

**A *Rhizomucor miehei* járomspórás gomba HMG-koenzim A
reduktáz génjének molekuláris és funkcionális vizsgálata**

Lukács Gyöngyi

Témavezető:

Dr. Papp Tamás, egyetemi adjunktus

Szegedi Tudományegyetem
Természettudományi és Informatikai Kar
Mikrobiológiai Tanszék

SZEGED
2008

Bevezetés

A járomspórás gombákhoz (*Zygomycota*) tartozó *Mucorales* rendbe sorolt nemzetségek (*Absidia*, *Cunninghamella*, *Mucor*, *Rhizomucor*, *Rhizopus*) orvosi, ipari, biotechnológiai és mezőgazdasági szempontból nagy jelentőségűek. Fontos szerepük van egyes élelmiszeripari termékek és mezőgazdasági termények károsításában, állati és humán zigomikózist okozó oportunistá patogének, egyes képviselőik pedig extracelluláris enzimek termelőjeként kerülnek felhasználásra. Fonalas gombák körében sajátos morfogenezisük, valamint szexuális folyamataik révén gyakran tanulmányozott szervezetek. A termofil *Rhizomucor* nemzetségbe tagjai (*R. pusillus*, *R. miehei*, *R. tauricus*), kiemelkedő gyakorlati jelentőségűek. A *R. pusillus* és a *R. miehei* humán és állati mikózisos oportunistá patogén kórokozói lehetnek. A járomspórás gombák által okozott betegségek, elsősorban immunszuppresszált betegeknél, ketoacidózisban szenvedő cukorbetegknél, leukémiás megbetegedésekben, illetve súlyos égési sérülteknél fordulnak elő. A gombák gyors, a testhőmérsékleten optimális feltételeket találó növekedése és a gombaellenes szerek többségével szemben mutatott rezisztenciájuk miatt ezen mikózisos esetén a terápiás lehetőségek korlátozottak. A járomspórás gombák által okozott fertőzések leküzdésében a meglévő gombaellenes szerek közül legtöbbször az amfotericin B, valamint az újabb fejlesztésű posakonazol bizonyult sikeresnek, míg más gombaellenes szerek (echinokandinok,

flukonazol, vorikonazol, itrakonazol) a patogén járomspórás gombákkal szemben *in vitro* kísérletekben is hatástalannak voltak.

A 3-hidroxi-3-metilglutail koenzim A (HMG-KoA) reduktáz az izoprénvázas vegyületek bioszintézisét biztosító acetát/mevalonsav (AMV) reakcióút kezdeti, meghatározó lépését katalizálja az eukarióta sejtekben. Az AMV reakcióúton keresztül keletkeznek egyes hormonhatású vegyületek (gibberellinek, szteroid hormonok, a gombák párosodási folyamataiban szerepet játszó ún. mating faktorok), számos élőlény színanyagai (pigmentek, karotinoidok) és a sejtmembránok fontos alkotórészei a szterol, vagy az ergoszterol. A karotinoidok, köztük a *Xanthophyllomyces dendrorhous* által termelt asztaxantin, biotechnológiai előállításához kapcsolódóan az AMV reakcióút egyes enzimeinek és az azt kódoló génnek tanulmányozására nagy figyelem irányul. Számos vizsgálat igazolta, hogy a HMG-KoA reduktáz katalizálta reakció központi, sebesség-meghatározó szerepet tölt be a karotinoidok bioszintézisében. Az AMV reakcióúthoz kapcsolódóan megy végbe a sejtek jelátviteli folyamataiban fontos szerepet játszó fehérjék (Rho, Ras) farnezilációja és prenilációja, amely elengedhetetlen biológiai funkciójuk betöltéséhez. A gombákban ezen folyamatok gátlása a HMG-KoA reduktáz gátlásán keresztül, a sejt növekedés és a spóráképzés zavarát okozza, morfológiai változásokat és apoptózist idéz elő. A HMG-KoA reduktáznak több szelektív gátlószere ismert, melyek közül legismertebbek a sztatinok. A sztatinok ma széles körben alkalmazott gyógyszerhatóanyagok a vér

koleszterinszintjének csökkentésére. Újabb kutatások vizsgálták más, az emberi szervezet élettani folyamataiban betöltött szerepüket is.

