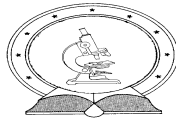


DE TTK



1949

A laktóz és D-galaktóz anyagcsere
molekuláris mechanizmusainak vizsgálata
Aspergillus nidulans gombában

Doktori (PhD) értekezés

Készítette:

Kovácsné Orosz Anita

okleveles biomérnök

Témavezető:

Dr. Fekete Erzsébet

egyetemi docens

Debreceni Egyetem

Természettudományi Doktori Tanács

Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola

Debrecen, 2016

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.

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

Debrecen, 2016..

a jelölt aláírása

*Tanúsítom, hogy **Kovácsné Orosz Anita** doktorjelölt 2012- 2015. között a fent megnevezett Doktori Iskola biológia programjának keretében irányításommal 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, 2016.

a témavezető aláírása

**A laktóz és D-galaktóz anyagcsere molekuláris
mechanizmusainak vizsgálata *Aspergillus nidulans*
gombában**

Értekezés a doktori (Ph.D.) fokozat megszerzése érdekében a
mikrobiológia tudományágban

Írta: **Kovácsné Orosz Anita** okleveles **Biomérnök**

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

Témavezető:
Dr. Fekete Erzsébet

A doktori szigorlati bizottság:

elnök:	Prof. Dr. Sipiczki Mátyás	
tagok:	Dr. Kredics László	
	Prof. Dr. Kovács Béla	

A doktori szigorlat időpontja: 2015. december 18.

Az értekezés bírálói:

Dr. Hamari Zsuzsanna	
Prof. Dr. Sipiczki Mátyás	

A bírálóbizottság:

elnök:	Dr.	
tagok:	Dr.	
	Dr.	
	Dr.	
	Dr.	

Az értekezés védésének időpontja: 2016.

TARTALOMJEGYZÉK

I.	BEVEZETÉS.....	5
II.	IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	9
	1. A fonalas gombák különböző stratégiája a laktózhasznosítás kezdeményezésére.....	9
	2. A fonalas gombák D-galaktóz katabolizmusa.....	17
III.	CÉLKITŰZÉS.....	22
IV.	ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	24
	1. <i>Aspergillus nidulans</i> törzsek, táptalajok és tenyésztési feltételek.....	24
	2. Laktóz felvételi kísérletek.....	31
	3. Genetikai technikák és transzformálás.....	32
	4. A genomi DNS és totál RNS-izolálás.....	32
	5. Northern és Southern blot analízis.....	33
	6. Hiánymutáns törzsek létrehozása.....	35
	7. A <i>lacpB</i> gén visszatranszformálása a <i>lacpB</i> hiányos háttérrel rendelkező mutánsba.....	38
	8. Analitikai módszerek.....	41
	9. Reprodukálhatóság.....	41
	10. Felhasznált vegyszerek.....	42
	11. Bioinformatikai módszerek.....	42
V.	EREDMÉNYEK.....	44
	1. A Leloir útvonal nélkülözhető a D-galaktóz általi <i>bgaD/lacpA</i> indukcióhoz.....	44
	2. A oxido-reduktív útvonal szintén nélkülözhető a D-galaktóz általi <i>bgaD</i> és <i>lacpA</i> transzkriptum képződéséhez.....	45
	3. A feltételezett laktóz permeáz gének azonosítása <i>in silico</i> vizsgálattal és azok génkifejeződésének vizsgálata.....	50
	4. A <i>lacpB</i> gén laktóz permeázt kódoló funkciójának megerősítése és elemzése.....	53
	5. Két permeáz által irányított laktóz felvétel <i>Aspergillus nidulans</i> fonalas gombában.....	62
	6. A <i>lacpA</i> és <i>lacpB</i> gén eltérő expressziós profillal rendelkezik.....	65
	7. A <i>lacpB</i> egy közös eleme lehet a laktóz- és a cellulóz katabolizmusnak <i>A. nidulans</i> gombában.....	69
VI.	EREDMÉNYEK ÖSSZEGZÉSE.....	71
VII.	ÖSSZEFOGLALÁS.....	79
VIII.	SUMMARY.....	81
IX.	IRODALMI HIVATKOZÁSOK.....	84
X.	TUDOMÁNYOS TEVÉKENYSÉG.....	101
XI.	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	104
XII.	FÜGGELÉK.....	106

I. BEVEZETÉS

A Biomérnöki Tanszék illetve jogelődje már 25 éve vizsgálja a biotechnológiai jelentőségű fonalas gombák laktóz és D-galaktóz anyagcseréjét. A laktóz, mint megújuló szénforrás tanulmányozása több szempontból is indokolt.

A tejipar nagy mennyiségű folyékony hulladékot halmoz fel (Gänzle és mtsai., 2008). A sajtgyártás során a tej komponenseinek csupán 85%-a kerül felhasználásra, míg a tejsavónak nevezett laktózt tartalmazó melléktermék nem hasznosítható (Marwaha és Kennedy, 1988). Ezért világszerte több mint 1,5 millió tonna halmozódik fel évente (Roelfsema, 2010). A laktóz biotechnológiai felhasználásának nehézségei annak is köszönhető, hogy a tejsavó laktóz koncentrációja alacsony, így a feldolgozási folyamat első lépését annak koncentrálása képezi. Az élelmiszeripar számára a laktóz felhasználása limitált, mivel a laktóz érzékenységben vagy galaktozémiában szenvedők számára arányosan csökken annak felhasználhatósága (Novelli és Reichardt 2000; Campbell és mtsai., 2005). Kezelés vagy felhasználás hiányában a tejsavó környezetvédelmi problémákat okoz, specifikus szennyvízkezelő rendszerek kiépítése pedig költséges. Ezért mindenképpen indokolt olyan folyamatok részévé tenni, melyek során hozzáadott értékű termékek létrehozását szolgálja (Panesar és Kennedy, 2012). A tejsavó hasznosítható a szükséges fermentációs folyamatok optimalizálásához, továbbá alkalmazható a második generációs bioüzemanyag-termelésben történő felhasználáshoz, valamint annak eltávolításához a szennyezett talajból és vízből (bioremediáció).

Példaértékű megoldást jelent az ipari fermentációs biotechnológia, amely a tejsavót a hagyományos értelemben vett olcsó és bőségesen rendelkezésre álló növekedési szubsztrátként és nitrogén forrásként alkalmazza a mikroorganizmusok, gombák számára (Coghill és Moyer, 1947; Silva és mtsai., 2009; Panesar és mtsai., 2006; Kumari és mtsai., 2011; Aghcheh és Kubicek, 2015). Éppen ezért elengedhetetlen fontosságú a laktóz lebontás tanulmányozása számos fonalas gomba, többek között a genetikai modellnek számító *Aspergillus nidulans* talajlakó szaprofita faj esetében.

Az egyetlen természetes laktózforrás az emlősök teje. A heterodiszacharid (1,4-O- β -D-galaktopiranozil-D-glükóz) laktóz a tej legfontosabb szénhidrátkomponense, amely az emlőmirigyek Golgi organellumában szintetizálódik. A laktóz az UDP-galaktózból és D-glükózból keletkezik laktátszintetáz hatására, amely α -laktalbumin és galaktoziltranszferáz egységekből épül fel.

Nem minden mikroorganizmus képes a laktóz hasznosítására. Ez azért is érdekes, mert a laktózhasznosítás *lac* operon által történő szabályozása az *Escherichia coli* baktériumban a prokarióta génszabályozás paradigmájává vált, mégis a természetben számos baktérium nem hordozza ezt a tulajdonságot. A fermentációs ipari jelentőségű gombafajok közül a pékélesztő (*Saccharomyces cerevisiae*) és az *Aspergillus niger* képtelen a laktózt katabolizálni (Seiboth és mtsai., 2007; Fekete és mtsai., 2012).

A legtöbb mikroorganizmus ugyan képes hidrolizálni a laktózt D-glükóz és D-galaktóz monomerekre, de a tejcukor mindenképpen lassan hasznosuló szénforrás lesz. Ennek oka az, hogy a mikroorganizmusok természetes élőhelyein nem fordul elő, továbbá megjelenése a természetben evolúciósan későre tehető. A lassú laktóz hasznosítás azonban elősegíti a karbon katabolit represszió alatt álló szekunder anyagcseretermékek (metabolitok) és polimer-lebontó enzimek keletkezését, ezért a tejsavót régóta használja a fungális fermentációs biotechnológiai ipar olyan folyamatokhoz, mint a *Trichoderma reesei* fonalas gomba celluláz, vagy a *Penicillium chrysogenum* által történő penicillin termelése; azonban ez csupán a világon évente keletkező mennyiség 15%-át jelenti (Roelfsema és mtsai., 1990). A *T. reesei* esetében olyan génmanipulált törzset hoztak létre, amelynek a celluláz enzimet kódoló génjét egy laktózzal indukálható promóterre cserélték, ezáltal a laktózt rekombináns fehérjék ipari előállítására is használják. A fentiek alapján belátható, hogy több szempontból is hasznos lehet a laktóz asszimiláció mechanizmusainak megértése a gombafermentációkban. A kihívást jelentő probléma megoldásához elengedhetetlen, hogy mélyrehatóan tanulmányozzuk a gombák laktóz katabolizmusának fiziológiáját.

Az a tény, hogy a mikroorganizmusok egy része képes növekedni laktózon laboratóriumi körülmények között sokkal inkább véletlen, mintsem evolúciósan „tervezett” biokémiai folyamat, emiatt gyakori a nemzetség, sőt fajspecifikus biokémiai megoldások aránya.

A laktózt fermentáló *Kluyveromyces lactis* élesztő LAC rendszerének működése az alacsonyabb rendű eukarióták transzkripció szintű szabályozásának egyik paradigmája (Cardinali és mtsai., 1997; Baruffini és mtsai., 2006; Rigamonti és mtsai., 2011). Az Ascomycota fonalas gombákban azonban a laktóz anyagcsere számos kulcsfontosságú metabolikus lépése kevésbé ismert (Seiboth és mtsai., 2007; Karaffa és mtsai., 2013).

Munkacsoportunk az Ascomycota törzs, *Pezizomycotina* altörzs, *Eurotiomycetes* osztály; *Eurotiomycetidae* alosztály; *Eurotiales* rendjének; *Aspergillaceae* családjába tartozó *Aspergillus nidulans* (*Emericella nidulans*) fonalas gomba laktóz katabolizmusának tanulmányozását tűzte ki célul.

Az *A. nidulans* ideális modellorganizmus. Szexuális és paraszexuális életciklusa laboratóriumi körülmények között is jól indukálható, teljes genom szekvenciája ismert, számos adatbázis, génkönyvtár, vektor, illetve mutáns segíti a vele történő munkát, sőt *A. nidulans*-ra kidolgozott DNS chip-ek is elérhetőek.

II. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

1. A fonalas gombák különböző stratégiája a laktózhasznosítás kezdeményezésére

A laktóz hidrolízise a különböző élelmiszer és fermentációs ipari technológiák számára kihívást jelentő folyamat. Mikrobák (jellemzően gombák) révén történik, a β -D-galaktozidáz (bGal) enzim közreműködésével. A fonalas gombák esetében a laktóz katabolizmus három lehetséges módon valósulhat meg: (1) egy specifikus transzporter bejuttatja a laktózt, majd a sejten belül az intracelluláris β -galaktozidáz hidrolizálja; (2) a laktóz extracelluláris hidrolízise D-galaktoz és D-glükóz monomerekre az extracelluláris β -galaktozidáz aktivitása révén; (3) az említett kétféle lebontási út párhuzamosan is megvalósulhat (1. ábra).

A fungális β -D-galaktozidázok esetében megkülönböztetünk a glikozil hidroláz (GH) 35 családba tartozó enzimeket, amelyek savas pH optimummal rendelkező extracelluláris enzimeket tartalmaznak, valamint a glikozil hidroláz (GH) 2 családba tartozó intracelluláris enzimeket, amelyek pedig semleges pH optimummal rendelkeznek (Gamauf és mtsai., 2007; Ishikawa és mtsai., 2006; Fekete és mtsai., 2002; 2012). A *P. chrysogenum* fonalas gomba laktóz hasznosítási rendszerére ez a kettős asszimilációs mechanizmus jellemző, ugyanis egyaránt rendelkezik egy extracelluláris β -galaktozidázzal (bGal), egy laktóz permeázzal valamint egy intracelluláris bGal enzimmal (Jónás és mtsai., 2014).

A *Neurospora crassa* szintén képes egyidejűleg két, fizikailag is jól elkülöníthető izoenzimet termelni. A kisebb molekulatömegű enzim pH optimuma 4,2 (o-nitrofenil- β -D-galaktopiranozidra (ONPG) nézve), továbbá laktóz, D-galaktóz, D-xilóz és L-arabinóz szénforráson egyaránt indukálódik. A másik nagyobb molekulatömegű izoenzim pH optimuma 7,5 (ONPG-re nézve), de ellentétben a másik bGal enzimmal D-xilóz és L-arabinóz jelenlétében nagyon alacsony aktivitás detektálható. Mindkét esetben alacsony indukciós hatás figyelhető meg D-glükóz, szacharóz és fruktóz szénforrások jelenlétében. A legerősebb inducer a D-galaktóz. (Lester és Byers, 1965; Bates és mtsai., 1967). Tehát nem csupán a laktóz-asszimiláló élesztők képesek a pH-semleges intracelluláris bGal enzim szintézisére. A *A. nidulans*-ban csupán laktóz és D-galaktóz által indukált pH-semleges intracelluláris aktivitás detektálható (Fekete és mtsai., 2012).

A bGal enzimek tisztítását és biokémiai jellemzését már számos gombafaj kapcsán publikálták (Panesar és mtsai., 2006), de a kódoló gének transzkripció szabályozása még nem teljesen tisztázott.

A *A. nidulans*-ban extracelluláris, vagy sejtfalhoz kötött β -galaktozidáz aktivitást a növekedés egyetlen fázisában sem tapasztaltak, azonban a sejten belüli intracelluláris aktivitás folyamatosan detektálható (Fekete és mtsai., 2002). Ebből következik, hogy *A. nidulans* gombában a laktóz intracellulárisan hidrolizálódik.

A *K. lactis* élesztő laktóz asszimilációs rendszerének analógiájára (Goeddecke és mtsai., 1991; Diniz és mtsai., 2012), *in silico*, illetve kísérletes vizsgálatok segítségével egy két génből álló klasztert azonosítottak és jellemeztek, melyek koordináltan átíródó géneket kódolnak: egy intracelluláris β -galaktozidázt (*bgaD*) és egy laktóz permeázt (*lacpA*) (Fekete és mtsai., 2012). Korábbi irodalmi adatok valamint *in silico* elemzések alapján a natív enzim molekulatömegét 450 kDa-ra becsülték, mely homotetramer, kb. 120 kDa-os alegységekből épül fel.

D-galaktóz, laktóz és (kisebb mértékben) L-arabinóz szénforrásokon a két gén koordinált, összehangolt expresszióját figyelték meg, viszont D-glükózon nem tapasztaltak indukciót. D-galaktóz és laktóz általi indukcióra is csak akkor került sor, ha D-glükóz nem volt jelen a táptalajban, ezzel azt sugallva, hogy a két gén D-glükóz általi katabolit represszió alatt áll. Bizonyított, hogy D-glükózon a karbon katabolit represszió a *creA* gén expressziójához kötött. *CreA* hiánymutáns törzsek esetében a két gén derepressziójára került sor, ez is erősíti azt a feltevést miszerint a génklasztert alkotó két gén kifejeződése *CreA*-függő karbon katabolit represszió által szabályozott (Fekete és mtsai., 2002, 2012).

Ez a két gén alapszintű kifejeződést mutatott a karbon-derepresszáló ($\Delta creA$) háttérrel rendelkező mutánsban akkor is, ha D-glükóz volt az egyetlen növekedési szubsztrát (Fekete és mtsai., 2012). A deléciós mutánsok létrehozásával bizonyították, hogy a *bgaD* az egyetlen olyan enzim *A. nidulans* gombában, amely hat a kromogén szubsztrátra az X-Gal-ra (5-bróm-4-klór-3-indolil- β -D-galaktopiranozid) – amely egy gyakran használt, noha mesterséges β -galaktozidáz szubsztrátum –

miközben a *lacpA* génről kimutatták, hogy jelentős szerepe van a laktóz intracelluláris transzportjában (Fekete és mtsai., 2012). *A. nidulans* gombában laktóz és D-galaktóz által indukált pH-semleges intracelluláris aktivitást sikerült leírni. Kimutatták továbbá, hogy a LacpA – az első fiziológiailag releváns, fungális laktóz permeáz, amelyet a *Saccharomycetales*-en kívül leírtak – egy élettanilag is releváns laktóz transzporter. Az *A. nidulans*-ban leírt β -galaktozidáz/laktóz permeáz génklasztert még másik 15 *Pezizomycotina* esetében is azonosítottak (Fekete és mtsai., 2012).

Továbbá bizonyítékot nyert az is, hogy a katabolizmus során *A. nidulans*-ban a laktóz transzportja a sebességmeghatározó lépés, nem pedig annak hidrolízise. Azok a mutánsok, ahol a *lacpA* gén több kópiában van jelen, jelentősen gyorsabban képesek a diszacharid felvételére, ezáltal a gyorsabb növekedésre is, a vad-típushoz képest. Bár a LacpA felelős a laktóz felvételének egy jelentős részéért ebben a gombában, azonban a *lacpA* hiánymutáns törzsek még képesek a laktózon történő növekedésre (Fekete és mtsai., 2012) utalva arra, hogy legalább egy további permeáz még érintett a laktóz transzportjában. A doktori munkám során azonosítottunk és funkcionálisan elemeztünk egy *lacpA*-val nem klasztereződő második élettanilag releváns laktóz permeáz gént *A. nidulans*-ban, az általunk megnevezett *lacpB* gént. Az értekezletem másik fő témája annak bemutatása, hogy a katabolikus *bgaD-lacpA* génpár indukciója szigorúan D-galaktóz mediált folyamat, sokkal inkább, mint a monoszacharid katabolizmusának bármely intermediere.

Az *A.nidulans* laktóz anyagcseréjéről az első dolgozatok a múlt század hatvanas éveiben jelentek meg. A klasszikus (random mutagenézissel előállított) mutánsokat alapvetően két csoportba sorolták: felvételben sérült illetve laktóz hidrolízis-mutánsok. Olyan mutáns törzset, amely egyszerre hordozta volna a laktóz felvételének és hidrolízisének defektusát, soha nem sikerült izolálni. A *lacA* mutáció laktóz felvételben defektes törzset eredményezett, a *lacG* lókuszt manipulálásával pedig β -galaktozidáz mutánsokat hoztak létre. Mindkét esetben a VI. kromoszómán található a mutáció (Gajewski és mtsai., 1972). A mutáns törzsek keresztezése során a *lacA* és *lacG* gének rekombinációs gyakorisága 12-19%-os volt, ami – ha nem is alacsony érték – a két gén genetikai kapcsoltságára utalt.

A *lacC24* az egyetlen olyan részleges (leaky) β -galaktozidáz mutáció, mely nem a VI. kromoszómán lokalizálódik, ám később kiderült, szerepe teljesen független a laktóz katabolizmustól. Ami meglepőbb, hogy Fantes és Roberts (1973) a mutánsok egy olyan csoportját írta le, melyek esetében ONP-Gal szubsztrátot használva hidrolitikus aktivitás ugyan nem volt mérhető, de laktóz szénforráson normál növekedés volt tapasztalható. A mutációt három egymástól független lókusztérképezték föl (*bgaA-C*), melyek közül az egyik hőérzékenynek bizonyult (*bgaA*). Ez a tulajdonság járult hozzá ahhoz, hogy lokalizálni tudjanak egy β -galaktozidáz struktúrgént, mely a III. kromoszómán található.

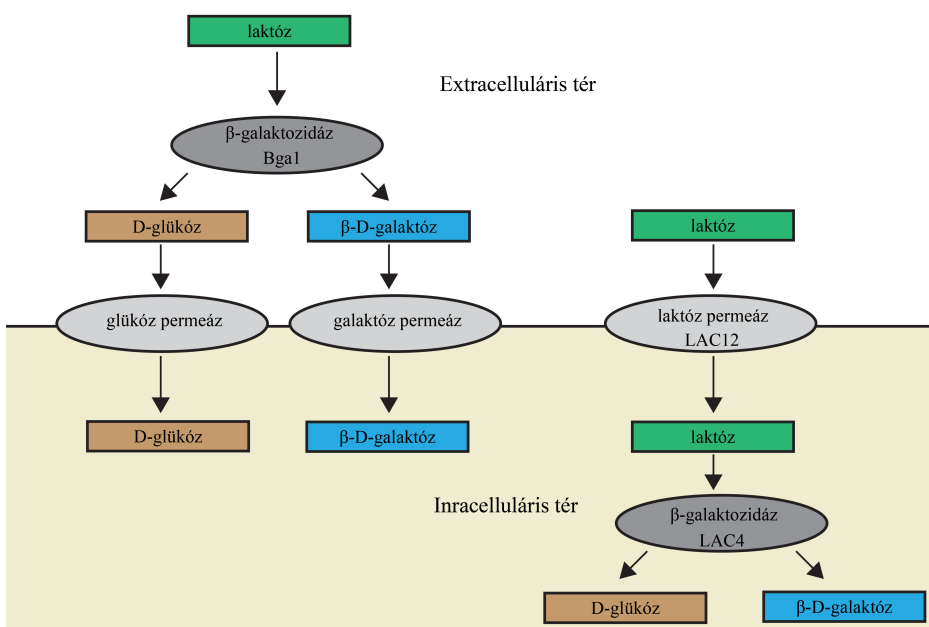
Mindezen túl egy membrán fehérjét is sikerült azonosítani, amely a nagy facilitátor szupercsalád (Major Facilitator Superfamily, MFS) fehérjék közé tartozik. *In silico* vizsgálatok révén nehéz meghatározni, hogy egy adott fehérje mely szubsztrátum transzportját látja el, mivel a transzmembrán fehérjék aminosav szekvenciái nagy hasonlóságot mutatnak. *A. nidulans* gombában kb. 400 MFS fehérjét kódoló gén található, melyek közül több mint 100 tartozik a cukor transzporterek családjába. Ez jelentős szám az élesztőkhöz képest, melyek genomjában ennél jóval kevesebb - pl. *Candida albicans* és *Kluyveromyces lactis* esetén 20, *Yarrowia lipolytica* esetén pedig 23 - cukor transzporter van jelen. *In silico* filogenetikai vizsgálatok révén *A. nidulans* gombában genetikai és biokémiai adatok alapján mégis sikerült azonosítani egy laktóz transzportért felelős gént. A laktóz permeáz azonosításához az NCBI genom adatbázisban végeztek TBLASTN analízist (Fekete és mtsai., 2012). Ennek eredményeként 11 db olyan szekvenciát kaptak, amelynek BLAST valószínűsége $6e^{-94}$ és $2e^{-46}$ közé esett. Ezt követően más gombafajokból származó feltételezett szekvenciákkal együtt Neighbour Joining (NJ) alapú filogenetikai törzsfát készítettek, majd több jól alátámasztott (bootstrap koeficiens > 75%) csoportra (clade) oszlott. Az egyik csoport a *K. lactis* és *K. marxianus* élesztők jól ismert laktóz permeáz szekvenciáit is tartalmazta, ezért azt feltételezték, ez a clade tartalmazza majd az *A. nidulans* ortológot is. Mivel azonban négy *A. nidulans* szekvencia is ebbe a clade-be esett, lehetetlen volt eldönteni, hogy melyik(ek) a ténylegesen laktózt transzportáló permeáz(ok) (Fekete és mtsai., 2012). Ezért más stratégiára volt szükség a laktóz permeáz azonosításához.

A *K. lactis* élesztő egyetlen laktóz permeázt kódol, amely a *lac12* lókuszon található. Ismert volt az is, hogy közvetlenül a *lac12* lókusztól mellett található egy másik *lac4p* lókuszt is, amely β -galaktozidáz gént kódol. A két gén közelsége miatt hamar bebizonyították, hogy azok klaszterbe rendeződve kétirányú közös promóterrel rendelkeznek. Feltételezték, hogy ez a kapcsoltság evolúciósan konzervatív, így a két gén klasztereződése fennmaradt. Ennek ismeretében az *A. nidulans*-ban talált laktóz permeáz jelöltek közül azt a gént keresték, amely közelében GH2 családba tartozó hidroláz található. Így sikerült azonosítani azt, hogy a VI. kromoszómán lévő AN3201 (*bgaD*) lókusztól kb. 5,6 kb távolságra az AN3199 lókuszon egy laktóz permeázt kódoló gén található, melyet *lacpA* rövidítéssel jelöltek el (Fekete és mtsai., 2012).

