



Szent István Egyetem
Gödöllő

Az Fphog1 HOG típusú MAP kináz új funkciói Fusarium proliferatumban

Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

Kohut Gábor

Gödöllő
2009

A doktori iskola neve: Biológiai Doktori Iskola

Tudományága: Biológia

Vezetője:

Dr. Tuba Zoltán

tanszékvezető egyetemi tanár

Szent István Egyetem, Mezőgazdasági- és Környezettudományi
Kar, Növénytani és Növényélettani Tanszék

Témavezetők:

Dr. Ádám Attila

tudományos főmunkatárs

SZIE-MTA Mikológiai Kutatócsoport

és

Prof. Hornok László

az MTA rendes tagja,

csoportvezető

SZIE-MTA Mikológiai Kutatócsoport

.....
Dr. Tuba Zoltán

a doktori iskola vezetője

.....
Dr. Ádám Attila

témavezető

.....
Prof. Hornok László

témavezető

Bevezetés

A sejt szintű élő rendszereknek, mint minden élő rendszernek, anyagcsere-folyamataik, életfolyamataik zavartalan működtetéséhez elengedhetetlen, hogy a környezetükkel kölcsönhatásban és egyensúlyban legyenek. Ehhez a legfontosabb, hogy az őket körülvevő, állandóan változó világgal folyamatos kommunikációt folytassanak: ingereket, jeleket felfogjanak, értelmezzenek, majd kialakítsák azt a választ, amelynek segítségével a változó környezethez alkalmazkodni tudnak.

Molekuláris szinten többlépcsős mechanizmusok játszódnak le a jel érzékelésétől az adaptációs folyamatok megindulásáig. Biotikus ingerek estében a jelmolekula, abiotikus ingerek esetében a fizikai/kémiai hatás felfogásában/érezékelésében specifikus receptorok játszanak szerepet. A receptorokról a jel továbbítódik, amit jelátvitelnek vagy szignál transzdukciónak nevezünk. A jelátviteli mechanizmusok döntő többségében a szerin/treonin kinázoké a szerep, közöttük kiemelkedő jelentőséggel bírnak a MAP kinázok (*mitogene activated protein kinase*). A MAP kinázok működésüket tekintve eléggé univerzális feladatokat látnak el, szerepük olyan változatos folyamatokban mutathatók ki, mint például az élesztőben a sejtfalintegritás szabályozása (Herskowitz, 1995), auxin szignálása növényi sejtekben (Mizoguchi et al., 1994), hiperszenzitív reakció során a programozott sejthalál szignálása (Ádám et al., 1996), vagy éppen a *Caenorhabditis elegans* vulva-diferenciálódás irányítása (Eisenmann és Kim, 1994).

A körülbelül 35-50 kDa molekulatömegű MAP kinázok minden élőlényben transzkripcionálisan és/vagy foszforiláció-defoszforiláció által poszttranszlációs modifikáció útján szabályozottak. A MAP kinázok minden szervezetben egy konzervált, három lépcsős foszforilációs kaszkádon keresztül aktiválódnak. A receptorok által közvetített jel legelőször a MAP kináz kináz kinázt (MAPKKK) aktiválja. A MAPKKK ezután foszforilálja a MAP kináz kinázt (MAPKK) az [ST] X₃₋₅ [ST] motívumon, majd újabb foszforilációs lépésben ez aktiválja a MAP kinázt (MAPK). A specifikus foszforiláció előfeltétele a MAPKK specifikus kapcsolódása a MAP kinázhoz, mely folyamatban a MAPK kinázok N-terminális régiójában lokalizált kináz interakciós motívum vesz részt (Jin et al., 2003). A MAP kinázok poszttranszlációs regulációjában a 11 konzervált szubdomén közül a VIII. doménban található kettős foszforilációs motívum (TXY) játszik döntő szerepet. A treonin (T) és a tirozin (Y) foszforiláltsága nemcsak a MAP kináz foszforilációs aktivitásának, hanem a transzkripció faktorok dokkoló motívumával való kölcsönhatásának is előfeltétele (Lee et al., 2004). A MAP kinázok megfelelő működéséhez a specifikus deaktiváció is hozzá tartozik, amihez a

MAP kinázok N-terminális részén szükséges egy kináz interakciós motívum jelenléte, melyhez a foszfatázok kapcsolódnak (Zuniga et al., 1999). A MAP kinázok különböző regulációs szinteken és különböző regulációs mechanizmuson keresztül fejtik ki szabályozó hatásukat. Biokémiai szempontból három regulációs szintet különíthetünk el: transzkripcionális, translációs és poszttranszlációs szintet. Az eddig publikált szakirodalmi adatok alapján a szabályozás módja szerint megkülönböztetünk foszforiláció általi szabályozást, DNS – fehérje és fehérje – fehérje interakció általi regulációt.

Fonalas gomba MAP kinázok három alcsoportba sorolhatók (Kültz, 1998): a YERK1, a YERK2 (yeast and fungal extracellular regulated protein kinase) és az YSAPK (yeast and fungal stress activated protein kinase). Mind a YERK1, mind a YERK2 alapvető szerepet tölt be a gombák ivaros szaporodásában, valamint kiemelkedő fontossággal bír a patogenitáshoz szükséges struktúrák kialakításában.

Tágabb értelemben a YERK1 és a YERK2 alcsoport tagjai a növény/gomba/állat ERK (extracellular regulated kinases) csoporthoz tartoznak. Az YSAPK alcsoport erős hasonlóságot mutat a gomba/állat SAPK (stress activated protein kinase) csoporttal (Kültz, 1998), és a különböző abiotikus stresszekre adott válasz szignálátvitelében tölt be szerepet. A *Saccharomyces cerevisiae* HOG1 (high osmolarity glycerol) névre keresztelt YSAPK típusú MAP kináza (Brewster et al., 1993) alapján ezt az alcsoportot "HOG típusú MAP kinázok" névvel illetjük a továbbiakban, mert ez a megnevezés a szakirodalomban jóval elterjedtebb.

Dolgozatunkban a *Fusarium proliferatum* HOG típusú MAP kinázának funkcionális vizsgálatával foglalkoztunk. A *Fusarium* fajok az egész világon elterjedt, a legváltozatosabb környezeti feltételekhez is alkalmazkodni képes, széles gazdanövénykörű fonalas tömlősgombák. Kísérleteinket a *G. fujikuroi* fajkomplexumba tartozó *F. proliferatum* (*Gibberella intermedia*) végeztük. Ez a gomba elsősorban, mint növényi kórokozó ismert. Számos különféle növényről izolálták már, többek között kukoricáról, búzáról, spárgáról, rizsről, cirokról, datolyapálmáról és fokhagymáról (Abdalla et al., 2000; Desjardins et al., 1997; Dugan et al., 2003; Leslie, 1995; Moretti et al., 1997), de jegyezték már fel *Fusarium proliferatum* által okozott tüdőgyulladást egy 62 éves, tüdő transzplantáción átesett, betegen (Herbrecht et al., 2004). Ezeken kívül a legnagyobb kárt mégis az általa termelt, talán legmérgezőbb mikotoxinnal a fumonizin B1-gyel tudja okozni. A fumonizinek és a közülük leggyakoribban előforduló fumonizin B1 a takarmány-, sőt még az étkezési kukoricát is világszerte szennyezik. Előfordulásukat a világ szinte minden országában megállapították, ahol kukoricát termelnek vagy felhasználnak. Az FB1 sertésekben súlyos fokú mellvízkórt és tüdővízenyőt idéz elő. Az is bizonyított tény, hogy az emberi nyelőcsőrák kialakulásáért a

magas fumonizin B1 tartalmú kukorica fogyasztása felelős olyan területeken (Dél-Afrika, Kína), ahol a lakosság táplálkozásában alapvető élelmiszer a kukorica (Yoshizawa et al., 1994; Marasas, 2001; Myburg et al., 2002).

