

KAROTINTERMELŐ JÁROMSPÓRÁS GOMBÁK GENETIKAI MÓDOSÍTÁSÁNAK LEHETŐSÉGEI

Csernetics Árpád

Témavezető:

Dr. Papp Tamás, Egyetemi docens



Biológia Doktori Iskola
Szegedi Tudományegyetem
Természettudományi és Informatikai Kar
Mikrobiológiai Tanszék

Szeged

2011

Bevezetés

A járomspórás gombák nagy gyakorlati jelentőséggel bírnak orvosi, ipari, biotechnológiai és mezőgazdasági szempontból is. Egyes fajok, mint zigomikózist okozó opportunistáknak patogének érdemelnek figyelmet, mások genetikai modellorganizmusok, illetve számos faj akad közöttük, amelyeket a biotechnológiai iparban hasznosítanak.

A karotinoidok az egyik leggyakrabban előforduló és legváltozatosabb természetes pigmentcsoport. Alapvető szerepük van mind fotoszintetizáló, mind heterotróf szervezetekben. Régóta ismert antioxidánsok, újabban daganatos megbetegedésekkel szembeni védő és az immunrendszert erősítő hatásukat is kimutatták. Előállításuk az iparban elsősorban kémiai szintézissel történik, azonban egyre nagyobb igény mutatkozik a természetes forrásból származó, ezen belül is a mikroorganizmusokkal előállított vegyületek iránt. A mikrobiológiai eredetű karotinoidok felhasználásának azonban egyik legfőbb akadálya jelenleg a termelékenység alacsony szintje. A legnagyobb mennyiségben előállított és forgalmazott karotinoid a β -karotin, mely egyben a járomspórás gombák által szintetizált karotinoidok közül is a legjelentősebb. Ugyanakkor az utóbbi években mind az ipar, mind az alap kutatás egyre növekvő érdeklődést mutat a β -karotin oxigenált származékainak (xantofillok), különösen a piros színű keto-származékok bioszintézise iránt is.

A járomspórás gombák, különösen a *Phycomyces*, a *Blakeslea* és a *Mucor* nemzetségek tagjai, régóta használt modell organizmusai a karotin bioszintézis biokémiai és genetikai tanulmányozásának. A *Mucor* fajok közül részletesebben a *Mucor circinelloides* karotinoid bioszintézisét tanulmányozzák. Ez a gomba rendelkezik néhány, mind a bioszintetikus út vizsgálata, mind a lehetséges alkalmazások szempontjából is rendkívül előnyös tulajdonsággal. Ilyen pl. a hatékony genetikai transzformáció lehetősége, a heterológ gének kifejeződése vagy a morfológiai dimorfizmus

jelensége. Mindezek mellett sok a karotin termelésében megváltozott mutáns törzset izoláltak, illetve több, a karotinszintézissel kapcsolatos gén szekvenciáját azonosították, sokat közülük részletesen jellemeztek is.

A gének funkcionális vizsgálatához és a biotechnológiai szempontból jelentős törzsek módosításához nélkülözhetetlenek a stabil transzformánsokat eredményező transzformációs rendszerek. Ugyanakkor viszonylag kevés járomspórás gombafaj esetében számoltak be sikeres transzformációról, ugyanis a járomspórás gombáknál a genetikai vizsgálatok és módosítások során nehézséget jelent a cönocitikus fonalas felépítés; egy feltételezett genomvédő mechanizmus, amely képes eliminálni a bejuttatott idegen DNS-t; illetve a bejuttatott DNS sorsát illetően is korlátozottak ismereteink. További nehézséget jelent, hogy a járomspórás gombákba bejuttatott cirkuláris DNS autonóm replikálódó elemként marad fenn, anélkül, hogy beépülne a gazda genomjába. Az integráció kikényszeríthető, ha olyan lineáris fragmentumokkal végezzük a transzformációt, melyek a kettős rekombinációt irányító homológ szakaszokat hordoznak. Egy másik, gombáknál viszonylag újonnan alkalmazott módszer, az *Agrobacterium tumefaciens*-közvetített transzformáció, amely szintén integrációt eredményez.

Célkitűzések

Munkánk során célul tűztük ki, hogy rekombináns technikákat, valamint a genetikai transzformáció különféle eljárásait alkalmazva a *M. circinelloides* karotinoid bioszintézisét úgy módosítsuk, hogy a létrehozott törzsek β -karotin termelése növekedjen, illetve a β -karotinon kívül más értékes karotinoidok (pl. asztaxantin és kantaxantin) termeltetése is lehetővé váljon. Célunk volt az is, hogy olyan a genetikai transzformációra, illetve a transzformánsok jellemzésére alkalmas módszereket dolgozzunk ki, illetve optimalizáljunk, melyek eredményesen használhatók fel a fonalas gombák

karotin termelésének befolyásolását célzó elméleti és alkalmazott kutatások során.