Ha ez a gén a VI. kromoszómán helyezkedik el, akkor a fenn leírt genetikai kapcsoltság miatt van rá esély, hogy fizikai környezetében egy cukor transzporter gén lokalizálódjék, ami esetleg a *lacA* lókussszal is kapcsolatban lehet, mely gén a laktóz felvételéért felelős lehet (Fekete és mtsai., 2012).

A *K. lactis* a laktóz felvételt a LAC12 gén által kódolt laktóz permeáz valósítja meg, majd ezt követően a LAC4 gén által kódolt β -galaktozidáz hidrolizálja a laktózt D-glükóz és D-galaktóz monomerekre. A LAC12 és a LAC4 gének egy klasztert alkotnak és egy közös promóterrel rendelkeznek (Godecke és mtsai., 1991). Az elérhető gomba genom adatbázisok *in silico* analíziséből arra lehet következtetni, hogy például az *A. nidulans* és a *N. crassa* mellett a *Fusarium graminearum* is a *K. lactis* laktóz asszimilációs stratégiáját követi (Seiboth és mtsai., 2007).

A fentiekkel ellentétben az Ascomycota *Hypocrea jecorina* (*T. reesei*) laktóz hidrolízise extracelluláris β -galaktozidáz révén valósul meg, ennek megfelelően nem rendelkezik laktóz permeáz kódoló génekkel, csupán a monomerek felvételére alkalmas glükóz és galaktóz permeázokkal. Ezt a megállapítást több tény is igazolja: (a) a *K. lactis* laktóz permeáz és intracelluláris β -galaktozidáz gének ortológja nem található meg a *H. jecorina* genom adatbázisában (b) nem detektálható intracelluláris β -galaktozidáz enzimaktivitás a laktózon történő növekedése során (Seiboth és mtsai., 2005) (1. ábra).



1. ábra: The *H. jecorina* (bal) és a *K. lactis* (jobb) laktózhasznosítás modellje (Seiboth és mtsai., 2005)

2. A fonalas gombák D-galaktóz katabolizmusa

A laktóz hidrolízis végtermékei a D-glükóz és D-galaktóz monoszacharidok. A D-glükóz a már jól ismert glikolitikus útvonalon degradálódik, a D-galaktóz azonban nem képes közvetlenül belépni az Embden-Meyerhof-Parnas útvonalba. A legtöbb eukariótában a Leloir útvonalon konvertálódik D-glükóz-1-foszfáttá α -D-galaktóz-1-foszfát köztesen keresztül, mielőtt belép a glikolízisbe (Frey 1996; Holden és mtsai., 2003; Sellick és mtsai., 2008).

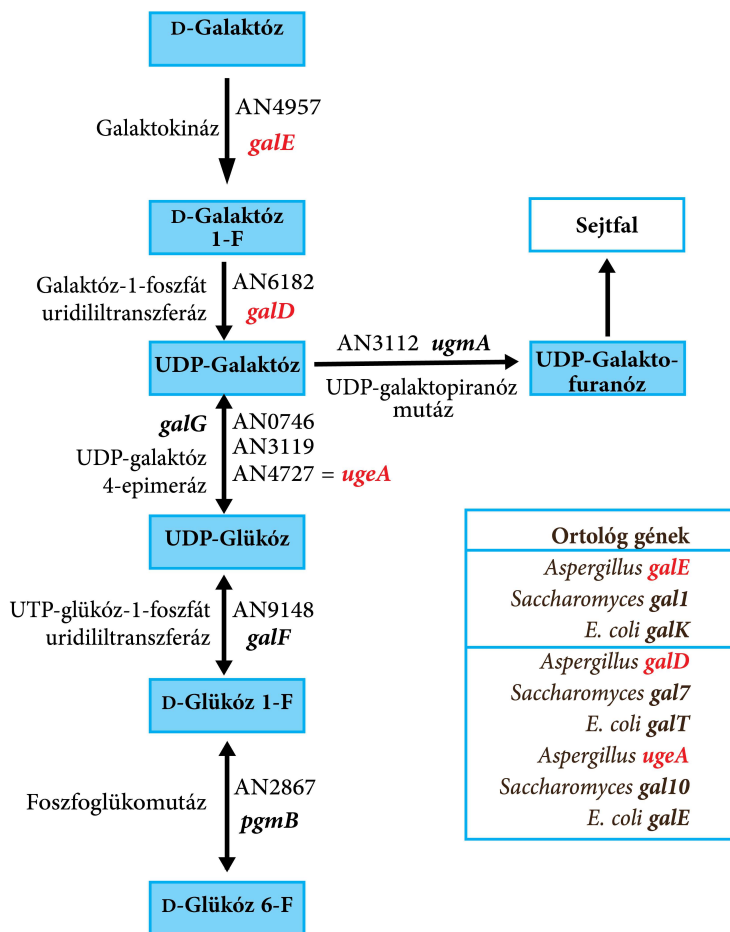
Az Ascomycota gombáknál a D-galaktóz katabolizmusa két útvonalon mehet végbe: (1) a kanonikus Leloir-úton, amely a piranozid hemiacetál (cirkuláris) ATP-igényes foszforilációs lépésével kezdődik, amelynek köszönhetően D-galaktóz-1-foszfát jön létre és végül glükóz-1-foszfátot eredményez (Roberts 1970; Alam & Kaminskyj, 2013) (2. ábra) (2), az oxido-reduktív úton, amely az L-arabinóz katabolizmusához nagymértékben hasonlít, és ahol a nyitott (lineáris) konfigurációjú D-galaktóz redukálódik először galaktitollá (3. ábra) (de Vries és mtsai., 1994; Fekete és mtsai., 2004; Seiboth és mtsai., 2007). Ez az útvonal végül fruktóz-6-foszfát, vagy tagatóz-1,6-biszfoszfát kialakulásához vezet *A. nidulans*-ban.

A fiziológiailag fontos galaktokináz enzim szigorúan specifikus a D-galaktóz α -anomerre, amelyet az aldóz-1-epimeráz (D-galaktóz mutarotáz) alakít át a β -D-galaktóz egységből. Élesztők esetében, mint például *S. cerevisiae* és a *K. lactis*, mindkét domén ugyanazon fehérjén található (Gal10), míg prokariótákban pl.: *E. coli*-ban az aldóz-1-epimerázt egy független gén kódolja.

A galaktokináz (*galE*) mutáns *A. nidulans* a korábbi szakirodalmak szerint nem képes D-galaktózon növekedni (Roberts és mtsai., 1970). Tanszékünk munkatársai viszont később ennek az ellenkezőjét tapasztalták, vagyis a *galE* mutánsok is növekedtek D-galaktózon (Fekete és mtsai., 2002). A tenyésztési körülményeket összehasonlítva azt tapasztalták, hogy a korábbi kísérleteknél nitrátot, később viszont ammónium ionokat használtak nitrogén forrásként. Az alkalmazott nitrogén forrás valóban erősen, de valójában csak közvetett módon befolyásolja a *galE* mutáns növekedésének képességét D-galaktózon. A vizsgálat során a *galE* mutáns galaktóz hasznosítása, az *araA1* mutáns L-arabitol hasznosítása és a vad típus L-szorbóz hasznosítása kapcsán észlelték, hogy nitrát ionok kizárólagos jelenlétében nincs szénforrás felvétel, ammónium ionok használatánál azonban igen, ami növekedést is eredményez. Mindegyik esetében feltételezhető egy poliol elem a katabolizmusban, aminek kialakulásához a cukor redukciója szükséges. Ezek a redukciók szigorúan NADPH-függő folyamatok. A nitrát és az ammónium ionok asszimilációjának élettani szempontból talán legfontosabb különbsége, hogy a nitrát és nitrit redukció NADPH-t igényel. Ammónium-nitrát tartalmú táptalajon a törzsek fenotípusa ugyanolyan volt, mint ammónium-foszfáton, vagyis a nitrát ionok jelenléte önmagában nem gátló hatású (Fekete és mtsai., 2004).

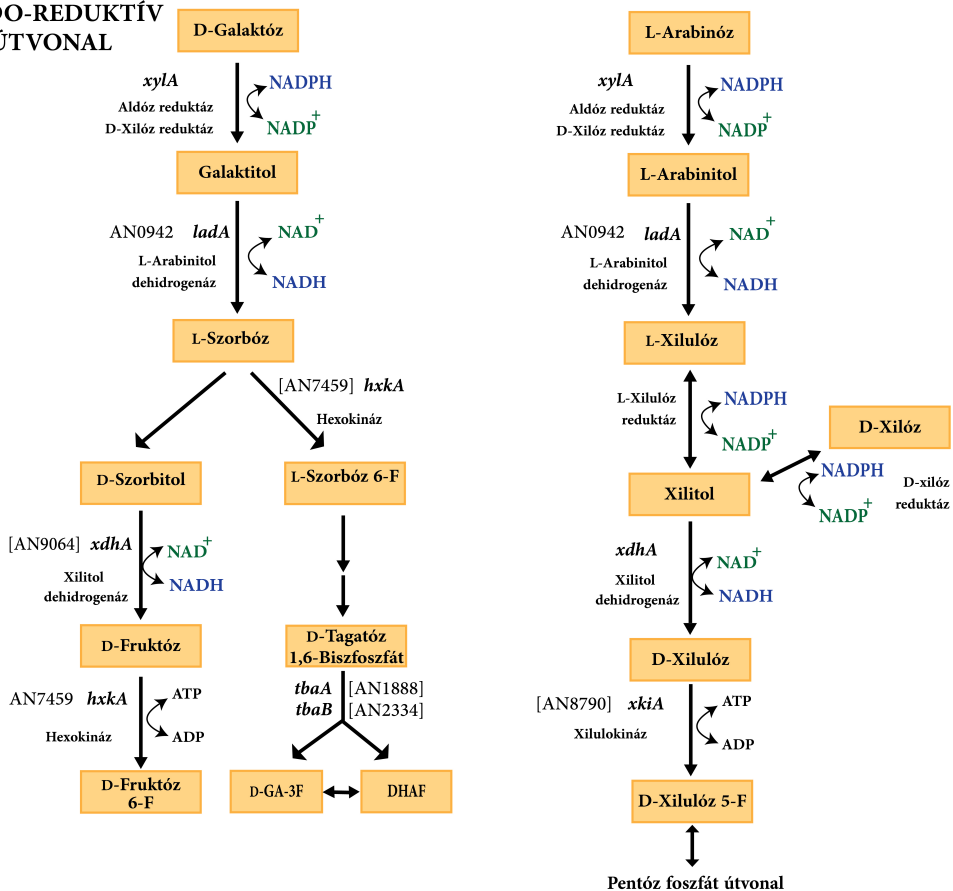
Későbbi vizsgálatok genetikai és biokémiai bizonyítékokat szereztek arra, hogy a Leloir útvonal mellett létezik egy alternatív útvonal is a D-galaktóz lebontására az *A. nidulans*-ban, amely a D-galaktóz lebontását galaktitollá és a galaktitol oxidációját L-szorbózzá foglalja magába (Fekete és mtsai., 2004).

A *H. jecorina* (*T. reesei*) az *A. nidulans*-hoz hasonlóan képes a D-galaktóz katabolizmusára mindkét említett útvonalon (Seiboth és mtsai., 2002a; 2002b; 2004). A *H. jecorina* (*T. reesei*) és az *A. nidulans* esetében is az L-arabitol dehidrogenáz (LadA) enzim felelős a galaktitol és az L-arabitol lebontásáért. Ezzel ellentétben az *A. niger* oxido-reduktív útvonal galaktitol intermedierének lebontásáért nem a *ladA* géntermék felelős, hanem a *ladB* gén által kódolt galaktitol dehidrogenáz enzim (Mojzita D és mtsai., 2012). Továbbá a D-galaktóz foszforilációs lépésekből álló katabolizmusára is képes az *A. niger* (Elshafei és Abdel-Fatah, 2001). Jelenleg az *A. nidulans*, a *H. jecorina* és az *A. niger* fonalas gombákon kívül nem bizonyították az alternatív oxido-reduktív útvonal létezését. A *P. chrysogenum* extra- és intracelluláris laktóz katabolizmusát követően a D-galaktóz hasznosítása a Leloir útvonalon megy végbe, az alternatív útvonalának végbemenetele még nem tisztázott (Jónás és mtsai., 2014). A *P. chrysogenum* csak egyetlen élettanilag releváns laktóz transzporterrel rendelkezik, neve LacA. Érdekesség, hogy a *lacA* gén ortológja a *Neurospora crassa* gombában mint cellobióz transzporter került leírásra. A másik, feltételezett laktóz permeázként azonosított *lacB* gén nem fejeződött ki laktóz, D-galaktóz, D-glükóz, D-xilóz, L-arabinóz és glicerol szénforrásokon sem (Jónás és mtsai., 2014). Ezzel ellentétben a cellulázt termelő *T. reesei*-ben a *lacB* ortológja nélkülözhetetlen a laktózon történő növekedéshez (Ivanova és mtsai., 2013).



2. ábra: A Leloir útvonal anabolikus funkciói azt jelentik, hogy a legtöbb Leloir enzim konstitutívan fejeződik ki a vegetatív fejlődési szakaszban. Az UDP-glükóz/galaktóz-4-epimeráz (*ugeA*) és az UDP-galaktópiranóz/furanóz mutáz (*ugmA*) géneket és azok szerepét a sejtfal szintézisben El-Ganiny és mtsai. (2010; 2008) közzétették. A hexokináz mutáns *hxA* nem képes nőni D-fruktózon, de normálisan növekszik a D-glükózon a gomba glükokináz aktivitása révén (Flippin és mtsai., 2003). D-Ga-3P: D-gliceraldehid-3-foszfát; DHAP: dihidroxiaceton-foszfát.

OXIDO-REDUKTÍV ÚTVONAL



3. ábra: A D-galaktóz oxidoreduktív útvonala és az L-arabinóz katabolizmusa Fekete és mtsai., (2004) és Flippfi és mtsai., (2009).

III. CÉLKITŰZÉS

Korábbi kutatások során bizonyítást nyert az a hipotézis miszerint, az *A. nidulans* gombában a D-galaktóz indukálja a *bgaD* (béta-galaktozidáz) gént (Fekete és mtsai., 2012). A D-galaktóz katabolizálódhat a foszforilációs lépésekből álló Leloir, illetve a NADPH függő reduktív útvonalakon. Azonban, az említett útvonalak intermedierei közül bármelyik felelős lehet a *bgaD* gén közvetlen kifejeződéséért, így okkal merült fel az a kérdés, hogy vajon melyik lebontási köztes molekula a *bgaD* gén közvetlen induktora.

A doktori munkám egyik kutatási célja volt megvizsgálni, hogy a D-galaktóz lebontási útvonalak köztesei, vagy maga a D-galaktóz indukálják-e a *bgaD* és *lacpA* gén expresszióját.

Mivel a D-galaktóz metabolizálódása során számos intermedier keletkezik, ezért olyan mutáns törzsek vizsgálatát tűztük ki célul, amelyekben az anyagcsere útvonalak egyes enzimeit kódoló gének hibásak vagy hiányoznak, így az intermedier nem alakul tovább. Ezt követően egyesével kívántuk megvizsgálni, hogy az adott lebontási köztes molekula szükséges-e a D-galaktóz általi indukcióhoz.

A *galE* (galaktokináz, A214) mutánsban a katabolizmus csak a reduktív útvonalon haladhat, mivel a galaktokináz a Leloir-útvonal első enzime. Ha a *galE* mutánsban a D-galaktóz indukálja a *bgaD* és *lacpA* gének kifejeződését, az azt jelenti, hogy a Leloir-útvonal köztesei nem szükségesek az indukcióhoz.

Ezt követően, ha kizárhatjuk a Leloir útvonal közteseit, akkor a reduktív útvonal hatását szükséges megvizsgálni a *bgaD* gén kifejeződésére. Ennek alapján, ha az *araA1* (L-arabitol-dehidrogenáz, a reduktív útvonal második enzime, amely a galaktitolt L-xylo-3-hexulózzá redukálná; G094) mutánsban a D-galaktóz indukálja a *bgaD* gén kifejeződését, az azt jelenti, hogy az induktor a D-galaktóz vagy a galaktitol (dulcitol). Amennyiben a *bgaD* gén expresszióját közvetlenül a D-galaktóz indukálja, akkor az aldóz-reduktáz és galaktokináz kettős mutánsban, D-galaktózon a *bgaD* génnek ki kell fejeződnie. További lehetőség a kérdés megválaszolására, hogy vajon a *galE* (galaktokináz, A214) mutáns galaktitolon történő fermentációja eredményez-e génkifejeződést? Ha ebben az esetben nem tapasztalható a *bgaD* gén indukciója, az szintén megerősítheti, hogy közvetlenül a D-galaktóz felelős a *bgaD* gén kifejeződéséért.

A közelmúltban a biomérnöki tanszék munkacsoportja azonosított és jellemzett egy laktóz permeáz (*LacpA*) enzimet, melynek hiányában a laktóz felvétel jelentősen lecsökkent a vad referencia törzshöz képest. A *lacpA* hiánymutánsok esetében növekedés volt megfigyelhető laktózon, ami egy másik transzporter létezésére utal (Fekete és mtsai., 2012).

A TBLAST analízis *A.nidulans*-ban három MFS fehérjével is nagy hasonlóságot mutatott a *lacpA* génről átirrt fehérjével, ezek az AN1577, AN6831 és AN2814. Ezen fehérjék génejeit microarray vizsgálatok alá vetették, melyek közül az AN2814 gén esetén figyeltek meg erős expressziót laktózon. Ennek megfelelően *lacpB* (AN2814) hiánymutánsok létrehozását tűztük ki célul, hogy azonosíthassunk egy másik feltételezett laktóz permeáz gént.

Ennek érdekében meg kell vizsgálnunk a hiánymutáns törzsek laktóz felvételi képességét, valamint különböző szénforrások *lacpB* génre gyakorolt indukciós hatását a vad típusú referencia törzsben Northern blot génexpressziós analízis segítségével. Továbbá a két laktóz permeáz gén egymásra gyakorolt hatásának vizsgálata is célunk volt, ezért célul tűztük ki, hogy olyan kettősmutáns törzset hozzunk létre, amely mindkét laktóz permeáz génre nézve hiányos. Amennyiben, a *lacpB* gén hiányában lecsökken a laktóz felvétel mértéke, esetleg a kettős mutáns esetében megszűnik a laktóz hasznosítása, akkor egy új laktóz permeáz gént azonosíthatunk.

IV. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

1. *Aspergillus nidulans* törzsek, táptalajok és tenyésztési feltételek

Doktori munkám során az **I. táblázatban** felsorolt törzsekkel végeztünk kísérleteket. Az R21 jelzésű vad típusú törzs Axel A. Brakhage professzor (Institute of Microbiology, Friedrich Schiller University of Jena) laboratóriumából származik. Az „A” előjelű törzsek az FGSC (Fungal Genetic Stock Center, University of Kansas Medical Center, Kansas City) törzsgyűjteményéből származnak. Az EFES jelzésű törzsek témavezetőm Fekete Erzsébet doktori munkája során keresztezéssel készültek. Az AOEF jelzéssel rendelkező törzseket az én doktori munkám során hoztuk létre.

Törzs	Genotípus	Hivatkozás
R21 ^a	<i>pabaA1</i> ; <i>yA2</i> ; <i>veA1</i>	Fantes és Roberts (1973)
TN02A3 (FGSC A1149)	<i>pyrG89</i> ; <i>pyroA4</i> ; <i>ΔnkuA::argB</i> ; <i>veA1</i>	Nayak és mtsai. (2006)
EFLK_161/9	(<i>pyrG89</i>); <i>pyroA4</i> ; <i>ΔnkuA::argB</i> ; <i>veA1</i> ; <i>ΔlaccpA::Tr.pyr4</i> ^b (uridin prototróf)	Fekete és mtsai. (2012)
RJMP155.55	<i>riboB2</i> ; <i>wA3</i> ; <i>veA</i> ⁺	Dr. Nancy Kellertől kaptuk
AOEF007	(<i>pyroA4</i>); <i>pyrG89</i> <i>ΔnkuA::argB</i> ; <i>veA1</i> ; <i>ΔlaccpB::Af.pyroA</i> ^c (piridoxin prototróf)	Fekete és mtsai. (2016)
AOEF008	(<i>pyroA4</i>);(<i>pyrG89</i>) <i>ΔnkuA::argB</i> ; <i>ΔlaccpA::Tr.pyr4</i> ^b ; <i>ΔlaccpB::Af.pyroA</i> ^c (uridin és piridoxin prototróf)	Fekete és mtsai (2016)
AOEF009 ^e	(<i>pyroA4</i>); <i>ΔnkuA::argB</i> ; <i>veA1</i> ; <i>ΔlaccpB::Af.pyroA</i> ^c (uridin és piridoxin prototróf)	Fekete és mtsai (2016)
AOEF010 ^e	(<i>pyroA4</i>); <i>ΔlaccpB::Af.pyroA</i> ^c ; <i>wA3</i> ; <i>riboB2</i> ; <i>veA1</i> (uridin és piridoxin prototróf)	Fekete és mtsai (2016)
AOEF011.1	(<i>pyroA4</i>); <i>ΔlaccpB::Af.pyroA</i> ^c ; <i>veA1</i> ; (<i>riboB2</i>); <i>Af.riboB</i> ^d <i>in trans</i> ; <i>wA3</i> ; <i>laccpB</i> ¹⁺ (uridin, piridoxin és riboflavin prototróf)	Fekete és mtsai (2016)
AOEF011.9	(<i>pyroA4</i>); <i>ΔlaccpB::Af.pyroA</i> ^c ; <i>veA1</i> ; (<i>riboB2</i>); <i>Af.riboB</i> ^d <i>in trans</i> ; <i>wA3</i> ; <i>laccpB</i> ²⁺ (uridin, piridoxin és riboflavin prototróf)	Fekete és mtsai (2016)
AOEF011.7	(<i>pyroA4</i>); <i>ΔlaccpB::Af.pyroA</i> ^c ; <i>veA1</i> ; (<i>riboB2</i>); <i>Af.riboB</i> ^d <i>in trans</i> ; <i>wA3</i> ; <i>laccpB</i> ⁵⁺ (uridin, piridoxin és riboflavin prototróf)	Fekete és mtsai (2016)
AOEF012 ^f	(<i>pyroA4</i>);(<i>pyrG89</i>); <i>ΔlaccpA::Tr.pyr4</i> ^b ; <i>ΔlaccpB::Af.pyroA</i> ^c (uridin és piridoxin prototróf)	Fekete és mtsai (2016)
A214	<i>galE9</i> , <i>biA1</i> , <i>wA3</i>	Roberts, 1963, 1970; Alam és Kaminskyj, 2013
A59 (G092)	<i>hxA1</i> , <i>yA2</i> , <i>pyroA4</i>	Roberts, 1963; Flippin és mtsai., 2003
G094	<i>biA1</i> , <i>wA3</i> , <i>araA1</i>	Clutterbuck, 1981; De Vries és mtsai., 1994
EFES3	<i>yA2</i> , <i>galE9</i> , <i>hxA1</i> , <i>pyroA4</i>	Fekete és mtsai., 2004
G0103 (FGSC A58)	<i>yA2</i> ; <i>pyroA4</i> ; <i>lacA1</i>	Roberts (1963); Gajewski és mtsai. (1972)

I. táblázat: A munkánk során felhasznált *A. nidulans* törzsek

Az 1. táblázatban található lábjegyzet magyarázata:

A megadott hivatkozások utalnak a releváns mutációkra; egyéb markerekre, amelyet használtunk (Clutterbuck, AJ, 1993. *A. nidulans*, gének. In: O'Brien, SJ (szerk Clutterbuck, A.J., 1993. *A. nidulans*, nuclear genes. In: O'Brien, S. J. (Ed.), Genetic Maps: Locus Maps of Complex Genomes, Vol. 3. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp. 3.71–3.84.)

Az alkalmazott rövidítések:

^a a vad típusú referencia törzs; ^b *T. reesei* orotidin-5-foszfát-dekarboxiláz (*pyr4*) génje; ^c *A. fumigatus* piridoxin bioszintézis (*pyroA*) génje; ^d *A. fumigatus* GTP ciklohidroxiláz (*riboB*) génje; ^e az AOEF007 és az RJMP155.55 törzsek keresztezéséből származó utód; ^f az AOEF008 és az RJMP155.55 törzsek keresztezéséből származó utód.