Munkánk során a környezeti stresszekhez való alkalmazkodás molekuláris mechanizmusai és a másodlagos anyagcserét befolyásoló tényezők jelátvitelével foglalkoztunk *Fusarium proliferatum*-ban.

Kutatómunkánk célkitűzései a következők voltak:

1. Szekvencia-elemzésekkel egy alcsoportspecifikus klónozási rendszer kidolgozása az abiotikus stresszhatások jelátvitelében kulcsfontosságú HOG típusú MAP kinázok klónozására
2. A *Fphog1* HOG típusú MAPK gén izolálása *Fusarium proliferatum*ból
3. $\Delta Fphog1$ génrontásos mutáns törzsek előállítását protoplaszt transzformáció segítségével
4. A $\Delta Fphog1$ mutáns segítségével az *Fphog1* MAP kináz gén fenotípusos jellemzése, különös tekintettel a:
 - szexuális rekombinációra és a patogenitásra
 - az abiotikus stressztolerancia kialakítására hő-, UV-, ozmotikus-, oxidatív és sejtfal stresszek alatt
 - az ozmotikus stressz alatti programozott sejthalál előfordulásának gyakoriságára
5. Az $\Delta Fphog1$ deléció mutáns segítségével tisztázni a MAP kináz szerepét a fumonizin bioszintézis szabályozásában nitrogénkiürülés és teljes nitrogénhiány alatt.

Módszerek

Törzsek származása, fenntartása, tenyésztése

Munkánk során a *Fusarium proliferatum* ITEM 2287 (Institute of Sciences of Food Production, CNR, Bari, Italy) és FGSC 7615 (Fungal Genetics Stock Center Kansas City, MO, USA) vad típusú törzseit használtuk fel. A gombákat burgonya glükóz agar táptalajon (PDA, Duchefa) tartottuk fenn 4°C-on, steril paraffin olaj alatt. Az inokulumként használt konídiumot a következő módon nyertük: a micéliumból egy kis agarkockányi mennyiséget CMC tápoldatba oltottunk (Cappellini és Peterson, 1965) és három napig rázattuk (23-24°C, 180 rpm). Három nap elteltével, a konídium szuszpenziót steril üvegszűrőn (G1) keresztül leszűrtük, és 4°C-on, hűtve tároltuk.

cDNS szintézis

Folyékony tenyészetekből szűrt micéliumpopulációkat folyékony nitrogénben eldözsöltük, és TRI Reagent (Sigma) segítségével totál RNS-t izoláltunk. Az RNS oldatból DNaseI (Fermentas) segítségével eltávolítottuk a DNS szennyeződést. A cDNS szintézist a Fermentas Life Sciences, RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit és random hexamer primer segítségével végeztük, gyártó utasítása szerint.

Polimeráz lánreakciók

A polimeráz lánreakciókat 25 illetve 50 µl térfogatban hajtottuk végre Biometra T3 Biocycler segítségével. A reakcióelegy tartalma: 20 ng genomi DNS, 1x PCR puffer (MBI Fermentas), 1,5 mM MgCl₂, 0,5 mM dNTP, 0,25 – 0,25 µM indítószekvenciák, 1 U *Taq* polimeráz (MBI Fermentas), steril desztillált víz. A PCR programok, ahol ezt nem jelöltük külön, a következő lépéseket tartalmazzák: első lépés: 95 °C 3min – 1 ciklus; második lépés: 94 °C 15s, 60 °C 30s, 72 °C 30s-től 5min-ig, az amplifikálandó fragmentum hosszának megfelelően – 30 ciklus; harmadik lépés: 72 °C 5min – 1 ciklus.

Kvantitatív valós idejű qrt-PCR reakció

Egy µl tízszeres hígítású cDNS templátokkal indítottuk az expressziós vizsgálatok PCR reakcióit. Kísérleteink folyamán SYBR Green (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) fluoreszcens DNS-festéket alkalmaztunk, ABI PRISM SDS 7000- es (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA) rendszerrel a következő amplifikációs körülmények között:

- 95°C-on 10 perc
- 94°C-on 15 másodperc és 57°C-on 60 másodperc – 40 ciklus

Annak érdekében, hogy meg tudjuk határozni a relatív expresszió változást a vizsgált gének vonatkozásában az összehasonlító $\Delta\Delta C_T$ módszert használtuk (Livak és Schmittgen, 2001).

A hiszton H3 gén (Glass and Donaldson, 1995) 377 bp fragmentjét használtunk, -mint konstitutívan expresszálódó gént- kontrollként. Ez a kontroll gén expresszió minden egyes kísérletben mérhető volt, demonstrálva ezzel, hogy a hiszton H3 expressziót nem befolyásolják a kísérleti körülmények. Ahhoz, hogy a $\Delta\Delta C_T$ módszerrel kapott eredményeinket ellenőrizzük, a különböző vizsgált gének és a hiszton H3 gén amplifikációs hatékonyságát összehasonlítottuk, a következő képpen. Hígítási sort (0,1-10ng) készítettünk az adott cDNS mintából, melyeket aztán templátként használtunk újabb qrt PCR során az említett primerek segítségével. A $\Delta C = \Delta C_{T, \text{célgén}} - \Delta C_{T, \text{Hiszton H3}}$ összefüggés alapján hasonlítottuk össze az egyes hígítással kapott eredményeket: a ΔC_T értékeket ábrázoltuk a

hígítás függvényében és meghatároztuk az illesztett egyenes meredekségét. Amennyiben a meredekség 0 értékhez közelít, úgy a $\Delta\Delta C_T$ módszer használható (Livak és Schmittgen, 2001). Mivel a $\Delta\Delta C_T$ módszer nem számol minden egyes reakció hatékonyságával, ezért kiszámoltuk minden egyes reakció hatékonyságát lineáris regresszióval az adott reakció kinetikus görbéjét felhasználva (Ramakers et al., 2003), majd ezután a GED formulát (Scheffe et al., 2006) alkalmazva számoltuk ki az egyéni hatékonysággal korrigált expressziós értékeket.

Szekvencia analízis

A nukleotid szekvencia meghatározásokat és az oligonukleotid indítoszekvencia szintéziseket a gödöllői Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpontban működő Biomi Kft. laboratóriumában végezték. Az indítoszekvenciák tervezéséhez a Lasergene szoftver csomag (DNASStar Inc., Madison, Wis.) PrimerSelect nevű programját használtuk. A szekvencia összehasonlításokat BLAST módszerrel (Altschul et al., 1997) végeztük, az EMBL adatbázist és a GenomeNet nevű internetes oldal (<http://www.genomet.jp>) BLAST programját használva. A DNS szekvenciák elemzéséhez a Lasergene szoftver csomagot (DNASStar Inc., Madison, Wis.) és az FGENESH programot (<http://www.softberry.com>) használtuk.

