



Szent István Egyetem
Gödöllő

**A MAT1-2-1 TRANSZKRIPCIÓS FAKTOR CÉLGÉNJEINEK AZONOSÍTÁSA
*FUSARIUM VERTICILLIOIDES*BEN**

Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

Keszthelyi Anita

Gödöllő
2007.

A doktori iskola neve: Biológiai Doktori Iskola

Tudományága: Biológia

Vezetője: Prof. Tuba Zoltán
tanszékvezető egyetemi tanár
Szent István Egyetem, Mezőgazdasági- és Környezettudományi Kar,
Növénytani és Növényélettani Tanszék

Témavezetők: Prof. Hornok László
az MTA levelező tagja,
tanszékvezető egyetemi tanár
Szent István Egyetem, Mezőgazdasági- és Környezettudományi Kar,
Mezőgazdasági Biotechnológiai és Mikrobiológiai Tanszék
és
Dr. Kerényi Zoltán
tudományos munkatárs
Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont, Gödöllő

.....
Dr. Tuba Zoltán
a doktori iskola vezetője

.....
Dr. Hornok László
témavezető

.....
Dr. Kerényi Zoltán
témavezető

Előzmények, kitűzött célok

A *Fusarium* fajok az egész világon elterjedt, széles gazdanövénykörű fonalas tömlősgombák. Egyik képviselőjük, a *Fusarium verticillioides* (Saccardo) Nirenberg, a kukorica egyik legjelentősebb kórokozója világszerte (Munkvold és Desjardins, 1997). Megbetegíti a csíranövényeket, ugyanakkor gyökér-, szár- és csőrothadást is okoz. Másodlagos anyagcseretermékként pedig mikotoxinokat, elsősorban fumonizineket termel. A fumonizinek különböző betegségek kiváltói. A szennyezett gabonafélék fogyasztásával akut vagy krónikus toxikózis léphet fel emberben és állatokban egyaránt. Többek között agyvelőgyulladás és mérgezés okozta májbetegséget vált ki lovakban, tüdőödémát sertésekben, juhokban pedig májkárosodást (Kriek et al. 1981). Az emberi nyelőcsőrák kialakulásáért részben a fumonizin B1-gyel szennyezett kukorica tartós fogyasztása a felelős (Marasas 2001; Myburg et al. 2002).

A fonalas gombák életciklusát hosszú ideje, széles körben vizsgálják annak érdekében, hogy minél több ismeretanyagot gyűjtsenek ezekről a gazdasági és egészségügyi szempontból is kiemelkedő jelentőségű kórokozókról. Az ivaros szaporodás a patogén gombák evolúciójában központi szerepet tölt be. Új patogén törzsek, változatok kialakulásához vezet, s e változatok képesek rezisztens fajtákat megbetegíteni, vagy megváltozik fungicidekkel szembeni ellenállóságuk. Mintegy tizenötezer gombának azonban nem ismert az ivaros alakja, s így nem tudjuk mi e mitotikus holomorfofok változékonyságának mozgató rugója (Arie et al. 2000).

Mivel az ivaroson kompatibilis haploid gombatörzsek morfológiailag megkülönböztethetetlenek egymástól és nem mutatnak sem hím, sem női nemi jelleget, az ivaros partnerek elkülönítése csupán párosodási típusaik alapján lehetséges (Bistis 1998). Dodge (1920) vizsgálta a heterotalliás aszkomicéta, *Ascobolus magnificus* párosodási típusának genetikai hátterét. Megfigyelte, hogy az ivaros szaporodással létrejövő utódokban a párosodási típusok 1:1 arányban oszlanak meg. Későbbi vizsgálatok alátámasztották a tömlősgombák párosodási típusának bipoláris jellegét, azt, hogy ezekben a szervezetekben az ivaros reprodukció egyetlen, két alléles lókuszt (*MAT*; mating type) szabályozása alatt áll (Coppin et al. 1997; Turgeon 1998).

A heterotalliás gombáknál, mint amilyen a *F. verticillioides* is, az ellentétes párosodási típusba tartozó törzsek csak egymással képesek ivaros kapcsolatba lépni. A heterotalliás fajok párosodási típusát egyetlen *MAT* lókuszon elhelyezkedő két eltérő idiomorf (*MAT1-1* és *MAT1-2*) határozza meg (Yoder et al. 1986; Yun et al. 2000). Ezek elnevezése és a bennük lévő gének száma fajtól függően változhat (Staben és Yanofsky, 1990; Glass et al. 1990). Ez idáig számos heterotalliás tömlősgomba párosodási típusa génjét klónozták és jellemezték, pl. a *Saccharomyces cerevisiae* (Hicks et al. 1979.), a *Schizosaccharomyces pombe* (Kelly et al. 1988), a *Neurospora*

crassa (Glass et al. 1990; Staben és Yanofsky, 1990), a *Podospora anserina* (Debuchy és Coppin, 1992) és a *Cochliobolus heterostrophus* (Turgeon et al. 1993) fajokét. Ezen fajok *MAT* lókuszaik közötti hasonlóságokat és különbségeket Turgeon et al. (1993), Nelson (1996), Coppin et al. (1997) és Wirsel et al. (1998) összegezték.

A gombák párosodási típusát meghatározó *MAT* gének szabályozzák a szexuális kompatibilitást és az ivaros reprodukciót. A párosodási típus rendszereknek több, erősen konzervatív eleme van, így a bonyolult feromon – feromon-receptor jelcsere vagy a *MAT* gének által kódolt transzkripciós faktorok, amelyek az ivaros szaporodáshoz szükséges gének expresszióját serkentve vagy gátolva szabályozzák az ivaros fejlődési szakaszt (Coppin et al. 1997). Ezen kívül a sejtciklus egyéb, ivaros reprodukciótól független folyamataiban is lényeges szerepet tölthetnek be (Turgeon 1998). A *MAT* gének a fertilizációt követő eseményekre is hatást gyakorolnak, úgymint a termőtestek képződése és sejtmagi felismerés folyamatára (Bistis és Raper, 1963; Zickler et al. 1995; Arnaise et al. 1997; Debuchy 1999).

Azokban a gombafajokban is működőképes, folyamatosan átíródó párosodási típus gének találhatóak, amelyekben ivaros szaporodást még nem figyeltek meg (Sharon et al. 1996; Wirsel et al. 1998; Arie et al. 2000; Yun et al. 2000; Kerényi et al. 2004), tehát a párosodásra való képesség hiánya nem a *MAT* génekben bekövetkezett mutáció következménye. Oka lehet azonban a párosodás elmaradásának a máig azonosítatlan, ivaros reprodukcióban résztvevő gének funkcionális rendezetlensége (Arie et al. 2000).

A *MAT* géntermékek sejtípus specifikus génekre gyakorolt hatásának vizsgálatára irányított génkiütéssel $\Delta MAT1-2-1$ mutáns törzseket állítottunk elő *F. verticillioides*ben. A mutánsok expressziós mintázatát a vad típushoz hasonlítottuk azzal a céllal, hogy alaposabban megismerjük a *MAT* géntermékeknek a párosodásban és/vagy az életciklus más lényeges eseményeinek szabályozásában betöltött szerepét. Ez a munka segítségünkre lehet abban, hogy megértsük azoknak a mechanizmusoknak a lényegét, amelyek lehetővé teszik a *Fusarium*ok és a velük rokonságban álló más gombák sikeres alkalmazkodását a folyamatosan változó ökológiai tényezőkhez. Munkánk hozzájárul továbbá e veszélyes gombák ellen irányuló védekezési stratégiák fejlesztéséhez.

