

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**A GLICERIN-3-FOSZFÁT DEHIDROGENÁZ
(*gfdB*) GÉN FUNKCIÓJÁNAK VIZSGÁLATA AZ
ASPERGILLUS NIDULANS FONALAS
GOMBÁBAN**

Gonda-Király Anita

Témavezető: Prof. Dr. Pócsi István



DEBRECENI EGYETEM

Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola

Debrecen, 2020

1. Bevezetés és célkitűzések

A glicerín egy olyan szerves vegyület, amely mindenhol jelen van a természetben. Ez a molekula az alapja például a foszfolipideknek és a triglicerideknek, melyek a sejtmembránok, illetve a lipidek gyakori összetevői (Mattam és mtsai., 2013). A glicerinképzés egyrészt biztosítja a celluláris redox egyensúly fenntartását stresszmentes körülmények között (Ansell és mtsai., 1997; Bakker és mtsai., 2001; Klein és mtsai., 2017). Másrészt, a sejtekben főként ozmotikus stressz hatására szintetizálódik és akkumulálódik, így jelentős szerepe van az ozmoregulációban (Pahlman és mtsai., 2001). A glicerín két úton szintetizálódhat az *Aspergillus nidulans* fonalas gombában: egyfelől a glicerín-3-foszfát dehidrogenáz enzimen keresztül, amely a dihidroxiaceton-foszfátot alakítja glicerín-3-foszfáttá, és ezután alakul tovább glicerinné, másfelől pedig a dihidroxiaceton-foszfátból először dihidroxiaceton, majd végül glicerín keletkezik (Fillinger és mtsai., 2001). Az *A. nidulans*-ban két paralóg glicerín-3-foszfát dehidrogenáz gén található, a *gfdA* és *gfdB* gének (Miskei és mtsai., 2009; de Vries és mtsai., 2017).

A Debreceni Egyetem Molekuláris Biotechnológiai és Mikrobiológiai Tanszékén 17 *Aspergillus* faj oxidatív stressztoleranciájának a tanulmányozása folyt. A Tanszékünkön végzett stresszkísérletek eredményeit a Fungal Stress Database adatbázisba (www.fung-stress.org) gyűjtötték össze Orosz és munkatársai (2018). Az elvégzett stresszkísérletek alapján jelentős ozmofilitást mutattak az *A. glaucus* és az *A. wentii* *Aspergillus* fajok

2 M szorbit mellett (de Vries és mtsai., 2017; Orosz és mtsai., 2018). Ezzel párhuzamosan a Debreceni Egyetem, Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet munkatársa, Dr. Miskei Márton összehasonlító genomikai elemzést végzett az *Aspergillus* fajokkal, mely alapján kiderült, hogy az *A. glaucus* és *A. wentii* fonalas gombák genomjában csak az *A. nidulans gfdA* génjének az ortológja található meg (de Vries és mtsai., 2017). Az *A. nidulans gfdA* géndeléciós mutánsát Fillinger és munkatársai (2001) készítették el és jellemezték. A mutáns törzs növekedése gyengült különböző szénforrásokon, kivéve glicerinen. Ugyanakkor ezen defektes növekedés az összes szénforráson helyreállítható volt 1 M NaCl ozmolit jelenlétében. Ezenfelül Balázs és munkatársai megvizsgálták a *gfd* génnek expresszióját oxidatív stresszorok (*t*BOOH, H₂O₂) és ozmotikus stresszt generáló ágens (NaCl) jelenlétében. Oxidatív stresszre egyik gén sem reagált, viszont NaCl expozícióra a *gfdB* gén up-regulálódott, a *gfdA* viszont nem (Balázs és mtsai., 2010).

Ezek alapján azt a hipotézist állítottuk fel, hogy az *A. glaucus* és az *A. wentii* gombák ozmofilitása a *gfdB* ortológok hiányával magyarázható. Doktori munkámban a *gfdB* (glicerín-3-foszfát dehidrogenáz B) gén funkciójának a feltárásában vettem részt különböző *Aspergillus* fajokban.

Munkám kezdetekor az alábbi célkitűzéseket fogalmaztuk meg:

- Fő célunk a *gfdB* gén deléciós mutánsának a létrehozása és fiziológiai jellemzése az *A. nidulans* modellorganizmusban, a Double-Joint PCR módszer segítségével.

- Keressük a választ arra a felvetésre, hogy a *gfdB* gén vajon ugyanolyan funkciót lát-e el, mint a *gfdA*; így az ozmotikus védelmi rendszerben van szerepe vagy más folyamatokban?

- Tanulmányozzuk az elkészült $\Delta gfdB$ mutánsok stresszérzékenységét és megfigyeljük a szabad gyökök és reaktív oxigén gyökök termelődését, az antioxidáns enzimtermelést, a toxintermelést, továbbá a törzsek micéliumából poliol tartalmat mérünk, és a sejtek apoptózisát, illetve életképességének változását is megvizsgáljuk oxidatív stresszor (*t*BOOH) jelenlétében és stresszmentes körülmények között is.

- További célunk az *A. nidulans gfdB* gén beépítése az *A. glaucus* ozmofil faj genomjába, az *Agrobacterium*-indukált transzformálási módszerrel.

- Választ keresünk arra a kérdésre, hogy vajon a *gfdB* gén hozzáadásával megszüntethető-e az *A. glaucus* ozmofilitása?

- Szeretnénk megvizsgálni, hogy hogyan változik a sikeresen előállított *A. glaucus* transzgén törzsek fenotípusa a különböző stresszt generáló szerek jelenlétében 2 M szorbittal, illetve 1 M NaCl-dal kiegészített táptalajon.

2. Anyagok és módszerek

2.1 A vizsgálatainkhoz felhasznált törzsek és tenyésztésük

Vizsgálataink során az *A. nidulans* THS30.3 kontroll törzsszel, *A. nidulans* $\Delta gfdB$ törzsekkel, az *A. glaucus* CBS 516.65 vad típusú törzsszel, valamint az *A. glaucus gfdB* transzgén törzsekkel dolgoztunk.

A *gfdB* (glicerin-3-foszfát dehidrogenáz, locus ID: AN6792) gén delécióját a Double-Joint PCR módszerrel hajtottuk végre (Yu és mtsai., 2004; Leiter és mtsai., 2016), a sikeres rekombinációt pedig Southern blot hibridizációval ellenőriztük.

Az *A. glaucus gfdB* transzgén törzseket az *Agrobacterium*-indukált transzformálással hoztuk létre Kozák és munkatársai 2018-as leírása alapján. A kópiaszámot az abszolút kvantifikáció módszerének segítségével határoztuk meg (Herrera és mtsai., 2009), a génexpressziót pedig reverz transzkripciós PCR módszerrel vizsgáltuk.

Az *A. nidulans* törzseket 6 napon keresztül szilárd Barratt-féle minimál táptalajon (Barratt és mtsai., 1965) spóráztattuk 37 °C-on, és a 6. napon összegyűjtöttük a spórákat a stresszkísérletekhez. Az *A. glaucus* törzsek tenyésztése 0,5 M NaCl-ot tartalmazó malátás táptalajon történt 25 °C-on 6 napon keresztül (de Vries és mtsai., 2017; Orosz és mtsai., 2018).

Az *A. nidulans* törzseket 100 ml minimál táplevest tartalmazó 500 ml-es Erlenmeyer lombikokban 220 rpm-mel rázattuk 37 °C-on. Az oxidatív stresszt generáló 0,4 mM *t*BOOH-val a kései

exponenciális növekedési fázisban (20 óra) kezeltük a tenyészeteket, majd 10 és 24 órás stressznek való kitétséget követően vettünk mintát a tenyészetekből (Yin és mtsai., 2013).

2.2 A vizsgált *Aspergillus* gombatörzsekkel végzett stresszkísérletek

A stresszkísérletekhez összegyűjtöttünk 1×10^5 számú friss spórát és pont inokuláltuk különböző stresszt generáló szereket tartalmazó minimál táptalajra, illetve az *A. glaucus* esetében 2 M szorbittal, valamint 1 M NaCl-dal kiegészített minimál táptalajra (Balázs és mtsai., 2010; de Vries és mtsai., 2017; Orosz és mtsai., 2018). Az alkalmazott stressz ágensek és koncentrációik a következők voltak:

- 2 M szorbit
- 1 M NaCl
- 0,4 és 0,8 mM *t*BOOH
- 6 és 9 mM H₂O₂
- 1,5 és 2 mM diamid
- 0,096 és 0,19 mM MSB
- 54 μM kongóvörös
- 0,1 és 0,3 mM CdCl₂

A felületi kultúrákat 5 napon át inkubáltuk 37 °C-on (*A. nidulans*), illetve 5 és 10 napon át 25 °C-on (*A. glaucus*, *A. nidulans*), majd az 5. és a 10. napon lemértük az átmérőjüket, ezzel jellemezve a stresszérzékenységüket.