A zárójelben feltüntetett allélok nem lettek leellenőrizve (keresztezéssel vagy szekvenálással).

Gén	Fenotípus	Hivatkozás
<i>yA1</i>	sárga konídium	Clutterbuck (1972)
<i>wA3</i>	fehér konídium	Pontecorvo és mtsai. (1953)
<i>biA1</i>	biotin auxotrófia	Roper (1950)
<i>galE9</i>	galaktokináz hiánya	Robert (1963)
<i>riboA1</i>	riboflavin auxotrófia	Cove (1979)
<i>hxA1</i>	hexokináz hiánya	Roberts (1963)
<i>pyro A4</i>	piridoxin auxotrófia	Käfer (1958)
<i>araA1</i>	L-arabitol hasznosítás képességének hiánya	Roberts (1963)
<i>pyrG89</i>	uridin auxotrófia	
<i>lacpA</i>	laktóz permeáz hiánya	Fekete és mtsai (2012)
<i>lacpB</i>	laktóz permeáz hiánya	Fekete és mtsai (2016)
<i>veA1</i>	sötétben jól sporulál	

II. táblázat: Az **I. táblázat**ban felsorolt fontosabb markereket és fenotípusokat a **II. táblázat** foglalja össze.

A rázott lombikban és a bioreaktorban történő tenyésztési feltételek a következők szerint valósultak meg (lásd Fekete és mtsai. (2002)).

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

1. A spóráztató táptalaj összetétele:

- 0,092 g/l di-ammónium-tartarát
- 10 g/l glükóz
- 20 ml/l sóoldat
- az adott törzs auxotróf markerei
- 15 g/l agar pH=6,5 (Pontecorvo és mtsai., 1953).

Új ferdeagaros tenyészetek leoltásakor mindig ellenőriztük, hogy a genotípus változatlan-e. A glükózt 50%-os oldatként használtuk, és külön sterilizáltuk. A vitamin kiegészítők többségét (p-amino-benzoésav [H1-vitamin], piridoxin [B6-vitamin], riboflavin [B2-vitamin] 2mg/l, a biotint [B7-vitamin] viszont 1 mg/l, az uridint 10 mM-os végkoncentrációban AMM (*Aspergillus Minimal Medium*; Pontecorvo és mtsai., 1953) tápoldathoz adtuk hozzá.

2. Az AMM tápoldat összetétele:

- 6 g/l NaNO₃,
- 2 ml sóoldat,
- 10 g/l szénforrás
- az adott törzs auxotróf markere(i); pH=6,5.
(Pontecorvo és mtsai., 1953).

3. A sóoldat összetétele:

- 26 g/l KCl
- 26 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- 76 g/l KH_2PO_4
- 50 ml/l nyomelemoldat.

4. A nyomelemoldat alkotói:

- 40 mg/l Na-borát
- 400 mg/l $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
- 714 mg/l $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- 8 mg/l Na-molibdát
- 800 mg/l $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; pH= 2,0.

Az AMM2 tápoldat összetétele elsősorban a nitrogénforrás minőségében tér el.

5. Az AMM2 tápoldat összetétele:

- 8 g/l $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$
- 2 ml sóoldat (lásd fent)
- 10 g/l szénforrás
- az adott törzs markere(i)
- 0,1 g/l CaCl_2 ; pH=6,5.

Az alkalmazott szénforrások kezdeti koncentrációja 1,5%. A tenyésztésekhez használt sterilizett tápoldatok beoltása 10^6 *A. nidulans* konídium/ml mennyiséggel történt. A rázott lombikos tenyészeteket 500 ml-es Erlenmeyer-lombikokban végeztük 100 ml tápoldatban, 37 °C-on, 200 percenkénti fordulatszámon (rpm).

A fermentációkat egy 2,5 literes üvegedényben végeztük (Sartorius, Göttingen, Németország), a tenyészet térfogata 2 l volt. A kevertetést és levegőztetést egy hat lapátos Rushton tárcsás turbinakeverő biztosította. A szabályozott paraméterek a következők voltak: pH = 6,5, a növekedéshez biztosított optimális hőmérséklet 37 °C, a levegőellátás 0,5 vvm¹ (levegő térfogat/folyadék térfogat/perc). Az oldott oxigén szintet 20%-os telítettségen tartottuk, amit a kevertetés sebességével szabályoztunk. A tápoldatveszteség minimalizálása érdekében, az elmenő gázt visszafolyó hűtő segítségével kondenzáltattuk, csatlakoztatva egy külső hűtőfürdőhöz (4 °C), mielőtt elhagyja a rendszert.

Az indukciós kísérletekhez a micéliumokat 37 °C-on 24 órán át előtenyésztettük glicerinnel semlegesített szénforrást tartalmazó AMM2 minimál tápoldaton, majd a tenyészetet egy zsugorított üvegszűrőn történő szűrését és steril vízzel történő mosását követően szénforrás nélküli AMM2 tápoldatba vittük át és további 1 órán át inkubáltuk 200 rpm rázatás mellett 37 °C-on. Az 1 órás éheztetés után a tenyészetet adagoltuk a vizsgálandó indukciós szénforrást 25 mM-os végső koncentrációban.

A tenyészetekből mintát vettünk 3, 6 és 12 óra elteltével az indukciós képesség vizsgálatához. Előkísérletek alapján megállapítottuk, hogy 3 óránál az indukciós hatást kifejtő szénforrással történő inkubációs idő elegendő a maximális transzkripció szint eléréséhez. A mintavételi idők során a biomassa koncentrációja érdemben nem változott, ami azt jelenti, hogy az ez idő alatt bekövetkező minimális bepárlódástól eltekinthetünk.

¹ vessel volume per minute

2. Laktóz felvételi kísérletek

A konídiospórával leoltott tápoldat inokulálása egy éjszakán át, 15 g/l glicerín szénforrás jelenlétében történt. A felnövesztett micéliumot alapos átmosást követően friss, egyedüli szénforrásként laktózt (15 g/l) tartalmazó AMM2 tápoldaton növesztettük tovább 24 órán át. Ezt követően a micéliumot steril „miracloth” segítségével átszűrtük, majd alapos átmosást követően 500 ml-es Erlenmeyer-lombikban lévő friss szénforrás nélküli AMM2 tápoldatba szuszpendáltuk, így a végső biomassza koncentrációja 1 g/l. A laktózt 0,2 mM, 0,5 mM és 2 mM végkoncentrációban adagoltuk a tenyészetbe, majd 6 órán át figyelemmel kísértük a diszacharid fogyását, miközben a tenyészeteket 37°C-on és 200 rpm fordulatszámon rázógépben inkubáltuk. A mintavételek szabályos időközönként történtek. A sejtenyészetet egy Eppendorf-centrifugában (10.000 g, 5 perc) lecentrifugáltuk, és a maradék laktóz koncentrációt a felülúszóból határoztuk meg nagynyomású folyadék-kromatográfia segítségével (HPLC; lásd alább). A kontroll tenyészet esetén D-glükóz szénforrást alkalmaztunk 2 mM-os végkoncentrációban. Meghatároztuk a biomasszával-korrigált laktóz felvételt, $\mu\text{mol/gramm}$ száraz sejttömegben kifejezve (DCW).

A specifikus felvételi rátát az idő függvényében, a percenként felvett laktóz mennyiségét μmol -ban, és a DCW értékét grammban fejeztük ki.

3. Genetikai technikák és transzformálás

A génkiütéshez transzformáláson alapuló génmanipulációs technikát alkalmaztunk, hogy a laktóz permeáz (*lacpB*) célgén a piridoxin auxotróf markerrel kicseréljük a homológ rekombináció révén. A deléciós konstrukció létrehozásához az ún. double-joint PCR módszert alkalmaztuk (Yu és mtsai., 2004). A módszer alapja, hogy egy szelekciós marker gén homológ rekombinációra alkalmas, kiméra oligonukleotidokkal felamplifikált *lacpB* gén „flanking” régióival fogjuk közre a marker gént. Ezek az „upstream” és „downstream” régiók biztosítják, hogy a cél lókusznál homológ rekombináció által megtörténjen a génkicserélődés.

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

4. A genomi DNS és totál RNS-izolálás

A begyűjtött micéliumot a lehető leggyorsabban „miracloth” nevű áteresztő textil segítségével átszűrtük, miközben hideg steril vízzel alaposan átmossuk a micéliumot. Ezt követően az átszűrt biomasszát papírtörő segítségével vízmentesítettük, majd folyékony nitrogénben azonnal lefagyasztottuk. A lefagyasztott biomasszát nitrogénnel hűtött mozsárban száraz porrá őröltük.

A genomi DNS-t Promega Wizard SV Genomic DNA Purification System Kit segítségével extraháltuk ki, míg a total RNS-t a Promega SV Total RNS-t izoláló kit alkalmazásával nyertük ki.

5. Northern és Southern blot analízis

A Sambrook és Russel (2001) által közölt standard eljárásokat használtuk a NanoDrop 2000 UV-Vis Spektrofotométer (Thermo Scientific) készülékkel történő RNS, DNS mennyiségi meghatározásra, denaturálásra, gél elválasztásra és a nukleinsavak nylon membránra történő blottolására a membrán hibridizációja során. Az agaróz gélekre 5 µg DNS-t (Southern blot) illetve RNS-t (Northern blot) vittünk fel zsebenként. A génspecifikus oligonukleotidokat digoxigeninnel jelöltük meg a PCR DIG Probe Synthesis Kit (Roche Applied Science) segítségével (III. táblázat) templátként R21 genomi DNS-t használtunk. A hibridizációt Lumi-Film kemilumineszcens detektáló film (Roche Applied Science) segítségével tettük láthatóvá. A cDNS-t 1 µg DNáz I-el kezelt totál-RNS-ből szintetizáltunk.

Gén azonosító	Oligonukleotid szekvencia (5'-3')	Amplikon mérete, bp	Hivatkozás	Alkalmazása
AN3199 (<i>lacpA</i>)	lacpA-Fw: 5'-TTTTGAATTCGCTGGCTGATGG-3' lacpA-Rv: 5'-TTTTGAATTCGTGCGGCTTTGG-3'	796	Fekete és mtsai., 2012.	Northern blot
AN2814 (<i>lacpB</i>)	lacpB-Fw: 5'-CGTCGGTCGTTTCATTCTCGG-3' lacpB-Rv: 5'-CCGACAGAGCGAGACCCCTT-3'	1.063	Fekete és mtsai., 2016.	Northern blot
AN2814 (<i>lacpB</i>)	lacpB_copy_Fw: 5'-TTCCTCCTTTCCCACAACGG-3' lacpB_copy_Rv: 5'-ATCCGCAAACCGACACAGAAC-3'	1.550	Fekete és mtsai., 2016.	Southern blot
AN2814 (<i>lacpB</i>)	lacpB_RT_Fw: 5'-TCTGTGTCACCTCGCTCTA-3' lacpB_RT_Rv: 5'-GGAAGAGGTAGTAGAAGGCG-3'	969	Fekete és mtsai., 2016.	RT-PCR
AN2814 (<i>lacpB</i>)	AN2814_seq1_Fw: 5'-CCCTCAGCCAACGACTATC-3' AN2814_seq1_Rv: 5'-ACGATAACTGAGGCGAAGCAC-3'	1.015	Fekete és mtsai., 2016.	A <i>lacpB</i> gén szekvenciája
AN2814 (<i>lacpB</i>)	AN2814_seq2_Fw: 5'-GTGCTTCGCCTCAGTTATCGT-3' AN2814_seq2_Rv: 5'-CGCTTCTTGGACGCCCTTGAC-3'	1.081	Fekete és mtsai., 2016.	A <i>lacpB</i> gén szekvenciája
AN2814 (<i>lacpB</i>)	lacpB_5flank_Fw: 5'-TTCGTTTCGGGTCAGCAGCA-3' lacpB5_5flank_Rv: 5'- ACCATAGTAATCCAGCATCGTCGTGCTCGTGGTCAGATG-3'	729 (+ 19)	Fekete és mtsai., 2016.	A <i>lacpB</i> gén 5' célzókar
AN2814 (<i>lacpB</i>)	lacpB_3flank_Fw: 5'- TTCATTATGTAGACACTCGCTCGTTTTCGCTTG GTTCC-3' lacpB_3flank_Rv: 5'-CTGTGATGTGACCTGGAAGC-3'	840 (+ 19)	Fekete és mtsai., 2016.	A <i>lacpB</i> gén 3' célzókar
AN2814 (<i>lacpB</i>)	Nested_AN2814-Fw:5'-TTCGCCATCAATCCCTT-3' Nested_AN2814-Rv:5'-TCTTAGGTTTGGGGTTGATT-3'	3.467	Fekete és mtsai., 2016.	A teljes <i>lacpB</i> gén deléciós kazettája
AN2814 (<i>lacpB</i>)	reintro-lacpB_Fw:5' GCTTGTGTTTGAGGAGAT-3' reintro-lacpB_Rv: 5'-AATGCTGTGATGTGACCT-3'	3.717	Fekete és mtsai., 2016.	<i>lacpB</i> gén retranszformálása a gén hiányos
AN1577	AN1577-Fw: 5'- ATCGTTGGTTCGTTCTTTGC-3' AN1577-Rv: 5'- ATAGAAGGAGGCGATGTTGA -3'	1.073	Fekete és mtsai., 2016.	RT-PCR
AN6831	AN6831-Fw: 5'- GCCAATACCATCTTCCTCG -3' AN6831-Rv:5'- TGAAGAAGGAGAAGGCAGC -3'	1.047	Fekete és mtsai., 2016.	RT-PCR
AN3200	AN3200-Fw: 5'-CGAGGACCCGCTATTCTACTATTG-3' AN3200-Rv: 5'-CCCTCGCCTCATCCATAAGC-3'	880	Fekete és mtsai., 2012.	RT-PCR
<i>pyroA</i> (<i>A. fumigatus</i>)	<i>pyroA</i> _AFU-Fw: 5'-GATGCTGGATTACTATGGT -3' <i>pyroA</i> _AFU-Rv: 5'-CGAGTGTCTACATATTGAA -3'	1.727	Fekete és mtsai., 2016.	A <i>lacpB</i> deléciós kazetta marker génje

III. táblázat: A munkánk során alkalmazott oligonukleotidok.

A szürke színnel kiemelt szekvenciák az *A. fumigatus pyroA* génnel alkot specifikus kiméra szekvenciát.

6. Hiánymutáns törzsek létrehozása

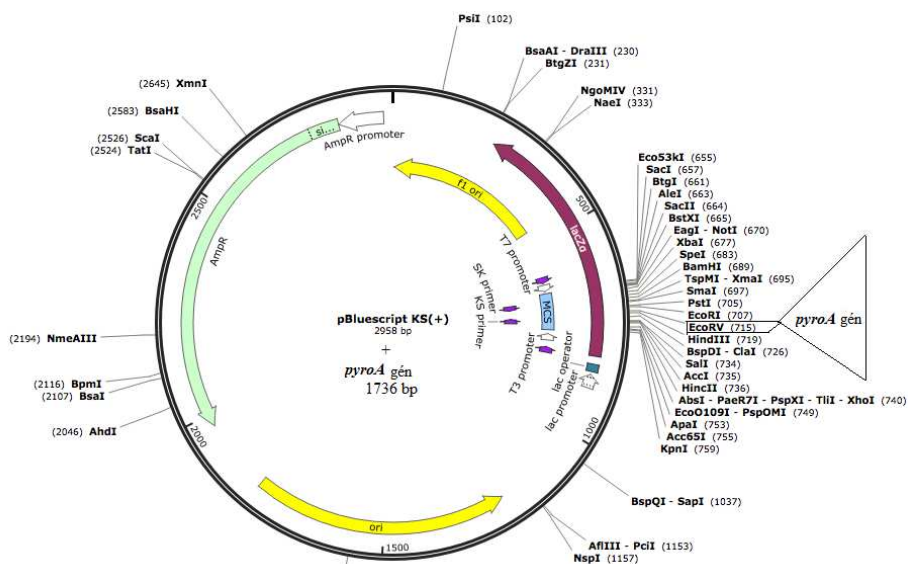
A gén kiütésére szolgáló deléciós kazettát *in vitro* hoztuk létre az ún. double-joint PCR módszerrel (Yu és mtsai., 2004). A kazetta egy 840 bp-ból álló nem kódoló régiót tartalmaz az *A. nidulans lacpB* gén „flanking” régiójából, valamint egy funkcionális *pyroA* gént az *A. fumigatus* genomból, mely a piridoxin bioszintézis egyik enzimét kódoló gén. Az alkalmazott oligonukleotidokat a III. táblázat tartalmazza (*lacpB*_5flank_Fw, Rw; *lacpB*_3flank_Fw, Rw; *pyroA*_AFU-Fw, Rw). Az *A. nidulans* piridoxin-auxotróf törzs TN02A3 protoplasztjait (Nayak és mtsai., 2006) 10 µg lineáris deléciós kazettával transzformáltuk. A génkiütésekhez *nkuA*-hiányos mutánst használtunk; a törzs nem rendelkezik a DNS mindkét láncát érintő törések javításának képességével², így a transzformációk hatékonysága jelentősen megnő. A piridoxin-prototróf transzformánsok tesztelését a *lacpB* gén kódoló szekvenciájának hiányával azonosítottuk PCR segítségével gén specifikus primereket használva. Több független *lacpB* hiányos törzs fenotípusos vizsgálata is megtörtént.

A kettős transzporter mutáns létrehozásához (*lacpA/lacpB*) a pTN1 plazmidot (4. ábra) használtunk (Nayak és mtsai., 2006; Berl R. Oakley-től kaptuk), amelynek mérete 4721 bp. A pBluescript KS plazmid³ az EcoRV helyen lett hasítva, ahová beligálták az *A. fumigatus pyroA* marker génjét (1736 bp). A ligálás eredménye a pTN1 plazmid. Az így létrehozott plazmid vektort használtuk templátként a szelekciós fragment felamplifikálásához (*pyroA*_AFU-Fw, Rv).

² Az angol szaknyelvben 'Non-homologous end joining activity'-ként ismert.

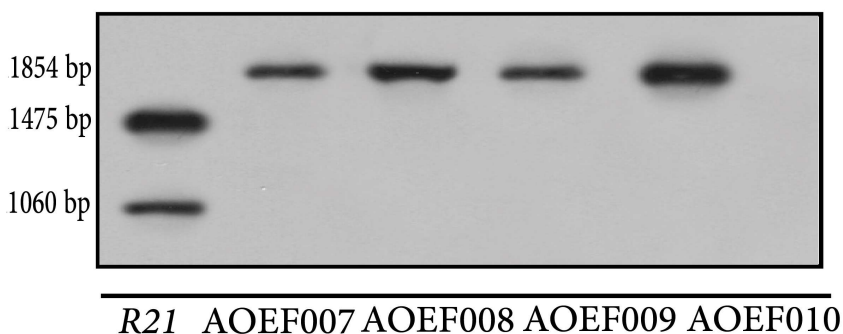
³https://www.snapgene.com/resources/plasmid_files/image_consortium_plasmids/pBlue_script_KS%28+%29/

A *lacpB* gén „upstream” régiójának felamplifikálásához a pyroA_AFU_Fw primerjének reverz komplementere és a *lacpB* gén revers primere által alkotott kiméra párt alkalmaztuk (*lacpB*_5flank_Fw, Rw). A *lacpB* gén „downstream” régiójának felamplifikálásához pedig a pyroA_AFU_Rw primerjének reverz komplementere és a *lacpB* gén forward primere által alkotott kiméra oligonukleotid párt használtuk (*lacpB*_3flank_Fw, Rw). Ezt a három terméket összeszerelő PCR segítségével egyesítettük, majd az egy fragmentet alkotó konstrukciót az ún. nested (a fragment széleitől beljebb eső) primerek (Nested_AN2814-Fw, Rv) segítségével sokszorozítottuk. Az *in vitro* létrehozott *lacpB* gén cseréjére alkalmas kazettát a piridoxin-auxotróf EFLK_161/9 ($\Delta lacpA/\Delta nkuA$) hiánymutáns törzsbe transzformáltuk. Az alkalmazott oligonukleotid primereket a III. táblázat tartalmazza.



4. ábra: A pTN1 plazmid vektor térképe, amely a pBluescript KS plazmid és az *A. fumigatus* *pyroA* génjéből épül fel.

A piridoxin-prototróf, és kettős hiánymutáns törzseket Southern blot analízissel igazoltuk. Mivel a *lacpA* gén hiányát Fekete és mtsai., (2012) korábban már igazolták, így csak a *lacpB* gén ellenőrzésére volt szükség. A Southern blot analízishez a vizsgálni kívánt törzsekből gDNS-t izoláltunk, majd 5 µg gDNS-t BamHI és KpnI restrikciós endonukleázokkal 37 °C-on 2-3 óráig emésztettük. A BamHI és a KpnI enzim egy 1060 bp és egy 1475 bp hosszúságú fragmentet hasít, az R21 vad típusú referencia törzsnél, a deléciós mutáns esetén várt fragment mérete a *pyroA* marker gén beépülése miatt 1854 bp (5. és 7. ábra). A kópiaszám az $n-1$ képlet alapján határozható meg, ahol az „n” a fragmentek száma (5. ábra).



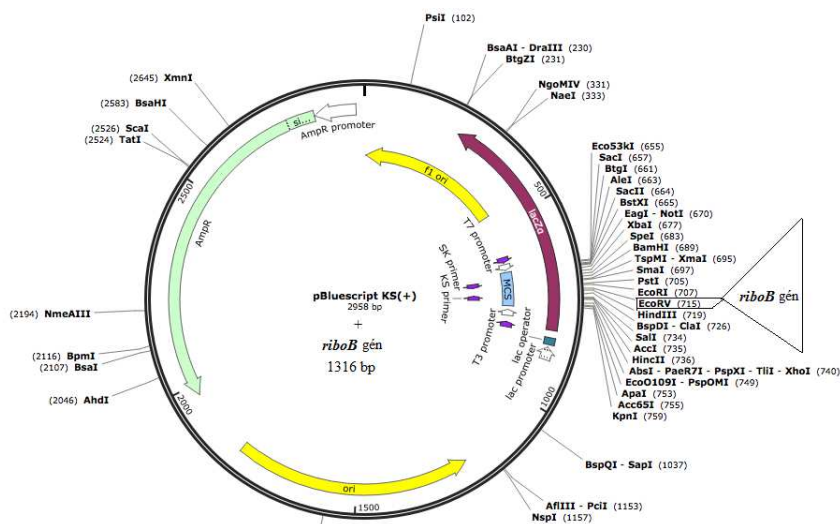
5. ábra: A *lacpB* gén hiányát illetve meglétét Southern blot analízissel ellenőriztük. Az R21 referencia törzs egy kópiában tartalmazza a *lacpB* gént. A laktóz felvételi kísérletek vizsgálatához is alkalmazott AOEf007 jelzésű *lacpB* hiányos törzs, az AOEf008 jelzésű *lacpA/lacpB* kettős mutáns törzs, valamint a keresztezésből származó uridin és piridoxin prototróf AOEf010 jelzésű *lacpB* hiányos törzsek Southern blot analízise is alátámasztja a *lacpB* gén hiányát.

Ezt követően, hogy visszanyerjük az *nkuA* gén funkcióját kereszteztük a kettős mutánst *nkuA* pozitív RJMP155.55 jelzésű törzzsel. Ebben a munkában két függetlenül izolált kettős transzporter mutánst vizsgáltunk meg.