Kutatómunkám célkitűzései az alábbiak voltak:

- a fonalas gombák ivaros szaporodásának alaposabb megismerése molekuláris szinten,
- a *MAT1-2-1* transzkripciós faktorok célgénjeinek azonosítása a fonalas aszkomicéta *F. verticillioides*ben és
- olyan biológiai folyamatok megismerése, amelyek a *MAT-1-2-1* gén szabályozása alatt állnak nemcsak az ivaros szaporodó, hanem az aszexuális fajokban is.

Módszerek

A gombatörzsek fenntartása és tenyésztése

Valamennyi gombatörzset steril paraffin olaj alatt, burgonya-glükóz táptalajra oltva, 4°C-on tároltuk. Az üvegszűrőn átszűrt konídium szuszpenziót -70°C-on tartottuk, 20%-os steril glicerinben.

Konídium termeléshez a *F. verticillioides* FGSC 7603 (genotípusa: *MAT1-1*) és FGSC 7600 (*MAT1-2*) törzseit CMC tápoldatba oltottuk és négy napig rázattuk (23-24°C, 180 rpm), (Cappellini és Peterson, 1965). 10⁸ db konídiummal inokuláltunk 100 ml komplett tápoldatot (CM) (Correll et al. 1987), amelyet három napig 24°C-on rázatva inkubáltunk. Genomi DNS izolálásához az így képződött micéliumot liofilizáltuk.

Szekvencia analízis

A szekvencia analízishez a Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpontban működő Gene Analyzer 3100 (Applied Biosystems) berendezést és ABI 3000 szekvenátort (Plant Research International, Wageningen, The Netherlands) használtunk. A kapott szekvenciákat a Lasergene (DNASar Inc., Madison, Wis.) és az FGENESH programmal (<http://www.softberry.com>), valamint BLAST módszerrel (Altschul et al. 1997) hasonlítottuk össze. Három különböző BLAST keresést végeztünk: BlastN-t és BlastX-et a GenBank EST-, illetve nr-adatbázisban és BlastN-t a *F. verticillioides*/*G. moniliformis* (<http://www.broad.mit.edu/annotation/fungi/fusariumverticillioides/>) ill. *Fusarium graminearum*/*Gibberella zeae* (<http://www.mips.gsf.de/genre/proj/fusarium/>) genom szekvencián.

A *FvMAT1-2-1* gén megszakítása

A higromicin rezisztenciát hordozó pAN7-1 vektorból (Punt et al. 1987) az *Escherichia coli* higromicin B foszfotranszferáz (*hygB*) génjét tartalmazó *hph* kazettát *hph_EcoRV_for* és *hph_EcoRV_rev* indítószekvenciákkal felsokszorozítottuk. A PCR-hez „Long PCR Enzyme Mix”-et (MBI Fermentas) használtunk, a gyártó utasításai szerint. A PCR terméket agaróz gélen elválasztottuk, majd „GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit”-tel (Amersham Biosciences) izoláltuk és *pBluescript II KS+* (Stratagene) vektorba ligáltuk. Az így kapott plazmidot pPHP-nak neveztük el.

A *F. verticillioides* FGSC 7603 törzs *MAT1-2* lókusának 4002 bp nagyságú darabját génbanki adatok alapján (*G. fujikuroi* *MAT1-2* – AF100926) tervezett FMATp1 – FMATp2 indítószekvenciákkal szaporítottuk fel. A polimeráz láncreakciókat 20 µl, illetve 25 µl térfogatban,

Biometra T3 Thermocycler készülékben hajtottuk végre, és a következő elegyet mértük össze: 20 ng templát DNS, 1×PCR puffer, 1,5 mM MgCl₂, 0,4 mM dNTP, 0,2 μM primer, 1 U *Taq* polimeráz, steril desztillált víz. A PCR terméket szintén *pBluescript* II KS+ vektorba ligáltuk és *NdeI* restriktációs enzimmel hasítottuk, majd feltöltöttük és CIAP-pal (Fermentas) kezeltük, a gyártó utasításai szerint. A *FvMAT1-2* szekvencia 1973 bp nagyságú *NdeI* fragmentjét a pHPH plazmidből származó 3,8 kb nagyságú *hph* kazettával helyettesítettük (pMAT7603/*hph* plazmid).

A transzformációhoz a *F. verticillioides* FGSC 7603 törzs konídiumait 9,5 órán keresztül YEPD-2G tápoldatban rázatva inkubáltuk (28°C, 180 rpm, 5 × 10⁶ db konídium/ml). A micéliumból Proctor és munkatársai (1997) által kidolgozott módszer szerint protoplasztokat hoztunk létre, amelyeket *NdeI* enzimmel linearizált pMAT7603/*hph* plazmiddal transzformáltuk. A transzformánsokat 200 μg/ml higromicint tartalmazó regenerációs tápközegen szelektáltuk. A rezisztens transzformánsokat 4-5 nap inkubációs idő elteltével szintén 200 μg/ml higromicinnel kiegészített komplett táptalajra oltottuk át és monospóráztuk. Higromicint nem tartalmazó CM csészékre történt többszöri átoltással, majd a szelektív táptalajra való visszaoltással győződünk meg az integráció stabilitásáról.

A vad típusú törzs és az 50 monospórázott transzformáns három napon keresztül (26°C, 180 rpm) CM tápoldatban rázatott tenyészetéből genomi DNS-t izoláltunk (Kerényi et al. 1999). A *hph* kazetta helyspecifikus beépülésének PCR-rel történő vizsgálatához a kiütött *FvMAT1-2-1* génre tervezett GfMAT2-r – GfMAT2-f, valamint a higromicin kazettára és a *FvMAT1-2* lókuszra tervezett FMATp1 – *hph_check2* és *hph_check1* – FMATp2 indítószekvenciákat használtuk.

Southern hibridizációhoz *hph* próbaként a *hph_check1* – *hph_EcoRV_rev*, *FvMAT1-2* próbaként pedig a GfMAT2-r – FMATp2, és GfMAT2-r – GfMAT2-f indítószekvenciákkal felsokszorozott PCR terméket használtuk.

Northern analízishez a Southern blottnál említett *hph* próbát, és a *FvMAT1-2-1* génre tervezett TMAT_for és TMAT_rev indítószekvenciákkal felszaporított és radioaktívan jelölt génrészletet használtuk. Az RNS membránok készítéséhez össz-RNS-t vontunk ki a törzsekből, TRI REAGENTTM (Sigma) segítségével. A Southern és a Northern hibridizációt Sambrook és Russel (2001) módszere szerint végeztük el.

Ivaros keresztezés

A *F. verticillioides* FGSC 7603 törzset (*MAT1-2*) és a $\Delta FvMAT1-2-1$ mutánsokat ($\Delta FvMAT1-2-1/6$, $\Delta FvMAT1-2-1/7$, $\Delta FvMAT1-2-1/15$) sárgarépa agaron (Klittich és Leslie, 1988) kereszteztük az ellentétes párosodási típusba tartozó *F. verticillioides* FGSC 7600 (*MAT1-1*) törzsszel (4 hét, 25°C, 12/12 órás sötét/világos fotoperiódus). A női partnerként használt törzs sárgarépa agaron növe micélium szövedékét kevertük össze a hím partner vizes agar csészéiről származó konídium

szuszpenziójával. A változásokat sztereo mikroszkópban vizsgálva, rendszeres időközönként feljegyeztük.