Blottolás és Southern hibridizáció

Genomi DNS-t izoláltunk amit utána megfelelő restrikciós endonukleázok segítségével emésztettünk, vagy emésztetlenül hagyunk a PCD alatti fragmentálódás vizsgálatához. A DNS mintát agaróz gélen elválasztottuk, az emésztett DNS populációt elektroforézis után Hybond-n membránra blottoltuk, 6 – 8 óra elteltével a DNS-t a membránon UV sugárzás segítségével rögzítjük Southern hibridizációt CHURCH pufferben 65 °C-on végeztük Sambrook és munkatársai (2001) utasítása szerint.

Az *Fphog1* gén inaktiválása

Felszorzottuk a teljes *Fphog1* gént a promoter és a termiátor régióra írt YSfor és YSrev indítoszekvenciák segítségével. Az így kapott 2089 bp hosszúságú fragmentumot pGEM-T Easy vektorba ligáltuk (pYS). Ebből a plazmid DNS-ből *KpnI-XbaI* enzimekkel egy 369 bp nagyságú fragmentumot hasítottunk ki, amelyet a 3805 bp nagyságú higromicin foszfortranszferáz (*hph* kazetta) (Punt et al., 1987) gént tartalmazó *KpnI-XbaI* fragmentummal helyettesítettünk, és az így kapott konstrukciót pGemFpKYS-nek neveztük el. A pGemFpKYS plazmid DNS-t templátként használva PCR reakciót indítottunk T7 és SP6 primerekkel. A megfelelő fragmentumot (5739 bp) agaróz gélből GFX-oszloppal (Amersham)

visszaizoláltuk a gyártó utasításai szerint és ezt használtuk a *F. proliferatum* protoplasztok transzformálásához.

A protoplasztokat exponenciális növekedési fázisban levő, fiatal micéliumból nyertük Proctor és munkatársai módszerével (1997). A transzformálást szintén a Proctor és munkatársai által leírt módon, poli-etilén-glikol és Ca^{2+} ionok jelenlétében végeztük.

A 48 db monospórázott transzformánst és a vad típusú recipiens törzset első lépésben micélium PCR technikával vizsgáltuk, így szűkítettük le a potenciális mutánsok számát. A kiűtött régióra írt CHOGfor-CHOGrev primerpárt és a CHPH1 és CHPH2 primereket alkalmaztuk 60 °C anellációs hőmérsékleten. A *hph* pozitív és *Fphog1* negatív transzformáns vonalakból genomi DNS-t izoláltunk és a PCR-rel kapott eredményeket Southern hibridizációval ellenőriztük (Sambrook és Russel, 2001).

***ΔFphog1-24* mutáns törzs komplementálása**

Neomicin foszfortranszferáz gént (Wöstemeyer et al., 1987) ligáltunk az *Fphog1* gént reprezentáló 2089 bp hosszú szekvenciához. A MAPK gén szekvenciája 304 bp nagyságú darabot hordozott a saját promóteréből, valamint egy 116 bp hosszú darabot a terminátor régiójából. Ezzel a konstrukcióval transzformáltunk *ΔFphog1-24* MAPK mutáns törzsből izolált protoplasztokat. Higromicin és geneticin antibiotikumok jelenlétében szelektáltunk két komplementált vagy helyreállított törzset, az R1-et és az R2-öt. A gén expresszióját RT-PCR technikával ellenőriztük.

Ivaros keresztezés

A transzformánsok párosodási képességét sárgarépás táptalajon vizsgáltuk a Klittich és Leslie (1988) által leírt módon. A keresztezés után a törzseket 23/24 °C-on inkubáltuk 5-6 héten át, 12 órás sötét periódust, 12 órás megvilágítottal váltogatva, amelyet fehér fényű és sötétkék fluoreszcens lámpával biztosítottunk. Teszter törzsként a *F. proliferatum* (*G. intermedia*) FGSC 7615 törzset használtuk. A keresztezés után kinőtt peritéciumokat számoltuk, az aszkospórákat fénymikroszkóppal vizsgáltuk.

Patogenitási teszt

Az élőszövet kolonizációs patogenitási teszthez a paradicsomgyümölcsöket sterilizáltunk felületileg 70% etanol segítségével. Hamilton pipettával juttattuk be 10 μl 10⁶ darab

konídiumot a gyümölcsök belsejébe és naponként mértük a megjelenő lézió átmérőjét Di Pietro és munkatársai (2001) közlése szerint.

Stressz kezelések

A hő és UV stressz vizsgálatához folyékony CMC tápközegben termeltetett konidiumsuszpenziót használtunk. Hőstresszhez 10^6 db konídium/ml-es szuszpenziót csíráztattunk 4 órán keresztül $25\text{ }^\circ\text{C}$ -on. Ezután ezeket áthelyeztük a kezeléseknak megfelelő 43 illetve $45\text{ }^\circ\text{C}$ -os vízfürdőbe, majd két órán keresztül 20 percenként mintát vettünk. A mintákból 10^2 db konídium/ml-es hígításokat szélesztettünk CM lemezekre, két nap elteltével a túlélő telepeket megszámoltuk. Az UV stresszhez nagyjából 10^2 db konídiumot CM agarra szélesztettünk és 0-10 percig UV-C (210-280 nm), monokromatikus UV-B (312 nm) sugárzással kezeltük a szélesztett populációkat VL-6MC UV lámpa (Vilber Lourmat, Marne La Vallée, France) segítségével. A túlélőkből kifejlődőtelepeket számoltuk.

Oxidatív stresszhez 25 mM , 50 mM és 100 mM koncentrációjú H_2O_2 , $0,1\text{ mM}$ koncentrációjú menadion biszulfid és 12 , 24 , 50 mM koncentrációjú metilglioxál stresszorokat alkalmaztunk CM agaron. H_2O_2 esetében micéliummal benőtt agarkorongot tettünk a stresszort tartalmazó CM-re. A menadion és metilglioxál kezeléseknél $10^7 - 10^3$ db/ml-es hígítási sort készítettünk a konídium szuszpenziókból, és az egyes hígításokból $5\text{ }\mu\text{l}$ -cseppentettünk a CM agar felszínére.

Ugyan ilyen kísérleti metodika alapján végeztük el a sejtfalstresszhez kapcsolódó kísérleteinket 40 mg/l koncentrációjú kongó vörös és $0,014\%$ -os SDS stresszorokkal.

Ozmotikus stressz esetében 4% NaCl-t illetve $1,2\text{ M}$ koncentrációjú szorbitot tartalmazó CM agar illetve folyékony CM (10^6 db/ml-es kiindulási konídium koncentrációval) tápközegeket használtunk. Folyadékkultúrák növekedése során az optikai denzitást mérését JENEWAY (UK), GENOVA típusú spektrofotométer segítségével végeztük 600nm -en. Annak érdekében, hogy az $\text{OD}_{600\text{nm}}$ értéke $0,1-0,5$ közötti legyen (mivel e két érték között a legkisebb a hiba a sejtszám és az optikai denzitás között) a mintákat hígítottuk LCM hozzáadásával.