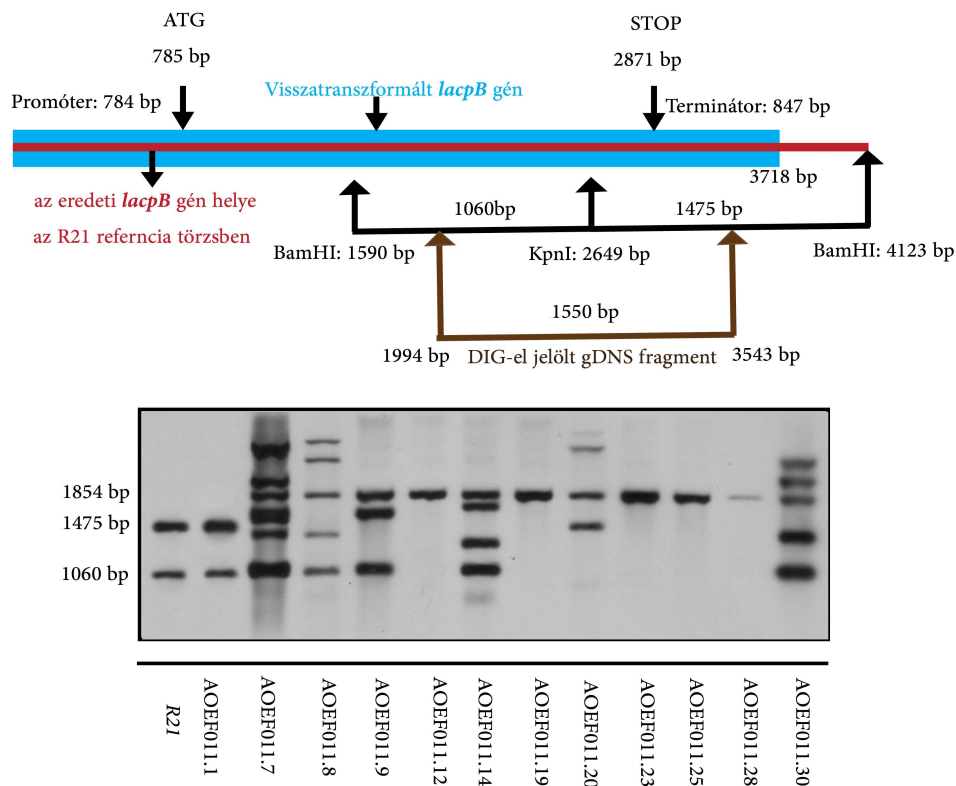
7. A *lacpB* gén visszatranszformálása a *lacpB* hiányos háttérrel rendelkező mutánsba

Egy karakterizált első generációs *lacpB* hiánymutáns törzset kereszteztünk az RJMP 155,55 törzzsel. Uridin-prototróf és riboflavin-auxotróf utódot azonosítottunk PCR segítségével (AOEF010), valamint az *nkuA* gén jelenlétét is detektáltuk, *nkuA* génre specifikus primerpárral (amely lehetővé teszi a *lacpB* gén több kópiába történő visszaintegrálódását ektópikus helyekre). A funkcionális *lacpB* gént *A. nidulans* R21 genomi DNS-éről amplifikáltuk DNS-specifikus primerpárral (reintro-*lacpB*_Fw, R_w) (III. táblázat). Az amplifikált, tisztított *lacpB* PCR termékből 10 µg mennyiséget ko-transzformáltunk 1 µg pTN2 (6. ábra) riboflavint hordozó plazmid vektorral (*A. fumigatus* *riboB* génje, a riboflavin bioszintézisben részt vevő riboflavin fehérjét kódol; Nayak és mtsai., 2006; Berl R. Oakley-től kaptuk) a már *nkuA* génnel rendelkező második generációs *lacpB* hiánymutáns törzsbe. A pTN2 plazmid létrehozása során szintén a pBluescript KS plazmid EcoRV hasító helyére ligálták be az *A. fumigatus* *riboB* génjét (1316 bp) (6. ábra). A riboflavin-prototróf transzformánsok között a visszatranszformált *lacpB* gén meglétét PCR segítségével vizsgáltuk.

Ezt követően a *lacpB* gén kópiaszámát Southern blot analízissel állapítottuk meg. (A Southern blot analízis stratégiája teljes mértékben megegyezik a fent leírtakkal (7. ábra)). Azokat a kiválasztott törzseket, amelyek visszanyerték a funkcionális *lacpB* génjüket egy vagy több kópiában, fenotípusosan is jellemeztük.



6. ábra: A pTN2 plazmid vektor térképe, amely a pBluescript KS plazmid és az *A. fumigatus* *riboB* génjéből épül fel.



7. ábra: A *lacpB* gén kópiaszámának ellenőrzése Southern blot analízissel néhány rekonstruált törzs esetében. Az R21 referencia törzs egy kópiában tartalmazza a *lacpB* gént. Az AOEF011.1 törzs egy kópiában tartalmazza a *lacpB* gént. Az AOEF011.7 törzs *lacpB* gén kópiaszáma 5, az AOEF011.8 törzs *lacpB* gén kópiaszáma 4, az AOEF011.9 és az AOEF011.20 törzsek *lacpB* gén kópiaszáma 2, az AOEF011.14 törzs *lacpB* gén kópiaszáma 3, az AOEF011.30 törzs *lacpB* gén kópiaszáma 4. Azonban az AOEF011.12, az AOEF011.19, az AOEF011.23, az AOEF011.25 és az AOEF011.28 jelzésű törzsek nem nyerték vissza a funkcionális *lacpB* gént.

8. Analitikai módszerek

A száraz sejttömeg (DCW) meghatározása 10 ml biomasszából történt. A micéliumot egy előre lemerített tömegű papírszűrőn keresztül, zsugorított üvegszűrő segítségével szűrtük le, majd többször hideg vízzel átmostuk a biomasszát, ezt követően 80 °C-on tömegállandóságig szárítottuk. A száraz sejttömeg adatait az Eredmények fejezetben közöljük, amely két különböző mérés átlagából származik. Ezek értékei alulmúlták az átlagok 14%-át. A D-glükóz, D-galaktóz és laktóz mennyiségét HPLC-vel határoztuk meg egy protoncserélő oszlop (Bio-Rad Aminex HPX-87H) és törésmutató (RI) detektor alkalmazásával, izokratikus elúció révén 10 mM H₂SO₄ mozgófázist alkalmazva, 55 °C-os kolonna hőmérsékleten.

9. Reprodukálhatóság

Minden analitikai és biokémiai eredmény 3-5 független kísérlet átlagából származik. Az adatok elemzése és számszerűsítése SigmaPlot szoftver (Jandel Scientific) segítségével történt. Minden kísérletsorozaton belül standard eltéréseket (SDs) határoztunk meg. Az indukciós kísérleteknél a változások szignifikancia-vizsgálatát a nem indukált adatokhoz képest Student-féle t-teszttel végeztük; a probabilitás (p) adatait az Eredmények részben adjuk meg.

10. Felhasznált vegyszerek

Munkánk során analitikai tisztaságú vegyszereket használtunk. A finomvegyszereket és táptalajkomponenseket a Sigma-Aldrich Kft.-től (Budapest, Magyarország), a molekuláris biológiai kísérletekhez szükséges anyagokat a Roche Magyarország Kft.-től vásároltuk meg.

11. Bioinformatikai módszerek

Az *A. nidulans* laktóz permeáz A (*lacpA*) (Fekete és mtsai., 2012) génjét használtuk mintának („bait”) a TBLASTN típusú lekérdezéshez, hogy szerkezetileg rokon MFS-transzmembrán proteint kódoló géneket keressünk az *Aspergillus* nemzetség mintegy három tucat faja között. A nukleotid adatbázisok elérhetők a National Center for Biotechnology Information (NCBI)⁴ és az Energy Joint Genome Institute (JGI) honlapjáról⁵. A gén modellek és termékek levezetése manuálisan történt. Gén modell alatt a génen belüli intron-exon arány értendő. Azokat a fehérjéket tekintettük további analízisre alkalmasnak, amelyek minimum 30%-os azonosságot („identity”) mutattak a LacpA fehérjével. A feltételnek 92 fehérje szekvencia felelt meg. A szekvenciák illesztésére a MAFFT program (7-es verzió; Katoh és Toh, 2010) esetén a G-INS-i algoritmus (képzett globális homológ) beállítást választottuk a nagyobb inzerciós és deléciós mutációk helyes kezelése (kiszűrése) érdekében.

⁴ www.ncbi.nlm.nih.gov

⁵ www-genome.wi.mit.edu

A BLOSUM 35, 45 valamint a 62-es lehetséges beállítások mindegyikét kipróbáltuk, végül a BLOSUM 45 hasonlósági mátrix segítségével végzett elemzést alkalmaztuk, mivel ez tűnt a leginformatívabbnak. A fehérjeszekvenciákat a Blokk Mapping és Gathering programok segítségével az Entropy szoftver révén határoztuk meg (BMGE verzió 1,12; Criscuolo és Gribaldo, 2010), BLOSUM 35 hasonlósági mátrix alkalmazásával és 3-as blokk mérettel, ami fehérjénként 477 informatív aminosavat eredményezett.

Ezt követően a BMGE által meghatározott fehérjeszekvenciákat a PhyML 3.0 verzióval kalkuláltuk ki a maximum likelihood fát a WAG szubsztitúciós modell alkalmazásával, ahol a „gamma shape” értéke becsült értékre volt állítva (Guindon és mtsai., 2010). A filogenetikai törzsfát a FigTree programmal rajzoltuk meg⁶. A hozzávetőleges valószínűség („likelihood”) arányt (Anisimova és Gascuel, 2006) integráltan, a PhyML segítségével számítottuk ki, Chi2-alapú parametrikus programot használva; az aLRT értékek (0-1) a fa összekötő csomópontjaiban láthatók (F1. ábra).

⁶ <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>

V. EREDMÉNYEK

1. A Leloir útvonal nélkülözhető a D-galaktóz általi *bgaD/lacpA* indukcióhoz

Munkánk első részében a katabolikus *bgaD/lacpA* klasztergének közvetlen induktorát vizsgáltuk. Ahhoz, hogy azonosítsuk a *bgaD/lacpA* génnek fiziológiai induktorát D-galaktóz indukció esetén, olyan *A. nidulans* mutáns törzseket vettünk górcső alá, amelyek a Leloir és/vagy az oxido-reduktív katabolikus útvonal bizonyos meghatározott lépésében/lépéseiben hibásak. Az A214, galaktokináz (*galE*) a Leloir útvonal első lépésében; G092, hexokináz mutáns (*hxA1*) az oxido-reduktív útvonal utolsó lépésében; G094, L-arabitol-dehidrogenáz (*araA1*), a reduktív útvonal második enzime, amely a galaktitolt L-xylo-3-hexulózzá redukálná) (lásd az I. táblázat a mutánsok genotípusáról).

Hipotézisünk szerint az indukció nem következne be, ha a mutálódott katabolikus gén hozza létre a fiziológiás induktort, vagy ha az enzimtermék az adott gén által van kódolva.

A galaktokináz *galE* gén *galE9* alléljában (*galE9*; Alam és Kaminskyj, 2013) a kódoló régió 3' végén lévő bázispár-inszerció által okozott leolvasási kereteltolódás funkcióvesztést okoz. A *galE9* törzsben nem változott meg a D-galaktóz általi indukció expressziós mintázata. Ugyanez volt a helyzet, amikor a *galE9/hxA1* duplamutánt vizsgáltuk (*hxA1*; Flippin és mtsai., 2003.) (8B. 8C. és 9. ábra). A transzkriptum képződésének idő-profiljában azonban különbségek figyelhetők meg a kontrollhoz viszonyítva (8A. ábra).

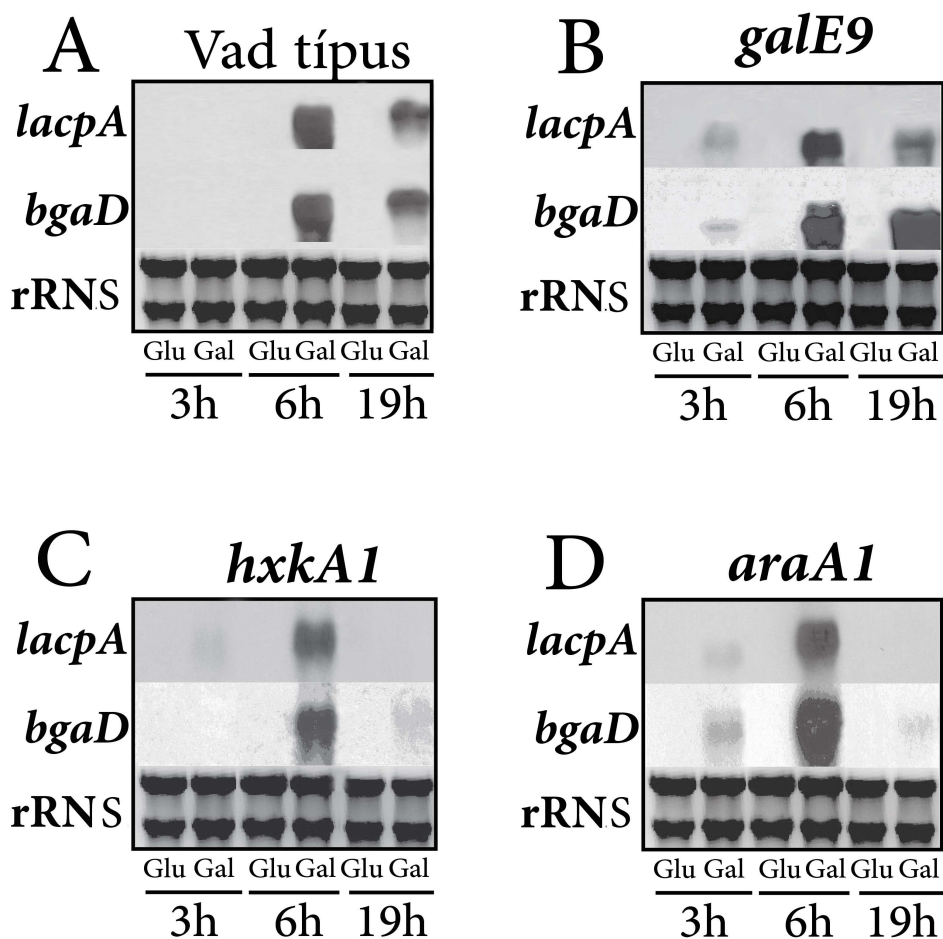
A *galE9* mutánsban következetesen korábban történik az expresszió a vad-típusú törzshöz képest. Összhangban a korábbi eredményekkel (Fekete és mtsai., 2012), a referencia törzs (R21) esetén nem volt megfigyelhető transzkriptum képződés glicerol, D-glükóz, D-xilóz, galaktitol szénforrások jelenlétében, kivéve egy mérsékelt kifejeződést az L-arabinóz pentózon. Ugyanezt tapasztaltuk az általunk elvégzett génexpressziós vizsgálatok során is az *A. nidulans* mutáns törzseknel.

2. A oxido-reduktív útvonal szintén nélkülözhető a D-galaktóz általi *bgaD* és *lacpA* transzkriptum képződéséhez

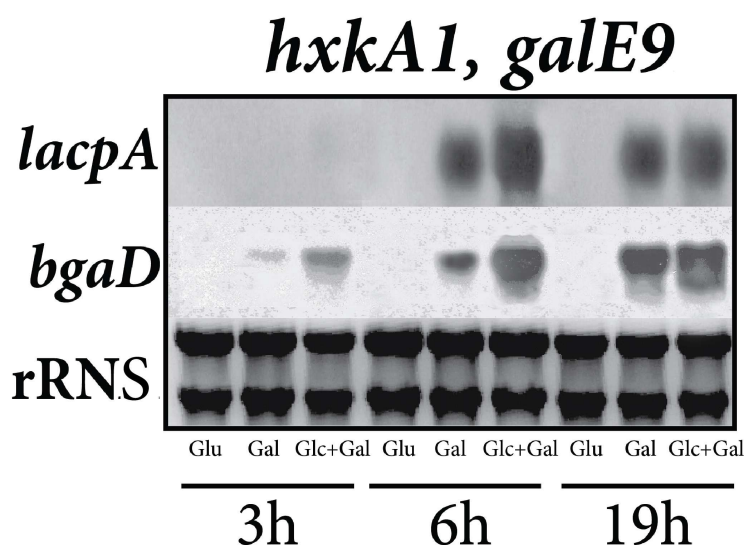
A *bgaD* és *lacpA* gének D-galaktóz általi indukcióját a hexokináz és az L-arabinitol dehidrogenáz mutációi (*hxA1* illetve *araA1*) sem változtatták meg (8C. 8D. ábra). Ezek az eredmények azt sugallták, hogy a D-galaktóz indukciós hatását a *bgaD-lacpA* génklaszterre vagy közvetlenül a D-galaktóz, vagy az oxido-reduktív katabolikus útvonal első közbenső terméke, a galaktitol (dulcitol) váltja ki. Ezért megvizsgáltuk, hogy a galaktitol képes-e indukálni a *bgaD* és *lacpA* transzkriptumok képződését, valamint az intracelluláris β -galaktozidáz-aktivitását.

A galaktitol egyedüli szénforrásként is képes támogatni az *A. nidulans* növekedését, bár az elérhető maximális növekedési ráta lényegesen alacsonyabb, mint D-galaktózon (Fekete és mtsai., 2004; a kvantitatív adatokat lásd a 10. ábrán). Azonban *bgaD* és *lacpA* transzkripció (11. ábra), vagy bGal enzimaktivitás nem volt kimutatható a fermentáció egy időpillanatában sem ezen a poliolon, mint egyedüli szénforráson, sem a vad típusú referencia törzs (R21), sem az A214 galaktokináz (*galE9*) mutáns esetén. Ezért arra a következtetésre jutottunk, hogy a D-galaktózon történő növekedés során nem szükséges a katabolikus intermedierek képződése és jelenléte a *bgaD* és a *lacpA* gének indukciójához.

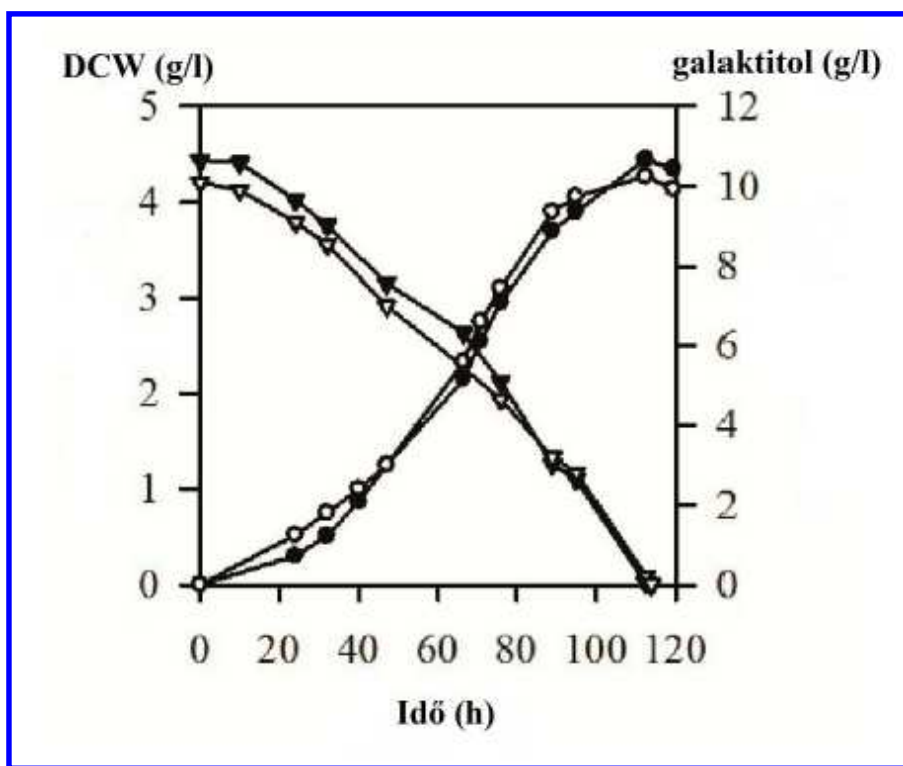
Mint ahogyan az a klasztergénék esetén várható, a *bgaD* és *lacpA* gének lényegében azonos expressziós mintázatot mutatnak, minden fiziológiai körülmény között, a galaktóz-hasznosításban sérült mutánsok genotípusától függetlenül.



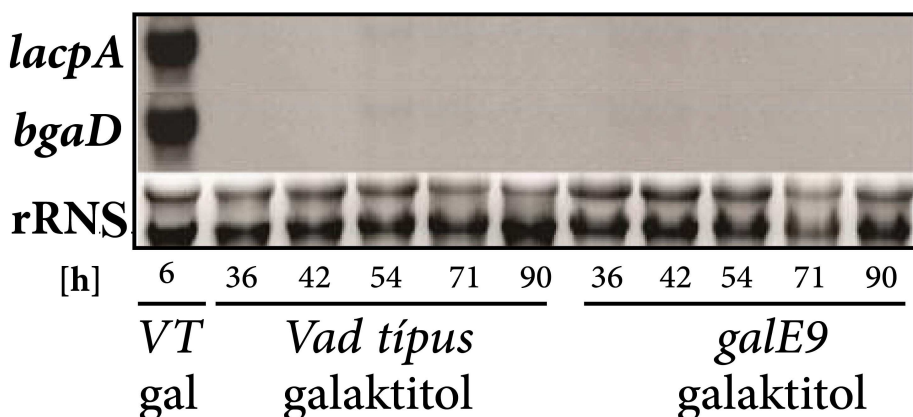
8. ábra: A *bgaD-lacpA* génklaszter indukciós spektrumának transzkripció analízise D-glükóz (Glu) és D-galaktóz (Gal) szénforrások jelenlétében különböző *A. nidulans* törzsek esetén (lásd I. táblázat) Northern blot analízissel. **A panel:** R21 referencia törzs; **B panel:** A214 galaktokináz mutáns; **C panel:** G092 hexokináz mutáns; **D panel:** G094 L-arabitol dehidrogenáz mutáns. Kontrollként az alkalmazott RNS minősége és mennyisége látható, a riboszomális RNS-eket (28S és 18S) etídium-bromiddal tettük láthatóvá.



9. ábra: A *bgaD-lacpA* génklaszter indukciós spektrumának transzkripciós analízise az EFES3 kettős galaktokináz/hexokináz mutáns esetén D-glükóz (Glu), D-galaktóz (Gal) és D-galaktóz+Glicerol szénforrások jelenlétében Northern blot analízissel. Hasonlóan a 8. ábrához kontrollként az alkalmazott RNS minősége és mennyisége látható, a riboszomális RNS-eket (28S és 18S) etídium-bromiddal tettük láthatóvá.



10. ábra: A biomassza képződés időprofilja (üres kör és teli kör), valamint a maradék galaktitol szénforrás koncentrációja (üres háromszög, teli háromszög); a referencia vad típusú (üres szimbólumok) és az A214 (*galE*) mutáns törzs (teli szimbólumok) esetén.



11. ábra: A *bgaD-lacpA* génklaszter transzkriptum képződésének időprofilját láthatjuk galaktitol (dulcitol) jelenlétében sülyesztett fermentációban, a vad típusú referencia törzs (R21), és a galaktokináz mutáns (A214) törzsek esetében Northern blot analízissel. Kontrollként az R21-es törzs transzkriptumát láthatjuk (VT), D-galaktóz (gal) jelenlétében növesztve 6 óra után. A kép alján a riboszómális RNS (28S és 18S) eredeti képe látható (rRNS).

3. A feltételezett laktóz permeáz gének azonosítása *in silico* vizsgálattal és azok génkifejeződésének vizsgálata

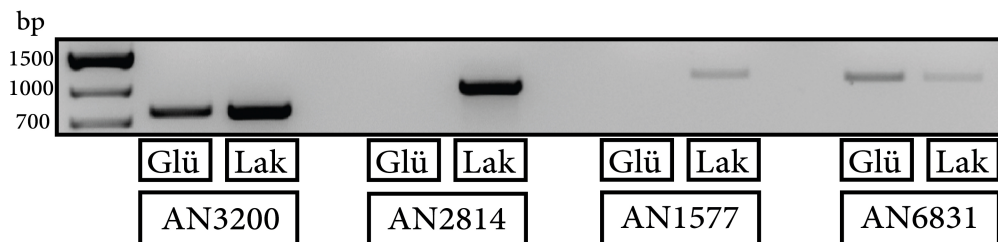
Munkánk második részében feltételezett laktóz permeáz géneket vizsgáltunk, melynek eredményeként egy második élettanilag releváns laktóz permeáz gént azonosítottunk és funkcionálisan elemeztünk *A. nidulans*-ban. A gént *lacpB*-nek neveztük el.

Az *A. nidulans* genomjában több száz olyan gén található, amelyek feltételezett MFS-cukortranszporter transzmembrán fehérjéket kódolnak (Wortman és mtsai., 2009). Filogenetikai kapcsolatokat vizsgáltunk *Aspergillus* fajok MFS fehérjéi között, hogy szerkezetileg rokon permeázokat találjunk. A LacpA fehérje ortológjainak és a hét, az *A. nidulans* LacpA-ra leginkább hasonlító szerkezeti paralóg fehérjének a génjei a nyilvánosan is hozzáférhető nukleotid adatbázisokból lettek kiválasztva a TBLASTN keresés alapján (Altschul és mtsai., 1997). Ezt követően a megfelelő génmodellek és fehérjetermékek levezetésére került sor 31 rendelkezésre álló *Aspergillus* genomszekvencia esetén. Az így kapott 92 fehérjét használtuk a Maximum Likelihood fa megépítéséhez. A LacpA laktóz permeáz ortológjai mindössze 14 genomban találhatók meg, míg egy hozzá hasonló fehérje 31 genomja közül csak háromban nincs kódolva.