A cDNS-AFLP

Össz-RNS-t vontunk ki a *F. verticillioides* FGSC 7603 vad típusú és két $\Delta FvMAT1-2-1$ mutáns törzsből ($\Delta FvMAT1-2-1/7$ és $\Delta FvMAT1-2-1/15$) TRI REAGENT™ (Sigma) segítségével, majd mRNS-t izoláltunk „Oligotex mRNA Midi Kit”-tel (QIAGEN). 2 μ g mRNS-ből kiindulva az „Universal RiboClone® cDNA Synthesis System” (Promega) elnevezésű kittel kétszálú cDNS-t hoztunk létre. A cDNS-t *EcoRI* és *MseI* restrikciós enzimekkel emésztettük. A létrejött cDNS fragmentumok végeire helyspecifikus, kettős fonalú adaptereket ligáltunk, amelyekhez a nem szelektív *EcoRI* és *MseI* indítószekvenciák kötődtek a felsokszorosítás során. Egy előzetes PCR-t, úgynevezett preamplifikálást végeztünk, majd a kapott PCR termékeket szelektíven felsokszoroztuk olyan indítószekvenciák alkalmazásával, amelyek 3' végükön egy vagy két szelektív bázist hordoznak, ezért csak azok a restrikciós fragmentumok szaporíthatók fel, amelyekre jellemző, hogy az adapterek szekvenciája és a csatlakozó hasított vég szekvenciája megfelel a szelektív nukleotidok bázissorrendjének (Vos et al. 1995).

A cDNS-AFLP során nyolc *EcoRI* és 20 *MseI* indítószekvencia kombinációját használtuk. Azokat a cDNS-fragmentumokat tudtuk detektálni akrilamid gélen, amelyeknek legalább egy *EcoRI* végük volt, mivel az *EcoRI* indítószekvenciák 5' végét $[\gamma\text{-}^{33}\text{P}]\text{dATP}$ -vel radioaktívan jelöltük. A gélt Whatman szűrőpapírra szárítottuk, majd a differenciáló fragmentumokat kivágtuk és a szelektív amplifikáció során alkalmazott indítószekvencia-kombinációval újra felsokszoroztuk azokat. A PCR termékeket agaróz gélen elektroforézissel ellenőriztük és a megfelelő fragmentumokat pGEM®-T Easy (Promega) vektorba ligáltuk. Az így létrehozott, különböző cDNS fragmentumokat tartalmazó plazmidokkal Sambrook és Russel (2001) útmutatása alapján *E. coli* DH5 α (Stratagene) sejteket transzformáltuk. A megfelelő rekombináns plazmidot hordozó telepeket α -komplementációval, illetve kolónia PCR segítségével választottuk ki.

A mutáns és a vad típusú törzsek közötti expressziós különbségek bizonyítására Northern hibridizációs kísérleteket végeztünk. Próbaként a kolónia PCR-t követően gélből izolált, $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ -vel radioaktívan jelölt („Hexalabel DNA kit”, Fermentas) cDNS fragmentumokat használtuk.

cDNS könyvtár-készítés és nukleinsav hibridizálás – HD filter technika

A sárgarépa agaron növesztett vad típusú és $\Delta FvMAT1-2-1/15$ mutáns törzsek micéliumából „Qiagen RNA Isolation Kit” (Qiagen) segítségével össz-RNS-t vontunk ki, majd „Oligotex mRNA Kit”-tel (Qiagen) mRNS-t izoláltunk és $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ -vel radioaktívan jelölt kettős szálú cDNS-t

szintetizáltunk. A másodszáll szintézist és az adapter (*SalI*) ligálást követően, a cDNS egy részét *NotI* restrikciós enzimmel emésztettük, és oszlop-kromatográfiával osztályoztuk. A különböző frakciók cDNS mennyiségét, illetve koncentrációját szcintillációs detektorban határoztuk meg. Az emésztéssel kapott cDNS fragmentumokat *SalI-NotI* enzimekkel hasított (szelektív markerként ampicillin rezisztenciagént hordozó) pSPORT vektorba ligáltuk. Az így létrehozott plazmidokkal elektrokompetens *E. coli* DH10B (ElectroMAX™) sejteket transzformáltunk elektroprációval. A könyvtárkészítés valamennyi lépését a „SuperScript™ Plasmid System with Gateway® Technology for cDNA Synthesis and Cloning” (Invitrogen) kit leírásának megfelelően hajtottuk végre.

A sikeres transzformációt követően mindkét törzsből könyvtáranként 7680 db klónt válogattunk ki α -komplementációval. Az *E. coli* sejteket 20 db 384-es lemezbe oltottuk, és egy éjszakán át 70 μ l ampicillint (100 mg/ml) tartalmazó LB tápoldatban 37°C-on inkubáltuk. A könyvtárak minőségének ellenőrzését kolónia PCR-rel végeztük, amelyhez minden esetben a következő elegyet mértünk össze: 1 \times PCR puffer, 1,5 mM MgCl₂, 60 μ M dNTP, 0,3 μ M T7/SP6 indítószekvenciák, 1 U *Taq* polimeráz, steril desztillált víz. (A cDNS könyvtárakat LB freeze tápoldatban -80°C-on tároljuk.) Ezt követően szintén ampicillinnel kiegészített LB tápoldatot tartalmazó 8 \times 12 cm méretű csészéket készítettünk, amelyek felszínére méretre vágott Hybond N+ membránt helyeztünk. A nagy sűrűségű filtereket (HD filter) egy 384 tűskés feltéttel kiegészített robot segítségével készítettük el. Egy membrán négy darab 384-es lemeznek megfelelő számú telepet tartalmazott két példányban (2 \times 4 \times 384 = 3072 db telep/membrán).

A csészéket 18 órán keresztül 37°C-on inkubáltuk. Ezt követően a filtereket 0,5 M NaOH és 1,5 M NaCl elegyében áztattuk fejjel lefelé egy percen keresztül, majd az azonos pufferbe merített Whatmann szűrőpapírokra helyeztük négy percre. A műveletet 0,2 M Tris/HCl-t (pH 8,0) és 1,5 M NaCl-t tartalmazó oldatban megismételtük. A mosás utolsó lépéseként a filtereket a fent leírt módon 2 \times SSC-ben áztattuk és szobahőmérsékleten 30 percig szárítottuk, majd 30 másodpercig tartó UV kezeléssel a baktériumból szabadra váló nukleinsavat a membránra kötöttük.

A cDNS fragmentumok másik részét a nukleinsav hibridizáláshoz próbaként használtuk fel. A mutánsból és a vad típusból származó, jelölt cDNS próbát hibridizáltattuk mutáns és vad típusú filterrel. A filtereket 1-2 órán keresztül 65°C-on inkubáltuk, filterenként 2 ml, illetve csövenként ezen felül 5 ml prehibridizációs elegyben. (Az elegy minden 10 ml-e 100 μ l 5mg/ml-es hal DNS-t tartalmazott, amelyet 10 percig 96°C-on denaturáltunk, majd 10 percre jég közé helyeztünk.)

A jelölést [α -³²P]dATP-t és random, hattagú indítószekvenciákat használva „Random Primed DNA Labeling Kit” (Boehringer) segítségével végeztük. A próbákat „QIAquick Nucleotide Removal Kit”-tel (Qiagen) tisztítottuk, majd a hal DNS kezeléséhez hasonló módon denaturáltuk és a prehibridizációs elegyhez adtuk. A hibridizációt Sambrook és Russel szerint végeztük el (2001). A hibridizációs mintázatok „tif” fájlként való megjelenítésére a TINA szoftvert használtuk.

