

**A BIOAKTÍV LIPIDEK ÉS A ZSÍRSAV-BIOSZINTÉZIS SZEREPE A
CANDIDA PARAPSILOSIS VIRULENCIÁJÁBAN**

DOKTORI ÉRTEKEZÉS

GRÓZER ZSUZSANNA BARBARA

TÉMAVEZETŐK:

**DR. GÁCSER ATTILA
TUDOMÁNYOS FŐMUNKATÁRS**

**DR. HAMARI ZSUZSANNA
DOCENS**

BIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA



**SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM
TERMÉSZETTUDOMÁNYI ÉS INFORMATIKAI KAR
MIKROBIOLÓGIAI TANSZÉK**

**SZEGED
2014**

Tartalomjegyzék

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. Rövidítések jegyzéke | 4 |
| 2. Bevezetés | 6 |
| 3. Irodalmi áttekintés | 8 |
| 3.1. A <i>Candida</i> fajok általános jellemzése és egészségügyi jelentőségük..... | 8 |
| 3.2. A <i>C. parapsilosis</i> általános jellemzése..... | 9 |
| 3.3. A <i>C. parapsilosis</i> virulenciafaktorai..... | 11 |
| 3.4. <i>De novo</i> zsírsav-bioszintézis élesztőben..... | 14 |
| 3.4.1. Zsírsavszintézis és elongáció..... | 15 |
| 3.4.2. Zsírsav deszaturáció..... | 16 |
| 3.5. <i>OLE</i> gének..... | 19 |
| 3.6. Az extracelluláris lipáz aktivitás és a <i>de novo</i> zsírsav-bioszintézis együttes szerepe a <i>C. parapsilosis</i> növekedésében és virulenciájában..... | 20 |
| 3.7. Prostaglandinok és tromboxánok..... | 22 |
| 3.8. Gomba prosztoglandinok..... | 25 |
| 4. Célkitűzések..... | 27 |
| 5. Anyagok és módszerek..... | 28 |
| 5.1. A kísérletekben használt mikroba törzsek..... | 28 |
| 5.2. A kísérletekben használt sejtek/sejtvonalak..... | 28 |
| 5.3. Tenyésztéshez használt tápoldatok/táptalajok..... | 29 |
| 5.4. Kísérleti módszerek..... | 30 |
| 5.4.1. Sejtvonalak és élesztő törzsek fenntartása, tenyésztése, primer sejtek izolálása..... | 31 |
| 5.4.1.1. <i>Candida</i> törzsek fenntartása és tenyésztése..... | 31 |
| 5.4.1.2. PBMC izolálás és PBMC-DM differenciáltatás..... | 31 |
| 5.4.2. Kompetens sejtek készítése..... | 31 |
| 5.4.2.1. Kompetens <i>E. coli</i> sejtek készítése..... | 31 |
| 5.4.2.2. Kompetens <i>C. parapsilosis</i> sejtek készítése elektroporáláshoz..... | 32 |
| 5.4.2.3. Kompetens <i>C. parapsilosis</i> sejtek készítése kémiai transzformációhoz..... | 32 |
| 5.4.3. Kompetens sejtek transzformálása..... | 32 |
| 5.4.3.1. Kompetens <i>E. coli</i> sejtek transzformálása..... | 32 |
| 5.4.3.2. Deléciós konstrukciók előkészítése és kompetens <i>C. parapsilosis</i> sejtek elektroporálással történő transzformálása..... | 33 |
| 5.4.3.3. Kompetens <i>C. parapsilosis</i> sejtek kémiai transzformálása..... | 33 |
| 5.4.4. Fermentlevek előállítása a <i>Candida</i> törzsek prosztoglandin termelésének vizsgálatához..... | 33 |
| 5.4.5. A vad típusú törzs és a <i>CpOLE2</i> deléciós mutánsok eltérő sejtfal- és oxidatív stresszorokra adott válaszainak vizsgálata..... | 34 |
| 5.4.6. A vad típusú törzs és a <i>CpOLE2</i> deléciós mutánsok pseudohifa képzésének vizsgálata..... | 34 |
| 5.4.7. Molekuláris technikák..... | 34 |
| 5.4.7.1. Bakteriális plazmid tisztítása..... | 34 |
| 5.4.7.2. Totál DNS kivonás gombából..... | 35 |
| 5.4.7.3. Deléciós konstrukciók létrehozása..... | 35 |
| 5.4.7.4. DIG-dUTP jelölt <i>OLE2</i> upstream próba előállítása..... | 36 |
| 5.4.7.5. Southern hibridizáció..... | 36 |
| 5.4.7.6. Fúziós konstrukciók létrehozása..... | 37 |
| 5.4.7.7. Fúziós PCR-ek helyes beépülésének ellenőrzése..... | 40 |
| 5.4.7.8. RNS kivonás gombából..... | 42 |
| 5.4.7.9. cDNS szintézis..... | 42 |

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 5.4.7.10. Valós idejű kvantitatív PCR (qRT-PCR)..... | 42 |
| 5.4.7.11. Microarray vizsgálat..... | 43 |
| 5.4.8. <i>In vitro</i> virulencia vizsgálatok..... | 43 |
| 5.4.8.1. <i>In vitro</i> fertőzés..... | 43 |
| 5.4.8.2. Fagocitózis vizsgálat..... | 43 |
| 5.4.8.3. Ölési hatások meghatározása..... | 44 |
| 5.4.8.4. Gazdasejtek károsodásának meghatározása..... | 44 |
| 5.4.8.5. Akridinnarancs/kristályibolya festés..... | 45 |
| 5.4.8.6. Enzim-kötött immunoszorbens assay (ELISA)..... | 45 |
| 5.4.9. <i>In vivo</i> virulencia vizsgálatok, viaszmosoly (<i>Galleria mellonella</i>) lárvák fertőzése | 45 |
| 5.4.10. <i>In silico</i> és statisztikai analízis..... | 45 |
| 5.4.10.1. Microarray adatok kiértékelése..... | 45 |
| 5.4.10.2. Statisztikai analízis..... | 46 |
| 5.4.11. Analitikai mérések..... | 46 |
| 5.4.11.1. Zsírsvak analitikai meghatározása..... | 46 |
| 5.4.11.2. Proszttaglandin-profil és proszttaglandin E ₂ meghatározás fermentléből HPLC-MS módszerrel..... | 47 |
| 5.4.11.3. Proszttaglandin-profil és proszttaglandin E ₂ meghatározás fermentléből HPLC-FLD módszerrel..... | 49 |
| 6. Eredmények és értékelésük..... | 51 |
| 6.1. A <i>CpOLE2</i> gén célzott génkiütése a <i>caSAT1</i> kazetta segítségével..... | 51 |
| 6.2. A <i>CpOLE2</i> mutáns törzsek fiziológiai vizsgálata..... | 55 |
| 6.2.1. A <i>CpOLE2</i> mutáns törzsek növekedési képességének vizsgálata különböző táptalajon és hőmérsékleten..... | 55 |
| 6.2.2. A <i>CpOLE2</i> mutáns törzsek növekedési vizsgálata különböző pH-n..... | 56 |
| 6.2.3. A <i>CpOLE2</i> mutáns törzsek FBS bontási képessége..... | 57 |
| 6.2.4. A <i>CpOLE2</i> mutáns törzsek pszeudohifa-képzése..... | 58 |
| 6.2.5. A <i>CpOLE2</i> mutáns törzs növekedése különböző stresszorokat tartalmazó tápközegben..... | 58 |
| 6.3. A <i>CpOLE2</i> mutáns törzsek <i>in vitro</i> és <i>in vivo</i> virulencia vizsgálatai..... | 60 |
| 6.3.1. Ölési kísérletek humán PBMC-DM sejtekkel..... | 60 |
| 6.3.2. Fagocitózis és ölés vizsgálata akridinnarancs/kristályibolya festéssel..... | 61 |
| 6.3.3. A <i>CpOLE2</i> mutáns törzsek PBMC-DM sejteket károsító hatásának vizsgálata.... | 64 |
| 6.3.4. A <i>CpOLE2</i> mutáns törzsek pro- és anti-inflammatorikus citokintermelést stimuláló hatásának vizsgálata PBMC és PBMC-DM sejteken..... | 65 |
| 6.3.5. Viaszmosoly (<i>Galleria mellonella</i>) lárvák fertőzése <i>CpOLE2</i> homozigóta mutáns törzssel..... | 67 |
| 6.4. A <i>C. parapsilosis</i> GA1 és <i>CpOLE2</i> deléciós törzsek proszttaglandin termelése..... | 68 |
| 6.5. A <i>CpOLE2</i> mutáns törzs zsírsvaprofiljának meghatározása..... | 70 |
| 6.6. A proszttaglandin bioszintézisben szerepet játszó gének azonosítása microarray analízis segítségével..... | 72 |
| 6.7. Microarray adatok validálása valós idejű kvantitatív PCR (qRT-PCR) segítségével.... | 73 |
| 6.8. A microarray során azonosított gének célzott génkiütése fúziós PCR technika segítségével..... | 73 |
| 6.9. A <i>CpUGA3</i> , <i>CPAR2_703920</i> , <i>CPAR2_108490</i> és <i>CpSOU2</i> deléciós mutáns törzsek fiziológiai vizsgálatai..... | 74 |
| 6.9.1. A deléciós mutáns törzsek növekedési vizsgálata különböző táptalajon és hőmérsékleten a <i>CpUGA3</i> heterozigóta és homozigóta mutáns törzseken bemutatva | 74 |
| 6.9.2. A mutáns törzsek növekedési vizsgálata különböző pH-n a <i>CpUGA3</i> heterozigóta és homozigóta mutáns törzseken bemutatva..... | 75 |

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 6.9.3. A mutáns törzsek FBS bontási képessége a <i>CpUGA3</i> heterozigóta és homozigóta mutáns törzseken bemutatva..... | 76 |
| 6.9.4. A <i>CpUGA3</i> , <i>CPAR2_703920</i> , <i>CPAR2_108490</i> és <i>CpSOU2</i> deléciós mutáns törzsek növekedése különböző stresszorokat tartalmazó tápközegben | 77 |
| 6.10. A <i>CpUGA3</i> , <i>CPAR2_703920</i> , <i>CPAR2_108490</i> és <i>CpSOU2</i> deléciós mutáns törzsek virulencia vizsgálatai..... | 78 |
| 6.10.1. A mutáns törzsekkel végzett ölési kísérletek humán PBMC-DM sejtek felhasználásával | 79 |
| 6.10.2. Fagocitózis vizsgálata áramlási citometriával (FACS)..... | 80 |
| 6.10.3. A <i>CpUGA3</i> , <i>CPAR2_703920</i> , <i>CPAR2_108490</i> és <i>CpSOU2</i> deléciós mutáns törzsek PBMC-DM sejteket károsító hatásának vizsgálata | 81 |
| 6.10.4. A <i>CpUGA3</i> , <i>CPAR2_703920</i> , <i>CPAR2_108490</i> és <i>CpSOU2</i> deléciós mutáns törzsek pro- és anti-inflammatorikus citokintermelést stimuláló hatásának vizsgálata PBMC és PBMC-DM sejteken | 81 |
| 6.10.5. Viaszmoly (<i>Galleria mellonella</i>) lárvák fertőzése <i>CpUGA3</i> , <i>CPAR2_703920</i> , <i>CPAR2_108490</i> és <i>CpSOU2</i> deléciós mutáns törzsekkel | 85 |
| 6.11. A <i>C. parapsilosis</i> CLIB214 és a <i>CpUGA3</i> deléciós mutáns prosztaglandin termelése.... | 86 |
| 7. Összefoglalás | 89 |
| 8. Summary | 93 |
| 9. Irodalomjegyzék | 96 |
| 10. Köszönetnyilvánítás | 106 |

1. Rövidítések jegyzéke

| | |
|--------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| AA | <u>A</u> rachidonic <u>A</u> cid (Arachidonsav) |
| AC | <u>A</u> cetyltransferase (Acetil transzferáz) |
| ACC | <u>A</u> cetyl <u>c</u> oenzyme <u>A</u> <u>c</u> arboxylase (Acetil-koenzim A karboxiláz) |
| ACK | <u>A</u> mmonium- <u>c</u> hloride- <u>p</u> otassium (Ammóniumklorid-káliumhidrogénkarbonát) |
| ACP | <u>A</u> cil- <u>c</u> arrier protein (Acil-szállító fehérje) |
| AIDS | <u>A</u> cquired <u>I</u> mmune <u>D</u> eficiency <u>S</u> yndrom (Szerzett immunhiányos betegség) |
| BC | <u>B</u> iotin <u>c</u> arboxylase (Biotin karboxiláz) |
| BCCP | <u>B</u> iotin <u>c</u> arboxyl <u>c</u> arrier protein (Biotin-karboxil-szállító fehérje) |
| BSA | <u>B</u> ovine <u>S</u> erum <u>A</u> lbumin |
| cDNS | <u>C</u> omplementary <u>D</u> NS |
| CoA | <u>C</u> oenzyme <u>A</u> (Koenzim A) |
| COX | <u>C</u> ycloo <u>x</u> ygenase (Ciklooxigenáz) |
| CT | <u>C</u> arboxyl <u>t</u> ransferase (Karboxil transzferáz) |
| CUG | <u>C</u> itozin- <u>u</u> racil- <u>g</u> uanin triplet |
| Cy3 | <u>C</u> yanine <u>3</u> |
| Cy5 | <u>C</u> yanine <u>5</u> |
| CYP450 | <u>C</u> ytochrom <u>P</u> 450 (Citokróm P450) |
| DGLA | <u>D</u> ihomo- <u>γ</u> - <u>l</u> inoleic <u>A</u> cid (Dihomo- γ -linolénsav) |
| DH | <u>D</u> ehidratase (Dehidratáz) |
| DHA | <u>D</u> ocosa <u>h</u> exaenoic <u>A</u> cid (Dokozahexaénsav) |
| DMSO | <u>D</u> imethyl <u>s</u> ulfoxide (Dimetil-szulfoxid) |
| DTT | <u>D</u> ithiothreitol |
| ELISA | <u>E</u> nzyme- <u>l</u> inked <u>i</u> mmunosorbent <u>a</u> ssay (Enzim-kötött immunoszorbens módszer) |
| EPA | <u>E</u> icosapentaenoic <u>A</u> cid (Eikozapentaénsav) |
| ER | <u>E</u> noyl <u>r</u> eductase (Enoil reduktáz) |
| FAD | <u>F</u> atty <u>a</u> cid <u>d</u> esaturase (Zsírsv deszaturáz) |
| FAS | <u>F</u> atty <u>a</u> cid <u>s</u> ynthase (Zsírsv szintáz) |
| FBS | <u>F</u> etal <u>b</u> ovine <u>s</u> erum (Fötális borjú szérum) |
| FLP | <u>F</u> lippase (Flippáz) |
| FRT | <u>F</u> LP <u>r</u> ecombination <u>t</u> arget (Flippáz rekombinációs célszekvencia) |
| GC | <u>G</u> as <u>c</u> hromatography (Gázkromatográfia) |
| GM-CSF | <u>G</u> ranulocyte- <u>m</u> acrophage <u>c</u> olony- <u>s</u> timulating <u>f</u> actor (Granulocita-makrofág kolónia stimuláló faktor) |
| HETE | <u>H</u> idroxi- <u>e</u> ikozatetraénsav |
| HIV | <u>H</u> uman <u>i</u> mmunodeficiency <u>v</u> irus |
| HPLC | <u>H</u> igh <u>p</u> ressure <u>l</u> iquid <u>c</u> hromatography (Magas nyomású folyadékkromatográfia) |
| IL | <u>I</u> nterleukin |
| KR | <u>K</u> etoreduktáz |
| LB | Luria-Bertani táptalaj |
| LDH | <u>L</u> aktát <u>d</u> ehidrogenáz |
| LIP | <u>L</u> ipáz |
| LOX | <u>L</u> ipoxigenáz |

