szekunder metabolit termelésük okán hasznosítják az iparban, hanem a primer anyagcseréjükhöz köthető termékeik élelmiszeripari adalékanyagok is lehetnek (pl. citromsav, glükonsav, Berovic és Legisa, 2007; Singh és Kumar, 2009). Továbbá egyes fonalas gombák extracelluláris enzimek kiválasztásában jeleskednek, melyet szintén az élelmiszeripar (pl. amilázok, lakkázok), de a papíripar és bioüzemanyag gyártók is hasznosíthatnak (cellulázok, hemicellulázok). Ezeknek a metabolitoknak a bioszintézisét komplex molekuláris szabályozási mechanizmusok irányítják. Az előállításukhoz szükséges enzimeket kódoló gének kifejeződését az eukarióta élőlényekben, így a gombákban is, több regulátor fehérje akár együtt, de külön-külön is szabályozhatják.

A globális regulátorok általában a környezeti ingerek hatását közvetítve befolyásolják a gének kifejeződését, melyek a fonalas gombák egyedfejlődésére és metabolitjainak bioszintézisére is kiterjednek. A munkám célkitűzése, hogy egy globális regulátor, a Velvet komplexet alkotó proteinek szerepeit megismerjük a fonalas gombák metabolit termelése vonatkozásában. A dolgozatomban két iparilag is jelentős fonalas gombát tanulmányozok, a *Trichoderma reesei*-t és az *Aspergillus nidulans*-t. A *T. reesei* az extracelluláris cellulázok és hemicellulázok termeléséről ismert, melyet a papír- és bioüzemanyag gyártók alkalmaznak a növényi lignocellulóz degradálására. Az *A. nidulans* a fonalas gombák modellszervezetként ismert, a biokémiai és genetikai kutatások során előszeretettel tanulmányozott faj. Az ipari fermentációs eljárások során is (részben a jól ismert genomja miatt) alkalmazzák az antifungális echinokandin B előállításához, valamint az antibakteriális béta-laktám penicillin bioszintézisének tanulmányozására. Az *A. nidulans*-t heterológ gazdaszervezetként a koleszterin szint csökkentő lovasztatin és az immunszuppresszív mikofenolsav termeltetésének molekuláris mechanizmusainak kutatásában is alkalmazhatják. Ezeknek a metabolitoknak a képződésével összefüggő regulációs mechanizmusok alapkutatásai jelentős mértékben hozzájárulhatnak gazdaságilag hasznot hozó biotechnológiai eljárások fejlesztéséhez.

Kutatásaink során a fény által befolyásolt Velvet komplex globális regulátort felépítő proteineket vizsgáltuk, mely konzervált az Ascomycetes-ekben (Ni és Yu, 2007). A Velvet komplex a sejtmagban jön létre a VeA, VelB és LaeA (*A. nidulans* nomenklatúra szerint) proteinek kapcsolódásával és a fonalas gombák egyedfejlődését és a szekunder metabolitok képződését befolyásolják. Az *A. nidulans* által termelt és ebben a fajban leggyakrabban vizsgált szekunder metabolit a sterigmatocisztin (továbbiakban: ST)

képződését pozitívan regulálja a Velvet komplex, hiszen a komplexet felépítő proteinek kódoló gének hiányában a mikotoxin képződés megszűnik (Bayram és mtsai, 2008a). *T. reesei* esetében a Velvet komplexet felépítő fehérjék közül eddig csak a *laeA* ortológ *lae1* gén szerepét vizsgálták, melynek funkciója esszenciális a celluláz és hemicelluláz enzimek termelésében (Seiboth és mtsai., 2012b). A munkánk során a *veA* ortológ *vell* gént és annak termékét, a VEL1 protein hatását vizsgáltuk a cellulázokat kódoló gének kifejeződésében és a *T. reesei* egyedfejlődésében betöltött szerepében. A LAE1 protein funkcióját konstans növekedési ráták mellett vizsgáltuk, mert a gén hiánya megváltoztatja a fonalas gomba növekedési sebességét. A regulációs mutánsok vizsgálata során kevés figyelmet kap az adott gomba megváltozott növekedési sebessége annak ellenére, hogy a mikroba növekedési rátája bizonyíthatóan hatással van a metabolitok termelésére. Ezt figyelembe véve vizsgáltuk meg a vad típusú *veA* gént hordozó *A. nidulans* által termelt ST képződését különböző növekedési ráta alkalmazásával.

A dolgozatban látszólag két, egymáshoz nem kapcsolódó folyamatot vizsgálunk, mint az *A. nidulans* ST képződése és a *T. reesei* celluláz termelése, de e két jelenség szabályozása és indukálódásának körülményei nagy hasonlóságot mutatnak. A konzerváltságuk ellenére azonban a Velvet komplexet felépítő fehérjékhez kapcsolható funkciók egyáltalán nem általános érvényűek a fonalas gombák körében, így a filogenetikailag távol álló törzsekben eltérő lehet a két folyamat szabályozása.



## 2. Irodalmi áttekintés

### 2.1. Szekunder metabolitok bioszintézisének szabályozása

A gombák szekunder metabolizmusáért felelős gének általában génklaszterekben helyezkednek el, amelyek a klasztereken belüli vagy az azokhoz közeli transzkripció faktorok által kooperatíván szabályozottak (Bayram és Braus 2011). Vannak érdekes kivételek, például az *Aspergillus nidulans* meroterpenoid, ausztinol és dehidroausztinol bioszintézise kettő olyan génklasztert is igényel, amelyek különböző kromoszómákon lokalizálódnak (Lo és mtsai., 2012). Az eddig azonosított, legtöbb szekunder metabolit génklaszter ún. alap géneket tartalmaznak, mint például a poliketid szintázok (PKS) és a nem-riboszómális peptid szintetázok (NRPS) génjei (Umema és mtsai., 2015). Ezek az enzimek a szekunder metabolit alapvázát hozzák létre, míg a génklaszterben jelen levő többi gén által kódolt enzimek a váz módosításáért, transzportjukért, termelésükért, azok szabályozásáért felelnek. A PKS és az NRPS enzimek egyszerű malonilt (PKS) és aminosavat (NRPS) vagy ezek származékait használják, mint alapegységeket az adott szekunder metabolit vázszerkezetének szintetizálásához. Ezek a multimoduláris enzimek figyelemre méltó hasonlóságokat mutatnak szerkezetükben és a termékek szintetizálásának mechanizmusában annak ellenére is, hogy szubsztrátjaik jelentősen különböznek. Ritkán, de előfordul azonban, hogy a szekunder metabolit szintéziséhez nincs szükség PKS vagy NRPS enzimekre, ilyen például a *Fusarium fujikuroi* gibberellin szintézise (Bomke és Tudzynski 2009).

A szekunder metabolit génklaszterekben levő gének transzkripciójának szabályozása jellemzően együtt történik (Yu és Keller 2005). A génklaszterek kifejeződését vagy annak represszióját komplex szabályozási hálózat irányítja, melyekben útvonal specifikus transzkripció faktorok, globális fehérjék, fehérje komplexek és hiszton módosulásokat előidéző regulátorok

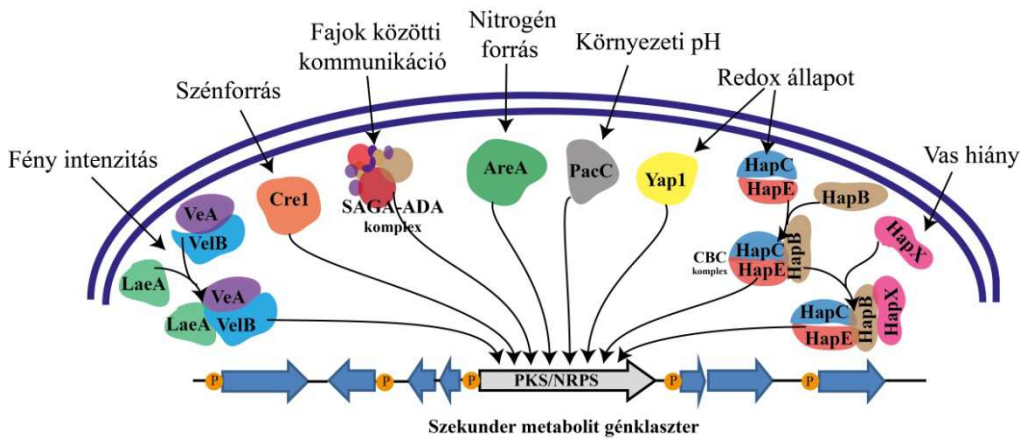
vesznek részt (Palmer és Keller 2010). A génklaszterek szabályozásának legalsó szintje a bioszintetikus útvonalra specifikus transzkripciós faktorok, melyek maguk is a génklaszterben kódoltak. Ezek szekvencia specifikus DNS kötő fehérjék, melyek a struktúrgének promóteréhez kötődve aktiválják a gén átírását. Számos szekunder metabolit termeléséért felelős génklaszterben egyetlen gén kódol transzkripciós faktort. Például a glikotoxin bioszintézis gének egy 13 gént tartalmazó génklaszterben foglalnak helyet, amelyek a GilZ szabályozása alatt állnak. Az ST bioszintézis génklaszter 25 gént tartalmaz köztük kettő (*aflR* és *aflS*) útvonal specifikus transzkripciós faktorral is, melyek közül az *aflR*-ről tudjuk, hogy a klaszterben levő összes struktúrgén aktivációjához szükséges (Yin és Keller 2011; Georgianna és Payne 2009). Vannak azonban olyan génklaszterek is, amelyek nem tartalmaznak útvonal-specifikus szabályzó gént. Ilyen pl. a  $\beta$ -laktám bioszintézis génklasztere, amely a penicillin és a cefalosporin termeléséért felelős (Brakhage 2013).

Az útvonal-specifikus regulátorok mellett - vagy némely esetben azok helyett - a globális transzkripciós faktoroknak köszönhetően számos szekunder metabolit indukálódik válaszul bizonyos környezeti ingerekre. Ugyanakkor a globális szabályozó protein komplexek részt vesznek a gombák egyedfejlődésének folyamatában is alátámasztva azt a megfigyelést, hogy a szekunder metabolitok termelése és a gomba egyedfejlődése között kapcsolat van (Sarıkaya-Bayram és mtsai., 2015). Ezek a környezeti hatások lehetnek a fény, a tápanyag ellátottság, a pH, a CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> aránya, a redox állapot vagy a vas hiánya (1. ábra). A globálisan ható transzkripciós faktorokat kódoló gének egy génklaszterhez sem tartoznak és a róluk átíródott regulátorok aktiválhatják, vagy akár represszálhatják is a szekunder metabolitok képződését. Például az *A. nidulans* PacC fehérjéje a környezet lúgos pH-ja esetén aktiválja a penicillin bioszintézis géneket (*palD*, *acvA*,

*ipnA*, Then Bergh és Brakhage 1998; Espeso és Penalva 1996; Tilburn és mtsai., 1995), míg az ST bioszintézis géneknek negatív regulátora (Keller és mtsai., 1997). A 3 proteiből álló (HapB, HapC, HapE) CBC komplex feladata a fiziológiai szignálok összegzése, és ezáltal a gomba redox állapotról és az esetleges vas hiányával kapcsolatos jelekre adó válasz adása (Brakhage 2013; Hortschansky és mtsai., 2007). Számos szekunder metabolit génklaszter szabályozására hatással van a gomba számára elérhető szén- és nitrogénforrás. Az AreA globális regulátor a nitrogén derepresszió mediátora, melynek hiányában a *F. fujikuroi* gibberellinsav bioszintézise és az ehhez szükséges gének expressziója nagyrészt megszűnik (Tudzynski és mtsai., 1999; Mihlan és mtsai., 2003). A gombák heterotróf életmódjából adódik, hogy a legfontosabb tápanyag számukra az elérhető szénforrás. Így fonalas gombáknak is a túlélés kulcsa, hogy sikeresen versenyezzenek más mikroorganizmusokkal az elérhető, limitált forrásokért a környezetben. Az élővilágban elterjedt szabályozási körfolyamat a karbon katabolit represszió, melynek során a magas tápanyagértékű szénforrások asszimilációja preferált (Görke és Stülke 2008; Deutscher 2008; Gancedo 1998; Ronne 1995). Azoknak a géneknek a transzkripciója gátlódik, melyek nem szükségesek a preferált szénforrás hasznosításához. A karbon katabolit represszióért felelős globális regulátor a CreA az *A. nidulans*-ban, *T.reesei*-ben ennek ortológja a Cre1. A *creA* gén egy C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> típusú cink-ujj fehérjét kódol, mely egy 5'-SYGGRG-3' konszenzus motívumhoz kötődve fejt ki repressziós hatását (Kulmburg és mtsai., 1993; Cubero és Scazzocchio 1994). A CreA transzkripciós szabályozó által kifejtett karbon katabolit represszió széleskörű a fonalas gombákban (Bailey és Arst 1975). Az olyan szénforrások, melyek karbon katabolit repressziót váltanak ki alacsonyabb antibiotikum hozamúak, mint a nem represszáló szénforrású táptalajok. Ez különösen igaz a β-laktám antibiotikumokra, melyeket évtizedekig a derepresszáló laktózt tartalmazó

tápközegben termeltették. Manapság viszont a derepressziót a tenyészet lassú növekedésének beállításával érik el, mely akár könnyen hasznosítható szénforrás alkalmazásával is történhet (Elander 2003).

Még nem tisztázott, hogy a globális regulátorok az útvonal specifikus regulátorokon keresztül, vagy közvetlenül a bioszintézisben résztvevő gének transzkripcióját szabályozzák (Brakhage 2013). A gombák esetében az egyik legfontosabb környezeti szignál a fény, mely által kiváltott szabályozási mechanizmusokat a Velvet doménnel rendelkező fehérjecsalád tagjai irányítják (Sarikaya-Bayram és mtsai., 2010).



**1. ábra. A globális regulátor proteinek befolyásolják a szekunder metabolit génklaszterek szabályozását a gombákban.** A környezeti szignálok hatással vannak a különböző szekunder metabolit génklaszterek szabályozására a környezeti hatás által kiváltott folyamat regulátorai által. A szekunder metabolit génklaszter tartalmaz egy központi gént, mely kódolhat poliketid szintázt (PKS), nem-riboszómális peptid szintázt (NRPS) vagy hibrid PKS-NRPS enzimet (Brakhage 2013, 3. ábrája alapján).

A szekunder metabolit génklaszterek szabályozásnak egy harmadik szintje a kromatin módosításokkal történő szabályozási mód, mely az epigenetikai szabályozás egyik módja (Strauss és Reyes-Dominguez 2011). A kromatinnak az elsődleges fehérjekomponensei a hiszton fehérjék, melyek

körülveszik a DNS-t. A hiszton fehérjéken különböző módosulások történhetnek, lehet például metiláció, foszforiláció vagy acetiláció (Shilatifard 2006). A különböző hiszton módosulások a szekunder metabolit génklaszter szabályozását is befolyásolhatják (Bok és Keller 2004; Nutzmann és mtsai., 2011; Strauss és Reyes-Dominguez 2011).

A szekunder metabolitok képződésének szabályozását a gombákban gyakran a gomba növekedése és differenciálódása is koordinálja (Zhang és mtsai., 2016). A gombák vegetatív növekedésük során primer anyagcserét folytatnak, mely energiát biztosít nekik a későbbi fejlődési szakaszokban. Az aszexuális és a szexuális spóráképzés is biomasszát és energiát igényel, melyeket a vegetatív növekedés során akumulálnak. A tápanyag limitáció mind az aszexuális, mind a szexuális szaporító képletek formálásával és a szekunder metabolitok képződésével járhat együtt, melynek magyarázata az lehet, hogy a gomba így védi meg a reprodukciós anyagait a versenytársakkal szemben. Ezen felül a szekunder metabolitok segítik a gombákat a tápanyagok beszerzésében, védekezésében és a környezettel való kommunikációban is (Braus és mtsai., 2010; Bayram és mtsai., 2010; Rodriguez-Romero és mtsai., 2010).

## **2.2. A Velvet komplexet felépítő proteinek funkciója a fonalas gombákban**

A fény globális környezeti jelként meghatározza az élőlények életmódját a Földön, mely a gombák esetén kihat a növekedésükre, reprodukciójuk módjára vagy a sporulációs rátájukra (Bayram és mtsai., 2010; Corrochano 2011; Rodriguez-Romero és mtsai., 2010). A Velvet komplex szabályozásának befolyásoló környezeti ingere a fény. A fehérjekomplexet felépítő 3 proteinből (VeA, VelB és LaeA; *A. nidulans* nomenklatura szerint) a VeA és a VelB egy úgynevezett Velvet doménnel rendelkeznek, melynek 200 aminosavból álló szekvenciájának nincs

szignifikáns hasonlósága más eddig ismert fehérje doménnel. A VeA és VelB a feltételezett metiltranszferáz LaeA-val kapcsolódva alkotják a heterotrimer Velvet komplexet, melynek a fényel összefüggő feltétele, hogy a VeA-VelB komplex a sejtmagba transzportálódjon (Stinnett és mtsai., 2007). A komplex központi fehérjéje a VeA, melyhez az N-terminális részénél kapcsolódik a VelB-vel és a C-terminálison a LaeA-val. Ez a heterotrimer komplex fontos szerepet játszik a fonalas gombák egyedfejlődésében, a szekunder metabolitok termelésében és egyes gombák esetén a patogenitásban is (Bayram és mtsai., 2008a).

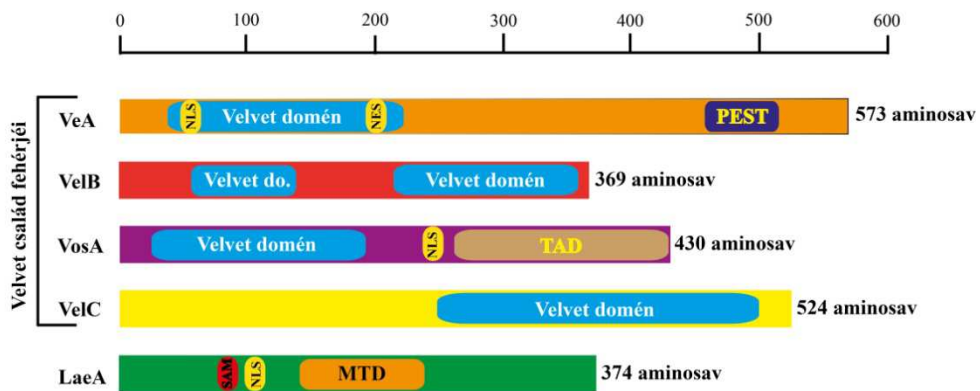
### **2.2.1. Velvet doménnel rendelkező proteinek**

A Velvet család proteinjei konzerváltak a Bazidiomycetes-ekben és az Ascomycetes-ekben (Ni és Yu, 2007), de nincsenek jelen a *S. cerevisiae*-ben vagy a *Candida albicans*-ban, melyekben egyébként szekunder metabolit génklaszter sem található (Bayram és Braus, 2011; Ni és Yu 2007). A genom szekvenálás és a reverz genetikai módszerek segítségével eddig négy velvet doménnel rendelkező fehérjét azonosítottak, a VeA-t, VelB-t, VosA-t és VelC-t (Bayram és Braus 2011) (2. ábra).

#### **VeA**

Az első velvet-doménnel rendelkező fehérjét *A. nidulans*-ban írták le, melyet VeA-nak neveztek el. Az *A. nidulans* laboratóriumi törzsek nagy része egy pontmutációt hordozott a VeA fehérjét kódoló gén start kodonjában, melyet megkülönböztetve a vad típusú *veA* géntől *veA1*-nek jelölnék. Etta Kaefer már 1965-ben felhívta a figyelmet arra, hogy az *A. nidulans* törzsgyűjtemény jelentős része morfológiai mutánsokat tartalmaz, melyek konidiospóra képzésre hajlamosak fény jelenlétében (Kaefer 1965). Később derült ki, hogy a mutációnak köszönhetően a VeA fehérjéről hiányzik az első 37 aminosav az N-terminális régióról, mely a sejtmag lokalizációs

szignált tartalmazza (Kim és mtsai., 2002). Ezek a törzsek több aszexuális spórát képeznek, míg a szexuális fejlődésük retardált és csökkent mértékű az ép VeA fehérjével rendelkezőkhöz képest. A VeA fehérje C-terminális részén van egy PEST szekvencia motívum (a PEST szekvenciák prolint (P), glutaminsavat (E), szerint (S) és treonint (T) tartalmazzak), mely arra utal, hogy ezek a fehérjék érzékenyek a degradációra, általában rövid féléletidejűek (Rogers és mtsai., 1986).



**2. ábra Velvet doménnal rendelkező proteinek és a LaeA protein szerkezete *A. nidulans*-ban.** NLS (sejtmag lokalizációs szignál), NES (nukleáris export szignál), PEST (prolin (P) glutaminsav (E) szerin (S) treonin (T) gazdag szekvencia), SAM (S-adenozil metionin-kötő hely), TAD (transzkripció aktivációs domén). (Bayram és Braus 2011, 2. ábrája alapján)

A Velvet doménnal rendelkező VeA fehérje fontos szerepet játszik a gomba fényfüggő differenciálódásának koordinálásban és a szekunder metabolitok termelésben. Az *A. nidulans* és általában a fonalas gombák szexuális és aszexuális egyedfejlődését a fény, mint környezeti inger befolyásolja. *A. nidulans* esetén sötétben a szexuális szaporodás termékei az aszkospórák, míg fény jelenlétében az aszexuális vegetatív spórák képzése a jellemző (Yager 1992, Stinnett és mtsai., 2007). A VeA fehérjének globális reguláló hatását *A. nidulans* modellszervezetben írták le először, melyben a

*veA* gén deléciója megszüntette az ST produkciót, képtelen volt az aszkospórákat tartalmazó kleisztotéciumok képzésére, viszont hiperkonidiációt figyeltek meg (Kim és mtsai., 2002; Kato és mtsai., 2003). A *veA* overexpressziójának hatására konstitutívan jönnek létre a kleisztotéciumok, függetlenül a fény hatásától (Kim és mtsai., 2002; Kato és mtsai., 2003; Bayram és mtsai., 2008a). Ezt követően más gazdaságilag, vagy a humán egészségügyben fontos fonalas gombák esetén is megvizsgálták a fehérje szerepét. A *veA* gén deléciója az aflatoxinokat termelő *A. parasiticus*-ban és *A. flavus*-ban megszüntette a szekunder metabolitok és azok prekursorainak előállítását, a túlélő képlet (szklerócium) formálását, viszont ellentétben az *A. nidulans*-ban megfigyeltekkel, csökkentette a konidiospóra képződést (Calvo és mtsai., 2004; Duran és mtsai., 2007). A *veA* gén ortológjainak fontos szerepe van a növénypatogén gombák (pl. *Fusarium fujikuroi*, *F. graminearum* és *F. verticillioides*) toxintermelésében, *P. chrysogenum*-ban és *Acremonium chrysogenum*-ban a  $\beta$ -laktám antibiotikumok produkciójában, valamint minden megvizsgált fonalas gomba esetében valamilyen fejlődési rendellenességet figyeltek meg (Merhej és mtsai., 2012; Myung és mtsai., 2009; Wiemann és mtsai., 2010, Dreyer és mtsai., 2007; Hoff és mtsai., 2010). A VeA fehérje a sejtmagba jutva tudja reguláló mechanizmusát érvényesíteni. A fehérje N-terminális részén levő NLS (Nuclear Localization Signal) doménje kapcsolódik az  $\alpha$ -importin KapA fehérjével, melynek segítségével transzportálódik a sejtmagba (Stinnett és mtsai., 2007; Araujo-Bazan és mtsai., 2009). A VeA kapcsolódhat fény jelenlétében a vörös fény receptor fitokróm FphA fehérjével a citoplazmában, melynek hatására a VeA sejtmagba való transzportja gátlódik, így a szexuális fejlődés és a mikotoxin bioszintézis represszálódik. A kék fény érzékeny fehérjék, a LreA és az LreB a sejtmagban lokalizálódnak, de csak az FphA-val asszociált VeA-val tudnak komplexet alkotni. Az FphA protein



elsősorban a citoplazmában lokalizálódik, de kisebb részt a sejtmagban is megtalálható, ahol az FphA-VeA-LreA-LreB fénykomplex létrejötte az aszexuális/szexuális egyedfejlődést koordinálják. (Purschwitz és mtsai., 2008).

A VeA központi szabályozó funkcióját betöltő szerepét és a nagy affinitását a metiltranszferázokhoz erősíti, hogy a LaeA-n kívül 3 további feltételezett metiltranszferázzal képes kapcsolódni, az LlmF (**L**aeA-like **m**ethyltransferase **F**), VipC (**V**elvet **i**nteraction **p**rotein **C**) és VapB-vel (**V**ipC associated **p**rotein **B**; Palmer és mtsai., 2013, Sarikaya-Bayram és mtsai., 2014). Az LlmF a VeA-val kapcsolódva befolyásolja a VeA arányát a sejtmagban és a citoplazmában. Az LlmF hiányában a VeA a sejtmagban lokalizálódik és megnöveli az ST produkciót és a szexuális fejlődést. A túltermeltetésének eredménye a VeA citoplazmában való akkumulálódása, mely így csökkenti a szexuális fejlődést és az ST termelést *A. nidulans*-ban (Palmer és mtsai., 2013). A VipC-VapB heterodimer VeA-val kapcsolódva megakadályozza annak sejtmagba való belépését, mellyel negatívan regulálja a szexuális, míg pozitívan az aszexuális egyedfejlődést. Tehát a VipC-VapB jelenléte csökkenti a VelB-VeA-LaeA Velvet komplex dúsulását a sejtmagban (Sarikaya Bayram és mtsai., 2014).

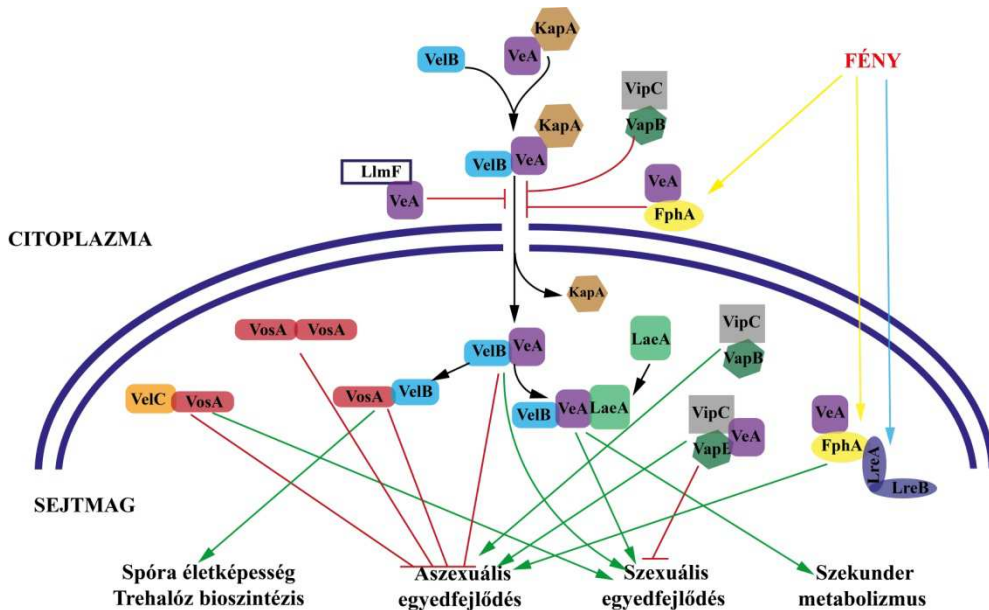
### **További Velvet domén fehérjék: VelB, VosA, VelC**

A VelB volt a második Velvet domén fehérje melyet leírtak (Bayram és mtsai., 2008a). A VelB nem tartalmaz NLS szekvenciát, a sejtmagba való bejutása a VeA-KapA-komplexhez való kapcsolódásával történhet. A sejtmagban a KapA leválik a komplexről és a VeA-VelB komplex indukálja a szexuális fejlődést a gombában. A *velB* deléciójának eredménye hasonló a *veA* deléciójához: képtelen termőtestek képzésére sötétben, az aszexuális spóráképzés mértéke és az ST produkciója is lecsökken, bár ezek nem olyan

mértékűek, mint ami a *veA* deléciójakor tapasztalható (Bayram és mtsai., 2008a).

A Velvet doménal rendelkező VosA fehérje szükséges mind az aszexuális mind a szexuális spóráképzéshez és a trehalóz előállításához, melynek hiányában csökken a spórák életképessége (Ni és Yu, 2007).

A Velvet fehérje család tagjai közül a VelC az eddig legkevésbé tanulmányozott protein. A VelC-t eredetileg úgy írták le, mint a pozitív regulátora a szexuális fejlődésnek, hasonlóan a *veA* és *velB*-hez a *velC* gén deléciója csökkentette a kleisztotéciumok számát és növelte a konidiospóra képzést *A. nidulan*-ban (Park és mtsai., 2014).



**3. ábra A Velvet család proteinjeinek, a LaeA és az ezekhez kapcsolódó más proteinek kölcsönhatása az *A. nidulans* modellszervezetben.** Velvet domén családjának fehérjéi: VeA, VelB, VosA, VelC; metiltranszferázok: LaeA, LlmF, VipC, VapB; vörös fény receptor: FphA; kék fény receptorok: LreA, LreB; VeA nukleáris transzportjért felelős protein: KapA. (Calvo és Carry 2015, 1. ábrája alapján)

A Velvet domén fehérjéi képesek komplexet alkotni egymással és más proteinekkal is, különböző homo- és heterodimereket vagy

heterotrimereket alkotva (3. ábra). A VelB a VeA-n kívül a VosA fehérjével alkot heterodimert, melynek a trehalóz előállításán keresztül a spórák életképességében van szerepe. A *vosA* és a *velB* deléciójának eredményeként a spórák toleranciája az oxidatív illetve hőstresszre lecsökken *A. nidulans*-ban. (Sarıkaya Bayram és mtsai., 2010). A VelB tehát két heterodimer komplex tagjaként mind a szexuális mind az aszexuális gombafejlődéshez hozzájárul (Park és mtsai., 2012b). A VelB-VelB homodimer is létrejöhet *in vivo* és *in vitro*, habár ennek a funkciója és céljai még ismeretlenek (Sarıkaya Bayram és mtsai., 2010). A VosA alkot homodimert vagy heterodimert a VelB-n kívül a VelC-vel is, mely represszálja az aszexuális fejlődést (Ahmed és mtsai., 2013; Park és mtsai., 2012b; Sarıkaya-Bayram és mtsai., 2010).

### **2.2.2. Feltételezett SAM-függő metiltranszferáz, LaeA**

A *laeA*-t (loss of **a**flR **e**xpression **A**) eredetileg *A. nidulans*-ban azonosították olyan mutánsokat keresve, melyek képtelenek ST prekurzorok előállítására (Butchko és mtsai., 1999; Bok és Keller, 2004). A *laeA* gén hiányában a mutánsok elvesztették *aflR* expressziós képességüket, mely az ST génklaszter specifikus transzkripciós faktora. További vizsgálatok során úgy azonosították a LaeA-t, mint egy feltételezett SAM-függő metiltranszferázt (Bok és Keller, 2004). A LaeA a szekunder metabolit génklaszterek mintegy felének szabályozásában részt vesz az *A. nidulans*-ban, *A. fumigatus*-ban és *A. flavus*-ban (Bok és Keller, 2004; Bok és mtsai., 2005, 2006; Perrin és mtsai., 2007; Kale és mtsai., 2008; Georgianna és mtsai., 2010). Továbbá a *laeA* ortológjai más fajokban pozitívan hatnak az aflatoxin, sterigmatocisztin, terrekinon, lovasztatin, penicillin, gliotoxin, fumonizinek és gibberellinek termelésére (Baba és mtsai., 2012; Bok és Keller 2004; Bouhired és mtsai., 2007; Kale és mtsai., 2008; Seiboth és mtsai., 2012b; Wiemann és mtsai., 2010; Wu és mtsai., 2012). A *laeA* deléciója eredményeként a virulencia

csökkenését tapasztalták *A. fumigatus*-ban (Bok és mtsai., 2005), a növény patogén gombák közül az *A. flavus*-ban (Kale és mtsai., 2008; Amaike és Keller, 2009), *Cochliobolus heterostrophus*-ban (Wu és mtsai., 2012) és számos *Fusarium* fajban (Wiemann és mtsai., 2010; Butchko és mtsai., 2012; Lopez-Berges és mtsai., 2013). A *laeA* hiánymutánsok esetén az aszexuális sporuláció mértéke csökken vagy teljesen hiányzik *A. nidulans*, *A. fumigatus* (Bok és mtsai., 2005), *T. reesei* (Seiboth és mtsai., 2012b), *P. chrysogenum* (Hoff és mtsai., 2010), *A. flavus* (Kale és mtsai., 2008) és *F. fujikuroi* (Wiemann és mtsai., 2010) esetén. Érdekesség, hogy a szekunder metabolitokon kívül az extracelluláris hidrolázok termelésében jeleskedő *T. reesei* LaeA ortológja, a LAE1 szabályozza a cellulázokat és hemicellulázokat kódoló gének expresszióját (Seiboth és mtsai., 2012b). A legtöbb kutatás azt sugallja, hogy a fonalas gombákban a LaeA-nak integráló szerepe van az szekunder metabolit termelés közvetítése és a gomba szexuális/aszexuális egyedfejlődése között (Bayram és mtsai., 2008a). A LaeA metiltranszferáz doménje révén és a szekunder metabolit génklaszterek génexpressziós vizsgálatai eredményeképpen számos kutatócsoport azt feltételezte, hogy a LaeA a szekunder metabolit génklaszterekre epigenetikai szabályozással, a kromatin módosítással van hatással. A LaeA valószínűsíthető epigenetikai szintű hatását a Reyes-Dominguez és mtsai. (2010) tanulmánya írta le, amelyben bemutatták, hogy a LaeA hiányában a heterokromatin megnövekedett represszív hiszton 3 (H3) lizin 9 (K9) trimetilációt (H3K9me3) tartalmazott az ST génklaszterben (Reyes-Dominguez és mtsai., 2010). A tanulmányokban azonban nincs közvetlenül bizonyítva a LaeA általi hiszton módosítás és így az epigenetikai szintű szabályozása sem. Jelentős erőfeszítések történtek a hipotézis bizonyítására, de a jelenlegi biokémiai módszerekkel eddig sem *in vivo* sem *in vitro* nem sikerült (Patananan és mtsai., 2013). A kérdést tovább bonyolítja, hogy míg a

*lae1* expressziójának manipulálása *T. reesei*-ben drámai hatással van a cellulázok és hemicellulázok expressziójára, az ezeket kódoló gének régióiban nem változott a H3K4 vagy a H3K9 metiláltsága (Seiboth és mtsai., 2012b). A szekunder metabolit produkció mellett a LaeA hatással van a gomba egyedfejlődésére azáltal, hogy szabályozza az expresszióját és posztranszlációs módosítását a Velvet család fehérjék közül a VeA, VelB és VosA-nak (Sarıkaya Bayram és mtsai., 2010). A Velvet család proteinjének szintje megemelkedik LaeA hiányában és a VeA egy ismeretlen posztranszlációs módosításon megy keresztül, mely drasztikusan lecsökkenti a Hülle-sejtek képződését és kisszámú kleisztotéciumot eredményez (Sarıkaya Bayram és mtsai., 2010; Shaaban és mtsai., 2010). Fény jelenlétében a LaeA csökkenti a VelB és VosA fehérjék szintjét, mely az aszexuális differenciálódást segíti, míg sötétben létrejövő Velvet komplex által a szexuális differenciálódást aktiválja.