Mivel egyazon filter két példányát hibridizáltattuk mindkét törzs cDNS fragmentumaiból készült radioaktív próbákkal, a számítógéppel végzett képanalízis és egy, az adott jel helyzetéből adódó értékmódosító hatás felmérésére is képes program (AIS 4.0; Imaging Research Inc., Ontario, Canada) segítségével a jelintenzitásbeli eltérésekből következtetni tudtunk a vad típusú és a $\Delta FvMAT1-2-1/15$ törzs közötti gén expressziós különbségekre.

A nitriláz fehérjét kódoló gén megszakítása

A differenciál hibridizációval megismert 1143 bp nagyságú nitriláz szekvencia 5' és 3' végére kifelé író oligonukleotid indítoszekvenciákat terveztünk, majd SON PCR-rel (Antal et al. 2004) a nitriláz gént teljes egészében tartalmazó 4168 bp nagyságú szakasz (nitSON) szekvenciáját meghatároztuk. Ennek a szekvenciának az ismeretében, a *F. verticillioides* FGSC 7603 törzs genomi DNS-éről, nitSON_for – nitSON_rev indítoszekvenciákkal felszaporítottunk egy 2519 bp nagyságú szakaszt. A tisztított PCR terméket pKS-T vektorba ligáltuk, majd a plazmiddal *E. coli* DH5 α sejteket transzformáltunk.

A kiütő konstrukciót **A *FvMAT1-2-1* gén megszakítása** című fejezetben leírtak alapján hoztuk létre, és a transzformációt is annak megfelelően végeztük el. Azzal a különbséggel, hogy a nitriláz szekvencia 583 bp nagyságú *NcoI* fragmentumát cseréltük a pPHH plazmidból származó 3.8 kb nagyságú *hph* kazettára, és a transzformációhoz a plazmidot *SmaI* restrikciós enzimmel linearizáltuk.

A higromicin rezisztens, monospórázott transzformánsokból genomi DNS-t izoláltunk. A kiütött génrészletre tervezett indítoszekvenciákkal (nitközép_for – nitközép_rev) PCR-t hajtottunk végre.

Az *F. verticillioides* FGSC 7603 vad típusú és a $\Delta nit29$ nitriláz mutáns törzsek vizsgálatára öt különböző minimál táptalajt készítettünk, amelyek nitrogénforrásként 1 liter táptalajra nézve 1 g ammónium-tartarátot, 0,5 g nátrium-nitritet, 0,2 g adenint, 2 g nárium-nitrátot, illetve 20 g kálium-klorátot tartalmaztak.

Eredmények

A $\Delta FvMAT1-2-1$ mutáns törzsek létrehozása és vizsgálata

A *F. verticillioides* FGSC 7603 törzs *MAT1-2* lókusztát génbanki adatok (*G. fujikuroi* *MAT1-2* – AF100926) alapján tervezett indítoszekvenciákkal felszaporítottuk, klónoztuk és szekvenáltuk. A *FvMAT1-2* szekvencia 1973 bp nagyságú *NdeI* restrikciós enzim felismerő helyekkel határolt szakaszát helyettesítettük az *E. coli* *hygB* génjét tartalmazó higromicin expressziós kazettával (*hph*). Az így létrehozott pMAT7603/*hph* transzformáló vektorral *F. verticillioides* FGSC 7603 törzsből

létrehozott protoplasztokat transzformáltunk Proctor és munkatársai (1997) utasításai szerint. Ötven higromicin rezisztens kolóniát monospóráztunk, és antibiotikum-mentes CM táptalajra történő átoltással teszteltük a higromicin rezisztencia stabilitását. A *hph* kazetta gomba genomba történő helyspecifikus beépülését PCR-rel, Southern és Northern hibridizációs kísérletekkel igazoltuk. Négy transzformáns esetében bizonyítottuk a kettős rekombináció megtörténtét.

A három kiválasztott $\Delta FvMATI-2-1$ mutáns ($\Delta FvMATI-2-1/6$, $\Delta FvMATI-2-1/7$ és $\Delta FvMATI-2-1/15$) vad típusra jellemző növekedést mutatott komplett táptalajon és sárgarépas csészéken, továbbá a vad típushoz hasonlóan fehér, pelyhes micéliumot növesztett burgonya-glükóz táptalajon. A spóráképződésben és a spórák csírázásában sem tapasztaltunk eltérést a vad típushoz képest. Ugyanakkor nem voltak képesek a párosodásra a *F. verticillioides* FGSC 7600 (*MATI-1*) teszt törzssel függetlenül attól, hogy hím vagy női partnerként szerepeltek az ivaros keresztezési kísérletekben.

Gén expressziós analízis cDNS-AFLP-vel

A *F. verticillioides* FGSC 7603 és a $\Delta FvMATI-2-1$ mutáns törzsek gén expressziós különbségeinek kimutatására cDNS-AFLP kísérleteket végeztünk 320 indítószekvencia-kombináció felhasználásával. A vad típusú és mutáns törzsek között szignifikáns jelintenzitásbeli különbséget mutató cDNS fragmentumokat, PCR-rel történt szelektív felsokszorosítást követően, Northern hibridizációval vizsgáltuk. Az expressziós különbségek csak hat esetben voltak visszaigazolhatók. A hat klón szekvenciáját meghatároztuk, és génbanki adatokkal hasonlítottuk össze. Az öt, vad típusban erőteljesebb expressziót mutató klón közül az *EcoRI*-GC/*MseI*-AG1, amelynek szekvenciája a *S. pombe* cullin-1 homológjával mutatott 44%-os hasonlóságot, mindenképpen említést érdemel. Ez a fehérje fontos szerepet tölt be az ubikvitin ligáz komplex felépítésében, amely az ubikvitinek közreműködésével lezajló fehérje degradációs folyamatokban nélkülözhetetlen. Eredményeink szerint e folyamatokra a MAT transzkripciós faktorok is hatással vannak.

Gén expressziós analízis differenciál hibridizációval

A cDNS-AFLP klónok további vizsgálatát célzó hibridizációs kísérleteket Wageningenben, a Plant Research International-ben folytattuk, és ezzel párhuzamosan differenciál hibridizációs kísérleteket indítottunk a *MAT* lókusztípus specifikus gének expressziójára gyakorolt hatásának vizsgálatára.

cDNS könyvtárakat hoztunk létre a $\Delta FvMATI-2-1/15$ mutánsból és a vad típusú törzsből. Törzsenként 7680 db klónt gyűjtöttünk össze és hibridizáltattunk radioaktívan jelölt mutáns ill. vad típusú cDNS fragmentumokkal.

Egy automata képanalizáló program (AIS 4.0) segítségével kiválogattuk azokat a cDNS klónokat, amelyek eltérően expresszálódtak a vad típusban és a $\Delta FvMAT1-2-1/15$ mutánsban. Ezeket további vizsgálatnak vetettük alá.

Négyszeres jelintenzitásbeli különbséget tartottunk elegendőnek ahhoz, hogy nagy biztonsággal állíthassuk: a membránokon látható eltérések oka a két törzs eltérő expressziós mintázatában keresendő. Ennek alapján meghatároztuk 264 klón szekvenciáját. 24 esetben (9,1%) nem kaptunk olvasható eredményt. Az értékelhető fragmentumok nagysága 262 és 886 bp között volt, a szekvenciák átlagos hossza ~ 698 bp.

Egy alkalommal sikerült azonosítanunk a transzformációs konstrukcióból származó *hygB* gén szekvenciáját, amely egyedül a mutáns törzsben expresszálódott.