N-kiürülés és N-éhezés alatti fumonizin termelést vizsgáló kísérletsorozathoz 10^6 db/ml konídium koncentrációjú tenyészeteket indítottunk 500 ml végtérfogatban, WM+AF (pH 3,3) tápközegben. Ebben a formában egy napig növesztettük, majd steril porcelán szűrőn, szűrőpapír segítségével szűrtük a tenyészeteket. A szűrt micéliumot $0,01\text{M}$ foszfát pufferral (pH 7,4) mostuk, majd felvettük WM, nitrogénforrást nem tartalmazó, ugyanolyan térfogatú tápközegben.

Génexpressziós vizsgálatokhoz a kísérletben meghatározott időközönként 50 ml folyadékkultúrát leszűrtünk az előbb leírt módon és az összegyűjtött, szűrt micéliumot először folyékony nitrogénben lefagyaszottuk, majd feldolgozásig $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk.

Mikroszkópos és fluoreszcens technikák

Munkánk során fluoreszcens lámpával felszerelt Olympus BH2 RFCA mikroszkópot használtunk. A sejthalál mértékének meghatározására 0.1% Evans blue festéket használtunk Ádám és munkatársai (1989) leírása szerint. A festékoldatot kevertük közvetlenül a tenyészetből vett mintához 1:1 arányban. A sejtmagfestéshez 4',6'-diamidino-2-fenilindol (DAPI) festéket használtunk Harris és munkatársai (1994) utasítása szerint, és a tárgylemezre tett festett mintát 495nm hullámhosszúságú gerjesztőfény segítségével vizsgáltuk.

Intracelluláris ROS szintet 2',7'-diklorodihidrofluorescein (DCHF) fluoreszcens festékekkel vizsgáltuk. A tenyészetekből vett mintát (5ml) $\text{OD}_{600} = 0.4$ értékre hígítottuk, és inkubáltuk $50\text{ }\mu\text{M}$ festék jelenlétében 20 percig. Ezután a mintákat mostuk $0,1\text{M}$ PBS (pH = 7.4) pufferrel. A 495nm hullámhosszúságú fény gerjesztésének hatására az oxidatív formákkal reagált festék 520nm hullámhosszú fényt bocsát ki, melyet fluoreszcens mikroszkóppal és LS 50B (PerkinElmer, Norwalk, CT, USA) lumineszcens spektrofluoriméterrel detektáltunk

A mitokondrium membrán programozott sejthalál alatti permeabilitás változását JC-1 (5,5',6,6-tetrakloro-1,1',3,3-tetraethyl-benzimidazolokarbocianin jodid) fluoreszcens festékekkel Mito PT Kit (Immunochemistry Technologies, Bloomington, MN, USA) vizsgáltuk. A gyártó által meghatározott mennyiséget hozzáadtuk a vizsgálandó mintához, majd 15 perces sötétben való inkubálás következett. A detektálás az előző bekezdésben leírtakkal megegyezően történt. A 495nm hullámhosszúságú fény hatására egészséges sejtekben vörös (590nm) PCD-és sejtekben zöld (527nm) fluoreszcencia jelenik, melynek mértéke (E) spektrofluoriméterrel mérhető. A mért értékekből kiszámolható a PCD populáción belüli aránya ($E_{527}/E_{590\text{nm}} \times 100$).

Ammóniumion koncentrációjának meghatározása

A tápoldat ammóniumion koncentrációjának meghatározását indofenol kék módszerrel végeztük (Solorzano, 1969). Az ammóniumion hipokloritok jelenlétében lúgos közegben fenollal illetve fenol vegyületekkel reagál és kékes színű indofenol keletkezi, mely intenzitását spektrofotométerrel 680 nm-en detektáltuk.

Fumonisin mennyiségének meghatározása

A fumonizin B1 mennyiségi meghatározásához Shephard és munkatársai (1990) által leírt eljárást kissé módosítva végeztük a mintaelőkészítést és származékolást. A fumonizinek fluoreszcens származékainak mennyiségi meghatározása HPLC-vel (HP 1050) Fazekas és munkatársai (1998) utasításai szerint történt. Az FB1 detektálásának alsó határa 0,1 µg/ml volt.

Eredmények

4.1 Az *Fphog1* MAPK gén izolálása és jellemzése

Gomba MAP kináz gének szekvenciáinak számítógépes összehasonlításával megállapítható volt, hogy a gomba MAP-kináz gének három különálló alcsoportot alkotnak, amely megfelel a Kültz (1998) által leírt MAPK alcsoportok közül a yeast and fungal stress activated protein kinase (YSAPK, azaz HOG típusú MAPK) valamint a yeast and fungal extracellular regulated kinase (YERK1 and YERK2) alcsoportoknak. A HOG alcsoportban számos új, alcsoport-specifikus konzervált motívum volt kimutatható, amely a gomba YERK1 és YERK2, illetve egyéb nem gomba MAPK alcsoportokban nem volt megtalálható.

A fent említett HOG-specifikus motívumokra épített indítószekvenciák felhasználásával a kidolgoztunk egy „nested” PCR-re alapozott alcsoport specifikus MAP kináz klónozási rendszert a fonalas gombák körében. A fenti megközelítéssel sikeresen klónoztunk HOG típusú MAPK alcsaládba tartozó szekvenciárészeket a *Fusarium* és *Trichoderma* fajokból. A *Fusarium proliferatum* (teleomorf: *Gibberella intermedia*), a *F. culmorum* és a *Trichoderma harzianum* (teleomorf: *Hypocrea lixii*) HOG típusú MAPK génjeinek szekvencia-részleteit elhelyeztük az NCBI adatbázisában is (DQ071423, DQ065608 és DQ071424).

Az *F. proliferatum* HOG típusú MAPK génjének, az *Fphog1* génnek a teljes genomi szekvenciáját az előzetesen klónozott 880 bp hosszúságú szakasz jobb és bal oldali kiterjesztésével határoztuk meg, SON (single oligonucleotide nested) PCR (Antal et al., 2004) alkalmazásával. A MAP kináz gének klónozására elsőként használtunk SON PCR-t. A gént, amely 340 bp promóter régiót is magában foglal, EF467357 számon helyeztük el az NCBI adatbázisában. Az *Fphog1* gén expressziója szemikvantitatív RT-PCR és kvantitatív valós idejű qrtPCR módszerekkel vizsgálva nem mutatott változást a gomba életciklusának különböző morfogenetikai fázisaiban: a nem csírázó, ill. csírázó konídiumban és a micéliális

növekedés alatt. Ennek köszönhetően a gomba különböző fejlődési fázisaiban, illetve konídium állapotban is lehetőség nyílt az *Fphog1* gén funkcióinak vizsgálatára.