| | |
|-----------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| MUFA | <u>M</u> onounaturated <u>f</u> atty <u>a</u> cid (Egyszeresen telítetlen zsírsav) |
| NADPH | <u>N</u> icotinamide <u>a</u> denine <u>d</u> inucleotide <u>p</u> hosphate (Nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát) |
| NAT | Nourseothricin |
| NSAID | <u>N</u> em <u>s</u> teroid alapú <u>a</u> nti- <u>i</u> nflamatorikus <u>d</u> rog |
| PBMC | <u>P</u> eripheral <u>b</u> lood <u>m</u> ononuclear <u>c</u> ells (Perifériás vérből származó mononukleáris sejtek) |
| PBMC-DM | <u>P</u> eripheral <u>b</u> lood <u>m</u> ononuclear <u>c</u> ells - <u>d</u> erived <u>m</u> acrophages (Perifériás vérből származó mononukleáris sejtekből differenciáltatott makrofágok) |
| PBS | <u>P</u> hosphate <u>b</u> uffered <u>s</u> aline (Foszfát puffer) |
| PCR | <u>P</u> olymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction (Polimeráz lánreakció) |
| PGD ₂ | <u>P</u> rosztaglandin <u>D</u> ₂ |
| PGE ₂ | <u>P</u> rosztaglandin <u>E</u> ₂ |
| PGF ₂ /F _{2α} | <u>P</u> rosztaglandin <u>F</u> ₂ / <u>F</u> _{2α} |
| PGI ₂ | Prostaciklin |
| PGT | <u>P</u> rosztaglandin <u>t</u> ranszporter |
| PLA ₂ | <u>F</u> oszfolipáz <u>A</u> ₂ |
| PS | <u>P</u> enicillin- <u>S</u> treptomycin (Penicillin-sztreptomicin) |
| PUFA | <u>P</u> olyunsaturated <u>f</u> atty <u>a</u> cid (Többszörösen telítetlen zsírsav) |
| qRT-PCR | <u>Q</u> uantitative <u>r</u> eal- <u>t</u> ime <u>p</u> olymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction (Kvantitatív valós idejű polimeráz lánreakció) |
| RPM | <u>R</u> evolutions <u>p</u> er <u>m</u> inute (Percenkénti fordulatszám) |
| SAP | <u>S</u> ecreted <u>a</u> spartyl <u>p</u> roteinase (Szekretált savas proteináz) |
| SAPP | <u>S</u> ecreted <u>a</u> spartyl <u>p</u> roteinase in <u>p</u> arapsilosis (Szekretált savas proteináz <i>parapsilosis</i> -ban) |
| SDS | <u>S</u> odium <u>d</u> odecyl <u>s</u> ulphate (Nátrium-lauril-szulfát) |
| SFA | <u>S</u> aturated <u>f</u> atty <u>a</u> cid (Telített zsírsav) |
| SOB | <u>S</u> uper <u>o</u> ptimal <u>b</u> roth (Tápanyagokban gazdag tápoldat) |
| Th | <u>T</u> - <u>h</u> elper (Helper T sejt) |
| TNF | <u>T</u> umor <u>n</u> ecrosis <u>f</u> actor (Tumor nekrozis faktor) |
| Tx | <u>T</u> romboxán |
| UFA | <u>U</u> nsaturated <u>f</u> atty <u>a</u> cid (Telítetlen zsírsav) |
| YCB | <u>Y</u> east <u>C</u> arbon <u>B</u> ase (Élesztő szénforrás) |
| YNB | <u>Y</u> east <u>N</u> itrogen <u>B</u> ase (Élesztő nitrogénforrás) |
| YPD | <u>Y</u> east extract- <u>p</u> eptone- <u>d</u> extrose (Élesztőkivonat-pepton-D-glükóz) |
| YPD/PS | <u>Y</u> east extract- <u>p</u> eptone- <u>d</u> extrose/ <u>p</u> enicillin- <u>s</u> treptomycin (Élesztőkivonat-pepton-D-glükóz/penicillin-sztreptomicin) |

2. Bevezetés

Az utóbbi évtizedekben szembesülhettünk a különböző *Candida* fajok által okozott opportunista fertőzések megnövekedett számával, főként az immunszuppresszált betegek számának világszerte történő növekedése miatt. A nemzetség tagjai közül a fertőzések során leggyakrabban izolált fajok a *Candida albicans*, a *Candida glabrata* és a *Candida parapsilosis*. Ezen mikrobák egyéb mikroorganizmusokkal együtt az emlősök természetes mikrobiota közösségének részét képezik. A *C. parapsilosis* nem obligát humán patogén, elsősorban nem humán forrásokból izolálták, azonban mint humán kommenzalista, egyike azon gombáknak, amelyet az ember bőrfelszínéről izolálnak. Bizonyos hajlamosító tényezők megléte esetén súlyos kórfolyamatokat válthat ki, elsősorban elégtelen immunrendszerrel rendelkező betegek esetében. A *C. parapsilosis* katétereken, implantátumokon, valamint egyéb orvosi eszközökön történő megtapadását követően, biofilmképzés révén képes a kórházi környezetben fennmaradni. Ezen képességének következtében, a *C. albicans*-szal ellentétben, elsősorban horizontális terjedés jellemzi. Ismertek bizonyos hajlamosító tényezők, amelyek hozzájárulhatnak a *C. parapsilosis* fertőzések kialakulásához. Ilyenek például az extrém magas glükóz-, illetve lipidtartalmú oldatok, a beépített protézisek és egyéb implantátumok alkalmazása. Így a legyengült immunrendszerű betegek mellett azok tartoznak a fokozottan veszélyeztetettek körébe, akik valamilyen, legtöbbször a gasztrointesztinális rendszert érintő sebészeti beavatkozáson estek át. A klinikumban ezen fertőzések leggyakoribb jellemzői a láz, a septicus sokk és a veseelégtelenség, továbbá tumorosodás és diabetes mellitus is kialakulhat. A leginkább érintett célcsoportok az újszülöttek, a transzplantáción átesettek és az idősek köréből kerülnek ki.

Mivel a candidiázisok legfőbb okozója a *C. albicans*, az elmúlt 30 évben erről a fajról halmozódott fel a legtöbb molekuláris és genetikai ismeretanyag a nemzetség tagjai közül. A közelmúltban azonban néhány nem-*albicans Candida* faj genomszekvenciája is meghatározásra került, így lehetőség nyílt genetikai hátterük és ezáltal biológiai működésük részletesebb megismerésére. Ezen opportunistá patogén fajokról gyűjtött információk hozzásegítenek az antifungális terápiák, irányított immun-beavatkozások, illetve a gombafertőzések diagnosztizálásának fejlődéséhez. A *Candida* fertőzések patomechanizmusát számos virulenciafaktor határozza meg, ezek közül a legjelentősebbek a gazdasejteken történő megtapadás, a pszeudohifa- és biofilmképzés, valamint a hidrolitikus enzimek szekréciója. Annak ellenére, hogy intenzív kutatás folyik a gombák virulenciafaktorainak meghatározásának érdekében, igen keveset tudunk a virulencia tényezőkről a *C. parapsilosis*

esetében, jóllehet ezek a kutatások alapul szolgálhatnak a diagnózis, a kezelés és a lehetséges megelőzés hatékonyságának növeléséhez.

Munkánk során célul tűztük ki a *C. parapsilosis* egy lehetséges virulenciafaktorának, a gomba prosztaglandin termelésének, illetve bioszintézisének vizsgálatát. A prosztaglandinok 20 szénatomból felépülő zsírsav metabolitok, melyek szerepet játszanak az immunválasz szabályozásában. Az emlősök arachidonsavból (AA) állítják elő ciklooxygenázok segítségével. Annak ellenére, hogy a gombáknál nem található ciklooxygenáz homológ, néhány patogén faj képes a gazdától származó AA-ból prosztaglandin előállítására. *C. albicans* esetében a zsírsav deszaturáz homológ Ole2 enzimet potenciális kulcsfaktorként azonosították a prosztaglandin-bioszintézis folyamatában, mivel a gomba által termelt prosztaglandin fontos szerepet játszhat a patogenezisben azáltal, hogy a gazda prosztaglandin-függő immunválaszát zavarja. Munkánk során bizonyítottuk, hogy a *C. parapsilosis*, hasonlóan a *C. albicans*-hoz, képes prosztaglandin előállítására exogén AA-ból. Megvizsgáltuk a *C. parapsilosis* feltételezett zsírsav deszaturáz CpOle2 enzimének prosztaglandin-bioszintézisben és *de novo* zsírsav-bioszintézisben játszott szerepét. Microarray analízis segítségével további géneket azonosítottunk, melyek szerepet játszhatnak a prosztaglandin-szintézisben. Elvégeztük ezen gének irányított génkiütését és a deléció törzsek vizsgálatát. Eredményeink alapján a CpUGA3 transzkripciós faktort kódoló gén deléciója lényegesen alacsonyabb szintű prosztaglandin-termelést eredményezett a vad típusú törzshöz képest.

3. Irodalmi áttekintés

3.1. A *Candida* fajok általános jellemzése és egészségügyi jelentőségük

A *Candida* nemzetség tagjai Ascomycota élesztőgombák, melyek többsége az úgynevezett CUG kládba tartozik (Butler és mtsi. 2009). Ezen klád tagjaira jellemző, hogy az univerzális kódhasználatától eltérően a fehérjeszintézis során a CUG bázishármasból szerint szintetizálnak leucin helyett (Miranda és mtsi. 2006, Santos és mtsi. 1997). A *Candida* fajok jellemzően dimorf megjelenésűek, három morfológiai típussal rendelkezhetnek: élesztő, pszeudohifa, valamint hifa formákkal (Thompson és mtsi. 2011). Az élesztősejtek kerek vagy ovális formájúak, méretük 3-30 µm átmérőjű, és laboratóriumi körülmények között fehér vagy sárgás-fehér, sima vagy ráncolt felszínű telepeket formálnak (Coronado-Castellote és Jimenez-Soriano 2013). A csoport tagjai közt megtalálhatóak mind haploid, mind diploid genommal rendelkező fajok is. Vegetatív szaporodásuk általánosan sarjadzással történik. Habár a csoportba tartozó fajok jellemzően ivartalanul szaporodnak, néhány faj esetében számos molekuláris-genetikai bizonyítékot találtak a szexuális szaporodás lehetőségére (Butler és mtsi. 2009, Bennett 2010). A nemzetség közel 200 faja között található környezetből izolálható (Pereira és mtsi. 2013, Dias és mtsi. 2000), biotechnológiában alkalmazható (Miyazawa és mtsi. 2013), borkészítés során izolálható (Bezerra-Bussoli és mtsi. 2013), valamint magasabbrendű gazdaszervezetekkel kommenzalista kapcsolatban élő fajokat is (Nguyen és mtsi. 2007).

A gombák által okozott megbetegedések epidemiológiája egyre nagyobb jelentőséggel bír az elmúlt három évtizedben, mivel a veszélyeztetett populációk köre sokkal kiterjedtebb. Emelkedett az alacsony születési súlyú koraszülöttek száma, kitolódott az élettartam, és növekedett az egyéb immunhiányos állapotokat előidéző kórfolyamatok, illetve az egészségügyi beavatkozások esetszáma. Ezen okok következtében a leginkább veszélyeztetett célcsoportok a HIV (Human Immunodeficiency Virus) fertőzött, szervátültetett vagy daganatos betegek (Nucci és Marr 2005, Pfaller és Diekema 2007, Fridkin 2005). McNeil és munkatársai megállapították, hogy 1980 és 1997 között a mikózisokból eredő halálozások száma 1557-ről 6534-re emelkedett, mely gombafertőzések kialakulásának többségével *Candida*, *Aspergillus*, valamint *Cryptococcus* fajok hozhatók összefüggésbe (McNeil és mtsi. 2001).

Jelenleg a nozokomiális megbetegedések negyedik legfőbb okozóiként a *Candida* gombákat tartják számon (Pfaller és Diekema 2007). A *Candida* nemzetség tagjai a

természetben számtalan helyen megtalálhatóak, valamint a normál humán mikroflóra általános szaprofita alkotóelemei is. Ezek a kommenzalista fajok azonban képesek opportunistá patogénné válni, amennyiben a gazdakörnyezet megváltozik. Bizonyos hajlamosító tényezők megléte esetén, amelyek elsősorban az immunrendszer helyi vagy szisztémás elégtelenségéből adódnak, képesek elszaporodni és fertőzést, ún. candidiázist kialakítani. A fertőzéseket három főbb csoportba sorolhatjuk: a bőrfelszín érintő megbetegedések, a nyálkahártya felszíneket érintő megbetegedések, valamint legsúlyosabb esetben a véráram fertőződését, amit szisztémás candidémiának neveznek. A bőr és nyálkahártya felszíneket érintő kórképeket elsősorban AIDS-ben szenvedő betegeknél; a szájüreg, garat, valamint a hüvely megbetegedéseit újszülöttek és legyengült immunrendszerrel rendelkező felnőttek körében figyeltek meg; míg a candidémia vagy invazív candidiázis a rákbetegek, illetve a szervátültetésen átesett betegek esetében jellemző (Papon és mtsi. 2013). Annak ellenére, hogy a candidiázisokból még mindig a *C. albicans* a leggyakrabban izolálható faj, a flukonazol széleskörű alkalmazásának köszönhetően az ún. nem-*albicans* fajok fokozatosan nagyobb jelentőséggel bírnak (Nucci és Marr 2005). Földrajzi elhelyezkedéstől, életkortól és egészségügyi állapottól függően változó eloszlásban, de gyakran izolálhatóak *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei* és *C. parapsilosis* (Nucci és Marr 2005, Papon és mtsi. 2013, Messer és mtsi. 2006) törzsek is candidiázisokból.