138 klón (57,7%) jóval gyengébb expressziót mutatott a mutáns törzsben, mint a vad típusban, ami azt jelzi, hogy átíródásukra a MAT1-2-1 transzkripciós faktor pozitívan hat. Ugyanakkor a *MAT1-2-1* gén termékének negatív szabályozó szerepe is van: 101 szekvencia (42,3%) megnyilvánulása erőteljesebb volt a mutánsban, a vad típushoz viszonyítva.

A BLAST keresések eredményeként 170 olyan szekvenciát azonosítottunk, amely lényeges hasonlóságot mutatott ismert gomba gének szekvenciáival. 34 klón csak a *F. verticillioides*szel igen távoli rokonságban álló organizmusokból származó génekkel mutatott hasonlóságot, míg 22 klón hipotetikus fehérjékkel adta a legnagyobb homológiát. 13 esetben a program nem talált adatbázisban fellelhető hasonlóságot, az adott keresési paraméterek mellett.

A klónok szekvenciáját egymással is összehasonlítottuk a SeqManII program (SeqMan II module of the Lasergene v. 5.0 software; DNASTAR) segítségével. Ennek megfelelően 48 klónt 14 kontigba soroltunk, mivel e klónok részben átfedő szekvenciákat tartalmaztak.

204, ismert fehérjékkel homológ cDNS klónt funkcionális csoportokba soroltuk Sacadura és Saville által 2003-ban módosított, de eredetileg White és Kerlavage (1996) által kidolgozott osztályozási rendszerének megfelelően. A besorolás során a kontigokat a klónokkal egyenértékűnek vettük.

A vad típus és a $\Delta FvMAT1-2-1/15$ mutáns törzs expressziós mintázatában jelentős különbséget tapasztaltunk. A fehérjeszintézisben részt vevő gének sokkal nagyobb számban jelentek meg a mutánsban erősebben megnyilvánuló szekvenciák között. A mutáns törzsben a felül-regulálódott klónok 20,4%-a a fehérjeszintézissel volt kapcsolatba hozható. Ez az érték a vad típusban csak 2,7% volt. Ezzel szemben, a $\Delta FvMAT1-2-1/15$ törzsben alul-regulálódott, jelfogás/jelátvitel kategóriát alkotó klónok száma négyszer több volt, mint az ugyanebbe a kategóriába sorolt, de a mutánsban erősebb expressziót mutató klónoké.

A vad típusban erőteljesebben átíródó szekvenciák jelentős hányadát (12,6%) nem tudtuk besorolni egyik kategóriába sem, amely azt jelzi, hogy a MAT1-2-1 transzkripció faktor számos, mai tudásunk szerint ismeretlen gén átíródását pozitívan befolyásolja.

A nitriláz fehérjét kódoló gén megszakítása

A $\Delta FvMAT1-2-1/15$ mutánsban gyengébben expresszáldott 18, részben átfedő szekvenciákat tartalmazó klón nukleinsav sorrendjéről származtatott aminosav szekvencia az *A. fumigatus* nitriláz fehérjéjével (EAL84990.1) 43%-os hasonlóságot mutatott.

Annak érdekében, hogy többet megtudjunk a nitrilázként azonosított gén funkciójáról, a klónok szekvenciáit alapul véve *hph* kazettát tartalmazó génkiütő konstrukciót terveztünk. Az így kapott nit/*hph* plazmiddal az FGSC 7603 törzsből létrehozott protoplasztokat transzformáltunk, azonban valamennyi transzformáns tartalmazta a kivágott, és *hph* kazettára cserélt nitriláz szekvenciát is. Ebből arra következtettünk, hogy a homológ rekombinációra lehetőséget nyújtó szekvenciák túlságosan rövidek voltak a helyspecifikus rekombinációhoz, ezért a *hph* kazetta véletlenszerű pozíciókban épült be a gomba genomjába.

Így létrehoztunk egy olyan génmegszakító konstrukciót SON-PCR segítségével, amelyben a *hph* kazettát a korábbinál jóval nagyobb nitriláz szekvenciák határolják. (A SON-PCR-rel meghatározott teljes nitriláz gén szekvenciáját az EMBL adatbankban helyeztük el, génbanki száma: DQ534528.)

A transzformációt követően a helyspecifikus rekombináció megtörténtét PCR-rel ellenőriztük, és egyetlen transzformáns esetében sikerült igazolnunk. Annak ellenére, hogy a nitriláz fehérje gombákban betöltött funkciójáról semmilyen információval nem rendelkezünk, csak feltételezhetjük, hogy a feromonérésben lehet szerepe, célszerűnek tartottuk megvizsgálni a mutáns viselkedését párosítási kísérletben az FGSC 7600 (*MAT1-1*) törzssel.

Sárgarépás csészéken a $\Delta nit29$ -es mutáns és a vad típus között növekedésbeli különbséget tapasztaltunk. A mutáns törzs sárgarépás táptalajon szokatlan, sötétkék színanyagot termelt, és a vad típushoz képest gyengébben növekedett.

A két törzs (a vad típus és a $\Delta nit29$) teszt-törzssel (FGSC 7600) való keresztezése során azonban nem tapasztaltunk jelentős eltérést, a mutáns hím és női partnerként is funkcióképes volt. Egyetlen különbséget a termőtestek érési idejében tapasztaltunk, és akkor is csak abban az esetben, amikor a nitriláz mutáns hím partnerként szerepelt a párosítási kísérletekben. Ekkor a keresztezést követő 14. napon már érett peritéciumokat detektáltunk. Ezzel szemben, a kontrollkeresztezésben (FGSC 7600+ – FGSC 7603>) csak a 19. napon figyelhettük meg az első érett termőtesteket és aszkospórákat.

Megvizsgáltuk a nitriláz mutáns vad típushoz viszonyított növekedési intenzitását különböző nitrogénforrásokon. 1 g/l koncentrációban ammónium-tartarátot és 0,2 g/l koncentrációban adenint tartalmazó minimál (MM) csészéken növesztve a mutáns törzs színanyagot termelt, amelyet a vad típus esetében nem tapasztaltunk, bár növekedési intenzitásukban nem volt számottevő különbség. Ezzel szemben, 0,5 g/l koncentrációban nátrium-nitrittel kiegészített MM csészéken a vad típus növekedésében elmaradt a mutánséhoz képest, és körvonalai határozottabbak voltak. Nátrium-nitrátos csészéken nem tapasztaltunk eltérést, míg 20 g/l kálium-klorátot tartalmazó táptalajon a vad típushoz képest kiemelkedő volt a nitriláz mutáns növekedési intenzitása.

Új tudományos eredmények

1. Higromicin foszfortranszferáz (*hph*) kazettát tartalmazó kiütő konstrukcióval $\Delta FvMAT1-2-1$ null-mutáns törzseket hoztunk létre. A mutánsok semmiféle morfológiai eltérést nem mutattak a vad típushoz képest, ugyanakkor nem voltak képesek a párosodásra az FGSC 7600 (*MAT1-1*) teszt törzsszel.
2. A $\Delta MAT1-2-1$ mutáns és a vad típusú törzsek közötti expressziós különbségek kimutatására differenciál hibridizációt végeztünk, és 226 cDNS klónt azonosítottunk, amelyek a MAT1-2-1 transzkripciós faktor által befolyásolt génekről származhattak.
3. A mutáns törzsben, illetve vad típusban felül-regulálódott szekvenciákat funkcionális csoportokba soroltuk, ezáltal körvonaloztuk a *MAT* gén inaktiválásával bekövetkező változásokat.
4. A legerősebb redundanciát mutató klón (a nitriláz) *MAT1-2-1* génnel való kapcsolatának feltárására $\Delta nit29$ nitriláz null-mutáns törzset hoztunk létre transzformációval. Vizsgálatokat indítottunk a nitriláz gén szabályozásának és az általa kódolt fehérje funkciójának megismerésére.