Ennek a célnak megfelelően $\Delta Fphog1$ null-mutáns törzseket hoztunk létre PEG mediált protoplaszt transzformációval (Proctor et al., 1997), és a mutánst funkcionális analízisnek vetettük alá. A szexuális rekombináció és a növényi szövetben való invázív növekedés szempontjából nem találtunk különbséget a vad és a mutáns törzsek között. Az *Fphog1* gen expressziója lehetővé tette, hogy a hő- és UV-stresszt intakt, illetve csíráztatott konídiumokon, a menadion-, diamid- és metilglioxál-stresszt konídiumokon, a hidrogén-peroxid-, sejtfal- és ozmotikus-stresszt pedig micéliumon és konídiumon is vizsgáltuk.

Teszteltük, hogy az *Fphog1* MAPK gén deléciója okoz-e változást a sejtfal integritást biztosító jelátviteli folyamatokban. Ehhez két stresszort, kongó vörös festéket és SDS-t használtunk. A mutáns törzs érzékenyebbnek bizonyult a sejtfal stresszorokkal szemben: nem, illetve nehezebben csírázott, és lassabban növekedett kongó vörös és SDS jelenlétében a kezeletlen, stresszort nem tartalmazó kontrollhoz képest. A *Fusarium* fajok között elsőként bizonyítottuk, hogy a *F. proliferatum* FpHOG1 MAP kináza szerepet játszik a sejtfal stressz jelátvitelében.

A vizsgált abiotikus stresszorokra, így az UV-C sugárzásra, a külső hidrogén-peroxid kezelésre, a diamid-, a menadion-, a metilglioxál-, a hő-, a só- és az ozmotikus-stresszre a $\Delta Fphog1$ mutáns törzs lényegesen érzékenyebb volt, mint a vad szülő. A vad típusú *Fphog1* génnel (saját promóterét alkalmazva) komplementált mutáns stressz-érzékenysége a vad típusú szülő törzséhez volt hasonló. A mutáns törzsek segítségével fonalas gombák körében elsőként mutattuk ki az élesztőgombákban (*Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*) leírt HOG MAPK függő összes abiotikus stresszfunkciót (Brewster et al., 1993; Gacto et al., 2003).

Az ozmotikus (NaCl, szorbitol) stresszorok hatására a $\Delta Fphog1$ mutánsban a növekedés gátlása fokozott mértékű sejthalállal társult. A mutánsban négy programozott sejthalál (PCD) erőteljesen jelentkező markerét azonosítottunk: az reaktív oxigényökök (ROS) fokozott képződését, a mitokondriális membránpermeabilitás-változást, a sejtmag dezintegrációját és a sejtmagi DNS fragmentációját. Ezek az eredmények azt jelzik, hogy az FpHOG1 fehérje egyik fontos funkciója az apoptózis kivédése abiotikus stressz esetén. Ismereteink szerint ez az első eredmény a HOG típusú MAP kinázok apoptózisban játszott szerepéről.

Valós idejű qrt-PCR alkalmazásával megállapítottuk, hogy ozmotikus stressz esetében az *Fphog1* gén transzkripcionálisan nem regulált. A transzkripció vizsgálatokban

összehasonlítottunk két qrt-PCR értékelési módszert: az összehasonlító (comparative) C_T ($\Delta\Delta C_T$) (Livak and Schmittgen, 2001) és a gene expression's C_T difference (GED) (Scheffe et al., 2006) módszert. Ez utóbbi módszer a különböző minták egyedi PCR hatékonyságát is figyelembe veszi. A két módszerrel számolt eredmények között szignifikáns különbség nem volt, azaz az egyes minták, illetve ismétléseik PCR hatékonysága között nem volt jelentős különbség.

A *Fusarium* fajok mikotoxin termelésének regulációjáról kevés ismeret áll rendelkezésünkre. Eddigi kutatások kiderítették, hogy a *Fusarium graminearum*-ban a HOG1 homológ *Fgos2* MAP kináz pozitívan regulálja a trichotecén bioszintézist (Ochiai et al. 2007). A *Fusarium verticillioides*-ben a fumonizin bioszintézist irányító génklaszter két eleme, a *fum1* (poliketid szintáz) és a *fum8* (alfa-aminotranszferáz) – a toxintermelést serkentő körülmények között – transzkripcionálisan regulált (Brown et al. 2007).

Célkitűzésünknek megfelelően vizsgáltuk a HOG típusú MAPK gén fumonizin bioszintézis regulációjában betöltött szerepét. Ahhoz, hogy lehetővé váljon e két célgén transzkripció vizsgálatát a *F. proliferatum* vad típusú és $\Delta Fphog1$ MAP kináz null mutáns törzsekben, valószerű qrt-PCR technikában is alkalmazható indítószekvenciákat terveztünk. Ezután a primerek segítségével előállított *fum1* és *fum8* gének fragmentumaik azonosítása következett. A transzkripcionális reguláció vizsgálata jól definiált körülmények között történt. Shim és Woloshuk (1999) munkája rámutatott arra, hogy a tápközeg nitrogénellátottsága befolyásolja a fumonizin termelést *F. verticillioides*-ben: nitrogénbőség esetén a fumonizin bioszintézis út szupresszált, ellenkező esetben a gomba toxin termelése felerősödik. Arra vonatkozó adat viszont még nem állt rendelkezésre, hogy ebben a folyamatban a HOG típusú MAP kináznak milyen szerepe van. Először a tápközegből való ammónium-nitrogén kiürülés és a *fum* gének expresszió-változását vizsgáltuk qrt-PCR technika segítségével a vad típusú *F. proliferatum* törzsekben. Amikor a kiindulási 30mM ammóniumion koncentráció a tápközegből harmadánál kevesebbre csökkent, mindkét gén expressziója jelentősen megnőtt. Ezzel bizonyítottuk, hogy a nitrogénhiányra fellépő fumonizin bioszintézis erősödés a *fum* gének transzkripcionális aktivációján keresztül valósul meg. Ezt követően vizsgáltuk az *Fphog1* MAP kináz szerepét a teljes N-hiányhoz való alkalmazkodásban. A kísérlethez vad típusú, $\Delta Fphog1$ MAPK mutáns és a vad típusú alléllal komplementált *F. proliferatum* törzseket használtunk. A törzseket egy napig tenyésztették 30 mM ammónium-foszfátot tartalmazó tápközegben, majd egy nap után leszűrtük és ugyanolyan, illetve ugyanolyan, de nitrogénforrás-mentes tápoldatban vettük fel. A $\Delta Fphog1$ MAP kináz mutáns lassabban volt képes adaptálódni a nitrogénmentes környezethez, mint a vad típusú vagy a helyreállított

törzs, de olyan táptalajban, ahol ugyanúgy rendelkezésre állt az ammóniumfoszfát mint nitrogénforrás, a növekedése nem maradt el a kontroll törzsekétől. Ez a kísérlet alátámasztotta azt a feltételezésünket miszerint a nitrogénérzékelésben az *Fphog1* MAP kináz szerepet játszik. Következő lépésben a három törzs fumonizin B1 termeléséhez nélkülözhetetlen *fum1* és *fum8* gének kifejeződését vizsgáltuk teljes nitrogénhiány alatt a fent leírt módszer szerint. Az eredmények azt mutatták, hogy a $\Delta Fphog1$ MAPK mutáns törzsben a tenyésztés negyedik napjától mind a *fum1*, mind a *fum8* expressziója erősen megnőtt. A vad és a helyreállított törzsben sokkal kisebb mértékű expresszió-növekedés volt megfigyelhető, és ez a kis növekedés is egy nappal később jelentkezett. A kapott eredményeket a tápközegben HPLC technikával mért fumonizin B1 koncentrációk is igazolták: a mutáns esetében a negyedik naptól a toxintartalom növekedésnek indult, míg a vad és a helyreállított törzsek tenyésztésében még a kilencedik napon sem érte el a fumonizin-koncentráció a kimutathatóság alsó határát.