3.2. A *C. parapsilosis* általános jellemzése

A *C. parapsilosis*-t Ashford izolálta először, 1928-ban Puerto Ricoban egy hasmenésben szenvedő beteg székletéből (Ashford 1928). Maltóz lebontására képtelen *Monilia* fajként írta le, és a *Monilia parapsilosis* nevet adta neki, hogy megkülönböztesse a *Monilia psilosis* vagy manapság *C. albicans* néven ismert fajtól (Trofa és mtsi. 2008, Tavanti és mtsi. 2005). Annak ellenére, hogy a *C. parapsilosis*-t kezdetben nem patogén fajként tartották számon, 1940-ben egy intravénás droghasználó halálos kimenetelű endokarditiszének okozójaként azonosították (Trofa és mtsi. 2008). 2005 előtt a *C. parapsilosis*-t három csoportba (I, II, III) osztották, azonban a molekuláris és genetikai vizsgálatok olyan mértékű különbségeket mutattak ki a három csoport között, hogy azok fajszerű besorolást kaptak *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis* és *C. metapsilosis* néven (Tavanti és mtsi. 2005). A *C. parapsilosis sensu lato* csoport tagjai közül a leginkább jellemzett faj a *C. parapsilosis*, és a csoporttal kapcsolatba hozható fertőzések 90%-áért is ez a faj tehető felelőssé (Tavanti és mtsi. 2010, Lockhart és mtsi. 2008).

Mint a *Candida* nemzetség tagja, a *C. parapsilosis* is a CUG kládba tartozó, diploid élesztőgomba. Szaporodása kizárólag ivartalanul történik, mivel szexuális ciklust ez idáig nem figyeltek meg náluk (Nosek és mtsi. 2009). Megjelenésüket tekintve az ovális vagy kerek élesztősejtek YPD (Yeast extract-peptone-dextrose) táptalajon nevelve, törzstől függően, négy jól elkülöníthető telepmorfológiát hozhatnak létre: sima vagy gyűrt felszínű, koncentrikus, illetve karéjos szélű telepeket, amelyek színüket tekintve fehérek vagy krémszínűek és fényesek. Ellentétben a *C. albicans*-szal, a *C. parapsilosis* sejtek valódi hifák helyett csak pszeudohifák képzésére képesek, mely struktúrák a gyűrt felszínű, illetve a koncentrikus morfológiájú telepeknél figyelhetők meg (Laffey és Butler, 2005, Trofa és mtsi. 2008).

Az elmúlt évtizedekben jelentős változások figyelhetők meg a candidiázist kiváltó fajok arányában. Annak ellenére, hogy ezt az arányt erősen befolyásolta a vizsgált időszak és a földrajzi lokalizáció, 2000 előtt egyértelmű volt a *C. albicans* dominanciája, mely a candidémiás esetek 37-70%-áért volt felelős (Pfaller és mtsi. 2007). Ez az arány azonban az ezredforduló óta egyre inkább a kevésbé ismert és vizsgált *Candida* fajok felé tolódik, mint a *C. glabrata*, a *C. krusei*, a *C. parapsilosis* és a *C. tropicalis*. Számos tanulmány szerint Európa-szerte, valamint Észak-Amerikában a *C. albicans* részaránya 50%-ra szorult vissza (Almirante és mtsi. 2006, Moran és mtsi. 2009, Nawrot és mtsi. 2013, Tortorano és mtsi. 2013), és még kifejezettebb mértékű csökkenést mutat más földrajzi területeken, mint Latin-Amerika, Dél-Afrika és India. Ezeken a területeken az egyre nagyobb teret nyerő nem-*albicans* fajok közül kiemelkedik a *C. parapsilosis*, amelyet a szisztémás fertőzések 20-26,5%-ából izoláltak (Xess és mtsi. 2007, Nucci és mtsi. 2013, Kreuzsch és Karstaedt 2013, Guinea 2014). Szélsőséges esetekben ez a faj akár meg is haladhatja a *C. albicans* által okozott megbetegedések számát (Medrano és mtsi. 2006). Az eltérő vizsgálati időtartamokon és földrajzi elhelyezkedésen túl, a korosztályok tekintetében is nagy eltérés figyelhető meg ezen fajok eloszlásában. Számos területen az újszülötteket érintő candidémiákat gyakran (33-67%) a *C. parapsilosis* okozza (Pammi és mtsi. 2013, Ballot és mtsi. 2013, Neu és mtsi. 2009, Moran és mtsi. 2009).

Amellett, hogy a *C. parapsilosis* a környezetből is izolálható (talajból, növényekről, háziállatokról, stb.), mint normál humán kommenzalistát is számon tartják (Trofa és mtsi. 2008). Izolálhatók mind a bőrfelszínről, mind a gasztrointesztinális rendszerből (Pammi és mtsi. 2013, Laffey és Butler 2005, Trofa és mtsi. 2008), tehát a *C. albicans*-szal és a *C. tropicalis*-szal ellentétben a *C. parapsilosis* nem obligát humán patogén (Weems 1992). Az elmúlt 20 évben azonban ez a faj egyre nagyobb jelentőséggel bír a nozokomiális fertőzések

során, köszönhetően annak, hogy képes horizontális terjedésre, például megtalálható a kórházi dolgozók kézfelszínén (Almirante és mtsi. 2006, Trofa és mtsi. 2008) . Emellett számos tanulmány támasztja alá, hogy a *C. parapsilosis* sejtek rendkívül nagy hatékonysággal képesek szintetikus felszíneken megtapadni, mint pl. intravénás katétereken, protéziseken és más kórházi eszközökön (Panagoda és mtsi. 2001) és képesek biofilmet képezni (Weems 1992, Trofa és mtsi. 2008, Pammi és mtsi. 2013). Mivel ez a faj nem képes intakt kültakaróval, illetve immunrendszerrel rendelkező egyének fertőzésére, a veszélyeztetett populációk az alacsony születési súlyú újszülöttek, az idős emberek, vagy más immunhiányos állapotban szenvedő betegek (AIDS-ben szenvedő betegek, szervátültetettek, valamint rákbetegek) (van Asbeck és mtsi. 2009, Kreusch és Karstaedt 2013, Pammi és mtsi. 2013, el-Mohandes és mtsi. 1994).

3.3. A *C. parapsilosis* virulenciafaktorai

Az invazív candidiázisok patogenezisét számos tényező elősegíti, melyeket a gomba virulenciafaktorainak tekintenek. Ezek közül a legfontosabbak a gazdasejthez való tapadás, a biofilmképzési képesség, valamint a hidrolitikus enzimek, mint pl. a proteázok, foszfolipázok és lipázok szekréciója (Trofa és mtsi. 2008). A *C. parapsilosis* virulenciafaktorainak és a gazda-patogén interakcióban betöltött szerepének vizsgálata, a korábban említett jelenségeknek köszönhetően, egyre nagyobb érdeklődést vált ki. Amellett, hogy a *C. albicans* virulenciafaktorai a legjobban jellemzettek, az elmúlt évtizedben intenzív kutatás irányult a nem-*albicans* fajok, köztük a *C. parapsilosis* virulenciafaktorainak vizsgálatára.

A *C. parapsilosis* kolonizációja és fertőzőképessége függ a gomba gazdasejtekhez, szövetekhez vagy nyálkahártya felszínekhez való **adhéziós képességétől**. A gomba megtapadása különböző orvosi eszközökön elősegíti a biofilmképzést, ezáltal a gazda károsítását. A *C. parapsilosis* esetében ezen adhéziós esemény első lépéseként a sejtfelszíni hidrofobicitást azonosították (Panagoda és mtsi. 2001, Trofa és mtsi. 2008). Egy összehasonlító tanulmány szerint a *C. parapsilosis* 20,6%-kal nagyobb affinitást mutatott szájüregi epitél sejtekhez, valamint 143,7%-kal nagyobb adhéziós képessége volt az akril-bevonatú eszközökhöz a *C. albicans*-hoz képest (Panagoda és mtsi. 2001).

A **biofilmképzés**, ami felülethez kötött extracelluláris mátrixban lévő mikroorganizmus közösséget jelent, szintén jelentős virulencia faktor (Kuhn és mtsi. 2002b). Számos *Candida* faj esetén a biofilmképzés potenciális virulenciafaktor, mivel elősegíti a gombaellenes kezelésekkel szembeni ellenállóképességet azáltal, hogy korlátozza a

hatóanyagok mátrixon történő átjutását, valamint védi a sejteket a gazda immunválaszától (d'Enfert 2006). *C. albicans* esetén a biofilm egy vékony, élesztősejteket tartalmazó és egy felette elhelyezkedő vastag, de sokkal lazább szerkezetű hifarétegből áll (Baillie és Douglas 1999), míg a *C. parapsilosis* törzsek csekélyebb mennyiségű és kevésbé komplex biofilmet képeznek (Hawser és Douglas 1994, Kuhn és mtsi. 2002a). A biofilmképzést szövethez vagy orvosi eszközhöz való adhézió előzi meg. Mivel a műanyag felületekhez való adhéziós képességük igen nagy (Panagoda és mtsi. 2001), már számos esetben leírták a *C. parapsilosis* biofilmek előfordulását a különböző orvosi eszközökön (intravénás katéterek, szívkatéterek, protézisek) (Ramage és mtsi. 2006). Egyes szerzők a megnövekedett biofilmképző képességű *C. parapsilosis* törzseket összefüggésbe hozták sorozatos megbetegedésekkel (Kuhn és mtsi. 2004), továbbá többen leírták, hogy a biofilmképző *C. parapsilosis* törzsek nagyobb arányban izolálhatóak vérmintából, mint a bőrfelületről (Shin és mtsi. 2002, Ruzicka és mtsi. 2007). A *BRC1* gén nélkülözhetetlen a biofilm képzéséhez, továbbá az is bizonyított, hogy a *C. parapsilosis* lipáz deléciós mutáns jelentősen kevesebb mennyiségű biofilm létrehozására képes, valamint csökkent virulenciát mutat szövetkultúrák és egerek fertőzése esetén (Gacser és mtsi. 2007c, Ding és Butler 2007).

Az elmúlt években a patogén mikroorganizmusok szekretált extracelluláris enzimei egyre nagyobb figyelmet kaptak a patogenezisben betöltött valószínűsíthető szerepük miatt, továbbá célpontjai lehetnek a fertőzések kezelésére alkalmazható szintetikus gátlószereknek. A **szekretált hidrolázok**, mint proteázok, foszfolipázok és lipázok fontos virulenciafaktorok, mivel szövetkárosító hatásuk lehet, a fertőzés során esszenciális tápanyagokhoz juttatják a sejteket, emellett segítik a gazdaszervezet védelmi mechanizmusainak elhárítását (Schaller és mtsi. 2005, Trofa és mtsi. 2008).

A *Candida* nemzetségben leginkább jellemzett proteázok a **szekretált savas proteínázok** (Secreted aspartyl proteinase-Sap). A Sap-ok extracelluláris mátrix fehérjéket (kollagén, laminin és fibronectin) bontanak le, amely fehérjék degradációja elengedhetetlen a szövetek károsításához és inváziójához (Schaller és mtsi. 2005, Pichova és mtsi. 2001). Emellett számos olyan Sap-célfehérjét azonosítottak, melyek a gazda immunválaszának szabályozásában játszanak szerepet, ilyenek például a nyálban lévő laktoferrin, immunglobulinok, laktoperoxidázok és a komplement rendszer fehérjéi (Pichova és mtsi. 2001). *C. albicans*-ban a *SAP* géncsalád tíz (*SAP1-SAP10*) (Naglik és mtsi. 2003), míg *C. parapsilosis*-ban három (*SAPP1-SAPP3*) génből áll (Hruskova-Heidingsfeldova és mtsi. 2009). A *C. parapsilosis* Sapp1p izoenzim biokémiaiailag jól jellemzett (Pichova és mtsi. 2001,

Dostal és mtsi. 2005, Fusek és mtsi. 1994), ezzel szemben a *SAPP2* génről keveset tudunk. Habár a *Sapp2p*-t kódoló *SAPP2* gént pszeudogénként tartották számon, a sejtkultúra felülúszóból izolálható Sap-ok mintegy 20%-át a *Sapp2p* fehérje teszi ki (Fusek és mtsi. 1993). Csoportunk korábban létrehozott egy *C. parapsilosis SAPP1* homozigóta deléciós mutáns törzset, majd humán perifériás vérből származó mononukleáris sejtek (PBMC) és azokból differenciáltatott makrofágok (PBMC-DM) *in vitro* fertőzéses modelljének segítségével bizonyította a *Sapp1p* fehérje virulenciában betöltött szerepét (Horvath és mtsi. 2012). A Sap-ok virulenciában betöltött jelentős szerepe miatt számos vizsgálat indult Sap gátlószerek, mint antimikotikus szerek tesztelésére. Két tanulmány szerint a HIV ellen alkalmazott savas proteáz inhibitor, a Ritonavir gyógyszer csökkenti a Sap-ok aktivitását *Candida* fajokban (Pichova és mtsi. 2001, Asencio és mtsi. 2005). A pepstatin A, ami egy specifikus savas proteináz gátlószert, pedig képes mind *C. albicans*, mind *C. parapsilosis* esetében csökkenteni a gombák nyálkahártya felületeken történő behatolásának hatékonyságát (Schaller és mtsi. 2003, Gacser és mtsi. 2007a). A fentiek alapján a Sap-ok fontos célpontjai lehetnek a gyógyszerfejlesztéseknek.

A **szekretált foszfolipázok** virulenciában betöltött szerepét *C. albicans* esetében több tanulmány is alátámasztja. Szerepük van az epitél sejtekhez való adhézióban és a gazdasejtek károsításában (Barrett-Bee és mtsi. 1985, Pugh és Cawson 1977). *C. parapsilosis* esetében azonban ellentmondások figyelhetők meg a szakirodalomban mind az enzimaktivitás (Kantarcioglu és Yucel 2002, Ghannoum 2000), mind a különböző izolátumok enzim termelését illetően (Fernando és mtsi. 1999, Dagdeviren és mtsi. 2005), ezzel bizonytalanná téve a foszfolipázok jelentőségét.