2.3 Az *A. nidulans* THS30.3 és $\Delta gfdB$ törzsek életképességének és a sejtek apoptózisának a vizsgálata

Az életképesség tesztet Gun Lee és munkatársai (1999) által leírt módszer módosított változatával hajtottuk végre az MTT redukciós teszt segítségével. A mitokondriális membránpotenciál tanulmányozásához JC-1 fluoreszcens festéket használtunk a gyártó leírásának megfelelően (JC-1 Mitochondrial Membrane Potential Detection kit, Biotium).

2.4 Az *A. nidulans* THS30.3 és $\Delta gfdB$ törzsek élettani tulajdonságainak vizsgálata

Az *A. nidulans* törzsek által termelt poliolt tartalom meghatározását liofilizálással előkészített mintákkal végeztük el HPLC módszerrel (Huber és Bonn, 1995), valamint NMR-alapú metabolomikával Witteveen és munkatársai (1990) leírásának módosításával.

A sejtek szabad gyök és reaktív oxigén gyök tartalmának tanulmányozásához Halliwell és Gutteridge 2007-es munkáját használtuk.

Az antioxidáns enzimaktivitás mérésekhez a törzsek tenyészetét (15 ml) zsugorított üvegszűrőn szűrtük át, a szűrt micéliumot pedig desztillált vízzel mostuk, majd jéghideg 0,1 M-os nátrium-foszfát pufferben vettük fel és a szuszpenziót -20 °C-on tároltuk. Ezután a mintákat 0,5 mm-es üvegyöngyök segítségével tártuk (Emri és mtsai., 1997). A minták glutation reduktáz (GR) (Pinto és mtsai., 1984), glutation peroxidáz (GPx) (Chiu és mtsai., 1976),

kataláz (Roggenkamp és mtsai., 1974) és szuperoxid dizmutáz (SOD) (Oberley és Spitz, 1984) aktivitását határoztuk meg.

A szterigmatocisztin mennyiségének meghatározásához Klich és munkatársai 2001-es munkáját használtuk.

2.5 Statisztikai vizsgálatok

A disszertációmban minden kísérlet esetében 3-6 független mérés átlagát és annak szórását tüntettük fel. Az átlagértékek közötti eltérések kimutatására a Student-féle t-próbát használtuk és a különbséget kizárólag a $p < 0,05$ valószínűség esetén fogadtuk el szignifikánsnak.

3. Eredmények és megbeszélésük

Elkészítettük az *A. nidulans* fonalas gomba *gfdB* géndeléciós mutánsát és megvizsgáltuk ozmotikus stresszt, oxidatív stresszt, sejtfalintegritás-stresszt és nehézfém stresszt okozó szerek jelenlétében, felületi tenyészetekben 37 °C-on, 5 napos inkubációt követően. A *gfdB* gén deléciója jelentős oxidatívstressz-érzékenységet eredményezett *tBOOH*, H_2O_2 és diamid jelenlétében. Emellett azt találtuk még, hogy a $\Delta gfdB$ mutáns érzékeny volt a sejtfalintegritás-stresszt generáló kongóvörösrre is. Az *A. nidulans* $\Delta gfdA$ mutáns is érzékenynek bizonyult a sejtfal dezintegrációját okozó kalkofluor fehérre, továbbá gyengén növekedett különböző szénforrásokat tartalmazó táptalajokon. Amikor glicerint használtak szénforrásként, a mutáns törzs növekedése nem maradt el a kontrollétól. Az összes szénforráson helyreállítható volt az eredeti fenotípus 1 M NaCl ozmotikus stabilizátorral (Fillinger és mtsai., 2001). Elvégeztük mi is ezt a kísérletet különböző szénforrásokon 1 M NaCl-dal, illetve 2 M szorbittal kiegészített táptalajon, de nem tapasztaltunk különbséget a kontroll és a mutánsok növekedésében. Azaz a $\Delta gfdB$ törzs észlelt fenotípusai nem voltak ozmolitokkal remediálhatók.

Megvizsgáltuk a mutáns törzsben a szabad gyök és reaktív oxigén gyök (RS) tartalom változását folyékony kultúrában stresszmentes körülménynek között és 0,4 mM *tBOOH*-val kezelt tenyészetekben is. Kezelés nélkül is négyszer olyan nagy volt az RS tartalom a mutánsban a kontrollhoz képest, viszont kezelés hatására mindkét törzsben jelentősen megnövekedett az RS szint; a géndeléciós törzsben nyolcszor olyan nagy volt, mint *tBOOH* nélkül. Mivel ilyen

jelentősen megnövekedett a szabad gyökök és reaktív oxigén gyökök szintje a mutánsban, így meghatároztuk néhány antioxidáns enzim specifikus aktivitását is folyékony kultúrában. A megnövekedett specifikus GR aktivitások feltehetően a nagy RS szintek semlegesítésére irányultak. Ezzel ellentétben a specifikus GPx és a kataláz enzimaktivitások oxidatív stresszor jelenlétében és anélkül is csökkentek a mutáns törzsben, ami önmagában eredményezhette az RS koncentrációk növekedését, másrészt valószínűleg emiatt még a megnövekedett specifikus GR aktivitás sem volt elegendő ahhoz, hogy helyreállítsa a redox egyensúly felborulását a $\Delta gfdB$ törzsben.

Tanulmányoztuk a szterigmatocisztin termelés változását is, és azt tapasztaltuk, hogy a *gfdB* gén deléciója növelte a mikotoxin termelést folyékony kultúrában stresszmentes körülmények között és oxidatív stressz kezelés hatására is.

Tanulmányoztuk a *gfdB* géndeléció törzs folyékony tenyészetének az életképességét és a programozott sejthalálát. A mutáns törzs életképessége szignifikánsan csökkent a THS30.3 kontroll törzséhez képest 0,4 mM *t*BOOH jelenlétében és nélküle is. Ehhez hasonló eredményeket kaptunk, amikor a sejtek apoptózisát vizsgáltuk, ahol már 52 óras korban nagyobb volt a sejtek apoptotikus rátája a *gfdB* gén hiányában.

Munkánk során megvizsgáltuk a $\Delta gfdB$ törzs poliol tartalmát stresszmentes körülmények között 44 óras rázatott tenyészetekben és mannit, illetve eritrit cukoralkoholokat detektáltunk. A *gfdB* gén deléciója hatással volt a mannit termelésre; szignifikánsan nagyobb

volt a mutáns törzsben a kontrolléhoz viszonyítva, viszont az eritrit termelésre nem volt hatással a géndeléción.

Az *A. nidulans* törzsek polioltartalmát megvizsgáltuk 0,4 mM *t*BOOH kezelés után is. Meglepő módon azt tapasztaltuk, hogy nem volt eritrittermelés sem a kontroll, sem pedig a mutáns törzsekben. Ez feltehetően azzal magyarázható, hogy a redukáló NADPH-igény növekszik, amely a citoplazmában zajló pentóz-foszfátútvonal terméke (Varecza és mtsai., 2006), és amely útvonal az eritrit prekursorának, az eritroz-4-foszfátnak is a forrása (Rzechonek és mtsai., 2018). Ez a megfigyelés azzal magyarázható, hogy a $\Delta gfdB$ törzsben megnövekedett specifikus GR-aktivitást mértünk, hiszen az eukariótákban a GR-enzim NADPH-t használ az oxidált glutation visszaredukálásához oxidatív stressz esetében (Emri és mtsai., 1997; Pócsi és mtsai., 2004). Továbbá azt is megfigyeltük, hogy a *t*BOOH-kezelés eredményeként a mannittermelés szignifikánsan növekedett a $\Delta gfdB$ mutánsban, míg a kontroll törzsben változatlan maradt. Ez azért lehet, mert a redox-egyensúly felborulásának helyreállításához a géndeléción törzsnek nagyobb szüksége van valamilyen poliokra, mint a kontrollnak. A mannitnak fontos szerepe van a fonális gombák oxidatív stressz elleni védelmi rendszerében. Korábbi kutatásokban igazolták, hogy a mannit gyökfogó molekulaként eliminálja a szabad gyököket és reaktív oxigén-gyököket (Smirnoff és Cumbes, 1989; Chaturvedi és mtsai., 1997; Hema és mtsai., 2014). Ezzel magyarázható, hogy a *gfdB* géndeléción törzsben stresszmentes körülmények között is növekedett a mannit-tartalom, mivel az RS-szint is magas volt.

Kutatásunkba bevontunk egy ozmofil fajt, az *A. glaucus* is, mivel ebben a fajban hiányzik a *gfdB* gén. Beépítettük tehát a *gfdB* gént az *A. glaucus* genomjába és felületi kultúrák kísérleteket végeztünk; megvizsgáltuk a fenotípusukat 25 °C-on, 5 és 10 napos inkubációt követően 2 M szorbit ozmotikus stabilizátor mellett. Mivel 25 °C-on hosszabb tenyésztési idő szükséges, 5 nap eltelte után még csak a 'c *gfdB2* törzs kongóvörössel és MSB-vel kezelt tenyészetek telepátmérőiben láthattunk különbséget. Majd 10 napos tenyésztés után azt tapasztaltuk, hogy a *gfdB* gén inzerciója szignifikánsan nagyobb oxidatív (*t*BOOH, MSB, H₂O₂), sejtfalintegritás- (kongóvörös) és nehézfém- (CdCl₂) stresszel szembeni toleranciát eredményezett. A leglátványosabb fenotípust 0,4 mM *t*BOOH mellett mutatták a transzgén törzsek, hiszen itt a *gfdB* gén teljesen visszaállította a kontroll törzs stresszmentes kultúrában észlelt fenotípusát.

