

DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**SPÓRAFELSZÍNI FEHÉRJÉKET KÓDOLOÓ GÉNEK
JELLEMZÉSE *MUCOR CIRCINELLOIDES*-BEN**

Szebenyi Csilla

Témavezetők:

Prof. Dr. Papp Tamás

Dr. Nagy Gábor



BIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA
SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM
TERMÉSZETTUDOMÁNYI ÉS INFORMATIKAI KAR
MIKROBIOLÓGIAI TANSZÉK

SZEGED

2020

Irodalmi áttekintés

A Mucorales rend fajai által okozott gombás fertőzéseket mucormikózisnak nevezzük. Ez a ritka, humán megbetegedés leggyakrabban olyan betegeknél fordul elő, akik immunszuppresszív kezelés alatt állnak vagy vérképzőszervi rosszindulatú daganat szövődményeként immunhiányos állapotban szenvednek.

A mucormikózis etiológiai ágenseként leggyakrabban azonosított fajok a *Rhizopus*, *Lichtheimia* és *Mucor* nemzetségekhez tartoznak. A gombás fertőzésekre fogékony populáció növekedése miatt a mucormikózisos esetek száma is növekvő tendenciát mutat. A kezelés sikeressége nagymértékben függ a korai diagnózistól és a megfelelően megválasztott gombaellenes terápiától, valamint a háttérben meghúzódó, immunrendszert gyengítő állapot kezelésétől. Legtöbbször azonban már a diagnózis felállítása is kihívást jelentő feladat.

A Mucorales rend tagjai rezisztenciát mutatnak a rutinszerűen alkalmazott gombaellenes szerek többségével szemben (pl. echinokandinok és azolok). A fent említett tények mindegyike sürgetővé teszi az azonosítást lehetővé tevő molekuláris módszerek fejlesztését, valamint új gombaellenes célpontok keresését. Ehhez elengedhetetlen a

mucormikózis patomechanizmusának tisztázása, a gazdapatogén interakciók feltárása, valamint a potenciális virulencia faktorok és biomarkerek azonosítása. E célok eléréséhez szükséges egy olyan molekuláris és genetikai manipulációs módszer járomspórás gombákra történő adaptációjára, mely segítségével rutinszerűen állíthatók elő a génfunkciók vizsgálatára alkalmas mutáns törzsek.

A legfrissebb kutatások rámutattak a CotH fehérje család fontosságára a járomspórás *Rhizopus delemar* patogenitása kapcsán. Jelen munka elsősorban e géncsalád átfogó elemzésére, mint például a virulenciában betöltött szerepének tisztázására összpontosult. A *Mucor* genomban azonosított feltételezett spórafelszíni fehérjéknek azonban csak egy része mutatott homológiát azokkal a *Rhizopus* fehérjékkel, melyek kapcsolatban állnak a gomba patogenitásával.

A CotH fehérjék funkcionális elemzése során nyomon követtük a CRISPR-Cas9 rendszer által létrehozott genetikailag stabil mutánsok fenotípusos változásait, hogy megválaszolhassuk azt a kérdést, hogy a CotH fehérjék milyen szerepet játszanak a *Mucor circinelloides* gomba patogenezisében, illetve egyéb fiziológiai folyamataiban.

Célkitűzések

Annak ellenére, hogy a járomspórás gombák kiváltotta fertőzések klinikai jelentősége egyre inkább nő, keveset tudunk a fertőzőképességüket meghatározó virulencia faktorokról. Ezen mechanizmusok meghatározása és alapos vizsgálata a jövőben új, hatékonyabb, célzott terápiás kezelések alapját képezhetik.

Ennek érdekében a következő célok megvalósítását tűztük ki:

1. A CRISPR-Cas9 rendszer optimalizálása *Mucor circinelloides* járomspórás gombára;
2. A *cotH* géncsalád azonosítása és *in silico* jellemzése *M. circinelloides*-ben;
3. A gazda-patogén interakcióban potenciálisan szerepet játszó *cotH* génnek genomból történő eltávolítása és egy diszrupciós könyvtár létrehozása CRISPR-Cas9 eljárással;
4. A létrehozott diszrupciós könyvtár tagjainak morfológiai, fiziológiai és genetikai jellemzése;
5. A CotH fehérjék patogenitásban betöltött szerepének vizsgálata *in vitro* és *in vivo* modellekben.