A **lipázok** katalizálják mind a triacilglicerolok hidrolízisét, mind azok szintézisét. A lipázokra jellemző a magas hőmérsékleten és szerves oldószerekben való stabilitás, valamint a proteolízissel szembeni rezisztencia (Brockhoff 1974). A mikrobiális extracelluláris lipázoknak számtalan lehetséges funkciója ismert, úgymint lipidek lebontása tápanyag-felhalmozás céljából, gazdasejthez vagy szövethez való megtapadás elősegítése, más enzimekkel való kölcsönhatás és ezáltal megváltozott szubsztrátspecifitás, valamint a gazdapatogén interakció módosítása gyulladáshoz vezető folyamatok beindításával (Schaller és mtsi. 2005, Stehr és mtsi. 2004). *C. albicans*-ban 10 lipáz gént (*LIP1-LIP10*) azonosítottak (Hube és mtsi. 2000). Egy szisztémás egérfertőzéses modellben csak a *LIP8* gén expressziója emelkedett egyértelműen a fertőzés 4. órájában (Stehr és mtsi. 2004). A *LIP8* homozigóta deléciós mutáns törzssel megismételve a kísérletet, lényeges virulenciacsökkenés volt megfigyelhető

(Gacser és mtsi. 2007b). *C. parapsilosis*-ban két lipáz gént (*CpLIP1*, *CpLIP2*) azonosítottak, de csak a *CpLIP2* génről képződik aktív fehérje (Brunel és mtsi. 2004, Neugnot és mtsi. 2002). A *CpLIP1-CpLIP2* homozigóta deléciója virulenciacsökkenéshez, vékonyabb és kevésbé komplex biofilmképzéshez, valamint csökkent növekedési képességhez vezet lipid-gazdag környezetben (például intravénás tápoldatban) (Trofa és mtsi. 2008). Humán makrofág-szerű sejtek és rekonstituált szájüregi epitélium, valamint egérfertőzéses kísérletek során a deléciós törzs szintén csökkent virulenciát mutatott a vad típushoz képest (Gacser és mtsi. 2007c). A *C. parapsilosis* lipáz génjeinek virulenciában betöltött szerepét tovább erősítik azok az eredmények, miszerint lipáz inhibitorok alkalmazása humán rekonstituált szövetek fertőzése során lényegesen csökkentette a szövetek károsodását (Gacser és mtsi. 2007a). Mindezek alapján a lipáz gének fontos célpontjai lehetnek az antifungális szerek fejlesztéseinek.

3.4. *De novo* zsírsav-bioszintézis élesztőben

A korábban említett klasszikus virulenciafaktorok mellett számos más folyamat is befolyásolhatja a *C. parapsilosis* patomechanizmusát, azonban a virulenciafaktorokhoz kapcsolódó molekuláris mechanizmusok kevésbé ismertek. A lipázoknak például bizonyítottan kiemelkedő szerepe van a virulenciában, azonban csekély ismeretanyaggal rendelkezünk a lipidmetabolizmus és a virulencia összefüggéséről. A sejtorganellumok nagy többsége részt vesz a zsírsav-bioszintézisben, illetve felépítésük függ ettől az esszenciális folyamattól. Exogén eredetű zsírsavak hiányában a *de novo* zsírsav-bioszintézis elengedhetetlen a sejtek növekedéséhez és a membránokat tartalmazó struktúrák összeépüléséhez. Így ennek a folyamatnak a részletes feltérképezése fontos lépése/kiindulópontja lehet a *C. parapsilosis*-szal kapcsolatos virulencia vizsgálatoknak (Zhao és mtsi. 1996, Nguyen és mtsi. 2009, Gacser és mtsi. 2007b, Gacser és mtsi. 2007c, Xu és mtsi. 2009).

A sejtek számtalan módon képesek felhasználni a zsírsavakat. Elsőként az acil láncok hidrofób természetéből adódóan kettős rétegű membrán struktúrák jöhetnek létre, melyekből később a sejten belüli kompartmentek képződnek. Emellett kiváló eszközei a metabolikus energiák tárolásának, mivel a C-C kötésekben lévő energia β -oxidáció révén hatékonyan felszabadítható. A zsírsavak lebontásából származó acetyl-CoA anabolikus építőelemként funkcionál, vagy belép a citrát ciklusba. Végezetül speciális zsírsavak biológiailag aktív

molekulák előnyagaiként is szolgálhatnak, mint pl. szignál molekulák (eikozanoidok), illetve fehérje-módosító molekulák (sejtproliferáció során) (Tehlivets és mtsi. 2007).

A sejten belüli szabad zsírsavak három különböző forrásból származhatnak: exogén zsírsavak felvételéből, endogén lipidek metabolizmusából és zsírsavak *de novo* szintéziséből. Annak ellenére, hogy a zsírsavszintézisben és elongációban résztvevő enzimek molekuláris felépítése rendkívül eltérő pro- és eukarióta fajokban, a reakciók biokémiája lényegében minden típusú sejt esetében megegyezik (Tehlivets és mtsi. 2007).

3.4.1. Zsírsavszintézis és elongáció

A zsírsavszintézis első lépéseként acetyl-KoA karboxilálódik malonil-KoA-t képezve. Ezt a lépést az acetyl-KoA karboxiláz (ACC) enzim végzi, melyet élesztőben az *ACC1* és *HFA1* gének kódolnak. A reakció fontos kofaktora a biotin, ami az ACC apoproteinhez az apoprotein ligáz által, kovalensen kötött állapotban van jelen. Az apoprotein ligáz enzimet élesztőben a *BPL1/ACC2* gén kódolja. Az ACC enzimnek három fő alegysége van: a biotin-karboxil-szállító fehérjedomén, a biotin karboxiláz domén és a karboxil transzferáz domén. Prokariótákban ezek az alegységek egyedi polipeptidekként expresszálódnak, majd egy heteromer komplexet alakítanak ki. Az eukarióta ACC azonban mindhárom funkciót egyetlen polipeptid láncon hordozza. Az ACC által képződött malonil-KoA kettős karbon donorként szolgál a zsírsav szintáz (FAS) és az elongázok által katalizált ciklikus reakciók során (Tehlivets és mtsi. 2007).

A telített zsírsavak szintézise baktériumokban, valamint az eukarióták mitokondriumaiban és kloroplasztiszaiban különálló gének termékeivel valósul meg (II-es típusú FAS rendszer), ahogyan a fent említett prokarióta ACC reakció is. Ellenben az emlős és élesztő citoplazmatikus zsírsavszintézist végző fehérje alegységek egy vagy két polipeptid lánc doménjeként találhatók meg (I-es típusú FAS rendszer). Az élesztő citoszolikus zsírsav szintáz két alegységből épül fel, a Fas1 (β -alegység) és Fas2 (α -alegység) alegységekből, amelyek hexamer formában kapcsolódnak ($\alpha\beta\beta$). A Fas1-nek acetyl transzferáz, enoil reduktáz, dehidratáz és malonil-palmitoil transzferáz aktivitása van. A Fas2 acetyl-szállító fehérje, 3-ketoreduktáz, 3-ketoszintáz és foszforantetén transzferáz aktivitással rendelkezik (Schweizer és Hofmann 2004, Jenni és mtsi. 2006). Az élesztők mitokondriális zsírsavszintézise a II-es típusú FAS szintézissel történik, mely során minden enzimátikus lépést egy-egy különálló polipeptid végez. Az *Acp1* egy acetyl-szállító fehérje, mely prosztetikus foszforantetén csoportot tartalmaz. A *Cem1* egy β -ketoacetyl-ACP szintáz, az *Oar1*

egy 3-oxoacil-ACP reduktáz, a Htd2 egy 3-hidroxiacil-tioészter dehidratáz, az Etr1 egy enoil-ACP reduktáz és végezetül a Ppt2 egy foszfoantetén transzferáz, ami katalizálja a foszfoantetén prosztetikus csoport apoACP-hez kapcsolódását (Lynen 1980, Smith 1994, Smith és mtsi. 2003, Tehlivets és mtsi. 2007, Schweizer és Hofmann 2004). Mind *C. albicans*-ban, mind *C. parapsilosis*-ban a *FAS2* génre homozigóta mutáns törzsek szabad, exogén eredetű telített zsírsavakat igényeltek a növekedésükhöz, valamint mindkét faj esetében jelentős virulenciacsökkenés volt megfigyelhető (Nguyen és mtsi. 2009, Zhao és mtsi. 1997, Zhao és mtsi. 1996). A gomba zsírsavsintézis kulcsfontosságú feladatai és a humán zsírsavsintézistől való különbözősége miatt kiváló célpontja lehet az antifungális terápiáknak (Nguyen és mtsi. 2009).

A 26 szénatomnál rövidebb zsírsavak esetén a zsírsav elongáció az endoplazmatikus retikulumban történik, a mitokondriális és citoplazmatikus FAS rendszerekhez hasonló reakciókat követve. Ilyen reakció az acil lánc kondenzációja malonil-KoA-vá az Acc1 által, a 3-ketoacil-KoA redukciója 3-hidroxiacil-KoA-vá, majd annak dehidratációja enoil-KoA-vá, illetve újabb redukciója egy olyan acil láncná, amely 2 szénatommal növekedett (Toke és Martin 1996, Dittrich és mtsi. 1998, Tehlivets és mtsi. 2007).

3.4.2. Zsírsav deszaturáció

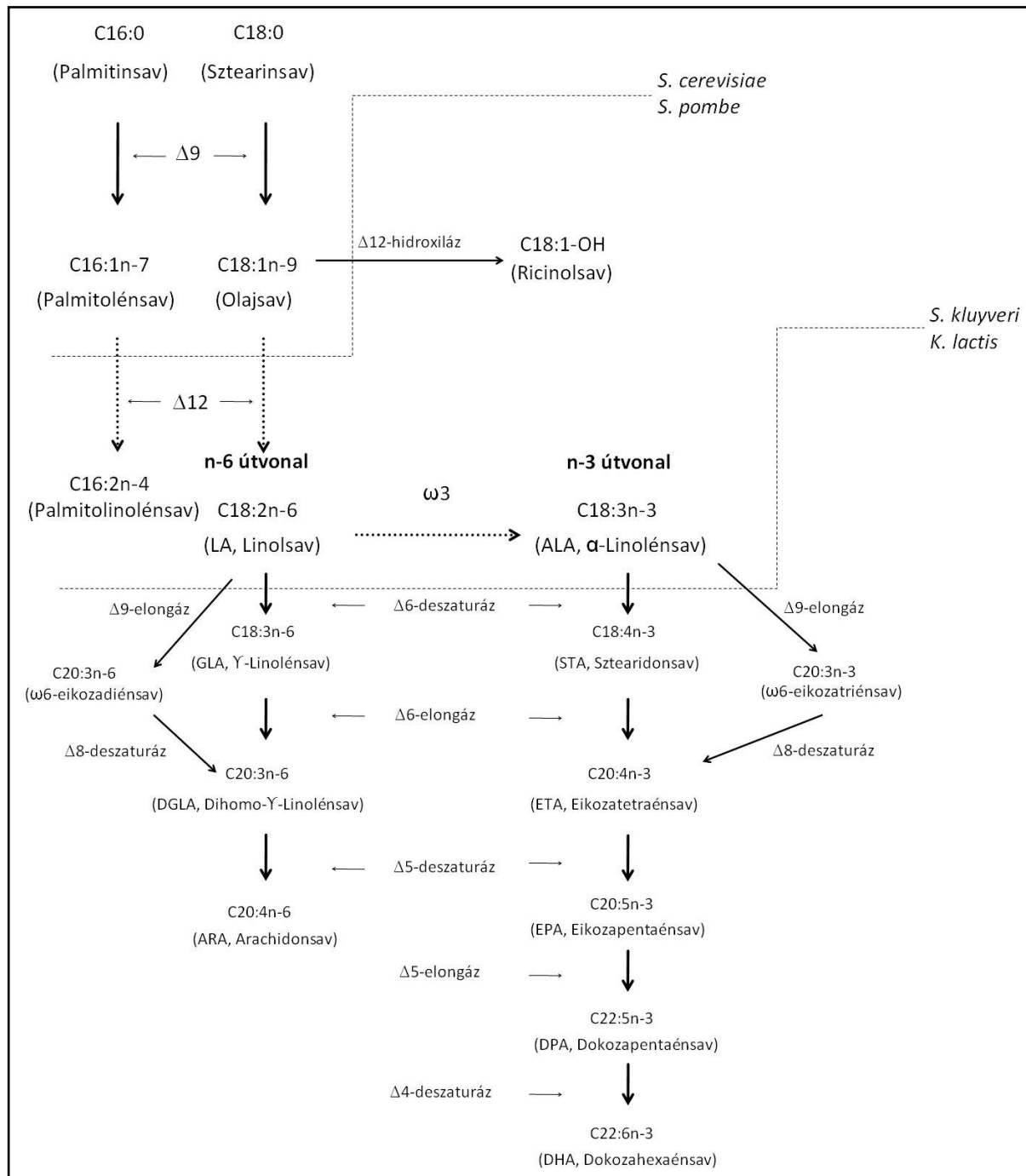
A *de novo* zsírsavsintézis telített zsírsavakat (SFA, Saturated Fatty Acid) eredményez, amelyekből deszaturáz enzimek által katalizált reakciókban, egy vagy több telítetlen kettős kötés beépülésével, egyszeresen (MUFA, Monounsaturated fatty acid) vagy többszörösen telítetlen (PUFA, Polyunsaturated fatty acid) zsírsavak képződnek (Los és Murata 1998). Az SFA-k és UFA-k közötti egyensúly kritikus tényező a membránfluiditás szempontjából, ami elengedhetetlen a sejt membránrendszerének normális funkciójához és integritásához (Xu és mtsi. 2009). Amennyiben ez az egyensúly felborul, a membránok biológiai funkciói sérülnek, úgymint stressztűrés (pl. hőtolerancia), membrán-kötött enzimek aktivációja, szignalizáció, membránfúzió vagy osztódás (Los és Murata 1998, Uemura 2012), Nguyen és mtsi. 2011b).

A zsírsav deszaturázok a zsírsav láncok két szénatomja közötti kötést alakítják át kettős kötéssé. A zsírsav deszaturázok néhány baktérium kivételével minden organizmusban megtalálhatók. Három típusú zsírsav deszaturázt különböztethetünk meg: acil-KoA, acil-ACP és acil-lipid deszaturáz. Növényekben és cianobaktériumokban főként egy acil-lipid deszaturáz alakítja ki a telítetlen kötések többszörösen lipíd-kötött zsírsavakban (Murata és

Wada 1995). Az acil-ACP deszaturázokat növények plasztiszaiban találhatjuk meg, ezek az és ACP-hez kötött zsírsavakba építik be az első kettős kötést (Murata és Wada 1995). Az acil-KoA állati és gombasejteken egyaránt megtalálható deszaturáz, amely koenzim A-hoz kötött zsírsavakba épít telítetlen kötéseket (Los és Murata 1998). A zsírsav deszaturáció aerob körülmények között játszódik le és molekuláris oxigént igényel. A reakcióhoz szükséges elektronokat különböző elektrondonorok szolgáltatathatják. Az acil-ACP deszaturázok, valamint a cianobaktériumok és növényi plasztiszok acil-lipid deszaturázai esetében ferredoxin az elektrondonor (McKeon és Stumpf 1982, Wada és mtsi. 1993). Ezzel ellentétben a növényi acil-lipid deszaturázok, amelyek a citoplazmában helyezkednek el, valamint az állatok és gombák acil-KoA deszaturázai is citokróm b5-öt használnak elektrondonorként (Jaworski és Stumpf 1974, Krishnamurthy és mtsi. 2004, Los és Murata 1998). Minden zsírsav deszaturáz a zsírsavlánc egy specifikus pozíciójába képes telítetlen kötés beépítésére, mint pl. a $\Delta 9$, $\Delta 12$, $\Delta 5$ és $\Delta 6$ pozíciókba (Los és Murata 1998).