### **2.3. *Trichoderma reesei* extracelluláris enzimtermelése**

A tömlősgombák Sordariomycetes osztályának tagja a *Trichoderma reesei* (anamorf *Hypocrea jecorina*), mely a celluláz és hemicelluláz enzimek ipari előállításának gyakran használt törzse (Kubicek 2012b). Ezek az extracelluláris enzimek a növényi lignocellulóz degradálását végzik oldható monomerekké, melyeket számos iparág hasznosíthat. A növényi sejtfa 60-80 %-át a cellulóz és hemicellulóz polimerek alkotják, melyek évről évre  $6-7,2 \times 10^{10}$  t mennyiségben jönnek létre (Gilbert 2010). A *Trichoderma* fajok mikoparazita képességeikről ismertek, melyek között a *T. reesei* egyedi faj abban a tekintetben, hogy az életben maradásért a genus tagjaitól eltérően, nem a versenytársak toxifikációjával, hanem a hatékony cellulózbontásával tud előnyhöz jutni (Druzhinina és mtsai., 2011). Nem meglepő, hogy e gazdaságilag jelentős törzs genom szekvenciája ismert (Martinez és mtsai., 2008) és számos, a celluláz enzimek kifejeződésének szabályozási

összefüggései részletesen tanulmányozottak. Ezeket az enzimeket kódoló gének klasztert alkotnak a genomban (Kubicek 2012a), melyben a szekunder metabolit bioszintézisére jellemző enzimeket kódoló gének is megtalálhatóak, mint a NRPS és PKS (Martinez és mtsai., 2008). A *T. reesei* cellulázait, hemicellulázait és más szénhidrát aktív enzimeit kódoló gének ötször gyakrabban fordulnak elő a génklaszterekben, mint más megvizsgált Ascomycetes genomban (Martinez és mtsai., 2008). A celluláz és hemicelluláz gének kifejeződésének fő aktiváló transzkripció faktor a XYR1 (Seiboth és mtsai., 2012a, Hakkinen és mtsai., 2012). A cellulóz, a cellobióz, a szoforóz és a laktóz szénforrások alkalmazásával lehet indukálni ezeknek az enzimeknek a termelését, de a laktóz az egyetlen gazdaságosan, ipari léptékben alkalmazható oldható szénforrás (Hakkinen és mtsai., 2012, Foreman és mtsai., 2003, Ries és mtsai., 2013, Ivanova és mtsai., 2013, Bischof és mtsai., 2013). A laktóz felhasználás *T. reesei*-ben független a kiválasztott cellulázoktól, metabolizmusa lassú, kisebb celluláz hozamot eredményez, mint a cellulóz (Seiboth és mtsai., 2007a). A cellulázok és a szekunder metabolitok termeléséért felelős gének szabályozása és indukálódásának körülményei hasonlóságot mutatnak (Ivanova és mtsai., 2013, Bischof és mtsai., 2013, Arvas és mtsai., 2011). Az *A. nidulans*-ban felfedezett LaeA regulátor felelős az ST útvonal specifikus *aflR* aktiváló transzkripció faktor kifejeződéséért és így a mikotoxin képződéséért. A *T. reesei*-ben a *laeA* ortológja a LAE1 irányítja a lignocellulóz degradálódásáért felelős gének, köztük a *xyl1* expresszióját is. Hasonlóan a szekunder metabolizmushoz, a LAE1 hiánya a sporulációs képesség megszűnésével vagy csökkenésével a celluláz enzimek termelésére is negatív hatással van (Seiboth és mtsai., 2012b). A *T. reesei* LAE1 protein túltermeltetésével kapott eredmények azt mutatják, hogy a 23 poliketid szintáz vagy nem riboszomális peptid szintáz közül csak 7-re hat pozitívan, melyből arra

következtethetünk, hogy a LAE1-nek nem a szekunder metabolitok regulációja a fő funkciója *T. reesei*-ben (Karimi-Aghchegh és mtsai., 2013). Továbbá a *T. reesei*-ben az extracelluláris hidrolitikus enzimek termeléséért felelős LAE1 globális regulátor hiányának következtében lassabb, míg túltermeltetve gyorsabb növekedést mutatottak a mutáns törzsek (Seiboth és mtsai., 2012b).

#### **2.4. Az *Aspergillus nidulans* által termelt sterigmatocisztin**

A szaprotróf életmódú *A. nidulans*-t elterjedten használják az eukarióta szervezetek biokémiai, genetikai kutatásaiban és a szekunder metabolitok összetett szabályozási mechanizmusainak vizsgálatára (Bok és mtsai., 2015). Az *A. nidulans* által termelt szekunder metabolitok 30 csoportba sorolhatóak, melyek közül a legismertebb az aflatoxin (AF) családba tartozó, poliketid típusú sterigmatocisztin (ST) mikotoxin, de termékei között detektáltak penicilline-t, emericelline-t, emericellamide A-F-t, emodin-t, shamixanthone-t, benzaldehide-t vagy orsellinic acid-ot és ezek származékait (Chiang és mtsai., 2010; Giles és mtsai., 2011; Marquez-Fernandez és mtsai., 2007; Sanchez és mtsai., 2010,2011). A legtöbb aflatoxint, mely a legismertebb és egyben legveszélyesebb mikotoxin család, az *Aspergillus* genus fajaiból izolálták (Rank és mtsai., 2011), de különösen az *A. flavus* és *A. parasiticus* fajokra jellemző. Az *A. parasiticus* és az *A. flavus* négy fő aflatoxinja: AFB1, AFB2, AFG1, AFG2 (Amaike és Keller 2011). Ezeket a vegyületeket Nagy-Britanniában a „Turkey X” nevezetű betegség kitörése után fedezték fel 1962-ben, mely az *A. flavus*-al fertőzött takarmányt fogyasztó pulykák pusztulását okozta (Bennett és Klich, 2003). Az aflatoxinok mutagének, akut és krónikus májkárosodást, cirrózist okozhatnak, tumort indukálhatnak és teratogének lehetnek emberben és magasabb rendű állatokban egyaránt (Wogan 1992). Ezek a gombák képesek megtelepedni gazdaságilag fontos haszonnövények termésein (pl.:

földimogyorón, gyapoton, kukoricán és az olajos magvakon) jellemzően a tárolásuk során, de jelentős a betakarítás előtti kártétel is. Az aflatoxin fertőzések nagy gazdasági károkat okoznak világszerte, a trópusi országokban akár éhínséghez is vezethetnek (Wilkinson és mtsai., 2004). Csak az Egyesült Államokban az aflatoxinokkal fertőzött termékek több száz millió dollár kárt okoznak évente (Wu 2004).

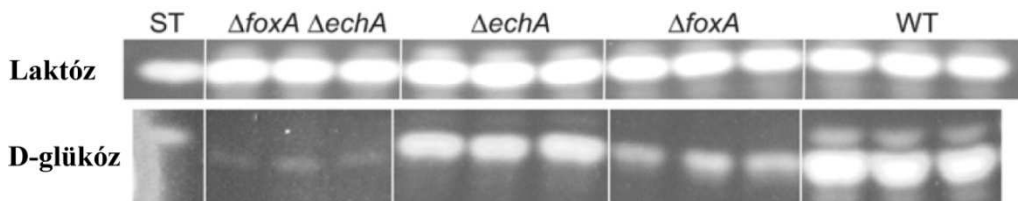
Az ST az AF bioszintézis útvonal utolsó előtti intermediere, mely az *A. nidulans*-ban a bioszintézisnek a végterméke (Barnes és mtsai, 1994). Az ST az AF-el ellentétben kevésbé karcinogén (Purchase és van der Watt 1970), így az AF bioszintézisének és annak szabályozásának megértésében az *A. nidulans* modellszervezet ST bioszintézise nyújthat segítséget. Az *A. nidulans*-ból hiányzik két gén, mely az ST AF-á való konverziójához szükséges (Amaike és Keller, 2011), de a többi, az ST bioszintézisében részt vevő gének nagyfokú homológiát mutatnak az AF bioszintetikus génekkel. Az AF és az ST a poliketid származékok furanokumarin csoportjába tartoznak (Hopwood és mtsai., 1990), melynek bioszintéziséhez legalább 18 enzimatis reakció szükséges. Az AF és az ST bioszintetikus génklaszter körülbelül 70 kb hosszúságú és a 3-as kromoszómán helyezkedik el. Ebben a génklaszterben 28 gén található, köztük az *aflR* és *aflS*, melyek útvonal specifikus transzkripciós aktivátorok. Az összes AF bioszintetikus gén promóterében található egy palindróm szekvencia, melyhez az *AflR* kötődni tud. Az *aflR* hiánymutáns képtelen az ST képzésére *A. nidulans*-ban (Fernandes és mtsai., 1998). Az AF és ST génklaszter globális regulátorok irányítása alatt van, mint a VeA, NsdD, NsdC és LaeA (Duran és mtsai., 2007; Kale és mtsai., 2008; Cary és mtsai., 2012). Az *A. nidulans* ST bioszintézisére negatív hatással van a megvilágítás, ahogyan a termőtestek képzésére is. Ez a hatás a Velvet komplex szabályozása alatt áll, de függ az elérhető D-glükóz koncentrációjától is (Atoui és mtsai., 2010). A D-glükóz



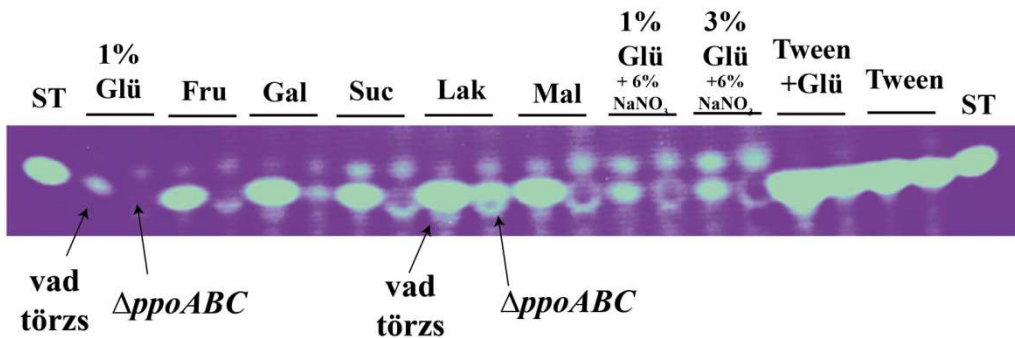
karbon katabolit repressziót kiváltó szénforrás, viszont nem tisztázott, hogy az ezt közvetítő CreA transzkripció faktor hogyan befolyásolja a mikotoxinok képződését (Hicks és mtsai., 2001). A CreA repressziós hatását *A. nidulans*-ban számos "represszálo" hexóz okozhatja, azok, amelyek felvételük során foszforilálódnak, de emellett a tenyészet növekedési rátája is befolyásolhatja (Bailey és Arst 1975; Strauss és mtsai., 1999; Ilyés és mtsai., 2004). A D-glükóz által kiváltott karbon katabolit represszió alacsony növekedési rátán megszűnik *A. nidulans* esetén, így arra lehet következtetni, hogy a növekedési ráta mértéke a kulcs a karbon katabolit represszióban (Ilyés és mtsai., 2004). A szekunder metabolitok bioszintézisét a CreA függő karbon katabolit represszió is szabályozza, melyet az elérhető cukrok különböző módon befolyásolnak (Kumar és mtsai., 2016; Aharonowitz és mtsai., 1992; Brakhage 1998; Espresso és Penalva 1992; Zhang és mtsai., 2016).

Az acetyl-CoA az alapvető építőeleme az összes fungális poliketid szerkezetű vegyületnek, mely a zsírsavak  $\beta$ -oxidációja, illetve a szénhidrátok glikolízise során képződik a sejtekben. Mind a peroxiszómális, mind a mitokondriális  $\beta$ -oxidációnak alapvető szerepe van a poliketid mikotoxinok produkciójában. A  $\beta$ -oxidáció gátlásával [amit a mitokondriális enoyl-CoA hidratáz (*echA*), illetve a peroxiszómális D-bifunkcionális fehérje homológ (*foxA*) dupla mutáns létrehozásával értek el], az ST szintézise *A. nidulans*-ban D-glükóz szénforráson leállt (Maggio-Hall és mtsai., 2005). Ez a dupla mutáns azonban laktóz diszacharidon növekedve a vad törzzsel összevethető mértékben termelték az ST-t (4. ábra; Maggio-Hall és mtsai., 2005). Az oxilipinek (hormonszerű lipofil molekulák, melyek sejten belül keletkező zsírsav származékok) az élelciklus lezajlásában játszanak szerepet, nevezetesen a szexuális és aszexuális egyedfejlődés közvetítésében és a sporulációban számos gombanemzetségben, köztük az *Aspergillus*-okban is

(Calvo és mtsai., 1999). Három konzervált zsírsav oxigenáz enzim szabályozza az oxilipinek képződést a gombákban, a PpoA, PpoB és PpoC. Az ezeket kódoló gének hiányában az *A. nidulans* ST termelésre képtelen, míg a penicillin antibiotikumot túltermeli (Tsitsigiannis és Keller 2006). Hasonló jelenséget lehetett tapasztalni a *ppoA-C* gének deléciójával mint a  $\beta$ -oxidációs mutánsokkal, a mutáns törzsek laktóz tartalmú minimál táptalajon a vad törzssel megegyező mértékben termelték az ST-t (5. ábra; Nancy P. Keller nem publikált adatai).



**4. ábra** A  $\beta$ -oxidációban mutáns *A. nidulans* törzsek laktóz tartalmú minimál táptalajon a vad törzssel megegyező mértékű ST termelésre képesek. ST: sterigmatocisztin standard;  $\Delta foxA$ : peroxisomális  $\beta$ -oxidációs mutáns;  $\Delta echA$ : enoil-CoA hidratáz mutáns; WT: vad törzs. (Maggio-Hall és mtsai., 2005 Figure 4 alapján)



**5. ábra** Az *A. nidulans* a *ppoA-C* gének hiányában a laktóz kivételével a legtöbb szénforráson képtelen ST termelésre. ST: sterigmatocisztin standard; Glü: glükóz; Fru: fruktóz; Gal: galaktóz; Suc: szacharóz; Lak: laktóz; Mal: maltóz. (Nancy P. Keller nem publikált adatai alapján).

### 3. Célkitűzések

Az elmúlt évtizedekben a bioinformatika és a molekuláris biológia fejlődésének köszönhetően a mikroorganizmusok genetikai kutatásai során számos olyan gént és génterméket sikerült leírni a kutatóknak, melyek azok életműködésében kulcsszerepet játszanak. Ilyen példa a fonalas gombákban konzervatív Velvet komplexet felépítő proteinek és azokat kódoló gének funkciójának megismerése. A kísérletek során létrehozott genetikai mutások fenotípus vizsgálatakor nehéz olyan tenyésztési körülményeket létrehozni, ahol az ezeket befolyásoló környezeti ingerek hatását külön-külön, vagy azokat kizárva lehet vizsgálni. Munkánk során egyik fő célkitűzésünk az volt, hogy meglévő fermentációs eszközeinkkel a genetikai mutások tenyésztésekor ezeket a környezeti hatásokat csökkentsük, vagy állandó értéken tartsuk. A Velvet komplexet felépítő fehérjék funkciójának így módon való vizsgálata akár új, eddig nem ismert szerepéről nyerhetünk információkat.

(1). A Velvet komplexet felépítő fehérjék közül az *A. nidulans* VeA proteinjének és ennek ortológjainak szerepéről tudunk a legtöbbet. Számos gazdaságilag és a humán egészségügyben érdekelt fonalas gomba esetén megvizsgálták a szerepét. Azonban összesen eddig két olyan tanulmány született, ahol a Velvet gén funkcióját valamilyen enzim szintézisével hozták összefüggésbe (Kamerewerd és mtsai., 2011; Duran és mtsai., 2014). A nagymennyiségű cellulázt és hemicellulázt szekretálni képes *T. reesei* Velvet génjének funkcióját az extracelluláris enzimtermelésre gyakorolt feltételezett hatásával kapcsolatban kívántuk megvizsgálni. Célul tűztük ki, hogy *vell* hiánymutásokat és a VEL1 proteint túltermelő mutásokat vizsgálunk meg, mind az aszexuális/szexuális spóráképzés képességük kapcsán, mind a celluláz gének kifejeződésének mértéke alapján.

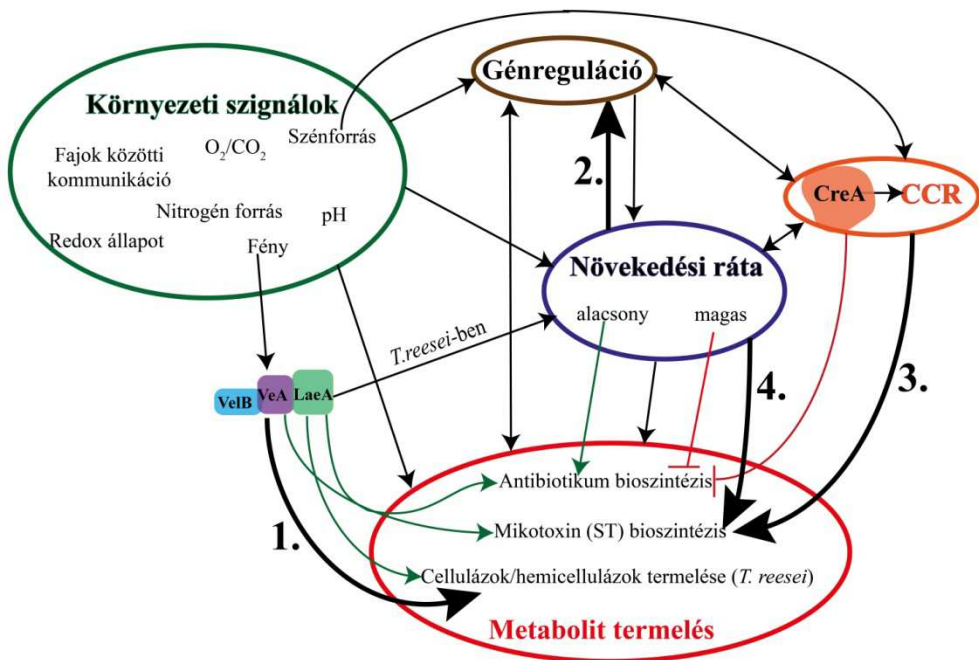
(2.) A *T. reesei* fonalas gomba kapcsán korábban leírták, hogy a Velvet komplexet felépítő LAE1 fehérje szükséges az extracelluláris celluláz és hemicelluláz enzimeknek az előállításához, melyet a *Δlae1* mutáns törzs tenyésztésével állapítottak meg. Viszont arra is figyelmesek lettek, hogy a gén hiánya megváltoztatta a tenyészet növekedésének sebességét (Seiboth és mtsai., 2012b). Erre alapozva tűztük ki célul, hogy megvizsgáljuk a *T. reesei* LAE1 fehérjének a funkcióját különböző konstans növekedési ráták alkalmazása mellett, melyeket kemosztát, folytonos fermentációval lehet kivitelezni. Kíváncsiak voltunk, hogy a LAE1 regulátor mely génekre hat, hogyan befolyásolja az egyes gének kifejeződését. Ez a kérdéskör a tenyészet steady-state állapotában vett mintákból és azokból kinyert totál RNS-ek microarray analízisével nyert expressziós mintázat elemzésével vizsgálható. Munkánk során a *lae1* hiánymutánst és a LAE1 fehérjét túltermelő mutánst kívántuk elemezni az azonos körülmények között növekedő szülői, QM 9414 törzs adatainak összehasonlításával.

(3.) Az *A. nidulans* laboratóriumi törzsek között gyakori genotípus a *veA* génnek egy pontmutációját hordozó *veAI* gén. Ennek eredménye, hogy a törzseknek laboratóriumi körülmények között a vegetatív konidiospóra képzése a kedvezményezett, mely megkönnyíti a genetikai munkát. Célul tűztük ki, hogy a *veAI* gént hordozó törzsek sterigmatocisztin termelő képességét összevessük a vad típusú *veA* gént hordozó törzsek produktivitásával. Ez pontos, reprodukálható HPLC-s módszer fejlesztését igényelte, így ellentétben a legtöbb közleménnyel, nem a törzsek összehasonlításán alapuló ST mennyiségeket, hanem egzakt értékeket kívántunk bemutatni.

(4.) Maggio-Hall és munkatársai (2005) tanulmányában közölt és Nancy P. Keller professzor asszony (Wisconsin, USA) nem publikált adataiból tudjuk, hogy a zsírsavak  $\beta$ -oxidációjában és az oxilipinek

bioszintézisében mutáns törzsek számos szénforráson tenyésztve képtelenek ST képzésére. Ez a jelenség laktóz szénforrást alkalmazva nem állt fenn, az ST termelésük a vad törzsével volt összevethető. Célul tűztük ki, hogy megvizsgáljuk szénforrásként laktózt tartalmazó tápoldatban az *A. nidulans* (*veA+*) sterigmatocisztin képződését. Feltételeztük, hogy a laktóz lassú katabolizmusa állhat a jelenség mögött, ezért egyrésztől karbon katabolit represszáló, másrésztől derepresszáló szénforrások alkalmazásával kívántuk megvizsgálni a termelést. A karbon katabolit represszió hatását különböző hígítási rátájú kemosztát folytonos tenyészetet alkalmazva lehet még tanulmányozni, mely során akár a repressziót kiváltó D-glükózt is használhatunk szénforrásként.

A dolgozat célkitűzéseit a 6. ábra szemlélteti grafikusán is, ahol a vastag nyilak jelölik azokat az összefüggéseket, melyre keressük a választ, míg a vékony nyilak a már ismert hatásokat mutatja.



**6. ábra A dolgozat célkitűzései, kérdései:** 1. A *T. reesei* Velvet génje által kódolt VEL1 protein milyen hatással van a cellulázokat/hemicellulázokat kódoló gének kifejeződésére és enzimtermelésére? 2. A *T. reesei laeA* ortológja a *LAEI* befolyásolja a tenyészet növekedési rátáját. Konstans magas, illetve alacsony növekedési ráta mellett hogyan változik meg a *T. reesei* génregulációja a *Δlae1* és *OELae1* törzseknél a QM 9414 törzshöz képest? 3. Számos szekunder metabolit képződése karbon katabolit represszió alatt áll gyorsan hasznosuló szénforráson való növekedés közben. Vajon a sterigmatocisztin mikotoxin képződése is e regulációs hatás alatt áll? 4. Hogyan befolyásolja az ST képződését a tenyészet gyors, illetve lassú növekedése?

## 4. Anyagok és módszerek

### 4.1. Felhasznált *Aspergillus nidulans* és *Trichoderma reesei* törzsek

A munkánk során felhasznált *Aspergillus nidulans* törzseket az 1. táblázat tartalmazza. Az RDIT 9.32, RDIT 2.3 és RJMP 155.55 jelzésű törzsek Nancy Keller professzor asszony (Wisconsin, USA), az R21 törzs Axel A. Brakhage professzor (Institut für Mikrobiologie, Universität Hannover) laboratóriumából származik. A V100-as jelzésű törzs Shroff és munkatársai által 1997-es tanulmányban leírt eredeti *creA14* mutáns törzsből keresztezéssel származó utódtörzs, mely M. Flippi nem publikált eredménye.

1. táblázat Munkánk során felhasznált *A. nidulans* törzsek

Törzs	Genotípus	Hivatkozás
RDIT 9.32	<i>veA+</i>	Tsitsigiannis és mtsai. (2004)
RDIT 2.3	<i>veA1</i>	Tsitsigiannis és mtsai. (2004)
R21	<i>yA2; pabaA1; veA1</i>	Fantes és Roberts (1973)
V100 <sup>a</sup>	<i>creA14; pantoB100; veA1</i>	Shroff és mtsai. (1997) <sup>b</sup>
RJMP 155.55	<i>riboB2; wA3, veA+</i>	Prof. Nancy P. Keller
ZNEF 8.55 <sup>c</sup>	<i>creA14; pantoB100; riboB2; wA3; veA+</i>	Németh és mtsai. (2016)

A táblázat jelzései: <sup>a</sup> Az eredeti *creA14* mutáns keresztezéséből származó utód törzs (M. Flippi, nem publikált eredménye); <sup>b</sup> Hivatkozás az eredeti mutánsra: Shroff és mtsai., 1997; <sup>c</sup> A V100-as és RJMP 155.55 jelzésű törzsek keresztezéséből származó utódtörzs. Az 1. táblázatban felsorolt és

félkövér betűvel jelölt fontosabb fenotípusok: **veA+**: vad típusú *veA* allélt tartalmazza; **veAI**: *veA* gén pontmutációja, mely 37 aminosavval rövidebb fehérjét eredményez (Han és mtsai., 2010); **creAΔ4**: CreA nullmutáns (Shroff és mtsai 1997).

Az általunk létrehozott mutánst ZNEF 8.55 (Zoltán Németh, Erzsébet Fekete) jelzéssel láttuk el, mely keresztezéssel lett előállítva a V100 jelzésű törzs (*creAΔ4*; *pantoB100*; *veAI*) és az RJPM 155.55 jelzésű törzs (*riboB2*; *wA3*, *veA+*) meiotikus rekombinációjával (Clutterbuck 1974). Az utódtörzsek *veA+ veAI* azonosítása PCR módszerrel történt, ahol a megfelelő primerpárok megválasztásával megkülönböztethető a vad típusú *veA* allél a *veAI* alléltól, melyben nonsense mutáció van (1. függelék, Han és mtsai., 2010). Az utódtörzsek *creAΔ4* genotípus azonosítását a megváltozott laktóz hasznosításon alapuló X-gal (5-bromo-4-kloro-3-indol-1-β-D-galaktóz) módszerrel teszteltük (Shroff és mtsai., 1997), ahol a tenyészet 1% D-glükózt tartalmazó táptalajon kék színnel jelzi a konstitutívan kifejeződő β-galaktozidáz enzimet.

A kísérleteink során felhasznált *Trichoderma reesei* mutáns törzseket az 2. táblázat tartalmazza, melyeket a Vienna University of Technology (Bécs, Ausztria) munkatársai hoztak létre.

A CPK 3793 (*Δlae1*) és CPK 4087 (*OElae1*) törzsek a Seiboth és munkatársai által 2012-ben közölt munka során lettek létrehozva. A *T. reesei* QM 9414 törzs *lae1* génje a *T. reesei pyr4*-re (orotidin 5'-foszfát dekarboxiláz gánje) lett kicserélve, míg a túltermelő törzseknek a *lae1* promóterét a *T. reesei* háztartási *tefl* (transzlációs elongációs faktor 1-α kódol) promóterével helyettesítették (Akel és mtsai., 2009).



## 2. táblázat A munkánk során felhasznált *T. reesei* törzsek

Törzs	Genotípus	Hivatkozás
QM 9414	<i>mat1-2</i>	Seidl és mtsai. (2009)
CBS 999.79	<i>mat1-1</i>	Seidl és mtsai. (2009)
CPK 3793	<i>Δ<i>lae1</i></i>	Seiboth és mtsai. (2012b)
CPK 4087	<i>OE<i>lae1</i></i>	Seiboth és mtsai. (2012b)
RKA 12	<i>OE<i>vell</i>; mat1-2</i>	Karimi-Aghcheh és mtsai. 2014
RKA 13	<i>OE<i>vell</i>; mat1-2</i>	Karimi-Aghcheh és mtsai. 2014
RKA 14	<i>Δ<i>vell</i>; mat1-2</i>	Karimi-Aghcheh és mtsai. 2014
RKA 17	<i>Δ<i>vell</i>; mat1-2</i>	Karimi-Aghcheh és mtsai. 2014
RKA 18	<i>Δ<i>vell</i>; mat1-2</i>	Karimi-Aghcheh és mtsai. 2014

A *T. reesei vell* hiánymutáns törzsek és a *vell* túltermelő törzsek kialakítását Razieh Karimi Aghcheh végezte a Vienna University of Technology (TU, Wien, Bécs, Ausztria) laboratóriumában. A QM9414 jelzésű celluláz termelő törzs *vell* génjét (1,8 kb) az *E.coli* higromicin B foszfortranszferáz (*hph*) génjére cserélte. A *T. reesei* QM 9414 genomi DNS-t felhasználva a *vell* gén 1,2 kb nagyságú upstream és downstream, nem kódoló régióját az 2. függelékben szereplő primerpárokkal amplifikálta. A két

PCR fragmentet *ApaI/XhoI* (upstream régió) és *XhoI/ClaI* (downstream régió) enzimekkel emésztette és ligálta a *ApaI/ClaI* restriktív pBluescript SK(+) vektorba (Stratagene, La Jolla, California). A *hph* gén *Sall/XhoI* enzimekkel emésztett 2,4 kb nagyságú fragmentjét az *XhoI* hellyel rendelkező pRKA\_D122284hph inszertálta. A *vell* mutáns törzsek retranszformálása sikertelen volt, 200 izolátum vizsgálata során nem találtak stabilan integrálódott *vell* gént. Ezért a *vell* gén túltermeltetése érdekében a *vell* promóterét egy erősen kifejeződő háztartási gén, a *tef1* gén promóterére cserélték. A *vell* gén egy 2275 bp hosszúságú régiójának PCR fragmentjét (mely tartalmazta a kódoló és a terminátor régiót is) az Fw\_ptef1:vell\_-*ClaI* és tef1:vell-HindIII oligonukleotidokkal amplifikálta (3. függelék) és inszertálta a *tef1* gén promóter régióját a *ClaI/HindIII* helyre a pLH1hphtef1 vektorba, mely tartalmazta az *E. coli* higromicin B foszfortranszferázt, mint szelektív markert. Ennek ellenőrzése Southern blot analízis alkalmazásával HindIII és BamI restriktív enzimek segítségével történt.

#### 4.2. Törzsfenntartás

A *A. nidulans* törzseket 10 g/L glükóz és a törzs auxotrófia igényeit biztosító vitaminokkal kiegészítve ún. spóráztató agarra oltottuk le, 3-4 napig 37 °C-on növesztettük, majd felhasználásig +4 °C-on tároltuk. A spóráztató táptalaj összetétele (Pontecorvo és mtsai., 1953): 0,092 g/L di-ammónium-tartarát; 20 ml/L sóoldat; 10 g/L D-glükóz; 15 g/L agar-agar; +vitaminok (törzs igényei szerint); pH=6,5. A sóoldat összetétele: 26 g/L KCl; 26 g/L MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 76 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 50 ml/L nyomelemoldat. A nyomelemoldat alkotói: 40 mg/L Na-borát; 400 mg/L CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O; 714 mg/L FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 8 mg/L Na-molibdát; 800 mg/L ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O.

A *T. reesei* tenyészeteket PDA (potato dextrose agar) táptalajon 3-4 napig 28 °C-on növesztettük, majd 4 °C-on tároltuk felhasználásig.

A törzsek hosszútávon történő megőrzése érdekében a lemosott és üvegyapoton átszűrt spóraoldatokat 50%-os glicerinnel oldatban -80 °C-on tároltuk.

### 4.3. Tenyésztési körülmények

#### 4.3.1. *Aspergillus nidulans*

Az *A. nidulans* rázott lombikos tenyésztései, valamint a batch, fed-batch és kemosztát folytonos fermentációi során az *Aspergillus* Minimal Medium (v. „Minimal táptalaj”) egy módosított változatát (AMM2) használtuk tápoldatként (Fekete és mtsai., 2002), mely annyiban különbözött az AMM tápoldattól, hogy a 6 g/L NaNO<sub>3</sub> nitrogénforrás helyett 8 g/L NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-et tartalmazott és 0,1 g/L CaCl<sub>2</sub>-dal volt kiegészítve. Az AMM tápoldat összetétele (Pontecorvo és mtsai., 1953): 6 g/L NaNO<sub>3</sub>; 20 ml/L sóoldat (lásd fenn); 15 g/L szénforrás; + vitaminok (a törzsek igényei szerint); pH=6,5.

Az *A. nidulans* tenyésztések során alkalmazott 3 különböző szénforrást (glicerinnel, D-glükózzal, és laktózzal) 1,5%-os (w/v) végkoncentrációban mindig utólag adtuk a már steril tápoldathoz. A glicerint és a D-glükózt 50%-os (w/v), míg a laktózt 25%-os (w/v) vizes oldat formájában használtuk. A vitamin kiegészítőket [p-amino-benzoésav (H<sub>1</sub>-vitamin), riboflavin (B<sub>2</sub>-vitamin), pantoténsav (B<sub>5</sub>-vitamin)] 2 mg/L végkoncentrációban adtuk a tenyészetekhez. Minden kiegészítőt Millipore Millex GP 0,22 µm-es szűrő segítségével csíramentesítettünk és lamináris fülke alatt adtuk a már steril tápoldathoz.

Az *A. nidulans* törzsek batch és fed-batch tenyésztését 7 L teljes és 6 L hasznos térfogatú üveggermentorban végeztük (Inel Kft, Budapest, Magyarország). A hőmérsékletszabályozást (37 °C) belső hőcserélő, a fermentálé homogenizálását két 6 lapátos Rushton turbina keverő oldotta meg. A bioreaktorokban való tenyésztés során a kémhatás állandó értéken való

tartása érdekében (pH=6,5) automatikus pH szabályozást végeztünk 3 M  $\text{H}_3\text{PO}_4$  és 3 M NaOH segítségével. Az oldott oxigén szintet minimum 20%-on tartottuk, melyet 0,5 VVM levegőztetéssel és szükség esetén a keverő fordulatszámának automatikus növelésével állítottuk be. A fermentálé párolgásából adódó veszteséget az elmenő levegő lehűtésével (4 °C) próbáltuk minimalizálni. A fény hatásának kiküszöbölése érdekében az egész fermentortestet alufóliával takartuk be.

A fermentor leoltására inokulum tenyészetet növesztettünk, melynek mennyisége minden esetben a fermentációs tápoldat végtérfogatának 10%-a volt. Az inokulum tenyészetet 500 ml-es Erlenmeyer lombikban 100 ml AMM2 tápoldatot 15 g/L glicerin szénforrással kiegészítve  $10^8$  db spóraoldattal oltottuk le, majd 37 °C-on 200 rpm rázatással növesztettük. 24 órás korában a tenyészetet zsugorított üvegszűrőn keresztül mostuk, majd a micéliumot úgynevezett leoltólombik segítségével jutattuk a fermentorba.

A fed-batch tenyésztés körülményei és kivitelezése azonos volt a batch fermentációval azzal a különbséggel, hogy D-glükóz ráadagolást végeztünk 10-10 g/L mennyiségben, két időpontban.