Alkalmazott módszerek

Molekuláris módszerek: Genomi DNS kinyerése gombasejtekből; Agaróz gélelektroforézis; DNS visszanyerése agaróz gélből; RNS tisztítás gombasejtekből; cDNS szintézis (reverz transzkripció); Polimeráz láncreakció (PCR) technika; Fúziós konstrukciók létrehozása; qRT-PCR reakciók a transzkripció szintek meghatározásához.

Diszruptív törzsek létrehozása: Gombasejtek protoplaszt transzformációja; Génszerkesztési munkálatok CRISPR-Cas9 rendszer segítségével; Monosporangiális telepek izolálása és a mitotikus stabilitás vizsgálata a gének elrontását követően.

Diszruptív törzsek karakterizálása: A törzsek növekedési képességének vizsgálata; A gombaspórák szerkezetének, transzmissziós elektronmikroszkóppal (TEM) és felszínének vizsgálata pásztázó elektronmikroszkóp (SEM) segítségével; A gombaspórák sejtfalának fluoreszcens festékekkel történő vizsgálata; J774.2 makrofágszerű egér sejt vonal fertőzése *M. circinelloides* törzsek spóráival; *M. circinelloides* spórákat tartalmazó fagoszómák savasodásának vizsgálata; A *M. circinelloides* spórák makrofágok általi eliminációjának vizsgálata.

In vivo patogenitási modellek: *Galleria mellonella*; *Drosophila melanogaster*; DKA egér.

Eredmények

1. A CRISPR-Cas9 rendszer optimalizálása *Mucor circinelloides* járomspórás gombára

A NHEJ hibajavító mechanizmus segítségével történő génszerkesztési kísérleteink során a *M. circinelloides* mutáns MS12 (*leuA*⁻ és *pyrG*⁻) és CBS277.49 vad típusú törzseit a *carB* génre specifikus *in vitro* szintetizált gRNS szekvenciával és Cas9 nukleázzal transzformáltuk. A gRNS-t és a Cas9 enzimet 100 µM-os koncentrációban alkalmazva $1,25 \times 10^4$ (MS12) és 2×10^4 (CBS277.49) transzformációs hatékonyságot értünk el. A *carB* gént tartalmazó régió szekvenciájának meghatározásával igazoltuk a deléció létrejöttét. A szekvenálás azonban a mutánsok genomjában nagyméretű, 2,3 kb nagyságot is meghaladó deléciók jelenlétét tárta fel a PAM szekvenciától 5' irányban, mely mutációk befolyásolták a szomszédos *carRP* gént is. A *carB* gén elrontásának HDR-en alapuló megvalósítása érdekében létrehoztunk egy olyan diszrupciós kazettát, mely a *carB* génnel homológ szekvenciákat, továbbá az uracil auxotrófia komplementációjáért felelős orotidin-5'-monofoszfát-dekarboxiláz (*pyrG*) génjét tartalmazza. 5 µg templát DNS, 100 µM Cas9 enzim és 100 µM gRNS 10^5 számú protoplaszthoz való hozzáadásával 2 telepet sikerült

izolálnunk, melyek genomi DNS-ében igazoltuk a *pyrG* gén sikeres integrációját a célszekvenciába. A transzformáns izolátumok nem szelektív körülmények között is, legalább 15 átoltási ciklus után is, megőrizték stabilitásukat. Sem az integrált DNS degradálódására, sem reorganizálódására utaló jeleket nem találtunk. Járomspórás gombákban tehát először, sikeresen alkalmaztuk a CRISPR-Cas9 rendszert, s ezt követően megkezdhetjük egyes géncsaládok átfogó vizsgálatát.