A legjobban jellemzett deszaturáz a $\Delta 9$ -sztearoil-KoA deszaturáz, amely ha nem is az egyetlen, de a legfőbb deszaturációs enzim, amely egyszerűen telítetlen zsírsavakat hoz létre. A *de novo* zsírsav-bioszintézis a legtöbb organizmusban 16 (palmitinsav, 16:0) és 18 (sztearinsav, 18:0) szénatomos telített zsírsavakat eredményez. A $\Delta 9$ -sztearoil-KoA deszaturáz enzim ezen telített zsírsavak $\Delta 9$ -es pozíciójában alakít ki kettős kötést, létrehozva az egyszerűen telítetlen palmitolénsavat (16:1) és olajsavat (18:1) (Uemura 2012). Ezt a lépést elsőként élesztőben írták le (Bloomfield és Bloch 1960). 1989-ben izolálták és jellemezték a *Saccharomyces cerevisiae* *OLE1* gént, amely egy $\Delta 9$ zsírsav deszaturáznak bizonyult (Stukey és mtsi. 1989). Később arra is fény derült, hogy a *S. cerevisiae* csak egyszerűen telítetlen zsírsavak előállítására képes (Ratledge 1989), amely felfedezés alkalmassá tette más organizmusokból származó deszaturációs gének heterológ vizsgálatára (Uemura 2012). Élesztők közül számos olyan faj ismert, amely kétszeresen (linolsav, 18:2) vagy akár háromszorosan (α -linolénsav, 18:3) telítetlen zsírsavak előállítására is képes, erre találunk példát a *Kluyveromyces lactis*, a *Pichia pastoris* és a *C. albicans* esetében (Kainou és mtsi. 2006, Ratledge 1989, Wei és mtsi. 2006, Murayama és mtsi. 2006). Ezekhez a deszaturációs lépésekhez a $\Delta 12$ deszaturáz (Fad2) illetve $\omega 3$ deszaturáz (Fad3) enzimek szükségesek. Más organizmusok képesek további deszaturációs, esetleg elongációs lépések beiktatásával nem csak többszörösen telítetlen zsírsavak, hanem hosszú szénláncú telítetlen zsírsavak előállítására. Ezek között bioaktív lipidek is megtalálhatók, mint az arachidonsav (AA), amely előanyagként szolgálhat immunmoduláló leukotriének és prosztaglandinok

képzéséhez (Huang és mtsi. 2004, Pereira és mtsi. 2003, Warude és mtsi. 2006, Noverr és mtsi. 2002) A telítetlen zsírsavak bioszintézise az 1. ábrán látható.



1. ábra. UFA-k bioszintézis útvonalának vázlata állatokban és alsóbbrendű eukariótákban (Uemura 2012).

3.5. OLE gének

A deszaturázok izolálása és tisztítása nehézkes az extrém hidrofobicitásuk és a membránokhoz való kötöttségük miatt. Annak ellenére, hogy a $\Delta 9$ deszaturáz általi deszaturációt elsőként *S. cerevisiae*-ben írták le, sokáig csak állati $\Delta 9$ deszaturáz enzimeket sikerült homogén állapotban tisztítani (Bloomfield és Bloch 1960, Stukey és mtsi. 1990). A *S. cerevisiae* $\Delta 9$ deszaturázt az *OLE1* gén kódolja (Stukey és mtsi. 1989, Stukey és mtsi. 1990). A gén nem esszenciális a pékélesztőben, viszont a deléciós mutáns a növekedéshez exogén telítetlen zsírsavakat igényel (Stukey és mtsi. 1989).

C. albicans esetében két gént azonosítottak, a *CaOLE1* és *CaOLE2* géneket, melyek homológok a *S. cerevisiae* *OLE1* génnel (Krishnamurthy és mtsi. 2004). Ezen gének termékei egymással 33%-os egyezést mutatnak, míg a *S. cerevisiae* Ole1 fehérjével (*ScOle1p*) a *CaOle1p* 57%-os, a *CaOle2p* pedig 32%-os azonosságot mutat. A zsírsav deszaturázok filogenetikai viszonyai alapján a gomba Ole1 fehérjék közeli rokonságban állnak egymással, míg a *CaOle2* és az *Aspergillus fumigatus* Ole1 fehérje messzebb, az emlős deszaturázokkal közös ágra helyeződik (Krishnamurthy és mtsi. 2004). Krishnamurthy és munkatársai (2004) megkísérelték mind a *CaOLE1*, mind a *CaOLE2* géne nézve homozigóta mutáns törzsek előállítását. A *CaOLE1* gén esetében azonban csak heterozigóta mutáns törzs előállítására voltak képesek, nem tudtak életképes homozigóta mutánsokat létrehozni, ami a *CaOLE1* gén esszenciális szerepére utalhat *C. albicans*-ban. Majd létrehoztak egy *CaOLE1* kondicionális mutáns törzset, amelyben az *OLE1* gén csökkent expressziót mutatott. A kondicionális mutáns segítségével bizonyították, hogy a gomba megfelelő növekedéséhez és morfogeneziséhez elengedhetetlen a vad típusnál jelenlevő Ole1p mennyiség. Ezt szintén alátámasztják azok a megfigyelések, miszerint az *OLE1* gén kémiai gátlószereinek alkalmazása csökkent növekedést, valamint virulenciacsökkenést eredményezett (Xu és mtsi. 2009). A *CaOLE2* gén esetében sikeresen létrehozták a homozigóta deléciós mutáns törzset, amely a vad típusal azonos növekedési képességet mutatott minden vizsgált táptalajon. Mindkét gén esetében megvizsgálták, hogy képesek-e komplementálni a *S. cerevisiae* *OLE1* mutáns fenotípusát. A *CaOLE1* gén heterológ expressziója sikeresen helyreállította a vad típusú fenotípust a *S. cerevisiae* *OLE1* deléciós mutáns törzsből, bizonyítva, hogy *C. albicans*-ban az *OLE1* gén $\Delta 9$ zsírsav deszaturáz enzimet kódol. A *CaOLE2* gén heterológ expressziója képtelen volt komplementálni a *S. cerevisiae* *OLE1* deléciós mutáns fenotípusát, amely valószínűsíti, hogy a *CaOLE2* gén terméke nem $\Delta 9$ zsírsav deszaturáz, ugyanakkor a *CaOLE2* deléciós törzs zsírsavprofilja az Ole2 fehérje lehetséges deszaturáz funkcióját feltételezi (Krishnamurthy és

mtsi. 2004). Habár a *CaOLE2* deléciós mutáns növekedési képessége a vad típusú törzsével megegyezett, csökkent prosztaglandin E2 (PGE2) termelést mutatott (Erb-Downward és Noverr 2007). A prosztaglandinok fontos virulenciafaktorként játszhatnak szerepet a gomba patomechanizmusa során (Erb-Downward és Noverr 2007, Noverr és mtsi. 2001).

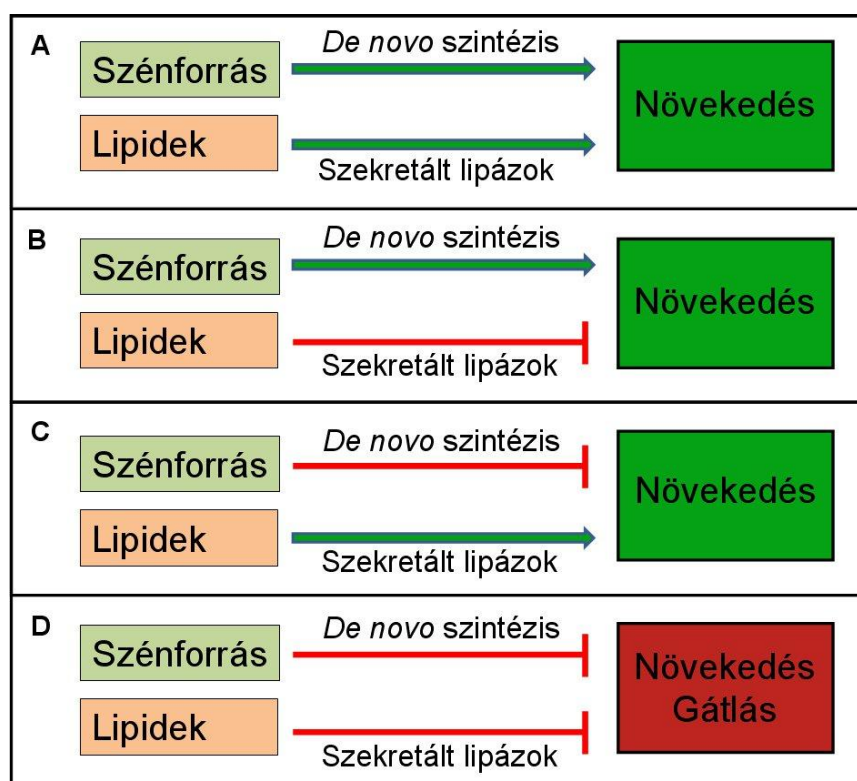
C. parapsilosis esetében szintén két *S. cerevisiae OLE1* homológot azonosítottak, ezek a *CpOLE1* és *CpOLE2* gének. A *C. albicans*-nál tapasztaltakkal ellentétben a *CpOLE1* gén nem esszenciális, azonban a *CpOLE1* mutáns törzs exogén telítetlen zsírsavakat igényel a növekedéshez. Nguyen és Nosanchuk (2011) a *CpOLE1* gén esszenciális szerepét mutatták ki magas glükóz szint okozta glikotoxicitás esetén, mivel az Ole1p képes lipidcseppek képződését elősegíteni glükózból, valamint a *de novo* zsírsav-bioszintézisből származó toxikus SFA-kal szemben védi az élesztősejteket. A *CpOLE1* génre homozigóta deléciós mutáns törzs csökkent virulenciát mutatott *in vitro* és *in vivo* fertőzéses modellekben (Nguyen és mtsi. 2011b). A *CpOLE2* gén pontos szerepéről a szakirodalomban nem áll rendelkezésre információ.

3.6. Az extracelluláris lipáz aktivitás és a *de novo* zsírsav-bioszintézis együttes szerepe a *C. parapsilosis* növekedésében és virulenciájában

A *C. parapsilosis* növekedésében és virulenciájában, a *C. albicans*-hoz hasonlóan, rendkívül fontos szerepet játszik a zsírsavak glükózból történő *de novo* szintézise, valamint az extracelluláris lipázok aktivitása. A lipázok nemcsak a tápanyagszerzés céljából történő lipid-emésztési folyamatokban, hanem a fertőzés során az adhézió elősegítésében, nem-specifikus hidrolízisben, valamint az immunsejtekre gyakorolt hatásuk révén a gyulladással járó folyamatok beindításában is részt vesznek. Exogén zsírsavak hiányában a *de novo* zsírsav-bioszintézis elengedhetetlen a sejtnövekedéshez, valamint a membránnal rendelkező struktúrák kialakulásához. Ez a két esszenciális útvonal azonban szorosan kapcsolódik egymáshoz *C. parapsilosis*-ban azáltal, hogy bármelyik mechanizmus defektusát képes a másik komplementálni (Nguyen és mtsi. 2011a).

Nguyen és munkatársai (2011a) felállítottak egy modellt, melyben összekapcsolták az extracelluláris lipidek emésztését a *de novo* zsírsavszintézissel (2. ábra). Következtetéseiket az alapján vonták le, miszerint a *FAS2* és *OLE1* deléciós törzsek növekedése jelentősen csökkent a lipáz inhibitor ebelakton B kezelést követően, olajsavat (Tween 80) vagy palmitinsavat (Tween 40) tartalmazó táptalajokon. Ez alapján a zsírsav auxotróf mutánsok lipid-gazdag táptalajon való növekedése nagyban függ a szekretált lipázok aktivitásától.

Emellett a *LIP1-2* deléciós mutáns törzs növekedését is megvizsgálták Tween- (40, 80) - tartalmú táptalajon a *FAS2* inhibitor cerulenin adagolása mellett, és ebben az esetben is csökkent növekedést tapasztaltak. Lipáz aktivitás hiányában ugyanis a *de novo* zsírsavszintézis közreműködésétől függ az élesztősejtek növekedése lipidtartalmú táptalajon. Vad típusú sejtek növekedését is vizsgálták glükóz- és lipidtartalmú táptalajon (Tween 80 vagy 40) cerulenin és ebelakton B hozzáadása mellett. Ebben a glükóz- és lipid-gazdag környezetben, ami az emlős gazda szöveti és szérum környezet imitációja, jelentősen csökkent a mindkét gátlószertrel kezelt vad típusú élesztősejtek növekedése, összehasonlítva a gátlószert nem kapott, vagy csak az egyik gátlószert kapott sejtek növekedésével.

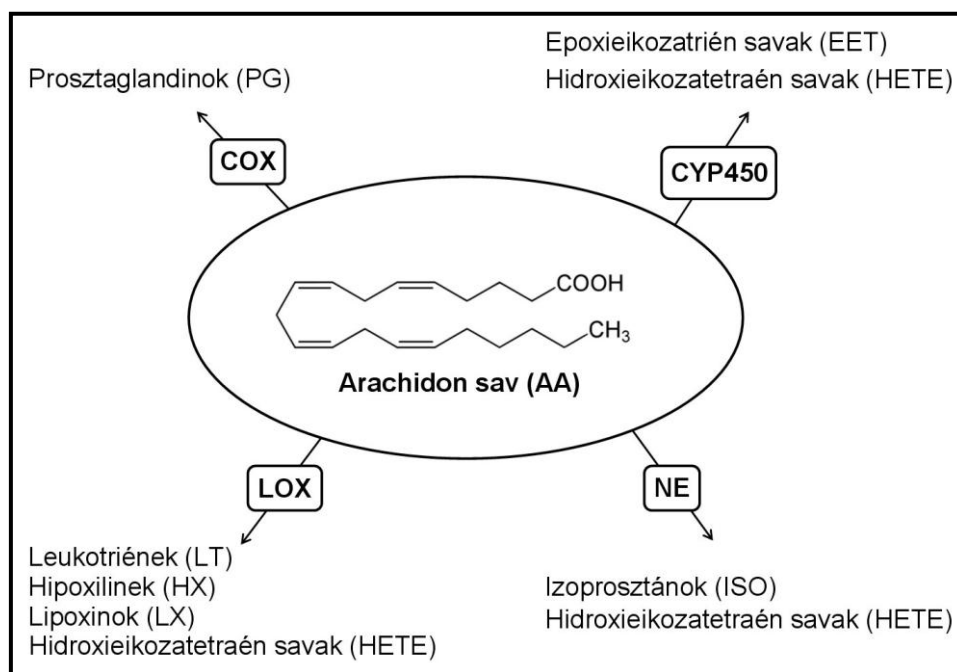


2. ábra. A zsírsavak előállításának sémája szekretált lipázok és a *de novo* zsírsavszintézis közreműködésével szénforrás-, illetve lipidtartalmú tápközegeket felhasználva (Nguyen és mtsi. 2011a).