Munkánk során ezért a következő konkrét célok megvalósítását tűztük ki:

1. A *M. circinelloides* kétszeres auxotróf mutáns MS12 törzs karotinoid termelésének módosítása olyan xantofilok termeltetése érdekében, amiket a gomba eredetileg nem szintetizál. Ezt a *Paracoccus* sp. N81106 törzs asztaxantinintermelő tengeri baktérium génjeit hordozó autonóm replikálódó expressziós vektorokkal kívántuk megvalósítani.

2. A *M. circinelloides* MS12 törzs izopentenil-pirofoszfát izomeráz kódoló génjének klónozása és jellemzése. Az MS12 törzs β -karotin termelésének fokozása három, a nem karotinoid-specifikus izoprén bioszintézis út génjeit (*ipi*, *isoA* és *carG*) hordozó autonóm replikálódó expressziós vektorok segítségével.

3. A xantofilok termeltetéséhez szükséges bakteriális eredetű gének integrációja a gomba genomjába különböző transzformációs rendszerek alkalmazásával.

Alkalmazott módszerek

DNS és RNS alapú technikák:

- ✓ DNS tisztítása
- ✓ RNS tisztítása, cDNS szintézise
- ✓ DNS/RNS gélelektroforézis
- ✓ polimeráz láncreakció, inverz PCR, valós idejű PCR (qPCR)
- ✓ DNS fragmentumok klónozása, DNS szekvenálás
- ✓ plazmid konstrukciók létrehozása
- ✓ baktériumok transzformációja
- ✓ plazmid DNS tisztítása
- ✓ plazmid menekítés
- ✓ Southern hibridizáció
- ✓ Northern hibridizáció

Nukleotid és aminosav szekvencia adatok elemzése:

- ✓ nukleotid szekvenciák analízise és összehasonlítása
- ✓ a nukleotid szekvenciákból származtatott aminosav szekvenciák meghatározása és összehasonlítása

Gombák genetikai transzformációja:

- ✓ gombaprotoplasztok képzése
- ✓ gombaprotoplasztok polietilén-glikol (PEG)-közvetített transzformációja autonóm replikálódó és integrációt eredményező expressziós vektorok alkalmazásával
- ✓ *Agrobacterium tumefaciens*-közvetített transzformáció
- ✓ monosporangialis telepek izolálása, mitotikus stabilitás vizsgálata

Analitikai módszerek

- ✓ karotinoidok tisztítása gombából
- ✓ karotinoid minták analízise spektrofotometriás méréssel, vékonyréteg kromatográfiával (TLC) és nagyhatékonyságú folyadék kromatográfiával (HPLC)

Eredmények

1. A *Paracoccus* sp. N81106 törzs β -karotin hidroxilázt kódoló *crtZ* és β -karotin ketolázt kódoló *crtW* gének heterológ expressziója *M. circinelloides*-ben.

A *Paracoccus* sp. N81106 törzs *crtZ* és *crtW* génjeit *M. circinelloides* glicerinaldehid-3-foszfát dehidrogenázt kódoló *gpdI* szabályozó régióival építettük össze. A vektorokkal külön-külön és párban is transzformáltuk az MS12 törzset. Northern hibridizációval igazoltuk, hogy a gének kifejeződnek a gombában.

Igazoltuk, hogy az MS12 törzs szintetizál zeaxantint és β -kriptoxantint (a β -karotin hidroxiszármazékait), vagyis az MS12 törzs rendelkezik β -karotin hidroxiláz aktivitással. Ezért elegendő a β -karotin ketolázt kódoló *crtW* gén kifejeztetése a gombában asztaxantin, kantaxantin, ehinenon, valamint egyéb ketolált xantofillok termeltetéséhez. A *crtW* gént hordozó transzformáns törzseknél, illetve a kotranszformánsoknál a vad típusú törzshöz képest megváltozott karotinösszetételt tapasztaltunk: nagy mennyiségben termeltek kantaxantint, ehinenont és kis mennyiségben

asztaxantint. A kísérletek során bizonyítottuk, hogy a *M. circinelloides* szintetizál γ -karotint.

2. Az izoprén bioszintézis út gének túlműködtetése *M. circinelloides*-ben, a transzformánsok karotin termelésének és a bejuttatott idegen DNS sorsának elemzése.