#### 4.3.2. *Trichoderma reesei*

*Trichoderma reesei* rázott lombikos tenyésztései, valamint a batch és kemosztát folytonos fermentációi során alkalmazott tápközeg kémiailag definiált MA (Mandels és Andreotti, 1978) tápoldat volt, melynek összetétele: 8 g/L  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ ; 6 g/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; 4 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 1 g/L  $\text{CaCl}_2$ ; 1 g/L  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 20 ml/L nyomelemoldat és 15 g/L szénforrás; pH=5. A nyomelemoldat összetétele: 250 mg/L  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 80 mg/L  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ; 70 mg/L  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 85 mg/L  $\text{CoCl}_2$ ; pH=2.

A *T. reesei* VEL1 funkciójának vizsgálatai során a törzseket 20 L teljes, 15 L hasznos térfogatú korróziómentes acélfermentorokban (Zolend Kft., Debrecen, Magyarország) tenyésztettük a celluláz géneket indukáló

laktózon 15 g/l kezdeti koncentrációjú szénforráson. A betekintő ablakot letakarva biztosítottuk a fénymentes tenyésztési körülményeket. A fermentációs paraméterek a következők voltak: 0,5 VVM levegőztetés, 28 °C hőmérséklet, 400 rpm mechanikus kevertetés két hatlapátos Rushton turbinával, a kémhatást pH=5 értéken tartottuk az egész fermentáció ideje alatt 3 M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> és 3 M NaOH segítségével. Az erős habzás csökkentésének érdekében polipropilén-glikol 2000 (Union Carbide Chemicals & Plastic) habzásgátlót használtunk. A fermentáció inokulumaként spóráról (*Δvell* mutáns esetén micéliumról) indított (10<sup>8</sup> db spóra/100 ml tápoldat) rázott lombikos tenyészeteket növesztettünk MA tápoldatban glicerin szénforráson (1 % w/v) a csírázást segítő kiegészítők hozzáadásával: urea 0,3 g/L; húspepton 1 g/L; Tween 0,5 ml/L. Az inokulum 24 órás 250 rpm-mel való rázatását követően a tenyészetet leszűrtük, hideg steril vízzel átmostuk, majd leoltólombikon keresztül a fermentorba juttattuk.

A szoforóz (2-O-β-glükopiranozil-D-glükóz) az egyik fő induktora a celluláz géneknek *Trichoderma reesei*-ben (Sternberg és Mandels, 1979). Az indukciós kísérlet során előnövesztett tenyészetet használtunk (előző bekezdésben leírtak szerint), majd a micélium atmosását követően MA tápoldatba kerültek, mely 10 mM koncentrációban tartalmazott szoforózt.

A *T. reesei* VEL1 funkciójának hatását vizsgáló, különböző minőségű szénforráson való növekedési tesztet MA táptalajon végeztük 2% agarral szilárdítva. A táptalajban a különböző szénforrások (D-glükóz, D-galaktóz, cellobióz, laktóz és cellulóz) 10 g/l végkoncentrációban lettek bemérve. A QM 9414 és az *OEvell* törzsek a Petri-csésze közepére felvitt 10 μl 10<sup>5</sup> db konidium/ml spóraoldattal, míg a *Δvell* törzsek spórázási képességük elvesztése miatt, micéliumról lettek indítva. A tenyészetek 28 °C-on növekedtek Sanyo inkubátorban, mely Philips-master fényforrással (TLD-15

W/840) lett folyamatosan megvilágítva, míg a sötét tenyésztés alufóliával duplán betekert Petri-csészéken történt.

#### 4.3.3. Kemosztát fermentációk

A *T. reesei* LAE1 funkciójának konstans növekedési rátán való vizsgálatát és az *A. nidulans* sterigmatocisztin termelésének növekedési ráta függését azonos felépítésű, 2,5 L teljes, 2 L hasznos térfogatú üvegfermentorokban (Inel Kft., Budapest, Magyarország) végeztük. A kemosztát folytonos fermentáció során a tápoldat ráadagolásának sebessége és a fermentálé elvételének sebessége megegyezik, mellyel a tenyésztés térfogatát és növekedési rátáját konstans értéken tartottuk. A bioreaktort alufóliával takarva fénymentes kondíciót tudtunk létrehozni. A hőmérséklet és a pH-t a gombatorzsek igényeinek megfelelően (lásd fenn) állandó értéken, a kevertetést 300 rpm-en és a levegőztetést 0,3 VVM értéken tartottuk. A ráadagolt tápoldat *A. nidulans* esetén AMM2, míg *T. reesei* esetén MA tápoldat volt 3 g/L D-glükózzal és 0,1 g/L peptonnal kiegészítve. Ez a szénforrás koncentráció mindkét gombafaj számára megfelelően alacsony, hogy szén-limitációt érzünk el mind magas (0,09 és 0,075 h<sup>-1</sup>), mind alacsony (0,02 h<sup>-1</sup>) hígítási ráta mellett (Karaffa és mtsai., 2006; Portnoy és mtsai., 2011). A tenyészet az inokulálást követő 24 órában a szakaszos fermentációknak megfelelően növekedett. A ráadagolás/elvétel kezdetétől a fermentációs térfogat 6-7-szeri átforgatásával lehetett elérni, hogy a kezdeti biomassza oszcilláció megfelelően alacsony szintre csökkenjen (Brown 1999). A steady-state biomassza koncentráció a hígítási rátától függetlenül, mindkét gombafaj esetén 1,49±0,2 g/L volt, míg a D-glükóz koncentráció a tápoldatban 0,05-0,08 mM közé esett, mely korrelál a fonalas gombák magas affinitású hexóz transzportereinek működésével (Jorgensen és mtsai., 2007). A steady-state állapot elérését az egymást követő három mintavételből kapott konstans biomassza koncentráció és a D-glükóz limitáció jelezte. Az ilyen

állapotban levő tenyészetből 3-5 alkalommal vettünk mintát, melyekből *A. nidulans* esetén ST detektálást, *T. reesei* esetén pedig totál RNS izolálást végeztünk. A fonalas gombákra jellemző falnövekedés elkerülése érdekében anti-adhéziós ágenszt, Sigmacote©-ot alkalmaztunk.

#### **4.4. Analitikai módszerek**

##### Száraz sejttömeg meghatározása:

A növekedést a tenyészetek egységnyi térfogatára vonatkoztatott szárazanyag tartalmának (Dry Cell Weight, DCW) gyarapodására vezettük vissza. A micélium leszűrését és átmosását követően 80 °C-on súlyállandóságig szárítottuk. A száraz sejttömeg adatai két különböző mérés átlagából származnak, mely értékeinek átlagos eltérései nem haladták meg a 14%-ot.

##### Szénhidrátok koncentrációjának meghatározása:

A munkánk során a folyékony tenyészetekből vett minták szénforrás koncentrációit (D-glükóz, laktóz, glicerin) HPLC-vel határoztuk meg. Az elválasztásra ioncserélő ( $H^+$ ) oszlopot (Bio-Rad Aminex HPX-87H<sup>+</sup>) használtunk izokratikus elúcióval (10 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> eluens, 55 °C kolonna hőmérséklet) és detektorként törésmutató (RI) detektort alkalmaztunk.

##### Sterigmatocisztin koncentrációjának meghatározása:

A sterigmatocisztin koncentrációja mind folyékony, mind szilárd tenyésztési körülmények között meglehetősen alacsony (néhány mg/l), ezért a detektálhatóság érdekében koncentrálni szükséges. 20 ml fermentlevet 3x10 ml etil-acetáttal extraháltunk és a szerves fázis gyűjtését követően vákuum bepárló segítségével szárítottuk. A bepárolt mintát 1 ml acetonitrilben oldottuk vissza. Szilárd fázisú tenyészetből való extrakció annyiban különbözött, hogy az etil-acetát adagolás előtt a kivágott agardarabokat (a gombamicéliummal együtt) melegítéssel felolvasztotuk. Az extrakció hibaátlagáa 5% alatt volt. A sterigmatocisztin koncentrációjának meghatározása HPLC-UV analízissel (HP 1090 Series L/M Liquid

Chromatographs, Agilent-Technologies) történt. A csúcsok hitelesítését ST standard addíciós módszerrel (Sigma-Aldrich Kft.) és a koncentrációját az ST standard oldat 4 pontos kalibrációs egyeneséből kalkuláltuk. A minta elválasztását egy reverz fázisú C18-as kolonnán (Phenomenex Luna 5  $\mu$ m C18) végeztük, ahol az eluens víz:acetonitril (4:6 v/v) elegy, mely nátrium-acetát és ecetsavval volt pufferelve és pH=4,8-ra állítva. Mivel az ST meglehetősen stabil molekula ( $pK_a=9,58$ ), az eluens kémhatása nem módosítja a molekula struktúráját, de a savas oldat szükséges a szennyezőktől való megfelelő elválasztáshoz. Az izokratikus elúció során az áramlási sebességet 0,5 ml/min értéken tartottuk, a kolonna hőmérséklete 55 °C és az UV detektorral 245 nm hullámhosszon történő elnyelést mértünk. E módszer alkalmazásával az ST retenciós ideje 11,9 perc és a detektálás alsó határa 0,1 mg/l.

#### Fehérje tartalom és celluláz enzimaktivitás meghatározása:

A sejtmentes fermentlé fehérjetartalmának meghatározását Bradford (1976) által kidolgozott módszer szerint határoztuk meg. A celluláz enzimaktivitás mérésére a karboxi-metilcellulóz (CMC, 1 % w/v) módszert alkalmaztuk (Uzbas és mtsai., 2002), amely a cellulitikus enzimkomplex által lehasított redukáló cukrok mennyiség mérésén alapul. A sejtmentes fermentléhez hozzáadott CMC-ből a celluláz enzimek cukor monomereket hidrolizálnak, melynek mennyiségét a 3,5-dinitroszalícilsavval (DNS), 100 °C-on reagáltatva a reakcióelegy abszorbancia (550 nm) változásából számolhatjuk. A celluláz aktivitás számolása Ghose (1987) publikációja szerint történt.

#### Génexpresszió vizsgálata kvantitatív PCR-el:

A DNáz-zal (DNase I, RNase free; Thermo Scientific) kezelt RNS-ek (5  $\mu$ g) reverz átírását a Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis kit-tel (Roche) végeztük a gyártó által leírt protokoll alapján, kiegészítve oligo-dT és random hexamer primerekkel. A qPCR méréseket Dr. Pahlócsék Melinda



(Humán genetikai Tanszék, Debreceni Egyetem, Debrecen) BioRad (Hercules, CA) iCycler IQ készülékkel végezte. Az amplifikációs protokoll egy kezdő denaturációt (3 perc, 95 °C) követően 40 ciklusos denaturációból (15 sec., 95 °C), annealációból (20 sec., a primereknek megfelelő hőmérsékleten (4 - 5. függelék) és elongációból (10 sec., 72 °C) állt. A PCR efficienciát a cDNS-ek hígításainak (1; 0,1; 0,01; 0,001) reakcióból határozták meg. Az amplifikáció efficienciát az IQ5 Optical System Software v2.0 által kapott meredekségekből számolták. Az expressziós arányokat a REST© szoftver alkalmazásával kalkuláltuk (Pfaffl és mtsai., 2002; Veiga és mtsai., 2012). A minták analízise legalább két független kísérletből 3 ismétléssel történt.

#### Transzkriptum analízis:

A totál RNS izoláláshoz SV Total RNA Isolation System (Promega) kisset használtunk a gyártó által leírtak szerint. A cDNS szintézisét és hibridizációját a Roche NimbleGen (Roche-NimbleGen, Inc., Madison, WI, USA) végezte nagy érzékenységgű oligonukleotid microarray módszerrel 60-mer próbákat használva, melyek alkalmasak a megvizsgált 9129 *T. reesei* gén expressziójának detektálására (Metz és mtsai., 2011). A microarray analízis által adott adatok begyűjtésének és azonosításának a Metz és munkatársai (2011) közleményében leírt beállításai alkalmas arra, hogy a különböző expressziós szintek között szignifikáns különbséget tegyenek. A gének azonosítása a teljes egészében manuálisan annotált *T. reesei* genom adatbázis segítségével történt, mely Christian P. Kubicek (Institute of Chemical Engineering, Vienna University of Technology, Vienna) szabadalma. A transzkriptum analízis bioinformatikai adatelemzését Christian P. Kubicek végezte. Az Euklideszi távolságokat metrikus módszerrel a DNSSTAR v5.1.2. build 3 (DNSstar Inc., Madison, WI) hierarchikus klaszterezést alkalmazva adta meg. Az azonosított gének annotálását a MIPS Functional

Catalogue-ban Mizzen és Allis (1998) közleménye szerint végezte. A mikorarray adatok és a kapcsolódó protokollok elérhetőek a GEO weboldalon a GSE55652 csatlakozási számon ([www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/))

A transzkriptumok a genom klasztereibe való azonosítása szintén Christian P. Kubicek munkájának köszönhető. A szoftver és a dokumentáció letölthető: <http://tele-thon.bio.unipd.it/bioinfo/reef/>.

#### Nukleinsav izolálás és hibridizáció:

A gombamicéliumokat Miracloth segítségével szűrtük, majd desztillált, hideg vízzel mostuk és azonnal folyékony nitrogénben fagyasztottuk. A lefagyasztott biomasszát nitrogénnel hűtött mozsárban porrá őröltük. A genomi DNS, plazmid DNS, és RNS tisztításokat a gyártó által kiadott protokoll szerint végeztük (Wizard Genomic DNA Purification Kit, PureYield Plasmid Midiprep System és SV Total RNA Isolation System; Promega). A nukleinsavak elektroforézisét, blotolását és hibridizációját standard molekuláris biológiai módszerekkel végeztük.

#### Southern blot analízis

A *Trichoderma reesei* túltermelő mutáns törzsek Southern blot analízisének a Sambrook és Russel (2001) által közölt standard eljárásokat használtuk. NanoDrop 2000 UV-Vis Spektrofotométer (Thermo Scientific) készülékkel történt a DNS mennyiségi meghatározásra. Az agaróz gélbe 5 µg emésztett DNS-t vittünk fel zsebenként. A génspecifikus oligonukleotidokat digoxigeninnel jelöltük PCR DIG Probe Synthesis Kit (Roche Applied Science) segítségével, templátként QM9414 törzs genomi DNS-ét használtunk. A hibridizációt Lumi-Film kemilumineszcens detektáló film (Roche Applied Science) segítségével tettük láthatóvá.

#### **4.5. Morfológiai vizsgálat**

A *T. reesei* QM 9414 és *Δvell* mutáns törzs morfológiai vizsgálatát rázatott lombikos tenyészetekkel végeztük MA tápoldatban, szénforrásként 10 g/L glicerinnel szénforrással. Mindkét törzs esetében a mintavételi időpontokat úgy választottuk meg, hogy a kezdeti, az exponenciális, illetve a hanyatló növekedési fázisból vett mintákat vizsgálhassuk. A növekedési szakaszok megválasztását a szénforrás hasznosulásának nyomonkövetésével határoztuk meg. Kezdeti növekedés: > 8 g/L glicerinnel; exponenciális szakasz: ~5 g/L glicerinnel; hanyatló fázis: < 1 g/L glicerinnel. Natív és laktofenol cotton blue (LPCB) festékkel festett mintákat analizáltunk Zeiss AxioImager, AxioCam MRc5 kamerával felszerelt mikroszkóppal. A képek analízisét Axio-Vision AC képanalizátor szoftverrel végeztük (Version 4.6.3, Carl Zeiss). Az LPCB festék összetétele: 200 g/L fenol; 0,5g/K Cotton blue; 400 ml/L glicerol; 200 ml/L tejsav; 200 ml/L víz, mely 10% v/v arányban volt a micéliumot tartalmazó tápoldatban (Leck 1999).

#### **4.6. Szexuális és aszexuális spóráképzés vizsgálata**

A szexuális reprodukció vizsgálatához a *T. reesei* QM 9414, *vell* és *OEvell* törzseket a párosodási partnerükként alkalmas CBS 999.79 törzsszel tenyésztettük (Seidl és mtsai., 2009). A PDA táptalajon kinőtt (4 nap) gombákat agarkockával együtt áthelyeztük egymással szembe, friss PDA táptalajra. A tenyészeteket 4-7 napig növesztettük természetes megvilágításban, illetve sötét körülmények között. Az egymással termőtest képzésre képes tenyészetekből aszkospórákat gyűjtöttünk és a spórák életképességét PDA táptalajon vizsgáltuk. A fényfüggő konidiospóra képzés vizsgálatához a tenyészeteket 8 napig vagy teljes sötétségben, vagy 12 óra megvilágítás/12 óra sötétségben növesztettük. A konidiospórák gyűjtését 1% w/v Tween-t és 0,8% w/v NaCl oldatot alkalmazva vittük szuszpenzióba, melyeket üvegyapoton keresztül szűrtünk, majd számoltunk.

#### **4.7. Bioinformatikai elemzés**

A PEST régiók azonosítását, melyek a gyors protein degradációhoz vezetnek és tipikusak a nem stabil fehérjékre az epestfind program alkalmazásával végeztük (Rechsteiner és mtsai., 1987; <http://emboss.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/epestfind>). A proteinek sejten belüli lokalizációjának analízisére a WoLF PSORT (Protein Subcellular Localization Prediction tool; Horton és mtsai., 2007) programot, a leucin gazdag nukleáris export szignálokat (NES) a NetNES 1.1 Server (la Cour és mtsai., 2004; <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNES>) segítségével azonosítottuk.

## 5. Eredmények

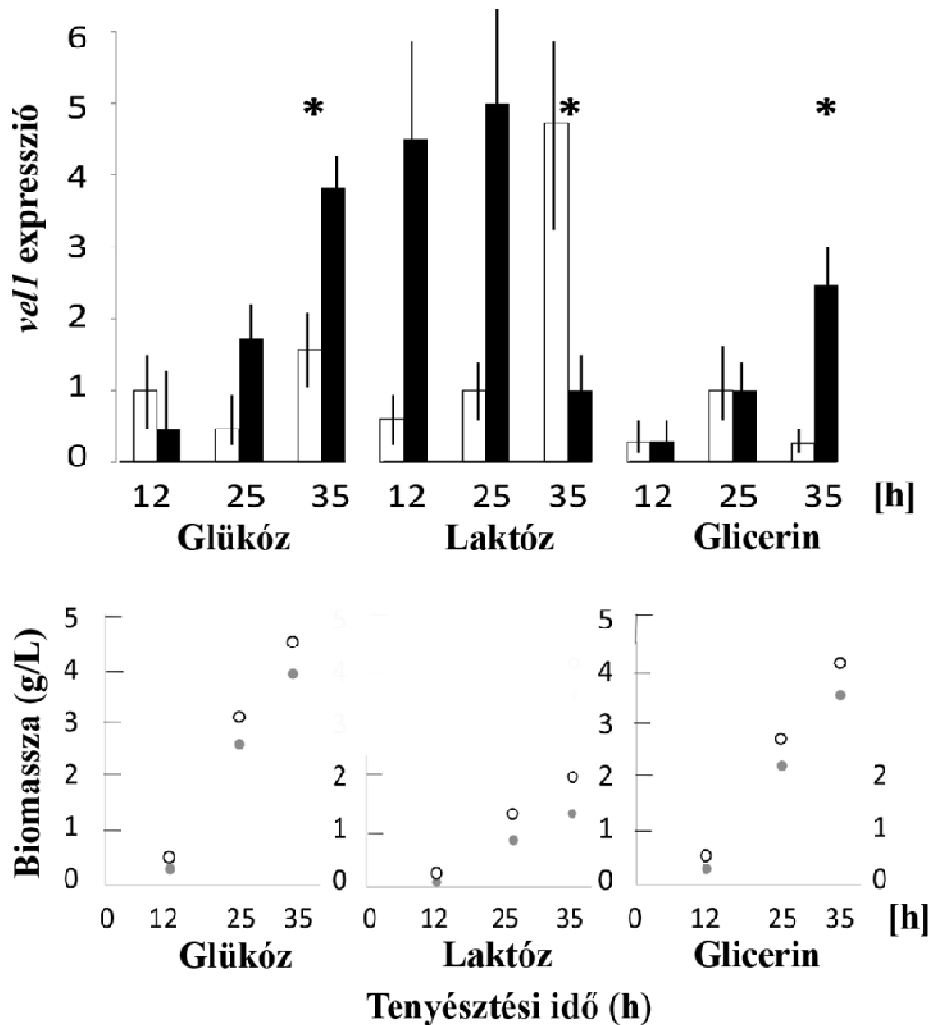
### 5.1. *Trichoderma reesei* VEL1 funkciójának vizsgálata: a VEL1 hatása a gomba egyedfejlődésére és celluláz enzimtermelésére

#### *Trichoderma reesei vell* génjének azonosítása

A *T.reesei* genomban a *vell* gén egy kópiában van jelen (Trire2:122284; az ehhez tartozó VEL1 protein: EGR48103.1). A *vell* nyitott leolvasási kerete 1801 bázispárból áll, mely 79 bázispárnyi intronnal van megszakítva, így a protein 574 aminosavból áll. A törzsfeljesztésen átesett, magasabb celluláz termelő törzsek (QM9414, NG14, Rut C-30; Le Crom és mtsai., 2009; Vitikainen és mtsai., 2010) genom szekvenciáját megvizsgálva azonos nukleotid szekvenciájú *vell* gént azonosítottunk, mellyel kizárhattuk annak a lehetőséget, hogy a magasabb celluláz termelés a vizsgált gén egy esetleges mutációja kapcsán történik. A *T.reesei* VEL1 proteinje nagy hasonlóságot mutatott a *T.virens* és *T. atroviride* VeA ortológjaival (*T.virens* esetén 80%, míg *T. atroviride* esetén 78 % volt a hasonlóság a fehérjét felépítő aminosav szekvenciában). A genuson kívüli fajok közül a legnagyobb hasonlóságot a *Nectria haematococca*-val (60%) mutatott, míg az *A. nidulans* és *A. fumigatus* fajokkal csak 36% illetve 38% volt a szekvencia hasonlóság (8. függelék). Feltehetően a VEL1 protein képes bejutni a sejtmagba, ugyanis a WoLF PSORT segítségével azonosítottunk a fehérje C terminális negyedében egy leucinban gazdag szekvenciát, mely feltételezhetően egy sejtmag lokalizációs szignál (NLS). Ez összhangban van az *A. nidulans* és *Neurospora crassa* gombafajokban leírt VeA proteinjeivel, viszont ez a szignál az N terminális részén van a fehérjéknek (Bayram és mtsai., 2008b; Stinnett és mtsai., 2007; Kim és mtsai., 2002). Az *A. nidulans* VeA proteinjéhez hasonlóan a *T.reesei* VEL1 fehérjéje is tartalmaz egy PEST régiót (gazdag prolin, szerin, treonin és glutamin tartalmazó szekvencia, mely

rövid féléletidejű), de az *A. nidulans*-al ellentétben (*A. nidulans*-ban a C-terminális végen helyezkedik el) a *T.reesei* VEL1 fehérjének a közepén, közvetlenül a konzervált N-terminális szekvencia után található (290-311 aminosav).

**Szénforrás függést mutat a *T. reesei vell* transzkriptum szintje**  
Három különböző szénforráson vizsgáltuk meg a *vell* expressziójának szintjét a hifanövekedés során és a későbbi sporuláció folyamán. Fény jelenlétében a *T.reesei* gyors növekedése tapasztalható D-glükóz és glicerinnel szénforrásokon az első 25 órában, mely a *vell* génhez tartozó transzkriptumok mennyiségének megemelkedett szintjével párosult (7. ábra). A növekedés megszűnésével a transzkriptum mennyisége is csökkent. A laktózon való növekedés sokkal lassabb, a *vell* transzkriptum akkumulálódása fény jelenlétében a 35. órában volt a legmagasabb, akkor, amikor a növekedési ráta is a maximumát érte el. Sötétben való növekedés során a *vell* transzkriptumok sokkal magasabb szintet értek el, mint megvilágítás során (7. ábra). A D-glükózon és glicerinen kapott *vell* transzkriptumok szintje hasonló mintázatot mutatott, viszont a megvilágított mintákkal ellentétben, sötétben a *vell* mRNS mennyisége az idő előrehaladtával megemelkedett és a legmagasabbat már a növekedés lassulásakor kaptuk (35. óra). Sötétben és laktóz szénforráson való növekedés során lehetett mérni a legmagasabb *vell* transzkriptum szintet, habár ez a szint a 35. órára nagymértékben lecsökkent. A *vell* expressziós szintje és a tenyésztet sporulációja között nem tapasztaltunk korrelációt (7. ábra-csillag). Ezen adatok alapján arra következtethetünk, hogy a *vell* gén mRNS expresszióját a fény, illetve a sötétség mellett a szénforrás és általa a növekedési ráta is befolyásolja.



**7.ábra** A szénforrás és a fény hatása a *vgl* expressziójára és biomassza termelésére *T. reesei* fonalas gombában. Fehérrel a fény, míg a fekete színnel a sötétség hatását mutatjuk a *vgl* transzkriptum szintjére és a biomassza mennyiségére *T. reesei* QM 9414 törzs tenyésztésében D-glükóz, glicerín és laktóz szénforráson való növekedés közben. A transzkriptumok szintjének értékeit a *vgl/tefl* arányának normalizálásából számoltuk, melyeket a tenyészet 12 órás korában megvilágítás során mértünk D-glükóz szénforráson. Az adatok 3 független ismétlés átlagából származnak. A csillagok a tenyészet spórázásának kezdetét jelölik, melyek megegyeznek a megvilágított illetve sötétben tenyésztett kultúrákban.

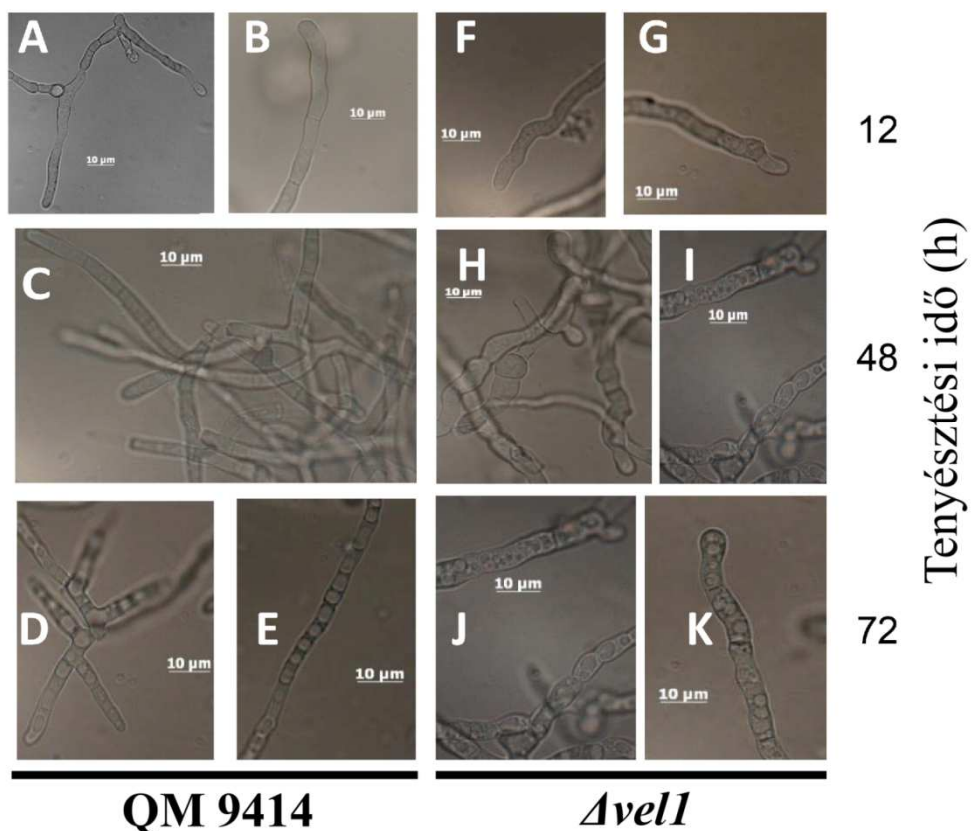
***T. reesei* VEL1 proteinja szükséges a normál hifavégek növekedéséhez és elengedhetetlen a szexuális és aszexuális egyedfejlődéshez**

A *T. reesei vell* génjének egyedfejlődésében betöltött szerepének vizsgálatához *vell* hiánymutáns ( $\Delta vell$ ) törzseket hoztunk létre. A *T. reesei* QM 9414 törzs *vell* kódoló régióját az *E. coli* higromicin B foszfotranszferáz génjére (*hph*) cseréltük. A *vell* gén overexpressziójához (*OEvell*) a gén nyitott leolvasási keretét egy konstitutívan kifejeződő *tef1* (elongációs faktor 1 $\alpha$  gén) promóterrel fuzionáltuk. Ahhoz, hogy biztonsággal azonosítsuk a  $\Delta vell$  fenotípust, 3 db  $\Delta vell$  és 2 db *OEvell* törzset vizsgáltunk, melyekkel a kísérletek során konzekvens eredményeket kaptunk. Ezeket a mutánsokat PCR illetve Southern blot analízissel ellenőriztük (3. függelék).

A  $\Delta vell$  mutánsok egyértelműen eltérő fenotípust mutattak: süllyesztett körülmények között duzzadt, nagymértékben elágazó és sokkal vastagabb hifák alakultak ki (8-9  $\mu\text{m}$  átmérőjű; 8. ábra H és I), mint a szülői törzsben (3-4  $\mu\text{m}$  átmérőjű; 8. ábra C). A  $\Delta vell$  mutáns hifavégei gyakran íveltek és sok, kis vakuólummal teli képet mutattak, amelyek az öregedő sejtekben megnövekedtek (8. ábra F,G és J,K).

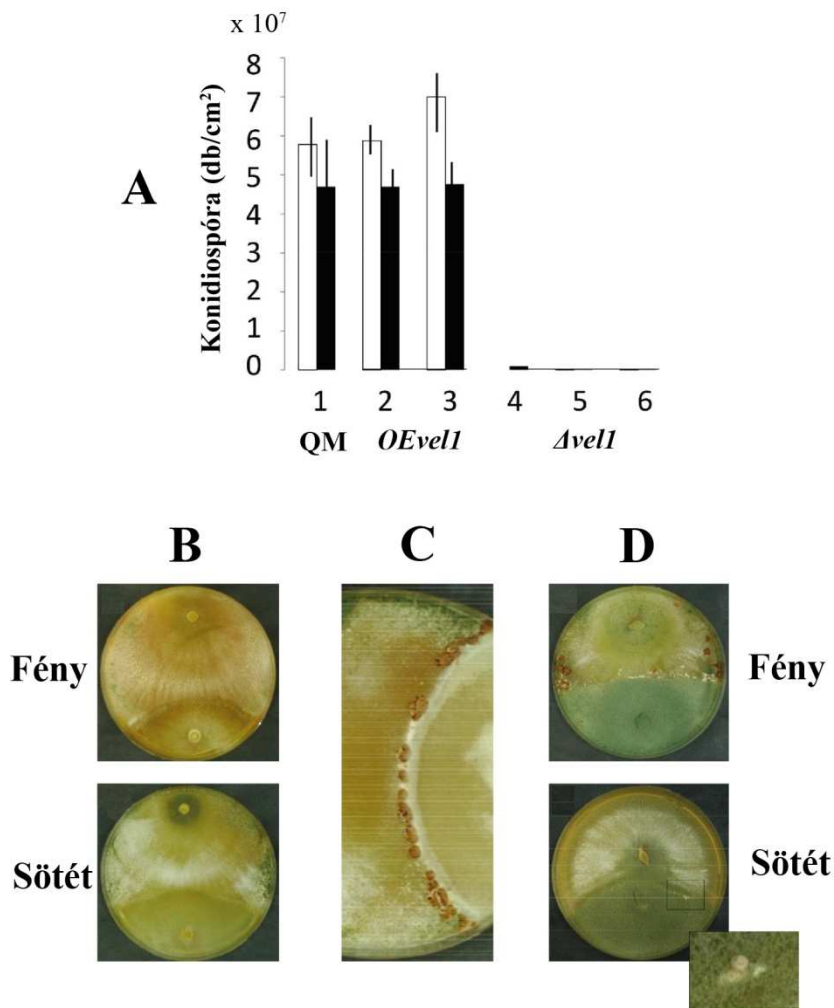
Agarral szilárdított D-glükózt tartalmazó táptalajon a  $\Delta vell$  mutáns esetén kissé csökkent növekedés és hiperelágazó fenotípus volt tapasztalható. A feltűnőbb azonban az, hogy a konidiospóra képzés teljesen hiánya jellemezte a  $\Delta vell$  mutánst, függetlenül a fény jelenlététől vagy hiányától. A *T. reesei*-re jellemző sárga pigmenteket a *vell* mutáns is termelte, viszont ez nem volt tapasztalható a  $\Delta lae1$  mutáns törzs esetén (Seiboth és mtsai., 2012b). Az *OEvell* törzs sporulációja normális, hasonló a konidiumképzés mértéke sötétben, mint a szülői törzsnek, és csak kis mértékben intenzívebb fény jelenlétében (9. ábra A).





**8. ábra** A **VEL1** hatása a *T. reesei* morfológiájára süllyesztett tenyészetben. A *T. reesei* QM 9414 törzs növekedő hifájának morfológiáját az **A-E** képeken, míg a *Δvell* törzs morfológiáját a **F-K** képeken láthatjuk, melyek szénforrásként glicerint (1% w/v) tartalmazó MA tápoldatban növekedtek. A tenyészetek 12 órás képeit az **A, B, F, G**; a 48 órás képeit a **C, H, I**; és a 72 órás képeit a **D, E, J, K** betűkkel jelzett képek mutatják.