Következtetések és javaslatok

A MAT transzkripciós faktorok sejtípus specifikus gének expressziójára gyakorolt hatásának vizsgálatára a *F. verticillioides* FGSC 7603 törzsből irányított génkiütéssel $\Delta FvMAT1-2-1$ null-mutánsokat hoztunk létre. A vad típusú és mutáns törzsek expressziós mintázatában megnyilvánuló különbségek kimutatására kezdetben cDNS-AFLP módszert használtunk. A jelintenzitásbeli különbségek valódiságát Northern hibridizációval próbáltuk alátámasztani, majd a cDNS-AFLP-ből származó klónokról nagy sűrűségű filtereket készítettük, és azokat jelölt vad típusú, illetve mutáns cDNS fragmentumokhoz hibridizáltattuk.

Annak ellenére, hogy a cDNS-AFLP-vel kapott eredményeinket nem sikerült visszaigazolnunk, egyes gének (mint a higromicin foszfortranszferázt kódoló gén, amely kizárólag a mutáns törzsben expresszáldott) megjelenése arra utal, hogy jó úton indultunk el. Az általunk azonosított *EcoRI-GC/MseI-AG1* klón a *S. pombe* cullin-1 homológjával 44%-os hasonlóságot mutatott. Ez a fehérje az SCF ubikvitin ligáz komplex része. A MAT transzkripciós faktoroknak az ubikvitinek közreműködésével lezajló fehérje degradációs folyamatokra gyakorolt hatását Lee és munkatársai (2006) is leírták *F. graminearum*-ban.

Az cDNS-AFLP klónok vizsgálatával egy időben a MAT transzkripciós faktorok célgénjeinek azonosítására differenciál hibridizációs kísérleteket indítottunk, amelyhez cDNS könyvtárakat hoztunk létre a vad típusú és a $\Delta FvMAT1-2-1/15$ mutáns törzsből, majd hibridizáltattuk mind a mutáns, mind pedig a vad típus cDNS klónjaiból készített radioaktív próbákkal. A differenciál hibridizálással kapott eredményeink azt mutatják, hogy a *MAT1-2-1* gén irányított megszakítása a sejtbológia egészen eltérő területein működő gének transzkripciójára gyakorol hatást. A klónok 58%-a a vad típusban, 42%-uk pedig a mutánsban mutatott erőteljesebb expressziót, ami arra utal, hogy a célgén funkciójától függően a *MAT1-2-1* génnek pozitív és negatív szabályozó szerepe is lehet. Hasonló expressziós mintázatot kaptak Güldener és munkatársai (2006) különböző tenyésztési körülményeket használva *F. graminearum* „microarray” kísérletben.

Annak ellenére, hogy a génfunkciókat még nem vizsgáltuk, néhány klón, amelynek transzkripciós szintje a *FvMAT1-2-1* gén megszakítását követően nagymértékben csökkent, mindenképpen említést érdemel.

A nitriláz fehérjét kódoló fragmentumokat kivételesen nagy számban azonosítottuk a $\Delta FvMAT1-2-1/15$ mutánsban gyengébben expresszáldott klónok között, továbbá a mutáns és a vad típus között igen jelentős transzkripciós eltérést tapasztaltunk. A nitrilázok egyik alcsaládját alkotó enzimekről ismeretes, hogy jelmolekulák bioszintézisében vesznek részt (Brenner 2002). Arról azonban nem rendelkezünk információval, hogy mi lehet a nitrilázok ezen típusának gombákban betöltött szerepe. N-acetiltranszferáz aktivitásuknak köszönhetően elvben részt vehetnek olyan lipofil addícióban, ami az érett feromon előállításához szükséges a gombákban.

Az egyik mutánsban gyengébb expressziót mutató klón egy hosszabb részletét tartalmazza a *carO* génnek, amelyet a közelmúltban írtak le a *F. verticillioides* rokonában, a *Fusarium fujikuroi*-ban (Prado et al. 2004). A CarO fehérje az opszinok családjába tartozik. Az opszinok membrán fotoreceptorok, amelyek nélkülözhetetlenek az algák (Ridge 2002) és az állatok (Menon et al. 2001) fényérzékelésében. A fonalas gombák igénylik a fényt a párosodáshoz és az ivaros morfogenezishez, ezen kívül az ivartalan spórák képződése is fényfüggő a legtöbb gomba esetében.

A CarO fehérje gombák biológiai folyamataiban betöltött szerepének megismerése azonban további vizsgálatokat igényel.

Más géneket is azonosítottunk a $\Delta FvMAT1-2-1$ mutánsban alul-regulálódott klónok között (pl. *Magnaporthe grisea* WC-2 fehérjét kódoló gén), amelyek szintén fény által szabályozott folyamatokban vehetnek részt. A WC-2 fehérje a WC-1-gyel alkotja az úgynevezett „white collar complex”-et (WCC). A WCC egy transzkripciós faktor, amely kék fény-függő folyamatokat közvetít *N. crassaban*, mint amilyen a karotenogenezis, a konídiumképződés vagy az ivaros struktúrák fototropizmusa (Linden et al. 1997). Egy másik klón a calcium/calmodulin-függő protein kinázzal (CAMK-1) adott jelentős homológiát. A WCC és a CAMK-1 között egy bonyolult, sokrétű kölcsönhatás áll fenn. A WCC aktiválja a 24 órás biológiai ritmusért felelős fehérjét (FRQ) kódoló gén transzkripcióját. Ez a fehérje szükségszerűen gátolja az *frq* átíródását, pozitív visszacsatolást valósítva meg a WC fehérjék szintjén (Lee et al. 2000). A napszakos biológiai ritmus fenntartását translációt követő mechanizmusok (pl. foszforilálás) is segítik. Az FRQ foszforilálását elsősorban a CAMK-1 végzi, amelynek expresszióját pedig (eredményeink szerint) a MAT1-2-1 transzkripciós faktor szabályozza.

Egy sejtciklust gátló, illetve egy endogén biológiai óra által szabályozott fehérjével (CCG-6) hasonlóságot mutató klón expressziója a mutánsban kisebb mértékű volt, mint a vad típusban. A *Cryptococcus neoformans* egyik sejtciklust gátló fehérjéről ismeretes, hogy egy feromonokkal összefüggésben lévő fehérje hatása alatt áll, míg a *N. crassa* CCG-6 fehérjeje a biológiai ritmus 24 órás szabályozásában tölt be fontos szerepet (Bell-Pedersen et al. 1996). A mutáns törzsben szintén gyengébben megnyilvánuló *esdC* („essential for sexual development C”) homológáról tudjuk, hogy az *Aspergillus nidulans* ivaros szaporodásához nélkülözhetetlen (Nowrousian et al. 2005).

A közelmúltban két cikk jelent meg hasonló témakörben. Az egyikben Nowrousian és munkatársai (2005) ivaros szaporodásban résztvevő gének azonosítására *Sordaria macrospora* fejlődésbeli mutánsainak gén expressziós mintázatát hasonlították össze a vad típusal. Egy másik tanulmányban (Lee et al. 2006) a *G. zae* (*F. graminearum*) egyik $\Delta MAT1-2$ deléziós mutánsában alul-regulálódott géneket határoztak meg a növekedési stádium azon részében, amikor a vad típusban bőséges peritécium-képződés zajlott.