Az *A. glaucus* törzsek stresszérzékenységét 1 M NaCl ozmolit mellett is megvizsgáltuk 10 napos inkubációt követően. Nem detektáltunk szignifikáns különbséget a kontroll és a mutánsok növekedésében. Ez feltehetően azért van, mert az *A. glaucus* gomba stresszmentes körülmények között is lassabban nő NaCl jelenlétében, mint szorbit mellett. Tehát valószínű, hogy a NaCl gátolhatja a gomba különböző stressztípusokhoz való alkalmazkodását (Orosz és mtsai., 2018).

Megvizsgáltuk ugyanilyen körülmények között (25 °C, 10 nap, minimál táptalaj) az *A. nidulans* Δ *gfdB* törzs stresszérzékenységét is ugyanezen stresszorokkal. A *gfdB* gén delécioja növelte a gomba

stresszérzékenységét oxidatív, sejtfalintegritás és nehézfém stresszorok jelenlétében is.

Eredményeink számos új információt tártak fel a glicerín-3-foszfát dehidrogenázt kódoló génekről *Aspergillus* fajokban. Adataink alapján elmondhatjuk, hogy az *A. nidulans*ban a *gfdB* gén szerepe az oxidatív, és sejtfalintegritás-stresszel szembeni toleranciában, a sejtek életképességének fenntartásában és az apoptózis késleltetésében nyilvánult meg. Ezen glicerín metabolikus enzim deléciója feltehetőleg azért eredményezett mannit túltermelést közvetett módon, mert az idősebb tenyészetekre jellemzőbb a mannit akkumulálása, míg a fiatalabb tenyészetek inkább glicerint halmoznak fel.

A *gfdB* gén beépítése az *A. glaucus* gombába növelte az oxidatív-, a sejtfalintegritás- és a nehézfémstressz-toleranciát, de nem volt hatással az ozmofilitásra, ahogyan azt korábban gondoltuk. A Balázs és munkatársai (2010) által elvégzett génexpressziós vizsgálatokban egyik *gfd* gén sem reagált oxidatív stresszre, viszont ozmotikus stresszre a *gfdB* gén up-regulációját figyelték meg. Az általunk elkészített *A. nidulans gfdB* géndeléciós mutánsok a várttal ellentétes fenotípust mutattak, feltehetőleg azért, mert ozmotikus stressz esetén a *gfdA* a fő védőelem, így nem indukálódik tovább NaCl expozíció hatására. A *gfdA* delécióját nem képes a *gfdB* up-regulációja sem kompenzálni ozmotikus stressz esetén. Viszont a *gfdB* gén delécióját a *gfdA* képes ellensúlyozni ozmotikus stressz esetében. Egy korábbi tanulmány szerint egy génnek kiemelt szerepe lehet a

stresszvédelemben, attól függetlenül, hogy nem reagál oxidatív stressznek kitett környezetben (Thorpe és mtsai., 2004).

Ahhoz, hogy eredményeinket megerősítsük, a jövőben további glicerín-3-foszfát dehidrogenáz paralóg génpárok vizsgálata szükséges különböző fajokban, hiszen a stressz védelmi szabályozás sokkal komplexebb ezen géneken keresztül, mint azt várnánk. Ezek alapján tervezzük az *A. wentii* ozmofil fonalas gomba *gfdB* transzgén törzseinek az előállítását is és az elkészült mutánsok fiziológiai vizsgálatát (de Vries és mtsai., 2017; Orosz és mtsai., 2018).

4. Összefoglalás

Az *A. nidulans* fonalas gombában a glicerín-3-foszfát dehidrogenáz génnek két paralóg izoformája létezik: a *gfdA* és a *gfdB* gének (de Vries és mtsai., 2017). Szerettük volna feltárni a *gfdB* génnek az élettani szerepét, ezért elkészítettük az *A. nidulans* fonalas gombában a $\Delta gfdB$ mutánst.

Megfigyeléseink közül az alábbiak voltak a legfontosabbak:

- A $\Delta gfdB$ mutáns 37 °C-on, 5 napos inkubálást követően jelentős oxidatívstressz-érzékenységet mutatott *t*BOOH, H₂O₂, valamint diamid jelenlétében, továbbá érzékenynek bizonyult kongóvörösre, mely festék sejtfalintegritás-stresszt okoz.

- Hasonló kísérletet végeztünk 25 °C-on, és 10 napos tenyészetekben is megfigyeltük a géndeléciós törzsek fenotípusának változását és szignifikáns különbségeket tapasztaltunk oxidatív (*t*BOOH, H₂O₂, MSB), sejtfalintegritás- (kongóvörös) és nehézfémstresszt okozó ágensek (CdCl₂) jelenlétében.

- A gén deléciójával növekedett a reaktív részecskék koncentrációja stresszmentes körülmények között, valamint az oxidatív stresszt előidéző *t*BOOH-val kezelt tenyészetekben is.

- Ebből adódóan megvizsgáltuk néhány antioxidáns enzim aktivitását is. A specifikus GR aktivitás nagyobb volt a géndeléciós törzsben kezeléssel és anélkül is. A specifikus GPx és kataláz aktivitás pedig szignifikánsan csökkent a mutáns törzsben, feltehetően azért, mert a specifikus GR aktivitás önmagában nem volt elegendő a redox egyensúly helyreállításához. Megfigyeltük még a specifikus SOD

aktivitás alakulását, mely szintén szignifikánsan csökkent a *tBOOH* kezelés hatására, ezáltal eliminálva a reaktív gyököket.

- A *gfdB* gén hiánya a mikotoxin termelést is megzavarta. A mutáns törzsben szignifikánsan nagyobb szterigmatocisztin tartalmat mértünk, mint a THS30.3 kontrollban. Amikor oxidatív stressz érte a tenyészeteket, akkor csökkent a szterigmatocisztin termelés mindkét törzsben, de még így is kétszer olyan nagy volt a mutánsban, mint a kontrollban.

- Emellett a Δ *gfdB* törzs polirol tartalmának az alakulását is megfigyeltük. Stresszmentes körülmények között a mannit termelés szignifikánsan nagyobb volt, mint a kontrollban, ezzel szemben az eritrit tartalmak hasonlóan alakultak mindkét törzsben. Amikor *tBOOH*-val kezeltük a gombatörzseket, akkor sem a kontrollban, sem a géndeléciós törzsben nem volt kimutatható mennyiségben eritrit, továbbá a Δ *gfdB* törzsben jelentősen növekedett a mannit koncentráció, de a THS30.3 törzsben változatlan maradt.

- A törzsek életképességének a csökkenését figyeltük meg mind a kezelés nélküli, mind a *tBOOH*-val kezelt tenyészetekben, ezzel ellentétben a sejtek apoptózisa viszont növekedett. *tBOOH* hozzáadásával már 52 óras korban szignifikáns különbséget figyeltünk meg az apoptotikus rátában.

A doktori munkám további céljával tüztük ki a *gfdB* gén beépítését a 2 M szorbit mellett jelentős ozmofilitást mutató *A.*

glaucus fonalas gomba genomjába. Az elkészített transzgén törzsekkel a legfontosabb eredményeink a következők voltak:

- A *gfdB* gén inzerciója jelentős stressztoleranciát eredményezett az oxidatív stresszt generáló *t*BOOH, MSB és H₂O₂ jelenlétében, ezen túlmenően megnövekedett toleranciát figyeltük meg a sejtfalintegritás-stresszt kiváltó kongóvörössel szemben, és emellett nehézfémstressz-toleranciát is megfigyeltünk a mutáns törzsek esetében CdCl₂ mellett 10 napos inkubációt követően, 2 M szorbittal kiegészített táptalajokon.

- A transzgén törzsek stresszérzékenységében nem volt jelentős különbség, amikor szorbit helyett 1 M NaCl-ot használtunk ozmotikus stabilizátorként.

Eredményeink alapján elmondható, hogy az *A. nidulans* fonalas gombában a *gfdB* génnek az oxidatív és a sejtfalintegritás-stressz elleni védelmi rendszerben, továbbá a sejtek életképességének a fenntartásában, illetve az apoptózis késleltetésében van szerepe.

Az oxidatív stressztoleranciában betöltött funkcióját akkor is megtartotta a *gfdB* gén, amikor egy másik *Aspergillus* fajba, az *A. glaucus*ba transzformáltuk. Ezek alapján elmondhatjuk, hogy az *A. glaucus* jól ismert ozmofilitása nem magyarázható a *gfdB* gén evolúciós hiányával. A további kutatásokban fontos lenne feltárni, hogy más glicerín-3-foszfát dehidrogenáz paralóg génpároknak vajon milyen fiziológiai funkciói vannak a különböző *Aspergillus* fajokban.