A járomspórás gombákban a mevalonsav – izoprén bioszintézis útvonalból ágazik le a karotinoidok bioszintetikus reakcióját. Munkánk ezen részében arra a kérdésre kerestük a választ, hogy a nem karotin-specifikus izoprén bioszintézis út génjeinek túlműködtetése fokozza-e a karotinoid termelést, és ha igen, milyen mértékű ez a változás, és melyik gén túlműködtetése okozza a legnagyobb változást?

Munkánk során klónoztuk és jellemeztük a *M. circinelloides* izopentenil-pirofoszfát izomerázt kódoló *ipi* génjét. Az azonosított DNS szekvencia egy 910 bp hosszú kódoló régiót és 787 bp upstream és 361 bp downstream határoló régiókat tartalmaz, amelyet adatbázisban rögzítettünk (EMBL azonosító: AM903092). A gén négy intronnal (57, 57, 61 és 57 bp) tagolt és egy mindössze 225 aminosavból álló fehérjét kódol. A feltételezett IPP izomeráz molekulatömege 26,124 kDa, katalitikus régiója (18 – 208 aminosav) a konzervált NUDIX hidroláz domén család jellemzőit (NUcleoside DIphosphate linked to some other moiety X, 49 - 199 aminosav) mutatja. Az aktív hely kialakításában feltételezhetően fontos konzervált cisztein és glutaminsav maradékokat (Cys85, C⁸⁵ és Glu147, E¹⁴⁷) szintén azonosítottuk.

Az izopentenil-pirofoszfát izomerázt kódoló *ipi*, a farnezil-pirofoszfát szintázt kódoló *isoA* és a geranilgeranil-pirofoszfát szintázt kódoló *carG* géneket (Csernetics és mtsi. 2011, Velayos és mtsi. 2003, 2004) autonóm replikálódó plazmidokba építettük. A három gént *M. circinelloides gpdI* génjének szabályozó régióival is összeépítettük, mivel a gén promotere erősen kifejeződő és indukálható a táptalaj glükóz

koncentrációjának fokozásával. A transzformációs kísérletekbe a korábban már említett, szintén *gpdI* szabályozó régiókkal összeépített *crtW* gént hordozó plazmidot is bevontuk. A vektorokkal külön-külön és azonos konstrukción belül párban, minden lehetséges génkombinációban, elvégeztük az MS12 törzs PEG-közvetített transzformációját.

Southern hibridizációs kísérletekkel igazoltuk, hogy a transzformáns törzsek autonóm replikálódó elemekként tartják fenn a plazmidokat. Több transzformáns esetében igazoltuk, hogy történtek plazmid DNS átrendeződések. Valós idejű PCR segítségével igazoltuk, hogy az *ipi*, *isoA*, *carG* gének egy kópiában vannak jelen a vad típusú *Mucor* genomban. Vizsgáltuk a transzformánsokba bejuttatott transzformáló vektorok relatív kópiaszámát is, amely 0,07-7 plazmid/genom értékek között változott és az átoltások során folyamatosan ingadozott. A kotranszformánsok többségében a plazmidok egyenlőtlen eloszlását mértük, illetve ugyanazon kotranszformánsban a heterológ gént hordozó plazmid kópiaszáma alacsonyabb volt, mint a homológ gént hordozó plazmidoké. A vizsgált transzformánsok stabilak voltak mind szelektív, mind nem-szelektív körülmények között.

Meghatároztuk az MS12 törzs izoprén génjeinek aktinhoz, valamint egymáshoz viszonyított relatív transzkripciós szintjeit, a transzkripciós szintek időbeni, valamint a glükóz koncentráció fokozásával járó esetleges változását valós idejű PCR segítségével. Az aktinnal összehasonlítva mindhárom gén transzkripciós szintje alacsony volt: az *ipi* és *isoA* gének transzkripciója a csírázó sporangiospórákban volt a legaktívabb, majd az idő előrehaladtával lecsökkent, míg a *carG* folyamatosan alacsony transzkripciós szintet mutatott. A glükóz koncentráció fokozása némiképp csökkentette mindhárom gén transzkripcióját. A megemelt gén-kópiaszámok megnövekedett transzkripciós szinteket eredményeztek a transzformánsokban.

Megállapítottuk, hogy a *gpdI* promóter szabályozása alatt álló géneket hordozó transzformáns törzsek esetén a 2,5% glükóz koncentráció az 1% glükózhoz képest a gének transzkripciójának növekedését okozza, ugyanakkor az 5%-os glükóz koncentráció már nem eredményez változást, sőt néhány esetben csökkentette is azt.