Munkánk során a *Rhizomucor* nemzetségbe tartozó *R. miehei* HMG-KoA reduktáz génjének részletes molekuláris és funkcionális elemzését végeztük el. Megvizsgáltuk az enzim gátlószereinek, a sztatinoknak opportunistá patogén járomspórás gombákra gyakorolt hatását, valamint *in vitro* kísérletekben vizsgáltuk az amfotericin B és két sztatinvegyület; a fluvasztatin és a rosuvasztatin kölcsönhatását a gombák növekedésgátlásában. Megkezdtük a HMG-KoA reduktázzal kapcsolatos kutatásaink kiterjesztését más, elsősorban biotechnológiai jelentőségű gombaszervezetekre is. Ennek keretében vizsgáltuk a *X. dendrorhous* karotintermelését és meghatároztuk *hmgR* génjének egy részletét.

Célkitűzések

Az elmúlt években a veszélyeztetett betegek számának növekedésével a járomspórás gombák által okozott fertőzések száma is növekedett, de a meglévő és újabb gombaellenes szerek továbbra sem jelentenek megoldást ezek kezelésére. A rendszertanilag elkülönülő csoportot alkotó járomspórás gombák molekuláris vizsgálata lehetőséget adhat új, jobb terápiás lehetőségek kidolgozására, és nem váltható ki más gombaszervezetek tanulmányozásával. Az idetartozó gombák részletesebb molekuláris jellemzéséhez szükséges a jelenleginél hatékonyabb transzformációs rendszer kidolgozása is.

Mindezeket figyelembe véve munkánk során a következő célokat tűztük ki:

- A *R. miehei* HMG-KoA reduktáz kódoló génjének azonosítása és izolálása. A *X. dendrorhous hmgR* gén jellemzését célzó kísérletek megkezdése.
- A gén nukleotidsorrendjének és a kódolt fehérje feltételezett aminosavsorrendjének elemzése, és a gén kópiaszámának meghatározása.
- Az azonosított gén felhasználásával a *Mucor circinelloides* járomspórás gomba genetikai transzformációja és a gomba sztatinerészékenységére gyakorolt hatásának tanulmányozása, a *hmgR* gén felhasználási lehetőségének vizsgálata egy új, járomspórás gombákban használható transzformációs-szelekciós rendszer kidolgozásában.
- A HMG-KoA reduktáz kompetitív gátlószereinek, a lovasztatinnak opportunistá humán patogén gombákra kifejtett biológiai hatásának vizsgálata.
- Az amfotericin B és sztatinegyületek kölcsönhatásának vizsgálata *in vitro* kísérleti rendszerben.

Alkalmazott módszerek

Fág genomiális génkönyvtár szűrése:

- génkönyvtár amplifikálása
- plakk-hibridizáció

- fág DNS tisztítása

DNS technikák:

- DNS és RNS tisztítása
- polimeráz láncreakció (PCR)
- reverz transzkripció-PCR (RT-PCR)
- Southern-blot
- DNS szakaszok izolálása és klónozása
- baktériumok transzformálása, plazmid DNS tisztítása

DNS és fehérje szekvencia adatok elemzése:

- BLAST
- ClustalW
- CAP (contig assembly program)

Gombák transzformálása:

- protoplasztok készítése
- transzformálás polietilén glikol (PEG) segítségével
- Antifungális szer érzékenység vizsgálati technikák (*in vitro*)
- Antifungális szerek kölcsönhatásának vizsgálata (*in vitro*)

Eredmények

A hmgR gén azonosítása és jellemzése

A λ Fix II fágban elkészített genomiális génkönyvtár szűréssel és HMG-KoA reduktáz génszekvenciák alapján tervezett, degenerált primerekkel amplifikált, homológ próba alkalmazásával sikerült azonosítanunk, majd pBluescript vektorba klónoznunk a *R. miehei* HMG-KoA reduktáz génjét. A teljes izolált gén nukleotidsorrendjét meghatároztuk (4977 bp), konszenzus szekvenciák segítségével a génben öt intront azonosítottunk, és a kódolt fehérje feltételezett aminosavsorrendjét (1058) meghatároztuk. Megvizsgáltuk, hogy a gén milyen hasonlóságot mutat egyes mikroszkopikus gombák, illetve más eukarióta szervezetek HMG-

KoA reduktáz génjeivel. Megállapítottuk, hogy a génben található intronok közül négy azonos pozícióban található a szintén járomspórás gomba *Phycomyces blakesleeanus hmgR* génjének 4 intronjával. PCR reakcióban felszaporítottuk a *X. dendrorhous hmgR* génjének 315 bp hosszúságú szakaszát, mely a fehérje katalitikus régiójában található 105 aminosavat kódolja.