Új tudományos eredmények

1. Gombafajok HOG típusú MAP kinázainak homológiai alapján azonosítottunk új gomba MAPK specifikus és alcsoport-specifikus motívumokat.
2. Szekvencia összehasonlítások alapján gomba MAPK alcsoport specifikus klónozási rendszert dolgoztunk ki: degenerált oligonukleotid indítószekvenciákat terveztünk, és a HOG (YSAPK) alcsoportba tartozó MAPK szekvenciákat klónoztunk fonalas gombákból.
3. SON PCR technikával izoláltuk a *F. proliferatum* HOG típusú MAPK génjét (*Fphog1*).
4. Az *Fphog1* MAPK gén expresszióját vizsgáltuk valós idejű kvantitatív PCR technikával csírázás és micélium-növekedés alatt. Az eredményeket a $\Delta\Delta C_T$ módszerrel és GED formula alkalmazásával értékeltük ki; megállapítottuk, hogy az *Fphog1* MAPK gén expressziója transzkripcionálisan nem regulált.
5. Az *Fphog1* MAPK gén funkciójának felderítésére $\Delta Fphog1$ null-mutáns törzseket hoztunk létre. A mutánst a vad típusú *Fphog1* génnel (saját promóterét alkalmazva) komplementáltuk.
6. Megállapítottuk, hogy az *Fphog1* MAPK gén nem nélkülözhetetlen a gomba számára, és nem játszik szerepet sem az ivaros szaporodásban, sem a patogénitásban.

7. Igazoltuk az *Fphog1* MAP kináz abiotikus stresszek jelátvitelében betöltött szerepét: a $\Delta Fphog1$ mutáns törzs fokozottan érzékeny volt hő-, UV-, valamint extra- és intracelluláris oxidatív, sejtfal és ozmotikus stresszel szemben.
8. Kimutattuk, hogy az *Fphog1* MAP kináz gén az ozmotikus stressz hatására transzkripcionálisan nem aktiválódik.
9. Igazoltuk, hogy az *Fphog1* MAP kináz az ozmotikus stressz alatt a programozott sejthalál negatív regulátora.
10. Fumonizin bioszintéziséért felelős gének transzkripcióját vizsgáltuk N-kiürülés és teljes N- hiány alatt. A vad típusú törzsben a tápközeg ammóniumion tartalmának 10mM alá csökkenése indukálta a *fum1* és *fum8* gének expresszióját.
11. Az *Fphog1* MAP kináz szerepet játszik a nitrogénéhezéshez való adaptációban.
12. Kimutattuk, hogy – nitrogénéhezés alatt – az FPHOG1 MAP kináz a fumonizin bioszintézis negatív regulátora.

Következtetések és javaslatok

A kísérleteink modellszervezetéül a *F. proliferatum*ot (teleomorf: *Gibbelrella intermedia*) választottuk, mert ennek a gombának mind ivarosán, mind klónosan szaporodó vonalai vannak és ez lehetőséget adott a különböző funkciójú MAP kináz gének többirányú szignálátviteli szerepének a vizsgálatára. Másrészt, gazdaságilag is jelentős fajról van szó, amely az egész világon elterjedt, sok termesztett növényen okoz megbetegedést, és egy sor másodlagos anyagcsereterméket, köztük mikotoxinokat, fumonizin B1-et termel (Leslie és Summerell, 2006).

Első lépésben gomba MAP kinázok szekvencia-elemzésével alcsoport-specifikus klónozási rendszert dolgozunk ki, amely lehetővé tette, hogy különböző fonalas gombafajokból HOG típusú MAP kinázokat izoláljunk. Ennek köszönhetően, és SON PCR technikát alkalmazva klónoztuk a *Fusarium proliferatum Fphog1* MAPK génjét. Megállapítható, hogy ez az alcsoport specifikus klónozási rendszer a továbbiakban javasolható ismeretlen genomú fonalas gombafajokból való HOG típusú MAPK gének izolálására.

Az *Fphog1*, HOG-típusú MAPkináz gén konídium állapotban, illetve csírázás és micélium-növekedés alatt is konstitutív expressziót mutatott. Az expressziós vizsgálatokhoz qrt-PCR tecchnikát választottunk. A qrt-PCR eredményeket az összehasonlító (comparative) C_T ($\Delta\Delta C_T$) (Livak and Schmittgen, 2001) és a gene expression's C_T difference (GED) (Scheffe

et al., 2006) módszert. Ez utóbbi módszer a különböző minták egyedi PCR hatékonyságát is figyelembe veszi. A két módszerrel számolt eredmények között szignifikáns különbség nem volt, azaz az egyes minták, illetve ismétléseik PCR hatékonysága között nem volt jelentős különbség. Ezzel szemben, elsősorban humán rendszerekben, figyelembe kell venni azt a tényezőt, hogy ugyanazon gén expressziója különböző szövetekben, illetve szervekben eltérő PCR-hatékonysággal detektálható (Scheffe et al., 2006).

Az *Fphog1* gén funkcionális vizsgálatához specifikus génrontás segítségével $\Delta Fphog1$ mutánsokat állítottunk elő. A mutánsok normálisan növekedtek és sporuláltak mesterséges táptalajon, s a spórák csírázása sem gyengült. A mutánsok párosodási képessége és paradicsom bogyókon vizsgált inváziós növekedése is normális volt a vad típushoz képest. Mindez azt bizonyítja, hogy ennek a MAPK génnek nincs szerepe sem a növekedésben, sem az ivaros szaporodásban, sem a patogenitásban. Ugyanakkor, fokozódott a mutánsok érzékenysége abiotikus stressz-faktorokkal, így UV-, hő-, ozmotikus-, oxidatív- és sejtfal-stresszel szemben. A programozott sejthalál (PCD) indikátorok, így a reaktív oxigénformák (ROS) szintje, a mitokondrium membrán-permeabilitásának megváltozása, a sejtmag dezintegráció és a DNS-fragmentálódás mértéke ozmotikus stressz esetén erősebben jelentkezett a $\Delta Fphog1$ mutánsokban, mint a vad típusban, vagy az ép *Fphog1* génnel komplementált R1 és R2 törzsekben. Ezek az adatok azt bizonyítják, hogy az *Fphog1* génnek az ozmotikus stressz indukálta apoptózisos fenotípus mérséklésében van szerepe. A gomba apoptózis-modellnek – az apoptózis mechanizmusok élővilágban tapasztalható nagyfokú konzerváltsága miatt – gyakorlati jelentősége is van. Ismeretes, hogy a ráksejtek ellen használt természetes és mesterséges anyagok hatásmechanizmusa az apoptózis indukcióján alapul, és a transzplantált szervekben jelentkező károsodás (reperfusion injury) is részben ennek a jelenségnek köszönhető. Gyakorlati szempontból egy egyszerű, jól tenyésztethető, nagy tömegben előállítható szervezeten lehet tanulmányozni a programozott sejthalál eseményeit, és az apoptózis indukciójára vagy gátlására alkalmas hatóanyagok is jól vizsgálhatók ebben a rendszerben.