Ennek ellenére nem találtunk olyan fajokat, amelyek az összes kiválasztott MFS gént tartalmaznák. Az *A. ustus* és az *A. versicolor* hat paralóg gént hordoz, viszont az *A. glaucus* és az *A. rubrum* esetében mind a nyolc hiányzik. A hét leginkább hasonló *Aspergillus* nemzetségbeli LacpA paralóg közül három szerkezetileg rokon *A. nidulans* MFS fehérjét találtunk, melyeket az AN1577, AN6831 és AN2814 annotált fehérjét határoznak meg, így ezeket a feltételezett laktóz permeázokat választottuk ki biológiai validálásra (F2. ábra).

A három kiválasztott gén expresszióját laktóz szénforráson vizsgáltuk; negatív kontrollként a D-glükóz hatását teszteltük reverz transzkriptáz (RT) PCR segítségével. Az expressziós vizsgálatához vad típusú törzs konídiospórájáról indított, glicerín C-forrás tartalmú minimál tápoldaton előnövesztett micéliumot lecseréltük laktóz tartalmú tápközegre, valamint kontrollként a glükóz génexpresszióra tett hatását is teszteltük. Az génexpressziós vizsgálatokat 6 órás indukciót követően végeztük el. Ahogyan a 12. ábra mutatja, az AN2814 kódoló génje jól kifejeződött laktóz jelenlétében. Az AN1577 kódoló génje jelentősen gyengébb jelet adott laktóz szénforrás hatására, míg a harmadik paralóg, az AN6831 kódoló génje kismértékben átíródott glükóz jelenlétében is, amely jelzi, vélhetően nem specifikus induktora a laktóz. Továbbá, a közelrokon *P. chrysogenum* gombafaj – a *Penicillium* az *Aspergillus* testvérnemzetsége az *Aspergillaceae* családban – az irodalom szerint rendelkezik az *A. nidulans* BgaD intracelluláris GH2 β -galaktozidáz orthológjával, de a genomja nem határoz meg a LacpA-val ortológ és az *A. nidulans* AN1577-el homológ transzportereket (Jónás és mtsai., 2014).

Összefoglalásként elmondható, hogy az *A. nidulans* genom szekvenciájának *in silico* vizsgálata, amelyet a három kiválasztott transzporter jelölt expressziós analízise követett, arra engednek következtetni, hogy az AN2814 kódoló génje egy LacpA-paralog MFS fehérjét kódol, amely hozzájárulhat a gomba laktóz felvételéhez. Ezt a feltételezett második laktóz permeáz gént *lacpB* génnek neveztük el.



12. ábra: Három feltételezett laktóz permeáz gén expressziós válaszát láthatjuk laktóz és glükóz jelenlétében 6 órás indukciót követően félkvantitatív RT-PCR-rel. Az így nyert micéliumokból RNS izolálást követően cDNS-t írtunk reverz transzkriptáz enzim segítségével. Az RT-PCR reakciókhoz minden esetben 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ cDNS-t használtunk templátként. Az erősen represszáló szénforrás a D-glükóz kontrollként szolgált: a *lacpA* és a *bgaD* kifejeződés D-glükóz általi represszió alatt áll még akkor is, ha a laktóz is jelen van a tápközegben (Fekete és mtsai., 2012). Ezzel szemben, az AN3200 lókusztól – a *lacpA* és *bgaD* között helyezkedik el – korábban kimutatták, hogy konstitutívan expresszálódik számos körülmény között, beleértve a D-glükózt is (Fekete és mtsai., 2012).

4. A *lacpB* gén laktóz permeázt kódoló funkciójának megerősítése és elemzése

Annak igazolására, hogy a *lacpB* valóban funkcionális laktóz permeázt kódol, a gént kiütöttük. A génkiütés részleteit az Anyagok és módszerek 6. fejezete tartalmazza. A *LacpB* hiánymutánst és azokat a törzseket, amelyekbe a funkcionális *lacpB* gént újra visszatranszformáltuk a gén-hiányos háttérrel rendelkező törzsbe fenotípusos vizsgálat alá vettük.

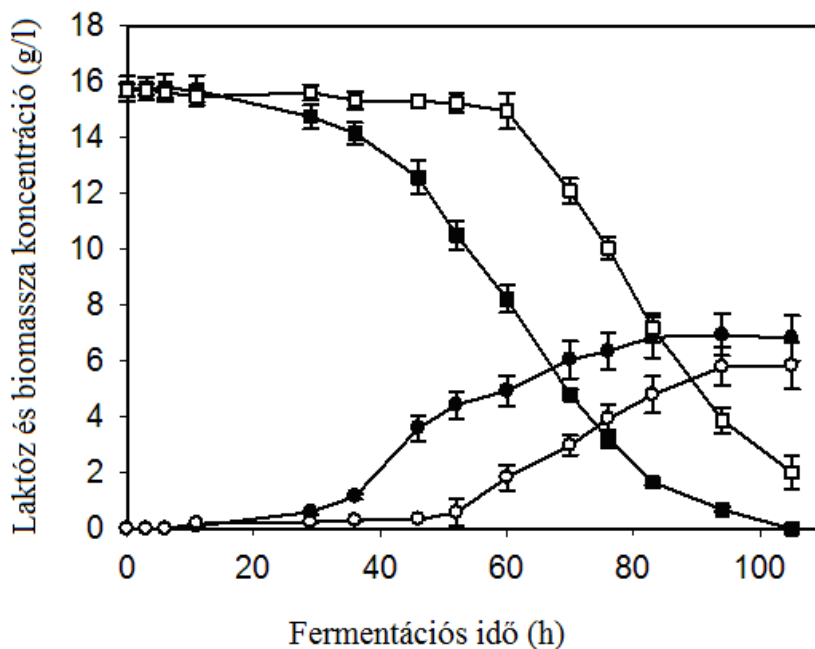
A visszatranszformálás során az egykópiás törzs mellett több (konkrétan 2 és 5) *lacpB* génkópiát tartalmazó mutánsok (AOEF011.9 és AOE011.7) is létrejöttek („túltermelő mutáns”).

Ahogy a 13. ábra mutatja, a *lacpB* gén hiánya a laktóz felvétel drasztikus csökkenéséhez vezetett a vad típusú R21 kontroll törzs laktóz hasznosításához képest, továbbá az is megfigyelhető, hogy nem képződött új biomassza laktóz jelenlétében, mint egyedüli szénforráson a fermentációk harmadik napja előtt. A *lacpB* hiánya a konídiospórával inokulált, szilárd tápközegen történő növekedést is érintette (15. ábra).

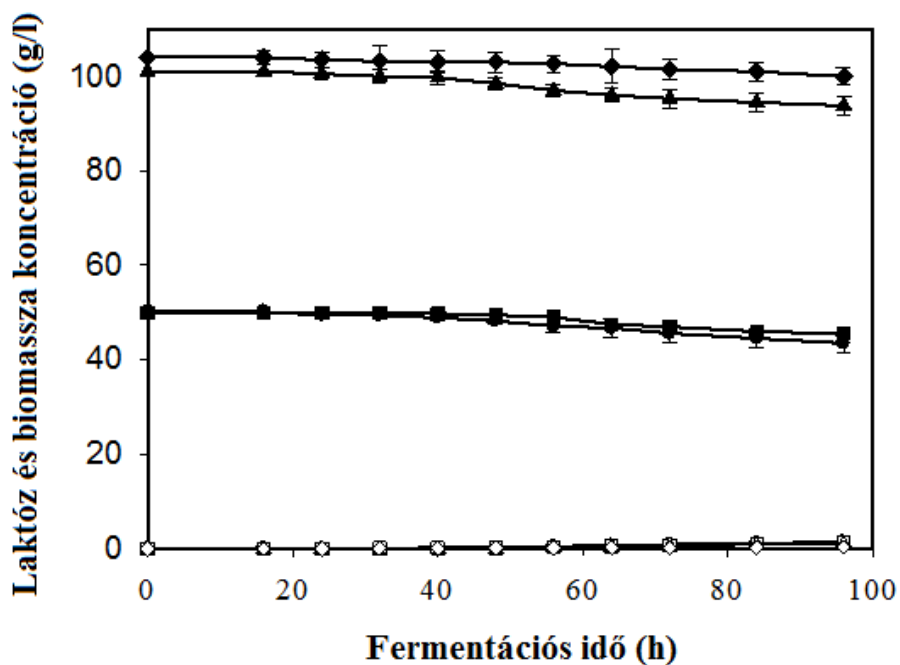
Másrészt, vad típusú növekedés tapasztalható D-glükóz és D-galaktóz jelenlétében, akár a folyékony vagy szilárd tápközegben vizsgáltuk a tenyészeteket. Némileg meglepő módon a laktóz-felvétel, valamint a gomba biomassza képződése körülbelül három nappal az inokulálást követően elkezdődött, összehasonlítható ütemben a vad típusú törzs gyors növekedési szakaszával, és addig folytatódott, amíg a rendelkezésre álló laktóz teljesen elfogy (13. ábra). Mindazonáltal a végső maximális biomassza-koncentráció szignifikánsan alacsonyabb ($p < 0,1\%$) maradt a referencia tenyészetéhez képest. Ez a késleltetett szénfelvételi és növekedési mintázat a *lacpB* hiányos törzs (AOEF010) laktóz fermentációja során minden esetben előállt, függetlenül a kezdeti szubsztrát koncentrációtól (1-20 g/l tartományon belül vizsgálva). Az 50 és 100 g/l ($\sim 0,15$ M és 0,3 M) kezdeti laktóz koncentrációk – ami a szokásos tartománya az emlős tejnek – még a vad típusú törzs esetén is növekedésgátlást eredményez. Ez a jelenség arra utalhat, hogy az *A. nidulans* kevésbé tolerálja a magas laktóz koncentrációt a növekedés kezdeti szakaszában (14. ábra).

A laktóz felvétel sebesség-meghatározó lépés a vad típusú *A. nidulans* törzs laktóz asszimilációja során (Fekete és mtsai., 2012). A komplementált *lacpB* hiányos törzsek vizsgálata feltárta, hogy a *lacpB* gén kópiszámával arányosan nő a laktóz felvétel hatékonysága és az ezt követő biomassza képződés (16. ábra). Mivel az egykópiás rekonstruált törzs viselkedése lényegében megegyezik a vad típusú törzsszel, a *lacpB* gént több kópiában tartalmazó törzsekkel végzett kísérletek eredményei azt bizonyítják, hogy a LacpB fiziológiailag releváns transzporter. A többkópiás törzsek szignifikánsan ($p < 1\%$) magasabb laktóz felvételi rátát mutatnak, ami nyilvánvaló a laktóz, tápközegből történő gyors ütemű fogyasztásból. Ennek következtében szignifikánsan nagyobb mértékű ($p < 1\%$ a 2-kópiás, $p < 0,1\%$ az 5-kópiás törzs esetében) a többkópiás törzsek biomassza-koncentrációja egységnyi idő alatt, mint a vad típusú vagy az egykópiás rekonstruált törzsek esetében. Annak igazolására, hogy a *lacpB* gén hiánya befolyásolja a laktóz felvételét a kontroll, valamint a mutáns törzs glicerinen előnövesztett micéliumát olyan minimál tápoldatra cseréltük le, amely alacsony (0,2 mM, 0,5 mM, 2 mM) koncentrációkban tartalmazott laktózt (17. ábra). Minden egyes koncentrációnál, a vad-típusú törzs specifikus laktóz felvétele magasabb volt, mint a hiánymutáns törzsé, de alacsonyabb, mint a többkópiás mutánsoké (17. ábra). Továbbá az is megfigyelhető, hogy a laktóz felvétel szignifikánsan ($p < 1\%$) gyorsabb azon törzs esetén, amely öt kópiában tartalmazza a *lacpB* gént, mint az a törzs, amely csupán két génnel rendelkezik.

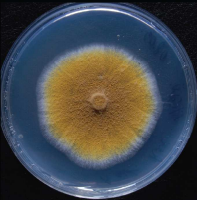
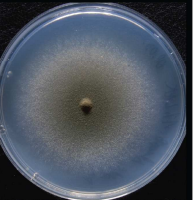
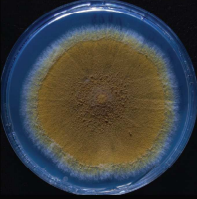
Ahhoz, hogy megbecsüljük a *lacpB* gén hozzájárulását a teljes laktóz felvételéhez, különböző kiindulási szubsztrátum koncentrációkat vizsgáltunk a vad típusú referencia törzs, továbbá a *lacpB*-hiányos, valamint a két- és öt-kópiás *lacpB*-rekonstruált törzsek esetében (I. táblázat). Az adatok azt mutatják, hogy míg a *lacpB*-hiányos törzs laktóz felvétele 0,2 és 0,5 mM (kezdeti) külső laktóz koncentráció mellett körülbelül 14% és 11%-a a vad típusú törzs laktóz fogyasztásához képest, ugyanezen koncentrációk esetén, illetve ez az arány körülbelül 22%, 2 mM-os kezdeti laktóz koncentrációból kiindulva. Mindezek a megfigyelések közvetlen bizonyítékok arra, hogy a *lacpB* gén egy fiziológiailag releváns laktóz permeázt kódol *A. nidulans*-ban. Továbbá, a LacpB megléte alapvető fontosságú, hogy akadálytalan növekedést indítson és tartson fenn 20 g/l kiindulási laktóz koncentrációig a lag fázis elhúzódása nélkül.



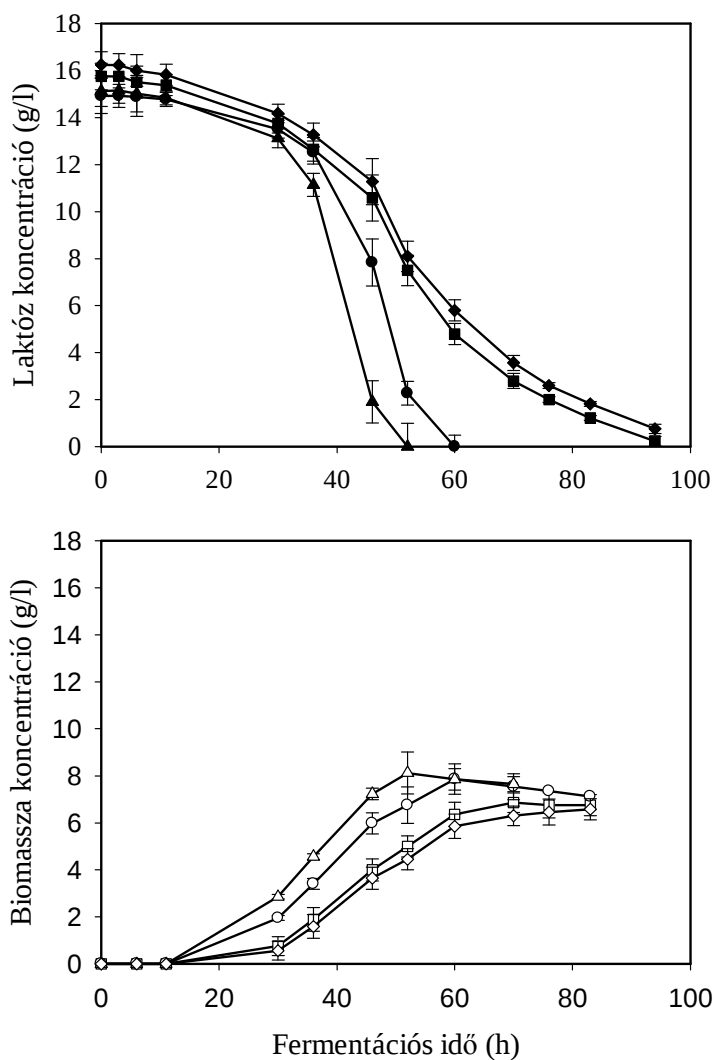
13. ábra: A növekedés időprofilja (körök), valamint a maradék laktóz koncentrációja (négyzetek) rázott lombikos fermentációban az *A. nidulans* vad típusú törzs (teli jelek), és a *lacpB* hiánymutáns (üres jelek) törzs esetén, 15 g/l kezdeti laktóz koncentráció mellett. Az inokulálás konídiospórával történt. A laktóz egyedüli szénforrásként volt jelen a tápoldatban.



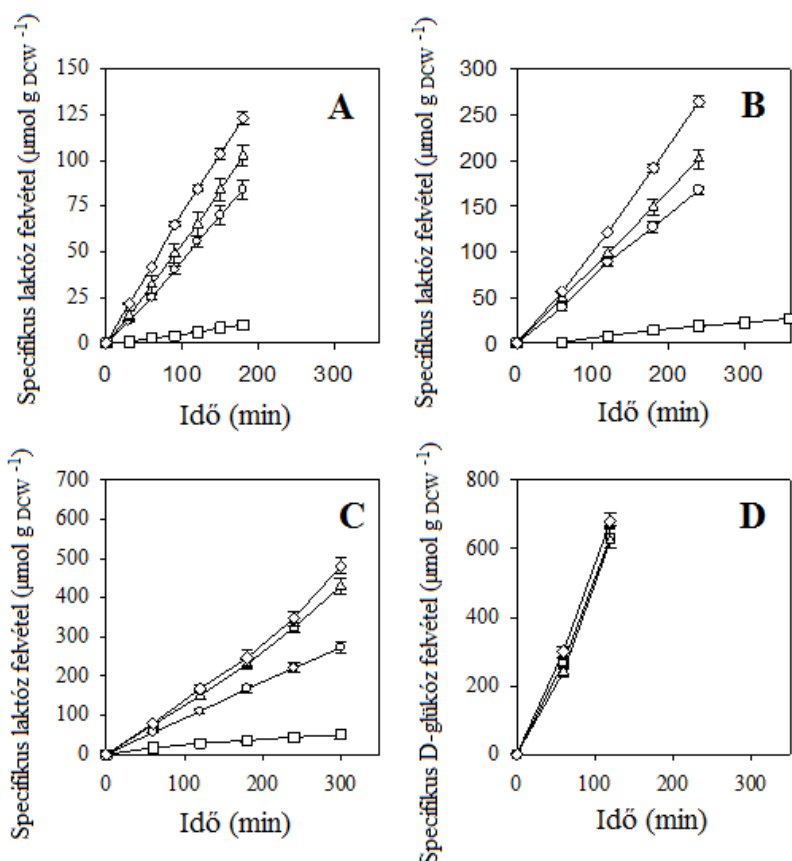
14. ábra: A növekedés időpofilja (üres jelek), valamint a maradék laktóz koncentráció (teli jelek) *A. nidulans* rázott lombikos fermentációjában. A vad típusú törzs és a *lacpB* hiánymutáns 50 g/l (körök illetve négyzetek), és 100 g/l (háromszögek illetve sokszögek) kiindulási laktóz koncentráción. Az inokulálás konídiospórával történt. A laktóz egyedüli szénforrásként volt jelen a tápoldatban.

Inkubációs idő	D-glükóz		Laktóz	
	R21 (vad típus)	$\Delta lacpB$	R21 (vad típus)	$\Delta lacpB$
4 nap				
6 nap				

15. ábra: Agarlemezen történő növekedése az R21 referencia és a *lacpB* hiánymutáns törzsnek, D-glükóz és laktóz egyedüli szénforráson.



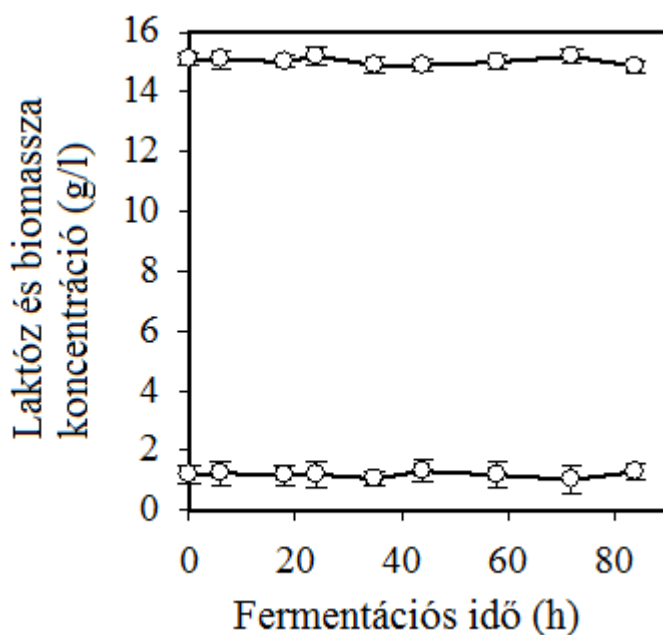
16. ábra: A laktóz-felvétel (teli jelek; **A panel**) és a biomassza képződés kinetikája (üres jelek; **B panel**) a vad típusú R21 kontroll törzs (rombusz) és az egykópiás rekonstruált törzs "AOEF011.1" (négyzetek), összevetve a 2-kópiás "AOEF011.9" (körök) és az 5-kópiás "AOEF011.7" (háromszögek) *lacpB* törzsekkel. Megjegyezzük, hogy az egykópiás rekonstruált törzs úgy viselkedik, mint a vad típusú kontroll törzs az R21.



17. ábra: Specifikus laktóz felvétel a vad-típusú (körök) és a *lacpB* hiánymutáns (négyzetek) törzsek, valamint a 2-kópiás (háromszögek) és az 5-kópiás (rombuszok) *lacpB* multikópiás rekonstruált törzsek esetén. A tápoldat kezdeti laktóz koncentrációi 0,2 mM (**A panel**), 0,5 mM (**B tábla**) vagy 2 mM (**C panel**). **Panel D:** a specifikus D-glükóz felvétel ugyanazon törzsek esetén, ahol a tápoldat kezdeti D-glükóz koncentrációja 2 mM. Megjegyezzük, hogy az Y-tengely eltérően skálázott az A, B és a C-D panel esetén, mivel különböző a kezdeti szubsztrátum koncentrációja minden kísérletben. Ennek következtében nem lehet vizuálisan összehasonlítani a látszólagos felvételi arányokat a különböző paneleken.

5. Két permeáz által irányított laktóz felvétel *Aspergillus nidulans* fonalas gombában

Egy korábbi közleményben munkacsoportunk demonstrálta, hogy az *A. nidulans lacpA* génje egy laktóz permeázt kódol, amely fiziológiailag releváns, azonban e cukor teljes felvételének csak egy részéért felelős (Fekete és mtsai., 2012). A paralóg *LacpB* permeáz funkciójáról kapott új adatok arra ösztönöztek bennünket, hogy vizsgáljuk meg azt, hogy vajon a *lacpB* gén felelős-e a fennmaradó laktóz felvételért a *lacpA* hiányos törzsben. Ebből a célból a *lacpB* gén törlésére került sor a *lacpA*-negatív háttérrel rendelkező törzsben, egy *lacpA/B* kettős laktóz permeáz hiányos mutánszt eredményezve. A kettős mutáns létrehozásának körülményeit az Anyagok és módszerek 6. fejezete tartalmazza. A törzsek fenotípus elemzéséből kiderült, hogy a konídiospóráról történő csírázása teljes gátlás alatt áll, azaz sem szilárd minimál tápagon, sem pedig süllyesztett folyékony tápközegben nem képes laktózon, mint egyedüli szénforráson növekedni. Ezen túlmenően, a glicerinen inokulált kettős hiánymutáns micéliumát laktóz tartalmú AMM2 minimál tápoldatba oltva képtelen volt új biomassza képzésére, valamint nem meglepő módon hosszú fermentációs idő elteltével sem detektálható laktóz fogyasztás (18. ábra). A specifikus laktóz felvételi ráták – a kapott értékek azonos módon generálódtak, mint a korábban bemutatott egyszeres hiánymutáns és a komplementált rekonstruált mutánsok esetén – nem utaltak statisztikailag releváns felvételre (IV. táblázat).



18. ábra: A növekedés (körök), valamint a maradék laktóz koncentráció (négyzetek) időprofilja rázott lombikos fermentációban az *A. nidulans lacpA/lacpB* kettős hiánymutáns esetén. A tápoldat kezdeti laktózkoncentrációja 15 g/l volt. Glicerinen előnövesztett micéliumokat használtunk az inokulum oltására. Azonos eredményeket kaptunk más, egymástól függetlenül előállított kettős laktóz permeáz hiánymutánsok esetén.