A *R. miehei* fehérje és *X. dendrorhous* fehérjerészlet aminosavsorrendjének elemzése során azonosítottuk a más, ismert HMG-KoA reduktázokkal nagy hasonlóságot mutató, konzervált katalitikus régiót. A katalitikus aktivitásért felelős NADP és HMG kötőhelyek motívumai között a gombák körében 100% a hasonlóság. A kódolt fehérje N-terminális szakasza az eddig vizsgált szervezetek enzimeikhez hasonlóan nagy szekvenciabeli különbségeket mutat.

Az eddig vizsgált növények és gombák genomjában rendszerint kettő vagy több *hmgR* gén fordul elő, melyek sejten belüli kifejeződése eltérő. Southern-hibridizáció segítségével megállapítottuk, hogy a *R. miehei* faj genomjában, a *P. blakesleeanus*-hoz hasonlóan, egy HMG-KoA reduktáz gén található. A gombából tisztított RNS mintákban RT-PCR segítségével igazoltuk a gén kifejeződését.

Transzformációs kísérletek Mucor circinelloides járomspórás gombában

Az izolált *R. miehei hmgR* gén promóterének (963 bp) és a zöld fluoreszcens fehérje kódoló szekvenciájának (*gfp*)

felhasználásával transzformáló vektort készítettünk, melyet *M. circinelloides* járomspórás gombába juttattunk be. A sikeres transzformáció eredményeként *M. circinelloides*-ben GFP termelődését detektáltuk fluoreszcens mikroszkóp segítségével.

A *R. miehei hmgR* gén (4656 bp) felhasználásával transzformáló vektort készítettünk, melyet *M. circinelloides* járomspórás gombába transzformálva megállapítottuk, hogy a *R. miehei hmgR* gén hozzájárult a *M. circinelloides* fluvasztatinnal szembeni rezisztenciájának növekedéséhez. Vizsgálatainkban a kontroll törzs növekedése 4 µg/ml fluvasztatin koncentrációnál szinte teljesen gátolt volt, míg a transzformáns törzs 40%-os növekedést mutatott a fluvasztatint nem tartalmazó táptalajon tapasztalt növekedéshez viszonyítva. A vizsgált gén bevitelének hatására megnövekedett sztatinnerezisztencia alapján feltételezhető, hogy lehetséges a *hmgR* gén transzformációs szelekcióban történő felhasználása.

Sztatincegületek hatásának vizsgálata járomspórás gombákban

Meghatároztuk 27 *Rhizomucor* nemzetségbe tartozó izolátum lovasztatin érzékenységét. Megállapítottuk, hogy a savas pH (pH 5), a minimál táptalaj alkalmazása, valamint a kisebb spóraszám leoltásakor a törzsek nagyobb érzékenységet mutatnak lovasztatinnal szemben. A kapott eredmények alapján kidolgoztunk egy egyszerű tenyésztésen alapuló eljárást a két *Rhizomucor* faj elkülönítésére, mely a két faj eltérő lovasztatin érzékenységét használja ki. A két faj

lovasztatinnal szemben mutatott érzékenységbeli különbsége alapján feltételezhető más antifungális szerekkel szemben mutatott érzékenységük különbsége is.

Meghatároztuk továbbá hét, orvosi szempontból fontos járomspórás gomba (*R. miehei*, *R. pusillus*, *Absidia corymbifera*, *Mortierella wolfii*, *Syncephalastrum racemosum*, *Rhizopus oryzae*, *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis*) sztatinokkal szemben mutatott érzékenységét. Kísérleteinkbe a kereskedelmi forgalomban kapható, a vér koleszterinszintjének csökkentésére alkalmazott sztatinvegyületeket (lovasztatin, szimvasztatin, rozuvasztatin, atorvasztatin, fluvasztatin, pravasztatin) vontunk be. Kimutattuk, hogy a különböző fajokhoz tartozó izolátumok *in vitro* érzékenysége eltérő. A vizsgált izolátumok közül a legérzékenyebb a *R. pusillus* és az *A. corymbifera*, legrezisztensebb a *M. wolfii* volt. Különböző fajok esetében a sztatinvegyületek hatáserősségének sorrendje is különbözik. Ezek háttérben az egyes sztatin molekulák szerkezeti és oldékonyságbeli eltérésein túl a tanulmányozott fajok sejtszerkezeti és molekuláris különbségei állhatnak. Kísérleteket végeztünk annak megállapítására, hogy a rozuvasztatin és fluvasztatin amfotericin B-vel történő együttes alkalmazása során milyen mértékben gátolt az opportunistá patogénként ismert járomspórás gombák növekedése. Az amfotericin B a járomspórás gombák által okozott fertőzések leküzdésének jelenleg is alkalmazott, egyik leghatékonyabb eszköze. Kimutattuk, hogy a vizsgált izolátumoknál az amfotericin B 1 µg/ml koncentrációban több mint