A *T. reesei* szexuális szaporodásához szükséges a VEL1 protein, melyet a termékeny perithécia formálási képességével vizsgáltuk. A *Δvell* törzs (mat 1-2) a *T. reesei* CBC 999.79 (mat 1-1; Seidl és mtsai., 2009) törzsszel keresztezve egyáltalán nem képzett termőtesteket fény jelenlétében, míg a CBC 999.79 a szülői QM 9414 (mat 1-2) törzsszel igen (9. ábra B-C). A *T. reesei* termőtest képzéséhez fény szükséges (Chen és mtsai., 2012), ennek

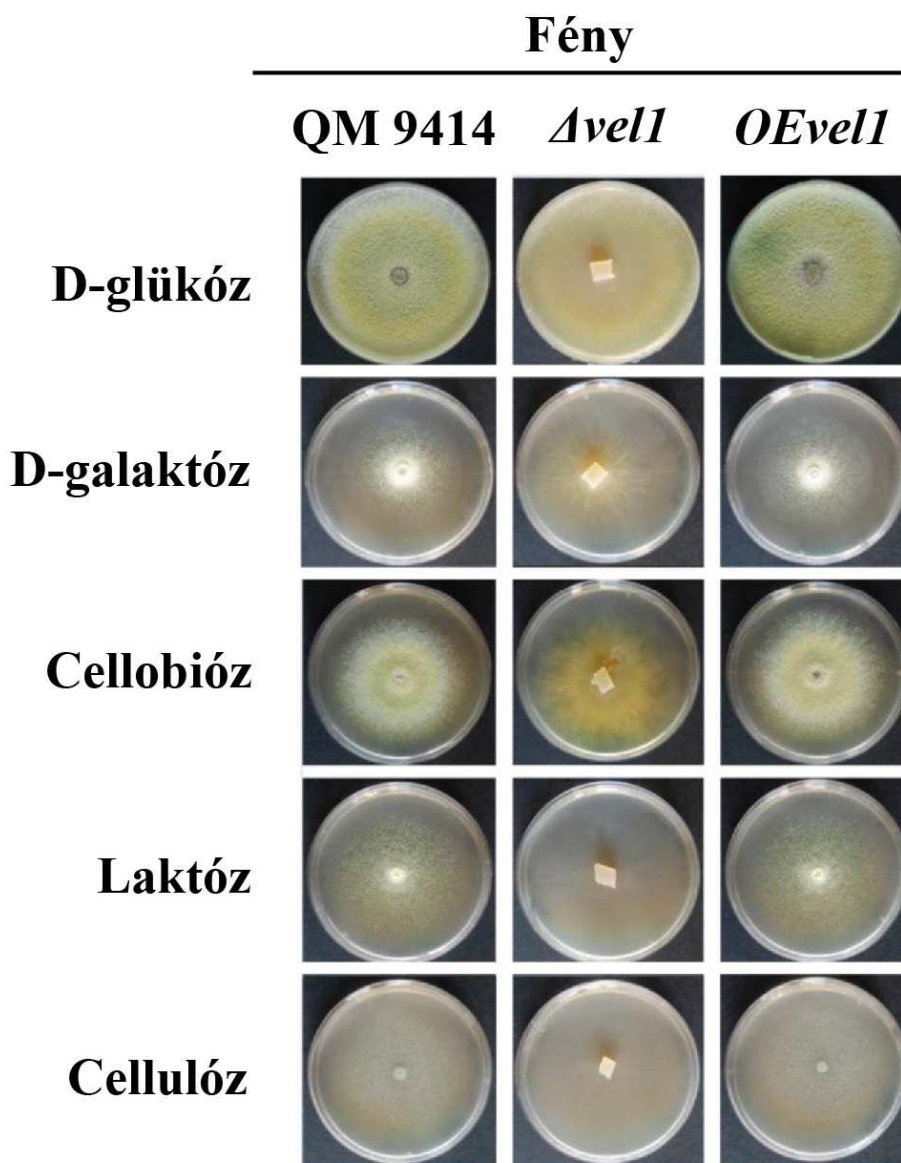


**9. ábra A *Vel1* fehérje szükséges a *T. reesei* szexuális és aszexuális spóráképzéséhez.** (A) A *vel1* gén hatása a *T. reesei* aszexuális spóráképzésére. Konidiospórák száma fény jelenlétében (fehér oszlopok) és konidiospórák száma sötétben (fekete oszlopok) tenyésztett QM 9414 (1), két *OEveli* (2,3) és három *Δveli* (4-6) törzs esetén. Az adatok három független kísérlet átlagából származnak ( $p < 0,05$ ). (B) Termőtest képzésének hiánya a *Δveli* (felül) és a párosodási partnere, a CBC 999.79 (alul) törzs között sötétben és fény jelenlétében. (C) A QM 9414 (balra) és CBC 999.79 (jobbra) törzsek termőtest képzése fény jelenlétében. A vad törzs nem képes sötétben termőtestet képezni (Seiboth és mtsai., 2007a), ezért csak a megvilágított tenyészetet mutatjuk. (D) Termőtest képzés a *OEveli* és a CBC 999.79 törzs között fény jelenlétében és hiányában. A felnagyított részlet primordiumokat mutatja.

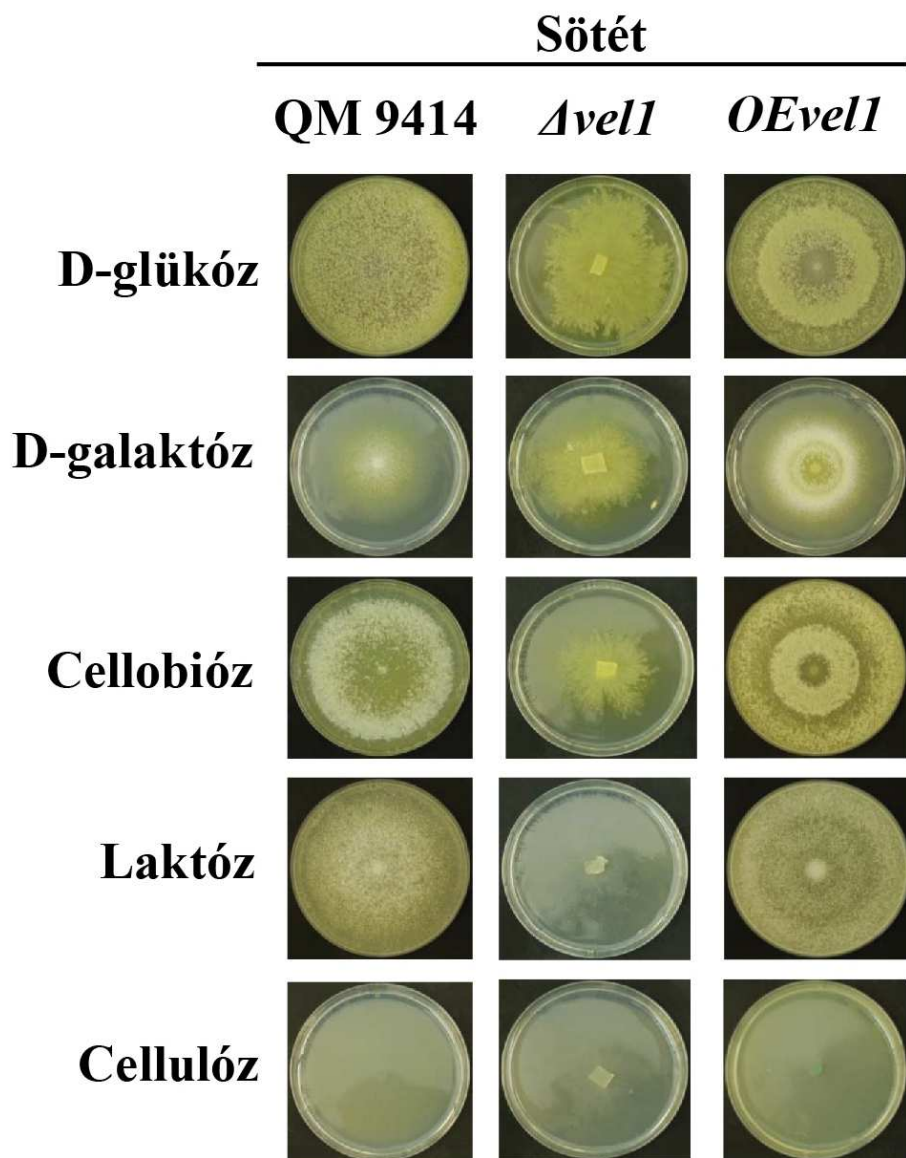
megfelelően a *Δvell* törzs keresztezése sötétben a szülői törzshöz hasonlóan nem volt sikeres. Érdekes megfigyelés volt, hogy a *OEvell* törzs képes peritécium képzésére a sötétben is, habár kisebb gyakorisággal, mint fényben (9. ábra D). Ezek a peritéciumok azonban nem tartalmaznak askospórákat, így terméketlenek.

### **Cellulózon és laktózon való növekedéshez VEL1 szükséges**

A megvizsgált két *Δvell* törzs kissé csökkent növekedést mutatott szilárd táptalajon D-glükóz szénforrás jelenlétében. Ahhoz, hogy megbizonyosodjunk arról, hogy a növekedés megváltozása a hifa morfológia átalakulásának következménye, vagy valamilyen más hatást látunk, számos szénforráson megvizsgáltuk a mutánsok növekedését, köztük a cellulázok képződésében érdekelt szénforrásokat is. A *vell* hiánymutáns növekedése minden megvizsgált szénforráson kisebb mértékű és megváltozott hifa fenotípust mutatott függetlenül attól, hogy a tenyészet fény jelenlétében (10. ábra A) vagy sötétben (10. ábra B) növekedett. Kifejezetten alacsony növekedési hajlandóságot tapasztaltunk laktóz tartalmú táptalaj esetén, míg cellulózon tulajdonképpen képtelen volt növekedni a *vell* hiánymutáns törzs. A *OEvell* törzs növekedése normális fenotípus mellett gyorsabb növekedést mutatott laktózt, cellobiózt és cellulózt tartalmazó táptalajon. A megfigyelések alapján arra következtethetünk, hogy a VEL1 egyértelműen hatással van a laktóz és cellulóz hasznosítására.



**10. ábra A:** A *VEL1* hatása különböző szénforrások hasznosítására *T. reesei* QM 9414, *OEvel1* és *Δvel1* törzsekben fény jelenlétében. A képek a szilárd táptalaj leoltását követően 5 nappal (120 óra) készültek. 2 nappal később vizsgált tenyészetek fenotípusa nem mutatott változást.

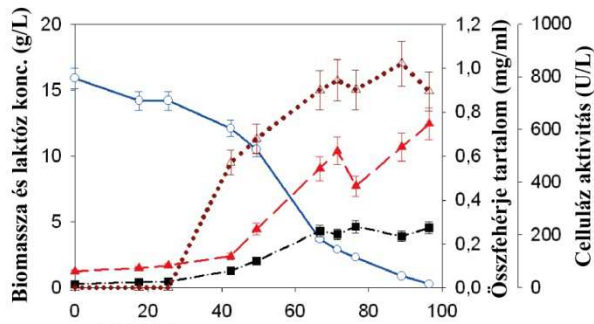


**10. ábra B:** A VEL1 hatása különböző szénforrások hasznosítására sötétben tenyésztett *T. reesei* QM 9414, *OEvel1* és *Δvel1* törzsekben. A képek a szilárd táptalaj leoltását követően 5 nappal (120 óra) készültek. 2 nappal később vizsgált tenyészetek fenotípusa nem mutatott változást.

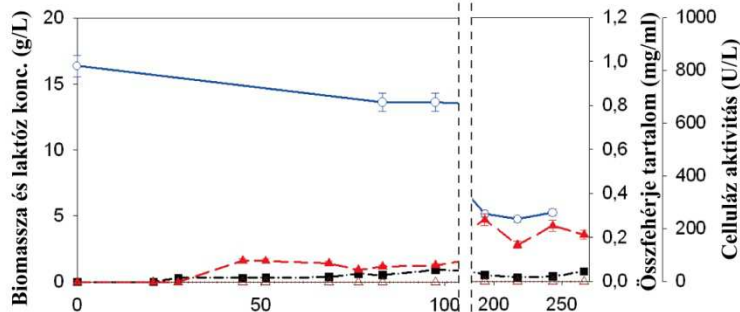
### **A VEL1 protein esszenciális a celluláz és hemicelluláz enzimeket kódoló gének kifejeződéséhez**

A kutatás elsősorban arra a hipotézisre épült, hogy a *veA* ortológ *vell* génterméke szükséges lehet a cellulázok képződéséhez *T. reesei*-ben. A szénforrásként cellulózt tartalmazó táptalajon való növekedési teszt eredménye összhangban van ezzel a hipotézissel. Az elmélet közvetlen bizonyításaképpen két  $\Delta vell$  törzset és a szülői törzset tenyésztettük laktóz szénforrást tartalmazó folyékony tápoldatban. A laktóz képes indukálni a celluláz gének expresszióját (Ivanova és mtsai., 2013), de ennek hasznosítása (a cellulózzal ellentétben) független a termelt cellulázoktól (Seiboth és mtsai., 2007a). Ahogyan a 11. ábrán látható, a  $\Delta vell$  törzs növekedése laktóz tartalmú folyékony kultúrában sokkal lassabb (összhangban a szilárd táptalajú tenyésztés eredményével), mint a szülői törzs növekedése. A QM 9414 törzsnek a maximális biomassza koncentráció eléréséhez 90-100 órára volt szüksége, míg a két  $\Delta vell$  törzs 250 óra tenyésztést követően érte el a hasonló sejttömeget. A tenyésztés teljes időtartama alatt nem tudtunk celluláz enzimaktivitást detektálni, ami összefügg a mutáns törzsek cellulózon való növekedésének lassulásával (11. ábra). Ahogyan az *OEvell* törzs gyorsabb növekedést produkált laktóz tartalmú szilárd táptalajon, süllyesztett kultúrában is gyorsabb szénhasznosítást mutatott és a celluláz termelése is korábban detektálható, mint a szülői törzsé (11. ábra). Ugyanakkor a cellulázai csak kis mértékben értek el magasabb enzimaktivitást, mint amit a szülői törzs esetén mértünk.

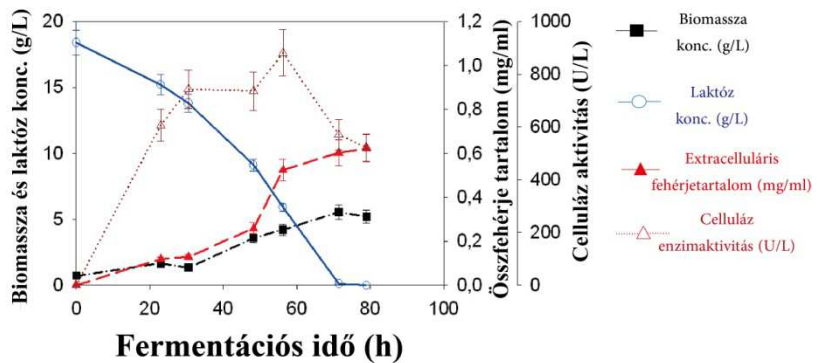
QM 9414



*Δvell*



*OEvell*

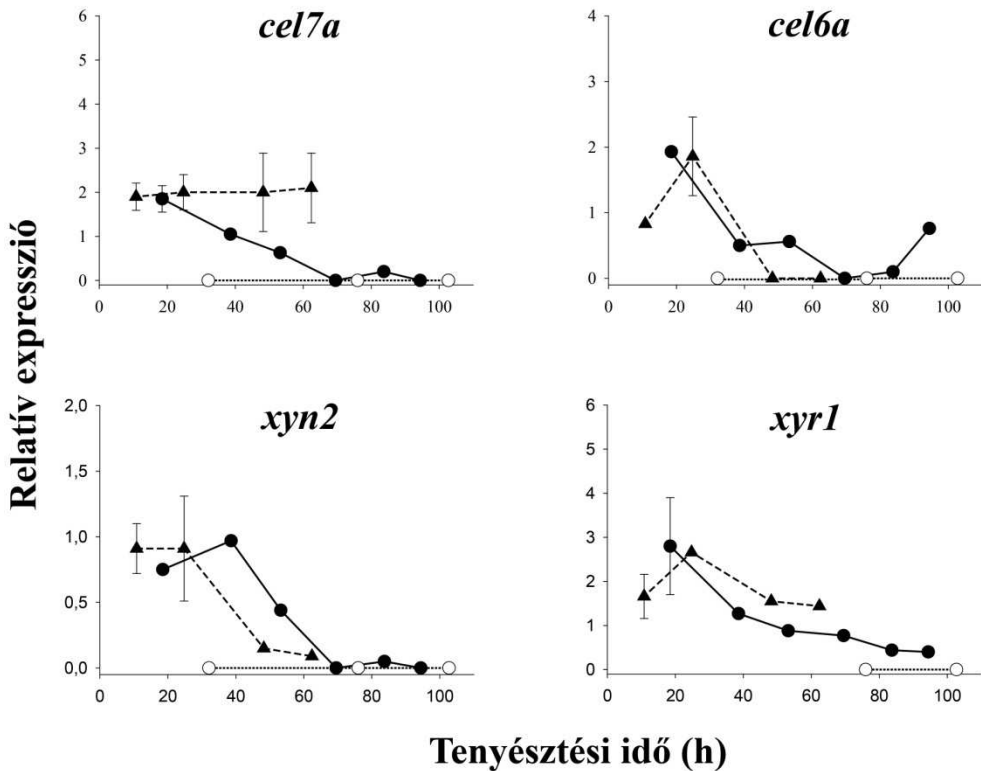


11. ábra A *T. reesei vell* deléciójának és túltermeltetésének hatása a növekedésre és cellulázok képződésére laktózon való növekedés során. Mind a két, azonos genotípusú mutánsokkal konzisztens eredményeket kaptunk. Az adatok két független kísérlet és három mérés átlagát mutatják. **Kék vonal üres kék karikával:** laktóz koncentráció (g/L); **sötét piros pontozott vonal üres háromszöggel:** celluláz aktivitás (U/L); **világos piros szaggatott vonal piros háromszöggel:** extracelluláris fehérje koncentráció (mg/ml); **fekete szaggatott vonal fekete négyzettel:** biomassza koncentráció (g/L).

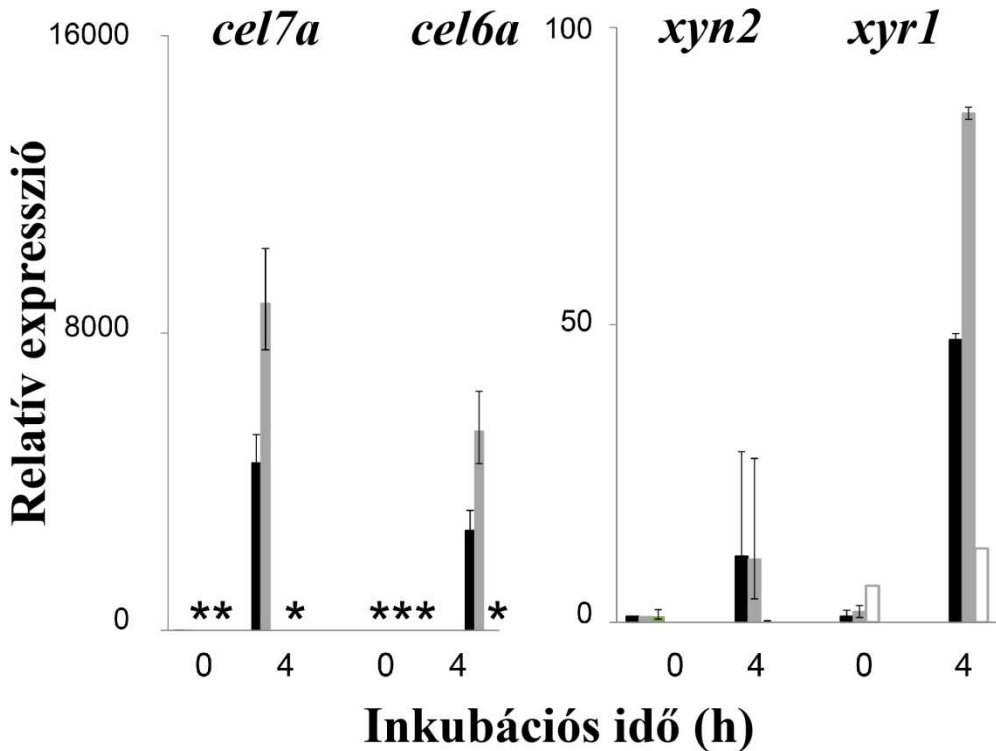
A két fő celluláz gén (*cel7a* és *cel6a*) és a xilanáz II-t kódoló *xyn2* gén transzkriptumjainak szintje tökéletesen egybeesik a celluláz enzimaktivitás hiányával a két  $\Delta vel1$  törzsben. A vizsgált génekről képződött mRNS-ek alacsony szintje azt jelzi, hogy a hatás transzkripciós szintű (12. ábra). A *xyr1* transzkriptum szintje is (terméke a XYR1 protein, mely a fő regulátora a celluláz és hemicelluláz géneknek) nagymértékben lecsökkent a két  $\Delta vel1$  mutáns törzsben (12. ábra). Ennek a fehérjének a hiánya lehet az oka a laktózon való növekedési fenotípusnak, mert a *xyr1* hiánymutáns törzs nem képes laktózon növekedni (Seiboth és mtsai 2007a és 2007b). Az *OEvel1* törzs esetén mért transzkriptumok szintjei szintén összefüggenek a celluláz aktivitás során mért értékekkel, miszerint a vizsgált génekről átíródott mRNS-ek szintje csak kis mértékben volt magasabb a szülői törzshöz képest (12. ábra).

Megvizsgáltuk a *vel1* szerepét a cellulázok képzésében olyan körülmények között, ahol a *vel1* nincs hatással sem a növekedésre sem az indukciót kiváltó molekula felvételére. A tenyészetet cellulázokat nem indukáló körülmények között (glicerin szénforráson) előnövesztettük, majd a nyugvó micéliumhoz  $\beta$ -kötést tartalmazó diszacharidot, szoforózt adtunk. A szoforóz induktor alkalmazása mellett szól, hogy a cellulázok és xilanázok egyik legerősebb aktivátora a *T. reesei* törzsekben (Hakkinen és mtsai., 2012; Ghassemi és mtsai., 2015), továbbá a szoforóz indukciót közvetítő szenzort kódoló gén, a *ctr1* expressziója független a *xyr1*-től, hiszen még  $\Delta xyr1$  *T. reesei* törzsben is magas szinten expresszálódik (Ghassemi és mtsai., 2015). Ezzel a kísérlettel olyan körülmények között lehet a *vel1* hatást megvizsgálni, ahol a VEL1 hiánya nem zavarja sem a növekedést sem a tápanyagfelvételt.





**12. ábra** A *T. reesei vell* deléciójának vagy túltermeltetésének hatása két celluláz, egy hemicelluláz és a celluláz regulátor gén transzkriptum szintjére laktózon való növekedés során. A két celluláz gén (*cel7a*, *cel6a*), a xilanáz gén (*xyn2*) és a celluláz regulátor gén (*xyr1*) mRNS szintjét a *T. reesei* QM 9414 törzs esetén: ●,  $\Delta vell$  törzsnek: ○, és a *OEvell* törzsnek: ▲ szimbólumokkal jelöltük. A génexpressziós szint értékeinek megadását önkényesen választottuk meg: a vizsgált gén transzkriptum szintjének és a *tef1* háztartási gén transzkriptum arányának normalizálásával számoltunk, és ezeknek az arányát összevetettük a QM 9414 tenyészet 17,5 órás korában mért transzkriptum szintek arányával. Az ábrán csak egy mutáns törzs értékei láthatóak, de az azonos genotípusú törzsek konzisztens eredményt mutattak. Az adatok legalább két független kísérletből és három mérésből származnak.



**13. ábra** A *T. reesei vell* deléciójának vagy túltermeltetésének hatása két celluláz, egy hemicelluláz és a celluláz regulátor gén transzkriptum szintjére szoforózzal való indukálás után. Glicerinen való előnövesztés után szoforózzal való indukálást követő 0 és 4 óras korban mért transzkriptum szintek, melyek értékei a 12. ábrában leírtak szerint lettek specifikálva. **Fekete szín:** QM 9414 törzs, **szürke szín:** OEvell törzs, **fehér szín:** Δvell törzs. A **csillaggal** jelölt esetekben a relatív mRNS szintje a kimutatási határ alatt volt. Az ábrán csak egy mutáns törzs értékei láthatóak, de az azonos genotípusú törzsek konzisztens eredményt mutattak. Az adatok legalább két független kísérletből és három mérésből származnak.

A 13. ábrán látható, hogy a szoforóz adagolást követő 4. órában nagymértékben emelkedett a *cel7a*, a *cel6a*, *xyn2* és *xyr1* transzkriptumok relatív szintje a QM 9414 törzsben, míg a *xyn2* gén kivételével a OEvell törzs esetén ez a szint a duplája volt. A Δvell törzsekben a vizsgált

transzkriptumok alig detektálhatóak. Noha a *xyl1* transzkriptum szintje a *Δvell* törzsnek a vizsgálat 0. órájában magasabb volt, mint a QM 9414 törzsnek, de akumulálódásának szintje a 4. órára a szülői törzshöz képest nagymértékben lecsökkent. Összességében kijelenthetjük, hogy a *vell* gén hiánya a celluláz gének expresszióját csökkenti, így a VEL1 protein esszenciális ehhez a folyamathoz. Továbbá megjegyzendő, hogy a *vell* gén túltermeltetése megnöveli a celluláz gének transzkripcióját.

## **5.2. A *Trichoderma reesei* LAE1 funkciójának vizsgálata konstans növekedési rátákon**

### **Kísérleti rendszer kidolgozása**

Kemosztát típusú, folytonos fermentációt alkalmaztunk, mely során konstans biomassa és szénforrás limitált körülményeket hoztunk létre. Két hígítási rátát beállítva ( $D=0,075\text{ h}^{-1}$  és  $D=0,02\text{ h}^{-1}$ ) tenyésztettük a QM 9414 szülői, *Δlae1* és *OElae1* *T. reesei* törzseket D-glükóz szénforráson. Ez a két hígítási ráta (későbbiekben magas illetve alacsony növekedési ráta) alkalmas a karbon katabolit repressziós illetve derepressziós állapot létrehozásához *T. reesei* és *A. nidulans* fonalas gombák esetén (Karaffa és mtsai., 2006; Ilyés és mtsai., 2004). A biomásszára vonatkoztatott hozam 46 és 53 % (a képződött biomassa (g)/felhasznált szénforrás (g)\*100) közé esett a tenyésztések során, mely megfelel a különböző gombák esetén mért adatokkal (köztük a *T. reesei*-vel is) D-glükóz limitált tenyészeteknél (Karaffa és mtsai., 2006; Portnoy és mtsai., 2011; Brown 1990). A steady-state D-glükóz koncentráció a tápoldatban 0,03-0,05 mM között volt mind a két hígítási rátán, mely igazolja, hogy a tenyészet valóban glükóz limitált volt. A  $0,02\text{ h}^{-1}$  hígítási rátán növekvő QM 9414 törzs kis mértékben konidiospórát hozott létre, míg a *Δlae1* mutáns törzsnél ez nem volt tapasztalható. Továbbá mindkét törzs

esetén kisméretű pelletesedést tapasztaltunk  $0,075 \text{ h}^{-1}$  hígítási rátán, bár túlnyomó részt fonalas morfológia volt jellemző. Összességében ez a kismértékű morfológiai különbség a két törzs és a két hígítási ráta között nem valószínű, hogy befolyásolta a kísérleti stratégiát és az eredményeket.

### **LAE1 protein hiánya dominánsabb magas hígítási rátán**

A kemosztát fermentációk steady-state állapotában vett mintákból a totál RNS-t izolálást követően reverz transzkriptáz segítségével cDNS-t szintetizáltunk, melyet microarray analízissel vizsgáltunk. Metz és munkatársai (2011) közleményében leírt beállításokkal elemeztük a microarray adatokat, mely alkalmas a különböző expressziós szintek közötti szignifikáns különbségek felismerésére. Az összesen 9123 megvizsgált gén közül 1069 génnek volt a transzkripciója minimum kétszeresen alul- vagy felülszabályozott ( $p < 0,05$ ) a *Δlae1* törzsben a QM9414 szülői törzssel összehasonlítva (3. táblázat). Az 1069 gén közül csak 182 génnek a kifejeződésénél lehetett több mint kétszer annyi terméket mérni mind a két hígítási rátán. Magas hígítási rátán ( $0,075 \text{ h}^{-1}$ ) nagyobb volt a különbség a *Δlae1* törzs és a szülői QM 9414 törzs géneinek regulációja között, ugyanis magas hígítási rátán 930, míg alacsony hígítási rátán 321 gén volt alul- vagy felülszabályozott. Azok közül a gének közül, melyeknek megváltozott a transzkriptum szintje magas növekedési rátán a *T. reesei Δlae1* mutáns törzsben, a 43%-a volt alulszabályozott, míg alacsony növekedési rátán ez az arány 36% volt.

Az *OELae1* mutáns és a szülői törzs összehasonlításakor a gének csak egy kis részének (113 gén) fejeződött ki eltérően. 89 génre a magas, 28 génre az alacsony, míg 4 génre mindkét növekedési ráta hatással volt. Magas növekedési rátán a megváltozott regulációjú géneknek csak egy kis része volt alulszabályozott, míg alacsony növekedési rátán a gének 61%-a volt

alulszabályozott (3. táblázat). Az adatok igazolása érdekében az eltérő expressziót mutató gének egy kisebb részével qPCR analízist hajtottunk végre (6. függelék).

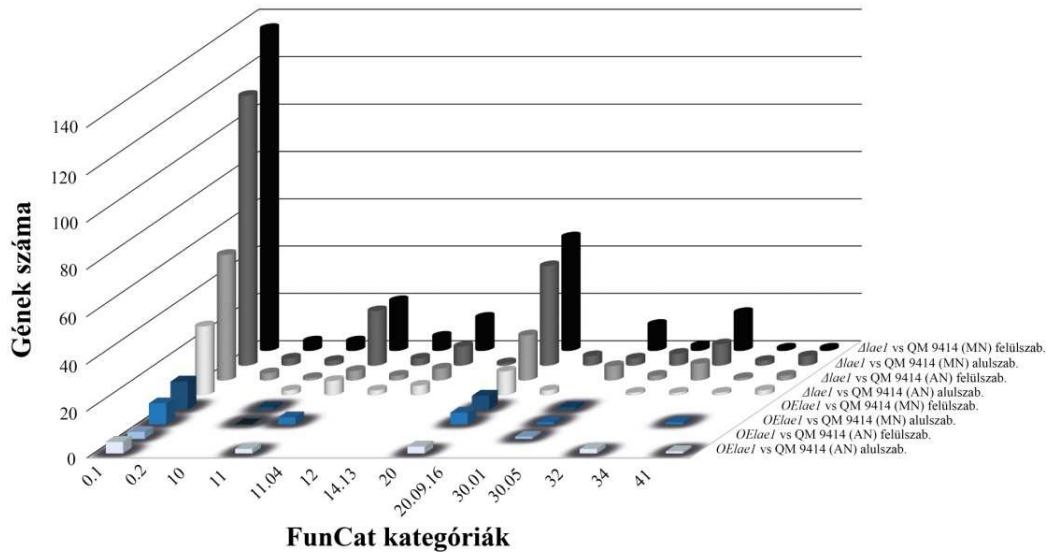
**3. táblázat A *T. reesei* QM 9414 törzs génkifejeződés különbségeinek összehasonlítása  $\Delta lae1$  és  $OElae1$  mutáns törzsekkel, két hígítási rátán**

Törzsek összehasonlítása	D (h <sup>-1</sup> )	Felülszabályozott		
		összes gén*	árva gének	ismeretlen gének
<i>Δlae1</i> vs. QM 9414	0,075	523	33	193
<i>Δlae1</i> vs. QM 9414	0,02	203	10	79
<i>OElae1</i> vs. QM 9414	0,075	53		22
<i>OElae1</i> vs. QM 9414	0,02	11		4
Törzsek összehasonlítása	D (h <sup>-1</sup> )	Alulszabályozott		
		összes gén*	árva gének	ismeretlen gének
<i>Δlae1</i> vs. QM 9414	0,075	407	16	138
<i>Δlae1</i> vs. QM 9414	0,02	118	9	40
<i>OElae1</i> vs. QM 9414	0,075	36	1	13
<i>OElae1</i> vs. QM 9414	0,02	17	2	3

\*beleértve az ismeretlen és árva géneket is

A vizsgálati körülmények között a gének harmada (melyek szignifikánsan alul- vagy felülszabályozottak a QM 9414 szülői törzshöz képest) ismeretlen proteinek kódolnak vagy ún. árva géneket. Az *OElae1* törzs megváltozott expressziójú génei azonban csak kisebb arányban tartalmaznak ilyen ismeretlen vagy árva géneket alacsony növekedési rátán (3. táblázat). Ahhoz, hogy a LAE1 funkciójához kapcsolható globális változásokat kielemezzük, az ismert géneket, ill. melyeknek a funkciója

megjósolható FunCat kategorizálással csoportosítottuk (Ruepp és mtsai., 2004). A gének által kódolt proteinek többsége, melyek expressziója szignifikánsan különbözött a szülői törzshöz képest a metabolizmushoz köthető celluláris transzportok és a transzkripcióhoz köthető kategóriákba sorolhatóak (14. ábra). Az eredményként kapott kategóriák közül a gének száma egyikben sem kiemelkedő szignifikánsan a többi kategóriával szemben ( $p > 0,05$  minden esetben). Ez azt mutatja, hogy a *Δlae1* mutáns hatása a sejt szintű folyamatokban nem általános az egyes kategóriákban.



**14. ábra** A kiválasztott FunCat kategóriákba sorolható gének expressziójának különbségei a *T. reesei* *Δlae1* és *OElae1* törzsekben magas (MN), illetve alacsony (AN) növekedési ráta mellett. Azok a gének láthatóak, melyek legalább kétszeresen felülszabályozottak (felülszab.) vagy alulszabályozottak (alulszab.) a *T. reesei* QM 9414 törzshöz képest. FunCat kategóriák: **0.1**: metabolizmus; **0.2**: energia előállítás; **10**: sejtciklus és DNS replikáció; **11**: transzkripció; **11.04**: RNS folyamatok; **12**: fehérjeszintézis; **14.13**: fehérje degradáció; **20**: transzport; **20.09.16**: celluláris export és szekréció; **30.01**: sejten belüli jelek; **30.05**: transzmembrán jelek; **32**: sejt védelem; **34**: környezeti interakciók; **41**: egyedfejlődés.

A LAE1 módosító hatását talán jobban tükrözi, ha a szignifikánsan különbözően expresszáldott géneket FunCat alkategóriákba soroljuk. Összehasonlítottuk a LAE1 függő gének arányát az alkategóriákban és ezeknek az alkategóriáknak az arányát a teljes *T.reesei* genomban. Így már szignifikáns változásokat figyelhettünk meg. A  $\Delta lae1$  mutáns magas növekedési rátán a következő proteinek kifejeződésére volt szembetűnő hatással: aminosav transzporterek, heteroinkompatibilis (HET) proteinek, GCN5-N-acetiltranszferázok és poliketid szintázok (PKS) (4. táblázat). Ezek közül az első három géncsoportba tartozó gének kifejeződésének szintje alacsony növekedési rátán még nagyobb változást mutatott. Viszont a PTH11-típusú transzporterek magas növekedési rátán mutattak magasabb expressziós szintet. Továbbá a metabolizmusban részt vevő LAE1 függő gének többsége az aminosav anyagcserében fordul elő és magas növekedési rátán főleg alulszabályozottan. Az intermedier anyagcserében (szénhidrát, lipid, aminosav és nukleotid anyagcsere) részt vevő gének expressziója csak nem szignifikáns módon változott meg alacsony növekedési rátán.

A szekunder metabolizmust tekintve, a LAE1 funkciójának hiánya a 11 poliketid szintázok (PKS) és a 10 nemriboszomális peptid szintázok (NRPS) közül csak 3-3-ra volt hatással (4. táblázat). Ezeknek a géneknek az alul- vagy felülszabályozottsága csak a magas növekedési rátán volt jellemző, az NRPS Trire2:71005 gén kivételével, mely a  $\Delta lae1$  mutánsban mind a két növekedési rátán alulszabályozott. Meglepő azonban, hogy egy korábbi tanulmányban (Karimi-Aghcheh és mtsai., 2013) a *T. reesei* NRPS génjei közül csak a sziderofór szintáz (Trire2:69946) volt egyértelműen alulszabályozott a  $\Delta lae1$  mutánsban.