5. Tézisek

- 1) Az *A. nidulans* fonalas gombában a *gfdB* génnek az oxidatív és sejtfalintegritás elleni védelmi rendszerben van szerepe.
- 2) A gén deléciója jelentősen növelte a Δ *gfdB* törzs szterigmatocisztin termelését stresszmentes körülmények között és 0,4 mM *t*BOOH kezelés hatására is.
- 3) A szabad gyök és reaktív oxigén gyök tartalom is szignifikánsan növekedett a géndeléciós törzsben az oxidatív stresszt generáló vegyület, a *t*BOOH jelenlétében és hiányában is.
- 4) A fokozott szabad gyök és reaktív oxigén gyök termelés hatására megnövekedett specifikus glutation reduktáz aktivitást figyeltünk meg. Ezzel ellentétben a specifikus kataláz, glutation peroxidáz és szuperoxid dizmutáz aktivitások csökkentek.
- 5) A *gfdB* gén részt vesz ebben a fajban a sejtek életképességének a fenntartásában, illetve az apoptózis késleltetésében.
- 6) A gén deléciója mannit túltermelést eredményezett, mely a szabad gyökök és reaktív oxigén gyökök semlegesítésére irányult.
- 7) Az *A. glaucus* fonalas gombában a *gfdB* gén bevitelével növelte az oxidatív-, a sejtfalintegritás- és a nehézfémstressz-toleranciát, de nem volt hatással az ozmofilitásra.

6. Köszönetnyilvánítás

Őszinte köszönetemet szeretném kifejezni témavezetőmnek, Prof. Dr. Pócsi István tanszékvezető egyetemi tanárnak, hogy lehetővé tette, és szakmailag támogatta a doktori munkám elkészítését a Debreceni Egyetem Természettudományi Karának Molekuláris Biotechnológiai és Mikrobiológiai Tanszékén.

Ezúton is nagyon köszönöm Dr. Leiter Éva egyetemi docensnek a genetikai munkában nyújtott nélkülözhetetlen segítségét, továbbá hasznos szakmai tanácsait.

Köszönetemet szeretném kifejezni Dr. Emri Tamás egyetemi docensnek az RT-qPCR kísérletek kivitelezésében és kiértékelésében nyújtott segítségéért és értékes szakmai tanácsaiért.

Szeretném megköszönni Prof. Dr. Molnár István professzor úrnak (The School of Plant Sciences, College of Agriculture and Life Sciences, The University of Arizona, Tucson, USA) az *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 törzs és a pAg-H3 plazmid, valamint Prof. Dr. Ronald de Vries professzor úrnak (Westerdijk Fungal Diversity Institute, Utrecht, The Netherlands) az *Aspergillus glaucus* CBS 516.65 törzs rendelkezésünkre bocsátását.

Köszönettel tartozom Prof. Dr. Kövér Katalin egyetemi tanárnak és munkatársainak (Debreceni Egyetem Természettudományi és Technológiai Kar Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék) az NMR mérésekben nyújtott segítségükért.

Szeretném megköszönni Dr. Gyémánt Gyöngyi egyetemi docensnek és munkatársainak (Debreceni Egyetem

Természettudományi és Technológiai Kar Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék) a HPLC mérésekben nyújtott segítségüket.

Nagyon köszönöm Tóth Gáborné laboratóriumi asszisztens stresszvizsgálatokban nyújtott odaadó segítségét.

Ezúton is köszönöm Dr. Jakab Ágnes egyetemi adjunktus hasznos szakmai tanácsait, valamint Szabó Zsuzsa tudományos segédmunkatárs élettani kísérletekben nyújtott segítségét.

Köszönetemet szeretném kifejezni Szabó Ivett Gabriella, Molnár Anna, Magi Katalin Fruzsina, Katona Erik, Szabó Fruzsina, Gyarmati Eszter, Szatmári Enikő szakdolgozóknak kitartó és lelkes munkájukért.

Köszönöm továbbá a Molekuláris Biotechnológiai és Mikrobiológiai Tanszék valamennyi dolgozójának a szakmai segítséget és támogatást.

Hálásan köszönöm férjemnek, szüleimnek, testvéremnek és barátaimnak a végtelen türelmet és támogatást, amellyel munkámat segítették.

A doktori munkám elkészítését az EFOP-3.6.1-16-2016-00022 számú projekt támogatta. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósult meg.

Az értekezés alapjául szolgáló kutatást az Innovációs és Technológiai Minisztérium által meghirdetett Felsőoktatási Intézményi Kiválósági Program NKFIH-1150-6/2019 számon támogatta, a Debreceni Egyetem Biotechnológia tématerületi programja keretében.

Az értekezés a GINOP-2.3.3-15-2016-00004 számú projekt keretében, az Európai Unió támogatásával, az Európai Regionális Fejlesztési Alap társ-finanszírozásával valósult meg.

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

**STUDY OF THE FUNCTION OF GLYCEROL-3-
PHOSPHATE DEHYDROGENASE (*gfdB*) IN THE
FILAMENTOUS FUNGUS *ASPERGILLUS*
*NIDULANS***

by Anita Gonda-Király

Supervisor: Prof. Dr. István Pócsi



UNIVERSITY OF DEBRECEN

Doctoral School of Juhász-Nagy Pál

Debrecen, 2020

7. Introduction and objectives

Glycerol is an organic compound that can be found everywhere in nature. This molecule is the base of for example phospholipids and triglycerides, which are common components of cell membranes and lipids (Mattam et al., 2013). On the one hand, glycerol synthesis ensures that the cellular redox balance is maintained under stress-free conditions (Ansell et al., 1997; Bakker et al., 2001; Klein et al., 2017). On the other hand, it is synthesized and accumulated in cells mainly due to osmotic stress, thus it plays a significant role in osmoregulation (Pahlman et al., 2001). Glycerol may be synthesized on two paths in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*: on the one hand, through the enzyme glycerol-3-phosphate dehydrogenase, which transforms dihydroxyacetone phosphate into glycerol-3-phosphate, and this is transformed further into glycerol, and on the other hand, from dihydroxyacetone phosphate, first dihydroxyacetone, and ultimately glycerol is formed (Fillinger et al., 2001). *A. nidulans* contains two paralogous glycerol-3-phosphate dehydrogenase genes, the genes *gfdA* and *gfdB* (Miskei et al., 2009; de Vries et al., 2017).

At the Department of Molecular Biotechnology and Microbiology of the University of Debrecen, the oxidative stress tolerance of 17 *Aspergillus* species has been studied. The results of stress experiments performed at our Department have been accumulated in the Fungal Stress Database (www.fung-stress.org) by Orosz et al. (2018). Based on the stress experiments performed, *A. glaucus* and *A. wentii* *Aspergillus* species showed significant osmophilicity in the presence of 2 M sorbitol (de Vries et al., 2017;

Orosz et al., 2018). Simultaneously, Dr. Márton Miskei, the associate of the Biochemistry and Molecular Biology Institute of the University of Debrecen performed a comparative genomic analysis of *Aspergillus* species, which showed that in the genome of the filamentous fungi *A. glaucus* and *A. wentii*, only the ortholog of the *gfdA* gene of *A. nidulans* can be found (de Vries et al., 2017). The *gfdA* gene deletion mutant of *A. nidulans* was prepared and described by Fillinger et al. (2001). The growth of the mutant strain was reduced on different carbon sources, except for glycerol. However, this defective growth could be restored on all carbon sources in the presence of 1 M NaCl osmolyte. Additionally, Balázs et al. examined the expression of *gfd* genes in the presence of oxidative stress agents (*t*BOOH, H₂O₂) and an osmotic stress agent (NaCl). Neither of the genes reacted to oxidative stress, but under NaCl exposure, the *gfdB* gene became up-regulated, while *gfdA* did not (Balázs et al., 2010).

Based on these findings, we have set up the hypothesis that osmophilicity of the fungi *A. glaucus* and *A. wentii* can be explained with the absence of *gfdB* orthologs. In my thesis, I have participated in uncovering the function of the *gfdB* (glycerol-3-phosphate dehydrogenase B) gene in different *Aspergillus* species.

At the beginning of my work, we have formulated the following objectives:

- Our main goal is to create the *gfdB* gene deletion mutant and to describe its physiology in the model organism *A. nidulans* using the Double-Joint PCR method.

- We wish to answer the hypothesis on whether the *gfdB* gene performs the same function as *gfdA*; thus does it play a role in osmotic defense system or in other processes?

- We study the stress sensitivity of the prepared Δ *gfdB* mutants, and observe the generation of free radicals and reactive oxygen species, antioxidant enzyme production, toxin production, and furthermore, we measure polyol content in the mycelia of the strains, and we also examine the change of cell apoptosis and viability in the presence of an oxidative stress agent (*t*BOOH) and also under stress-free conditions.