75%-os növekedésgátlást okoz. Ez alól a *M. wolfii* volt az egyetlen kivétel, ahol a legnagyobb alkalmazott amfotericin B koncentráció (16 µg/ml) is kevesebb mint 50%-os gátlást eredményezett és csak a legmagasabb koncentrációjú amfotericin B (16 µg/ml) és fluvasztatin (96 µg/ml) együttes alkalmazásával sikerült több mint 75%-os növekedésgátlást kiváltani. Minden vizsgált opportunistá patogén törzsnél a sztatinok és az amfotericin B között fellépő additív hatást, néhány esetben pedig szinergizmust sikerült kimutatnunk.

Összefoglalás

Kísérleteink eredményeként azonosítottuk és jellemeztük a *R. miehei* járomspórás gomba teljes *hmgR* génjét, valamint a *X. dendrorhous hmgR* génjének egy szakaszát. A *R. miehei hmgR* gén szakaszainak felhasználásával transzformáló vektort készítettünk, mellyel sikeresen transzformáltuk a *M. circinelloides* MS12 törzsét. Kimutattuk, hogy a *R. miehei hmgR* génjének promotere működőképes GFP fehérje termelődését teszi lehetővé *M. circinelloides*ben. Igazoltuk továbbá, hogy a teljes *R. miehei* eredetű *hmgR* gén bejuttatása *M. circinelloides* MS12 törzsébe, megnövekedett rezisztenciát eredményez a HMG-KoA reduktáz szelektív gátlószerével a fluvasztatinnal szemben, mely alapját képezheti a járomspórás gombákban alkalmazható új transzformációs-szelekciós rendszer kidolgozásának.

Vizsgáltuk továbbá a *Rhizomucor* nemzetséghez tartozó két

faj, a *R. miehei* és a *R. pusillus* 27 izolátumának lovasztatin-érzékenységét és kimutattuk az érzékenységet befolyásoló körülmények (pH, táptalaj-összetétel, spóramennyiség) hatását az *in vitro* vizsgálatokra. A két *Rhizomucor* faj lovasztatinnal szemben mutatott érzékenységbeli eltérése alapján kidolgoztunk egy egyszerű tenyésztési módszert a két faj elkülönítésére.

Kimutattuk 7 oportunistá patogén járomspórás gombafaj, a *R. miehei*, *R. pusillus*, *A. corymbifera*, *M. wolfii*, *S. racemosum*, *Rh. oryzae* és *Rh. microsporus* var. *rhizopodiformis*, érzékenységét a jelenleg koleszterinszint-csökkentő gyógyszerként forgalomban lévő vegyületekkel (lovasztatin, szimvasztatin, rozuvasztatin, atorvasztatin, pravasztatin, fluvasztatin) szemben. Megvizsgáltuk a fluvasztatinnak és a rozuvasztatinnak amfotericin B-vel kombinációban kifejtett hatását a gombák növekedésgátlására. Ezekben a kísérletekben minden kombinációnál additív hatást, néhány esetben pedig szinergizmust tapasztaltunk.

Elmondhatjuk, hogy a mind gyakrabban fellépő járomspórás gombás fertőzések kezelésében a sztatinegyületek kombinációban történő alkalmazása lehetőséget adhat a fertőzés jelenleginél hatékonyabb leküzdésére, a ma is használt gombaellenes szerek súlyos mellékhatásainak csökkentésére, valamint a szerekkel szemben kialakuló rezisztencia valószínűségének minimalizálására.