<i>A. nidulans</i> törzs	Laktóz koncentráció (mM)	Specifikus felvételi ráta (μM laktóz/min/g _{DCW})
Vad típus (R21)	0.2	0.523 ± 0.49
	0.5	0.702 ± 0.68
	2.0	0.893 ± 0.84
AOEF010 $\Delta lacpB$	0.2	0.075 ± 0.01
	0.5	0.077 ± 0.01
	2.0	0.196 ± 0.03
AOEF011.9 (2 kópiás <i>lacpB</i>)	0.2	0.510 ± 0.06
	0.5	0.834 ± 0.07
	2.0	1.411 ± 0.12
AOEF011.7 (5 kópiás <i>lacpB</i>)	0.2	0.651 ± 0.05
	0.5	1.067 ± 0.12
	2.0	1.468 ± 0.14
AOEF008 $\Delta lacpA/\Delta lacpB$	0.2	< 0.05
	0.5	< 0.05
	2.0	< 0.05

IV. táblázat: Laktóz-felvétel a vad-típusú *A. nidulans* és a *lacpB* hiányos-, *lacpB* többkópiás- és *lacpA/lacpB* kettős mutáns törzsek esetén különböző szubsztrátkoncentrációkon. Az egykópiás rekonstruált törzs és a vad-típusú kontroll R21 törzs közötti különbségek nem szignifikánsak ($P < 0,1\%$).

6. A *lacpA* és *lacpB* gén eltérő expressziós profillal rendelkezik

A *lacpB* gén szabályozásának vizsgálatához transzkripciós szinten tanulmányoztuk az expressziós profilját. A vad-típusú törzsben a *lacpB* gén erős indukciója figyelhető meg laktóz jelenlétében már 3 óra elteltével a glicerinen előnövesztett micélium esetében (19. ábra). D-galaktóz jelenlétében csak egy mérsékelt génexpresszió látható 3 óra elteltével, míg az ettől későbbi időpontokban (6 és 12 óra) egyáltalán nincs génexpressziós válasz. Ezzel szemben, a *lacpA* gén reagált a D-galaktóz monoszacharidra legalább olyan erősen, mint 3 órában a laktózra, bár később a D-galaktóz által kifejtett transzkripciós szint erőteljesen lecsökkent (19/b. ábra). Egy még inkább figyelemre méltó különbség, a két *lacp* gén L-arabinóz jelenlétében megfigyelt expressziós profilja. Mint arról korábban beszámoltak, az L-arabinóz erőteljes hatást gyakorol a *lacpA* gén indukciójára a fermentáció korai (3h) szakaszában (Fekete és mtsai., 2012), de a *lacpB* gén nem – még a *lacpA* negatív háttérrel rendelkező törzs esetén sem – fejeződik ki az említett pentóz jelenlétében. Amint az várható volt, az erősen represszáló D-glükóz monoszacharid nem váltott ki transzkriptum képződést a *lacp* gének egyikénél sem a fermentáció teljes ideje alatt, valamint ugyanez mondható el a D-xilóz pentózzal és a D-glükóz C-2-es epimeréről a D-mannózzal is (19/a, b. ábra).

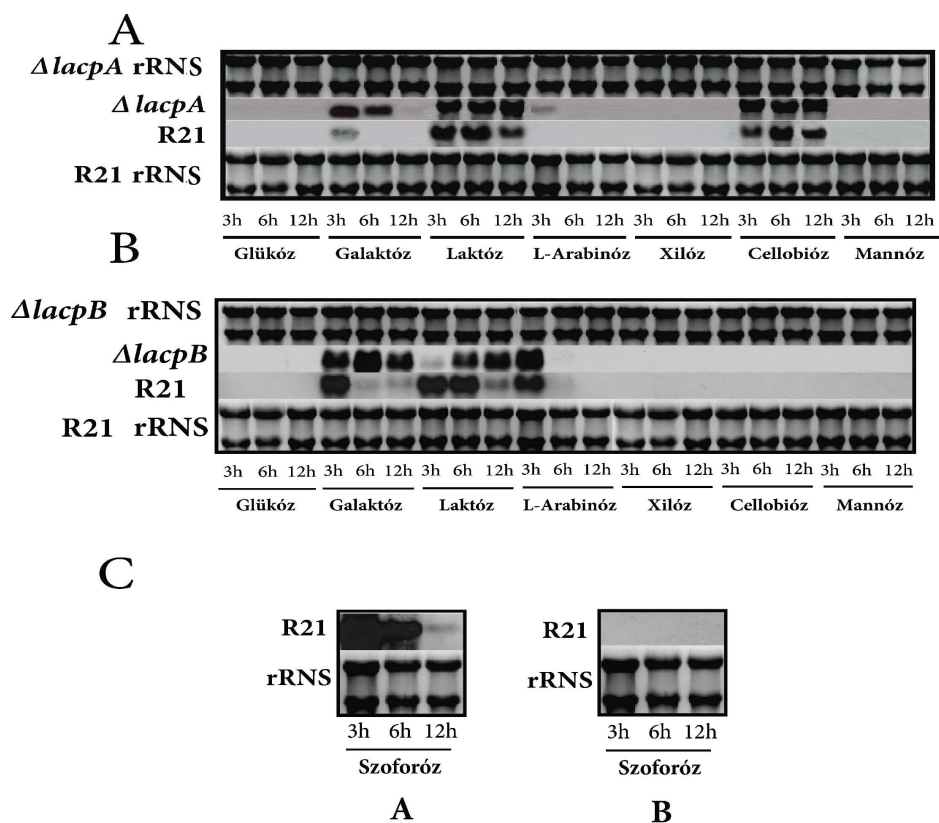
Az *Aspergillus* genom adatbázisban (<http://www.aspergillusgenome.org>), a *lacpB* (AN02814) gént feltételezett cellobióz (4-O- β -D-glükopiranozil-D-glükóz) transzporterként annotálták (Cerqueira és mtsai., 2013), mivel a *N. crassa* CDT-1 transzporterének (NKE 00801 lókusz) szerkezeti ortológja.

A CDT-1 permeáz funkciója akkor jutott érvényre, amikor az élesztőben történő expresszója révén kimutatták, hogy cellobiózt transzportál (Gałaszka és mtsai., 2010). Mindkét *A. nidulans lacp* génexpresszióját megvizsgáltuk cellobióz tartalmú tápoldatban. Ahogy a 19 (a, b) ábra is mutatja, a *lacpB* gén erősen indukálódik a vad típusú törzsben, különösen a fermentáció első hat órájában (3 h és 6 h), míg – éles ellentétben – a cellobióznak nincs indukciós hatása a *lacpA* génre a Northern blot transzkripció analízis alapján.

A cellobióz a fungális cellulitikus rendszerek alacsony molekula tömegű induktora (Seiboth és mtsai, 2007). Annak eldöntésére, hogy *lacpB*-t indukáló hatása összefüggésben van-e a lignocellulóz lebontással, megvizsgáltuk a két *lacp* gén expressziós válaszát egy másik béta-kötésű glükopiranoz dimer, a szoforóz (2-O-béta-D-glükopiranozil-alfa-D-glükóz) jelenlétében is. A szoforóz *T. reesei*-ben a cellulitikus rendszer legerősebb induktora (Sternberg és Mandels, 1980). A 19 (c) ábrán látható, hogy a szoforózra adott indukciós válasz nagyon hasonló volt ahhoz, mint amit a cellobióz esetén tapasztaltunk, azaz nincs detektálható *lacpA* transzkriptum képződés, míg a *lacpB* gént a szoforóz erősen indukálta, különösen a micéliumtranszfert követő 3 és 6 h mérési pontokon.

A laktóz tartalmú tápfolyadékban elvégzett fiziológiás és génexpressziós vizsgálatok egyértelműen bizonyítják, hogy a két különbözően expresszálódó laktóz permeáz együttesen felelős a laktóz felvételéért *A. nidulans*-ban.

Az egyik *lacp* expressziója a másik *lacp*⁻ hiánymutáns törzsben azt mutatja, hogy a D-galaktóz indukció hatása gyorsabb és erősebb lett mindkét permeázra nézve, a cellobióz indukciója a *lacpB* kifejeződésre szintén fokozódott. A laktóz indukciós hatása viszont nem tért el a vad típusétól. Ez is azt a hipotézist támaszthatja alá, miszerint a laktóz anyagcserében részt vevő gének/enzimek mintegy véletlenül képesek a laktóz transzportjára/hidrolízisére, és eredeti funkciójuk más – növényi vagy fungális eredetű – cukor-polimerek degradációjával volt kapcsolatos. Ezzel összhangban a *lacpB* expresszió cellobióz jelenlétében gyorsnak, erősnek és tartósnak bizonyult (19 a, b ábra).



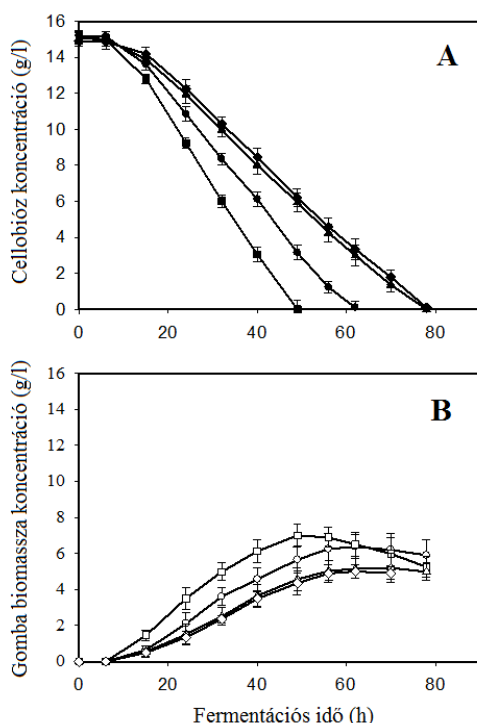
19. ábra: Az *A. nidulans lacpB* (A panel) és *lacpA* (B panel) mRNS mennyiségének összehasonlítása a vad típusú, *lacpA* illetve *lacpB*-negatív háttérrel rendelkező törzseknél Northern blot analízissel. A riboszómális RNS-t (28 S és 18 S) etídium-bromiddal tettük láthatóvá, amely a felső és az alsó paneleken láthatók, kontrollként az RNS minták minősége és mennyisége. **C-panel:** az *A. nidulans lacpB* (balra) és *lacpA* (jobbra) gének kifejeződése szoforózon.

7. A *lacpB* egy közös eleme lehet a laktóz- és a cellulóz katabolizmusnak *A. nidulans* gombában

Az a megfigyelés, hogy a *lacpB* erősen indukálható cellobiózzal arra sarkalt minket, hogy megvizsgáljuk, hogy a *LacpB* hiánymutáns törzs milyen fenotípust mutat ezen diszacharidon, mint egyedüli szénforráson. Ezzel párhuzamosan a kontroll törzsszel is felvettük a biomassza képződés és cellobióz fogyás kinetikai profiljait. Ahogy a 20. ábrán látható, a *lacpA*- és *lacpB* egyszeres-, valamint a *lacpA/B* kettős mutáns is egyértelműen bizonyítja a laktóz permeáz gén(ek) hiányának hatását a cellobióz felvétel csökkenésére a vad típusú referencia és az egykópiás rekonstruált törzsekhez képest (Ez utóbbi törzsek fenotípusa lényegében megegyezett). A *lacpA*-negatív háttérben a cellobióz fogyás gyorsabb volt ($P < 0,1\%$) (20/a. ábra), és ebből következően a fungális biomassza képződése is szignifikánsan ($p < 1\%$) gyorsabb, mint a kontroll törzs esetén (20/b. ábra). Ez az eredmény jól korrelál a mutánsban megfigyelhető *lacpB* expressziós profillal (lásd fent).

Éppen ellenkezőleg, szignifikánsan ($p < 1\%$) alacsonyabb növekedési ütem és cellobióz fogyasztás figyelhető meg a *lacpB* és a dupla permeáz hiánymutáns törzsek esetében. Ezek az eredmények is korrelálnak a transzkripció analízisekkel és azt bizonyítják, hogy a *lacpB* gén terméke részt vesz a cellobióz transzportjában *A. nidulans* gombában. A *lacpB* géntermék tehát egy élettanilag releváns cellobióz transzporter, az *A. nidulans* cellulolitikus rendszerének része.

A cellobióz fenotípus azonban részleges, nem abszolút – a *lacp*-mutánsok csíráznak, növekszenek és spóráznak cellobiózon – vagyis a cellobióz transzportnak további, egyenlőre ismeretlen komponensei is vannak ebben a gombafajban.



20. ábra: A maradék cellobióz koncentráció (teli jelek; **A panel**) és növekedés (üres szimbólumok; **B-panel**) időprofilja rázott lombikos fermentációk esetén az egykópiás *lacpB* rekonstruált törzsek (körök), a *lacpA* hiányos (négyzetek), a *lacpB* hiányos (háromszögek) és a *lacpA/lacpB* dupla permeáz hiányos (sokszög) törzsek esetén. Az egykópiás rekonstruált törzs alapvetően úgy viselkedik, mint a vad típusú kontroll törzs az R21. A tápoldat oltása konídiospórával történt.

VI. EREDMÉNYEK ÖSSZEGZÉSE

A fonalas gombáknál nem ritkán előforduló jelenség, hogy az asszimilációs útvonalakat a katabolikus intermedierek, mint fiziológiai induktorok indukálják, nem pedig maga a növekedési szubsztrát. Egy jól körbejárt példa az *A. nidulans* modell organizmus esetében figyelhető meg, ahol az etanol katabolizmus (*alc* rendszer) indukciója acetaldehid - az útvonal első intermediere - által történik, az etanolról pedig kimutatták, hogy inert (Flipphi és mtsai., 2001; 2002).

Doktori munkám során megvizsgáltuk, hogy *A. nidulans*-ban a D-galaktóz indukálja-e a *bgaD* és a *lacpA* géneket – klasztergének, amelyek egy intracelluláris béta-galaktozidázt illetve egy laktóz permeázt kódolnak – illetve azt, hogy a D-galaktóz katabolizmusa nélkülözhető vagy szükséges-e az indukcióhoz. Ahhoz, hogy ezt kísérletileg bizonyítsuk, olyan mutáns törzseket alkalmaztunk, amelyek a Leloir útvonal első (galaktóz-1-kináz) és az oxido-reduktív útvonal második lépésében (NAD-függő galaktitol-dehidrogenáz) defektesek, majd detektáltuk a klasztergén transzkriptumok meglétét vagy hiányát.

Sajnos nem ismerünk olyan *A. nidulans* mutánsokat, amelyeknek az aldóz 1-oxidoreduktáz enzimet kódoló génje lenne sérült. Ez a géntermék a legvalószínűbb felelőse az oxido-reduktív D-galaktóz lebontási útvonal első lépésének (valamint a D-xilóz és az L-arabinóz pentózok katabolizmusában is szerepet játszik). Ez annak is köszönhető, hogy legalább két, de valószínűleg több aldóz 1-oxidoreduktázt kódoló gén található a genomban, melyek termékei egyébként is széles szubsztrát specificitással rendelkeznek (Hasper és mtsai., 2000).

Az *A. nidulans* gombában akár tizenkét aldóz 1-oxidoreduktáz gén is lehet a genomban (M. Flippin, nem publikált *in silico* megfigyelés). Annak érdekében, hogy megkerüljük a D-galaktózt galaktitollá redukálni nem tudó *A. nidulans* mutánsnak a hiányát, megvizsgáltuk a két klasztergén indukálhatóságát galaktitolon. Az indukciós kísérlethez glicerinen előnövesztett micéliumot áthelyeztünk friss tápoldatra, amely tartalmazta azt a szénforrást, amelynek az indukciós hatását vizsgáltuk. Minden adat egyértelműen azt mutatta, hogy a galaktitol nem képes indukálni a *bgaD* és a *lacpA* gének expresszióját a növekedés egyetlen szakaszában sem, annak ellenére, hogy a növekedési ráta galaktitol jelenlétében lényegesen alacsonyabb, mint monoszacharidok esetében. Ez a megfigyelés érdekes, mivel ez a két gén konstitutívan fejeződik ki, a karbon-derepresszált háttérrel rendelkező *creA^{d30}* mutánsban (Fekete és mtsai., 2012), míg a glükóz represszióról kimutatták, hogy növekedési ráta függő *A. nidulans*-ban, az alacsonyabb növekedési rátával egyre csökken (Ilyés és mtsai., 2004). Másrészt, az oxido-reduktív útvonalon sérült mutánsok – azaz az L-arabinitol dehidrogenáz vagy hexokináz – *bgaD/lacpA* génklaszterei továbbra is reagálnak a D-galaktóz jelenlétére, jelezve, hogy a katabolikus intermedierek képződéséért felelős enzimek nem játszanak szerepet az indukciós folyamatban. Egy fontos következtetést is meg kell jegyezni: a galaktitol nem alakítható vissza D-galaktózzá *in vivo* vagy "fiziológiai körülmények között", mivel a poliolnak nem volt indukáló hatása, még az *araA1* mutáns esetén sem, amely normálisan képes nőni D-galaktózon, de képtelen a galaktitolon történő növekedésre (de Vries és mtsai., 1994).

A Leloir-útvonal galaktokináz lépésében sérült mutáns esetén a *bgaD* és *lacpA* gének alapvetően hasonló expressziós mintázatot mutattak, mint a vad típusú törzs, jelezve, hogy a Leloir-útvonal szintén nélkülözhető a D-galaktózon történő indukcióhoz. Az indukció időprofiljában megfigyelhető mennyiségi különbségek valószínűleg a növekedési rátában történő eltérésekből adódik. Valóban, a galaktokináz (*galE9*) és az L-arabinitol dehidrogenáz (*araA1*) mutánsokról már korábban közölték, hogy jelentősen lassabban nőnek D-galaktózon, mint a vad típusú törzs (Fekete és mtsai., 2004). Ezen túlmenően a képesség, hogy D-galaktózon nő irrelevánsnak tűnik a *bgaD/lacpA* génklaszter indukciója szempontjából ugyanis önmagában is előfordul, ami az EFES3, a galaktokináz és hexokináz funkciókban hibás kettős mutáns alkalmazásával nyert bizonyítást (Fekete és mtsai., 2004). Ez az *A. nidulans* kettős mutáns nem képes növekedni D-galaktózon, de a glicerinen előnövesztett micéliumok, az egyedüli szénforrásként D-galaktózt tartalmazó táptalajon még mindig képesek *bgaD* és *lacpA* transzkriptumok létrehozására. Azonos eredményeket kaptunk abban az esetben is, ha a kettős mutáns növesztése vegyes szénforráson azaz D-galaktóz és glicerin mellett történt – a glicerin, egy semleges, azaz nem indukáló és nem represszáló növekedési szubsztrát – elkerülve ezáltal a szén-éheztetést (lásd 3. ábra). Összességében a kísérleteink egyértelműen azt mutatják, hogy a D-galaktóz katabolizmus – beleértve a kanonikus Leloir-útvonalat, vagy annak alternatív oxido-reduktív útvonalát – nem szükséges a *bgaD-lacpA* génklaszter indukciójához a D-galaktóz egyedüli szénforrás jelenlétében.

A D-galaktóz által történő indukciót *A. nidulans* gombában a galaktóz katabolizmus egy általános regulátora a GalX is eredményezheti (Roberts 1970; Christensen és mtsai., 2011). (NB. A galX gén megfelel a klasszikus *galA* lókusznak). GalX szerkezeti ortológja a Gal4p, amely a *Saccharomyces cerevisiae* galaktóz katabolikus útvonalának a cink klaszter aktivátora, illetve a *K. lactis* laktóz-galaktóz regulonja a Lac9p (Christensen és mtsai., 2011). Másrészt, *A. nidulans*-ban a laktóz által kiváltott indukcióról azt feltételezték, hogy egy szabályozó, a *lacA* génterméke által történik. A *lacA1* nem funkcionális mutáns képtelen a laktózon történő növekedésre, ugyanakkor ez a mutáns képes nőni D-galaktózon bizonyítva, hogy ennek a regulátornak nincs szerepe a D-galaktóz katabolizmusában. A laktóz befolyásolása nélkül képes nőni D-galaktózon (Roberts, 1963), a laktóz felvételi kapacitás lényegében teljesen hiányzik (Paszewski és mtsai., 1970). Az a tény, hogy a *lacA1* mutáció úgy tűnik, nem zavarja a D-galaktóz-felvételt (Fekete és mtsai., 2012) és az ONPG-hidrolitikus aktivitásának indukcióját (Paszewski és mtsai., 1970; Gajewski és mtsai., 1972), azt sugallja, hogy a *bgaD/lacpA* génklaszter D-galaktóz, valamint laktóz általi transzkripció indukciója különböző, független szabályozó rendszeren alapul, ellentétben a *K. lactis* élesztő laktóz asszimilációs rendszerével (Wray és mtsai., 1987).

A sajtgyártás bőséges melléktermékét, a laktóz tartalmú tejsavót már régóta használják növekedési szubsztrátként a fungális metabolitok, mint például a penicillin és különböző hidrolitikus enzimek termeléséhez (Roelfsema, 2010). A laktóz azonban több szempontból is, egy szokatlan, sőt egyedi diszacharid. Kizárólag az emlősök tejében fordul elő, amelyből a teljes száraz sejt tömeg 2-8%-át teszi ki.

A szaprofita és növénypatogén gombák, entomo (rovar)- és mikopatógének természetes élőhelyükön nem találkoznak a laktózzal, és így – a szükséges enzimek és transzporterek hiányában – vagy nem képesek hasznosítani, vagy ha igen, akkor csak lassú ütemben. Azonban az is igaz, hogy a talajszaprofita *A. nidulans* kivételesen nagy cukor transzportáló lehetőségekkel rendelkezik, hiszen genomja az elemzések szerint több mint 400 olyan kódoló gént tartalmaz, amely feltételezhetően MFS 12-transzmembrán-domén fehérjét kódol (Wortman és mtsai., 2009). A transzporter géntermékek lehetővé teszik ezen élettani szempontból szokatlan diszacharid felvételét, majd az ezt követő intracelluláris hidrolízist D-glükóz és D-galaktóz monomerekké, amelyek már természetes szénforrásai a legtöbb gombának. Ugyanis a laktóz lebontás folyamatában annak felvétele a sebesség meghatározó lépés *A. nidulans* esetében (Fekete és mtsai., 2012). Az *Aspergillus* fajok sokoldalúságát szépen illusztrálja a *lacpA* előfordulásának változatossága és a hét MFS fehérjék között lévő nagyfokú szerkezeti hasonlóság.

Ebben a munkában azt bizonyítottuk, hogy az *A. nidulans* két olyan permeázzal (*lacpA* és *lacpB*) rendelkezik, amelyek képesek transzportálni a laktózt ezt a „nem helyén való” szénforrást standard laboratóriumi körülmények között (azaz, a koncentráció legfeljebb 2%-áig). Nem zárható ki, hogy léteznek más permeázok, amelyek biokémiaiilag képesek a plazmamembránon keresztül történő laktóz transzportra. Azonban, ezen transzporterek kifejeződése nyilvánvalóan nem alkalmas a csírázás megindítására és/vagy arra, hogy lehetővé tegyék a tartós növekedést laktózon a *lacpA* és *lacpB* gének hiányában.

Általában, a konídiospóra csírázásának hatékonysága csökken a tápközeg ozmolalitásának növekedésével (ennek mennyiségi elemzését *A. niger*-ben: lásd Wucherpennig és mtsai., 2011). A laktóz a legkevésbé ozmotikusan aktív cukrok közé sorolható (Mustapha és mtsai., 1997). Ezen tény ellenére, azt találtuk, hogy a vad-típusú *A. nidulans* nem képes csírázni 5% (w/v) vagy a feletti laktóz koncentráció mellett. Ez igen figyelemreméltó, mivel más iparilag fontos *Aspergillus* fajok rutinszerűen nőnek olyan szubsztrátokon, amelyek több mint 10% szénhidrátot tartalmaznak (például Karaffa és mtsai., 2015).

Az egyszerűen permeáz hiányos mutánsok esetében a megmaradó laktóz felvétele azon alapszik, hogy míg a LacpB fehérjének a laktózon történő csírázás megindításában és az ezt követő korai növekedésben lehet vezető szerepe, addig a LacpA fehérjének sokkal inkább van egyfajta kiegészítő, rásegítő szerepe a laktóz transzportban. Azonban, csak mindkét *lacp* gén egyidejű hiánya eredményezi a laktózon történő növekedés teljes megszűnését. Ez ellentétben áll a *K. lactis* laktózt fermentáló élesztővel, amelynek csak egy fiziológiailag releváns laktóz transzportere fejeződik ki, a Lac12 (Riley és mtsai., 1987; Lodi és Donnini, 2005).