2. A cotH géncsalád azonosítása és in silico jellemzése Mucor circinelloides-ben

17 *cotH*-szerű gént azonosítottunk JGI MycoCosm *M. circinelloides* f. *lusitanicus* genom adatbázisban. Összegejtöttük az azonosított CotH-szerű fehérjékben feltételezhetően jelen lévő alegységeket és motívumokat. *R. delemar* CotH3 fehérjével a CotH4 (49,3%), a CotH6 (52,1%) és a CotH13 (72,9%) protein mutatta a legnagyobb hasonlóságot, melyekben a „CotH-motívumként” leírt AS szekvencia is azonosítható volt. Prediktáltuk a *M. circinelloides*-ben azonosított CotH-szerű fehérjék feltételezett sejten belüli lokalizációját, mely alapján feltételezzük, hogy az főképp extracelluláris jellegű, továbbá megvizsgáltuk a szignál peptid és GPI-horgony lehetséges jelenlétét is a fehérjékben. Az általunk azonosított spórafelszíni fehérjék ortológjait a

legnagyobb hasonlóságban hordozó két organizmus a *R. delemar* és a *P. blakesleanus*.

3. A gazda-patogén interakcióban potenciálisan szerepet játszó cotH gének genomból történő eltávolítása és egy diszrupciós könyvtár létrehozása CRISPR-Cas9 eljárással

A *cotH1-6* gének elrontása céljából olyan diszrupciós kazettákat hoztunk létre, melyek tartalmazták a célzott gének promóter és az 5' UTR régióját, továbbá a 3' UTR és terminális régiókat, valamint a *pyrG* gént. Az így létrehozott diszrupciós kazettát templát DNS-ként alkalmaztuk a CRISPR-Cas9 módszerrel megvalósított HDR során, létrehozva öt, *cotH*-mutáns törzset. A *cotH* gének CRISPR-Cas9 rendszerrel végrehajtott specifikus géndiszrupciójának sikerességét hagyományos PCR, qRT-PCR, Sanger szekvenálás és a *cotH3* és *cotH4* mutáns esetében WGS segítségével validáltuk. A *cotH* gének diszrupciója során tapasztalt transzformációs gyakoriság 2-6 telep/10⁵ protoplaszt volt. A *cotH6* gén elrontására tett kísérletek során, mivel a feltehetőleg mutáns telepek nem bizonyultak életképesnek, arra következtettünk, hogy a *cotH6* gén olyan fontos funkcióval bírhat, melynek hiánya letális a gomba számára.

4. A létrehozott diszrupciós könyvtár tagjainak morfológiai, fiziológiai és genetikai jellemzése

A gomba növekedési optimumán (28 °C) történő tenyésztés során az MS12- Δ *cotH3*+*pyrG* törzs fokozott növekedést mutatott, míg az MS12- Δ *cotH4*+*pyrG* mutáns növekedési defektussal bírt. Az MS12- Δ *cotH4*+*pyrG* törzs alacsonyabb és magasabb hőmérsékleten megőrizte jellegzetes növekedési defektusát, továbbá növekedését a magasabb hőmérsékleten történő tenyésztés kevésbé befolyásolta, mint a kontroll törzsét. A *cotH1*, *cotH2*, *cotH3* és *cotH5* törzsek a kontrollhoz képest szenzitívebbnek bizonyultak a magasabb hőmérsékleten történő tenyésztéssel szemben. A *cotH3* mutáns hőszenszitivnek bizonyult 20 °C és 35 °C-on.

A Kongó vörös (KV) festékekkel szemben az MS12- Δ *cotH3*+*pyrG* és MS12- Δ *cotH5*+*pyrG* mutánsok szignifikánsan érzékenyebbek, míg az MS12- Δ *cotH4*+*pyrG* szignifikánsan ellenállóbbnak bizonyult. A Kalkofluor fehér (KF) az összes vizsgált *cotH* mutáns növekedésére szignifikáns hatással bírt, mely a *cotH1*, *cotH2*, *cotH3* és *cotH5* törzsek esetében a stresszszóval szembeni érzékenységgént, a *cotH4* esetében pedig egy fokozottabb ellenállóképességgént mutatkozott meg. A KV és KF festékekkel szembeni érzékenység megváltozásának egy lehetséges magyarázata lehet a *cotH* mutánsok sejtfalának szerkezeti megváltozása. Az MS12- Δ *cotH4*+*pyrG* törzs spóráinak életképessége szignifikánsan lecsökkent hidrogén-peroxidtal

való kezelést követően. Az MS12- Δ *cotH4*+*pyrG* mutáns ellenállóbbnak bizonyult az SDS membrán detergenssel szemben, míg a harmadik naptól kezdve a *cotH1*, *cotH2*, *cotH3* és *cotH5* mutánsok fokozott érzékenységet mutattak.