A dolgozat témájához kapcsolódó folyóiratcikkek

Lukács, G., Papp, T., Nyilasi, I., Nagy, E. and Vágvölgyi, Cs. (2004) Evaluation a new medium to differentiate *Rhizomucor* species on the basis of their different sensitivity to lovastatin. *J. Clin. Microbiol.* 42, 5400-5402.

Lukács, G., Linka, B. and Nyilasi, I. (2006) *Phaffia rhodozyma* and *Xanthophyllomyces dendrorhous*: astaxanthin-producing yeasts of biotechnological importance. *Acta Alimentaria* 5, 99-107.

Lukács, G., Papp, T., Somogyvári, F., Csernetics, Á., Nyilasi, I. and Vágvölgyi, Cs. (2008) Cloning of the *Rhizomucor miehei* 3-hydroxy-3-methylglutharyl coenzyme A reductase gene and its heterologous expression in *Mucor circinelloides*. *Antonie van Leeuwenhoek (Accepted, in press)*.

A dolgozat témájához kapcsolódó szabadalmi bejelentés

Vágvölgyi, Cs., Papp, T., Nyilasi, I., Pesti, M. and **Lukács, Gy.** (2008) Gombaellenes hatóanyagot és sztatint tartalmazó kombinációs készítmények és alkalmazásuk. Szabadalmi bejelentés. M.Sz.H. P0800305. Szabadalmi Közlöny és Védjegyterjesztő 113(7), 241.

A dolgozat témájához kapcsolódó konferenciaszereplések

Lukács, Gy., Ács, K., Vastag, M., Nyilasi, I., Kasza, Zs. and Vágvölgyi, Cs. (2002) Cloning and partial sequence analysis of the gene encoding 3-hydroxy-3-methylglutharyl coenzyme A reductase of *Rhizomucor miehei*. Congress of the Hungarian Society for Microbiology, Balatonfüred, Hungary. Abstracts.

Lukács, Gy., Ács, K., Vastag, M., Papp, T. and Vágvölgyi, Cs. (2003) Molecular analysis of the gene encoding 3-hydroxy-3-methylglutharyl coenzyme A reductase of *Rhizomucor miehei*. 14th Int. C. Hung. Soc. Microbiol, Balatonfüred, Abstracts.

Lukács, Gy., Ács, K., Vastag, M. and Vágvölgyi, Cs. (2003) Molecular cloning and sequence analysis of the gene encoding 3-hydroxy-3-methylglutharyl coenzyme A reductase in *Rhizomucor miehei*. *FEMS Microbiol. Letters* 222, Suppl. 1. 457.

Vágvölgyi, Cs., **Lukács, Gy.**, Nyilasi, I. and Papp, T. (2004) Development of a lovastatin resistance-based transformation system for *Rhizomucor miehei*. Clin. Microbiol. Infect. 10, Suppl. 3. 507.

Papp, T., **Lukács, Gy.**, Vastag, M., Vágvölgyi, Cs. and Nagy, E. (2004) Identification of *Rhizomucor* species by means of biochemical and molecular methods. Clin. Microbiol. Infect. 10, Suppl. 3. 508.

Lukács, Gy., Ács, K., Vastag, M., Nyilasi, I., Kasza, Zs. and Vágvölgyi, Cs. (2004) cloning and partial sequence analysis of the gene encoding 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase of *Rhizomucor miehei*. Acta Microbiol. Hung. 51, 125.

Lukács Gy., Nyilasi I., Papp T., Somogyvári F., Nagy E. and Vágvölgyi Cs. (2004) Rapid differentiation of *Rhizomucor* species with the aid of a lovastatin-containing medium. Congress of the Hungarian Society for Microbiology, Keszthely, Hungary. Abstracts.

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

Lukács, Gy., Kovács, N., Papp, T. and Vágvölgyi, Cs. (2005) The effect of vegetable oils on carotenoid production of *Phaffia rhodozyma*. Acta Microbiol. Hung. Acta Microbiol. Hung. 52, 267.

Egyéb folyóiratcikkek

Ács, K., Kasza, Zs., **Lukács, Gy.**, Schwab, H. and Vágvölgyi, Cs. (2002) Cloning and sequence analysis of *Mucor circinelloides* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene. Acta Microbiol. Immunol. Hung. 49, 305-312.

Lukács, G., Takó, M. and Nyilasi, I. (2006) Pulsed-field electrophoresis: a versatile tool for analysis of fungal genomes. Acta Microbiol. Immunol. Hung. 53, 95-104.