**4. táblázat Néhány FunCat alkategóriába tartozó gének kifejeződésének megváltozása a *Alae1* mutáns és QM9414 törzs összehasonlításakor.**

Funkció	FunCat	D=0,075 (h <sup>-1</sup> )		D=0,02 (h <sup>-1</sup> )		Genomban van		p-érték*
		Down	Up	Down	Up	db	%	
Aminosav transzporterek	20_01_07	11	7	2	3	36	0,4	<0,01
C2H2 transzkripció faktorok	11_02_03_04**	3	6	0	1	54	0,6	
Citokróm P450 proteinek	32_07	2	6	1	0	61	0,7	
Flavin monooxigenázok	16_21_05	2	5	0	4	43	0,5	
GCN5N-acetiltranszferázok	14_07	5	3	2	1	20	0,2	<0,02
Glikozid hidrolázok	01_25_01	6	10	0	7	194	2,1	
Heteroinkompatibilis proteinek	36_20	4	1	1	1	23	0,25	<0,05
Fő facilitátor szupercsalád	20_03	16	21	3	11	174	1,9	
Mitokondriális funkció	42_16	3	3	3	1	83	0,9	
NRPS	01_20_36	1	2	1	0	10	0,11	
PKS	01_20_05	2	1	0	0	12	0,13	<0,05
PTH11-receptorok	30_05_02_24	2	3	0	1	24	0,25	
SSCRP	70_27	14	12	0	3	130	1,4	

\*Csak azoknál az alkategóriáknál adtuk meg, ahol a statisztikailag megfelelő volt a mutánsokban a különbség

\*\*A C2H2 transzkripció faktoroknak nincs saját számuk



Hasonló analízist végeztünk azokkal a génekkel melyeknek legalább kétszeresen különbözött a regulációja az *OELaeI* mutáns és a szülői törzs között, de nem találtunk egyetlen génekategoriát vagy alkategoriát sem, melyeknél a transzkriptumok akkumulálódása szignifikáns mértékű lett volna.

### **A LAE1 funkciójának hiánya a növekedési ráta függő génextpressziós szabályozásra hat**

Az eddigi adatokból kiderült, hogy mely génekre hat a LAE1 funkciója konstans növekedési rátán, de feltételeztük, hogy vannak gének, amelyekre a LAE1 a megváltozott növekedési rátán keresztül hat. Kétféleképpen vizsgáltuk meg az adatokat. Az egyik módszer tartalmazta azokat a géneket, melyek növekedési ráta függőek *T. reesei* vad törzsben, de *ΔlaeI* mutánsban nem. A másik módszerrel olyan géneket kerestünk, melyek expressziója függ a növekedési rátától *ΔlaeI* mutánsban, de a vad törzsben nem. Az első módszer esetén 758 gént, míg a másodikonál 131 gént kaptunk. Az így kapott gének ismeretében azt láttuk, hogy nem volt olyan specifikus génekategoriá, melyben szignifikánsan több gén besorolható lett volna. Ez azt mutatja, hogy a LAE1 specifikus génekre hat inkább, mintsem hasonló funkciójú géncsoportokra. Hasonló analízist végeztünk az *OELaeI* törzssel, de az eddigiekhez hasonlóan kevesebb gént kaptunk, melyek funkciója javarészt ismeretlen.

Adatelemzést végeztünk azokat a géneket keresve, melyek növekedési ráta függő expressziója a *ΔlaeI* mutánsban visszatért, azaz ellenkező a szülői törzssel. 26 gént találtunk, melynek kifejeződése nagyobb volt magas növekedési rátán a *T. reesei* QM 9414 törzsben és alulszabályozott *ΔlaeI* mutánsban. Ezzel ellentétesen 12 gén viselkedett. Ezek a gének nem hasonló funkciójúak, mert egyetlen FunCat kategóriába vagy alkategoriába sem csoportosultak nagyobb számban (7. függelék).

### **A LAE1 funkciójának hatása a génklaszterben elhelyezkedő génekre**

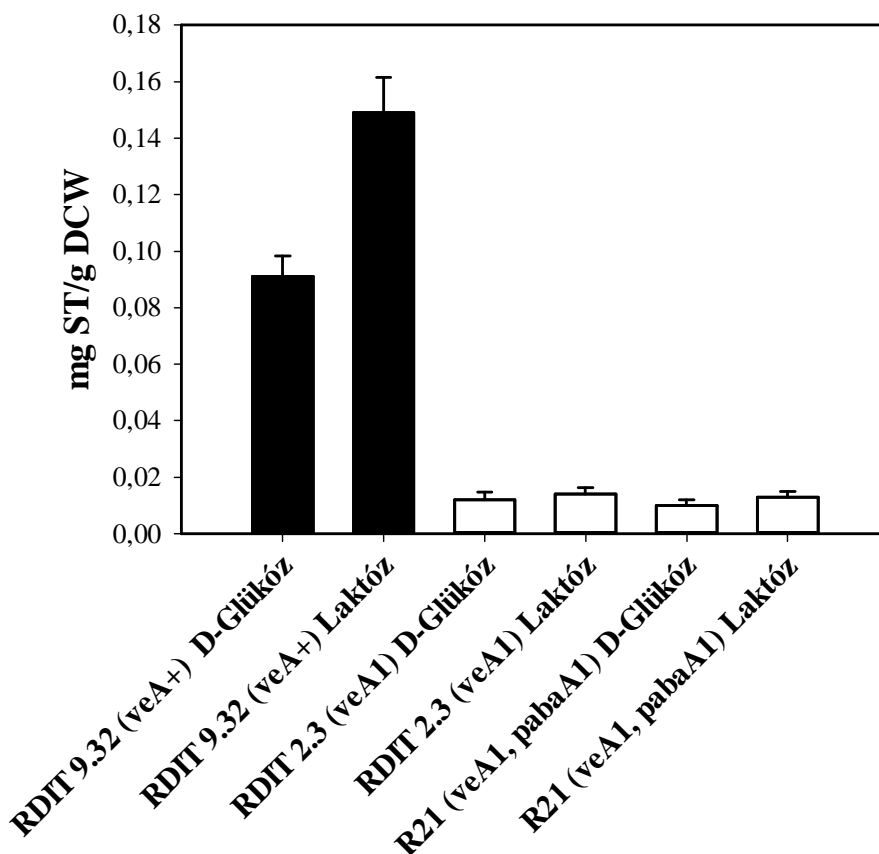
Kíváncsiak voltunk, hogy azok a gének, melyekre a LAE1 funkciója hat klaszterben vannak-e a genomban. Magas növekedési rátán a 930 génből (melyeknek expressziós szintje különbözött a *lae1* és QM 9414 törzs között) 124 gén, míg alacsony növekedési rátán 321 génből 31 volt génklaszterben a genomban. Magas növekedési ráta során keletkezett transzkriptumok 16 génklaszterből, míg alacsony növekedési rátán kapott transzkriptumok 9 génklaszterből származnak. Ezek közül 4 olyan génkasztert találtunk, melyek mindkét körülményhez köthetőek. Körülbelül csak minden tizedik gén van génklaszterben a genomban, amelyekre a LAE1 funkciójának a hiánya hatással van.

### **5.3. Sterigmatocisztin képződésének vizsgálata vad típusú *veA* gént hordozó *A. nidulans* süllyesztett tenyészetében**

#### **Kísérleti rendszer kidolgozása**

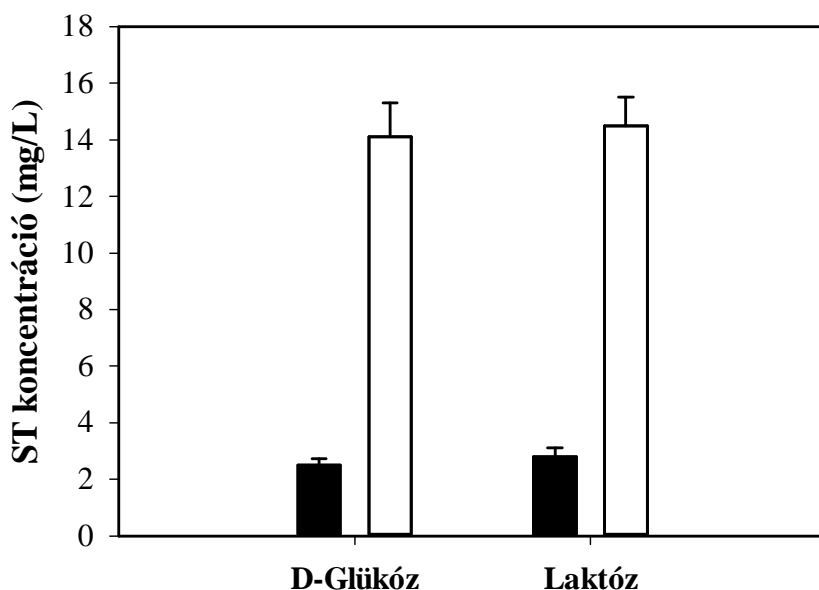
Az *A. nidulans* *velvet* génje (*veA*) részt vesz a különböző sejtfolyamatok szabályozásában, mint az aszexuális/szexuális egyedfejlődés és a szekunder metabolizmus (Calvo 2008). A *veA* gén start kodonjában történt pontmutáció eredményeképpen (melynek jelölése *veA1*) az ST termelés rendellenes (Stinnett és mtsai., 2007). Megvizsgáltuk az ST képződésének mértékét az általunk alkalmazott süllyesztett kondíciók között két *veA1* és egy *veA+* genotípusú törzssel D-glükóz és laktóz szénforrásokon. Mindkét szénforráson a biomasszára vonatkoztatott ST produkció 10-15-ször magasabb a vad típusú *veA* alléllal rendelkező törzsben (15. ábra). A *veA1* mutáns törzs tenyészetében a maximális ST koncentráció éppen a kimutathatósági határunk felett volt. Megjegyezzük, hogy amíg a maximális ST koncentráció

értéke mg/L dimenzióban magasabb D-glükóz szénforráson, addig a biomasszára vonatkoztatott  $\mu\text{g/gDCW}$  dimenzióban szignifikánsan ( $p < 1\%$ ) magasabb laktóz szénforráson, mely a csökkent növekedésnek és így az alacsonyabb biomasszának köszönhető ezen a szénforráson. Az adatokból kiderül, hogy még *veA*<sup>+</sup> háttérben is a képződött biomassza tömege és a megtermelt ST mennyiségének az aránya hozzávetőlegesen egy a tízezerhez.



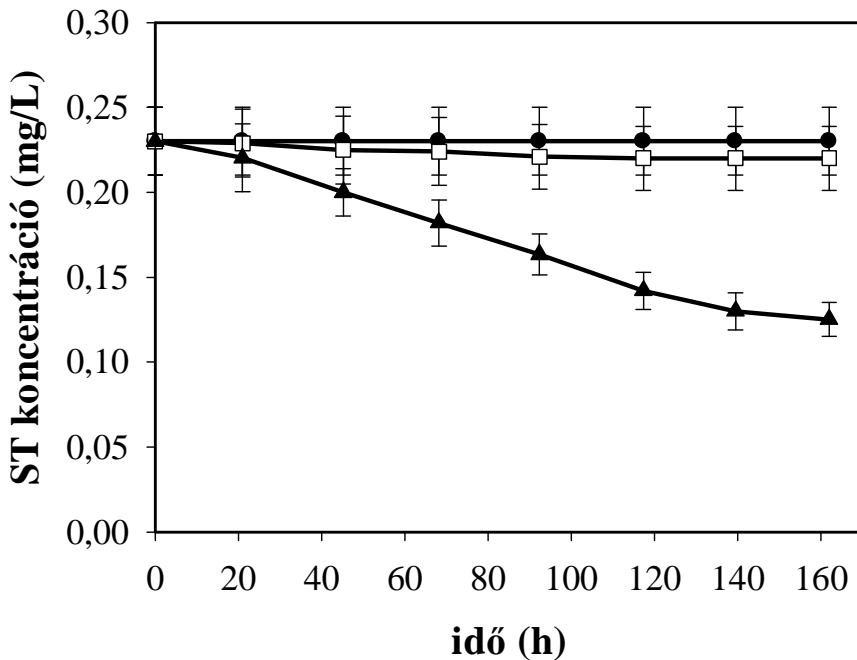
**15. ábra** A maximális biomasszára vonatkoztatott ST produkció a vad típusú *veA* allélt hordozó RDIT 9.32-es, a *veA1* alléllal rendelkező RDIT 2.3 és R21 *A. nidulans* törzseknek szénforrásként D-glükózt vagy laktózt tartalmazó folyékony tápoldatban történő tenyésztés során. Az *A. nidulans* törzsek genotípusát és fenotípusát a 1. táblázat tartalmazza. DCW (dry cell weight): száraz sejtömeg.

Ahhoz, hogy megvizsgáljuk az általunk alkalmazott tenyésztési kondíciók hogyan befolyásolják az ST termelését, összehasonlítottuk a szilárd felületen, illetve sülyesztett körülmények között növekedő tenyészetek ST termelését. Az ST produkció sülyesztett, folyékony tápközegben 4-5-ször kisebb, mint agarral szilárdított táptalajon mind D-glükóz, mind laktóz szénforráson, de az extrakció optimalizálásával és az analitikai módszerünkkel reprodukálható módon tudjuk meghatározni az ST koncentrációját mindkét szénforrást alkalmazva. Az *A. nidulans* ST produkciója folyékony, sülyesztett tenyésztés során is biztonságosan meghaladja a módszerünk kimutatási határát még minimál táptalajon is, mely 0,1 mg/ml (16. ábra).



**16. ábra. Vad típusú *A. nidulans* (RDIT 9.32) maximális ST produkciója D-glükóz és laktóz szénforrásokon, melyeknek kezdeti koncentrációja 15 g/L volt.** Fehér oszlop: agarral szilárdított, fekete oszlop: folyékony tenyésztés során mért ST koncentráció (mg/L). Az adatok három egymástól független mérésekből származnak. Az ST extrakciója és analitikai protokollja az Anyagok és módszerek fejezetben leírtak szerint történt.

Az ST stabilitása magas neutrális pH-jú vizes oldatban (Septien és mtsai., 1994). Ezt a megfigyelést alátámasztja az a vizsgálatunk, mely során a gombafermentációknál alkalmazott fizikai paramétereket hoztunk létre rázott lombikban, és sem a vizes, sem előzőleg sterilizett tápoldatban nem változott az ST koncentrációja hosszú inkubálási időn keresztül. A mikroorganizmusok (beleértve a gombákat is) azonban képesek degradálni az aflatoxinokat (Hamid és Smith 1987; Wu és mtsai., 2009). Megvizsgáltuk, hogy az ST esetleges *A. nidulans* általi degradációja befolyásolja-e a kísérleteink során az eredményeinket. ST-t nem termelő *veAI* genotípusú *A. nidulans* törzset glicerinen felnevesztve, majd ST standard hozzáadásával folytattuk 7 napig a tenyésztést.

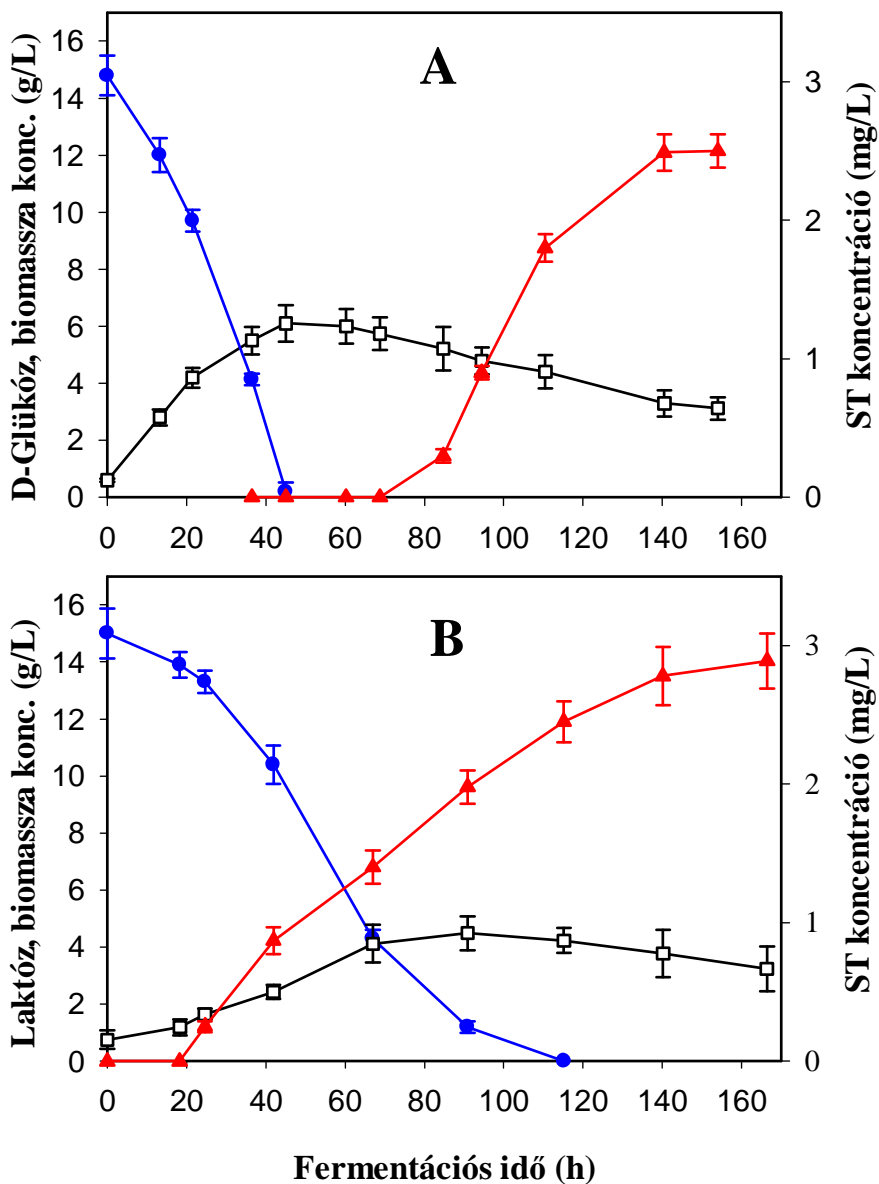


**17. ábra.** A hozzáadott sterigmatocisztin standard koncentrációjának változása steril vízben (●), steril, D-glükózt tartalmazó minimál tápoldatban (□) és D-glükózt tartalmazó tápoldatban előnevesztett *A. nidulans* tenyészetben (▲).

Az ST koncentrációja idővel csökkent, melynek átlagos mértéke 0,14  $\mu\text{g/gDCW}\cdot\text{h}$  volt (17. ábra). Ez az érték azt mutatja, hogy az *A. nidulans* tulajdonképpen képes degradálni ezt a mikotoxint (és így elméletileg a tenyésztés minden egyes időpontjában az aktuális ST koncentráció a képződés és lebontás eredménye), annak mértéke jóval a képződési ráta alatt van, mely így csak elhanyagolható mértékben befolyásolja a tenyészetünk produktivitását és ennek reprodukálhatóságát. Ezeket a vizsgálatokat elvégezve arra jutottunk, hogy az általunk alkalmazott kísérleti rendszer megfelel a kitűzött céljainknak.

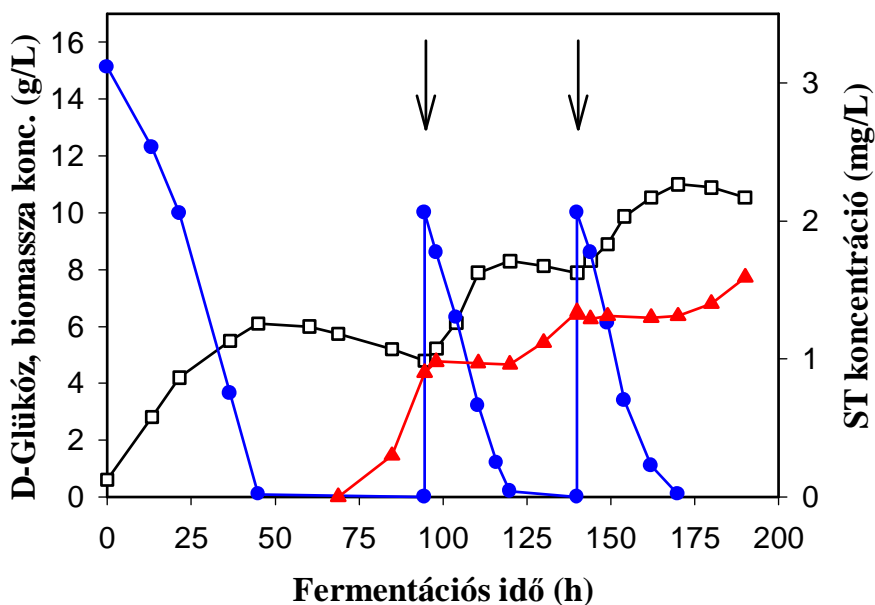
### **A sterigmatocisztin képződésének kinetikai vizsgálata batch és fed-batch tenyésztés során**

A szénforrás hasznosítási ráta és az ST képződés közötti összefüggés vizsgálata érdekében vad típusú törzset minimál tápoldatot D-glükózzal (gyorsan metabolizálódó), valamint a lassan hasznosuló laktózzal kiegészítve tenyésztettünk. Az ST képződésének időprofilja a két szénforrás esetén egyértelmű különbséget mutatott. D-glükózt alkalmazva az ST csak a D-glükóz teljes hasznosulása után volt detektálható, mely a leoltást követően kb. 1,5 nap után volt tapasztalható (18. ábra A). Laktóz szénforráson az ST már a növekedés során megjelent, amikor még a diszacharid nagy része elérhető volt a tápoldatban (18. ábra B). Habár a növekedés leállt a D-glükóz kiürülésével a tápoldatból, ST termelés volt tapasztalható további 70 óráig és végül 2,5 mg/L koncentrációt ért el. Az ST végkoncentrációja 2,8 mg/L volt laktóz tartalmú tápoldatban, ami csak kissé magasabb, de ez a mennyiség biomasszára vonatkoztatva már szignifikánsan magasabb, mint D-glükózon. A kinetikai adatokból arra következtethetünk, hogy a D-glükóz teljes hasznosítása előtt nincs ST termelés.



**18. ábra.** *A. nidulans* vad törzs (RDIT 9.32) növekedése és ST termelése batch fermentáció során. Biomassa koncentrációja (g/L): □, szénforrás koncentrációja (g/L): ●, sterigmatocisztin koncentrációja (mg/L): ▲ minimál tápoldatban 15 g/L kezdeti (A) D-glükóz, (B) laktóz szénforrással. Glicerinen előnövesztett micéliumot alkalmaztunk inokulumként minden egyes fermentáció indításakor.

Annak megállapítására, hogy a D-glükóz jelenléte gátolja-e az ST bioszintézist, azt követően, hogy annak termelése megkezdődött, fed-batch tenyésztést hajtottunk végre. Amikor a vad törzs ST termelése elérte az 1 mg/L koncentrációt (kb. 94 h), további D-glükózt adagoltunk a tápoldathoz. Az extra D-glükóz a biomassza gyarapodás mellett az ST termelést azonnal leállította (19. ábra). A D-glükóz gyors kimerülését követően az ST termelés folytatódott. Lényegében azonos kinetikai jelenséget tapasztaltunk a következő D-glükóz adagolása után, mely a fermentáció 140. órájában történt.

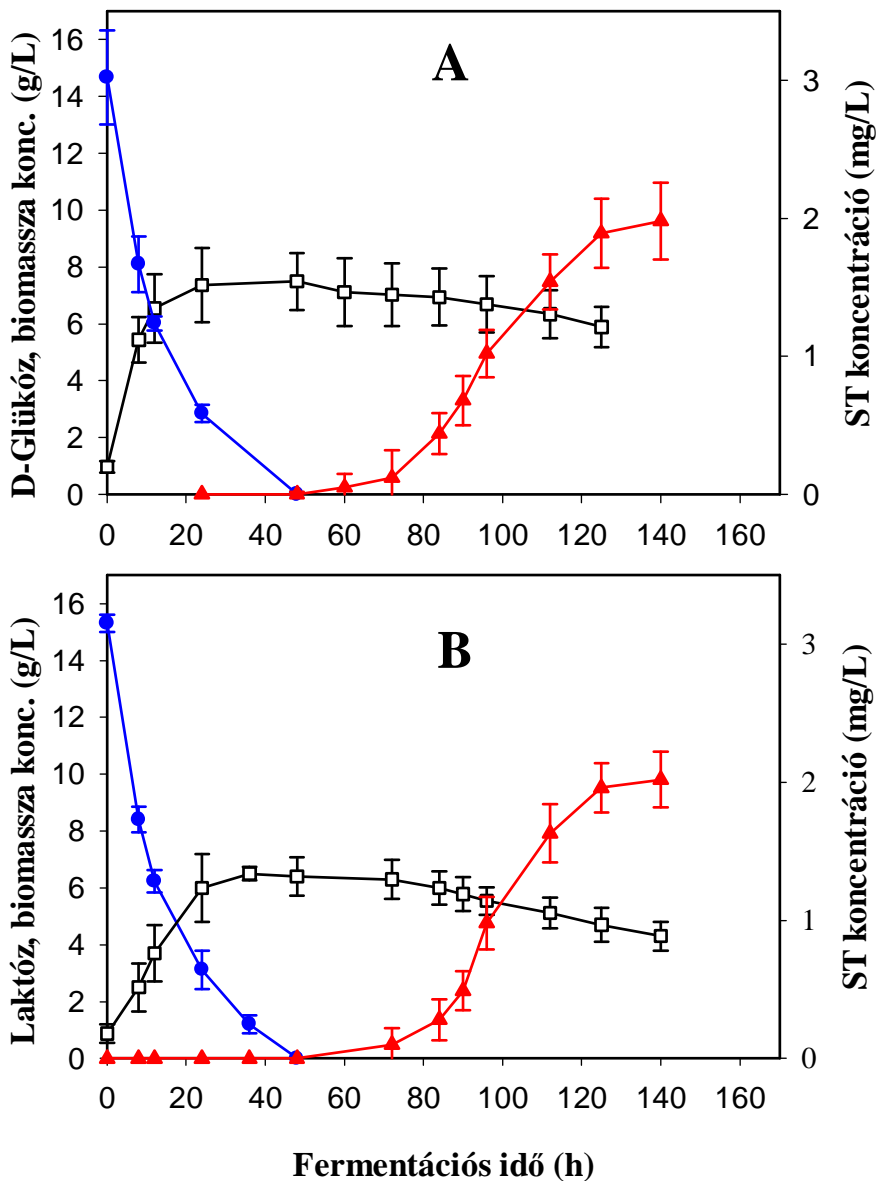


**19. ábra.** *A. nidulans* vad törzs (RDIT 9.32) növekedése és ST termelése fed-batch fermentáció során. Biomassa koncentrációja (g/L): □, szénforrás koncentrációja (g/L): ●, sterigmatocisztin koncentrációja (mg/L): ▲ minimál tápoldatban. A tenyésztés során további D-glükózt adagolás (↓) történt a 94. és 140. órában. Az eredmények átlag adatokat tartalmaznak, melyet 3 független tenyésztésből kalkuláltunk. Az átlagos standard hibája a D-glükóz koncentrációjának 5%, míg a biomassza koncentrációnak 10% volt. Az tenyésztet inokuluma glicerinen előnövesztett tenyésztetből származik úgy, mint a szakaszos fermentációk esetén.



### **Sterigmatocisztin képződése CreA mutáns *A. nidulans*-ban**

Az eredmények azt sugallják, hogy az ST bioszintézis *A. nidulans*-ban a karbon katabolit repressziós mechanizmus alatt áll a D-glükóz hasznosítása során. A másik lehetőség, hogy a laktóz lassú metabolizmusa és ezáltal a lassú növekedési ráta okozza a laktóz tartalmú tápközegben tapasztalt eredményeket. A hipotézis tesztelése érdekében megismételtük a fermentációkat karbon katabolit derepresszáló mutáns törzssel ( $\Delta creA$ ,  $veA^+$ ). A tenyészet D-glükóz hasznosítása és biomassza képzése hasonló a vad törzshöz, míg a laktóz metabolizmusa gyorsabb volt a referenciatörzshöz képest (20. ábra A és B). A laktóz hasznosítása a CreA mutáns törzsnek tulajdonképpen majdnem olyan gyors, mint a D-glükózé a vad törzs esetén, és a biomassza hozama ( $Y_{x/s}$ ) is szokatlanul magas volt ezen a diszacharidon (5. táblázat). A legfontosabb jelenség mégis az, hogy az ST csak a fermentáció késői szakaszában jelent meg, amikor a micéliumok szétesése megkezdődött. Ez az időprofil nagyon hasonlít a vad törzs ST termeléséhez D-glükózon, viszont kisebb ST koncentrációt ért el a tenyésztés végére. Ezek alapján úgy tűnik, hogy a karbon asszimilációs ráta és a biomassza képződési ráta fordítottan korrelál az ST formálással *A. nidulans* tenyészetekben, és a lassú növekedés az előfeltétele a növekedés közbeni ST produkciónak.



**20. ábra A. nidulans CreA mutáns törzs (ZNEF 8.55) növekedése és ST termelése batch fermentáció során.** Biomassa mennyisége (g/L): □, szénforrás koncentrációja (g/L): ●, sterigmatocisztin koncentrációja (mg/L): ▲ minimál tápoldatban 15 g/L kezdeti (A) D-glükóz, (B) laktóz szénforrással. Glicerinen előnövesztett micéliumot alkalmaztunk inokulumként minden egyes fermentáció indításakor.

**5. táblázat. *A. nidulans* tenyészetek növekedésének kinetikai paraméterei**

<b>Törzs, szénforrás</b>	<b>Szénforrás hasznosítási ráta (g/h)</b>	<b>Biomassza képződési ráta (g<sub>DCW</sub>/h)</b>
Vad törzs, D-glükóz	0.30 ± 0.03	0.15 ± 0.02
Vad törzs, laktóz	0.14 ± 0.02	0.07 ± 0.02
CreA mutáns, D- glükóz	0.29 ± 0.03	0.14 ± 0.01
CreA mutáns, laktóz	0.27 ± 0.03	0.13 ± 0.02

**Az *A. nidulans* ST termelése folytonos, kemosztát fermentációk során**

Az eddigi eredmények arra engednek következtetni, hogy az ST képződés a lassú szénhasznosítási rátával esik egybe, mely alacsonyabb növekedési rátát eredményez. E jelenség további megerősítése érdekében kemosztát típusú fermentációs rendszert kialakítva konstans biomassza produkció mellett cukor limitációt állítottunk be. D-glükózt alkalmazva szénforrásként két különböző hígítási rátát választottunk ki (0,09 h<sup>-1</sup> és 0,02 h<sup>-1</sup>) mind a CreA mutáns mind a vad törzs esetén. Ez a két hígítási ráta (későbbiekben magas illetve alacsony növekedési ráta) alkalmas az *A. nidulans* karbon katabolit repressziós illetve derepressziós állapotának létrehozásához (Ilyés és mtsai., 2004). A vad típusú törzs végig fonalas növekedést mutatott, míg a CreA mutáns törzs esetén kismértékű pelletesedést tapasztaltunk, de ez a morfológiai különbség nem olyan mértékű, hogy befolyásolta volna a kísérletünket.

Az ST termelésének vizsgálata folytonos tenyésztés során azt mutatta, hogy a hígítási ráta (mely megegyezik a specifikus növekedési rátával) fordítottan korrelál az ST képződésével. Magas növekedési rátán nem képződik ST, míg

az alacsony növekedési ráta ST termeléssel párosult, melynek mértéke 0,5 mg/L koncentrációt ért el (6. táblázat). Hasonló eredmény született CreA mutáns törzs esetén is, melyből arra következtethetünk, hogy az ST képződése nem CreA szabályozás alatt áll D-glükózon növekedve.

**6. táblázat. Kemosztát típusú folytonos fermentáció hígítási rátájának hatása a sterigmatocisztin képződésre *A. nidulans* vad, illetve CreA mutáns törzs tenyésztésekor**

<b>Törzs</b>	<b>Hígítási ráta (1/h)</b>	<b>Steady-state sterigmatocisztin koncentráció (mg/L)</b>
Vad törzs ( <i>veA</i> )	0.090	< 0.1
	0.020	0.5 ± 0.07
CreA mutáns törzs ( <i>veA</i> )	0.090	< 0.1
	0.020	0.4 ± 0.05

## 6. Eredmények megbeszélése

A fonalas gombák, a dimorf gombák kivételével vegetatív hifákat növesztenek, amíg a differenciálódáshoz alkalmassá nem válnak. A differenciálódást környezeti tényezők befolyásolják, mint az elérhető tápanyagok, gomba feromonok, stressz hatások, szilárd felület, oxigén ellátottság, a CO<sub>2</sub> és O<sub>2</sub> aránya és a különböző hullámhosszú fény. A környezeti ingerek hatására végbemenő szabályozási mechanizmusokat több globális regulátor együttesen irányítja. A fény által kiváltott szabályozást a Velvet doménnel rendelkező, fonalas gombákban konzervált globális regulátor a VeA fehérje befolyásolja. A VeA protein a Velvet heterotrimer komplex (LaeA-VeA-VelB) tagja, melynek funkcióját az elmúlt 15 évben számos kutatócsoport vizsgálta.

### 6.1. A *Trichoderma reesei* VEL1 proteinjének hatása az egyedfejlődésre és extracelluláris enzimtermelésre.

Az, hogy a Velvet komplex hogyan befolyásolja a szekunder metabolizmust széleskörűen kutatott téma, míg arról, hogy a *veA/velA* milyen hatással van az extracelluláris enzimek szintézisére eddig csak két közlemény született. Kamerewerd és munkatársai bemutatták, hogy a *P. chrysogenum* PcchiB1 génje (egy V. osztályba sorolt kitinázt kódol), mely részt vesz a sejtfa sértetlenségének megőrzésében erőteljesen alulszabályozott PcVela hiányában (Kamerewerd és mtsai., 2011). Duran és munkatársai pedig arról számoltak be, hogy az *A. flavus* *ΔveA* mutánsa proteázok kifejeződésében károsodott, míg  $\alpha$ -amilázt nagyobb mennyiségben termelt (Duran és mtsai., 2014). Az iparilag jelentős celluláz termelő *T. reesei* fonalas gomba LAE1 fehérjéről tudjuk, hogy nagy hatással van a celluláz gének transzkripciójára, mert a *lae1* hiánymutánsban teljesen megszűnt a cellulázok expressziója (Seiboth és mtsai., 2012b). *T. reesei*-ben, más gombákhoz is hasonlóan a

LAE1 és VEL1 is kapcsolódhat egymáshoz (Karimi-Aghcheh és mtsai., 2013), ezért feltételezhető volt, hogy a cellulázok kifejeződésére a *vel1* gén is hatással van. A kísérleteink pedig bizonyítják, hogy a cellulázok expressziója teljes mértékben függ a *vel1* funkciójától, ahogyan a *lae1* működésétől is (Seiboth és mtsai., 2012b). E két jelenségből arra következtethetünk, hogy a cellulázok expresszióját a Velvet komplex szabályozza. Habár a dolgozatomban csak két cellulázt és egy xilanázt vizsgáltunk, az általánosításunk az összes cellulázra és hemicellulázra abból adódik, hogy ezek szoforózzal és laktózzal együtt indukálódnak, ezért biztonsággal feltételezhetjük, hogy hasonló szabályozási mechanizmus érvényes a többi enzimre is. Megerősíti ezt a gondolatmenetet, hogy a cellulázok és hemicellulázok központi regulátor XYR1 transzkripció szintje nem teljesen, de nagymértékben lecsökkent. Ezzel megegyező jelenség történt a *T. reesei* *Alae1* mutáns törzsben is. Ráadásul a *xyr1* transzkripció szintje, a gént konstitutív promóterrel ellátva se tudott megemelkedni *Alae1* mutánsban (Seiboth és mtsai., 2012b).