Az *Fphog1* gén egyes másodlagos anyagcseretermékek szintézisét beindító stresszhatások jelátvitelében is részt vesz. Amikor a *F. proliferatum* vad törzsét ammónium-foszfátot tartalmazó táptalajon tenyésztettük, az ammóniumion koncentrációjának csökkenésével nőtt a *fum1* és a *fum8* gén (a fumonizin bioszintézis génklaszter tagjai) expressziója. A $\Delta Fphog1$ mutánsokban a nitrogén éhezés hatására bekövetkező expresszió-növekedés még erőteljesebb volt. Nőtt a fumonizin B1 (FB1) termelés is a *FUM* gének expressziójának emelkedésével: a $\Delta Fphog1$ mutánsok tenyésztésürlében jelentős

mennyiségű FB1-et mértünk, a vad típus és az R1 törzs szűrletében viszont nem találtunk érdemleges mennyiségű toxint. A fumonizin bioszintézis gének *ΔFphog1* mutánsokban tapasztalt felül-reguláltsága azzal magyarázható, hogy ezek a mutánsok a működő HOG1 MAPK útvonal hiányában fokozottan érzékenyenek N-éhezés okozta stresszre.

Összegésképpen elmondhatjuk, hogy elvégeztük a *F. proliferatum* HOG típusú MAP kinázának részletes vizsgálatát. Tisztáztuk, milyen szerepet játszik az FpHOG1 MAPK a szaporodási és patogenitási folyamatokban, valamint az abiotikus stressz-toleranciában, illetve a másodlagos anyagcsere szabályozásában. Eredményeinkből látható, hogy a MAP kinázok rendkívül sok funkcióban vállalnak szabályozó szerepet különböző szinteken. A szignálátviteli folyamatok hálózatot alkotva egymással kölcsönhatásban állnak, így a jövőben a jelátviteli folyamatok tanulmányozásánál a különböző útvonalak egymásra hatását illetve "párbeszédét" is figyelembe vevő, azt vizsgáló kutatási feladatoknak kell nagyobb hangsúlyt kapniuk.

Irodalomjegyzék

Abdalla M.Y., Al-Rokibah A., Moretti A. and Mule G. (2000): Pathogenicity of toxigenic *Fusarium proliferatum* from date palm in Saudi Arabia. *Plant Disease*, 84:321-324.

Ádám A., Farkas T., Somlyai G., Hevesi M., Király Z., (1989): Consequence of O₂⁻ generation during a bacterially induced hypersensitive reaction in tobacco: deterioration of membrane lipids. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 34: 13-26.

Ádám A.L., Pike S., Hoyos M.E., Stone J.M., Walker J.C., Novacky A., (1997): Rapid and transient activation of an MBP kinase in tobacco leaves treated with harpin from *Erwinia amylovora*. *Plant Physiol.*, 115: 853-861.

Altschul S.F., Madden T.L., Schaffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Millwer W., Lipman D.J., (1997): Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acid Res.* 25: 3389-3402.

Antal Z., Rasclé C., Fevre M., Bruel C., (2004): Single oligonucleotide nested PCR: a rapid method for the isolation of genes and their flanking regions from expressed sequence tags. *Curr. Genet.* 46: 240-246.

Brewster J.L., de Valoir T., Dwyer N.D., Winter E., Gustin M.C., (1993): An osmosensing signal transduction pathway in yeast. *Science* 259: 1760-1763.

Brown, D.W., Butchko, R.A.E., Busman, M., Proctor, R.H., 2007. The *Fusarium verticillioides* FUM gene cluster encodes a Zn(II)2Cyd6 protein that affects FUM gene expression and fumonisin production. *Eukaryotic Cell* 6, 1210-1218.

Capellini R, Peterson, J.L., (1965): Macroconidium formation in submerged cultures by a non-sporulating strain of *Gibberella zeae*. *Mycologia* 57: 962-966.

Desjardins A.E., Plattner R.D., Nelson P.E., (1997): Production of fumonisin B1 and moniliformin by *Gibberella fujikuroi* from rice and from various geographical areas. *Applied and Environmental Microbiology*, 63:1838-1842.

Di Pietro A., Garcia-Maceira F. I., Meglecz E, Roncero M. I. G. (2001): A MAP kinase of the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum* is essential for root penetration and pathogenesis. *Mol. Microbiol.* 39, 1140-1152.

- Dugan F.M., Hellier B.C. and Lupien S.L. (2003): First report of *Fusarium proliferatum* causing rot of garlic bulbs in North America. *Plant Pathology*, 52:426.
- Eisenmann DM, Kim SK. (1994): Signal transduction and cell fate specification during *Caenorhabditis elegans* vulval development. *Curr Opin Genet Dev* 4: 508-16.
- Fazekas B., Bajmóczy E., Glávits R., Fenyvesi A., Tanyi J., (1998): Fumonisin B1 contamination of maize and experimental acute fumonisin oxycosis in pigs. *Journal of Veterinary Medicine*, 45: 171-181.
- Gacto M., Soto T., Vicente-Soler J., Villa T.G., Cansado J., (2003): Learning from yeasts: intracellular sensing of stress conditions. *Int. Microbiol.* 6, 211-219.
- Glass, N.L., Donaldson, G.C., 1995. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 1323-1330.
- Harris S.D., Morrell J.L., Hamer J.E., (1994): Identification and characterization of *Aspergillus nidulans* mutants defective in cytokinesis. *Genetics* 136: 517-532.
- Herbrecht R., Kessler R., Kravanja C., Meyer M.H., Waller J., Letscher-Bru V., (2004): Successful treatment of *Fusarium proliferatum* pneumonia with posaconazole in a lung transplant recipient. *J Heart Lung Transplant.*, 23:1451-4.
- Herskowitz I., (1995): MAP kinase pathways in yeast: for mating and more. *Cell.*, 80 187-97.
- Jin W, Wu L, Liang K, Liu B, Lu Y, Fan Z., (2003): Roles of the PI-3K and MEK pathways in Ras-mediated chemoresistance in breast cancer cells. *Br J Cancer* 89: 185-91.
- Klittich, C.J., Leslie, J.F., (1988): Nitrate reduction mutants of *Fusarium moniliforme* (*Gibberella fujikuroi*). *Genetics* 118, 417-423.
- Kültz D. (1998): Phylogenetic and functional analysis of mitogen- and stress-activated protein kinases. *J. Mol. Evol.* 46: 571-588.
- Lee T., Hoofnagle A.N., Kabuyama Y., Stroud J., Min X., Goldsmith E.J., Chen L., Resing, K.A., Ahn N.G., (2004): Docking motif interactions in MAP kinases revealed by hydrogen exchange mass spectrometry. *Mol. Cell* 14, 43-55.
- Leslie, J.F., Summerell, B., (2006): *Fusarium Laboratory Manual*. Blackwell Publishing, Oxford.
- Leslie J.F. (1995): *Gibberella fujikuroi*: available populations and variable traits. *Canadian Journal of Botany*, 73:S282–S291.
- Livak K.J., Schmittgen T.D., (2001): Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ method. *Methods* 25: 402-408.
- Logrieco A., Moretti A., Ritieni A., Bottalico A. Corda P., (1995): Occurrence and toxigenicity of *Fusarium proliferatum* from preharvest maize ear rot and associated mycotoxins, in Italy. *Plant Dis.* 79: 727-731
- Marasas, W.F.O. (2001): Discovery Occurrence of the Fumonisin: A Historical Perspective. *Environ. Health Perspect.* 109:239-243.
- Mizoguchi T, Gotoh Y, Nishida E, Yamaguchi-Shinozaki K, Hayashida N, Iwasaki T, Kamada H, Shinozaki K., (1994): Characterization of two cDNAs that encode MAP kinase homologues in *Arabidopsis thaliana* and analysis of the possible role of auxin in activating such kinase activities in cultured cells. *Plant J.* 5:111-22.
- Moretti A., Logrieco A., Doko, B., Frisullo S., Visconti A, Bottalico A., (1997): *Fusarium proliferatum* from asparagus in Italy: Occurrence, fertility and toxigenicity. *Cereal Research Communications* 25:785-786
- Myburg R.B., Dutton, M.F., Chuturgoon A.A., (2002): Cytotoxicity of fumonisin B1, diethylnitrosamine, and catechol on the SNO esophageal cancer cell line. *Environ Health Perspect.* 110: 813-5.