A mérési körülmények optimalizálása után a karotin termelést spektrofotometriás, TLC és HPLC vizsgálatokkal határoztuk meg. A transzformánsokban a relatív plazmid kópiaszám és vele együtt a relatív transzkripciós szintek ingadozása a karotin termelés ingadozását eredményezte. Az izoprén bioszintézis út gének túlműködtetése fokozta a karotin termelést az MS12 törzs karotin termeléséhez képest. A legnagyobb mértékű növekedés minden esetben a *carG* gént hordozó vektorral transzformált törzseknél volt megfigyelhető. Egyes kotranszformáns törzsekben három-négyszeresére nőtt a karotin termelés a vad típusú törzshöz képest. A transzformánsok karotin összetételében nem tapasztaltunk eltérést. A *crtW* gént is hordozó kotranszformánsok esetében a *carG+crtW* és az *ipi+crtW* génkombinációk eredményezték a legnagyobb egységnyi szárazanyag tartalomra vonatkoztatott karotinoid tartalmat és egyben a legtöbb ketolált β -karotin származékot (nagy mennyiségben kantaxantint és ehinenont, kis mennyiségben asztaxantint). A magasabb glükóz koncentráció nem fokozta az egységnyi szárazanyag tartalomra vonatkoztatott karotinoid tartalmat, viszont a biomassza növekedését eredményezte.

3. A *crtW* gén integrációja a *M. circinelloides* genomjába különböző transzformációs módszerekkel.

A korábbi kutatások tapasztalatai szerint a járomspórás gombákba bejuttatott plazmidokat a gombák autoreplikatív módon hordozzák, anélkül, hogy a bejuttatott DNS (vagy annak egy része) integrálódna a genomba. Ha sikerülne a plazmidokat a gomba genomjába integrálni, akkor elkerülhető

lenne a plazmid kópiaszám és vele együtt a karotinoid tartalom ingadozása a transzformánsokban. Ennek érdekében a *crtW* gént három különböző transzformációs módszerrel integráltuk a *M. circinelloides* genomjába: kettős rekombináción alapuló szubsztitúcióval, restriktációs enzim-közvetített integrációval (REMI), valamint *Agrobacterium tumefaciens*-közvetített transzformációval (ATMT). A körülmények optimalizálása után sikeres transzformációt hajtottunk végre mindhárom módszerrel. Az ATMT nem, azonban a másik két módszer stabil transzformánsokat is eredményezett.

PCR segítségével igazoltuk, hogy a *crtW* gén jelen van a transzformánsokban. Az integrációt minden esetben Southern hibridizációs technikával igazoltuk, illetve inverz-PCR technika segítségével vizsgáltuk az integráció helyét. A vizsgálatok során kimutattuk, hogy az integráció általában egy kópiában történt, ugyanakkor esetenként a REMI és az ATMT többkópiás integrációt eredményezett. Kimutattuk, hogy történtek DNS átrendeződések. A szubsztitúción alapuló integráció egy esetben igazolható volt, ugyanakkor a módszerek többsége ektopikus integrációt eredményezett. A Southern hibridizációs vizsgálatok alapján feltételezhetőek a genomban ún. „hotspot”-ok, de azok szekvenciáját nem sikerült meghatároznunk.

A *crtW* gén kópiaszámát qPCR segítségével határoztuk meg. Egyes transzformánsokban közvetlenül a transzformáció után a bakteriális eredetű gén kópiaszáma 0,001-0,5 kópia/genom között változott. Ez az alacsony relatív kópiaszám az átoltások során emelkedett a transzformánsok egy részében és elérte az 1 körüli kópiaszámot genomonként; ezekben feltételezzük a homokariotikus állapot elérését. Más transzformánsokban 13 átoltási ciklus után is alacsony maradt a kópiaszám, úgy tűnik, hogy ezekben a törzsekben fennmaradt a heterokariotikus állapot. Izoláltunk olyan transzformánsokat is, amelyekben a transzformációt követően már eleve magas volt a vizsgált gén relatív kópiaszáma, majd tizenhárom átoltási

ciklus után a 200 kópia/genom értéket is meghaladta. Ez az extrém magas kópiaszám a Southern hibridizációs és az inverz-PCR adatok figyelembevételével többféleképp magyarázható: egyik lehetőség szerint a gomba genomba integrálódott idegen DNS pontatlanul kivágódott, majd cirkularizációt követően képes volt nagy kópiaszámában felszaporodni. A lineáris fragmentumok összekapcsolódása, azaz egy óriásmolekula keletkezése is magyarázhatja a magas kópiaszámot. Ezen óriásmolekula ugyanakkor integrálódhatott a gomba genomjába, ez esetben a lineáris fragmentumok tandem ismétlődése figyelhető meg.