Galgóczy L., Papp T., **Lukács Gy.**, Leiter É., Pócsi I. and Vágvölgyi Cs. (2007) Interactions between statins and *Penicillium chrysogenum* antifungal protein (PAF) to inhibit the germination of

sporangiospores of different sensitive Zygomycetes. FEMS Microbiol Lett 270, 109-115.

Egyéb konferenciaszereplések

Nyilasi, I., Ács, K., **Lukács, Gy.**, Papp, T., Kasza, Zs., and Vágvölgyi, Cs. (2003) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Mucor circinelloides*. FEMS Microbiol. Letters 222, Suppl.

Nyilasi, I., Papp, T., Heinrich, H., **Lukács, Gy.**, and Vágvölgyi, Cs. (2002) Identification of mating-type-specific markers in *Gilbertella persicaria*. Acta Microbiol. Hung. 49, 404-405.

Nyilasi, I., Papp, T., **Lukács, Gy.**, Nagy, E., and Vágvölgyi, Cs. (2006) Cloning and partial sequence analysis of the *Rhizomucor miehei* high affinity iron permease (FTR1) gene. Acta Microbiol. Hung. 53, 233-234.

Lukács, Gy., Krizsán, K., Papp, T., and Vágvölgyi Cs. (2006) Comparison of *Bipolaris* isolates using molecular and biochemical markers. Acta Microbiol. Immunol. Hung. 53, 311.

Vágvölgyi, Cs., Papp, T., Heinrich, H., **Lukács, Gy.** and Ferenczy, L. (2000) *Rhizopus* izolátumok genetikai variabilitásának meghatározása RAPD analízis és szénforrás hasznosítási vizsgálatok alapján. MMT 2000. évi Nagygyűlése, Keszthely, Összefoglalók.

Ács, K., Nyilasi, I., **Lukács, Gy.**, Kasza, Zs., Papp, T., and Vágvölgyi, Cs. (2003) New transformation approaches for zygomycetes. 14th Int. C. Hung. Soc. Microbiol. Balatonfüred, Hungary, Abstracts.

NYILATKOZAT

Kijelentjük, hogy Lukács Gyöngyi

Vágvölgyi Cs., Papp T., Nyilasi I., Pesti M., **Lukács Gy.** (2008) Gombaellenes hatóanyagot és sztatint tartalmazó kombinációs készítmények és alkalmazásuk. Szabadalmi bejelentés. M.Sz.H. P0800305 (2008. május 9.)

című szabadalmi bejelentéshez kapcsolódó munkájának eredményeit tudományos fokozat (Ph.D.) megszerzésére mindeddig nem használtuk fel és ezt a jövőben sem fogjuk tenni.

Szeged, 2008. augusztus 25.

Dr. Papp Tamás Nyilasi Ildikó

Dr. Vágvölgyi Csaba Prof. Dr. Pesti Miklós

NYILATKOZAT

Kijelentjük, hogy Lukács Gyöngyi

Lukács, G., Papp, T., Nyilasi, I., Nagy, E., and Vágvölgyi, C. (2004): Evaluation a new medium to differentiate *Rhizomucor* species on the basis of their different sensitivity to lovastatin. J. Clin. Microbiol. 42, 5400-5402

Lukács G, Linka B, Nyilasi I (2006) *Phaffia rhodozyma* and *Xanthophyllomyces dendrorhous*: astaxanthin-producing yeasts of biotechnological importance. Acta Alimentaria 5 (1): 99-107.

Lukács, G., Papp, T., Somogyvári, F., Csernetics, Á., Nyilasi I. and Vágvölgyi. C. (2008) Cloning of the *Rhizomucor miehei* 3-hydroxi-3-methylglutaryl coenzyme A reductase gene and its heterologous expression in *Mucor circinelloides*. Antonie van Leeuwenhoek,. Submitted.

címmel megjelent közleményekben végzett munkájának eredményeit tudományos fokozat (Ph.D.) megszerzésére mindeddig nem használtuk fel és ezt a jövőben sem fogjuk tenni.

Szeged, 2008. augusztus 25.

Dr. Papp Tamás Nyilasi Ildikó Prof. Dr. Nagy Erzsébet

Dr. Vágvölgyi Csaba Linka Beáta Dr. Somogyvári Ferenc

Csernetics Árpád