A három munka (beleértve a miénket is) részben átfedő eredményeket tartalmaz, ami nem meglepő, hiszen a változások minden esetben a gombák ivaros fejlődési szakaszát érintették.

A két korábbi tanulmány azt a fiziológiai állapotot vizsgálta, amikor az ivaros fejlődés motorja éppen beindul. Ezzel szemben mi a MAT1-2-1 gén szabályozó hatásának alaposabb megismerésére koncentráltunk azáltal, hogy a MAT géntermék vegetatív növekedés során betöltött szerepét próbáltuk nyomon követni a növekedés korai stádiumában. Elképzelésünk szerint a

miénkhez hasonló megközelítés segíthet megérteni a konstitutívan átíródó párosodási típus gének szerepét a vegetatív fejlődés szakaszában, illetve a csak ivartalanul szaporodó gombákban.

A fent említett különbségek ellenére néhány gén egyaránt előfordult a mi munkánkban és egyik vagy másik, előbb említett kísérletben is. Ezen klónok közül néhányan feltehetően részesei az ivaros folyamatoknak (pl. opszin, MAP kináz, esdC), de a többi szekvenciával kapcsolatban nem ismerünk olyan irodalmi adatot, ami alátámasztaná hasonló funkciójukat.

Mivel a feromon prekursor és a feromon receptor gének a MAT1-2-1 transzkripciós faktor igazolt célpontjai, kísérleteink kezdetén mi magunk is feltételeztük, hogy e gének fragmentumait megtaláljuk majd a mutánsban alul-regulálódott klónok között. Ilyen jellegű szekvenciákat azonban nem sikerült azonosítanunk, mint ahogyan Leenek és munkatársainak (2006) sem a *G. zea* MAT1-2 hiánymutánsal végzett kísérletükben.

A feromon prekursor és a feromon receptor gének hiánya a vad típusban szignifikánsan erősebb intenzitást mutató klónok között azzal magyarázzuk, hogy ezek a gének a növekedés kezdeti stádiumában még nem működnek olyan intenzitással, hogy transzkriptumaik jól észlelhetők legyenek, illetve oka lehet a jelenségnek még a párosodáshoz szükséges partner hiánya is.

A legígéretesebb cDNS klónok, amelyek redundánsan fordultak elő és/vagy erős expressziót mutatnak a vad típusban, a feromon – feromon-receptor bioszintézissel vagy akár a fény által indukált sejtbiológiai változásokkal hozhatók kapcsolatba, mindenképpen megérik a kitüntetett figyelmet. Ezek a gének minden valószínűség szerint közvetve vagy közvetlenül részt vesznek az ivaros folyamatokban. Érdeemes lenne megvizsgálni (mint ahogy ezt elkezdtek a nitriláz esetében): milyen következményekkel járhat ezen gének kiiktatása a gomba ivaros szaporodására, morfogenetikai változásaira nézve. Vagy akár olyan funkciók is felderíthetők, amelyek választ adnának arra a kérdésre, hogy miért nem tűnt el a *MAT* gén azokból a gombákból, amelyek a legjobb tudomásunk szerint nem élnek az ivaros reprodukció lehetőségével.

Irodalomjegyzék

Altschul S. F., Madden T. L., Schaffer A. A., Zhang J., Zhang Z., Miller W. and 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. and 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.

Arie T., Kaneko I., Yoshida T., Noguchi M., Nomura Y. and Yamaguchi I. (2000): Mating-type genes from asexual phytopathogenic ascomycetes *Fusarium oxysporum* and *Alternaria alternata*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 13:1330-1339.

Arnaise S., Debuchy R. and Picard M. (1997): What is a bona fide mating-type gene? Internuclear complementation of mat mutants in *Podospora anserina*. *Mol. Gen. Genet.* 256:169-178.

- Bell-Pedersen D., Shinohara M. L., Loros J. J. and Dunlap J.C. (1996): Circadian clock-controlled genes isolated from *Neurospora crassa* are late night-to early morning-specific. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93:13096-13101.
- Bistis G. N. (1998): Physiological heterothallism and sexuality in Euscomycetes: a partial history. *Fungal Genet. Biol.* 23:213-222.
- Bistis G. N. and Raper J. R. (1963): Heterothallism and sexuality in *Ascobolus stercorarius*. *Am. J. Bot.* 50:880-891.
- Brenner C. (2002): Catalysis in the nitrilase superfamily. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 12:775-782.
- Cappellini R. and Peterson J. L. (1965): Macroconidium formation in submerged cultures by a non-sporulating strain of *Gibberella zeae*. *Mycologia* 57:962-966.
- Coppin E., Debuchy R., Arnaise S. and Picard M. (1997): Mating types and sexual development in filamentous ascomycetes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61:411-428.
- Correll J. C., Klittich C. J. R. and Leslie J. F. (1987): Nitrate nonutilizing mutants of *Fusarium oxysporum* and their use in vegetative compatibility tests. *Phytopathology* 77:1640-1646.
- Debuchy R. (1999): Internuclear recognition: A possible connection between euscomycetes and homobasidiomycetes. *Fungal Genet. Biol.* 27:218-223.
- Debuchy R. and Coppin E. (1992): The mating-types of *Podospora anserina*: functional analysis and sequence of fertilization domains. *Mol. Gen. Genet.* 233:133-121.
- Dodge B. O. (1920): The life-history of *Ascobolus magnificus*: origin of the ascocarp from two strains. *Mycologia* 12:115-134.
- Glass N. L., Grotelueschen J. and Metzberg R. L. (1990): *Neurospora crassa* A mating-type region. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:4912-4916.
- Güldener U., Seong K.-Y., Boddu J., Cho S., Trail F., Xu J.-R., Adam G., Mewes H.-W., Muehlbauer G. J. and Kistler H. C. (2006): Development of a *Fusarium graminearum* Affymetrix GeneChip for profiling fungal gene expression in vitro and in planta. *Fungal Genet. Biol.* 43:316-325.
- Hicks J., Strahern J. N. and Klar A. J. S. (1979): Transposable mating type genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 282:478-483.
- Kelly M., Burke J., Smith M., Klar A. and Beach D. 1988: Four mating-type genes control sexual differentiation in the fission yeast. *EMBO J.* 7:1537-1548.
- Kerényi Z., Moretti A., Waalwijk C., Oláh B. and Hornok L. (2004): Mating type sequences in asexually reproducing *Fusarium* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:4419-4423.
- Kerényi Z., Zeller K., Hornok L. and Leslie J. F. (1999): Molecular standardization of mating type terminology in the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:4071-4076.
- Klittich C. J. R. and Leslie J. F. (1988): Nitrate reduction mutants of *Fusarium moniliforme* (*Gibberella fujikuroi*). *Genetics* 118:417-423.
- Kriek N. P. J., Kellerman T. S. and Marasas W. F. O. (1981): A comparative-study of the toxicity of *Fusarium-verticillioides* (= *F-moniliforme*) to horses, primates, pigs, sheep and rats. *Onderstepoort J. Vet.* 48:129-131.
- Lee K., Loros J. J. and Dunlap J. C. (2000): Interconnected feedback loops in the *Neurospora* circadian system. *Science* 289:107-110.
- Lee S. H., Lee S., Choi D., Lee Y. W. and Yun S.H. (2006): Identification of the down-regulated genes in a *mat1-2*-deleted strain of *Gibberella zeae*, using cDNA subtraction and microarray analysis. *Fungal Genet. Biol.* 43:295-310.
- Linden H., Ballario P. and Macino G. (1997): Blue Light Regulation in *Neurospora crassa*. *Fungal Genet. Biol.* 22:141-150.