- In addition, it is our goal to supplement the genome of the osmophilic species *A. glaucus* with the *gfdB* gene of *A. nidulans* using the *Agrobacterium*-induced transformation method.

- We are seeking the answer to the question whether the osmophilicity *A. glaucus* can be eliminated by introducing the *gfdB* gene?

- We would like to examine how the phenotypes of the transgenic *A. glaucus* strains successfully prepared change in the presence of stress agents on a medium complemented with 2 M sorbitol, and 1 M NaCl respectively.

8. Materials and methods

8.1 The strains used for our examinations and their culturing

In the course of our examinations, we used the *A. nidulans* THS30.3 control strain, *A. nidulans* Δ *gfdB* strains, the *A. glaucus* CBS 516.65 wild-type strain, and *A. glaucus* *gfdB* transgenic strains.

The deletion of the *gfdB* (glycerol-3-phosphate dehydrogenase, locus ID: AN6792) gene was performed using the Double-Joint PCR method (Yu et al., 2004; Leiter et al., 2016), and successful recombination was verified using Southern blot hybridization.

The *A. glaucus* *gfdB* transgenic strains were created using *Agrobacterium*-induced transformation as described by Kozák et al. in 2018. The copy number was determined using the method of absolute quantification (Herrera et al., 2009), and gene expression was examined using reverse transcription PCR.

A. nidulans strains were sporulated for 6 days on the solid minimal medium proposed by Barratt (Barratt et al., 1965) at 37 °C, and on the 6th day, the spores were collected for stress experiments. The culturing of *A. glaucus* strains was performed on malt medium containing 0.5 M NaCl at 25 °C for 6 days (de Vries et al., 2017; Orosz et al., 2018).

The *A. nidulans* strains were shaken at 220 rpm at 37 °C in 500-ml Erlenmeyer flasks containing 100 ml minimal liquid media. The cultures were treated with the oxidative stress agent 0.4 mM *t*BOOH in the late exponential growth phase (20 hours), and then samples were

taken from the cultures following 10-hour and 24-hour exposure to stress (Yin et al., 2013).

8.2 Stress experiments performed with the *Aspergillus* fungal strains examined

For the stress experiments, we collected 1×10^5 fresh spores, and point-inoculated them to minimal media containing the different stress agents, and for *A. glaucus*, minimal media complemented with 2 M, and 1 M NaCl sorbitol respectively (Balázs et al., 2010; de Vries et al., 2017; Orosz et al., 2018). The stress agents used and their concentrations were as follows:

- 2 M sorbitol
- 1 M NaCl
- 0.4 and 0.8 mM *t*BOOH
- 6 and 9 mM H₂O₂
- 1.5 and 2 mM diamid
- 0.096 and 0.19 mM MSB
- 54 μM Congo Red
- 0.1 and 0.3 mM CdCl₂

Surface cultures were incubated for 5 days at 37 °C (*A. nidulans*), and for 5 and 10 days at 25 °C-on (*A. glaucus*, *A. nidulans*) respectively, and their diameters were measured on the 5th and the 10th day, thus describing their stress sensitivity.

8.3 Examination of the viability and cell apoptosis of the *A. nidulans* THS30.3 and Δ *gfdB* strains

The viability test was performed with the modified version of the method described by Gun Lee et al. (1999), using the MTT reduction test. For the study of the mitochondrial membrane potential, the fluorescent dye JC-1 was used, in accordance with the guidance of the manufacturer (JC-1 Mitochondrial Membrane Potential Detection kit, Biotium).

8.4 Examination of the physiological properties of the *A. nidulans* THS30.3 and Δ *gfdB* strains

The polyol content produced by *A. nidulans* strains was measured using samples prepared with lyophilization, using the HPLC method (Huber és Bonn, 1995), and using NMR-based metabolomics, with the modified version of the description of Witteveen et al. (1990).

The free radical and reactive oxygen species content of cells was examined based on the 2007 work of Halliwell and Gutteridge.

For the measurement of antioxidant enzyme activity, the cultures of the strains (15 ml) were filtered through a sintered glass-filter, the filtered mycelia were washed with distilled water, and resuspended in ice-cold 0.1 M potassium-phosphate buffer, and the suspension was stored at -20 °C. Then, the samples were prepared by disruption using 0.5 mm glass beads (Emri et al., 1997). The glutathione reductase (GR) (Pinto et al., 1984), glutathione peroxidase (GPx) (Chiu et al., 1976), catalase (Roggenkamp et al., 1974), and superoxide dismutase (SOD) (Oberley és Spitz, 1984) activity of the samples were measured.

For the measurement of the quantity of sterigmatocystin, the 2001 work of Klich et al. was used.

8.5 Statistical tests

For each experiment in the dissertation, the means of 3 to 6 independent measurements and their standard deviations are shown. Student's t-test was used to detect differences between mean values, and the differences were accepted as significant only in the case of probabilities of $p < 0.05$.

9. Results and discussion

We prepared the prepared the *gfdB* gene deletion mutant of the filamentous fungus *A. nidulans*, and examined it in the presence of osmotic stress, oxidative stress, cell wall integrity stress, and heavy metal stress agents, in surface cultures following 5-day incubation at 37 °C. The deletion of the *gfdB* gene resulted in significant oxidative stress sensitivity in the presence of *t*BOOH, H₂O₂ and diamide. In addition, we found that the Δ *gfdB* mutant was sensitive to the cell wall integrity stress agent Congo Red as well. The Δ *gfdA* mutant of *A. nidulans* also proved to be sensitive to Calcofluor White, which causes cell wall disintegration, and it grew poorly on media containing different carbon sources. When using glycerol as the carbon source, the growth of the mutant strain did not lag behind that of the control. The original phenotype could be restored on all carbon sources using an osmotic stabilizer of 1 M NaCl (Fillinger et al., 2001). We also performed this experiment on different carbon sources on media complemented with 1 M NaCl, and 2 M sorbitol respectively, but did not find a difference between the growth of the control and the mutants. I.e. the observed phenotypes of the Δ *gfdB* strain could not be remediated using osmolytes.

In the mutant strain, we examined the changes of free radical and reactive oxygen species (RS) content in submerged cultures under stress-free conditions, and also in cultures treated with 0.4 mM *t*BOOH. Without treatment, RS content was already four times greater in the mutant compared to the control, but as a result of the treatment, the RS level increased significantly in both strains; it was eight times

greater in the gene deletion strain compared to the case without *t*BOOH. As the level of free radical and reactive oxygen species increased to such a significant degree in the mutant, we measured the specific activity of some antioxidant enzymes in the submerged culture. The increased specific GR activities were presumably aimed at neutralizing the high RS levels. In contrast, the specific GPx and catalase enzyme activities decreased both in the presence and absence of an oxidative stress agent in the mutant strain, which alone could result in the increase of RS concentrations, and on the other hand, it was probably due to this that even the increased specific GR activity was insufficient to restore the disruption of the redox balance in the Δ *gfdB* strain.

We also examined the changed in sterigmatocystin production, and found that the deletion of the *gfdB* gene increased mycotoxin production in submerged cultures both under stress-free conditions and due to oxidative stress treatment.

We also studied the viability and programmed cell death of submerged cultures of the *gfdB* gene deletion strain. The viability of the mutant strain decreased significantly compared to that of the control strain THS30.3 both in the presence and absence of 0.4 mM *t*BOOH. We obtained similar results when studying the apoptosis of cells, where the apoptotic rate of cells was greater already at the age of 52 hours in the absence of the *gfdB* gene.

In the course of our work, we examined the polyol content of the Δ *gfdB* strain under stress-free conditions in 44-hour old submerged cultures, and detected the sugar alcohols mannitol and

erythritol. The deletion of the *gfdB* gene impacted mannitol production; this was significantly larger in the mutant strain compared to that of the control, however, the gene deletion did not affect erythritol production.

The polyol content of *A. nidulans* strains was also examined following treatment with 0.4 mM *t*BOOH. Surprisingly, we found that there was no erythritol production in either the control or the mutant strains. This is presumably explained by the increased demand for reducing NADPH, which is a product of the pentose phosphate pathway taking place in the cytoplasm (Varecza et al., 2006), which pathway is also the source of the precursor of erythritol, erythrose 4-phosphate (Rzechonek et al., 2018). The explanation for this observation is that in the Δ *gfdB* strain, increased specific GR activity was measured, as in eukaryotes, the GR enzyme uses NADPH to reduce glutathione back in the case of oxidative stress (Emri et al., 1997; Pócsi et al., 2004). In addition, we also observed that as a result of the *t*BOOH treatment, mannitol production increased significantly in the Δ *gfdB* mutant, while it remained unchanged in the control strain. This may be caused by that in order to restore the disrupted redox balance, the gene deletion strain requires some kind of polyol more than the control. Mannitol plays an important role in the oxidative stress protection system of filamentous fungi. It has been proven in previous research that as a radical scavenger molecule, mannitol eliminates free radicals and reactive oxygen species (Smirnoff and Cumbes, 1989; Chaturvedi et al., 1997; Hema et al., 2014). This explains that in the *gfdB* gene deletion strain, mannitol content

increased under stress-free conditions as well, since the RS level was high as well.