- Ochiai N., Tokai T., Nishiuchi T., Takahashi-Ando N., Fujimura M., Kimura M., (2007): Involvement of the osmosensor histidine kinase and osmotic stress-activated protein kinases in the regulation of secondary metabolism in *Fusarium graminearum*. *Biochemistry and Biophysics Research Communications* 363: 639-644.
- Proctor R.H., Hohn T.M., McCormick S.P., (1997): Restoration of wild-type virulence to *Tri5* disruption mutants of *Gibberella zeae* via gene reversion and mutant complementation. *Microbiology* 143, 2583-2591.
- Punt P.J., Oliver R., Dingemanse P., Pouwels M.A.P.H., van den Hondel C.A.M.J.J., (1987): Transformation of *Aspergillus* based on the hygromycin B resistance marker from *Escherichia coli*. *Gene* 56, 117-124.
- Ramakers C., Ruijter J. M., Deprez R.H., Moorman A.F. (2003): Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neurosci. Lett.* 339: 62-66.
- Sambrook J., Russell R.W., (2001): Molecular cloning: A laboratory manual, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Scheffe J.H., Lehmann K.E., Buschmann I.R., Unger T. Funke-Kaiser, H., (2006): Quantitative real-time RT-PCR data analysis: current concepts and the novel "gene expression's CT difference" formula. *J. Mol. Med.* 84: 901-910.
- Shephard G.S., Sydenham E.W., Thiel P.G., Gelderblom W.C.A., (1990): Quantitative determination of fumonisins B₁ and B₂ by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Liquid Chromatography* 13: 2077-2087.
- Shim, W-B., Woloshuk, C.P., (1999): Nitrogen repression of fumonisin B1 biosynthesis in *Gibberella fujikuroi*. *FEMS Microbiology Letters* 177: 109-116.
- Solorzano L., (1969): Determination of ammonia in natural waters by the phenol hypochlorite method. *Limnology and Oceanography* 14: 799-801.
- Wöstemeyer J., Burmester A., Weigel C., (1987): Neomycin resistance as a dominantly selectable marker for transformation of the zygomycete *Absidia glauca*. *Curr. Genet.*, 12: 625-627.
- Yoshizawa T., Yamashita A., Luo Y., (1994): Fumonisin occurrence in corn from high- and low-risk areas for human esophageal cancer in China. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 1626-9.
- Zúñiga A, Torres J, Ubeda J, Pulido R., (1999): Interaction of mitogen-activated protein kinases with the kinase interaction motif of the tyrosine phosphatase PTP-SL provides substrate specificity and retains ERK2 in the cytoplasm. *J Biol Chem.* 274: 21900-21907.

Kohut Gábor - Publikációs lista

Ádám A.L., **Kohut G.**, Láday M. (2005): Identification of new molecular hallmarks for YSAPK MAPKs: application for cloning strategies in different filamentous fungal species. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica* **40**, 233-249.

Ádám A.L., **Kohut G.**, Hornok L. (2008): Cloning and characterization of a HOG-type MAP kinase encoding gene from *Fusarium proliferatum*. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica* **43**, 1-13.

Ádám A.L., **Kohut G.**, Hornok L. (2008): *Fphog1*, a HOG-type MAP kinase gene, is involved in multistress response in *Fusarium proliferatum*. *Journal of Basic Microbiology* **48**, 151-159.

Kohut G., Ádám A.L., Fazekas B., Hornok L. (2009): N-starvation stress induced *FUM* gene expression and fumonisin production is mediated via the HOG-type MAPK pathway in *Fusarium proliferatum*. *International Journal of Food Microbiology* **130**, 65-69.

Más témában megjelent publikáció

Kohut G., Oláh B., Ádám A.L., García-Martínez J., Hornok, L. (2009): Adenylyl cyclase regulates heavy metal sensitivity, bikaverin production, and plant tissue colonization in *Fusarium proliferatum*. *Journal of Basic Microbiology* In press.

Konferencia kiadványok

Ádám, A.L., **Kohut, G.**, Hornok, L. (2005): PCR based strategies for subgroup-specific cloning of MAP kinase genes from filamentous fungi. Central European Forum for Microbiology (CEFOM), Keszthely, *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*. S **52**.

Ádám, A.L., **Kohut, G.**, Hornok, L. (2006): The role of FPMK3, a HOG1-type MAP kinase encoding gene of *Fusarium proliferatum* in multiple abiotic stress tolerance. MMT vándorgyűlés, Keszthely, *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* S **53**.

Ádám, A.L., **Kohut, G.**, Hornok, L. (2007): Egy *hog1*-típusú MAP kináz gén, az *fpmk3* null-mutációja hiperozmotikus stressz hatására programozott sejthalált (*pcd*) okoz *Fusarium proliferatum*-ban. 53. *Növényvédelmi Tudományos Napok*, Budapest, MAE, p.28.

Kohut, G., Ádám, A. L., Fazekas, B., Hornok, L. (2008): Disruption of *Fphog1*, a MAPK encoding gene of *Fusarium proliferatum* results in increased fumonisin B1 production under N-starvation. 3rd International Symposium on FHB, Szeged, *Cereal Research Communications* **36**, p.451-453.

Ádám, A.L., **Kohut, G.**, Fazekas, B., Hornok, L. (2009): Abiotikus stresszfaktorok szerepe a mikotoxin bioszintézisben. 55. *Növényvédelmi Tudományos Napok*, Budapest, MAE, p.25.