Ezen eredmények alapján bizonyították, hogy a két útvonal együttes gátlása hatékony módszer lehet a gomba elleni védekezésben lipid-gazdag környezetben, amilyen az emlős gazdaszervezete is (Nguyen és mtsi. 2011a). Rávilágítottak ezen két útvonal *C. parapsilosis* patomechanizmusában betöltött esszenciális szerepére, valamint arra, hogy még számtalan molekuláris mechanizmus, mint például a zsírsavakból képződő bioaktív lipidek, a leukotriének és a prosztaglandinok szerepe nem ismert ezekkel kapcsolatban.

3.7. Prostaglandinok és tromboxánok

A zsírsavszintézis során szignálmolekulák is létrejönnek, melyek kihatnak az immunrendszer működésére (Serhan 2005). Az oxilipinek közé az oxigenált többszörösen telítetlen zsírsavak és azok metabolitjai tartoznak, melyek között kiemelkedő fontosságúak a húsz-szénatomos telítetlen zsírsavakból létrejövő eikozanoidok, mint például a leukotriének, a tromboxánok és a prosztoglandinok. Emlős sejtekben ezek főként dihomo- γ -linolénsavból (DGLA), eikozapentaénsavból (EPA), dokozahexaénsavból (DHA) és arachidonsavból szintetizálódnak (Needleman és mtsi. 1986, Haeggstrom és mtsi. 2010, Serhan 2005, Funk 2001). A membránból a foszfolipáz A₂ (PLA₂) segítségével felszabadított AA-at az emlősök több útvonalon is képesek eikozanoidokká alakítani. Ez a szintézis történhet ciklooxygenázok (COX), lipoxigenázok (LOX), citokróm P450 (CYP450) közreműködésével, valamint nem-enzimatis úton is, melyet a 3. ábra szemléltet (Murakami és Kudo 2004, Rinaldo-Matthis és Haeggstrom 2010, Zeldin 2001, Buczynski és mtsi. 2009).



3. ábra. Az AA-ból történő eikozanoid-bioszintézis a COX, LOX, CYP450 és nem-enzimatis (NE) útvonalak által (Buczynski és mtsi. 2009).

A **LOX** enzimek nem-hem típusú dioxigenázok, amelyek egy oxigén molekula hozzáadását katalizálják az AA-hoz különböző pozíciókban. Ez a hidroxilációs vagy epoxigenizációs lépés leukotriének, mono-, di- és trihidroperoxi-zsírsavak, valamint lipoxinok szintézisét eredményezi (Buczynski és mtsi. 2009).

A **CYP450** különböző enzimek szupercsaládját foglalja magába, melyek a nevüket szénmonoxid kötött formájuk nem szokványos abszorbanciája miatt kapták, aminek a csúcsa 450 nm-nél van. A CYP450 enzimek szubsztrátok széles spektrumánál képesek az oxigén beépülését katalizálni (Omura 1999). Az eikozanoid-bioszintézisben résztvevő CYP450 aktivitását a hidroxiláz és epoxiláz aktivitásokhoz sorolhatjuk. A LOX-okhoz hasonlóan a CYP450 is hidroxilálja, illetve epoxigenálja az AA-at, azonban a CYP450 egy hem-vas aktív centrummal oxidálja a szubsztrátot (Hirao és mtsi. 2005, Schlichting és mtsi. 2000). A CYP450 a NADPH-t kofaktorként használva AA-ból epoxi-eikozatriénsav, illetve dihidroxieikozatriénsav előállítására is képes (Zeldin 2001).

A **COX**-ok, vagy más néven prosztaglandin-endoperoxid szintázok, hem-vas aktív centrummal rendelkező enzimek, amelyek két oxigén molekula beépülését katalizálják az AA-ba. Emlősökben két izoforma, a COX-1 és COX-2 ismert, amelyek rendkívül hasonlóak mind struktúrájukat, mind enzimatis aktivitásukat tekintve. Transzkripciós regulációjuk azonban különböző, mivel a COX-1 konstitutívan expresszálódik szinte minden sejt típusban, a COX-2 kifejeződése pedig függ a pro-inflammatorikus transzkripciós faktortól, az NF- κ B-től (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells). Ebből következően biológiai aktivitásukban is különböznek. A COX-ok két egymást követő reakciót katalizálnak. Első lépésként a COX reakciónak nevezett folyamat során a prosztaglandin-endoperoxid szintáz segítségével oxidálják az AA-at egy instabil endoperoxiddá, a prosztaglandin G₂-vé (PGG₂). Ezt követően a peroxidáz reakció során egy újabb instabil endoperoxid képződik, a prosztaglandin H₂ (PGH₂). Ezután további enzimek (izomerázok, reduktázok, szintázok) segítségével jönnek létre a biológiailag aktív prosztanoidok, mint például a prosztaglandinok (PGD₂, PGE₂, PGF_{2 α} , PGI₂) és a tromboxánok (TXA₂, TXB₂) a szintézis helyétől és a stimulusától függően (Funk 2001, Murakami és Kudo 2004, Smith és mtsi. 2000, Buczynski és mtsi. 2009).

Prosztaglandin-szerű molekulák és hidroxieikozatetraénsavak (HETE) szintézise, **nem-enzimatis** úton, oxidatív stresszből származó szabadgyökök közreműködésével, illetve a szabadgyökök által katalizált lipidperoxidáció révén is végbemehet, melynek során az AA-ból, a DHA-ból és az EPA-ból ún. izoprosztánok jönnek létre. Enzimatis kontroll hiányában ezen molekulák számos sztereoizomere (összesen 64 féle) jöhet létre. A szabadgyökök által katalizált lipidperoxidáció révén a LOX és CYP450 útvonalak termékeként kapott HETE-k képződnek, valamint 9-HETE is, amelynek nincs beazonosítható biológiai aktivitása, ezért indikátora a nem-enzimatis lipoxigenáz aktivitásnak. Mind a 9-

HETE, mind az izoprosztánok felhasználhatóak az oxidatív stressz *in vivo* biomarkereiként (Jahn és mtsi. 2008, Durand és mtsi. 2011, Spiteller 2010, Durand és mtsi. 2009, Buczynski és mtsi. 2009).

A COX útvonalon képződött prosztaglandinok túlnyomórészt egy szerves anion-transzporter polipeptid családba tartozó prosztaglandin transzporter (PGT), illetve más, még nem azonosított transzporterek segítségével szekretálódnak a sejtekből (Schuster 1998, Schuster 2002). Legalább 9 prosztaglandin receptor ismert, ezek közül négy PGE₂-t (EP₁-EP₄), kettő PGD₂-t (DP₁ és DP₂), míg a többi PGF_{2α}-t PGI₂-t és TxA₂-t (FP, IP és TP receptorok) köt. Ezen receptorok mindegyike a hét transzmembrán doménnel rendelkező, G fehérjével kötött receptorok családjába tartozik (Breyer és mtsi. 2001, Narumiya és mtsi. 1999). Széles körben ismert, hogy az aszpirin és más nem-szteroid alapú anti-inflammatorikus (NSAID) drogok a COX-okra gyakorolt gátló hatásuk által csökkentik a prosztaglandin-szintézist (Haeggstrom és mtsi. 2010, Ricciotti és FitzGerald 2011, Kock és mtsi. 2007). Az emlős sejtek által termelt eikozanoidok különböző stimulusok hatására termelődnek. Ilyen stimulusok lehetnek fizikai vagy kémiai (citokinek) hatások, valamint a patogén invázió. A prosztaglandinoknak számos szövet-specifikus funkciója lehet, mint gyulladás és láz indukálása, női reprodukció befolyásolása, sejtproliferáció szabályozása, tumor genesis, vazodilatáció és vérlemezke aggregáció szabályozása, továbbá fájdalom indukálása (Langenbach és mtsi. 1995, Morham és mtsi. 1995, Ushikubi és mtsi. 1998, Lim és mtsi. 1997, Rudnick és mtsi. 2001, Williams és mtsi. 1999, Funk 2001). A prosztaciklin (PGI₂) a koronária erek vazodilatációját segíti elő, valamint gátolja a vérlemezkek alvadékképzését (Funk 2001). Ezzel ellentétes hatásuk van a tromboxánoknak (TxA₂), amelyek a vérerek összehúzódását, valamint a vérlemezkek aggregációját segítik elő (Hata és Breyer 2004). A PGF_{2α} a méh simaizomzatának összehúzódásában vesz részt, míg a PGD₂ a T-helper 2 (Th2) limfocita kemotaxiszt segíti elő és a tüdő epitél sejtek allergiás reakcióját váltja ki, ami asztmához vezet (Funk 2001, Hata és Breyer 2004). A PGE₂ a szervezetben legnagyobb mennyiségben termelődő prosztaglandin. Állatokban a legjobban jellemzett és számtalan biológiai funkcióval rendelkezik, mint pl. az immunrendszer, a vérnyomás, a gasztro-intesztinális integritás és a termékenység szabályozása (Ricciotti és FitzGerald 2011). A PGE₂ szerepe az immunválasz szabályozásában rendkívül jelentős. Egyrészt képes gátolni a Th1-típusú immunválaszt, a fagocitózist és limfocita proliferációt, másrészt elősegíti a Th2-típusú immunválaszt, az immunglobulin E termelést és a szöveti eozinofíliát (Betz és Fox 1991, McIlroy és mtsi. 2006, Sergeeva és mtsi. 1997, Demeure és mtsi. 1997, Kalinski és mtsi.

1997, Shibata és mtsi. 2005). A korai immunválasz Th1/Th2 egyensúlyának Th2-es irányba történő eltolódása *Candida* fertőzések során a patogén túlélését, illetve elterjedését eredményezi, ami krónikus betegséget idéz elő (Louie és mtsi. 1994). A gombafertőzések során a megnövekedett prosztaglandin-termelés fontos tényező lehet a gomba által okozott kolonizáció elősegítésében és a fertőzések krónikussá válásában (Noverr és mtsi. 2002).

3.8. Gomba prosztaglandinok

Az eikozanoidok és oxilipinek termelése rendkívül elterjedt a fonalas gombák, az élesztők, valamint az Oomycota-k körében egyaránt. Egy tanulmányban a patogén fajok eikozanoid termelését vizsgálták, és megállapították, hogy minden faj termelt mérhető mennyiségű COX és LOX terméket endogén módon, illetve exogén AA-ból (Noverr és mtsi. 2002). A fajok közt szerepeltek dermatofiták (*Epidermophyton floccosum*, *Fusarium dimerum*, *Microsporium audouinii*, *Microsporium canis* és *Trichophyton rubrum*), szubkután (*Sporothrix schenckii*), valamint szisztémás patogének (*Absidia corymbifera*, *Aspergillus fumigatus*, *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis*, *Penicillium* fajok, *Rhizopus* fajok és *Rhizomucor pusillus*). Korábban már megállapították, hogy a patogén élesztő *Cryptococcus neoformans* és a *C. albicans* ugyancsak képes prosztaglandinok termelésére kisebb mennyiségben *de novo*, illetve nagyobb mennyiségben exogén AA-ból (Noverr és mtsi. 2001). Ezek az eredmények arra utalnak, hogy ezek a patogén gombák képesek a fertőzés során a gazdától származó AA-at felhasználni a saját eikozanoidjaik termeléséhez. Ezek a vegyületek legtöbbször mind a gomba fejlődésében, mind annak a gazdával való sejtszintű kommunikációjában részt vesznek (Noverr és mtsi. 2003, Kock és mtsi. 2003). A *C. albicans* által termelt eikozanoidok közül egy keresztreakciót mutatott az emlős PGE₂-vel. Ez a vegyület, hasonlóan az emlős PGE₂-höz, biológiai aktivitást mutat az emlős sejteken *in vitro*. Korábban említettük, hogy az emlős PGE₂ a Th1-típusú immunválaszt a Th2-típusú immunválasz felé tolja el. A gomba prosztaglandin kereszt-reaktivitása utalhat a gomba prosztaglandinok immunmoduláló hatására azáltal, hogy a gazda immunrendszerét a patogenezis elősegítése irányába mozdítják el. Annak ellenére, hogy a gombákban nem található az emlős ciklooxygenázokkal homológ enzim, annak inhibitorai, mint az aszpirin és a NSAID drogok, gátolták a gomba prosztaglandin termelését (Noverr és mtsi. 2001). *C. albicans*-ban a zsírsav deszaturáz homológ Ole2 és a „multicopper” oxidáz homológ Fet3 enzimet azonosították, mint a gomba prosztaglandin-bioszintézisének kulcs faktorát (Erb-Downward és Noverr 2007). *C. parapsilosis*-ban eddig még nem vizsgálták sem a prosztaglandin-szintézis, sem az *OLE2* gén szerepét, holott a fenti megállapítások alapján a

prostaglandin-bioszintézis fontos virulenciafaktor a patogén gombák esetén, valamint ígéretes célpont lehet az antifungális szerek fejlesztésében.

4. Célkitűzések

A klasszikus virulenciafaktorokon túl, számos patogén gomba esetében bizonyították a *de novo* zsírsav-bioszintézis, továbbá a gombák által termelt bioaktív lipidek virulenciában betöltött fontos szerepét. Az utóbbi évtizedekben a *C. parapsilosis* klinikai jelentősége egyre növekszik, azonban igen keveset tudunk a gomba virulenciafaktorairól. Annak érdekében, hogy a *C. parapsilosis* egy lehetséges virulenciafaktoráról, a gomba eredetű bioaktív lipidek termeléséről szélesebb körű ismereteket szerezzünk, az alábbi célokat fogalmaztuk meg:

- 1.) A *C. parapsilosis* exogén arachidonsavból történő prosztaglandin termelésének jellemzése.
- 2.) A *C. parapsilosis*-ban azonosított, feltételezett zsírsav deszaturáz *CpOLE2* gén célzott génkiütése; a *CpOLE2* génre deléciós mutáns törzsek fiziológiai és virulenciában betöltött szerepének jellemzése; a $\Delta Cpole2/\Delta Cpole2$ homozigóta mutáns törzs zsírsavprofiljának és prosztaglandin-termelési képességének vizsgálata.
- 3.) További, a *C. parapsilosis* prosztaglandin-bioszintézisében szerepet játszó gének azonosítása arachidonsavas indukciót követő microarray analízis segítségével; az azonosított gének célzott génkiütése, a mutánsok jellemzése.