We also included an osmophilic species, *A. glaucus* in our research, since this species lacks the *gfdB* gene. Thus we introduced the *gfdB* gene into the genome of *A. glaucus*, and performed surface culture experiments; we examined the phenotypes at 25 °C-on, following 5-day and 10-day incubation, using 2 M sorbitol as an osmotic stabilizer. As at 25 °C, a longer incubation time is required, after 5 days, a difference could only be observed in the colony diameters of cultures of the strain 'c *gfdB2* treated with Congo Red and MSB. Then it was found after 10-day incubation that the insertion of the *gfdB* gene resulted in a significantly higher tolerance of oxidative (*t*BOOH, MSB, H₂O₂), cell wall integrity (Congo Red), and heavy metal (CdCl₂) stress. The most impressive phenotype was shown by the transgenic strains in the presence of 0.4 mM *t*BOOH, since in this case, the phenotype of the control strain observed in a stress-free culture was completely restored by the *gfdB* gene.

The stress sensitivity of *A. glaucus* strains was also observed in the presence of 1 M NaCl osmolyte following 10-.day incubation. No significant difference was detected between the growth of the control and that of the mutants. This is presumably because the fungus *A. glaucus* grows more slowly in the presence of NaCl than in that of sorbitol under stress-free conditions as well. I.e. NaCl probably inhibits the fungus from adapting to different types of stress (Orosz et al., 2018).

We also examined the stress sensitivity of the *A. nidulans* $\Delta gfdB$ strain under the same conditions (25 °C, 10 days, minimal medium) with the same stress agents. The deletion of the *gfdB* gene increased the stress sensitivity of the fungus in the presence of oxidative, cell wall integrity, and heavy metal stress agents as well.

Our results revealed lots of new information concerning the genes coding glycerol-3-phosphate dehydrogenase in *Aspergillus* species. Based on our data, it can be stated that in *A. nidulans*, the role of the *gfdB* gene was expressed in tolerance against oxidative and cell wall integrity stress, maintaining the viability of cells, and delaying apoptosis. The deletion of this glycerol metabolic enzyme indirectly caused mannitol overproduction presumably because the accumulation of mannitol is more typical of older cultures, while younger cultures rather accumulate glycerol.

Introducing the *gfdB* gene into the fungus *A. glaucus* increased oxidative, cell wall integrity, and heavy metal stress tolerance, but it had no effect on osmophilicity as we previously thought. In the gene expression analyses performed by Balázs et al. (2010), neither of the *gfd* genes responded to oxidative stress, however, the up-regulation of the *gfdB* gene in response to osmotic stress was observed. The *A. nidulans* *gfdB* gene deletion mutants we prepared showed a phenotype opposite to that expected, presumably because in the case of osmotic stress, *gfdA* is the main element of protection, thus it is not induced further due to NaCl exposure. In the case of osmotic stress, the deletion of *gfdA* cannot be compensated even by the up-regulation of *gfdB*. However, the deletion of the *gfdB* gene can be counterbalanced

by *gfdA* in the case of osmotic stress. According to a previous study, a gene can play a prominent role in stress protection even if it does not respond in environments exposed to oxidative stress (Thorpe et al., 2004).

In order to reinforce our results, the examination of further glycerol-3-phosphate dehydrogenase paralogous pairs is required in different species in the future, as the regulation of stress protection is much more complex through these genes than one would expect. Based on this, we are planning to prepare the *gfdB* transgenic strains of the osmophilic filamentous fungus *A. wentii* as well, and perform the physiological examination of the mutants prepared (de Vries et al., 2017; Orosz et al., 2018).

10. Summary

In the filamentous fungus *A. nidulans*, two paralogous isoforms of the glycerol-3-phosphate dehydrogenase gene exist: the genes *gfdA* and *gfdB* (de Vries *et al.*, 2017). We wanted to reveal the physiological role of the *gfdB* gene, thus we constructed the $\Delta gfdB$ mutant in the filamentous fungus *A. nidulans*.

From our observations, the following were the most important ones:

- At 37 °C, after 5-day incubation, the $\Delta gfdB$ mutant showed significant sensitivity to oxidative stress in the presence of *t*BOOH, H₂O₂, as well as diamide, furthermore, it proved to be sensitive to Congo Red, a dye causing cell wall integrity stress.

- We conducted a similar experiment at 25 °C, and the phenotype change of the gene deletion strains was also observed in 10-day cultures, and significant differences were detected in the presence of oxidative stress agents (*t*BOOH, H₂O₂, MSB), a cell wall integrity stress agent (Congo Red), and a heavy metal stress agent (CdCl₂).

- As a result of the deletion of the gene, the concentration of reactive species increased under normal conditions, as well as in cultures treated with *t*BOOH, which causes oxidative stress.

- Therefore, we also analyzed the activity of some antioxidant enzymes. Specific GR activity was higher in the gene deletion strain, with and without treatment. In turn, specific GPx and catalase activities were reduced significantly in the mutant strain, presumably because specific GR activity on its own was insufficient restore the

redox balance. We also monitored the development of specific SOD activity, which was also decreased significantly due to the *t*BOOH treatment, thus eliminating reactive species.

- The absence of the *gfdB* gene also disturbed mycotoxin production. Significantly higher sterigmatocystin content was measured in the mutant strain than in the THS30.3 control. When the cultures were exposed to oxidative stress, sterigmatocystin production decreased in both strains, but it was still twice as high in the mutant compared to the control.

- In addition, the development of the polyol content of the Δ *gfdB* strain was also monitored. Under normal conditions, mannitol production was significantly higher compared to the control, whereas the development of erythritol contents was similar in both strains. As a result of *t*BOOH treatment of the fungal strains, there was no detectable amount of erythritol in either the control or the gene deletion strain. Furthermore, the mannitol concentration increased significantly in the Δ *gfdB* strain, but it remained unchanged in the THS30.3 strain.

- A reduction in the viability of the strains was observed in both the untreated cultures and those treated with *t*BOOH, whereas cell apoptosis increased. When adding *t*BOOH, a significant difference was observed between the apoptotic rate already at the age of 52 hours.

We have set as an additional objective of my PhD work to introduce the *gfdB* gene into the genome of the filamentous fungus *A. glaucus*, which shows significant osmophily in the presence of 2 M

sorbitol with the *gfdB* gene. Our most important results with the transgenic strains constructed are the following:

- The insertion of the *gfdB* gene resulted in significant stress tolerance in the presence of *t*BOOH, MSB and H₂O₂, which generate oxidative stress, moreover, tolerance to Congo Red, which causes cell wall integrity stress, was observed, and furthermore, heavy metal stress tolerance was also observed in the case of the mutant strains in the presence of CdCl₂ following 10-day incubation, on media supplemented with 2 M sorbitol.

- There was no significant difference in the stress sensitivity of the transgenic strains when using 1 M NaCl instead of sorbitol as an osmotic stabilizer.

Based on our results, it can be concluded that in the filamentous fungus *A. nidulans*, the *gfdB* gene plays a role in protection against oxidative and cell wall integrity stress, furthermore in maintaining the viability of cells and delaying apoptosis.

The *gfdB* gene maintained its function in oxidative stress tolerance even when transformed into another *Aspergillus* species, *A. glaucus*. Therefore, it can be stated that the well-known osmophilicity of *A. glaucus* cannot be explained with the evolutionary lack of the *gfdB* gene. In further research, it would be important to explore what physiological functions other glycerol-3-phosphate dehydrogenase paralogous gene pairs have in different *Aspergillus* species.

11. Theses

- 1) In the filamentous fungus *A. nidulans*, the *gfdB* gene plays a role in the oxidative and cell wall integrity stress defense system.
- 2) The deletion of the gene significantly increased sterigmatocystin production in the $\Delta gfdB$ strain, both under stress-free conditions and when treated with 0.4 mM *t*BOOH.
- 3) The free radical and reactive oxygen species content also increased significantly in the gene deletion strain both in the presence and absence of the oxidative stress agent *t*BOOH.
- 4) Due to the increased production of free radicals and reactive oxygen species, increased specific glutathione reductase activity was observed. In contrast, specific catalase, glutathione peroxidase and superoxide dismutase activities were reduced.
- 5) In this species, the *gfdB* gene takes part in maintaining the viability of cells and delaying apoptosis.
- 6) The deletion of the gene resulted in mannitol overproduction, which was aimed at neutralizing free radicals and reactive oxygen species.
- 7) In the filamentous fungus *A. glaucus*, introducing the *gfdB* gene increased the oxidative, cell wall integrity, and heavy metal stress tolerance, but had no impact on osmophily.

12. Acknowledgements

I would like to express my sincere thanks to my supervisor, Prof. Dr. István Pócsi, professor and head of department, for making the preparation of and providing professional support for my PhD work possible and at the Department of Molecular Biotechnology and Microbiology of the University of Debrecen.