Igazoltuk, hogy a *crtW* gén kifejeződik a transzformánsokban és a gén transzkripció szintjének változása követi a kópiaszám változását. A glükóz koncentráció emelése fokozott génextpressziót eredményezett.

Vizsgáltuk a transzformáns törzsek karotin termelését. Sikerült olyan törzseket izolálnunk, melyek nagy mennyiségű xantofillt, azon belül is kantaxantint és ehinenont termelnek. Ezekben a törzsekben a *crtW* gén relatív kópiaszáma magas volt. Vizsgáltuk a legnagyobb mennyiségben xantofillt termelő törzsek karotin termelését különböző tenyésztési körülmények között (hőmérséklet, fényforrás, különböző szénforrást tartalmazó táptalaj, egyéb adalékanyagokkal kiegészített táptalaj). Igazoltuk, hogy az alacsonyabb hőmérséklet kedvez a ketolált β -karotin származékok képződésének. Sikerült meghatároznunk olyan tenyésztési paramétereket, amelyek mellett a β -karotin – kantaxantin konverzió szinte teljesen ezekben a törzsekben. Fontos megemlíteni ugyanakkor, hogy elhanyagolható volt az asztaxantin mennyisége, valószínűleg a *M. circinelloides* β -karotin hidroxiláza csak kis hatásfokkal képes a kantaxantint szubsztrátként hasznosítani. Ezért két kiválasztott transzformáns törzsbe bejuttattuk a *crtZ* gént hordozó cirkuláris plazmidot. Ezeknél a transzformánsoknál jelentős mennyiségben kimutatható volt az asztaxantin termelődése.

Szerkesztettünk egy a *carRP-crtW* fúziós gént hordozó vektort is. Ezt a vektort hordozó transzformánsok azonban nem, vagy csak kis mennyiségben termeltek karotinoidokat. Feltételezzük, hogy a fúziós fehérje gátolta a *Mucor* CarRP működését, de ennek bizonyítása további vizsgálatokat igényel.

Összefoglalás

Eredményeink összefoglalásaként elmondhatjuk, hogy:

1. A *Paracoccus* sp. N81106 törzs *crtZ* és *crtW* génjeit hordozó plazmidokat szerkesztettünk, amelyekkel transzfomáltuk ill. kotranszfomáltuk a *M. circinelloides* MS12 törzset. Kutatócsoportunk először írta le a *M. circinelloides* kotranszfomációját.
2. Vizsgáltuk a transzfomációs gyakoriságot és igazoltuk, hogy a heterológ gének kifejeződnek a gombában.
3. Kimutattuk, hogy a *M. circinelloides*-nek van β -karotin hidroxiláz aktivitása.
4. Igazoltuk, hogy a *crtW* gént is hordozó transzformánsokban termelődtek oxigenált β -karotin származékok.
5. Kimutattuk, hogy a *M. circinelloides* termel γ -karotint.
6. Klónoztuk és jellemeztük a *M. circinelloides* izopenenil-pirofoszfát izomeráz enzimét kódoló *ipi* génjét.
7. Igazoltuk, hogy az *ipi*, *isoA* és *carG* gének egy kópiában vannak jelen a *Mucor* genomban. Meghatároztuk a három gén aktinhoz és egymáshoz viszonyított relatív transzkripció szintjét.
8. A *M. circinelloides* három izoprén génjét (*ipi*, *isoA*, *carG*) hordozó expressziós vektorokat szerkesztettünk, a géneket *Mucor gpd1* szabályozó régiókkal is összeépítettük, majd a vektorokkal külön-külön és párosával is transzfomáltuk az MS12 törzset. A kísérletekbe bevontuk a *crtW* gént hordozó plazmidot is.
9. Vizsgáltuk a transzfomációs gyakoriságot, igazoltuk, hogy a transzformánsok autonóm replikálódó elemekként tartják fenn a

bejuttatott plazmidokat és bizonyítottuk, hogy történtek DNS átrendeződések.