5. Anyagok és módszerek

5.1. A kísérletekben használt mikroba törzsek

Escherichia coli XL1-Blue

GA1: *Candida parapsilosis* GA1, vad típus (Hamburg, Németország) (Gacser és mtsi. 2007c)

CLIB214: *Candida parapsilosis* CLIB214, vad típus (Puerto Rico) (Laffey és Butler 2005)

CLIB His-Leu-: *Candida parapsilosis* CLIB214 hisztidin, leucin deléciós mutáns ($\Delta his1/\Delta his1/\Delta leu2/\Delta leu2$) (Dublin, Írország)

CpOLE1: *Candida parapsilosis* GA1-ből képzett *OLE1* 2.1-es homozigóta mutáns, ($\Delta ole1/\Delta ole1::FRT$)

CpOLE2_6/4: *Candida parapsilosis* GA1-ből képzett *OLE2* heterozigóta mutáns ($OLE2/\Delta ole2::FRT$)

CpOLE2: *Candida parapsilosis* GA1-ből képzett *OLE2* homozigóta mutáns ($\Delta ole2/\Delta ole2::FRT$)

CpUGA3: *Candida parapsilosis* CLIB214-ből képzett *UGA3* homozigóta mutáns ($\Delta uga3/\Delta uga3/\Delta his1/\Delta his1/\Delta leu2/\Delta leu2::cdHIS1/cmLEU2$)

CpSOU2: *Candida parapsilosis* CLIB214-ből képzett *SOU2* homozigóta mutáns ($\Delta sou2/\Delta sou2/\Delta his1/\Delta his1/\Delta leu2/\Delta leu2::cdHIS1/cmLEU2$)

Cp703920: *Candida parapsilosis* CLIB214-ből képzett CPAR2_703920 homozigóta mutáns ($\Delta 703920/\Delta 703920/\Delta his1/\Delta his1/\Delta leu2/\Delta leu2::cdHIS1/cmLEU2$)

Cp108490: *Candida parapsilosis* CLIB214-ből képzett CPAR2_108490 homozigóta mutáns ($\Delta 108490/\Delta 108490/\Delta his1/\Delta his1/\Delta leu2/\Delta leu2::cdHIS1/cmLEU2$)

A marker gének *Candida dubliniensis*-ből (*cdHIS1*) és *Candida maltosa*-ból (*cmLEU2*) származnak.

5.2. A kísérletekben használt sejtek/sejtvonalak

PBMC/PBMC-DM: Egészséges felnőtt donorok perifériás véréből izolált mononukleáris sejtek (PBMC) és az azokból differenciáltatott makrofágok (PBMC-DM).

5.3. Tenyésztéshez használt tápoldatok/táptalajok

YPD/PS tápoldat/táptalaj: 0,5% élesztőkivonatot, 1% peptont és 1% D-glükózt tartalmazó tápoldat, 100 U/ml penicillin-sztreptomycin (PS) (Sigma-Aldrich) oldattal kiegészítve. Táptalaj esetén további 2,5% agarral kiegészítve.

Transzformáláshoz használt tápoldatok/táptalajok: YPD/PS tápoldat 1 M szorbitollal kiegészítve és YPD/PS tápoldat/táptalaj 50 µg/ml nourseothricin-nel (NAT) (WERNER BioAgents) kiegészítve. Táptalaj esetén további 2,5% agarral kiegészítve.

FLP (flippáz) indukciós tápoldat YNB/PS/MAL: Yeast Nitrogen Base (YNB w/o Amino Acids, Difco) tápoldat 100 U/ml PS oldattal és 2% maltózzal kiegészítve.

FLP indukciót szelektáló táptalaj YPD/PS/FLPout: YPD/PS táptalaj 3 µg/ml NAT-tal kiegészítve.

OLE1 tápoldat/táptalaj: YPD/PS tápoldat/táptalaj 1% Tween 80-nal kiegészítve.

YNB tápoldat/táptalaj aminosavakkal kiegészítve: YNB tápoldat 100 U/ml PS oldattal kiegészítve. Táptalaj esetén további 2,5% agarral kiegészítve. Hisztidin (HIS) és leucin (LEU) auxotrófia esetén 0,002% arginin, 0,003% izo-leucin, 0,003% lizin, 0,002% metionin, 0,005% fenil-alanin, 0,02% treonin, 0,003% tirozin, 0,002% uracil, 0,015% valin, 0,02% alanin és 0,02% triptofán hozzáadása. HIS prototrófia szűrése esetén 0,005% leucinnal kiegészítve. LEU prototrófia szűrése esetén 0,001% hisztidinnel kiegészítve.

YNB/FBS táptalaj: YNB tápoldat 100 U/ml PS oldattal, 10% Fetal Bovine Serum-mal (FBS) (Lonza) és 2,5% agarral kiegészítve.

YCB/BSA táptalaj: Yeast Carbon Base tápoldat (YCB, Difco) a gyártó utasításai alapján 100 U/ml PS oldattal, 2% Bovine Serum Albumin-nal (BSA) és 2,5% agarral kiegészítve.

Különböző pH-jú YPD táptalajok: YPD/PS táptalaj McIlvaine pufferek megfelelő arányú keverékében oldva. McIlvaine pufferek: 0,2 M dinátrium-hidrogén-foszfát (Na_2HPO_4) oldat és 0,1 M citromsav oldat. A pufferek aránya a megfelelő pH beállításához 20 ml végtérfogatra: **pH4:** 7,71 ml Na_2HPO_4 és 12,29 ml citromsav; **pH5:** 10,3 ml Na_2HPO_4 és 9,7 ml citromsav; **pH6:** 12,63 ml Na_2HPO_4 és 7,37 ml citromsav; **pH7:** 16,47 ml Na_2HPO_4 és 3,53 ml citromsav; **pH8:** 19,45 ml Na_2HPO_4 és 0,55 ml citromsav.

Stresszorral kiegészített YPD tápoldat: Különböző koncentrációban alkalmazott stresszorokkal kiegészített YPD/PS tápoldat: **koffein** (*sejtfal stresszor*): 1 / 0,5 / 0,25 / 0,125 / 0,062 / 0,03 M; **SDS** (*nátrium-dodecil-szulfát, sejtmembrán detergens*): 2 / 1 / 0,5 / 0,25 / 0,125 / 0,062%; **hidrogén-peroxid** (*oxidatív stresszor*): 75 / 50 / 25 / 12 / 6 / 3 mM; **higromicin B** antibiotikum (*polipeptid szintézis gátlás*): 312 / 156 / 78 / 39 / 19,5 / 9,75 µg/ml; **kongó vörös** (*sejtfal stresszor, kitin és β-1,3-glükán szintázok gátlása*) 2 / 1 / 0,5 / 0,25 / 0,125 / 0,065 mg/ml; **kalkofluor fehér** (*fluoreszcens festék*) 2 / 1 / 0,5 / 0,25 / 0,125 / 0,065 mg/ml

LB tápoldat/táptalaj: 0,5% élesztőkivonatot, 1% triptont és 1% nátrium-kloridot (NaCl) tartalmazó tápoldat. Táptalaj esetén 2,5% agarral kiegészítve. *E. coli* törzsek transzformációja esetén LB táptalaj/tápoldat 100 µg/ml ampicillin (Sigma-Aldrich) oldattal kiegészítve (LB^{AMP}).

SOB tápoldat: 2% triptont, 0,5% élesztőkivonatot, 10 mM NaCl-t, 2,5 mM kálium-kloridot (KCl), 10 mM magnézium-kloridot (MgCl₂), valamint 10 mM magnézium-szulfátot (Mg₂SO₄*7H₂O) tartalmazó tápoldat, melynek pH-ját 6,7-7,0 érték közé állítottuk be 5 M kálium-hidroxid (KOH) oldattal.

PBMC/PBMC-DM tápoldat: RPMI 1640 tápoldat (Lonza) 100 U/ml penicillin-sztreptomycin oldattal kiegészítve (RPMI/PS). X-VIVO (X-VIVO 15 without phenol red and gentamycin, Lonza) tápoldat 100 U/ml penicillin-sztreptomycin oldattal és 4µg/ml granulocita és makrofág kolónia stimuláló faktorról (GM-CSF, Sigma-Aldrich) kiegészítve (X-VIVO/PS/GM-CSF).

DMEM tápoldat: Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, BioWhittaker) tápoldat, 10% hőinaktivált FBS-sel 100 U/ml penicillin-sztreptomycin oldattal kiegészítve.

10x PBS oldat (Phosphate buffered saline): 8% NaCl, 0,2% KCl, 1,44% Na₂HPO₄, 0,24% kálium-dihidrogén-foszfát (KH₂PO₄).

Prostaglandin termeltetéshez használt indukciós tápoldat: 1x PBS oldat 0,015% arachidonsavval (Sigma) kiegészítve.

5.4. Kísérleti módszerek

5.4.1. Sejtvonalak és élesztő törzsek fenntartása, tenyésztése, primer sejtek izolálása

5.4.1.1. *Candida* törzsek fenntartása és tenyésztése: Az élesztő törzseket YPD/PS táptalajon tartottuk fenn 4°C-os hűtőben, kéthavonta frissítve a tenyészeteket. Az élesztőket a felszaporításhoz szilárd táptalajról oltottuk kaccsal 2 ml YPD/PS tápoldatba, majd 30°C-on, 200 rpm fordulatszámmal rázatva egy éjszakán át inkubáltuk. Az élesztőket az elektroporálással történő transzformációs kísérletekhez 100 ml YPD/PS tápoldatban szaporítottuk fel.

5.4.1.2. PBMC izolálás és PBMC-DM differenciáltatás: A perifériás vér mononukleáris sejtjeinek izolálása egészséges felnőtt donorok véréből előállított „buffy coat” vérkészítményből történt, Ficoll Paque Plus (GE Healthcare) sűrűséggrádiens centrifugálással (900 rpm, 30 perc, 20°C). A centrifugálást követően a PBMC frakciókat 3 db 50 ml-es falcon csőbe gyűjtöttük, majd jéghideg 1x PBS-sel 40 ml-ig töltöttük fel. Újabb centrifugálást (1000 rpm, 10 perc, 4°C) követően a pelleteket jéghideg ACK lízis pufferrel (0,8% ammónium-klorid, 0,1% kálium-hidrogénkarbonát) összemostuk. Ismét centrifugáltuk (1000 rpm, 10 perc, 4°C), majd jéghideg 1x PBS-ben mostuk a sejteket (1000 rpm, 10 perc, 4°C). A pelleteket jéghideg RPMI/PS tápoldatban vettük fel, majd a megfelelő tenyésztőedényben inkubáltuk a sejteket két órán keresztül (37°C, 100% relatív páratartalom, 5% CO₂ tenzió). Két óra elteltével a sejteket 37°C-ra előmelegített 1x PBS-sel mostuk, majd X-VIVO/PS/GM-CSF tápoldatban 5 napon keresztül inkubáltuk (37°C, 100% relatív páratartalom, 5% CO₂ tenzió). Ez idő alatt a PBMC-k makrofágokká differenciálódtak.

5.4.2. Kompetens sejtek készítése

5.4.2.1. Kompetens *E. coli* sejtek készítése: Kompetens *E. coli* sejtek készítéséhez egy telep XL1-Blue *E. coli* inokulumot 25 ml LB tápoldatba oltottunk, majd 8 órán át 37°C-on 250 rpm rázatással növesztettünk. Az így felnövesztett induló tenyészetből 15 ml-t 250 ml SOB tápoldatba oltottunk, majd 16°C-on 175 rpm rázatás mellett egy éjszakán keresztül növesztettük. Másnap, mikor a tenyészet a 0,4 OD értéket (600 nm-en) elérte, a kultúrát két falcon csőbe öntöttük, majd 4°C-on 5000 rpm-mel 10 percig centrifugáltuk. A sejteket 80 ml TB pufferben (10 mM PIPES, 15 mM kalcium-klorid, 250 mM KCl, 55 mM mangán-klorid, pH6,7) felszuszpendáltuk, majd 8% dimetil-szulfoxidot (DMSO, Sigma) adtunk hozzá. Az

így elkészített szuszpenziót 100 µl-es adagokban, folyékony nitrogénben fagyasztottuk, majd felhasználásig -80°C-on tároltuk.

5.4.2.2. Kompetens *C. parapsilosis* sejtek készítése elektroporáláshoz: Kompetens *C. parapsilosis* sejtek készítéséhez egy oltókacsnyi inokulumot 100 ml YPD/PS tápoldatba oltottunk, majd 30°C-on 200 rpm rázatás mellett egy éjszakán keresztül növesztettük. Másnap a felnövesztett kultúrát 2 db 50 ml-es falcon csőbe öntve 4°C-on 3000 rpm-mel 5 percig centrifugáltuk. A leülepített sejteket 50 ml 1x TE pufferben (10x-es TE törzsoldatból hígítva, 10x TE puffer: 100 mM TRIS, 10 mM EDTA, pH7,5) öszemostuk 1db 50 ml-es falcon csőbe és ismét centrifugáltuk, majd 30 ml 1x TE-t és 0,1 M lítium-acetátot (Sigma) tartalmazó pufferben felszuszpendáltuk és 45 percig 30°C-on 200 rpm mellett ráztattuk. Az inkubációs idő letelte után 750 µl 1 M koncentrációjú ditiotreitol (DTT) oldatot adtunk a szuszpenzióhoz, majd további 15 percig ráztattuk (30°C, 200 rpm). Az inkubációs idő letelte után a szuszpenziót jéghideg steril desztillált vízzel 50 ml-re kiegészítettük és 4°C-on 3000 rpm-mel 5 percig centrifugáltuk. A sejteket ezután kétszer jéghideg steril desztillált vízzel, majd utolsó lépésként jéghideg 1 M koncentrációjú szorbitol oldattal mostuk. Az így elkészített kompetens sejteket felhasználásig jégen tároltuk.

5.4.2.3. Kompetens *C. parapsilosis* sejtek készítése kémiai transzformációhoz: Kompetens *C. parapsilosis* sejtek készítéséhez egy oltókacsnyi inokulumot 5 ml YPD/PS tápoldatba oltottunk, majd 30°C-on 200 rpm rázatás mellett egy éjszakán keresztül növesztettük. Másnap a felnövesztett kultúrát 0,2 OD értékre hígítottuk 30 ml YPD/PS tápoldatban és további 4 órán át inkubáltuk 30°C-on 200 rpm rázatás mellett (\approx OD=1,0). A sejteket centrifugálással ülepitettük (3000 rpm, 4°C, 5 perc), majd 3 ml jéghideg vízzel mostuk és ismételen centrifugálással ülepitettük (3000 rpm, 4°C, 5 perc). A sejteket 1 ml jéghideg TELIOAC oldattal (100 µl 1 M lítium-acetát, 100 µl 10x TE puffer, 800 µl desztillált víz) szuszpendáltuk fel és átmértük mikrocentrifuga csövekbe, majd 13000 rpm-el 30 másodpercig centrifugáltuk őket. Végül 200 µl jéghideg TELIOAC oldatban felszuszpendáltuk a sejteket és a felhasználásig jégen tároltuk.

5.4.3. Kompetens sejtek transzformálása

5.4.3.1. Kompetens *E. coli* sejtek transzformálása: 100 µl, -80°C-on tárolt kompetens sejtet jégen 10 perc alatt kiolvasztottunk, majd a sejtekhez hozzámértük a transzformálni kívánt DNS-t és további 25 percig jégen inkubáltuk. Ezután a sejteket 42°C-on hősokkoltuk 2 percig, majd 800 µl LB tápoldat hozzáadása után a sejteket 37°C-on 40 percig inkubáltuk. Ezt

követően LB^{AMP} táptalajra szélesztettük a sejteket két különböző koncentrációban. A csészéket egy éjszakán keresztül 37°C-on inkubáltuk.