I would like to take this opportunity to thank associate professor Dr. Éva Leiter for the indispensable help she provided in the genetic work and her professional advice.

I would like to express my thanks to associate professor Dr. Tamás Emri for his help in implementing and evaluating the RT-qPCR experiments and his valuable professional advice.

I would like to thank Prof. Dr. István Molnár (The School of Plant Sciences, College of Agriculture and Life Sciences, The University of Arizona, Tucson, USA) for the *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 strain and the pAg-H3 plasmid, and Prof. Dr. Ronald de Vries (Westerdijk Fungal Diversity Institute, Utrecht, The Netherlands) for the *Aspergillus glaucus* CBS 516.65 strain that they have made available to us.

I would like to thank Prof. Dr. Katalin Kövér and her colleagues (Department of Inorganic and Analytical Chemistry, Faculty of Science and Technology, University of Debrecen) for their help with the NMR measurements.

I would like to thank associate professor Dr. Gyöngyi Gyémánt and her colleagues (Department of Inorganic and Analytical

Chemistry, Faculty of Science and Technology, University of Debrecen) for their help with the HPLC measurements.

I am very thankful to devoted help of laboratory assistant Mrs. Gábor Tóth for her devoted help in the stress examinations.

I would like to take this opportunity to thank senior lecturer Dr. Ágnes Jakab for her useful professional advice, as well as assistant research fellow Zsuzsa Szabó for her help with the physiological experiments.

I would like to express my thanks to thesis students Ivett Gabriella Szabó, Anna Molnár, Katalin Fruzsina Magi, Erik Katona, Fruzsina Szabó, Eszter Gyarmati, Enikő Szatmári for their persistent and enthusiastic work.

Furthermore, I would like to thank all colleagues of the Department of Molecular Biotechnology and Microbiology for their professional help and support.

I would like to thank my husband, my parents, my sister and my friends for their infinite patience and support with which they supported my work.

The dissertation is supported by the EFOP-3.6.1-16-2016-00022 project. The project is co-financed by the European Union and the European Social Fund.

The research on which the dissertation is based was supported by the Higher Education Institutional Excellence Program of the Ministry of Innovation and Technology under number NKFIH-1150-6/2019, within the framework of the Biotechnology thematic program of the University of Debrecen.

The dissertation was supported by the European Union under the project GINOP-2.3.3-15-2016-00004 and co-financed by the European Social Fund European Regional Development Fund.

13. Hivatkozások/References

- Ansell, R., Granath, K., Hohmann, S., Thevelein, J.M., és Adler, L. (1997) The two isoenzymes for yeast NAD⁺-dependent glycerol 3-phosphate dehydrogenase encoded by *GPD1* and *GPD2* have distinct roles in osmoadaptation and redox regulation. *EMBO J* **16**: 2179–2187.
- Bakker, B.M., Overkamp, K.M., van Maris AJ, null, Kötter, P., Luttk, M.A., van Dijken JP, null, és Pronk, J.T. (2001) Stoichiometry and compartmentation of NADH metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev* **25**: 15–37.
- Balázs, A., Pócsi, Imre, Hamari, Z., Leiter, E., Emri, T., Miskei, M., et al. (2010) AtfA bZIP-type transcription factor regulates oxidative and osmotic stress responses in *Aspergillus nidulans*. *Mol Genet Genomics* **283**: 289–303.
- Barratt, R.W., Johnson, G.B., és Ogata, W.N. (1965) Wild-type and mutant stocks of *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **52**: 233–246.
- Chaturvedi, V., Bartiss, A., és Wong, B. (1997) Expression of bacterial *mtlD* in *Saccharomyces cerevisiae* results in mannitol synthesis and protects a glycerol-defective mutant from high-salt and oxidative stress. *J Bacteriol* **179**: 157–162.
- Chiu, D.T., Stults, F.H., és Tappel, A.L. (1976) Purification and properties of rat lung soluble glutathione peroxidase. *Biochim Biophys Acta* **445**: 558–566.
- Emri, T., Pócsi, I., és Szentirmai, A. (1997) Glutathione metabolism and protection against oxidative stress caused by peroxides in *Penicillium chrysogenum*. *Free Radic Biol Med* **23**: 809–814.

- Fillinger, S., Ruijter, G., Tamás, M.J., Visser, J., Thevelein, J.M., és d'Enfert, C. (2001) Molecular and physiological characterization of the NAD-dependent glycerol 3-phosphate dehydrogenase in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* **39**: 145–157.
- Gun Lee, D., Shin, S.Y., Maeng, C.Y., Jin, Z.Z., Kim, K.L., és Hahm, K.S. (1999) Isolation and characterization of a novel antifungal peptide from *Aspergillus niger*. *Biochem Biophys Res Commun* **263**: 646–651.
- Halliwell, B. és Gutteridge, J.M.C. (2007) Free radicals in biology and medicine, 4th ed. Oxford ; New York: Oxford University Press.
- Hema, R., Vemanna, R.S., Sreeramulu, S., Reddy, C.P., Senthil-Kumar, M., és Udayakumar, M. (2014) Stable expression of *mtlD* gene imparts multiple stress tolerance in finger millet. *PLoS ONE* **9**: e99110.
- Herrera, M.L., Vallor, A.C., Gelfond, J.A., Patterson, T.F., és Wickes, B.L. (2009) Strain-dependent variation in 18S ribosomal DNA Copy numbers in *Aspergillus fumigatus*. *J Clin Microbiol* **47**: 1325–1332.
- Huber, C.G. és Bonn, G.K. (1995) HPLC of Carbohydrates with Cation- and Anion-Exchange Silica and Resin-Based Stationary Phases. In *Journal of Chromatography Library*. Elsevier, o. 147–180.
- Klein, M., Swinnen, S., Thevelein, J.M., és Nevoigt, E. (2017) Glycerol metabolism and transport in yeast and fungi:

- established knowledge and ambiguities: Glycerol catabolism in yeast. *Environ Microbiol* **19**: 878–893.
- Klich, M., Mendoza, C., Mullaney, E., Keller, N., és Bennett, J.W. (2001) A new sterigmatocystin-producing *Emericella* variant from agricultural desert soils. *Syst Appl Microbiol* **24**: 131–138.
- Kozák, L., Szilágyi, Z., Vágó, B., Kakuk, A., Tóth, L., Molnár, I., és Pócsi, I. (2018) Inactivation of the indole-diterpene biosynthetic gene cluster of *Claviceps paspali* by *Agrobacterium*-mediated gene replacement. *Appl Microbiol Biotechnol* **102**: 3255–3266.
- Leiter, É., Park, H.-S., Kwon, N.-J., Han, K.-H., Emri, T., Oláh, V., és mtsai. (2016) Characterization of the *aodA*, *dnmA*, *mnSOD* and *pimA* genes in *Aspergillus nidulans*. *Sci Rep* **6**: 20523.
- Mattam, A.J., Clomburg, J.M., Gonzalez, R., és Yazdani, S.S. (2013) Fermentation of glycerol and production of valuable chemical and biofuel molecules. *Biotechnol Lett* **35**: 831–842.
- Miskei, M., Karányi, Z., és Pócsi, I. (2009) Annotation of stress-response proteins in the aspergilli. *Fungal Genet Biol* **46 Suppl 1**: S105-120.
- Oberley, L.W. és Spitz, D.R. (1984) Assay of superoxide dismutase activity in tumor tissue. *Meth Enzymol* **105**: 457–464.
- Orosz, E., van de Wiele, N., Emri, T., Zhou, M., Robert, V., de Vries, R.P., és Pócsi, I. (2018) Fungal Stress Database (FSD)--a repository of fungal stress physiological data. *Database (Oxford)* **2018**: bay009

- Pahlman, A.K., Granath, K., Ansell, R., Hohmann, S., és Adler, L. (2001) The yeast glycerol 3-phosphatases *Gpp1p* and *Gpp2p* are required for glycerol biosynthesis and differentially involved in the cellular responses to osmotic, anaerobic, and oxidative stress. *J Biol Chem* **276**: 3555–3563.
- Pinto, M.C., Mata, A.M., és Lopez-Barea, J. (1984) Reversible inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* glutathione reductase under reducing conditions. *Arch Biochem Biophys* **228**: 1–12.
- Pócsi, I., Prade, R.A., és Penninckx, M.J. (2004) Glutathione, altruistic metabolite in fungi. *Adv Microb Physiol* **49**: 1–76.
- Roggenkamp, R., Sahn, H., és Wagner, F. (1974) Microbial assimilation of methanol induction and function of catalase in *Candida boidinii*. *FEBS Lett* **41**: 283–286.
- Rzechonek, D.A., Dobrowolski, A., Rymowicz, W., és Mirończuk, A.M. (2018) Recent advances in biological production of erythritol. *Crit Rev Biotechnol* **38**: 620–633.
- Smirnoff, N. és Cumbes, Q.J. (1989) Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry* **28**: 1057–1060.
- Thorpe, G.W., Fong, C.S., Alic, N., Higgins, V.J., és Dawes, I.W. (2004) Cells have distinct mechanisms to maintain protection against different reactive oxygen species: oxidative-stress-response genes. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 6564–6569.
- Varecza, Z., Emri, T., Pusztahelyi, T., és Pócsi, I. (2006) A novel aspect of NADPH production in ageing *Penicillium chrysogenum*. *Acta Biol Hung* **57**: 115–121.