A *T. reesei vel1* gén funkciójának hatását nem csak az extracelluláris enzimtermelésre, hanem a gomba egyedfejlődésére is megvizsgáltuk. Ez a globális regulátor konzervált az aszkomikóta gombákban, viszont a *veA* gén ortológjainak hatása a különböző gombanemzetségekben nagy változatosságot mutat a mikroba egyedfejlődésében (Bayram és Braus 2011; Calvo 2008; Kim és mtsai., 2014). A legszembetűnőbb példa az aszexuális sporuláció, melyet a *VeA/VeA/VEL1* befolyásol az összes eddig vizsgált gombában. A *veA/veA* delécióna megnövelte a konidiospórák számát *A. nidulans*-ban, *P. chrysogenum*-ban és *N. crassa*-ban (Vitikainen és mtsai., 2010; Yager 1992; Hoff és mtsai., 2010), míg ugyanezen gén hiánya a konidiospóra képződés csökkenését okozta *A. fumigatus*, *A. parasiticus*, *A. flavus*, *Fusarium Fujikuroi*, *F. graminearum*, *Dothistroma septosporum* és *T.*

*virens* fajok esetén (Park és mtsai., 2012a; Chettri és mtsai., 2012; Mukherjee és mtsai., 2010; Hoff és mtsai., 2010; Wiemann és mtsai., 2010; Dhingra és mtsai., 2012; Amaike és Keller 2009; Jiang és mtsai., 2011; Merhej és mtsai., 2012). *T. reesei* esetében mi azt tapasztaltuk, hogy a *vell* hiánya majdnem teljesen megszüntette a konidiospóra képződésének képességet. Ez a jelenség független volt a megvilágítástól, melyhez hasonlóan csak *A. fumigatus* esetén írtak le (Dhingra és mtsai., 2012). Ez a jelenség adódhat abból is, hogy a *T. reesei* QM 9414 törzs ugyanannyi spórát képez fény jelenlétében, mint sötétben, melyben lényegesen különbözik az *A. nidulans*-tól (Yager 1992). Tehát a fény nem egy lényeges faktor a *veA/vell* függő konidiospórák képződésének szabályozásában az *A. fumigatus* és *T. reesei* esetén.

Egy másik példa, melyben a *T. reesei* VEL1 funkciója eltér más gombában megfigyeltektől, hogy *T. reesei*  $\Delta vell$  mutáns teljesen elveszítette szexuális egyedfejlődésének képességét fény jelenlétében. Ezzel ellentétben megfigyelés született *N. crassa* gombában (Bayram és mtsai., 2008b). Hasonlóan a *T. reesei*  $\Delta vell$  mutáns törzshöz, fény jelenlétében megszűnik a szexuális egyedfejlődése az *A. nidulans*-nak, de ennél a fajnál egyébként is inkább sötétben indukálódik (Ghassemi és mtsai., 2015). *T. reesei* esetén viszont a fény jelenlétében való termőtest képzés a normális (Chen és mtsai., 2012). A *T. reesei* *OEvell* törzs steril termőtestet hoz létre sötétben is (a *vell* gént egy konstitutívan, fénytől független *tefl* promóterrel túltermeltetve), mely a vad törzsre nem jellemző (Chen és mtsai., 2012). A *vell* megnövekedett expressziójának hatása tehát nem életképes termőtestet képez sötétben, de a korai szakaszban elkezdődik ennek formálása. Ebből arra következtethetünk, hogy a *vell* számos lépést kontrollál ebben a folyamatban és a *vell* elengedhetetlen a *T. reesei* szexuális egyedfejlődéséhez, amelyet a fény nagymértékben befolyásol. Következésképpen kijelenthetjük, hogy a *T. reesei* VEL1 funkciója szabályozza a gomba fejlődési folyamatait, de ennek

mechanizmusa és a környezeti jelekkel való kapcsolata még tisztázatlan és a folyamat más, eddig megvizsgált gombával nem analóg.

A *T. reesei* aszexuális sporulációja és a celluláz enzimek képzése közötti szoros kapcsolatot már tanulmányozták (Metz és mtsai., 2011). A növényi sejtfal bontó hidrolázok jelen vannak a gomba spóráin, így segítik azok kezdeti növekedését új szubsztrátra kerülve. Ennek tekintetében az is érdekes, hogy sok cellulázt kódoló gén a szekunder metabolit szintézis génekkel egy génklaszterben van a *T. reesei* genomban (Kubicek 2012a), és ezek közül számos expresszálódik a cellulázok bioszintézisét is indukáló körülmények között (Ivanova és mtsai., 2013; Bischof és mtsai., 2013; Arvas és mtsai., 2011). Még nem azonosítottak olyan regulátort, mely a sporulációt, a szekunder metabolit képződést és a celluláz gének expresszióját együttesen koordinálja *T. reesei*-ben. Ez a regulátor nem lehet a XYR1, mert a  $\Delta xyr1$  mutáns nem képes cellulázok képzésére, de a sporulációra igen (Metz és mtsai., 2011). Hasonlóképpen a konidiospóra képzésre képtelen *T. reesei* mutáns képes celluláz termelésre (C.P. Kubicek nem publikált adatai alapján) és így a két folyamat bár összekapcsolható, de nem függ egymástól. Továbbá az erősen lecsökkent a konidiospóra képzés a  $\Delta lae1$  *T. reesei* mutáns törzsben XYR1 funkciójától független (Seiboth és mtsai., 2012b).

Az a megállapításunk, hogy a *T. reesei vell* génje elengedhetetlen az extracelluláris enzimtermeléshez a *lae1* már leírt hasonló szerepével együtt azt mutatja, hogy a Velvet komplex nem csak a szekunder metabolizmusban és a gombák egyedfejlődésében játszik szerepet. A Velvet komplex funkciójának kiterjesztése az extracelluláris hidrolitikus enzimek formálására az egyik legjelentősebb tanulsága a vizsgálatainknak, mert a Velvet komplexnek ez a funkciója eddig ismeretlen volt.



## 6.2. A *Trichoderma reesei* LAE1 funkciója konstans növekedési rátákon

A globális regulátorok funkcióinak tanulmányozása és azok hatásának fiziológiai vizsgálata a mutáns törzsekkel leggyakrabban szilárd táptalajon, vagy szakaszos módon tenyésztett folyékony kultúrákban történik. Minkét körülmény esetén a kiindulási tápanyagok a tenyésztés során limitálónak válnak és ezzel megváltoztatják a tenyésztés növekedési rátáját, ami hatással van a metabolizmusukra, következésképpen a fiziológiájukra is. Ezek a szempontok a baktériumok és élesztők tenyésztése során nagy figyelmet kapnak. Ezzel szemben sokkal kevesebb tanulmányban van szem előtt tartva a fonalas gombák tenyésztésekor a specifikus növekedési ráta hatása (Karaffa és mtsai., 2006; Portnoy és mtsai., 2011; Ilyés és mtsai., 2004; David és mtsai., 2005; Pakula és mtsai., 2005; Rautio és mtsai., 2006; Arvas és mtsai., 2011). Például a *P. chrysogenum* penicillin termelésének a Velvet komplex az egyik fő regulátora, melynek hiányában az antibiotikum-produkció lecsökken. Azonban a *P. chrysogenum* tenyésztésekor alacsony növekedési rátát alkalmazva a Velvet komplexet felépítő két protein (*PclaeA*, *PcvelA*) hiánya a penicillin bioszintézis gének kifejeződésére csak elhanyagolható hatással volt (Veiga és mtsai., 2012). A növekedési rátát kemosztát típusú fermentációk során lehet vizsgálni, ahol a hígítási ráta megválasztása meghatározza a specifikus növekedési rátát is. Kemosztát tenyésztési módot alkalmazva derült ki, hogy a *T. reesei* CRE1 funkciója nemcsak a szénforrástól, hanem a növekedési rátától is függhet (Portnoy és mtsai., 2011). Továbbá *T. reesei*-ben az extracelluláris hidrolitikus enzimek termeléséért felelős LAE1 globális regulátor hiánya alacsonyabb, míg túltermeltetve gyorsabb növekedést mutatott (Seiboth és mtsai., 2012b). Ezért célul tűztük ki, hogy alacsony, illetve magas növekedési rátát stimulálva vizsgáljuk meg a LAE1 hatását a génexpresszióra.

A *T. reesei* LAE1 feltételezett metiltranszferáz hatását glükóz limitálással beállított konstans növekedési ráták mellett vizsgáltuk. Teljes transzkriptum analízist végeztünk a QM 9414 (szülői törzs), a *Δlae1* és az *OElae1* mutáns törzsek tenyészetét alkalmazva és összevetettük a gének expressziós szintjét. Azokat az eredményeket emeltük ki, ahol a gének transzkripció termékei szignifikánsan, legalább kétszer felül-, vagy alulszabályozottak a szülői, QM 9414 törzs géntermékeihez képest ugyanazon körülmények mellett.

Egy korábbi tanulmányban leírták, hogy a *Δlae1* mutánsban csak egyetlen NRPS-t kódoló gén volt alulszabályozva a *T. reesei*-ben (Karimi-Aghcheh és mtsai., 2013), noha az *A. nidulans*-ban ennek ortológja a szekunder metabolizmus szabályozásában játszik szerepet (Bok és Keller 2004). Ettől eltérő eredményt kaptunk vizsgálatunk során, hiszen két PKS és egy NRPS génre volt hatással a LAE1 funkciójának hiánya és ez a hatás is magas növekedési rátán volt detektálható. Talán magyarázatot ad az eltérésre, hogy Karimi-Aghcheh és munkatársai laktózon növekedő tenyészetet vizsgáltak és ezen a szénforráson a növekedési ráta nagyon alacsony. Ezek alapján arra következtettünk, hogy a LAE1 hatása a szekunder metabolizmusra *T. reesei*-ben növekedési ráta függően jelenik meg és kifejezőbb magas növekedési rátán.

Az eredményeink azt mutatták, hogy a LAE1 funkciójától függő gének többsége a *T. reesei* genomban nem génklaszterekben vannak. Azok közül a gének közül, melyre a LAE1 hatással volt, csak 10% található génklaszterben, mely kevesebb, mint korábban Karimi-Aghcheh és munkatársai bemutattak. A különbség talán annak köszönhető, hogy a vizsgálatunk során D-glükózt használtunk szénforrásként és konstans növekedési rátát alkalmaztunk. Következésképpen azt mondhatjuk, hogy a LAE1 által befolyásolt génklaszterek kevésbé tanulmányozhatóak ilyen körülmények között.

A LaeA/LAE1 globális regulátor szabályozási mechanizmusáról az a hipotézis, hogy a hiszton fehérjék lizin vagy arginin metiláltságával befolyásolják a gének expresszióját, hiszen nagy hasonlóságot mutatnak a metiltranszferázokkal és a sejtmagban lokalizálódnak (Bok és Keller 2004; Reyes-Dominguez és mtsai., 2008). Viszont *T.reesei*-ben nem figyelhető meg változás a hiszton metilációs állapotán azokon a lókuszon, amelyeknek a génexpressziója a LAE1 által szabályozott (Karimi-Aghcheh és mtsai., 2013). Továbbá Patananan és munkatársai számos módon, de eredménytelenül próbálkoztak azonosítani *A. nidulans*-ban egy proteint vagy egy szubsztrátot, amely a LaeA által metilálttá válik. A LaeA/LAE1 regulációs mechanizmusának egy új megközelítését feltételezhetjük a vizsgálataink során kapott eredmények alapján. A *T. reesei* *Δlae1* mutánsban a GCN5-N-acetiltranszferázokat (GNAT) kódoló gének 50%-ának megváltozott az expressziója, a legtöbbjüknek alulszabályozottan. A LAE1-nek ez a hatása nem derült ki előzőleg egy tanulmányban sem, valószínűleg a szakaszos tenyésztés vagy a különböző szénforrások miatt. A GNAT enzimek az acetyl-coenzim-A-ról a primer aminokra helyezik át az acetyl csoportot. Ezek egy alcsoportja úgy ismert, mint amelyek a hisztonokat egy specifikus lizin részen acetylálják. Ez a folyamat transzkripciós aktivitáshoz vezet, mert modulálja a kromatin állapotát az aktív kromatinállapot irányába (Grunstein 1997; Mizzen és Allis 1998). Sajnos eddig egy GNAT enzim sem volt funkcionális vizsgálaton, de az egyik (Trire2:120120) indukálódik a cellulózon (Bischof és mtsai., 2013; Hakkinen és mtsai., 2014) és laktózon is (Ivanova és mtsai., 2013) és alulszabályozott *Δlae1* törzsben (Karimi-Aghcheh és mtsai., 2013). A vizsgálataink során számos GNAT-t kódoló génről derült ki, hogy LAE1 hatása alatt állnak és ez a korreláció érvényes lehet a GNAT Trire2:120120 génre is más körülmények között is. *A. nidulans*-ban a LaeA funkciója összefüggésbe hozható a hiszton acetylálással,

hiszen azonosítottak egy hiszton acetiltranszferáz (EsaA) fehérjét, mely *A. nidulans* *ΔlaeA* mutánsban képes volt a szekunder metabolit termelést helyreállítani (Soukup és mtsai., 2012). Habár az EsaA a Myb\_Cef fehérjecsalád (Pdam 11831) tagja és nem a GNAT családkhoz tartozik, képes kapcsolódni a hiszton egy meghatározott részéhez a kromo doménje által. A *S. cerevisiae* SPT10 génjével ortológ gén a *T. reesei* *Δlae1* mutánsban nagymértékben alulszabályozott. Ez a gén az *S. cerevisiae* élesztőben egy acetiltranszferáz, mely közvetlenül aktiválja a hiszton gének transzkripcióját és ez a funkció elengedhetetlen a normál sejtosztódáshoz. Ennek alulszabályozottsága a *T. reesei* *Δlae1* mutánsban lehet a felelős a mutánsra jellemző lassabb növekedésnek. A növekedési ráta függő szabályozás megváltozása a *Δlae1* törzsben teljesen mértékben összeegyeztethető a LAE1 tevékenységével a GNAT enzimeszalád tagjain keresztül, mert ezek acetilálási funkciója aktív kromatin állapothoz vezet, tehát elősegítik a génexpressziót (Bok és mtsai., 2013).

Egy másik géncsoport, melyet a vizsgálataink során egyértelműen befolyásolt a LAE1, az aminosav transzportereket kódoló gének. Ezek a transzporterek megbízhatóan azonosíthatóak a közös struktúrájukból adódóan, a 12 db  $\alpha$ -helikális transzmembrán szegmens motívummal és a citoplazmában elhelyezkedő N- és C-terminális hidrófil régióikkal. Ezek az aminosav transzporterek az aminosav/poliamin szuprecsaládkhoz tartoznak (Sophianopoulou és Diallinas 1995). Élesztőkben ezek a transzporterek gyakran nincsenek jelen, amikor a növekedés szerves nitrogénforráson történik, de génjei felül szabályozottak szerves nitrogénforrás jelenlétében (Godard és mtsai., 2007; Magasanik és Kaiser 2002). Ezzel szemben a *T. reesei*-ben ezek a transzporterek kifejeződnek szerves nitrogénforráson is. Ezek a transzporterek összefüggésben lehetnek azzal, hogy a *T. reesei* aminosavakat igényel, amikor cellulóz vagy laktóz szénforráson növekszik

(Kubicek 1993), így ezeknek a permeáz géneknek a szabályozása nem elhanyagolható. Egyre több bizonyíték van arra, hogy az élesztők aminosav felvétele GNAT függő hiszton acetilálás által szabályozott (Takahashi és mtsai., 2012; Kaufmann és mtsai., 2010), mely megfelel az általunk megfigyelt LAE1 szerepével a GNAT enzimek kifejeződésének regulálása kapcsán. A LAE1 hatása az aminosav permeázokra megerősíti azt az eredményünket, hogy a *T. reesei* *Δlae1* mutánsban főleg magas növekedési rátán az aminosav metabolizmusban részt vevő gének alulszabályozottak. Továbbá néhány extracelluláris proteázra és oligopeptid transzporterre a LAE1 hatással van, de nem az egész fehérje csoportra hat szignifikánsan.

### **6.3. *Aspergillus nidulans* sterigmatocisztin termelésének növekedési ráta függése.**

A Velvet komplexet alkotó proteineket legrészletesebben a fonalas gombák modellszervezetében, az *A. nidulans*-ban tanulmányozták. Ezeknek a globális regulátoroknak az *A. nidulans* egyedfejlődésére, szekunder metabolizmusára, a sterigmatocisztin mikotoxin termelődésére kifejtett hatásáról sok rangos tanulmányban olvashatunk. Az ST bioszintézisének kutatásakor a fonalas gombát gyakran agarral szilárdított táptalajon tenyésztik, ahol számos, az ST képződését befolyásoló paraméter nem kontrollálható. A folyékony tápoldatban történő tenyésztés homogénebb környezete lévén jobban alkalmazható az ST mennyiségének kinetikai tanulmányozásához, ezért a kísérleti rendszerünket úgy állítottuk be, hogy az *A. nidulans* ST termelését folyékony tenyészetben megbízhatóan nyomon követhessük. A változók csökkenése érdekében az összes tenyészetet sötét körülmények között növesztettük és állandó értéken tartottuk a tenyésztésünk során a hőmérsékletet, pH-t és az oldott oxigén szintet. Ilyen körülmények között, függetlenül az elérhető szénforrástól, más tanulmányokkal

összhangban (Calvo 2008; Stinnett és mtsai., 2007), a *veA1* genotípusú *A. nidulans* sokkal kevesebb ST-t termel. Ezzel szemben a vad típusú *veA* gént hordozó törzsek képesek D-glükóz és laktóz szénforrású minimal tápközegben is 3 mg/L körüli koncentrációban termelni. Ez az ST titer jóval alacsonyabb, mint ami szilárd táptalajon elérhető (Calvo és mtsai., 2002; Hicks és mtsai., 1997), de az analitikai módszerünkkel biztonságosan meghatározható így is a fermentációk során az aktuális ST koncentráció.

Maggio-Hall és munkatársai tanulmányában közölt és Nancy P. Keller professzor asszony nem publikált adataiból tudjuk, hogy a zsírsavak  $\beta$ -oxidációjában és az oxilipinek bioszintézisében mutáns törzsek különböző szénforráson tenyésztve képtelenek ST képzésére. Ez a jelenség laktóz szénforrást alkalmazva nem állt fenn, az ST termelésük a vad törzisével volt összevethető. Ahogyan a szaprotróf gombák, az *A. nidulans* sem találkozik a természetes élőhelyén ezzel a diszachariddal, mely egy nehezen bontható szénforrás és lassú növekedést eredményez (azaz lassú növekedési rátát). Ez a jelenség elősegíti a szekunder metabolitok termelését, melyek bioszintézise gyakran a szénforrás által szabályozott a CreA/CRE1 függő karbon katabolit represszió keresztül (Karaffa és mtsai., 2006; Portnoy és mtsai., 2011). A glükóz által kiváltott karbon katabolit repressziót azonban az aktuális specifikus növekedési ráta is befolyásolja *A. nidulans*-ban (Ilyés és mtsai., 2004), és a celluláz termelő *T. reesei* gombában is (Karaffa és mtsai., 2006; Portnoy és mtsai., 2011), mert az alacsony növekedési ráta derepressziót vált ki ezeknél a gombáknál. Annak ellenére, hogy a CreA/CRE1 egy globális regulátor, kevés ismeret áll rendelkezésre a karbon katabolit represszió szerepéről a mikotoxinok bioszintézisében.

Megvizsgálva az ST képződésének mechanizmusát batch fermentációk során egyrészt azt gondolhattuk, hogy a laktózon elérhető alacsony növekedési ráta hatására kezdődik meg az ST képződés. Viszont a D-glükóz

kimerülését követő ST megjelenéséből arra következtethettünk, hogy a mikotoxin képződés karbon katabolit represszió hatása alatt áll. E két hatás szétválasztása batch vagy fed-batch tenyésztés során nem lehetséges, ezért a kemosztát tenyésztést választottuk, ahol a specifikus növekedési rátát beállíthatjuk a hígítási rátán keresztül. Lényegében azonos eredményt kaptunk mind a vad, mind a CreA mutáns törzs esetén bizonyítva azt, hogy a CreA nem közvetlenül vesz részt az ST formálásának szabályozásában D-glükózon való tenyésztés során. Tulajdonképpen a laktózon növekedő batch tenyészet adott látszólag ellentmondásos eredményt azzal, hogy a vad és CreA mutáns törzs ST képződése alapjaiban különbözött. A vad törzs tenyésztésekor az ST már megjelent a növekedés közben, amikor a laktóz még bőségesen jelen volt a tápoldatban, míg a CreA mutánsban ST nem volt detektálható a késői stacioner fázisig, csak jóval a laktóz kimerülését követően. Ezt a különbséget az okozhatta, hogy a CreA mutánst fokozott laktóz hasznosítási ráta jellemzi. A CreA represszálja a laktóz hasznosítást transzkripciós szinten *A. nidulans*-ban (Fekete és mtsai., 2012), így a CreA mutáns már képes gyorsabban növekedni ezen a szénforráson, mint a vad törzs. Ehhez hasonlóan az *A. parasiticus* AF termelése fordítottan korrelál a D-glükóz hasznosítási rátával (Shih és Marth 1974).

A D-glükóz koncentrációja a kemosztát fermentációk során a nullához közelít függetlenül a hígítási rátától. Tehát a D-glükóz kifogyása önmagában nem egy indukáló hatás, mivel a magas hígítási rátájú kemosztátban nem detektáltunk ST-t. Viszont a D-glükóz elfogyása előfeltétele az ST bioszintézisének a növekedés megszűnésén keresztül.

Szemben a karbon katabolit represszióval és az elérhető szénforrással a tápközegben, a növekedési ráta az, ami közvetlen kapcsolatban van az ST képződéssel. A laktóz egy nehezen hasznosítható szénforrás az *A. nidulans* számára (Fekete és mtsai., 2012; Fekete és mtsai., 2016), és ennek lassú

asszimilációja okozza az alacsony növekedési ráta által az ST képződést. Míg a gyorsabb növekedés során a gomba a növekedéshez szükséges sejtanyagok képzését és a primer metabolizmust részesíti előnyben, az ST képződés háttérbe szorul. Amikor a laktóz hasznosítási ráta megnövekedik – melyet CreA mutáns esetén tapasztaltunk – az ST termelés nem figyelhető meg addig, míg teljesen ki nem merül a tápoldatból, hasonlóan a D-glükóz szénforráson látottakhoz. Habár a megfigyeléseinket nem kapcsoltuk össze definiált molekuláris lépésekkel, megjegyezzük, hogy a *Pichia pastoris*-ben a szénforrásra fogékony gének és transzkripció faktorok felülszabályozottak alacsony növekedési rátán (Rebnegger és mtsai., 2014). Újabb bizonyítékok is azt sugallják, hogy a gombák szekunder metabolit génklaszterei eltérően szabályozódnak a különböző cukrok által (Zhang és mtsai., 2016; Kumar és mtsai., 2016). A méz természetes védettsége az AF szennyeződéssel szemben (Hanif és mtsai., 2015; Kumar és mtsai., 2016) összefügghet az általunk leírtakkal, hiszen a benne lévő D-fruktóz gyorsan asszimilálható szénforrás.

Egy másik magyarázat lehet a laktóz hatásra az, hogy a katabolizmusa - mely *A. nidulans*-ban kizárólag intracelluláris (Fekete és mtsai., 2002) - közvetlenül vagy közvetetten képes stimulálni az ST bioszintézist ebben a gombában.



## 7. Összefoglalás

A fonalas gombák által termelt metabolitok bioszintézisét komplex molekuláris szabályozási mechanizmusok irányítják. Az előállításukhoz szükséges enzimeket kódoló gének kifejeződését az eukarióta élőlényekben, így a gombákban is, több regulátor fehérje akár együtt, de külön-külön is szabályozhatja. A globális regulátorok általában a környezeti ingerek hatását közvetítve a fonalas gombák egyedfejlődésére és metabolitjainak bioszintézisére is kiterjedve befolyásolják a gének kifejeződését. A fény hatására megváltozott folyamatokat az *A. nidulans*-ban leírt VeA protein közvetíti, mely a LaeA és VelB proteinnel kapcsolódva (Velvet komplex) a szekunder metabolitok bioszintézisét is szabályozza. A tanulmányok többsége a Velvet komplex és az azokat felépítő proteineknek a fonalas gombák szexuális/aszexuális egyedfejlődésére és szekunder anyagcsere termékeinek bioszintézisére kifejtett hatásáról számolnak be, az extracelluláris enzimtermelésre kifejtett hatásukról keveset tudunk. A magas extracelluláris cellulázokat és hemicellulázokat termelő *T. reesei*-ben a Velvet komplex proteinjeit kódoló gének ortológjai megtalálhatóak, melyek közül a LAE1-ről tudtuk, hogy mind az aszexuális sporulációhoz mind az enzimek termeléséhez esszenciális. A *lae1* gén és annak termékének hiánya azonban megváltoztatta a gomba növekedési sebességét, ezért célul tűztük ki, hogy konstans növekedési ráta beállítása mellett megvizsgáljuk, hogy a szülői, QM 9414 törzshöz képest a gének kifejeződését hogyan befolyásolja a *lae1* gén hiánya, illetve annak túltermeltetése. Az eredmények megerősítettek számos előzőleg feltételezett hipotézist, de néhány eddig nem feltételezett funkciót is találtunk. Megállapítható, hogy a LAE1 hatása főleg a gén deléciójával válik jobban megfigyelhetővé, míg túltermeltetése kevésbé látványos eredményeket ad. A LAE1-nek egy új funkcióját azonosíthattuk, amelyben a GCN5-N-acetiltranszferázok helyezik új megvilágításba a LAE1

mechanizmusát. A *T. reesei* *Δlae1* mutánsban a GCN5-N-aciltranszferázokat (GNAT) kódoló gének 50%-ának az expressziója alulszabályozottan változott meg a szülői törzshöz képest. A GNAT enzimek egy alcsoportja a hisztonokat egy specifikus lizin részen acetilálva transzkripciók aktivitáshoz vezet és a kromatin állapotát az aktív kromatinállapot irányába modulálja (Grunstein 1997; Mizzen és Allis 1998). **Tehát a LAE1 tanulmányunk szerint is részt vesz epigenetikai szabályozásban közvetett módon, a GNAT enzimek kifejeződésének szabályozása révén.** A másik géncsoport, melyet a vizsgálataink során egyértelműen befolyásolt a LAE1 az aminosav transzportereket kódoló gének közé tartoznak. A LAE1 hatása az aminosav permeázokra megerősíti azt az eredményünket, hogy a *T. reesei* *Δlae1* mutánsban főleg magas növekedési rátán az aminosav metabolizmusba részt vevő gének alulszabályozottak. A LAE1 hatása az aminosav permeázok kifejeződésére **magyarázatot ad a *T. reesei* aminosav igényére cellulóz és laktóz szénforráson való növekedése közben.** A LAE1 által befolyásolt génklaszterek a genomban azonban kevésbé voltak megfigyelhetők a vizsgálataink során, ami talán annak köszönhető, hogy glükózt használtunk szénforrásként vagy az, hogy konstans növekedési rátát alkalmaztunk. Fontos észrevétel, hogy a *lae1* gén deléciója a növekedési ráta által hatással van a génexpresszió szabályozására. **A vizsgálatainkból kapott adatok azt mutatják, hogy a regulációs mutánsok kutatása konstans növekedési rátán új megvilágítást adhat az adott gének funkcióját tekintve.**

Az *A. nidulans* *veA* génjének ortológja a *T. reesei*-ben a *vell* gén, amely által kódolt protein funkciójának szerepét vizsgáltuk a cellulóz gének kifejeződésében és a gomba egyedfejlődésében. A Velvet gén által kódolt VeA/VeA/VEL1 funkciójának legszembetűnőbb szerepe a gombák aszexuális sporulációja, melyet az összes eddig vizsgált gombában valamilyen módon befolyásolt. *T. reesei* esetében mi azt tapasztaltuk, hogy a

*vell* hiánya teljesen megszüntette a konidiospóra képződésének képességet. Ellentétben más gombafajokkal ez a jelenség független volt a fény hatásától. Továbbá a *T. reesei*  $\Delta vell$  mutáns teljesen elveszítette szexuális egyedfejlődésének képességét fény jelenlétében, ami ugyancsak eltér más gombákban megfigyeltektől. Következésképpen kijelenthetjük, hogy a *T. reesei* VEL1 funkciója szabályozza a gomba fejlődési folyamatait, de ennek mechanizmusa és a környezeti jelekkel való kapcsolata más, eddig megvizsgált gombával nem analóg. A dolgozatban megvizsgált celluláz enzimeket kódoló gének kifejeződése a  $\Delta vell$  mutánsban a QM 9414 törzshöz képest nagyon alacsony szintre csökkent laktóz szénforráson való növekedés közben, amit a fermentlébe kiválasztott extracelluláris enzimek mennyisége és celluláz aktivitása is alátámasztott. Hasonlóan alacsony expressziós szintet tapasztaltunk a  $\Delta vell$  mutáns esetén a celluláz gének legerősebb indukáló szénforrásán a szoforózon is, mellyel bizonyossá vált, hogy a cellulázok expressziója teljes mértékben függ a VEL1 funkciójától. Azzal a megállapításunkkal, hogy a *T. reesei vell* génje elengedhetetlen az extracelluláris enzimtermeléshez és a *lael* már leírt hasonló szerepével együtt azt mutatja, hogy a Velvet komplex nem csak a szekunder metabolizmusban és a gombák egyedfejlődésében játszik szerepet. **A Velvet komplex funkciójának kiterjesztése az extracelluláris hidrolitikus enzimek formálására az egyik legjelentősebb tanulsága a vizsgálatainknak, mert a Velvet komplexnek ez a funkciója eddig ismeretlen volt.**

Az *A. nidulans* modellszervezetben a szekunder metabolit bioszintézisét a sterigmatocisztin mikotoxin képződésén keresztül lehet a legkönnyebben tanulmányozni. Az ST képződéséhez, ahogyan a legtöbb szekunder metabolithoz is a VeA fehérje normál funkciója szükséges. Ezt bizonyítja az az eredményünk is, hogy a *veA* génről egy pontmutáció következtében

képződő **VeA1 fehérje jelenlétében az *A. nidulans* 10-15-ször kevesebb ST képzésére képes.** Az ST bioszintézisének vizsgálatához így csak a vad típusú (*veA+*) alléllal rendelkező törzsek alkalmasak. Számos tanulmány született az ST képződésének molekuláris szabályozásáról, azonban keveset lehetett tudni a CreA globális regulátor által közvetített karbon katabolit repressziós hatásról az ST bioszintézisében. A karbon katabolit represszáló D-glükóz szénforráson és a derepresszáló laktóz szénforráson tenyésztve az *A. nidulans* vad törzset látszólag ennek a hatását tapasztaltuk, hiszen laktózon már a növekedés közben, míg D-glükózon csak a kifogyását követően indukálódott az ST képződés. CreA mutánst alkalmazva viszont nem igazolódott ez a feltételezés, ráadásul a CreA mutánsra jellemző gyorsabb laktóz metabolizmus eredményeképpen nem tapasztaltunk ST képződést a kezdeti növekedés közben. Az *A. nidulans* vad és CreA mutáns törzseket megvizsgálva alacsony, illetve magas növekedési ráta mellett láthattuk, hogy **a lassú növekedés indukálja, míg a magas represszálja az ST termelést.** Így megállapíthattuk, hogy szemben a karbon katabolit represszióval és az elérhető szénforrással a tápközegben, **a növekedési ráta az, ami közvetlen kapcsolatban van az ST képződéssel.** A laktóz egy nehezen hasznosítható szénforrás az *A. nidulans* számára (Fekete és mtsai., 2012), és ennek lassú asszimilációja okozza az alacsony növekedési ráta által az ST képződést.

Ahogy a *T. reesei* LAE1 funkciójának vizsgálatakor és az *A. nidulans* ST képződésekor tapasztalhattuk, **a konstans növekedési ráta alkalmazása a fonalas gombák tenyésztése során új megvilágításba helyezheti azok szekunder metabolit termelését és génregulációját.**

## 8. Summary

The trimeric Velvet protein complex consists of LaeA, VeA and VelB, and regulates secondary metabolism and development in *A. nidulans*, and pathogenesis on plants and humans in other genera. Most studies on *veA* have been carried out in *Aspergillus* spp., where this gene has been described to control photodependent development, secondary metabolism and pathogenesis-associated processes. We have known that the expression of genes for lignocellulose degradation in *T. reesei* is further obligatorily dependent on the function of the protein methyltransferase LAE1 (Seiboth et al, 2012b), the orthologue of the *A. nidulans* regulator of secondary metabolism and development LaeA. LAE1 is essential for cellulase gene expression, raising the hypothesis that this function may require a functional Velvet complex. While the impact of the Velvet complex on the regulation of secondary metabolite production has been well documented in numerous fungi, only two papers have so far reported the participation of *veA/velA* in the regulation of extracellular enzyme synthesis (Kamerewerd et al., 2011; Duran et al., 2014). We have therefore cloned and functionally characterized the ortholog of the central component of the VELVET complex, VeA, from *T. reesei* (VEL1). Our study shows that the *vel1* knock-out strains almost completely lacked conidiation and sexual development in *T. reesei*. Interestingly, overexpression of *vel1* under a constitutive, light-independent promoter (*tef1*) enabled *T. reesei* to form some sterile primordia in darkness, an ability not shown by the wild type strains. We have shown that VEL1 also regulates developmental processes in *T. reesei*, that cannot be deduced from analogy with other fungal systems. We provide evidence that the expression of cellulases in *T. reesei* is completely dependent on a functional *vel1* gene and suggests that cellulase expression is indeed regulated by the Velvet complex. The extension of our findings to all cellulases and hemicellulases of

*T. reesei* appears justified because they are co-regulated by sophorose and lactose, and thus - although we quantified only the transcripts of two cellulases and one xylanase - it can be safely assumed that the others are affected in the same manner too. In addition, we have shown that the expression of the central regulator of cellulase and hemicellulase biosynthesis, XYR1 as well, is strongly reduced albeit not eliminated. Our study show that the regulatory targets of the Velvet complex reach beyond mere secondary metabolism and development. The extension of the function of the Velvet complex towards formation of extracellular hydrolytic enzymes is intriguing, because a regulatory interaction of secondary metabolism and fungal development is already well established, whereas such a link with hydrolases is so far unknown.