10. Vizsgáltuk a transzformánsok stabilitását, meghatároztuk a bejuttatott plazmidok kópiaszámát, és a túlműködtetett, valamint a bakteriális eredetű gének transzkripció szintjét különböző tenyésztési körülmények között.
11. Vizsgáltuk a transzformánsok karotinoid termelését különböző tenyésztési körülmények között.
12. Vektorokat szerkesztettünk a *crtW* gén *Mucor* genomba történő integrációjához, majd sikeres transzfomációkat hajtottunk végre.
13. Vizsgáltuk a transzfomációs gyakoriságot, az integráció sikerességét és meghatároztuk az integráció helyét Southern hibridizációs és inverz-PCR technika segítségével. Igazoltuk, hogy történtek DNS átrendeződések.
14. Meghatároztuk a *crtW* gén relatív kópiaszámának és transzkripció szintjének változását az átoltások számának növekedésével.
15. Vizsgáltuk a transzformánsok stabilitását és karotinoid termelését. Kimutattuk az oxigenált β -karotin származékok nagy mennyiségben történő termelődését. Vizsgáltuk különböző tenyésztési körülmények hatását a karotinoid termelésre.
16. A bakteriális eredetű *crtZ* gént autonóm replikálódó plazmidon bejuttattuk a transzformánsokba, és kimutattuk a transzformánsok megnövekedett asztaxantintermelő képességét.
17. Szerkesztettünk egy *carRP-crtW* génfúziót hordozó vektort, mellyel sikeres transzfomációt hajtottunk végre. Vizsgáltuk a transzformánsokba bejuttatott plazmid kópiaszámát és a transzformánsok karotinoid termelését.

A dolgozat alapját képező közlemények:

Könyvfejezetek:

Papp T, Csernetics Á, Nyilasi I, Ábrók M, Vágvölgyi Cs (2010) Genetic transformation of Zygomycetes fungi. In: Progress in Mycology (ed.: Rai, M and Kövics Gy), Scientific Publishers, India, pp. 75-94.

Papp T, Csernetics Á, Nyilasi I, Vágvölgyi Cs, Iturriaga EA (2011) Integration of a bacterial β -carotene ketolase gene into the *Mucor circinelloides* genome by the *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation (ATMT) method. In: Microbial Carotenoids: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology (ed.: Barredo J-L), Humana Press, NY, USA (in press).

Referált folyóiratban megjelent közlemények:

Takó M, Csernetics Á (2005) Genotypic analysis of variability in Zygomycetes. *Acta Biol Hung* 56, 345-357. *IF: 0.636*

Csernetics Á, Péteri Zs, Linka B, Takó M (2005) Physiological and genetic variability of zygomycetes causing post-harvest decay. *Acta Phytopathol Entomol Hung* 40, 262-277.

Csernetics Á, Linka B, Krisch J, Vágvölgyi Cs, Papp T (2007) Increased carotenoid content of *Xanthophyllomyces dendrorhous* cultivated in plant oil supplemented media. *Acta Biol Szeged* 51, 43-46.

Papp T, Nyilasi I, Csernetics Á, Galgóczy L, Vágvölgyi Cs (2008) Molecular studies on Zygomycetes fungi causing opportunistic infections. *Rev Med Microbiol* 19, 39-46. *IF: 0.750*

Papp T, Nagy G, Csernetics Á, Szekeres A, Vágvölgyi Cs (2009) Beta-carotene production by Mucoralean fungi. *J Eng Ann Fac Eng Huned* 7, 173-176.

Csernetics Á, Nagy G, Iturriaga EA, Szekeres A, Eslava AP, Vágvölgyi Cs, Papp T (2011) Expression of three isoprenoid biosynthesis genes and their effects on the carotenoid production of the zygomycete *Mucor circinelloides*. *Fung Genet Biol* 48, 696-703. *IF: 3.333*

Csernetics Á, Nagy G, Bencsik O, Iturriaga EA, Eslava AP, Vágvölgyi Cs, Papp T (2011) Canthaxanthin production with modified *Mucor circinelloides* strains. *Metabol Engin* (manuscript).

A dolgozat témájához kapcsolódó konferencia összefoglalók:

Csernetics Á, Papp T, Velayos A, Iturriaga EA, Eslava AP, Vágvölgyi Cs (2005) Carotene production with genetically modified *Mucor circinelloides* strains. *Acta Microbiol Immunol Hung* 52, 22.

Vágvölgyi Cs, Lukács Gy, Takó M, Csernetics Á, Papp T (2005) The effect of vegetable oils on astaxanthin production of *Phaffia rhodozyma* and *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *J Biotechnol* 118 (S1), 153. *IF: 2.323*

Papp T, Csernetics Á, Iturriaga EA, Eslava AP, Vágvölgyi Cs (2005) Over-expression of isoprene biosynthetic enzymes in the β -carotene producer zygomycete *Mucor circinelloides*. *J Biotechnol* 118 (S1), 153. *IF: 2.323*

Papp T, Iturriaga EA, Csernetics Á, Eslava AP, Vágvölgyi Cs (2006) Improvement of the carotene production in *Mucor circinelloides*. *Acta Microbiol Immunol Hung* 53, 328-329.