- Marasas W. F. O. (2001): Discovery and occurrence of the fumonisins: a historical perspective. *Environ. Health Perspect.* 109:239-243.
- Menon S. T., Han M. and Sakmar T. P. (2001): Rhodopsin: structural basis of molecular physiology. *Physiol. Rev.* 81:1659-1688.
- Munkvold G. P. and Desjardins A. E. (1997): Fumonisins in maize. Can we reduce their occurrence? *Plant Dis.* 81:556-564.
- Myburg R. B., Dutton M. F. and Chaturgoon A. A. (2002): Cytotoxicity of fumonisin B1, diethylnitrosamine, and catechol on the SNO esophageal cancer cell line. *Environ. Health Perspect.* 110:813-815.
- Nelson M. A. (1996): Mating systems in ascomycetes: a romp in the sac. *Trends Genet.* 12:69-74.
- Nowrousian M., Ringelberg C., Dunlap J. C., Loros J. J. and Kück U. (2005): Cross-species microarray hybridization to identify developmentally regulated genes in the filamentous fungus *Sordaria macrospora*. *Mol. Genet. Genomics* 273:137-149.
- Prado M. M., Prado-Cabrero A., Fernandez-Martin R. and Avalos J. (2004): A gene of the opsin family in the carotenoid gene cluster of *Fusarium fujikuroi*. *Curr. Genet.* 46:47-58.
- Proctor R. H., Hohn T. M. and 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. P., Dingemanse M. A., Pouwels P. H. and 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.
- Ridge K. D. (2002): Algal rhodopsins: phototaxis receptors found at last. *Curr. Biol.* 12:588-590.
- Sacadura N. T. and Saville B. J. (2003): Gene expression and EST analyses of *Ustilago maydis* germinating teliospores. *Fungal Genet. Biol.* 40:47-64.
- Sambrook J. and Russell D. W. (2001): *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Sharon A., Yamaguchi K., Christiansen S., Horwitz B. A., Yoder O. C. and Turgeon B. G. (1996): An asexual fungus has the potential for sexual development. *Mol. Gen. Genet.* 251:60-68.
- Staben C. and Yanofsky C. (1990): *Neurospora crassa* a mating-type region. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:4917-4921.
- Turgeon B. G. (1998): Application of mating type gene technology to problems in fungal biology. *Annu. Rev. Phytopathol.* 36:115-137.
- Turgeon B. G., Bohlmann H., Ciuffetti L. M., Christiansen S. K. and Yang G. (1993): Cloning and analysis of the mating type genes from *Cochliobolus heterostrophus*. *Mol. Gen. Genet.* 238:270-284.
- Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., van-de Lee T., Hornos M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M. and Zabeau M. (1995): AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23:4407-4414.
- White O. and Kerlavage A. R. (1996): TDB: new databases for biological discovery. *Methods Enzymol.* 266:27-40.
- Wirsel S., Horwitz B., Yamaguchi K., Yoder O.C. and Turgeon B.G. (1998): Single mating type-specific genes and their 3' UTRs control mating and fertility in *Cochliobolus heterostrophus*. *Mol. Gen. Genet.* 259:272-281.
- Yoder O. C., Valent B. and Chumley F. (1986): Genetic nomenclature and practice for plant pathogenic fungi. *Phytopathology* 76:383-385.
- Yun S. H., Arie T., Kaneko I., Yoder O. C. and Turgeon B. G. (2000): Molecular organization of mating type loci in heterothallic, homothallic, and sexual *Gibberella/Fusarium* species. *Fungal Genet. Biol.* 31:7-20.
- Zickler D., Arnaise S., Coppin E., Debuchy R. and Picard M. (1995): Altered mating-type identity in the fungus *Podospira anserina* leads to selfish nuclei, uniparental progeny, and haploid meiosis. *Genetics* 140:493-503.

PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

TUDOMÁNYOS DOLGOZATOK:

Anita Keszthelyi, Apor Jeney, Zoltán Kerényi, Odette Mendes, Cees Waalwijk & László Hornok (2007): Tagging target genes of the MAT1-2-1 transcription factor in *Fusarium verticillioides* (*Gibberella fujikuroi* MP-A). *Antonie van Leeuwenhoek* (megjelenés alatt)

Waalwijk, C., **Keszthelyi, A.**, van der Lee, T., Jeney, A., de Vries, I., Kerényi, Z., Mendes, O. and Hornok, L. (2006): Mating type loci in *Fusarium*: structure and function. *Mycotoxin Research* 22: 54-60.

MÁS TÉMÁBAN MEGJELENT TUDOMÁNYOS DOLGOZATOK:

Jeney, A., Béki, E., **Keszthelyi, A.**, Leslie, J.F. and Hornok, L. (2007): Cloning and characterization of *Fpmtr*, an amino acid transporter gene of *Fusarium proliferatum* (*Gibberella intermedia*). *Journal of Basic Microbiology* 47(1): 16-24.

KONFERENCIA ELŐADÁSOK, POSZTEREK:

Keszthelyi A., de Vries, I., Jeney A., Kerényi Z., Mendes, O., van der Lee, T., Waalwijk, C., Hornok L. (2005): Tagging potential target genes of the MAT1-2-1 transcription factor in *Fusarium verticillioides* (*Gibberella fujikuroi* MP-A). A Magyar Mikrobiológiai Társaság Nagygyűlése és a 1st Central European Forum for Microbiology, Keszthely

Jeney A., **Keszthelyi A.**, Hornok L. (2005): Inactivation of *Fpmtr*, an unusual amino acid transporter gene disturbs sexual and parasexual events in *Fusarium proliferatum*. A Magyar Mikrobiológiai Társaság Nagygyűlése és a 1st Central European Forum for Microbiology, Keszthely

Oláh B., Kerényi Z., Jeney A., **Keszthelyi A.**, Hornok L. (2005): Cloning and characterization of *Fpac1*, an adenylate cyclase gene from *Fusarium proliferatum*. A Magyar Mikrobiológiai Társaság Nagygyűlése és a 1st Central European Forum for Microbiology, Keszthely

Keszthelyi A., de Vries, I., Jeney A., Kerényi Z., Mendes, O., van der Lee, T., Waalwijk, C. and Hornok L. (2005): Transcript profile changes in a Δ MAT-2 strain of *Fusarium verticillioides* (*Gibberella fujikuroi* MP-A). *MycoGlobe EU-USA Bilateral Workshop on Toxigenic Fungi and Mycotoxins, New Orleans, USA*

Jeney A., Béki E., **Keszthelyi A.**, Hornok L. (2004): Fonalasgombák aminosav transzporterei, egy hipotetikus aminosav permeáz gén izolálása *Fusarium proliferatum*ból. *Magyar Mikrobiológiai Társaság Nagygyűlése, Keszthely*

Ádám A.L., Oláh B., Kerényi Z., **Keszthelyi A.** és Hornok L. (2004): Jelátviteli útvonalak a *Giberella fujikuroi*-ban. *A Magyar Mikrobiológiai Társaság Nagygyűlése, Keszthely*

Keszthelyi A., Kerényi Z., Posta K. és Hornok L. (2004): Transzkripciós profilok összehasonlítása egy, a párosodási típus génjében null-mutáns és a vad típusú törzs között a *Fusarium verticillioides*-ben (*Gibberella fujikuroi*). *A Magyar Mikrobiológiai Társaság Nagygyűlése, Keszthely*

This document was created with Win2PDF available at <http://www.win2pdf.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.
This page will not be added after purchasing Win2PDF.