- de Vries, R.P., Riley, R., Wiebenga, A., Aguilar-Osorio, G., Amillis, S., Uchima, C.A., et al. (2017) Comparative genomics reveals high biological diversity and specific adaptations in the industrially and medically important fungal genus *Aspergillus*. *Genome Biol* **18**: 28.
- Witteveen, C.F., van de Vondervoort, P., Dijkema, C., Swart, K., és Visser, J. (1990) Characterization of a glycerol kinase mutant of *Aspergillus niger*. *J Gen Microbiol* **136**: 1299–1305.
- Yin, W.-B., Reinke, A.W., Szilágyi, M., Emri, T., Chiang, Y.-M., Keating, A.E., és mtsai. (2013) bZIP transcription factors affecting secondary metabolism, sexual development and stress responses in *Aspergillus nidulans*. *Microbiology (Reading, Engl)* **159**: 77–88.
- Yu, J.-H., Hamari, Z., Han, K.-H., Seo, J.-A., Reyes-Domínguez, Y., és Scazzocchio, C. (2004) Double-joint PCR: a PCR-based molecular tool for gene manipulations in filamentous fungi. *Fungal Genet Biol* **41**: 973–981.



Nyilvántartási szám: DEENK/258/2020.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Király Anita
Doktori Iskola: Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10057611

A PhD értekezés alapján szolgáló közlemények

Idegen nyelvű tudományos közlemények külföldi folyóiratban (2)

1. **Király, A.**, Hámosi, C., Gyémánt, G., Kövér, K. E., Pócsi, I., Leiter, É.: Characterization of gfdB, putatively encoding a glycerol 3-phosphate dehydrogenase in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Biology*. 124 (5), 352-360, 2020. ISSN: 1878-6146.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.funbio.2019.09.011>
IF: 2.789 (2019)
2. **Király, A.**, Szabó, I. G., Emri, T., Leiter, É., Pócsi, I.: Supplementation of *Aspergillus glaucus* with gfdB gene encoding a glycerol 3-phosphate dehydrogenase in *Aspergillus nidulans*. *J. Basic Microbiol.* 124 (5), 352-360, 2020. ISSN: 0233-111X.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/jobm.202000067>
IF: 1.909 (2019)

Magyar nyelvű absztrakt kiadványok (1)

3. **Király, A.**, Hámosi, C., Gyémánt, G., Kövér, K. E., Pócsi, I., Leiter, É.: A glicerín-3-foszfát dehidrogenáz (gfdB) gén szerepe az *Aspergillus nidulans* és *Aspergillus glaucus* oxidatív stresszválaszában.
In: Biotechnológia a Debreceni Egyetemen Tudományos szimpózium: Program és összefoglalók, Debreceni Egyetem Természettudományi Kar, Debrecen, 20, 2019.

Idegen nyelvű absztrakt kiadványok (3)

4. **Király, A.**, Molnár, A., Kocsis, B., Pócsi, I., Leiter, É.: Functional study on gfdB, putatively encoding a glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in *Aspergillus nidulans*.
In: 30th Fungal Genetics Conference : Abstract Book. Ed.: Brenda J. Andrews, Mark Johnston, Genetics Society of America, Asilomar, 64-65, 2020.
5. **Király, A.**, Molnár, A., Bodnár, V., Hámosi, C., Gyémánt, G., Kövér, K. E., Leiter, É., Pócsi, I.: Glycerol-3-phosphate dehydrogenase GfdB in the oxidative stress defense of *Aspergillus nidulans*.
In: Annals of the International Symposium on Fungal Stress : ISFUS : Book of Abstracts, Even3, Sao Paulo, 69-70, 2019. ISBN: 9788557222106





6. **Király, A.,** Molnár, A., Leiter, É., Pócsi, I.: Characterization of a glycerol 3-phosphate dehydrogenase gene deletion strain of the filamentous model fungus *Aspergillus nidulans*. In: *Fiatal Biotechnológusok Országos Konferenciája*. Szerk.: Tamás László, Zelenyánszki Helga, JATEPress, Szeged, 97, 2018. ISBN: 9789633153703

További közlemények

Idégen nyelvű tudományos közlemények hazai folyóiratban (1)

7. Bakti, F., **Király, A.**, Orosz, E., Miskei, M., Emri, T., Leiter, É., Pócsi, I.: Study on the glutathione metabolism of the filamentous fungus.

Acta Microbiol. Immunol. Hung. 64 (3), 255-272, 2017. ISSN: 1217-8950.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/030.64.2017.003>

IF: 1.107

Idégen nyelvű absztrakt kiadványok (1)

8. Bakti, F., **Király, A.**, Molnár, A., Leiter, É., Emri, T., Pócsi, I.: Study on the glutathione metabolism in the filamentous fungus *aspergillus nidulans*.

Acta Microbiol. Immunol. Hung. 62 (Suppl.), 131-132, 2015. ISSN: 1217-8950.

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 5,805

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 4,698

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

Debrecen, 2020.09.03.





Registry number: DEENK/258/2020.PL
Subject: PhD Publication List

Candidate: Anita Király

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

MTMT ID: 10057611

List of publications related to the dissertation

Foreign language scientific articles in international journals (2)

1. **Király, A.**, Hámosi, C., Gyémánt, G., Kövér, K. E., Pócsi, I., Leiter, É.: Characterization of *gfdB*, putatively encoding a glycerol 3-phosphate dehydrogenase in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Biology*. 124 (5), 352-360, 2020. ISSN: 1878-6146.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.funbio.2019.09.011>
IF: 2.789 (2019)
2. **Király, A.**, Szabó, I. G., Emri, T., Leiter, É., Pócsi, I.: Supplementation of *Aspergillus glaucus* with *gfdB* gene encoding a glycerol 3-phosphate dehydrogenase in *Aspergillus nidulans*. *J. Basic Microbiol.* 124 (5), 352-360, 2020. ISSN: 0233-111X.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/jobm.202000067>
IF: 1.909 (2019)

Hungarian abstracts (1)

3. **Király, A.**, Hámosi, C., Gyémánt, G., Kövér, K. E., Pócsi, I., Leiter, É.: A glicerín-3-foszfát dehidrogenáz (*gfdB*) gén szerepe az *Aspergillus nidulans* és *Aspergillus glaucus* oxidatív stresszválaszában.
In: Biotechnológia a Debreceni Egyetemen Tudományos szimpózium: Program és összefoglalók, Debreceni Egyetem Természettudományi Kar, Debrecen, 20, 2019.

Foreign language abstracts (3)

4. **Király, A.**, Molnár, A., Kocsis, B., Pócsi, I., Leiter, É.: Functional study on *gfdB*, putatively encoding a glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in *Aspergillus nidulans*.
In: 30th Fungal Genetics Conference : Abstract Book. Ed.: Brenda J. Andrews, Mark Johnston, Genetics Society of America, Asilomar, 64-65, 2020.
5. **Király, A.**, Molnár, A., Bodnár, V., Hámosi, C., Gyémánt, G., Kövér, K. E., Leiter, É., Pócsi, I.: Glycerol-3-phosphate dehydrogenase *GfdB* in the oxidative stress defense of *Aspergillus nidulans*.
In: Annals of the International Symposium on Fungal Stress : ISFUS : Book of Abstracts, Even3, Sao Paulo, 69-70, 2019. ISBN: 9788557222106





6. Király, A., Molnár, A., Leiter, É., Pócsi, I.: Characterization of a glycerol 3-phosphate dehydrogenase gene deletion strain of the filamentous model fungus *Aspergillus nidulans*. In: *Fiatl Biotechnológusok Országos Konferenciája*. Szerk.: Tamás László, Zelenyánszki Helga, JATEPress, Szeged, 97, 2018. ISBN: 9789633153703

List of other publications

Foreign language scientific articles in Hungarian journals (1)

7. Bakti, F., Király, A., Orosz, E., Miskel, M., Emri, T., Leiter, É., Pócsi, I.: Study on the glutathione metabolism of the filamentous fungus.
Acta Microbiol. Immunol. Hung. 64 (3), 255-272, 2017. ISSN: 1217-8950.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/030.64.2017.003>
IF: 1.107

Foreign language abstracts (1)

8. Bakti, F., Király, A., Molnár, A., Leiter, É., Emri, T., Pócsi, I.: Study on the glutathione metabolism in the filamentous fungus *aspergillus nidulans*.
Acta Microbiol. Immunol. Hung. 62 (Suppl.), 131-132, 2015. ISSN: 1217-8950.

Total IF of journals (all publications): 5,805

Total IF of journals (publications related to the dissertation): 4,698

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

03 September, 2020