Csernetics Á, Papp T, Barta K, Vágvölgyi Cs (2006) Carotenoid production of different Zygomycetes fungi. *Acta Microbiol Immunol Hung* 53, 255-256.

Papp T, Iturriaga EA, Csernetics Á, Molina R, Álvarez MI, Eslava AP, Vágvölgyi Cs (2006) Cloning and analysis of the IPP (isopentenyl pyrophosphate isomerase)-coding gene of *Mucor circinelloides*. ECFG-8, Vienna, Austria, Abstracts pp. 229.

Péteri Zs, Barta K, Csernetics Á, Vágvölgyi Cs, Papp T (2007) Cloning and partial sequence analysis of the *Gilbertella persicaria* farnezyll pyrophosphate synthase gene. *Acta Microbiol Immunol Hung* 54, 101.

Papp T, Iturriaga EA, Csernetics Á, Eslava AP, Vágvölgyi Cs (2007) Improvement of the carotene production in Zygomycetes fungi. Eurofungbase, Wageningen, The Netherlands, Abstracts pp. 24.

Papp T, Csernetics Á, Szekeres A, Iturriaga EA, Eslava AP, Vágvölgyi Cs (2007) Modification of *Mucor circinelloides* for production of oxygenated beta-carotene derivatives. Power of microbes in industry and environmental, Zadar, Croatia, Abstracts pp. 62.

Csernetics Á, Papp T, Nagy G, Szekeres A, Vágvölgyi Cs (2008) Integrative transformation systems in Zygomycetes. *Acta Microbiol Immunol Hung* 55, 179.

Papp T, Iturriaga EA, Csernetics Á, Szekeres A, Eslava AP, Vágvölgyi Cs (2008) Production of oxygenated β -carotene derivatives by modified *Mucor circinelloides*. ECFG-9 Edinburgh, United Kingdom, Abstracts pp. 36.

Csernetics Á, Papp T, Szekeres A, Vágvolgyi Cs (2008) Carotenoid content of different species belonging to the class Zygomycetes. ECFG-9 Edinburgh, United Kingdom, Abstracts pp. 178.

Csernetics Á (2009) Genetic modification of carotene producing Zygomycetes. *Acta Biol Szeged* 53, 57-58.

Csernetics Á, Papp T, Nagy G, Vágvolgyi Cs (2009) Characterization of *Mucor circinelloides* transformants carrying autonomously replicating plasmids. *Acta Microbiol Immunol Hung* 56, 136.

Papp T, **Csernetics Á**, Nagy G, Vágvolgyi Cs (2009) Improvement of carotenoid producing *Zygomycetes* fungi. *Acta Microbiol Immunol Hung* 56, 223-224.

Csernetics Á, Papp T, Nagy G, Vágvolgyi Cs (2009) Transformation systems in the zygomycete *Mucor circinelloides* based on autonomously replicating plasmids. FEMS, Gothenburg, Sweden, Abstract CD 1913.pdf

Csernetics Á, Nagy G, Vágvolgyi Cs, Papp T (2010) Integration of bacterial genes into the *Mucor circinelloides* genome. CESC, Szeged, Hungary, Abstracts pp. 61-62.

Csernetics Á, Nagy G, Vágvolgyi Cs, Papp T (2010) Comparison of *Mucor circinelloides* strains created by different transformation strategies. Power of Microbes in Industry and Environment, Malinska, Croatia, Abstracts pp. 64.

Csernetics Á, Nagy G, Vágvolgyi Cs, Papp T (2010) Canthaxanthin producing *Mucor circinelloides* transformant strains. Power of Microbes in Industry and Environment, Malinska, Croatia, Abstracts pp. 65.

Papp T, **Csernetics Á**, Nagy G, Vágvolgyi Cs (2010) Characterization of isoprenoid biosynthesis genes in *Mucor circinelloides*. Power of Microbes in Industry and Environment, Malinska, Croatia, Abstracts pp. 116.

Csernetics Á, Nagy G, Farkas A, Vágvolgyi Cs, Papp T (2011) Analysis of *Mucor circinelloides* carotenoid producing strains transformed with homologous and heterologous genes. *Acta Microbiol Immunol Hung* 58, 132-133. *IF: 0.625*

Csernetics Á, Nagy G, Vágvolgyi Cs, Papp T (2011) Transformation of the β -carotene producing *Mucor circinelloides* with homologous and heterologous genes. The dynamics of zygomycete research in a changing world, Utrecht, The Netherlands, Abstracts pp. 11.