Abszolút különbség figyelhető meg a cellobiózra, valamint annak helyzeti izomerére a szoforózra adott eltérő válaszukban is, mivel azt találtuk, hogy a *lacpB* transzkriptum képződése magas szintű volt mindkét béta-kapcsolt glükopiranoz dimer által kifejtett indukció hatására, míg *lacpA* génexpresszió a fermentáció egy vizsgált időpillanatában sem volt detektálható.

A cellobióz és a laktóz szerkezetileg hasonló epimeráz, csak a nemredukáló monoszacharid egység C4-es pozíciójában különböznek és az eredményeink is arra hagynak következtetni, hogy ez a „nem helyén való” laktóz katabolizmus szorosan kapcsolódik a celluláz rendszerhez. Ezt a funkcionális kapcsolatot már korábban leírták a *T. reesei* fonalas gomba esetén, amelyek a laktóz az egyetlen olyan oldható szénforrás, amely képes indukálni a celluláz- és hemicelluláz enzimeket gazdaságilag megvalósítható ipari növekedési körülmények között (Bischof és mtsai., 2013). A *T. reesei* laktóz transzporter Crt1 (annotált fehérje azonosító Trire2: 3405) eszenciális fontosságú a laktózon történő növekedéshez és ennek hiánya megelőzi a laktóz-indukált celluláz gén expresszióját (Ivanova és mtsai., 2013; Zhang és mtsai., 2013; Cai és mtsai., 2015). *N. crassa*-ban a LacpB szerkezeti ortológját (lókusz NCU 00801) egy potenciális cellobióz transzporterként írták le (Gałązka és mtsai., 2010). Ezzel ellentétben az *A. niger* genom nem tartalmaz *lacpA* és *lacpB* gén ortológokat, és érdekes módon, a szoforóznak sincs indukáló hatása a celluláz génekre ebben a fajban (Gielkens és mtsai., 1999). Továbbá, ez az *Aspergillus* faj köztudottan kizárólag extracellulárisan képes hidrolizálni a laktózt a GH35 glikozid hidrolázok révén (Nevalainen 1981; O'Connell és Walsh, 2010).

A jelenlegi eredmények azt sugallják, hogy LacpB szerves része a cellulóz katabolizmusnak, míg LacpA főként az I. típusú pektinekhez tartozó arabinogalaktán – egy másik növényi sejtfal polimer – bontásában játszhat fontos szerepet. Az *A. nidulans* egy extracelluláris enzime az arabinogalaktán endo- β -1,4-glükánáz (EC 3.2.1.89) (lókusz azonosító AN5727) működése révén D-galaktózt és β -1,4-galaktobiózt generál (Michalak és mtsai., 2012 ; Otten és mtsai., 2013).

Feltételezzük, hogy a LacpA a β -1,4-galaktobióz egy permeáza, amely elősegíti annak β -1,4-galaktozidáz BgaD által történő intracelluláris hidrolízisét, továbbá részt vesz a laktóz transzportjában is, mint egy mellék aktivitásként, mivel ez a két diszacharid csupán a redukáló monoszacharid egységük C4-es pozíciójában különböznek.

Ez a hipotézis további alátámasztást nyer a Fekete és mtsai (2012) által közölt eredményekre hivatkozva, amely szerint a D-galaktóz - az endo- β -1,4-galaktanáz egyik monomerikus végterméke – egy potenciális induktora a *lacpA* és *bgaD* génklaszternek *A. nidulans* gombában. Továbbá bebizonyosodott, hogy két feltételezett extracelluláris GH35 β -1,4-galaktozidáz gén nem fejeződik ki ebben a gombában. Összefoglalva, a laktóz kettős felvételi rendszere, a talajlakó *A. nidulans*-ban, két fontos hidrolitikus rendszer egy váratlan kapcsolata, amely a növényi sejtfal bontásához szükséges, hogy azt növekedési szubsztráttá alakítva, hasznosíthatóvá tegye.

VII. ÖSSZEFOGLALÁS

A laktóz hidrolízise D-glükózt és D-galaktózt eredményez. Az aszkusszos fonalas gombákban a D-galaktóz lebontása a közismert Leloir útvonalán, illetve az alternatív oxido-reduktív útvonalon, amely hasonlít az L-arabinóz katabolizmusához. Fekete és mtsai. (2012) azonosítottak két egymással klasztereződő, divergensen átíródó gént, melyek egy intracelluláris β -galaktozidázt (*bgaD*) és egy laktóz permeázt (*lacpA*) kódolnak. Fonalas gombákban nem szokatlan, hogy a lebontó útvonalakat egy lebontási köztes, és nem maga a növekedési szubsztrát indukálja. Megvizsgáltuk ezért, hogy a *bgaD* és a *lacpA* gének D-galaktóz általi indukciója során a D-glaktóz lebontó anyagcseréje szükséges, vagy nélkülözhető.

A kétféle D-galaktóz lebontás közteseinek induktív képességét olyan hiánymutánsok révén vizsgáltuk, melyek a Leloir útvonal első (galaktóz-1-kináz) illetve az oxido-reduktív útvonal második (NAD-függő galaktitol dehidrogenáz) lépésében defektesek. A vizsgálatok során a két génről átíródó transzkriptumok megjelenését követtük nyomon. A *bgaD/lacpA* gén klaszter mindkét mutánsban kifejeződött D-galaktóz hatására, jelezve, a két enzim után lévő katabolikus intermedierek nem játszanak szerepet az indukcióban.

A D-galaktóz-galaktitol átalakulásában defektes mutáns törzs hiányát megkerülve a két gén indukálhatóságát galaktitolon teszteltük. A galaktitol nem volt képes indukálni a *bgaD/lacpA* kifejeződését, a növekedés aktuális szakaszától függetlenül.

Összeségében a kísérleteink azt bizonyították, hogy a D-galaktóz lebontás – akár a Leloir-, akár az oxido-reduktív útvonalon történik – nem szükséges a *bgaD/lacpA* génklaszter indukciójához D-galaktóz jelenlétében.

A. *nidulans* esetében a laktóz katabolizmus sebességmeghatározó lépése, a laktóz hidrolízise. A laktóz permeáz A gén hiánya csökkenti a laktózon történő növekedést, míg az említett gén overexpressziója gyorsabb laktóz hasznosítást eredményezett a vad típusú törzshöz képest. Egy második fiziológiailag releváns laktóz transzportert azonosítottunk, a *lacpB* gént. A *lacpB* hiánymutáns törzs glicerinen előnövesztett micéliuma laktóz tartalmú táptalajon, csupán minimális mennyiségű diszacharid felvételére képes a fermentáció első 60 órája alatt, míg a *lacpA/lacpB* kettős mutáns ugyanezen körülmények között képtelen új biomassza képzésére. A *lacp* gének átíródását a laktóz erősen indukálja, azonban a két gén indukciós profilja jelentősen eltér. A *lacpB* gén szintén erős expressziós választ mutat a cellobióz és a szoforóz glükopiranoz dimerek jelenlétében is, míg a cellulotikus rendszer ezen inducerei nem gyakorolnak expressziós hatást a *lacpA* génre. Másrésről, a D-galaktóz monoszacharid a *lacpA* gén esetében fejt ki erősebb indukciós választ, a *lacpB* génre gyakorolt hatása elenyésző. A *lacpA*-negatív háttérben a cellobióz erősebben indukálja a *lacpB* gént a vad típusú törzshöz képest, következésképpen a cellobióz felvétel és a biomasszaképződés gyorsabb volt a *lacpA* hiánymutáns esetén. Ellentétben a *lacpB* hiánymutáns törzsben, a növekedési ráta és a cellobióz felvétel jelentősen csökkent a vad típusúhoz képest, jelezve, hogy a cellulóz és a laktóz katabolizmus rendszere közös elemekre épül.

VIII. SUMMARY

During our work we analyze the expression of the *Aspergillus nidulans bgaD-lacpA* gene couple (encoding an intracellular beta-galactosidase and a lactose permease) in the presence of D-galactose. This monosaccharide can be catabolized via alternative, independent pathways in this model organism. The inductive capabilities of intermediates of the two alternative routes of D-galactose utilization were addressed in loss-of-function mutants defective in a defined step in one of the two pathways. In a galactokinase (*galE9*) mutant, the cluster is strongly induced by D-galactose, suggesting that formation of Leloir pathway intermediates is not required. The expression profiles of *bgaD* and *lacpA* were similar in wild type, L-arabinitol dehydrogenase (*araA1*) and hexose kinase (*hxA1*) negative backgrounds, indicating that intermediates of the oxido-reductive pathway downstream of galactitol are not necessary either. Furthermore, *bgaD-lacpA* transcription was not induced in any of the tested strains when galactitol was provided as the growth substrate. An *hxA1/galE9* double mutant cannot grow on D-galactose at all, but still produced *bgaD* and *lacpA* transcripts upon transfer onto D-galactose.

We therefore concluded that the physiological inducer of the *bgaD-lacpA* gene cluster in *A. nidulans* upon growth on D-galactose is the non-metabolized sugar itself.

In *Aspergillus nidulans*, uptake rather than hydrolysis is the rate-limiting step of lactose catabolism. Deletion of the lactose permease A (*lacpA*) gene reduces the growth rate on lactose while its overexpression enables faster growth than wild type strains are capable of. We have identified a second physiologically relevant lactose transporter, LacpB. Glycerol-grown mycelia from mutants deleted for *lacpB* appear to take up only minute amounts of lactose during the first 60 hours after a medium transfer, while mycelia of double *lacpA/lacpB* deletant strains are unable to produce new biomass from lactose. Although transcription of both *lacp* genes was strongly induced by lactose, their inducer profiles differ markedly. *lacpB* responded also strongly to beta-linked glucopyranose dimers cellobiose and sophorose, while these inducers of the cellulolytic system did not provoke any *lacpA* response. On the other hand, *lacpA* but not *lacpB* expression was high in D-galactose cultures. In a *lacpA*-negative background, *lacpB* was overinduced by cellobiose in comparison to wild type; consequently, cellobiose uptake was faster and biomass formation accelerated in *lacpA* deletants.

In contrast, in *lacpB* knockout strains, growth rate and cellobiose uptake were considerably reduced relative to wild type, indicating that the cellulose- and lactose catabolic systems employ common elements. Nevertheless, our permease mutants still grew on cellobiose which suggests that its uptake in *A. nidulans* prominently involves hitherto unknown transport systems.

IX. IRODALMI HIVATKOZÁSOK

1. Aghcheh RK, Kubicek CP (2015): Epigenetics as an emerging tool for improvement of fungal strains used in biotechnology. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99: 6167-6181.
2. Alam K, Kaminskyj SGW (2013): *Aspergillus* galactose metabolism is more complex than that of *Saccharomyces*: the story of GalD^{GAL7} and GalE^{GAL1}. *Botany*. 91: 467-477.
3. Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang, J, Zhang, Z, Miller W, Lipman DJ (1997): Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic. Acids. Res.* 25: 3389-3402.
4. Anisimova M, Gascuel O (2006): Approximate likelihood-ratio test for branches: A fast, accurate, and powerful alternative. *Syst. Biol.* 55: 539-552.
5. Arst Jr HN, Peñalva MA (2003): pH regulation in *Aspergillus* and parallels with higher eukaryotic regulatory systems. *Trends. Genet.* 19: 224-231.
6. Baruffini E, Goffrini P, Donnini C, Lodi T (2006): Galactose transport in *Kluyveromyces lactis*: Major role of the glucose permease Hgt1. *FEMS Yeast Res.* 6: 1235-1242.

7. Bates WK, Hedman SC, Woodward DO (1967): Comparative inductive responses of two β -galactosidases of *Neurospora*. *J. Bacteriol.* 93: 1631-1637.
8. 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.
9. Cai P, Wang B, Ji J, Jiang Y, Wan L, Tian C, Ma Y (2015): The putative cellodextrin transporter-like protein CLP1 is involved in cellulase induction in *Neurospora crassa*. *J. Biol. Chem.* 290: 788-796.
10. Campbell AK, Waud JP, Matthews SB (2005): The molecular basis of lactose intolerance. *Science. Progress.* 88: 157-202.
11. Cardinali G, Vollenbroich V, Jeon MS, de Graaf AA, Hollenberg CP (1997): Constitutive expression in *gal7* mutants of *Kluyveromyces lactis* is due to internal production of galactose as an inducer of the Gal/Lac regulon. *Mol. Cell. Biol.* 17: 1722-1730.

12. Cerqueira GC, Arnaud MB, Inglis DO, Skrzypek MS, Binkley G, Simison M, Miyasato SR, Binkley J, Orvis J, Shah P, Wymore F, Sherlock G, Wortman JR (2013): The *Aspergillus* Genome Database: multispecies curation and incorporation of RNA-Seq data to improve structural gene annotations. *Nucleic. Acids. Res.* 42: 705-710.
13. Christensen AD, Kádár Z, Oleskowicz-Popiel P, Thomsen MH (2011): Production of bioethanol from organic whey using *Kluyveromyces marxianus*. *J. Industrial. Microbi. Biotech.* 38: 283-289.
14. 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.
15. Clutterbuck AJ (1981): An arabinose non-utilizing mutant *araA1*. *Asp. Newslett.* 15: 21.
16. Clutterbuck AJ (1997): The validity of the *Aspergillus nidulans* linkage map. *Fung. Genet. Biol.* 21: 267-277.
17. Coghill RD, Moyer AJ (1947): Method for production of increased yields of penicillin. *US Patent 2,423,873*.

18. Criscuolo A, Gribaldo S (2010): BMGE (Block Mapping and Gathering with Entropy): a new software for selection of phylogenetic informative regions from multiple sequence alignments. *BMC Evol. Biol.* 10: 210.
19. De Vries RP, Flipphi MJA, Witteveen CFB, Visser J (1994): Characterization of an *Aspergillus nidulans* L-arabitol dehydrogenase mutant. *FEMS Microbiol. Letts.* 123: 83-90.
20. Diniz RHS, Silveira WB, Fietto LG, Passos FML (2012): The high fermentative metabolism of *Kluyveromyces marxianus* UFV-3 relies on the increased expression of key lactose metabolic enzymes. *Antonie van Leeuwenhoek Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* 10: 540-550.
21. El-Ganiny AM, Sanders DAR, Kaminskyj SGW (2008): *Aspergillus nidulans* UDP-galactopyranose mutase, encoded by *ugmA* plays key roles in colony growth, hyphal morphogenesis, and conidiation. *Fung. Genet. Biol.* 45: 1533-1542.
22. El-Ganiny AM, Sheoran I, Sanders DAR, Kaminskyj SGW (2010): *Aspergillus nidulans* UDP-glucose-4-epimerase UgeA has multiple roles in wall architecture, hyphal morphogenesis, and asexual development. *Fung. Genet. Biol.* 47: 629-635.

23. Elshafei AM, Abdel-Fatah OM (2001): Evidence for a nonphosphorylated route of galactose breakdown in cell-free extracts of *Aspergillus niger*. *Enzyme and Microbial Tech.* 29: 76-83.
24. Fantes PA, Roberts CF (1973): β -Galactosidase activity and lactose utilization in *Aspergillus nidulans*. *J. Gen. Microbiol.* 77: 471-486.
25. Fekete E, Karaffa L, Sándor E, Seiboth B, Biró S, Szentirmai A, Kubicek CP (2002): Regulation of formation of the intracellular β -galactosidase activity of *Aspergillus nidulans*. *Arch. Microbiol.* 179: 7-14.
26. Fekete E, Karaffa L, Sándor E, Bányai I, Seiboth B, Gyémánt Gy, Sepsi A, Szentirmai A, Kubicek CP (2004): The alternative D-galactose degrading pathway of *Aspergillus nidulans* proceeds via L-sorbose. *Arch. Microbiol.* 18: 35-44.
27. Fekete E, Padra J, Szentirmai A, Karaffa L (2008): Lactose and D-galactose catabolism into the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Acta Microbiol. et Immuno. Hungari.* 55: 119-124.

28. 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*. *Fung. Genet. Biol.* 49: 415-425.
29. 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-SGM* doi: 10.1099/mic.0.000267.
30. Felenbok B, Flipphi M, Nikolaev I (2001): Ethanol catabolism in *Aspergillus nidulans*: A model system for studying gene regulation. *Prog. Nucleic. Acid. Res. Mol. Biol.* 69: 149-204.
31. Flipphi M, Mathieu M, Cirpus I, Panozzo C, Felenbok B (2001): Regulation of the aldehyde dehydrogenase gene (*aldA*) and its role in the control of the coinducer level necessary for induction of the ethanol utilization pathway in *Aspergillus nidulans*. *J. Biol. Chem.* 276: 6950-6958.
32. Flipphi M, Van de Vondervoort PJI, Ruijter GJG, Visser J, Arst Jr HN, Felenbok B (2003): Onset of carbon catabolite repression in *Aspergillus nidulans*: Parallel involvement of hexokinase and glucokinase in sugar signalling. *J. Biol. Chem.* 278: 11849-11857.

33. Flippin M, Sun J, Robellet X, Karaffa L, Fekete E, Zeng AP, Kubicek CP (2009): Biodiversity and evolution of primary carbon metabolism in *Aspergillus nidulans* and other *Aspergillus* spp. *Fung. Genet. Biol.* 46: 19-44.
34. Gajewski W, Litwińska J, Paszewski A, Chojnacki T (1972): Isolation and characterization of lactose non-utilizing mutants in *Aspergillus nidulans*. *MGG* 116: 99-106.
35. Galazka JM, Tian C, Beeson WT, Martinez B, Glass NL, Cate JH (2010): Cellodextrin transport in yeast for improved biofuel production. *Science* 330: 84-86.
36. Gamauf C, Marchetti M, Kallio J, Vehmaanperä J, Allmaier G, Kubicek CP, Seiboth B (2007): Characterization of the *bga1*-encoded glycoside hydrolase family 35 β -galactosidase of *Hypocrea jecorina* with galacto- β -D-galactanase activity. *FEBS J.* 274: 1691-1700.
37. Gänzle MG, Haase G, Jelen P (2008): Lactose: Crystallization, hydrolysis and value-added derivatives. *Int. Dairy J.* 18: 685-694.
38. Gielkens MM, Dekkers E, Visser J, de Graaff LH (1999): Two cellobiohydrolase-encoding genes from *Aspergillus niger* require D-xylose and the xylanolytic transcriptional activator XlnR for their expression. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 4340-4345.

39. Gödecke A, Zachariae W, Arvanitidis A, Breunig KD (1991): Coregulation of the *Kluyveromyces lactis* lactose permease and β -galactosidase genes is achieved by interaction of multiple LAC9 binding sites in a 2.6 kbp divergent promoter. *Nucleic. Acids. Res.* 19: 5351-5358.
40. Gruben BS, Zhou M, De Vries RP (2012): GalX regulates the D-galactose oxido-reductive pathway in *Aspergillus niger*. *FEBS Letts.* 586: 3980-3985.
41. Gruber F, Visser J, Kubicek CP, de Graaff LH (1990): Cloning of the *Trichoderma reesei* *pyrG* gene and its use as a homologous marker for a high-frequency transformation system. *Curr. Genet.* 18: 447-451.
42. Guindon S, Dufayard JF, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W, Gascuel O (2010): New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst. Biol.* 59: 307-321.
43. Hasper AA, Visser J, De Graaff LH (2000): The *Aspergillus niger* transcriptional activator XlnR, which is involved in the degradation of the polysaccharides xylan and cellulose, also regulates D-xylose reductase gene expression. *Mol. Microbiol.* 36: 193-200.

44. Ilyés H, Fekete E, Karaffa L, Fekete É, Sándor E, Szentirmai A, Kubicek CP (2004): CreA-mediated carbon catabolite repression of β -galactosidase formation in *Aspergillus nidulans* is growth rate dependent. *FEMS Microbiol. Letts.* 235: 147-151.
45. Ishikawa E, Sakai T, Ikemura H, Matsumoto H, Abe H (2005): Identification, cloning, and characterization of a *Sporobolomyces singularis* β -galactosidase-like enzyme involved in galacto-oligosaccharide production. *J. Biosci. Bioeng.* 99: 331-339.
46. 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* 8:62631
47. Jónás Á, Fekete E, Flippi M, Sándor E, Jäger Sz, Molnár ÁP, Szentirmai A, Karaffa L (2014): Extra- and intracellular lactose catabolism in *Penicillium chrysogenum*: phylogenetic and expression analysis of the putative permease and hydrolase genes. *J. Antibiotics* 67: 489-497.
48. Karaffa L, Coulier L, Fekete E, Overkamp KM, Druzhinina IS, Mikus M, Seiboth B, Novák L, Punt PJ, Kubicek CP (2013): The intracellular galactoglycome in *Trichoderma reesei* during growth on lactose. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97: 5447-5456.

49. Karaffa L, Diaz R, Papp B, Fekete E, Sándor E, Kubicek CP (2015): A deficiency of manganese ions in the presence of high sugar concentrations is the critical parameter for achieving high yields of itaconic acid by *Aspergillus terreus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99: 7937-7944.
50. Katoh K, Toh H (2010): Parallelization of the MAFFT multiple sequence alignment program. *Bioinformatics* 26: 1899-1900.
51. Kumari S, Panesar PS, Panesar R (2011): Production of β -galactosidase using novel yeast isolate from whey. *Int. J. Dairy Sci.* 6: 150-157.
52. Lester G, Byers A (1965): Properties of two β -galactosidases of *Neurospora crassa*. *Biochem. and Biophys. res. com.* 18: 5-6.
53. Lodi T, Donnini C (2005): Lactose-induced cell death of β -galactosidase mutants in *Kluyveromyces lactis*. *FEMS Yeast Res.* 5: 727-734.
54. Marwaha SS, Kennedy JF (1988): Review: whey pollution problem and potential utilization. *Int. J. Food Sci. Technol.* 23: 323-336.

55. Michalak M, Thomassen LV, Roytio H, Ouwehand AC, Meyer AS, Mikkelsen JD (2012): Expression and characterization of an endo-1,4- β -galactanase from *Emericella nidulans* in *Pichia pastoris* for enzymatic design of potentially prebiotic oligosaccharides from potato galactans. *Enzyme. Microb. Technol.* 50: 121-129.
56. Mojzita D, Koivistoinen OM, Maaheimo H, Penttilä M, Ruohonen L, Richard P (2012): Identification of the galactitol dehydrogenase, LadB, that is part of the oxido-reductive D-galactose catabolic pathway in *Aspergillus niger*. *Fungal. Genet. Biol.* 49:152-159.
57. Mustapha A, Jiang T, Savaiano DA (1997): Improvement of Lactose Digestion by Humans Following Ingestion of Unfermented Acidophilus Milk: Influence of Bile Sensitivity, Lactose Transport, and Acid Tolerance of *Lactobacillus acidophilus*. *J. Dairy Sci.* 80: 1537-1545.
58. Nayak T, Szewczyk E, Oakley CE, Osmani A, Ukil L, Murray SL, Hynes MJ, Osmani SA, Oakley BR (2006): A versatile and efficient gene-targeting system for *Aspergillus nidulans*. *Genetics* 172: 1557-1566.

59. Nevalainen KMH (1981): Induction, isolation, and characterization of *Aspergillus niger* mutant strains producing elevated levels of β -galactosidase. *Appl. Environ. Microbiol.* 41: 593-596.
60. Novelli G, Reichardt JK (2000): Molecular basis of disorders of human galactose metabolism: past, present, and future. *Molecular Genetics and Metabolism* 71: 62-65.
61. O'Connell S, Walsh G (2010): A novel acid-stable, acid-active β -galactosidase potentially suited to the alleviation of lactose intolerance. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 86: 517-524.
62. Otten H, Michalak M, Mikkelsen JD, Larsen S (2013): The binding of zinc ions to *Emericella nidulans* endo- β -1,4-galactanase is essential for crystal formation. *Acta. Crystallogr. Sect. F. Struct. Biol. Cryst. Commun.* 69: 850-854.
63. Panesar PS, Panesar R, Singh RS, Kennedy JF, Kumar H (2006): Microbial production, immobilization and applications of β -D-galactosidase. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 81: 530-543.
64. Panesar PS, Kennedy JF (2012): Biotechnological approaches for the value addition of whey. *Crit. Rev. Biotechnol.* 32: 327-348.