TEM segítségével vizsgáltuk a spórák hossz- és keresztmetszetének eloszlását, profilterületét és cirkularitását, továbbá sejtfalának szerkezetét. Az MS12+*pyrG* törzs spóráinak profilterülete 7,77-75,35 μm , keresztmetszetük 2,71-7,87 μm , hosszmetsetük 3,65-12,19 μm közé esik. A CotH4 és CotH5 fehérjék szereppel bírnak a spórák méretének kialakításában. A spórafal rétegeinek TEM általi vizsgálata során megállapítottuk, hogy a spórafal három rétegének kialakításában a *cotH* géneknek jelentős szerepük van, azonban e gének szerepe a cirkuláris és ellipszoid spórák spórafalának kialakításában eltérő lehet. Az MS12- Δ *cotH3*+*pyrG* törzs cirkuláris spóráinak falában a középső réteg elvékonyodását figyeltük meg, mellyel egyidőben a külső fal vastagodása is végbement. A középső réteg vastagságának csökkenését az ellipszoid spórák esetében is detektálni tudtuk. A CotH3 fehérjének leginkább a spórafal középső rétegének kialakításában van szerepe. A *cotH4* gén hiányában a középső spórafal réteg rendellenesen megvastagszik, azonban az ellipszoid spórák esetében ez a hatás a belső réteget érinti. A CotH5 protein szerepe

valószínűsíthető a cirkuláris spórák mindhárom rétegének, míg az ellipszoid spórák esetében a spórafal középső rétegének kialakításában.

A *cotH4* génben történő mutációt követően a spórafal összkitin mennyisége jelentősen megnőtt, mely valószínűleg a sejtfa egyes rétegeiben bekövetkező változással áll összefüggésben. Fennáll továbbá annak a lehetősége, hogy a sejtfa és sejtmembrán elválik, és a két struktúra között anyag- (pl. kitin) felhalmozódás zajlik le. A fiatal hifák fluoreszcens festése azt mutatta, hogy a kitintartalomban történő változások kizárólag a gombaspórákra összpontosulnak az MS12-*ΔcotH4+pyrG* törzs esetében.

A spórák J774.2 makrofágokkal történő interakcióját áramlási citométer segítségével követtük nyomon. Annak ellenére, hogy az MS12-*ΔcotH3+pyrG*, MS12-*ΔcotH4+pyrG* és MS12-*ΔcotH5+pyrG* törzsek spóráinak méretében, illetve spórafal szerkezetében is jelentős változást detektáltunk, a fagocitáló makrofágok arányában nem volt szignifikáns különbség, azonban az MS12-*ΔcotH3+pyrG* és MS12-*ΔcotH4+pyrG* törzs spóráiból a J774.2 sejtek képesek voltak négy-nél többet is bekebelezni. Ezt követően a J774.2 sejteket a mutáns törzsek spóráival koinkubáltuk, majd képkalkító áramlási citométerrel vizsgáltuk a pHrodo™ Red+ makrofágok arányát. A fagoszómák savasodását nem

befolyásolták a vizsgált CotH fehérjék, továbbá a CotH fehérjék hiánya nem volt hatással a spórák túlélésére az *in vitro* interakciót követően.

5. A CotH fehérjék patogenitásban betöltött szerepének vizsgálata *in vitro* és *in vivo* modellekben

Az *in vivo* kísérleteinkbe bevont *cotH3*, *cotH4* és *cotH5* mutáns törzsek esetén *Drosophila* fertőzési modellben csökkent patogenitást tapasztaltunk. *G. mellonella* modellorganizmusban végzett *in vivo* életképesség-vizsgálatok a CotH4 protein virulenciában betöltött szerepét erősítették meg. Az MS12- Δ *cotH3*+*pyrG* és az MS12- Δ *cotH4*+*pyrG* törzs virulenciáját DKA egérben is megvizsgáltuk. Először a vad típusú gomba (CBS277.49) DKA BALB/c hím egerekre gyakorolt fertőzőképességének vizsgálatát végeztük el. A DKA egerekben végzett életképesség vizsgálataink bizonyították, hogy a CotH3 és CotH4 fehérjék befolyásolják a *M. circinelloides* fonalas gomba fertőzőképességét.