Csernetics Á, Nagy G, Farkas A, Vágvolgyi Cs, Papp T (2011) Comparison of the carotenoid production of different zygomycetous fungi. BIOXEN and 2nd CEFSE, Novi Sad, Serbia, Abstracts pp. 39.

Csernetics Á, Nagy G, Farkas A, Vágvolgyi Cs, Papp T (2011) Canthaxanthin production with genetically modified *Mucor circinelloides* strains. BIOXEN and 2nd CEFSE, Novi Sad, Serbia, Abstracts pp. 80.

Egyéb referált folyóiratban megjelent közlemények:

Nyilasi I, Papp T, **Csernetics Á**, Krizsán K, Nagy E, Vágvolgyi Cs (2008) High-affinity iron permease (*FTR1*) gene sequence-based molecular identification of clinically important Zygomycetes. *Clin Microbiol Infect* 14, 393-397. *IF: 3.554*

Nyilasi I, Papp T, **Csernetics Á**, Vágvolgyi Cs (2008) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of the zygomycete fungus, *Backusella lamprospora*. *J Basic Microb* 48, 59-64. *IF: 1.051*

Lukács Gy, Papp T, Somogyvári F, **Csernetics Á**, Nyilasi I, Vágvolgyi Cs (2009) Cloning of the *Rhizomucor miehei* 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase gene and its heterologous expression in *Mucor circinelloides*. *Antonie van Leeuwenhoek* 95, 55-64. *IF: 1.983*

Nagy G, Imre G, **Csernetics Á**, Petkovits T, Nagy GL, Szekeres A, Vágvolgyi Cs, Papp T (2011) A prenyl pyrophosphate synthase gene from the zygomycete fungus, *Gilbertella persicaria*. *Acta Biol Szeged* 55, 7-12.

Összesített impakt faktor: 17,891

Társszerzői nyilatkozat

Kijelentjük, hogy Csernetics Árpád szerepe meghatározó jelentőségű volt a

Papp T, **Csernetics Á**, Nyilasi I, Ábrók M, Vágvölgyi Cs (2010) Genetic transformation of Zygomycetes fungi. In: Progress in Mycology (ed.: Rai, M and Kövics Gy), Scientific Publishers, India, pp. 75-94.

Papp T, **Csernetics Á**, Nyilasi I, Vágvölgyi Cs, Iturriaga EA (2011) Integration of a bacterial β -carotene ketolase gene into the *Mucor circinelloides* genome by the *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation (ATMT) method. In: Microbial Carotenoids: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology (ed.: Barredo J-L), Humana Press, NY, USA (in press).

Takó M, **Csernetics Á** (2005) Genotypic analysis of variability in Zygomycetes. *Acta Biol Hung* 56, 345-357. *IF: 0.636*

Csernetics Á, Péteri Zs, Linka B, Takó M (2005) Physiological and genetic variability of zygomycetes causing post-harvest decay. *Acta Phytopathol Entomol Hung* 40, 262-277.

Csernetics Á, Linka B, Krisch J, Vágvölgyi Cs, Papp T (2007) Increased carotenoid content of *Xanthophyllomyces dendrorhous* cultivated in plant oil supplemented media. *Acta Biol Szeged* 51, 43-46.

Papp T, Nyilasi I, **Csernetics Á**, Galgóczy L, Vágvölgyi Cs (2008) Molecular studies on Zygomycetes fungi causing opportunistic infections. *Rev Med Microbiol* 19, 39-46. *IF: 0.750*

Papp T, Nagy G, **Csernetics Á**, Szekeres A, Vágvölgyi Cs (2009) Beta-carotene production by Mucoralean fungi. *J Eng Ann Fac Eng Huned* 7, 173-176.

Csernetics Á, Nagy G, Iturriaga EA, Szekeres A, Eslava AP, Vágvölgyi Cs, Papp T (2011) Expression of three isoprenoid biosynthesis genes and their effects on the carotenoid production of the zygomycete *Mucor circinelloides*. *Fung Genet Biol* 48, 696-703. *IF: 3.333*

Csernetics Á, Nagy G, Bencsik O, Iturriaga EA, Eslava AP, Vágvölgyi Cs, Papp T (2011) Canthaxanthin production with modified *Mucor circinelloides* strains. *Metabol Engin* (manuscript).

címmel megjelent közleményekben, így az értekezésben és a publikációkban közölt eredményeket tudományos fokozat (Ph.D.) megszerzésére nem használtuk fel és ezt a jövőben sem fogjuk tenni.

Szeged, 2011. szeptember 20.

Dr. Papp Tamás

Takó Miklós