Reverse genetics relies on the use of molecular biological methods to discover the function of a gene by analyzing the phenotypic effects that result from a manipulation of its function. While this approach mostly leads to valid information about the role of a gene in the physiology of the respective organism, some caveats are to be applied when these mutants are studied by – omics techniques: many gene mutants also display altered growth rates, and thus studying their gene or protein expression on plates or in batch cultures will inevitably also identify genes whose expression is controlled only by the growth rate itself. This may lead to flawed interpretations as to the potential targets of the investigated genes, particularly in the case of regulatory genes. In *T. reesei*, *lae1* mutants are also differing in their growth rates. Therefore, we chose to use chemostat cultures on D-glucose as a carbon source at two different growth rates (one carbon catabolite repressing and one carbon catabolite derepressing) to investigate the genomewide changes in gene expression in relation to LAE1 function, using  $\Delta lae1$  and *OELae1* recombinant mutant strain of *T. reesei*. The corresponding results confirm

several previously detected targets, but also reveal new findings: on one hand, the effect of LAE1 becomes mainly visible upon its deletion whereas overexpression has only a little effect. Also genomic clustering of the *lae1*-effected transcripts was observed to a much lower extent than previously shown by Karimi-Aghcheh et al. (2013), and is thus either due to the use of glucose as a carbon source or the use of constant growth rates for comparison. However, we detect for the first time that *lae1* gene deletion affects the regulation of gene expression by the growth rate. The latter finding likely points to an indirect influence, and suggests that LAE1 influences the formation of both positive as well negative signals or regulators of the respective genes. On the other hand, additional LAE1 targets were obtained of which the GCN5-N-acetyltransferases may offer a new understanding of the mechanism of LAE1 action. Our data show that – using *T. reesei* LAE1 as a model – the investigation of the transcriptome in a regulatory mutant at constant growth rates may reveal new insights into the function of the respective gene.

The velvet gene (*veA*) of *A. nidulans* is involved in the regulation of a variety of cellular processes such as asexual and sexual development as well as secondary metabolism (Calvo 2008). A single base pair mutation at the full length *veA* start codon is called *veA1*. Two *veA1* mutant strains were tested for sterigmatocystin (ST) production and compared to a wild-type (*veA*) strain and the biomass-specified ST production was 10-15 times higher in the strain containing the wild-type allele. The ST biosynthetic pathway is well-characterized in *A. nidulans*, but many of the regulatory aspects related to the carbon source available for the fungus are still enigmatic. We have shown that ST forms only after D-glucose is depleted from the medium, while on lactose, ST appears when the majority of the carbon source is still available. These data suggested that ST formation may either be mediated by a carbon

catabolite regulatory mechanism or induced by low specific growth rates attainable on lactose. These hypotheses were tested by constant-mass chemostat-type continuous fermentations on D-glucose as a sole carbon source at two different dilution rates ( $D = 0.090 \text{ h}^{-1}$  and  $D = 0.020 \text{ h}^{-1}$ ), representing a state of carbon catabolite repression and derepression, respectively. ST production under such conditions negatively correlated with the dilution rate, i.e., no ST formed at high growth rate, while low growth rate led to the formation of  $0.4 \text{ mg L}^{-1}$  ST. Essentially identical results were obtained with a CreA mutant strain, indicating that CreA does not regulate the formation of ST during growth on D-glucose. Since the residual D-glucose concentration was set close to zero in each chemostat culture irrespective of the dilution rate, we also concluded that the depletion of D-glucose itself is not an initiator but rather a prerequisite for ST biosynthesis through the cessation of growth. Lactose is a poor carbon source for *A. nidulans*, and we believe the low growth rate caused by its slow assimilation will trigger sustained ST formation. By the same token, faster growth means the fungus has to put more resources into primary metabolism by creating cell materials needed for growth, and has less ability to shunt to ST. When lactose utilization rate gets higher (as in the CreA loss-of-function mutants), ST production will not occur before its complete exhaustion, just like on D-glucose. We concluded that low specific growth rates may be the primary cause of sustained, mid-growth ST formation on the slowly assimilating lactose in *A. nidulans*, and that carbon utilization rates likely play a general regulatory role during biosynthesis.



## 10. Irodalmi hivatkozások

1. Aharonowitz Y, Cohen G, Martin JF (1992) Penicillin and cephalosporin biosynthetic genes: Structure, organization, regulation and evolution. *Annu Rev Microbiol* 46: 461-495.
2. Ahmed YL, Gerke J, Park HS, Bayram O, Neumann P, Ni M, Dickmanns A, Kim SC, Yu JH, Braus GH, Ficner R (2013). The velvet family of fungal regulators contains a DNA-binding domain structurally similar to NF-kappaB. *PLoS Biol.* 11:e1001750. doi:10.1371/journal.pbio.1001750
3. Akel E, Metz B, Seiboth B, Kubicek CP (2009) Molecular regulation of arabinan and L-arabinose metabolism in *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*). *Eukaryot Cell* 8:1837-1844.
4. Amaike S, Keller NP (2009) Distinct roles for VeA and LaeA in development and pathogenesis of *Aspergillus flavus*. *Eukaryot Cell.* 8:1051-1060.
5. Araujo-Bazan L, Dhingra S, Chu J, Fernandez-Martinez J, Calvo AM, Espeso E A (2009) Importin alpha is an essential nuclear import carrier adaptor required for proper sexual and asexual development and secondary metabolism in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Biol.* 46, 506–515.
6. Arvas M, Pakula T, Smit B, Rautio J, Koivistoinen H, Jouhten P, Lindfors E, Wiebe M, Penttilä M, Saloheimo M (2011) Correlation of gene expression and protein production rate - a system wide study. *BMC Genomics* 12:616.
7. Atoui A, Kastner C, Larey CM, Thokala R, Etxebeste O, Espeso EA, Fischer R, Calvo AM (2010) Cross-talk between light and glucose regulation controls toxin production and morphogenesis in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Biol.* 47: 962-972.
8. Baba S, Kinoshita H, Nihira T (2012) Identification and characterization of *Penicillium citrinum* VeA and LaeA as global regulators for ML-236B production. *Curr Genet* 58:1–11
9. Bailey C, Arst HN Jr (1975) Carbon catabolite repression in *Aspergillus nidulans*. *Eur J Biochem.* 51: 573-577.
10. Barnes SE, Dola TP, Bennett JW, Bhatnagar D (1994) Synthesis of sterigmatocystin on a chemically defined medium by species of *Aspergillus* and *Chaetomium*. *Mycopathologia* 125: 173-178.
11. Bayram Ö, Krappmann S, Ni M, Bok JW, Helmstaedt K, Valerius O, Braus-Stromeyer S, Kwon NJ, Keller NP, Yu JH, Braus GH (2008a) VelB/VeA/LaeA complex coordinates light signal with fungal development and secondary metabolism. *Science* 320: 1504-1506.

12. Bayram OS, Krappmann S, Seiler S, Vogt N, Braus GH (2008b) *Neurospora crassa ve-1* affects asexual conidiation. *Fungal Genet Biol.* 45:127-138.
13. Bayram O, Braus GH, Fischer R, Rodriguez-Romero J (2010) Spotlight on *Aspergillus nidulans* photosensory systems. *Fungal Genet Biol.* 47: 900–908.
14. Bayram O, Braus GH (2011) Coordination of secondary metabolism and development in fungi: the velvet family of regulatory proteins. *FEMS Microbiol Rev* 36:1-2
15. Bennett JW, Klich M (2003) Mycotoxins. *Clin Microbiol Rev.* 16: 497–516.
16. Berovic M, Legisa M (2007) Citric acid production. *Biotechnol Annu Rev.* 13:303–343
17. Bischof R, Fourtis L, Limbeck A, Gamauf C, Seiboth B, Kubicek CP (2013) Comparative analysis of the *Trichoderma reesei* transcriptome during growth on the cellulase inducing substrates wheat straw and lactose. *Biotechnol Biofuels* 6: 127.
18. Bok JW, Keller NP (2004) LaeA, a regulator of secondary metabolism in *Aspergillus* spp. *Eukaryot Cell.* 3:527–535.
19. Bok JW, Balajee SA, Marr KA, Andes D, Nielsen KF, Frisvad JC, Keller NP (2005) LaeA, a regulator of morphogenetic fungal virulence factors. *Eukaryot Cell.* 4:1574–1582.
20. Bok JW, Noordermeer D, Kale SP, Keller NP (2006) Secondary metabolic gene cluster silencing in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol.* 61:1636-1645.
21. Bok JW, Soukup AA, Chadwick E, Chiang YM, Wang CC, Keller NP (2013) VeA and MvIA repression of the cryptic orsellinic acid gene cluster in *Aspergillus nidulans* involves histone 3 acetylation. *Mol Microbiol.* 89:963–974.
22. Bok JW, Albright JC, Ye R, Mead D, Wagner M, Krerowicz A, Goering AW, Kelleher NL, Keller NP, Wu CC (2015) Fungal artificial chromosomes for mining of the fungal secondary metabolome. *BMC Genomics.* 16: 343.
23. Bomke C, Tudzynski B (2009) Diversity, regulation, and evolution of the gibberellin biosynthetic pathway in fungi compared to plants and bacteria. *Phytochemistry.* 70: 1876–1893.
24. Bouhired S, Weber M, Kempf-Sontag A, Keller NP, Hoffmeister D (2007) Accurate prediction of the *Aspergillus nidulans* terrequinone gene cluster boundaries using the transcriptional regulator LaeA. *Fungal Genet Biol.* 44:1134–1145

25. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72:248-254.
26. Brakhage AA (1998) Molecular regulation of  $\beta$ -lactam biosynthesis in filamentous fungi. *Microbiol Mol Biol R.* 62:547-585.
27. Brakhage AA (2013) Regulation of fungal secondary metabolism. *Nat Re Microbiol.* 11: 21–32.
28. Braus GH, Irniger S, Bayram O (2010) Fungal development and the COP9 signalosome. *Curr Opin Microbiol.* 13: 672–676
29. Brown A. Fed-batch and continuous culture. In: McNeil B, Harvey LM, editors. *Fermentation: A Practical Approach*. Oxford: University Press; 1990. pp. 113–130.
30. Butchko RA, Adams TH, Keller NP (1999) *Aspergillus nidulans* mutants defective in stc gene cluster regulation. *Genetics* 153: 715–720.
31. Butchko RA, Brown DW, Busman M, Tudzynski B, Wiemann P (2012) Lae1 regulates expression of multiple secondary metabolite gene clusters in *Fusarium verticillioides*. *Fungal Genet Biol.* 49: 602–612.
32. Calvo AM (2008) The VeA regulatory system and its role in morphological and chemical development in fungi. *Fungal Genet Biol.* 45: 1053-1061.
33. Calvo AM, Cary JW (2015) Association of fungal secondary metabolism and sclerotial biology. *Front Microbiol.* 6:1-16.
34. Calvo AM, Hinze LL, Gardner HW, Keller NP (1999) Sporogenic effect of polyunsaturated fatty acids on development of *Aspergillus* spp. *Appl Environ Microbiol.* 65: 3668–3673.
35. Calvo AM, Bok J-W, Brooks W, Keller NP (2004) VeA is required for toxin and sclerotial production in *Aspergillus parasiticus*. *Appl Environ Microbiol.* 70: 4733–4739.
36. Cary JW, Harris-Coward PY, Ehrlich KC, Mack BM, Kale SP, Larey C, Calvo AM (2012) NsdC and NsdD affect *Aspergillus flavus* morphogenesis and aflatoxin production. *Eukaryot Cell.* 11: 1104–1111.
37. Chen CL, Kuo HC, Tung SY, Hsu PW, Wang CL, Seibel C, Schmoll M, Chen RS, Wang TF (2012) Blue light acts as a double-edged sword in regulating sexual development of *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*). *PLoS One* 7:e44969.
38. Chettri P, Calvo AM, Cary JW, Dhingra S, Guo Y, McDougl RL, Bradshaw RE (2012) The *veA* gene of the pine needle pathogen *Dothistroma septosporum* regulates sporulation and secondary metabolism. *Fungal Genet Biol.* 49:141-151.

39. Chiang YM, Szewczyk E, Davidson AD, Entwistle R, Keller NP, Wang CC, Oakley BR (2010) Characterization of the *Aspergillus nidulans* monodictyphenone gene cluster. *Appl Environ Microbiol.* 76: 2067–2074.
40. Clutterbuck AJ (1974): *Aspergillus nidulans*. In: King, R.C. (Ed.), Handbook of Genetics, Bacteria, Bacteriophages, and Fungi, vol.1. Plenum Press, New York, 447-510.
41. Corrochano LM (2011) Fungal photobiology: a synopsis. *IMA Fungus* 2: 25–28.
42. Cubero B, Scezzocchio C (1994) Two different, adjacent and divergent zinc finger binding sites are necessary for CREA-mediated carbon catabolite repression in the proline gene cluster of *Aspergillus nidulans*. *EMBO J.* 13: 405-415.
43. David H, Krogh AM, Roca C, Åkesson M, Nielsen J (2005) CreA influences the metabolic fluxes of *Aspergillus nidulans* during growth on glucose and xylose. *Microbiology* 151:2209–2221.
44. Deutscher J (2008) The mechanisms of carbon catabolite repression in bacteria. *Curr Opin Microbiol.* 11: 87-93.
45. Dhingra S, Andes D, Calvo AM (2012) VeA Regulates Conidiation, Gliotoxin Production, and Protease Activity in the Opportunistic Human Pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryot Cell.* 11:1531-1543.
46. Dreyer J, Eichhorn H, Friedlin E, Kürnsteiner H, Kück U (2007) A homologue of the *Aspergillus* velvet gene regulates both cephalosporin C biosynthesis and hyphal fragmentation in *Acremonium chrysogenum*. *Appl Environ Microbiol.* 73:3412-3422.
47. Druzhinina IS, Seidl-Seiboth V, Herrera-Estrella A, Horwitz BA, Kenerley CM, Monte E, Mukherjee PK, Zeilinger S, Grigoriev IG, Kubicek CP (2011) Trichoderma: the genomics of opportunistic success. *Nat Rev Microbiol.* 16: 749–759.
48. Duran RM, Cary JW, Calvo AM (2007) Production of cyclopiazonic acid, aflatoxin, and aflatoxin by *Aspergillus flavus* is regulated by *veA*, a gene necessary for sclerotial formation. *Appl Microbiol Biotechnol.* 73: 1158–1168.
49. Duran RM, Gregersen S, Smith TD, Bhetariya PJ, Cary JW, Harris-Coward PY, Mattison CP, Grimm C, Calvo AM (2014) The role of *Aspergillus flavus veA* in the production of extracellular proteins during growth on starch substrates. *Appl Microbiol Biotechnol* 98:5081-5094.
50. Elander RP (2003) Industrial production of  $\beta$ -lactam antibiotics. *Appl Microbiol Biotechnol.* 61: 385-392.

51. Espeso EA, Peñalva MA (1992) Carbon catabolite repression can account for the temporal pattern of expression of a penicillin biosynthetic gene in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol.* 6: 1457-1465.
52. Espeso EA, Penalva MA (1996) Three binding sites for the *Aspergillus nidulans* PacC zinc-finger transcription factor are necessary and sufficient for regulation by ambient pH of the isopenicillin N synthase gene promoter. *J Biol Chem.* 271: 28825–28830.
53. Fantes PA, Roberts CF (1973)  $\beta$ -Galactosidase activity and lactose utilization in *Aspergillus nidulans*. *J Gen Microbiol.* 77: 471-486.
54. Fekete E, Karaffa L, Sándor E, Seiboth B, Bíró S, Szentirmai A, Kubicek CP (2002) Regulation of the intracellular  $\beta$ -galactosidase activity of *Aspergillus nidulans*. *Arch Microbiol.* 179: 7-14.
55. Fekete E, Karaffa L, Seiboth B, Fekete É, Kubicek CP, Flipphi M (2012) Identification of a permease gene involved in lactose utilisation in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Biol.* 49: 415-425.
56. Fekete E, Orosz A, Kulcsár L, Kavalecz N, Flipphi M, Karaffa L (2016) Characterization of a second physiologically relevant lactose permease gene (*lacpB*) in *Aspergillus nidulans*. *Microbiology* 162: 837-847.
57. Fernandes M, Keller NP, Adams TH (1998) Sequence-specific binding by *Aspergillus nidulans* AfIR, a C6 zinc clusterprotein regulating mycotoxin biosynthesis. *Mol Microbiol.* 28: 1355-1365.
58. Foreman PK, Brown D, Dankmeyer L, Dean R, Diener S, Dunn-Coleman NS, Geodegebuur F, Houfek TD, England GJ, Kelley AS, Meerman HJ, Mitchell T, Mitchinson C, Olivares HA, Teunissen PJ, Yao J, Ward M (2003) Transcriptional regulation of biomass-degrading enzymes in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *J Biol Chem.* 278:31988-31997.
59. Gancedo JM (1998) Yeast carbon catabolite repression. *Microb Mol Biol Rev.* 62: 334-361.
60. Georgianna DR, Payne GA (2009) Genetic regulation of aflatoxin biosynthesis: from gene to genome. *Fungal Genet Biol.* 46: 113–125.
61. Georgianna DR, Fedorova ND, Burroughs JL, Dolezal AL, Bok JW, Horowitz-Brown S, Woloshuk CP, Yu J, Keller NP, Payne GA (2010) Beyond aflatoxin: four distinct expression patterns and functional roles associated with *Aspergillus flavus* secondary metabolism gene clusters. *Mol Plant Pathol.* 11: 213–226.
62. Ghassemi S, Lichius A, Bidard F, Lemoine S, Rossignol MN, Herold S, Seidl-Seiboth V, Seiboth B, Espeso EA, Margeot A, Kubicek CP (2015) The  $\beta$ -importin KAP8 (Pse1/Kap121) is required for nuclear

- import of the cellulase transcriptional regulator XYR1, asexual sporulation and stress resistance in *Trichoderma reesei*. *Mol Microbiol.* 96: 405-418.
63. Ghose TK (1987) Measurement of cellulase activities. *Pure Appl Chem.* 59: 257-268.
64. Gilbert HJ (2010) The biochemistry and structural biology of plant cell wall deconstruction. *Plant Physiol.* 153: 444-455.
65. Giles SS, Soukup AA, Lauer C, Shaaban M, Lin A, Oakley BR, Wang CC, Keller NP (2011) Cryptic *Aspergillus nidulans* antimicrobials. *Appl Environ Microbiol.* 77, 3669–3675.
66. Godard P, Urrestarazu A, Vissers S, Kontos K, Bontempi G, van Helden J, André B (2007) Effect of 21 different nitrogen sources on global gene expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* 27:3065–3086.
67. Görke B, Stülke J (2008) Carbon catabolite repression in bacteria: many ways to make the most out of nutrients. *Nat Rev Microbiol.* 6:613-624.
68. Grunstein M (1997) Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature* 389:349–352.
69. Häkkinen M, Arvas M, Oja M, Aro N, Penttilä M, Saloheimo M, Pakula TM (2012) Re-annotation of the CAZy genes of *Trichoderma reesei* and transcription in the presence of lignocellulosic substrates. *Microb Cell Fact.* 11:134.
70. Häkkinen M, Valkonen MJ, Westerholm-Parvinen A, Aro N, Arvas M, Vitikainen M, Penttilä M, Saloheimo M, Pakula TM (2014) Screening of candidate regulators for cellulase and hemicellulase production in *Trichoderma reesei* and identification of a factor essential for cellulase production. *Biotechnol Biofuels.* 7:14.
71. Hamid AB, Smith JE (1987) Degradation of aflatoxin by *Aspergillus flavus*. *J Gen Microbiol.* 133: 2023-2029.
72. Han KP, Park JS, Chae KS, Han DM (2010): Simple identification of *veA1* mutation in *Aspergillus nidulans*. *J Microbiol.* 48: 885-887.
73. Hanif M, Khattak MK, Rehman MU, Ramzan M, Amin M, Aamir M, Sher SS, Hafizullah, Khan S, Saeed M, Khan A, Saqlain M (2015) Effect of drying temperature and natural preservatives on reducing aflatoxins in solar dried persimmon (*Diospyros kaki* L). *Proceedings of the Pakistan Academy of Sciences* 52:361-365.
74. Hicks JK, Yu JH, Keller NP, Adams TH (1997) *Aspergillus* sporulation and mycotoxin production both require inactivation of the FadA Gα protein-dependent signaling pathway. *EMBO J.* 16: 4916-4923.

75. Hicks JK, Lockington RA, Strauss J, Dieringer D, Kubicek CP, Kelly J, Keller NP (2001) RcoA has pleiotropic effects on *Aspergillus nidulans* cellular development. *Mol Microbiol.* 39: 1482-1493.
76. Hoff B, Kamerewerd J, Sigl C, Mitterbauer R, Zadra I, Kürnsteiner H, Kück U (2010) Two components of a velvet-like complex control hyphal morphogenesis, conidiophore development, and penicillin biosynthesis in *Penicillium chrysogenum*. *Eukaryot Cell.* 9:1236-1250.
77. Hopwood DA, Sherman DH (1990) Molecular genetics of polyketides and its comparison to fatty acid biosynthesis. *Annu Rev Genet.* 24: 37-66.
78. Horton P, Park KJ, Obayashi T, Fujita N, Harada H, Adams-Collier CJ, Nakai K (2007) WoLF PSORT: protein localization predictor. *Nucleic Acids Res.* 35: 585-587
79. Hortschansky P, Eisendle M, Al-Abdallah Q, Schmidt AD, Bergmann S, Thön M, Kniemeyer O, Abt B, Seeber B, Werner ER, Kato M, Brakhage AA, Haas H (2007) Interaction of HapX with the CCAAT-binding complex a novel mechanism of gene regulation by iron. *EMBO J.* 26: 3157–3168.
80. Ilyés H, Fekete E, Karaffa L, Fekete É, Sándor E, Szentirmai A, Kubicek CP (2004) CreA-mediated carbon catabolite repression of  $\beta$ -galactosidase formation in *Aspergillus nidulans* is growth rate dependent. *FEMS Microbiol Lett.* 235: 147-151.
81. Ivanova C, Bååth JA, Seiboth B, Kubicek CP (2013) Systems analysis of lactose metabolism in *Trichoderma reesei* identifies a lactose permease that is essential for cellulase induction. *PLoS One* 8(5):e62631.
82. Jiang J, Liu X, Yin Y, Ma Z (2011) Involvement of a velvet protein FgVeA in the regulation of asexual development, lipid and secondary metabolisms and virulence in *Fusarium graminearum*. *PLoS One* 6:e28291.
83. Jorgensen TR, van Kuyk PA, Poulsen BR, Ruijter GJG, Visser J, Iversen JJJ (2007) Glucose uptake and growth of glucose-limited chemostat cultures of *Aspergillus niger* and a disruptant lacking MstA, a high-affinity glucose transporter. *Microbiology* 153: 1963-1973.
84. Kaefer E (1965) Origins of translocations in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* 52: 217–232.
85. Kale SP, Milde L, Trapp MK, Frisvad JC, Keller NP, Bok JW (2008) Requirement of LaeA for secondary metabolism and sclerotial production in *Aspergillus flavus*. *Fungal Genet Biol.* 45:1422–1429.
86. Kamerewerd J, Zadra I, Kürnsteiner H, Kück U. (2011) PcchiB1, encoding a class V chitinase, is affected by PcVelA and PcLaeA, and

- is responsible for cell wall integrity in *Penicillium chrysogenum*. *Microbiology* 157:3036-48.
87. Karaffa L, Fekete E, Gamauf C, Szentirmai A, Kubicek CP, Seiboth B (2006) D-galactose induces cellulase gene expression in *Hypocrea jecorina* at low growth rates. *Microbiology* 152: 1507-1514.
  88. Karimi-Aghcheh R, Bok JW, Phatale PA, Smith KM, Baker SE, Lichius A, Omann M, Zeilinger S, Seiboth B, Rhee C, Keller NP, Freitag M, Kubicek CP (2013) Functional analyses of *Trichoderma reesei* LAE1 reveal conserved and contrasting roles of this regulator. *G3*. 3:369-378.
  89. Karimi-Aghcheh R, Németh Z, Atanasova L, Fekete E, Paholcsek M, Sándor E, Aquino B, Druzhinina IS, Karaffa L, Kubicek CP (2014) The Velvet a orthologue VEL1 of *Trichoderma reesei* regulates fungal Development and is essential for cellulase gene expression. *PLoS ONE* 9: e112799.
  90. Kato N, Brooks W, Calvo AM (2003) The expression of sterigmatocystin and penicillin genes in *Aspergillus nidulans* is controlled by *veA*, a gene required for sexual development. *Eukaryot Cell*. 2: 1178–1186.
  91. Kaufmann I, White E, Azad A, Marguerat S, Bähler J, Proudfoot NJ (2010) Transcriptional activation of the general amino acid permease gene *per1* by the histone deacetylase *Clr6* Is regulated by *Oca2* kinase. *Mol Cell Biol*. 30:3396–3410.
  92. Keller NP, Nesbitt C, Sarr B, Philips TD, Burow GB (1997) pH regulation of sterigmatocystin and aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus* spp. *Phytopathology* 87: 643-648.
  93. Kim H, Han K, Kim K, Han D, Jahng K, Chae K (2002) The *veA* gene activates sexual development in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Biol*. 37: 72–80.
  94. Kim HJ, Han JH, Kim KS, Lee YH (2014) Comparative functional analysis of the velvet gene family reveals unique roles in fungal development and pathogenicity in *Magnaporthe oryzae*. *Fungal Genet Biol* 66:33-43.
  95. Kubicek CP (1993) From cellulose to cellulase inducers: facts and fiction. In Proceedings of the second TRICEL symposium on *Trichoderma reesei* cellulases and other hydrolytic enzymes. Edited by Suominen P, Reinikainen T. Finland: Foundation of Biotechnical and Industrial Fermentation Research, Espoo; 1993:181–188.
  96. Kubicek CP (2012a) Systems biological approaches towards understanding cellulase production by *Trichoderma reesei*. *J Biotechnol*. 163: 133– 142



97. Kubicek CP (2012b). *Fungi and Lignocellulose Biomass*. Wiley and Sons, NY, USA.
98. Kulmburg P, Mathieu M, Dowzer C, Kelly J, Felenbok B (1993) Specific binding site in the *alcR* and *alcA* promoters of the ethanol regulon for the CREA repressor mediating carbon catabolite repression in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol.* 7: 847-857.
99. Kumar D, Barad S, Chen Y, Luo X, Tannous J, Dubey A, Glam N, Tian S, Li B, Keller N, Prusky D (2016) LaeA regulation of secondary metabolism modulates virulence in *Penicillium expansum* and is mediated by sucrose. *Mol Plant Pathol.* doi: 10.1111/mpp.12469.
100. Le Crom S, Schackwitz W, Pennacchio L, Magnuson JK, Culley DE, Collett JR, Martin J, Druzhinina IS, Mathis H, Monot F, Seiboth B, Cherry B, Rey M, Berka R, Kubicek CP, Baker SE, Margeot A (2009) Tracking the roots of cellulase hyperproduction by the fungus *Trichoderma reesei* using massively parallel DNA sequencing. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:16151-16156.
101. Leck A (1999) Preparation of lactophenol cotton blue slide mounts. *Community Eye Health.* 12: 24.
102. Lo HC, Entwistle R, Guo CJ, Ahuja M, Szewczyk E, Hung JH, Chiang YM, Oakley BR, Wang CC (2012) Two separate gene clusters encode the biosynthetic pathway for the meroterpenoids austinol and dehydroaustinol in *Aspergillus nidulans*. *J Am Chem Soc.* 134: 4709-4720.
103. Lopez-Berges MS, Hera C, Sulyok M, Schafer K, Capilla J, Guarro J, Di Pietro A (2013) The velvet complex governs mycotoxin production and virulence of *Fusarium oxysporum* on plant and mammalian hosts. *Mol Microbiol.* 87: 49–65.
104. Magasanik B, Kaiser CA (2002) Nitrogen regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 290:1–18.
105. Maggio-Hall LA, Wilson RA, Keller NP (2005) Fundamental contribution of beta-oxidation to polyketide mycotoxin production in planta. *Mol Plant Microbe In.* 18: 783-793.
106. Mandels M, Andreotti RE (1978) Problems and challenges in the cellulose to cellulase fermentation. *Process Biochem.* 13: 6–13.
107. Martinez DRM, Berka B, Henrissat M, Saloheimo M, Arvas, Baker SE, Chapman J, Chertkov O, Coutinho PM, Cullen D, Danchin EG, Grigoriev IV, Harris P, Jackson M, Kubicek CP, Han CS, Ho I, Larrondo LF, de Leon AL, Magnuson JK, Merino S, Misra M, Nelson B, Putnam N, Robbertse B, Salamov AA, Schmoll M, Terry A, Thayer N, Westerholm-Parvinen A, Schoch CL, Yao J, Barabote R, Nelson MA, Detter C, Bruce D, Kuske CR, Xie G, Richardson P,

- Rokhsar DS, Lucas SM, Rubin EM, Dunn-Coleman N, Ward M, Brettin TS (2008) Genome sequencing and analysis of the biomass-degrading fungus *Trichoderma reesei* (syn. *Hypocrea jecorina*). *Nat Biotechnol.* 26: 553–560.
108. Marquez-Fernandez O, Trigos A, Ramos-Balderas JL, Viniegra-Gonzalez G, Deising HB, Aguirre J (2007) Phosphopantetheinyl transferase CfwA/NpgA is required for *Aspergillus nidulans* secondary metabolism and asexual development. *Eukaryot Cell.* 6: 710–720.
109. Merhej J, Urban JM, Dufresne M, Hammond-Kosack KE, Richard-Forget F, Barreau C (2012) The velvet gene, *FgVel1*, affects fungal development and positively regulates trichothecene biosynthesis and pathogenicity in *Fusarium graminearum*. *Mol Plant Pathol.* 13:363–374.
110. Metz B, Seidl-Seiboth V, Haarmann T, Kopchinskiy A, Lorenz P, Seiboth B, Kubicek CP (2011) Expression of biomass-degrading enzymes is a major event during conidium development in *Trichoderma reesei*. *Eukaryot Cell.* 10:1527–1535.
111. Mihlan MV, Homann V, Liu TW, Tudzynski B (2003) AREA directly mediates nitrogen regulation of gibberellin biosynthesis in *Gibberella fujikuroi*, but its activity is not affected by Nmr. *Mol Microbiol.* 47: 975–991.
112. Mizzen CA, Allis CD (1998) Linking histone acetylation to transcriptional regulation. *Cell Mol Life Sci.* 54:6–20.
113. Mukherjee PK, Kenerley CM (2010) Regulation of morphogenesis and biocontrol properties in *Trichoderma virens* by a VELVET protein, Vell. *Appl Environ Microbiol.* 76:2345–2352.
114. Myung K, Li S, Butchko RA, Busman M, Proctor RH, Abbas HK, Calvo AM (2009) FvVE1 regulates biosynthesis of the mycotoxins fumonisins and fusarins in *Fusarium verticillioides*. *J Agr Food Chem.* 57: 5089–5094.
115. Németh Z, Molnár AP, Fejes B, Novák L, Karaffa L, Keller NP, Fekete E (2016) Growth-phase sterigmatocytin formation on lactose is mediated via low specific growth rates in *Aspergillus nidulans*. *Toxins* 8: 354.
116. Newman DJ, Cragg GM (2012) Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *J Nat Prod.* 75:311–335.
117. Ni M, Yu JH (2007) A novel regulator couples sporogenesis and trehalose biogenesis in *Aspergillus nidulans*. *PLoS One* 2: e970.
118. Nutzmann HW, Reyes-Dominguez Y, Scherlach K, Schroeckh V, Horn F, Gacek A, Schumann J, Hertweck C, Strauss J, Brakhage AA (2011) Bacteria-induced natural product formation in the fungus

- Aspergillus nidulans* requires Saga/Ada-mediated histone acetylation. *Proc Natl Acad Sci. USA* 108: 14282–14287.
119. Pakula TM, Salonen K, Uusitalo J, Penttilä M (2005) The effect of specific growth rate on protein synthesis and secretion in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Microbiology* 151:135–143.
  120. Palmer JM, Keller NP (2010) Secondary metabolism in fungi: does chromosomal allocation matter? *Curr Opin Microbiol.* 13:431–436.
  121. Palmer JM, Theisen JM, Duran RM, Grayburn WS, Calvo AM, Keller NP (2013) Secondary metabolism and development is mediated by LlmF control of VeA subcellular localization in *Aspergillus nidulans*. *PLoS Genet.* 9:e1003193.
  122. Park HS, Bayram O, Braus GH, Kim SC, Yu JH (2012a) Characterization of the velvet regulators in *Aspergillus fumigatus*. *Mol Microbiol.* 86:937-953.
  123. Park HS, Ni M, Jeong KC, Kim YH, Yu JH (2012b) The role, interaction and regulation of the velvet regulator VelB in *Aspergillus nidulans*. *PLoS ONE* 7:e45935.
  124. Park HS, Nam TY, Han KH, Kim SC, Yu JH (2014) VelC positively controls sexual development in *Aspergillus nidulans*. *PLoS ONE* 9:e89883.
  125. Patananan AN, Palmer JM, Garvey GS, Keller NP, Clarke SG (2013) A novel automethylation reaction in the *Aspergillus nidulans* LaeA protein generates S-methylmethionine. *J Biol Chem.* 288:14032-14045.
  126. Perrin RM, Fedorova ND, Bok JW, Cramer RA, Wortman JR, Kim HS, Nierman WC, Keller NP (2007) Transcriptional regulation of chemical diversity in *Aspergillus fumigatus* by LaeA. *PLoS Pathog.* 3:e50.
  127. Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L (2002) Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res.* 30:e36
  128. Pontecorvo G, Roper JA, Chemmons LM, Macdonald KD, Bufton AWJ (1953) The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Adv Genet.* 5:141-238.
  129. Portnoy T, Margeot A, Linke R, Atanasova L, Fekete E, Sándor E, Hartl L, Karaffa L, Druzhinina IS, Seiboth B, Le Crom S, Kubicek CP (2011) The CRE1 carbon catabolite repressor of the fungus *Trichoderma reesei*: a master regulator of carbon assimilation. *BMC Genomics* 12: 269.
  130. Purchase IFH, van der Watt JJ (1970) carcinogenicity of sterigmatocystin. *Food Cosmet Toxicol.* 8: 291-295.