65. Paszewski A, Chojnacki T, Litwinska J, Gajewski W (1970): Regulation of lactose utilization in *Aspergillus nidulans*. *Acta Biochim. Pol.* 17: 385-391.
66. Peterson GL (1983): Determination of total protein. *Methods. Enzymol.* 91: 86-105.
67. Rigamonte TA, Silveira WB, Fietto LG, Castro IM, Breunig KD, Passos FML (2011): Restricted sugar uptake by sugar-induced internalization of the yeast lactose/galactose permease Lac12. *FEMS Yeast Res.* 11: 243-251.
68. Riley MI, Sreekrishna K, Bhairi S, Dickson RC (1987): Isolation and characterization of mutants of *Kluyveromyces lactis* defective in lactose transport. *Mol. Gen. Genet.* 208: 145-151.
69. Roberts CF (1963): The genetic analysis of carbohydrate utilization in *Aspergillus nidulans*. *J. Gen. Microbiol.* 31: 45-58.
70. Roberts CF (1970): Enzyme lesions in galactose non-utilising mutants of *Aspergillus nidulans*. *BBA - General Subjects* 201: 267-283.
71. Roelfsema WA, Kuster FM, Pluim H (1990): Lactose and derivatives. In: Elvers, B., Hawkins, S., Schulz, G. (eds): *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, 4th ed. VCH Weinheim FRG, 107-114

72. Roelfsema WA, Kuster BFM, Heslinga MC, Pluim H & Verhage M (2010): Lactose and Derivatives. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, 7th ed. (Wiley & Sons, New York, NY).
73. Sambrook J, Russell DW (2001): Molecular Cloning: a Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory, New York*.
74. Samson RA, Visagie CM, Houbraken J, Hong SB, Hubka V, Klaassen CH, Perrone G, Seifert KA, Susca A, Tanney JB, Varga J, Kocsubé S, Szigeti G, Yaguchi T, Frisvad JC (2014) *Stud. Mycol.* 78: 141-173.
75. Seiboth B, Hofmann G, Kubicek CP (2002a): Lactose metabolism and cellulase production in *Hypocrea jecorina*: the gal7 gene, encoding galactose-1-phosphate uridylyltransferase, is essential for growth on galactose but not for cellulase induction. *Mol. Gene. and Geno.* 267: 124-132.
76. Seiboth B, Karaffa L, Sandor E, Kubicek CP (2002b): The *Hypocrea jecorina* gal10 (uridine 50-diphosphate-glucose 4-epimerase- encoding) gene differs from yeast homologues in structure, genomic organization and expression. *Gene.* 295: 143-149.

77. Seiboth B, Hartl L, Pail M, Fekete E, Karaffa L, Kubicek CP (2004): The galactokinase of *Hypocrea jecorina* is essential for cellulase induction by lactose but dispensable for growth on D-galactose. *Mol. Microbiol.* 51: 1015-1025.
78. Seiboth B, Pakdaman BS, Hartl L, Kubicek CP (2007): Lactose metabolism in filamentous fungi: how to deal with an unknown substrate. *Fung. Biol. Rev.* 21: 42-48.
79. Silva MF, Fornari RCG, Mazutti MA, de Oliveira D, Padilha FF, Cichoski AJ, Cansian RL, Di Luccio M, Treichel H (2009): Production and characterization of xanthan gum by *Xanthomonas campestris* using cheese whey as sole carbon source. *J. Food Eng.* 90: 119-123.
80. Sternberg D, Mandels GR (1980): Regulation of the cellulolytic system in *Trichoderma reesei* by sophorose: induction of cellulase and repression of β -glucosidase. *J. Bacteriol.* 144: 1197-1199.
81. Tilburn J, Scazzocchio C, Taylor GG, Zabicky-Zissman JH, Lockington RA, Davies RW (1983): Transformation by integration in *Aspergillus nidulans*. *Gene* 26: 205-221.

82. Wortman JR, Gilsenan JM, Joardar V, Deegan J, Clutterbuck J, Andersen MR, Archer D, Bencina M, Braus G, Coutinho P, von Döhren H, Doonan J, Driessen AJ, Durek P, Espeso E, Fekete E, Flipphi M, Estrada CG, Geysens S, Goldman G, de Groot PW, Hansen K, Harris SD, Heinekamp T, Helmstaedt K, Henrissat B, Hofmann G, Homan T, Horio T, Horiuchi H, James S, Jones M, Karaffa L, Karányi Z, Kato M, Keller N, Kelly DE, Kiel JA, Kim JM, van der Klei IJ, Klis FM, Kovalchuk A, Krasevec N, Kubicek CP, Liu B, Maccabe A, Meyer V, Mirabito P, Miskei M, Mos M, Mullins J, Nelson DR, Nielsen J, Oakley BR, Osmani SA, Pakula T, Paszewski A, Paulsen I, Pilsyk S, Pócsi I, Punt PJ, Ram AF, Ren Q, Robellet X, Robson G, Seiboth B, van Solingen P, Specht T, Sun J, Taheri-Talesh N, Takeshita N, Ussery D, van Kuyk PA, Visser H, van de Vondervoort PJ, de Vries RP, Walton J, Xiang X, Xiong Y, Zeng AP, Brandt BW, Cornell MJ, van den Hondel CA, Visser J, Oliver SG, Turner G (2009): The 2008 update of the *Aspergillus nidulans* genome annotation: a community effort. *Fungal. Genet. Biol.* 46: 2-13.
83. Wray LV Jr, Witte MM, Dickson RC, Riley MI (1987): Characterization of a positive regulatory gene, LAC9, that controls induction of the lactose-galactose regulon of *Kluyveromyces lactis*: structural and functional relationships to GAL4 of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 7: 1111-1121.

84. Wucherpennig T, Hestler T, Krull R (2011): Morphology engineering-osmolality and its effect on *Aspergillus niger* morphology and productivity. *Microb. Cell Fact.* 10: 58.
85. Yu JH, Hamari Z, Han KH, Seo JA, Reyes-Domínguez Y, Scazzocchio C (2004): Double-joint PCR: a PCR-based molecular tool for gene manipulations in filamentous fungi. *Fungal. Genet. Biol.* 41: 973-981.
86. Zhang W, Kou Y, Xu J, Cao Y, Zhao G, Shao J, Wang H, Wang Z, Bao X, Chen G, Liu W (2013): Two major facilitator superfamily sugar transporters from *Trichoderma reesei* and their roles in induction of cellulase biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 288: 32861-32872.
87. Znameroski EA, Coradetti ST, Roche CM, Tsai JC, Iavarone AT, Cate JHD, Glass NL (2012): Induction of lignocellulose-degrading enzymes in *Neurospora crassa* by cellodextrins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109: 6012-6017.

X. TUDOMÁNYOS TEVÉKENYSÉG

Referált, angol nyelvű közlemények:

- 1) **Orosz A**, Fekete E, Flippi M, Karaffa L (2014): Metabolism of D-galactose is dispensable for the induction of the beta-galactosidase- (*bgaD*) and lactose permease (*lacpA*) genes in *Aspergillus nidulans*. *FEMS Microbiology Letters*, 359: 19–25

Impakt faktor: 2,121

- 2) Fekete E, Karaffa L, Karimi Aghcheh R, Németh Z, Fekete É, **Orosz A**, Paholcsek M, Stágel A, Kubicek CP (2014): The transcriptome of *lae1* mutants of *Trichoderma reesei* cultivated at constant growth rates reveals new targets of LAE1 function. *BMC Genomics*, 15: Art. No. 447.

Impakt faktor: 3,986

- 3) Fekete E, **Orosz A**, Kulcsár L, Kavalecz N, Flippi M, Karaffa L (2016): Characterization of a second physiologically relevant lactose permease gene (*lacpB*) in *Aspergillus nidulans*. *Microbiology-SGM* doi: 10.1099/mic.0.000267.

Impakt faktor: 2,557

Idegen nyelvű posztterek:

- 1) **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 [CEFORM], Keszthely, 2013).
- 2) **Orosz A.**, Bodnár G., Ondecs Á., Nielsen J.B., Karaffa L., Mortensen U.H., Fekete E.: The ultimate test: does NADPH-availability indeed control the oxido-reductive pathway of D-galactose catabolism in *Aspergillus nidulans*? (4th Central European Forum for Microbiology [CEFORM], Keszthely, 2013).
- 3) Jónás Á., **Orosz A.**, Bíró E., Fekete E., Karaffa L.: Carbon source profiling the expression of the Leloir-pathway genes in *Penicillium chrysogenum* (4th Central European Forum for Microbiology [CEFORM], Keszthely, 2013).
- 4) **Orosz A.**, Ondecs Á., 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).

Konferencia előadás:

- 1) **Orosz A:** A *bgaD* gén kifejeződésének vizsgálata *Aspergillus nidulans* fonalas gombában (Fiatal Biotechnológusok Országos Konferenciája, Szeged, 2014).

XI. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretném köszönetemet kifejezni **Dr. Karaffa Levente** egyetemi docensnek, hogy lehetőséget kaptam az általa vezetett Biomérnöki Tanszék munkájába bekapcsolódni. A szakmai tudása és a tudomány iránti elhivatottsága példaértékű számomra. Köszönettel tartozom a publikációk elkészítésében nyújtott fáradhatatlan segítségéért, a mindig biztató, lelkesítő szavaiért. A munkacsoporttal eltöltött idő egy életre szóló szakmai alapot nyújtott számomra.

Hálás köszönettel tartozom témavezetőmnek **Dr. Fekete Erzsébet** egyetemi docensnek, hogy fáradságot nem kímélve mindig szívesen nyújtott segítséget. Útmutatása, kitartó tanítása által elsajátíthattam a molekuláris biológia rejtelseit, ami elengedhetetlen alapot biztosít számomra az iparban is. Még egyszer köszönöm a sok-sok segítséget!

Továbbá köszönettel tartozom **Németh Zoltán** tanársegédnek, a közösen végzett kísérletekért, a mindig jó hangulatban végzett munkáért és a lelkesítő, előremutató szakmai beszélgetésekért.

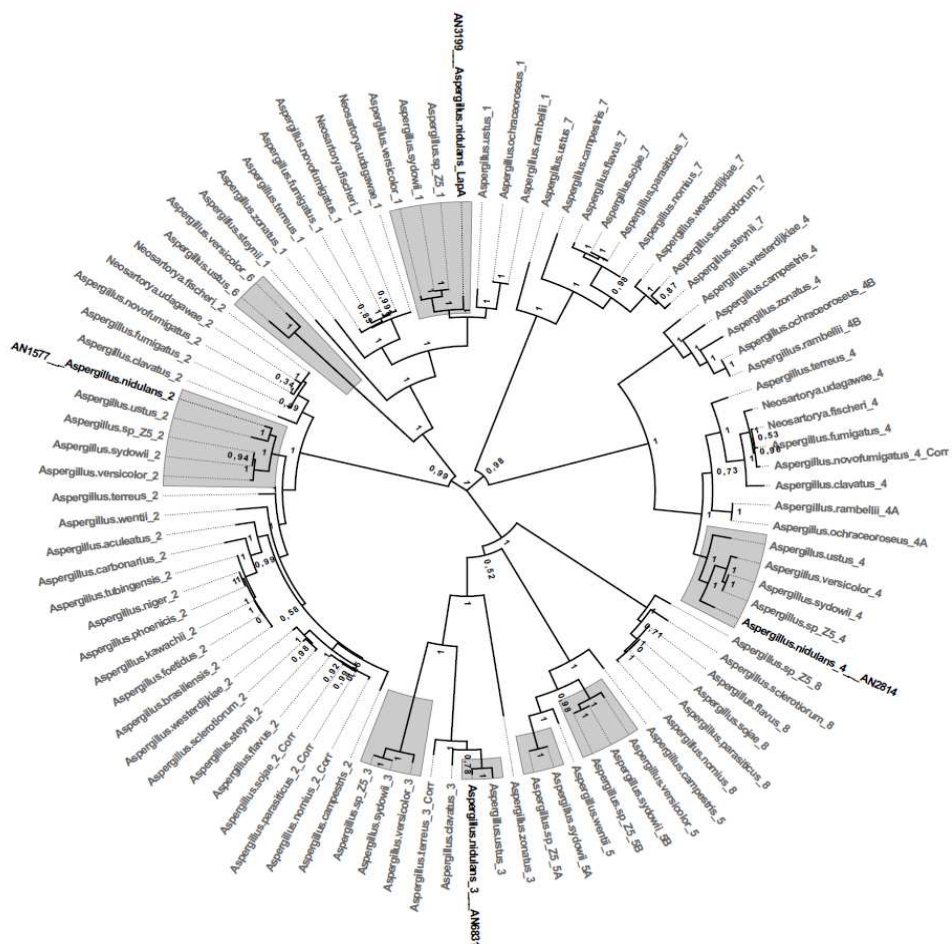
Szeretném megköszönni **Michel Phlippi** bioinformatikai analízisekhez nyújtott segítségét, valamint a törzsfák elkészítését.

Köszönetemet szeretném kifejezni doktorandusz társaimnak **Dr. Vasasné Jónás Ágota, Ág Norbert, Kulcsár László és Papp Benedek** segítségét, hogy hozzájárultak a kísérletek kiviteléhez.

A Biomérnöki Tanszék minden munkatársának szeretném megköszönni a sok-sok segítséget, támogatást.

Végül, de nem utolsó sorban szeretnék köszönetet mondani férjemnek, **Kovács Zoltánnak**, hogy mindig támogatott, lelkesítő szavaiból mindig erőt meríthettem a legnehezebb pillanatokban is. Hálás vagyok szüleimnek minden támogatásukért, hiszen nélkülük mindez nem sikerült volna.

XII. FÜGGELÉK



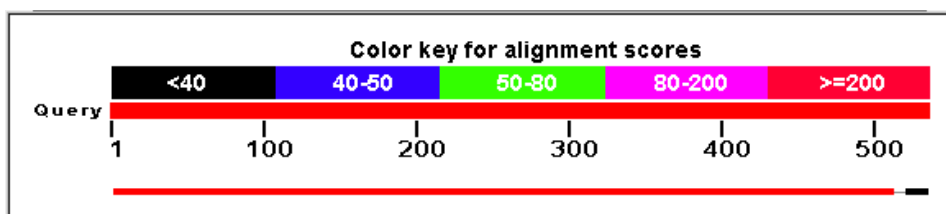
F1 ábra: A gyökértelen „maximum likelihood” fa mutatja a szerkezeti összefüggéseket a 92 LacpA fehérje ortológjai és paralógjai között 31 rendelkezésre álló *Aspergillus* fajban.

```

>gi|256674242|gb|ACV04919.1| lactose permease [Aspergillus
nidulans]
MADEKTVQPSAEQEA VGEAE EVRVAHDALNAKYSPLTWSMFRLYLCLIIPYLCGTLNGY
DGSLMGGLNAMETYLDFFNMETSGSSTGIVFALYNIGSIPAVFFTGPVNDYWGRRCGMF
VGALIIVIGTCIQSPSVNRGMFLAGRFILGFGVSFCCVSAPCYVSEMAHPAWRGITGL
YNCTWYIGSILASWVVYGCSQLDNANSFRIPIWCQLISSALVVLGVWFIPESPRWLMAQ
DRAEDAAKILTRYHGENDPDHPLVHLQLKEMQQSIATDASDKKWWDYRELYTGHSARRR
LICVLGMACFGQISGNSVTSYYLPVMLENAGIVSESRLKFNGIYPPLSLIGAVVGARM
TDTIGRRPLLIYSLLFCSVAFAIITGTSKLATDDPTNTAAANTTIAFIYLFGIVFSFGW
TPLQSMYIAETLTTTTRAKGTAVGNLASSIASTIIQYSSGPAFKDIQYYFYLVFVFWDL
IEIVIMYFYFPETKDRTLEELVEEVFSAPNPVKRSLVKRDAATVLNTMQVEQRELVSKEA
QV
>gi|67522240|ref|XP_659181.1| hypothetical protein AN1577.2
[Aspergillus nidulans FGSC A4]
MERTYGFETTISRDA DKGVS VNNAALHMATLRVKPRLLTKRMLKLYWCIGVAMLNSC
INGYNGSLMGSINSYRQYREYFGFDLEEGTSTTGIVYAIYTI GNIVGSFFAGPFTDFRG
RRMGMAIGALWIIAGTIVQATCHNLGGFMAGRFLLGFGVATSATAGPAYVSEMAHPAYR
GAMTGLYNVLWFGGGIPGT FIPWRTSTIDGTQSWRIPVWLQMVFSGLVLLLCFTIPESP
RWLISCDRHEAAIRVLA EYHGEGRNSPLVQLEYREMLEDISNVGADKRWWDYRELFDS
RETRYRSM LVFMGTSPNPSLQTYTEE VNIVQFTGAIFGALITDRVGRRPQLLVSTSII
VFLFVIITALNATNVQVAGDGGGVVAKSSVTARAQIAMIFIFGFVYSAGWTPNQAMY PV
ECLRYESRAKGMGMNFFINIASFYNTFVTGIAFTRIGWKYYFLFIFWCTFEVLIIYFL
FVETSKRTLEELTVIFQQKRPVQASLDKEEIFVSGDEIVEVRSCSITFSPSFLVGRIPE
SWSANA

```

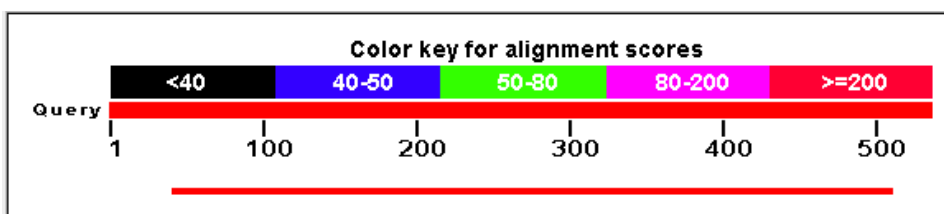
A LacpA fehérje és az AN1577 protein szekencia közötti szerkezeti hasonlóság bizonyítéka a Protein BLAST analízis eredménye: 98% lefedettség „coverage” és 41% azonosság „identity”.



```
>gi|256674242|gb|ACV04919.1| lactose permease [Aspergillus
nidulans]
MADEKTVQPSAEQEAVGEAEVVRVAHDALNAKYSPLTWSMFRLYLCLIIPYLCGTLNGY
DGSLMGGLNAMETYLDFFNMETSGSSTGIVFALYNIGSIPAVFFTGPVNDYWGRRCGMF
VGALIIVIGTCIQSPSVNRGMFLAGRFILGFGVSFCCVSAPCYVSEMAHPAWRGITITGL
YNCTWYIGSILASWVVYGCSQLDNANSFRIPIWCQLISSALVVLGVWFIPESPRWLMAQ
DRAEDAAKILTRYHGENDPDHPLVHLQLKEMQQSIATDASDKKWWDYRELYTGHSARRR
LICVLGMACFGQISGNSVTSYYLPVMLENAGIVSESRLKFNGIYPPLSLIGAVVGARM
TDTIGRRPLLIYSLLFCSVAFIITGTSKLATDDPTNTAAANTTIAFIYLFGIVFSFGW
TPLQSMYIAETLTTTTRAKGTAVGNLASSIASTIIQYSSGPAFKDIQYYFYLVFVFDL
IEIVIMYFYFPETKDRTLEELVEEVFSAPNPVKRSLVKRDAATVLNTMQVEQRELVSKEA
QV
```

```
>gi|67541322|ref|XP_664435.1| hypothetical protein AN6831.2
[Aspergillus nidulans FGSC A4]
MKGEKKAEGVAAPASEQVENTTVHTVTGSEAFNQALIQEKPHLLSPTNLLLCACLMVG
FCCQTMNGYDGSLSFGLLANTIFLDHFNGRDAGIWAGLVSAAMYQIGGVSAALPFVGPAD
TWGRRFGMFLGSFMIVLGAVVSGTTIANASVGQFMGGRFLLGFGVSIAAAAGPIYVET
THPAWRGMVTGYCNTFWFIGSILASGAVRGSITLDNNQSWLIPLWLQLVFSGIIICTCW
MIPESPRWLYVHGKQEKAVEVLTKWHGLGNRDSLWVKLQISEYDAHLNMDGSDKKFWDY
RSLFNRRSSIYRLCCNCFFAIFAQWAGNGVLTYYLVPALRGAGFTSDVTQANINLGYAC
FQFFWALVGAADFVDSLGRPMMLLGMAGCCVWIAILSASSQVNNSDGTLNSAASNATL
GFIFIFGAASFFFITPLQALYPVEVLSYEMRAKGMAFSSSLAVNAAGLLNQFAWPVSLDN
IGWKTYIVFVWDIAIQTVIMYFFFETKDRTLEELDQIFEARNPVKASTRKTAIAVDAE
NNVKF
```

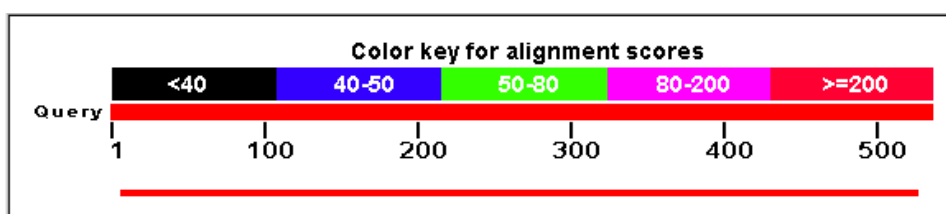
A LacpA fehérje és az AN6831 protein szekencia közötti szerkezeti hasonlóság bizonyítéka a Protein BLAST analízis eredménye: 87% lefedettség „coverage” és 45% azonosság „identity”.



```
>gi|256674242|gb|ACV04919.1| lactose permease [Aspergillus
nidulans]
MADEKTVQPSAEQEAVGEAEVVRVAHDALNAKYSPLTWSMFRLYLCLIIPYLCGTLNGY
DGSLMGGLNAMETYLDFFNMETSGSSTGIVFALYNIGSIPAVFFTGPVNDYWGRRCGMF
VGALIIIVIGTCIQSPSVNRGMFLAGRFILGFGVSFCCVSAPCYVSEMAHPAWRGITITGL
YNCTWYIGSILASWVVYGCQLDNANSFRIPIWCQLISSALVVLGVWFIPESPRWLMAQ
DRAEDAAKILTRYHGENDPDHPLVHLQLKEMQQSIATDASDKKWWDYRELYTGHSARRR
LICVLGMACFGQISGNSVTSYYLPVMLENAGIVSESRLLFNGIYPPLSLIGAVVGARM
TDTIGRRPLLIYSLLFCSVAFAIITGTSKLATDDPTNTAAANTTIAFIYLFGIVFSFGW
TPLQSMYIAETLTITTTAKGTAVGNLASSIASTIIQYSSGPAFKDIQYYFYLVFVFWDL
IEIVIMYFYFPETKDRTLEELEEVSAPNPVKRSLVKRDAATVLNTMQVEQRELVSKEA
QV
```

```
>gi|67524713|ref|XP_660418.1| hypothetical protein AN2814.2
[Aspergillus nidulans FGSC A4]
MGEINEEKHDISVTEGAKVATMHGMTAEKPGATTKS VFNAELFAAINETKIERWSKTSTI
HLYCAVCIFVSFCCACANGYDGSLMGAVFAMDHYQATFNTGMTGQKVS VVTSLYTVGSM
VATPFSAVISDNFGRRKCMFVGGWVIIIGSIVIATASTLAHFIVGRFILGFGIQIMVVS
APAYAAEISPPHWRGRAVGLYNCGWFGGSIPAACVTYGCNYIDSNWSWRVPFLLQCFAS
VIVIIISVWFIPESPRWLI AHGKEEEAIAILAKYHGNGDPNARLVRLEADEMREGIRQDG
IDKRWWDYRPFLLSHNGRWRFAQVIMISIFGQWSGNLGYFNPAIYEALGYTSSSMQLL
LNLVNSIVGAIGALTAVYYCDRMPRRTVLVWGTLGCAICMAVNAGVSQPLIPQRNAGET
LDPTFGRTALAFYYLFQVVSFTYTPLQGVVPAEALETTTRAKGLALSGFLVSGTSFIS
QYASPIALGNISTNYFWIFVGWDVVETACWYLFGVEAQGRTLEELEYIYNQYPVKASK
KRDRVVVQQDGHVTEKISADEA
```

A LacpA fehérje és az AN2814 protein szekencia közötti szerkezeti hasonlóság bizonyítéka a Protein BLAST analízis eredménye: 96% lefedettség „coverage” és 40% azonosság „identity”.



F2. ábra: A három szerkezetileg rokon AN1577, AN6831 és AN2814 *A. nidulans* MFS fehérje szekvenciák Protein BLAST analízis eredményei.