Összefoglalás

1. Járomspórás gombák genetikai módosítására először a *carB* gén célzott elrontásán keresztül, sikeresen adaptáltuk a CRISPR-Cas9 módszert.
2. Az általunk *M. circinelloides* fonalas gombára optimalizált génebézési eszköz egy plazmidok használatát nélkülöző,

off-target hatások nélküli, megbízható genomszerkesztési eljárásnak bizonyult, melynek segítségével a NHEJ és HDR hibajavító útvonal általi géndiszrupciót is végrehajtottuk.

3. 17 *cotH*-szerű gént azonosítottunk a *M. circinelloides* f. *lusitanicus* genomjában, melyek *in silico* analízise bővítette a Coth fehérjékkel kapcsolatos ismereteinket.
4. A CRISPR rendszer segítségével öt *cotH* gén sikeres diszrupcióját hajtottuk végre.
5. Két mutáns törzs WGS analízisével is validáltuk eredményeinket.
6. A Coth1, Coth2, Coth3, Coth4 és Coth5 proteineknek szerepük van az eltérő hőmérsékletekhez való adaptációban, továbbá a sejtfal szerkezetének kialakításában.
7. A Coth3, Coth4 és Coth5 fehérjék részt vesznek spórafal szerkezetének kialakításában.
8. A Coth5 proteinnek szerepe van a sporangiumok falának kialakításában.
9. A *M. circinelloides* spórák méretének kialakítása a *cotH4* és *cotH5* génektől függő folyamat, hiányukban kisebb gombaspórák képződnek.
10. A Coth4 protein befolyásolja a spórák sejtfalának öszskitin tartalmát, ezáltal a spórafal összetételét.

11. A CotH3 fehérje virulenciában betöltött szerepét igazoltuk *D. melanogaster* és DKA egér modellben.
12. A CotH4 fehérje virulenciában betöltött szerepét igazoltuk *D. melanogaster*, *G. mellonella* és DKA egér modellben.

A doktori eljárás alapját képező 2 db közlemény:

Ibragimova S *, **Szebenyi C** *, Sinka R, Alzyoud EI, Homa M, Vágvölgyi C, Nagy G, & Papp T (2020). CRISPR-Cas9-based mutagenesis of the mucormycosis-causing fungus *Lichtheimia corymbifera*. *International journal of molecular sciences*, 21(10), 3727. (* Megosztott elsőszereplőség) **IF: 4.556**

Nagy G, Vaz AG, **Szebenyi C**, Takó M, Tóth EJ, Csernetics Á, Bencsik O, Szekeres A, Homa M, Ayaydin F, Galgóczy L, Vágvölgyi C & Papp T (2019). CRISPR-Cas9-mediated disruption of the HMG-CoA reductase genes of *Mucor circinelloides* and subcellular localization of the encoded enzymes. *Fungal genetics and biology : FG & B*, 129, 30–39. **IF: 3.071**

Referált folyóiratban megjelent egyéb közlemények:

Varga T, Krizsán K, Földi C, Dima B, Sánchez-García M, Sánchez-Ramírez S, Szöllősi GJ, Szarkándi JG, Papp V, Albert L, Andreopoulos W, Angelini C, Antonín V, Barry KW, Bougher NL, Buchanan P, Buyck B, Bense V, Catcheside P, Chovatia M, Cooper J, Dämon W, Desjardin D, Finy P, Geml J, Haridas S, Hughes K, Justo A, Karasiński D, Kautmanova I, Kiss B, Kocsubé S, Kotiranta H, LaButti KM, Lechner BE, Liimatainen K, Lipzen A, Lukács Z, Mihaltcheva S, Morgado LN, Niskanen T, Noordeloos ME, Ohm RA, Ortiz-Santana B, Ovrebo C, Rácz N, Riley R, Savchenko A, Shiryayev A, Soop K, Spirin V, **Szebenyi C**, Tomšovský M, Tulloss RE, Uehling J, Grigoriev IV, Vágvölgyi C, Papp T,