131. Purschwitz J, Müller S, Fischer R (2009) Mapping the interaction sites of *Aspergillus nidulans* phytochrome FphA with the global regulator VeA and the White Collar protein LreB. *Mol Genet Genomics*. 281:35–42.
132. Rank C, Nielsen KF, Larsen TO, Varga J, Samson RBA, Frisvad JS (2011) Distribution of sterigmatocystin in filamentous fungi. *Fungal Biol*. 115: 406-420.
133. Rautio JJ, Smit BA, Wiebe M, Penttilä M, Saloheimo M (2006) Transcriptional monitoring of steady state and effects of anaerobic phases in chemostat cultures of the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *BMC Genomics* 7:247.
134. Rebnegger C, Graf AB, Valli M, Steiger MG, Gasser B, Maurer M, Mattanovich D (2014) In *Pichia pastoris*, growth rate regulates protein synthesis and secretion, mating and stress response. *Biotechnol J*. 9: 511-525.
135. Rechsteiner M, Rogers S, Rote K (1987) Protein structure and intracellular stability. *Trends Biochem Sci*. 12: 390-394
136. Reyes-Dominguez Y, Narendja F, Berger H, Gallmetzer A, Fernandez-Martin R, Garcia I, Scazzocchio C, Strauss J (2008) Nucleosome positioning and histone H3 acetylation are independent processes in the *Aspergillus nidulans prnD-prnB* bidirectional promoter. *Eukaryot Cell*. 7:656–663.
137. Reyes-Dominguez Y, Bok YW, Berger H, Shwab E, Basheer A, Gallmetzer A, Scazzocchio C, Keller N, Strauss J (2010) Heterochromatic marks are associated with the repression of secondary metabolism clusters in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol*. 76:1376-1386.
138. Ries L, Pullan ST, Delmas S, Malla S, Blythe MJ, Archer DB (2013) Genome-wide transcriptional response of *Trichoderma reesei* to lignocellulose using RNA sequencing and comparison with *Aspergillus niger*. *BMC Genomics* 14:541.
139. Rodriguez-Romero J, Hedtke M, Kastner C, Muller S, Fischer R (2010) Fungi, hidden in soil or up in the air: light makes a difference. *Annu Rev Microbiol*. 64: 585–610.
140. Rogers S, Wells R, Rechsteiner M (1986) Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science*. 234: 364-368.
141. Ronne H (1995) Glucose repression in fungixs. *Trends Genet*. 11: 12-17.
142. Ruepp A, Zollner A, Maier D, Albermann K, Hani J, Mokrejs M, Tetko I, Güldener U, Mannhaupt G, Münsterkötter M, Mewes HW (2004) The FunCat, a functional annotation scheme for systematic

- classification of proteins from whole genomes. *Nucleic Acids Res.* 32:5539–5545
143. Sambrook J, Russell DW (2001) *Molecular Cloning: a Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
  144. Sanchez JF, Chiang YM, Szewczyk E, Davidson AD, Ahuja M, Elizabeth Oakley C, Woo Bok J, Keller NP, Oakley BR, Wang CC (2010) Molecular genetic analysis of the orsellinic acid/F9775 gene cluster of *Aspergillus nidulans*. *Mol Biosyst.* 6: 587–593.
  145. Sanchez JF, Entwistle R, Hung JH, Yaegashi J, Jain S, Chiang YM, Wang CC, Oakley BR (2011) Genome-based deletion analysis reveals the prenyl xanthone biosynthesis pathway in *Aspergillus nidulans*. *J Am Chem Soc.* 133: 4010–4017.
  146. Sarikaya Bayram O, Bayram O, Valerius O, Park HS, Irniger S, Gerke J, Ni M, Han KH, Yu JH, Braus GH (2010) LaeA control of velvet family regulatory proteins for light-dependent development and fungal cell-type specificity. *PLoS Genet.* 6, e1001226.
  147. Sarikaya-Bayram Ö, Bayram Ö, Feussner M, Kim JH, Kim HS, Kaefer A, Feussner I, Chae KS, Han DM, Han KH, Braus GH (2014) The membrane-bound VapA-VipC-VapB methyltransferase complex guides signal transduction for epigenetic and transcriptional control of fungal development. *Dev Cell.* 29:406-420
  148. Sarikaya-Bayram O, Palmer JM, Keller NP, Braus GH, Bayram O (2015) One Juliet and four Romeos: VeA and its methyltransferases. *Front Microbiol.* 6: 1-7.
  149. Seiboth B, Pakdaman BS, Hartl L, Kubicek CP (2007a) Lactose metabolism in filamentous fungi: how to deal with an unknown substrate. *Fungal Biol Rev.* 21: 42-48
  150. Seiboth B, Gamauf C, Pail M, Hartl L, Kubicek CP (2007b) The D-xylose reductase of *Hypocrea jecorina* is the major aldose reductase in pentose and D-galactose catabolism and necessary for beta-galactosidase and cellulase induction by lactose. *Mol Microbiol.* 66:890-900
  151. Seiboth B, Herold S, Kubicek CP (2012a) Metabolic engineering of inducer formation for cellulase and hemicellulase gene expression in *Trichoderma reesei*. *Subcell Biochem.* 64:367-390.
  152. Seiboth B, Karimi RA, Phatale PA, Linke R, Hartl L, Sauer DG, Smith KM, Baker SE, Freitag M, Kubicek CP (2012b) The putative protein methyltransferase LAE1 controls cellulase gene expression in *Trichoderma reesei*. *Mol Microbiol.* 84:1150-1164.
  153. Seidl V, Seibel C, Kubicek CP, Schmoll M (2009) Sexual development in the industrial workhorse *Trichoderma reesei*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 106:13909-13914.

154. Septien I, Blanco JL, Suarez G, Cutuli MT (1994) Solubility and stability of sterigmatocystin in aqueous solution. *Mycotoxin Res.* 10: 15-20.
155. Shaaban MI, Bok JW, Lauer C, Keller NP (2010) Suppressor mutagenesis identifies a velvet complex mediator of *Aspergillus nidulans* secondary metabolism. *Eukaryot Cell.* 9: 1816–1824.
156. Shilatifard A (2006) Chromatin modifications by methylation and ubiquitination: implications in the regulation of gene expression. *Ann Rev Biochem.* 75: 243-269.
157. Shih CN, Marth EH (1974) Some cultural conditions that control biosynthesis of lipid and aflatoxin by *Aspergillus parasiticus*. *Appl Microbiol.* 27: 452-456.
158. Shroff RA, O'Connor SM, Hynes MJ, Lockington RA, Kelly JM (1997) Null alleles of *creA*, the regulator of carbon catabolite repression in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Biol.* 22: 28–38.
159. Singh OV, Kumar R (2007) Biotechnological production of gluconic acid: future implications. *Appl Microbiol Biotechnol.* 75:713–722
160. Sophianopoulou V, Diallinas G (1995) Amino acid transporters of lower eukaryotes: regulation, structure and topogenesis. *FEMS Microbiol Rev.* 16:53–75.
161. Soukup AA, Chiang YM, Bok JW, Reyes-Dominguez Y, Oakley BR, Wang CC, Strauss J, Keller NP (2012) Overexpression of the *Aspergillus nidulans* histone 4 acetyltransferase *EsaA* increases activation of secondary metabolite production. *Mol Microbiol.* 86:314–330
162. Sternberg D, Mandels GR (1979) Induction of cellulolytic enzymes in *Trichoderma reesei* by sophorose. *J Bacteriol.* 139:761-769.
163. Stinnett SM, Espeso EA, Cobeño L, Araújo-Bazán L, Calvo AM (2007) *Aspergillus nidulans* VeA subcellular localization is dependent on the importin  $\alpha$  carrier and on light. *Mol Microbiol.* 63: 242-255.
164. Strauss J, Horvath HK, Abdollah BM, Kinderman J, Mach RL, Kubicek CP (1999) The function of *CreA*, the carbon catabolite repressor of *Aspergillus nidulans*, is regulated at the transcriptional and post-transcriptional level. *Mol Microbiol.* 32: 169-178.
165. Strauss J, Y. Reyes-Dominguez (2011) Regulation of secondary metabolism by chromatin structure and epigenetic codes. *Fungal Genet Biol.* 48: 62–69.
166. Takahashi H, Sun X, Hamamoto M, Yashiroda Y, Yoshida M (2012) The SAGA histone acetyltransferase complex regulates leucine uptake through the *Agp3* permease in fission yeast. *J Biol Chem.* 287:38158–38167.

167. Then Bergh K, Brakhage AA (1998) Regulation of the *Aspergillus nidulans* penicillin biosynthesis gene *acvA* (*pcbAB*) by amino acids: implication for involvement of transcription factor PACC. *Appl Environ Microb.* 64: 843–849.
168. Tilburn J, Sarkar S, Widdick DA, Espeso EA, Orejas M, Mungroo J, Penalva MA, Arst HN (1995) The *Aspergillus* PacC zinc finger transcription factor mediates regulation of both acid- and alkaline-expressed genes by ambient pH. *EMBO J.* 14: 779–790.
169. Tsitsigiannis DI, Zarnowski R, Keller NP (2004) The lipid body protein, PpoA, coordinates sexual and asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. *J Biol Chem.* 279:11344–11353.
170. Tsitsigiannis DI, Keller NP (2006) Oxylipins act as determinants of natural product biosynthesis and seed colonization in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol.* 59: 882–892.
171. Tudzynski B, Homann V, Feng B, Marzluf GA (1999) Isolation, characterization and disruption of the *areA* nitrogen regulatory gene of *Gibberella fujikuroi*. *Mol Gen Genet.* 261: 106–114.
172. Uzbas F, Sezerman U, Hartl L, Kubicek CP, Seiboth B (2012) A homologous production system for *Trichoderma reesei* secreted proteins in a cellulase-free background. *Appl Microbiol Biotechnol.* 93:1601–1608
173. Veiga T, Nijland JG, Driessen AJ, Bovenberg RA, Touw H, van den Berg MA, Pronk JT, Daran JM (2012) Impact of velvet complex on transcriptome and penicillin G production in glucose-limited chemostat cultures of a  $\beta$ -lactam high-producing *Penicillium chrysogenum* strain. *OMICS* 16:320–333.
174. Vitikainen M, Arvas M, Pakula T, Oja M, Penttilä ME, Saloheimo M (2010) Array comparative genomic hybridization analysis of *Trichoderma reesei* strains with enhanced cellulase production properties. *BMC Genomics* 11:441.
175. Wogan GN (1992) Aflatoxins as risk for hepatocellular carcinoma in humans. *Cancer Research* 52: 2114–2118.
176. Wu F (2004). Mycotoxin risk assessment for the purpose of setting international regulatory standards. *Environ Sci Technol.* 38: 4049–4055.
177. Wu Q, Jezkova A, Yuan Z, Pavlikova L, Dohnal V, Kuca K (2009) Biological degradation of aflatoxins. *Drug Metab Rev.* 41: 1–7.
178. Wu QX, Jin XJ, Draskovic M, Crews MS, Tenney K, Valeriote FA, Yao XJ, Crews P (2012) Unraveling the numerous biosynthetic products of the marine sediment-derived fungus, *Aspergillus insulicola*. *Phytochem Lett.* 5:114–117.

179. Wiemann P, Brown DW, Kleigrewe K, Bok JW, Keller NP, Humpf HU, Tudzynski B (2010) FfVel1 and FfLae1, components of a velvet-like complex in *Fusarium fujikuroi*, affect differentiation, secondary metabolism and virulence. *Mol Microbiol.* 77: 972–994
180. Wilkinson HH, Ramaswamy A, Sung CS, Keller NP (2004) Increased conidiation associated with progression along the sterigmatocystin biosynthetic pathway. *Mycology* 96: 1190-1198.
181. Yager LN (1992) Early developmental events during asexual and sexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Bio/Technology* 23: 19–41.
182. Yin W, Keller NP (2011) Transcriptional regulatory elements in fungal secondary metabolism. *J Microbiol.* 49: 329-339.
183. Yu JH, Keller N (2005) Regulation of secondary metabolism in filamentous fungi. *Annu Rev Phytopathol.* 43:437-458.
184. Zhang X, Zhu Y, Bao L, Gao L, Yao G, Li Y, Yang Z, Li Z, Zhong Y, Li F, Yin H, Qu Y, Qin Y (2016) Putative methyltransferase LaeA and transcription factor CreA are necessary for proper asexual development and controlling secondary metabolic gene cluster expression. *Fungal Genet Biol.* 94: 32-46.



## 11. Tudományos tevékenység

### Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

- 1) FEKETE E, KARAFFA L, KARIMI AGHCHEH R, **NÉMETH Z**, FEKETE É, OROSZ A, PAHOLCSEK M, STÁGEL A, KUBICEK CP

The transcriptome of *lae1* mutants of *Trichoderma reesei* cultivated at constant growth rates reveals new targets of LAE1 function  
*BMC GENOMICS* 15: 447-456. (2014)

**Impakt faktor: 3,986**

- 2) KARIMI AGHCHEH R\*, **NÉMETH Z**\*, ATANASOVA L, FEKETE E, PAHOLCSEK M, SÁNDOR E, AQUINO B, DRUZHININA IS, KARAFFA L, KUBICEK CP

The VELVET A orthologue VEL1 of *Trichoderma reesei* regulates fungal development and is essential for cellulase gene expression  
*PLOS ONE* 9: e112799. (2014)

\*These authors contributed equally to this work.

**Impakt faktor: 3,234**

- 3) **NÉMETH Z**, MOLNÁR ÁP, FEJES B, NOVÁK L, KARAFFA L, KELLER NP, FEKETE E

Growth-phase sterigmatocystin formation on lactose is mediated via low specific growth rates in *Aspergillus nidulans*  
*TOXINS* 8: p. 354. (2016)

**Impakt faktor: 3,030**

### További közlemény:

JÓNÁS Á, FEKETE E, **NÉMETH Z**, FLIPPHI M, KARAFFA L  
D-galactose catabolism in *Penicillium chrysogenum*: expression analysis of the structural genes of the Leloir pathway  
*Acta Biologica Hungarica* 67:318-332 (2016)

**Impakt faktor: 0,506**

### **Az értekezés témájában elhangzott előadások:**

#### **1) NÉMETH Z**

Lactose induction of sterigmatocystin formation in *Aspergillus nidulans*  
4th Central European Forum for Microbiology [CEFARM], Keszthely, 2013)

#### **2) NÉMETH Z**

A *Trichoderma reesei* gomba vell (Velvet ortológ) génje nélkülözhetetlen a celluláz gének kifejeződésére  
(A Magyar Mikrobiológiai Társaság Nagygyűlése, Keszthely, 2014)

#### **3) NÉMETH Z**

*Aspergillus nidulans* sterigmatocisztin képződésének vizsgálata folyékony táptalajban, laktóz és D-glükóz szénforrásokon  
(A Magyar Mikrobiológiai Társaság Nagygyűlése és a XII. Fermentációs Kollokvium Keszthely, 2016)

### **Idegen nyelvű poszterek:**

#### **1) NÉMETH Z, NOVÁK L, NAGY N, FEKETE E, KELLER NP, KARAFFA L**

A novel HPLC-UV method to detect sterigmatocystin formation from submerged cultures of *Aspergillus nidulans*  
(4th Central European Forum for Microbiology [CEFARM] , Keszthely, 2013)

#### **2) OROSZ A, ONDECS Á, MATOLCSI CS, NÉMETH Z, KARAFFA L, FEKETE E**

Identification of the true inducer of the *bgaD* (beta-galactosidase-encoding) gene in *Aspergillus nidulans* upon growth on D-galactose  
(4th Central European Forum for Microbiology [CEFARM], Keszthely, 2013)

#### **3) TÖRÖK T, PAPP B, KÖKÉNYESI A, KOLLÁTH I, SÁNDOR E, NÉMETH Z, FEKETE E, KARAFFA L**

Cultivation of a slow-growing bacterium strain into high cell density  
(4th Central European Forum for Microbiology [CEFARM], Keszthely, 2013)

- 4) **NÉMETH Z**, FEKETE E, NOVÁK L, FEJES B, KELLER NP, KARAFFA L

Lactose induction of sterigmatocystin formation in *Aspergillus nidulans*  
(12th European Conference of Fungal Genetics, Sevilla, Spanyolország, 2014)

- 5) OROSZ A, ONDECS A, MATOLCSI C, **NÉMETH Z**, KARAFFA L, FEKETE E

Identification of the inducer of the *bgaD* (beta-galactosidase-encoding) gene in *Aspergillus nidulans* upon growth on D-galactose  
(12th European Conference of Fungal Genetics, Sevilla, Spanyolország, 2014)

- 6) KARAFFA L, TÖRÖK T, KÖKÉNYESI A, KOLLÁTH I, SÁNDOR E, **NÉMETH Z**, LIPTÁK N, FEKETE E, PAPP B

High cell density cultivation of the chemolithoautotrophic bacterium *Nitrosomonas europaea* in a dialysis membrane bioreactor  
(16th European Congress on Biotechnology, Edinburgh, Skócia, 2014)

- 7) KARAFFA L, **NÉMETH Z**, MOLNÁR ÁP, FEJES B, NOVÁK L, KELLER NP, FEKETE E

Growth-phase sterigmatocystin formation on lactose is mediated via low specific growth rates in *Aspergillus nidulans*  
(29th Fungal Genetics Conference, Asilomar, CA, USA, 2017; 14th International Aspergillus Meeting, Asilomar, CA, USA)

## 12. Köszönetnyilvánítás

Szeretném köszönetemet kifejezni **Dr. Karaffa Levente** tanszékvezető egyetemi docensnek, hogy mindig támogatott és biztatott a munkám során. Köszönöm a beszélgetéseink során átadott, a tudomány műveléséhez elengedhetetlen gondolkodásmódot és értékrendet. Köszönettel tartozom a publikációk elkészítésében nyújtott elengedhetetlen segítségéért is.

Hálás köszönettel tartozom témavezetőmnek **Dr. Fekete Erzsébet** egyetemi docensnek, hogy mindig bizalommal fordulhattam hozzá nem csak a kutatómunka kapcsán, de az élet más területeivel kapcsolatban is. Fermentációs és törzsfejlesztési tapasztalatai nélkül nem szülehetett volna meg a disszertációm.

Köszönet illeti **Christian P. Kubicek** professzor urat és **Razieh Karimi Aghcheh** kollégát a Bécsi Technológiai Egyetemről, hogy az általuk létrehozott *Trichoderma reesei* mutáns törzsekkel végezhettem a kutatásaimat. Az eredmények kiértékelésében, értelmezésében is elengedhetetlen segítséget nyújtottak.

Köszönettel tartozom **Dr. Paholcsek Melindának** a qPCR mérések kivitelezésében és hogy megtanított az ebből kapott adatok kiértékelésére. Sokat köszönhetek **Dr. Novák Leventének** a HPLC módszer kifejlesztésében, nélküle nem sikerült volna.

Továbbá köszönettel tartozom **Fekete Zoltán** tanszéki mérnöknek a fermentációs kísérletekben nyújtott segítségéért, mindig számíthattam rá és áldozatos munkájára.

Köszönetemet szeretném kifejezni tanársegéd kollegáimnak **Dr. Ág Norbertnek**, és **Molnár Ákos Péternek**, valamint volt és jelenlegi doktorandusz társaimnak **Kovácsné Dr. Orosz Anitának**, **Dr. Vasasné Dr. Jónás Ágotának**, **Kulcsár Lászlónak**, **Papp Benedeknek**, **Kavalecz**

**Napsugárnak és Kolláth Istvánnak**, hogy segítettek a kísérletek során felmerülő problémák megoldásában, megvitatásában.

Minden szakdolgozómnak köszönöm, hogy hozzátettek munkájukkal az eredményekhez és külön köszönöm **Fejes Baláznak** a fáradthatatlan segítségét a közös munkánk során.

## 13. Függelék

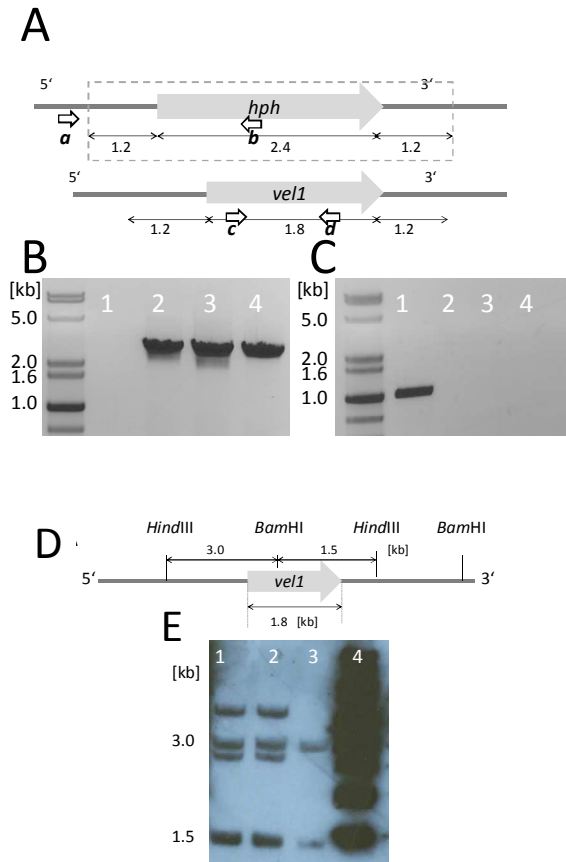
**1. Függelék** Az *A. nidulans* törzsek *veA*<sup>+</sup> és *veA1* genotípusának meghatározásához alkalmazott oligonukleotidok.

Gén	Oligonukleotid szekvencia (5'-)	Amplikon mérete (bp)	Referencia
AN1052 ( <i>veA</i> <sup>+</sup> )	<i>veA</i> <sup>+</sup> -Fw: 5'-TGTGTTATCCCATCAAGAGG <i>veA</i> <sup>+</sup> -Rv: 5'-CTTGGCGCTGTAGACGATAA	687	Han és mtsai., 2010
AN1052 ( <i>veA1</i> )	<i>veA1</i> -Fw: 5'-TGTGTTATCCCATCAAGAGT <i>veA1</i> -Rv: 5'-CTTGGCGCTGTAGACGATAA	687	Han és mtsai., 2010

**2. Függelék** A *T.reesei*  $\Delta$ *vel1* és *OEvell1* mutáns törzsek konstruálásához felhasznált oligonukleotidok.

Primer neve	Oligonukleotid szekvencia (5'→3')	Célja
Pfw_Dvel1_ApaI	Fw: 5'- TGGGCCACCAGCAGCAGAAAGCAC	<i>Δvel1</i> konstruálás
Prev_Dvel1_XhoI	Rv: 5'- TCTCGAGGATGCCGCGTTTGTTC	
Tfw_Dvel1_XhoI	Fw: 5'- TCTCGAGGGCCATTGGACGAGTGTT	<i>Δvel1</i> konstruálás
Dvel1_Trev1_ClaI	Rv: 5'- TATCGATTACCTATCGAGACTCATGG	
Fw_Ptef1:vel1_ClaI	Fw: 5'- GCTATCGATGGCGACGCCTTCCTCCG T	<i>tef1:vel1</i> konstruálás
Tef1:vel1-HindIII	Rv: 5'-TAGTACCCCAAAGCTTTCAGGA	<i>vel1</i> próba Southern blotthoz
Vell-ATG	Fw: 5'-ACAAACGCGGCATCATGG	
Vell-stop	Rv: 5'-CAATGGCCTTACACCTGG	<i>Δvel1</i> detektálás PCR-el
pVell	Fw: 5'-GCAAAAACGCACTGTAAGTGG	
hph_int	Rv: 5'-GTGTATTGACCGATTCTTG	
Vel_int1	Fw: 5'-CGACTACAATGCCAACTTC	
Vel_int2	Rv: 5'-GTCGACGCATATACGGAAG	A vad típusú <i>vel1</i> detektálása PCR-el

**3. Függelék** A *T.reesei* rekombináns törzsek ( $\Delta vel1$  és *OEvel1*) konstruálásának bemutatása



(A) A *T. reesei* *vel1* gén kiütésének PCR ellenőrzésének vizuális bemutatása a megszakított (fenn) és a natív *vel1* (lenn) lókusztér szerkezetével. A számok az adott szakasz méretét jelölik (kb-ban). A szaggatott vonal jelöli a deléciós kazetta felépítését. Az **a - d** nyilak specifikus primereket jelölnek, melyek amplifikációjával a homológ végek összetapadásához szükségesek (**a** és **b** primerpár eredménye a B képen) és a natív *vel1* gén (**c** és **d** primerpár eredménye a C képen). **a**: pVel1; **b**: hph\_int; **c**: Vel\_int1; **d**: Vel\_int2 (szekvenciák a 2. függelékben). A (B) és (C) képen láthatóak a  $\Delta vel1$  mutáns törzsek PCR módszerrel történő ellenőrzése. Számok: 1: QM 9414; 2:  $\Delta vel1$  törzs RKA14; 3:  $\Delta vel1$  törzs RKA17; 4:  $\Delta vel1$  törzs RKA18. (D) A vad típusú *vel1* lókusztér ábrája. A HindIII és BamHI DNS hasításának helyei (a sematikus ábra nem méretarányos). (E) A túltermelő törzsek Southern blot

analízise a (D) ábrán feltüntetett DNS emésztést követően, ahol az 1:RKA 12 (*OEvel1* mutáns); 2: RKA 13 (*OEvel1* mutáns); 3: QM 9414; 4: létra marker. Southern blot analízis során használt DIG-es próbát az (A) ábrán feltüntetett **c** és **d** primerpár segítségével amplifikáltuk.

4. **Függelék** *T. reesei* celluláz génjeinek expressziós analíziséhez felhasznált qPCR primerpárok

Gén	Primer neve	Oligonukleotid szekvencia (5'→3')	Amplifikációs efficiens	R <sup>2</sup> érték
tef1	tef1_F	Fw: 5'- TCAACGGTGACAACATGCTC	41853	0,99
	tef1_R	Rv: 5'- TTCTCCCAGCCCTTGTACC		
cbh1	cbh1_F	Fw: 5'- CGAATCTCAGTCTCCCAACG	41853	1,00
	cbh1_R	Rv: 5'- CCAATGGGTCCGAACTTG		
cbh2	cbh2_F	Fw: 5'- AAGGTCGATCGGGAAAGC	35065	1,00
	cbh2_R	Rv: 5'- CGATCACATTGCACCAGTCT		
xyr1	xyr1_F	Fw: 5'- AATCCACCTGCCAACCAG	35796	0,98
	xyr1_R	Rv: 5'- GTCGTGCTCATCCACGTCT		
xyn2	xyn2_F	Fw: 5'- TGCCGTGGAGGGTTACTTTA	32143	1,00
	xyn2_R	Rv: 5'- AAGAGCCCCCTTTAGCTGAC		
vel1	RT_Vel1 (1200- End) fw	Fw: 5'- AGCCTTATGTGCCTCACT	33140	1,00
	RT_Vel1 (1200- End) rev	Rv: 5'- GCAGGAGCAGAGTAGTTG		



**5. Függelék** A *T. reesei* LAE1 funkciójának tanulmányozásakor a qPCR vizsgálatához felhasznált primerpárok, azok amplifikációs efficienciái és R<sup>2</sup> értékei.

<b>Protein ID</b>	<b>Oligonukleotid szekvencia (5 - 3')</b>	<b>UPL próba (Roche)</b>	<b>Amplifikációs efficiencia (%)</b>	<b>R<sup>2</sup> érték</b>
23184	23184F: ccaaaagatccgcgagag 23184R: ttgtgggtgattgtgacgag	#89	1.79	0.98
41325	41325F: cgttttctcacaagcgaca 41325R: tcgccgattgctacacct	#75	1.70	0.98
61420	61420F: agcctatccccgaaagtca 61420R: gaagagggcgtctgtcttgt	#25	1.75	0.97
66092	66092F: ggggagcaaagattgatgc 66092R: tgccttctgcctgagac	#153	1.57	0.99
75230	75230F: atcgtggtcaactaccacagc 75230R: gccaaaggactcgaccag	#70	1.70	0.98
80685	80685F: gattccgacgatgaggagat 80685R: ccggcaccagtggtaact	#22	1.75	0.99
107494	107494F: gctcccttaaggagaagtgacc 107494R: gagttagacgccgtcgatatt	#70	1.70	0.96
122271	122271F: tgacatttctgacttgatgga 122271R: gccgcaaatgtcctcatac	#153	1.72	0.99
78683	78683F: caacgacaccaactacggtct 78683R: atggccgtgttgatgcc	#70	1.56	0.97
2392	2392F: cctcgtgcccaacttctc 2392R: cggatctcgaggactgctc	#25	1.72	0.98
53267	53267F: agcagcagcagaccatgag 53267R: gtgaggctcttgacga	#153	1.84	0.97
78611	78611F: catcctcgagggtcgtga 78611R: tactttggccgctgcaact	#153	1.67	0.98
57185	57185F: tgctttctttgacgtctc 57185R: cctcgaacaaggcaacaat	#153	0.97	0.99
60144	60144F: tcaagatgcttctggtgctc 60144R: agggcccaacgtcgtaac	#25	0.95	0.99
66819	66819F: gcgataggattccgctactg 66819R: gccgtctccagatactgt	#81	0.92	0.99
73250	73250F: tcggaatgggggaagat 73250R: ataccaatggccaagaac	#44	0.995	0.97
105106	105106F: caagaccaggaggagagcat 105106R: ggagatgaggaccgatgtgt	#75	1.07	0.997
106116	106116F: atccagtggtggaagtcaa 106116R: gccgtagccgagcatatc	#44	0.85	0.99
106161	106161F: caacctgggagactgcaac 106161R: gacgttggtcatggcgtag	#81	1.01	0.9917
tefl	trire_tefl_F:tcaacggtgacaacatgctc trire_tefl_R: ttctcccagccctgtacc	#22	1	0.99

**6. Függelék** A *T. reesi* LAE1 tanulmányban kiválasztott gének qPCR-el megvizsgált expressziós mintázata. QM: vad törzs;  $\Delta lae1$ : *lae1* mutáns; H: magas növekedési ráta (0.075 h<sup>-1</sup>); L: alacsony növekedési ráta (0.020 h<sup>-1</sup>)

Protein ID	Kódolt protein	D (h <sup>-1</sup> )	Összehasonlítás	Expresszió*	p érték*	Arrays	qPCR
73250	Coenzyme F420-dependent N5,N10-methylene tetrahydromethanopterin reductase	0.075	$\Delta lae1$ vs. QM	32.85	0.001	DOWN	DOWN
106161	NADP-glutamate dehydrogenase	0.075	$\Delta lae1$ vs. QM	1.02	0.001	DOWN	DOWN
122271	DAHP synthase ARO4	0.075	$\Delta lae1$ vs. QM	11.8	0.001	DOWN	DOWN
66092	GcvT, Glycine cleavage system T protein	0.075	$\Delta lae1$ vs. QM	63.63	0.001	DOWN	DOWN
75230	ILVD-Dehydratase family	0.075	$\Delta lae1$ vs. QM	4.06	0.001	DOWN	DOWN
107494	Glutamate decarboxylase and related proteins	0.075	$\Delta lae1$ vs. QM	3.6	0.001	DOWN	DOWN
41325	Bifunctional carbamoylphosphate synthase/aspartate carbamoyltransferase	0.075	$\Delta lae1$ vs. QM	14.87	0.001	DOWN	DOWN

Protein ID	Kódolt protein	D (h <sup>-1</sup> )	Összehasonlítás	Expresszió*	p érték*	Arrays	qPCR
53267	Nop10p family Nucleolar RNA-binding protein	0.075	Δlae1 vs. QM	3.62	0.001	DOWN	DOWN
78611	Ribosomal protein S29 (S14 family) by homology to the corresponding protein of <i>N. crassa</i>	0.075	Δlae1 vs. QM	9.33	0.001	DOWN	DOWN
78683	UTP5, encoding a component of the SSU processome	0.075	Δlae1 vs. QM	2.5	0.001	DOWN	DOWN
80685	Cys/Met metabolism PLP-dependent enzyme	0.075	Δlae1 vs. QM	3.53	0.001	DOWN	DOWN
61420	HisG ATP phosphoribosyltransferase	0.075	Δlae1 vs. QM	2.5	0.001	DOWN	DOWN
23184	IlvH Acetolactate synthase small (regulatory) subunit	0.075	Δlae1 vs. QM	0.18	0.001	DOWN	DOWN
2392	Translation initiation inhibitor, yjgF family	0.075	Δlae1 vs. QM	3.96	0.001	DOWN	DOWN
66819	4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase	0.075/0.020	QMH vs. QML	69.06	0.001	DOWN	DOWN
57185	C2H2 transcriptional regulator (amdA)	0.075/0.020	QMH vs. QML	1.78	0.001	DOWN	DOWN

Protein ID	Kódolt protein	D (h <sup>-1</sup> )	Összehasonlítás	Expresszió*	p érték*	Arrays	qPCR
105106	Catalase	0.075/0.020	QMH vs. QML	4.00	0.001	DOWN	DOWN
60144	Amino acid transporters	0.075/0.020	QMH vs. QML	2.51	0.001	UP	UP
106116	Amino acid transporters	0.075/0.020	QMH vs. QML	238	0.001	UP	UP
73250	Coenzyme F420-dependent N5,N10-methylene tetrahydromethanopterin reductase	0.075/0.020	QMH vs. QML	286	0.001	UP	UP

\* Az expresszió és p érték viszonya a qPCR eredményekhez.

**Függelék 7.** Gének, melyek ellentétes módon szabályozódnak a *T. reesei* *Δlae1* és QM 9414 törzsekben.

Trire2:	Szabályozás		Annotáció
	QM 9414	<i>Δlae1</i>	
4064	3,146 down	2,380 up	Threonine dehydratase
4921	4,263 down	2,241 up	C2H2 transcriptional regulator
56117	8,763 down	2,114 up	unknown protein
61114	3,169 down	2,015 up	Amino acid transporter LysP
68889	3,438 down	3,664 up	PDR-type ABC transporters
75998	7,174 down	3,107 up	unknown protein
82667	6,454 down	3,672 up	ThrB Homoserine kinase
103065	2,524 down	2,117 up	unknown protein
106647	3,115 down	2,468 up	unique protein
109211	2,226 down	2,135 up	MFS permease
122375	2,569 down	5,323 up	MRSP1/expansin-like
124288	3,814 down	2,308 up	unknown protein
3267	3,325 up	2,823 down	MRSP1/expansin-like
21758	13,684 up	9,337 down	isocitrate lyase
52248	8,064 up	2,597 down	ribosomal protein L1.
58525	6,212 up	2,064 down	unknown protein
59827	10,162 up	3,740 down	unknown protein
61081	4,232 up	5,133 down	histone acetyltransferase SPT10
64377	2,558 up	2,038 down	Cytochrome P only
66819	34,211 up	2,217 down	Amino acid transporter LysP
67133	6,047 up	2,203 down	unknown protein
69468	2,113 up	2,524 down	unknown protein
74486	3,025 up	3,190 down	unknown protein
75260	12,327 up	2,059 down	RNA polymerase H/23 kD subunit
75514	3,477 up	4,866 down	amino acid transporter ARG13
78679	17,156 up	2,004 down	mitochondrial carrier protein
82334	5,039 up	2,018 down	tyrosyl-tRNA synthetase, class Ib.
104595	18,405 up	2,140 down	Ribosomal protein L7Ae/L30e/S12e/Gadd45. Homologue of yeast SNU13.
106538	42,801 up	2,089 down	HFB4
108299	7,777 up	2,865 down	Kynurenine aminotransferase, glutamine transaminase K
109325	3,444 up	2,213 down	β-lactamase-like protein

Trire2:	Szabályozás		Annotáció
	QM 9414	<i>Δlae1</i>	
110493	5,609 up	2,291 down	unknown protein
112525	7,686 up	3,422 down	unknown protein
121089	7,396 up	13,125 down	unknown protein, only present in ascomycota and cow
121187	3,990 up	4,533 down	unknown protein
121475	2,173 up	19,965 down	unique protein
121486	2,427 up	2,104 down	unknown protein
121820	3,692 up	2,066 down	Methionine_syntMethionine synthasevitamin-B independent

**Függelék 8.** Az *Aspergillus nidulans* VeA és *Trichoderma reesei* VEL1 proteinjének struktúrális felépítése. Konzervált régiók kiemelve a sematikus ábrán. NCBI blastp alapján készült az ábra.

*Aspergillus nidulans* VeA (An1052) proteinjének struktúrális felépítése



*Trichoderma reesei* VEL1 (EGR48103.1) proteinjének struktúrális felépítése