Martin FM, Miettinen O, Hibbett DS, Nagy LG & Nagy LG (2019). Megaphylogeny resolves global patterns of mushroom evolution *Nature ecology & evolution*, 3(4), 668–678. **IF: 10.080**

Homa M, Sándor A, Tóth E, **Szebenyi C**, Nagy G, Vágvölgyi C & Papp T (2019). *In vitro* Interactions of *Pseudomonas aeruginosa* with *Scedosporium* species frequently associated with cystic fibrosis. *Frontiers in microbiology*, 10, 441. **IF: 4.190**

Nagy G, **Szebenyi C**, Csernetics Á, Vaz AG, Tóth EJ, Vágvölgyi C & Papp T (2017). Development of a plasmid free CRISPR-Cas9 system for the genetic modification of *Mucor circinelloides*. *Scientific reports*, 7(1), 16800. **IF: 4.122**

Tóth EJ, Boros É, Hoffmann A, **Szebenyi C**, Homa M, Nagy G, Vágvölgyi C, Nagy I & Papp T (2017). Interaction of THP-1 monocytes with conidia and hyphae of different *Curvularia* strains. *Frontiers in immunology*, 8, 1369. **IF: 5.70**

Összesített impakt faktor: 31,719

A dolgozat témájához kapcsolódó konferencia összefoglalók:

Szebenyi Cs, Nagy G, Vaz A, Tóth E, Kiss S, Vágvölgyi Cs, Papp T (2017). Disruption of *cotH1* and *cotH2* genes of *Mucor circinelloides* by using a CRISPR/Cas9 system. In: 7th Congress of European Microbiologists (FEMS 2017), p. 1783.

Szebenyi Cs, Nagy G, Vaz A, Tóth E, Kiss S, Vágvölgyi Cs, Papp T (2017). A *Mucor circinelloides* *cotH1* és *cotH2* gén deléciója CRISPR/Cas9 rendszer segítségével - Disruption of the *cotH1* and *cotH2* genes of *M. circinelloides* using a CRISPR/Cas9 system. MIKOLÓGIAI KÖZLEMÉNYEK-CLUSIANA 56:1 pp. 136-138., 3 p.

Szebenyi Cs, Nagy G, Vaz A, Tóth E, Vágvölgyi Cs, Papp T (2017). Disruption of genes *cotH1* and *cotH2* of *Mucor circinelloides* via the CRISPR/Cas9 system. ACTA MICROBIOLOGICA ET IMMUNOLOGICA HUNGARICA 64:1 pp. 172-173., 2 p.

Szebenyi Cs, Nagy G, Vaz A, Tóth E, Kiss S, Vágvölgyi Cs, Papp T (2017). Targeted genome editing via the CRISPR/CAS9 system in *Mucor circinelloides*. In: 19th Danube-Kris-Mures-Tisa (DKMT) Euroregional Conference on Environment and Health : Program and abstracts. Szeged, Magyarország: University of Szeged, Faculty of Medicine, p. 30.

Nagy G., **Szebenyi Cs, Vaz A, Tóth E, Homa M, Vágvölgyi Cs, Papp T** (2017). A CRISPR/Cas9 system for disruption of *carB* gene in *Mucor circinelloides*. In: 7th Congress of European Microbiologists (FEMS 2017), p. 2125, 1 p.

Szebenyi Cs, Nagy G, Tóth EJ, Kiss S, Vaz A, Vágvölgyi Cs, Papp T (2018). Identification and analysis of the *cotH* genes encoding spore coat-like proteins in *Mucor circinelloides*. In: Attila, Gácsér; Iona, Pfeiffer (szerk.) 6th CESC 2018 Central European Summer Course on Mycology and 3rd Rising Stars in Mycology Workshop: Biology of pathogenic fungi. Szeged, Magyarország: JATEPress Kiadó, p. 49, 1 p.

Szebenyi Cs, Nagy G, Tóth EJ, Vaz A, Végh AG, Farkas G, Vágvölgyi C, Papp T (2018). Disruption of *cotH* genes of *Mucor circinelloides* via a plasmid-free CRISPR/Cas9 system. MEDICAL MYCOLOGY 56: S2 pp. S28-S28., 1 p.

Nagy G, Juhász Á, Kiss S, **Szebenyi Cs, Vágvölgyi Cs, Papp T** (2018). Modification of the genetic background of *Mucor*

circinelloides using a plasmid free CRISPR/Cas9 system. In: 14th European Conference on Fungal Genetics (ECFG14), p. 116, 1 p.

Szebenyi Cs, Nagy G, Tóth EJ, Kiss S., Vaz AG, Vágvölgyi Cs, Papp T (2018). Molecular and functional analysis of the *cotH* genes encoding spore coat-like proteins in the zygomycete fungus *Mucor circinelloides*. In: A Magyar Mikrobiológiai Társaság 2018. évi Nagygyűlése és a XIII. Fermentációs Kollokvium: Absztraktfüzet, p. 59.

Szebenyi Cs, Nagy G, Tóth EJ, Werner T, Vaz AG, Vágvölgyi C, Papp T (2019). Disruption of the *cotH* genes of the filamentous fungus, *Mucor circinelloides* by a plasmid-free CRISPR/CAS9 system. In: HFP2019: Molecular Mechanisms of Host–Pathogen Interactions and Virulence in Human Fungal Pathogens, p. 146.

Nagy G, **Szebenyi Cs**, Vaz AG, Jáger O, Ibragimova S, Gu Y, Ibrahim A, Vágvölgyi Cs, Papp T (2019). Development of a plasmid free CRISPR/Cas9 system for the genetic modification of opportunistic pathogenic mucormycotina species. In: K., Márialigeti; O., Dobay Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica Budapest, Magyarország : Akadémiai Kiadó, pp. 169-169., 1 p.

Nagy G, Kiss S, **Szebenyi Cs**, Verghase R, Vaz AG, Jáger O, Ibragimova S, Gu Y, Ibrahim A, Vágvölgyi Cs, Papp T (2020). Construction of a mutant library to examine the pathogenicity of *Mucor circinelloides* using CRISPR/Cas9 system. In: Fungal genetics, host pathogen interaction and evolutionary ecology, pp. 289-290., 2 p.

Szebenyi Cs, Nagy DS, Bozóki G, Werner T, Tóth EJ, Gu, Y, Ibrahim AS, Vágvölgyi Cs, Papp T, Nagy G (2020).

Investigate the relevance of *cotH* genes in the pathogenicity and other biological mechanisms of *Mucor circinelloides*. In: Fungal genetics, host pathogen interaction and evolutionary ecology, pp. 290-291., 2 p.

Szebenyi Cs, Nagy DS, Gu Y, Ibrahim AS, Roland P, Bodai L, Nagy G, Vágvölgyi Cs, Papp T, Nagy G (2020). Egy új protein kináz család azonosítása és jellemzése *Mucor circinelloides* humán patogén fonalas gombában. In: A Magyar Mikrobiológiai Társaság 2020. évi Nagygyűlése és a XIV. Fermentációs Kollokvium: Absztraktfüzet Magyar Mikrobiológiai Társaság és a MMT Alapítványa.

Egyéb közlemények: MTMT azonosító: 10055593

A kutatás az LP2016-8/2016, GINOP-2.3.2-15-2016-00035 és az NKFI K 131796 számú projektek, továbbá az

„AZ INNOVÁCIÓS ÉS TECHNOLÓGIAI MINISZTERIUM ÚNKP-20-4 - KÓDSZÁMÚ ÚJ NEMZETI KIVÁLÓSÁG PROGRAMJÁNAK A NEMZETI KUTATÁSI, FEJLESZTÉSI ÉS INNOVÁCIÓS ALAPBÓL FINANSZÍROZOTT SZAKMAI TÁMOGATÁSÁVAL KÉSZÜLT.”