5.4.3.2. Deléciós konstrukciók előkészítése és kompetens *C. parapsilosis* sejtek elektroporálással történő transzformálása: A transzformálandó deléciós konstrukciók plazmid preparátumaiból 5 µg mennyiséget 200 µl végtérfogatban KpnI-SacI restrikciós endonukleázokkal emésztettük egy éjszakán át 37°C-on. Az emésztési elegy 1 µl-ét 0,8%-os TAE gélelektroforézissel ellenőriztük. A fennmaradó mennyiségből a DNS-t 1x térfogat izopropanollal csaptuk ki, majd a DNS-t centrifugálással ülepitettük (13000 rpm, 10 perc) és a pelletet 70% etanollal mostuk (13000 rpm, 5 perc). 5 perc szárítás után a DNS pelletet 5 µl steril desztillált vízben oldottuk vissza. A kompetens *C. parapsilosis* sejtek 40 µl mennyiségéhez hozzáadtunk 5 µg emésztett plazmid DNS-t, majd a szuszpenziót 0,2 cm résszélességű jéghideg elektroporáló küvetába (Bio-Rad) tettük és transzformálásig jégen tároltuk. Az elektroporáció 1,5 kV, 25 µF és 200 Ω paraméterek mellett történt. Az elektroporáció után a sejtekhez 800 µl 1 M szorbitollal kiegészített YPD/PS tápoldatot adtunk, majd az elegyet 2 ml 1 M szorbitollal kiegészített YPD/PS tápoldatba pipettáztuk és 3 órán keresztül 30°C-on inkubáltuk. Az inkubációs idő letelte után a sejteket centrifugáltuk (3000 rpm, 5 perc), 200 µl 1 M szorbitollal kiegészített YPD/PS tápoldatban felszuszpendáltuk, majd YPD/NAT csészére szélesztettük. A transzformáns telepeket tartalmazó csészéket 2 napig 30°C-on inkubáltuk.

5.4.3.3. Kompetens *C. parapsilosis* sejtek kémiai transzformálása: Kémiai transzformációhoz elkészített kompetens *C. parapsilosis* sejtek 100 µl-éhez 10 µl, 10 mg/ml koncentrációjú, frissen hőinaktivált (10 perc, 99°C) hering sperma DNS-t (Sigma), valamint 5 µg mennyiségű emésztett plazmid DNS-t adtunk, majd óvatos elkeverés után az elegyet 30 percig 30°C-on inkubáltuk. Ezután a transzformációs elegyhez 700 µl frissen készített PLATE oldatot (100 µl 1 M lítium-acetát, 100 µl 10x TE puffer, 800 µl 50% PEG 3350) adtunk, majd egy éjszakán át 30°C-on inkubáltuk. Másnap 44°C-on 15 percen keresztül hősokkoltuk, majd mikrocentrifuga segítségével ülepitettük a sejteket (13000 rpm, 30 mp). A felülúszó óvatos eltávolítása után a pellet felzavarása nélkül 1 ml friss YPD/PS tápoldatot mértünk a sejtekre és további 2 órán át inkubáltuk 30°C-on 200 rpm rázatás mellett. Ezután a sejteket a megfelelő szelektív táptalajra szélesztettük és a transzformáns telepeket tartalmazó csészéket 2-3 napig 30°C-on inkubáltuk.

5.4.4. Fermentlevek előállítása a *Candida* törzsek prosztoglandin termelésének vizsgálatához: A *Candida* törzsekből egy oltókacsnyi inokulumot 5 ml YPD/PS tápoldatba oltottunk, majd 30°C-on 200 rpm rázatás mellett egy éjszakán keresztül növesztettük. Másnap a felnövesztett kultúrákból 2×10^9 sejtet 100 ml 1x PBS-be (kontroll), illetve 100 ml indukciós oldatba (1x PBS oldat 0,015% arachidonsavval kiegészítve) továbboltottuk. 24 óra indukciót követően a tenyészeteket sejtmentesre szűrtük, majd a fermentleveket a felhasználásig 4°C-on tároltuk.

5.4.5. A vad típusú törzs és a *CpOLE2* deléciós mutánsok eltérő sejtfal- és oxidatív stresszorokra adott válaszainak vizsgálata: A gombasejteket a 5.4.1.1. pontban leírtaknak megfelelően szaporítottuk fel, majd 1x PBS-sel történő kétszeri mosást és centrifugálást (3000 rpm, 5 perc) követően YPD/PS-ben állítottuk be a kívánt sejt koncentrációt ($6,6 \times 10^5$ sejt/ml). A vad típusú és mutáns sejteket tartalmazó szuszpenziókat 96 lyukú mikrotiter lemezre pipettáztuk (95-95 μ l), majd hozzáadtuk a megfelelő koncentrációban kihígított stresszorokat (5-5 μ l), kontrollként stresszor-mentes YPD/PS tápoldatot használva. A mikrotiter lemezeket 30°C-on 16 órán át inkubáltuk, majd spektrofotométer segítségével 620 nm-en meghatároztuk az optikai denzitás értékeket.

5.4.6. A vad típusú törzs és a *CpOLE2* deléciós mutánsok pszeudohifa képzésének vizsgálata: A gombasejteket a 5.4.1.1. pontban leírtaknak megfelelően szaporítottuk fel, majd 1x PBS-sel történő kétszeri mosást és centrifugálást (3000 rpm, 5 perc) követően 1x PBS-ben állítottuk be a kívánt sejt koncentrációt (10^7 sejt/ml), amit DMEM tápoldathoz adtunk. A sejtek pszeudohifa-képzését a tápoldathoz való hozzáadásuk után mikroszkóppal folyamatosan nyomon követtük és 60 perces, 24 és 48 órás inkubálásokat követően mikroszkópos felvételt készítettünk.

5.4.7. Molekuláris technikák

5.4.7.1. Bakteriális plazmid tisztítása: Az 5.4.3.1 pontban leírt (Kompetens *E. coli* sejtek transzformálása), 37°C-on felnőtt transzformáns telepeket 2 ml LB^{AMP} tápoldatba oltottuk, majd egy éjszakán át 200 rpm-mel 37°C-on rázattuk. A tenyészeteket másnap 1,5 ml-es mikrocentrifuga csövekbe pipettáztuk és 6000 rpm-mel 5 percig ülepítettük. A kiülepített sejteket 100 μ l lízis pufferben (50 mM glükóz, 10 mM EDTA, 25 mM TRIS, pH7,5) felszuszpendáltuk, majd 5 percig állni hagytuk. Ezután 200 μ l alkalikus SDS-t (4,4 ml steril desztillált víz, 100 μ l 10 M NaOH, 0,5 ml 20% SDS) adtunk hozzá, mellyel óvatosan összeforgattuk, 150 μ l 3 M-os kálium-acetát oldatot adtunk hozzá. 15 perc jégen történő inkubálás után 0,5 ml kloroform-izoamilalkohol 24:1 arányú elegyet adtunk hozzá és

vortexelés után 13000 rpm-mel 10 percig centrifugáltuk a mintákat. A felső, vizes fázisban levő DNS-t 1x térfogatú izopropanollal csaptuk ki, majd a DNS-t centrifugálással üleptettük (13000 rpm, 10 perc) és 70% etanollal mostuk (13000 rpm, 5 perc). 5 perc szárítás után a DNS pelletet 30 µl RNáz (250 µg/ml, Sigma) tartalmú steril desztillált vízbe oldottuk vissza. A plazmidok ellenőrzése restriktációs emésztéssel történt. Nagyobb mennyiségű plazmid izolálása érdekében a transzformáns telepeket 2 ml LB^{AMP}-ban történő előtenyésztés után (16 óra, 200 rpm, 37°C) 100 ml térfogatú LB^{AMP} tápoldatba oltottuk és egy éjszakán át 200 rpm-mel 37°C-on ráztattuk. Másnap a bakteriális plazmid tisztítását Plasmid Midi Kit (Geneaid) segítségével, a gyártó utasításainak megfelelően végeztük.

5.4.7.2. Totál DNS kivonás gombából: A törzseket 2 ml YPD/PS tápoldatban ráztattuk (200 rpm, 30°C) egy éjszakán át. A sejteket 3000 rpm fordulaton 5 percig centrifugáltuk, majd a sejt pelletre 500 µl lízis puffert (1% SDS, 50 mM EDTA, 100 mM TRIS, pH8) és 500 µl-nyi üveggyöngyöt mértünk és ezt követően 3 percen keresztül vortexeltük. A mintákhoz 275 µl 7 M-os ammónium-acetátot adtunk, majd 5 percig 65°C-on, ezt követően pedig 5 percig jégen inkubáltuk. A mintákat 500 µl kloroform-izoamilalkohol (24:1) hozzáadását követően centrifugáltuk (13000 rpm, 10 perc), majd a felső vizes fázist átpipettáztuk egy másik mikrocentrifuga csőbe, amelyhez 500 µl izopropanolt adtunk, és 30 percre -20°C-ra helyeztünk. Ezután a mintákat centrifugáltuk (13000 rpm, 10 perc), a felülúszót eltávolítottuk, a kiülepedett csapadékra 70%-os etanolt mértünk, majd a mintákat a fenti paraméterekkel újból centrifugáltuk. A felülúszó eltávolítása után a mintákat beszárítottuk és 100 µl RN-áz (250 µg/ml, Sigma) tartalmú bidesztillált vízben vettük fel. A DNS kivonás sikerességét 1-1 µl minta 0,8%-os agaróz gélen történő gélelektroforézisével ellenőriztük.

5.4.7.3. Deléciós konstrukciók létrehozása: A *CpOLE2* lókuszt deléciójának végrehajtásához a pSFS2Ole2 és pSFS2ÚjOle2 vektorokat használtuk. A pSFS2Ole2 konstrukció elkészítéséhez 599 bp nagyságú upstream homológ szakaszt, valamint 594 bp nagyságú downstream homológ szakaszt amplifikáltunk a *C. parapsilosis* GA1 genomi DNS-ét templátként használva. A pSFS2Ole2 konstrukció esetén az upstream homológ régió felszaporításához a "*CpOLE2* upst KpnI frw" és a "*CpOLE2* upst XhoI rev", míg a downstream homológ régió felszaporításához a "*CpOLE2* down NotI frw" és a "*CpOLE2* down SacI rev" primer párokat használtuk. A pSFS2ÚjOle2 konstrukció esetén csak az upstream homológ régiót változtattuk meg. Ez esetben egy 417 bp hosszúságú upstream homológ szakaszt klónoztunk a vektorba a "*CpOLE2* Újupst KpnI frw" és a "*CpOLE2* Újupst XhoI rev" primer pár segítségével.

Polimeráz láncreakció deléciós konstrukció létrehozásához: A 25 µl végtérfogatú reakció az alábbi komponenseket tartalmazta: 1x Roche *Expand Long Template* puffer (gyárilag 20 mM MgCl₂-dal), 0,25-0,25 µM forward és reverz primer, 0,2-0,2 mM dNTP (Thermo Scientific), 20-50 ng genomi DNS templát és 1 U *Expand Long Template* polimeráz. A reakciókörülmények az alábbiak voltak: 3 perc 95°C (elődenaturáció), majd 35 cikluson keresztül 1 perc 94°C (denaturáció), 45 másodperc 60°C (primer bekötés) és 2 perc 68°C (lánc hosszabbítás), végül 7 perc 68°C utópolimerizáció.

C. *parapsilosis* GA1 törzsből történő génkiütéshez használt primerek:

| Primer neve | Szekvenciája (5'→3') |
|------------------------|------------------------------------------------------|
| CpOle2 upst KpnI frw | ttttt <u>gtacc</u> GAAAAATGAAGCTAAATCCTCCAAGGGAC |
| CpOle2 upst XhoI rev | ttttt <u>ctcgag</u> ATAGGAAAAGTAGTTGAAAATGCGCACAC |
| CpOle2 Újupst KpnI frw | ttttt <u>gtacc</u> CTATTTACTAAGCAGCTTCGGCAG |
| CpOle2 Újupst XhoI rev | ttttt <u>ctcgag</u> GGCACACCAATATCTAAACTACCATTG |
| CpOle2 down NotI frw | ttttt <u>cgggccgc</u> GCGTTGTTTCTCATCCATTTGAGGAAATTC |
| CpOle2 down SacI rev | ttttt <u>gagctc</u> GGTTTATACTCAAATGGATGAATAGTCTTCTG |

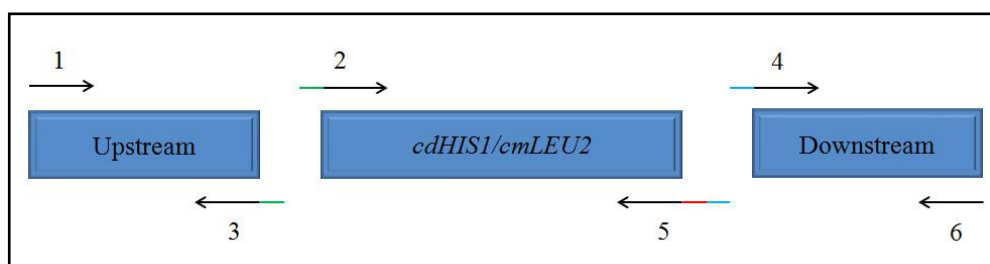
Az aláhúzott rész a restrikciós endonukleázok hasítóhelyeit jelöli.

5.4.7.4. DIG-dUTP jelölt *OLE2* upstream próba előállítása: A DIG-jelölt próba elkészítéséhez *DreamTaq* DNS polimerázt (Thermo Scientific) használtunk a gyártó utasításainak megfelelően. A dNTP mix összeállítása Thermo Scientific dNTP és Digoxigenin-11-dUTP (Roche) felhasználásával történt. A 25 µl végtérfogatú reakció az alábbi komponenseket tartalmazta: 1x *DreamTaq* puffer (gyárilag 20 mM MgCl₂-dal), 0,25-0,25 µM forward és reverz primer, 0,2-0,2 mM dNTP (Thermo Scientific), 20-50 ng genomi DNS templát és 1,25 U *DreamTaq* DNS polimeráz. A PCR program az alábbi lépéseket tartalmazta: 3 perc elődenaturáció 94°C-on, majd 35 cikluson keresztül 15 másodperc 94°C, 15 másodperc 60°C, 80 másodperc 72 °C, végül utópolimerizáció 3 perc 72°C-on. Az *OLE2* lokusz detektálását Southern hibridizációval végeztük, ahol a DNS próba az upstream régió DIG-jelölt PCR terméke volt.

5.4.7.5. Southern hibridizáció: Munkánk alapjául a Gácsér és munkatársai (2007c) által publikált módszer szolgált. Az 5.4.7.2. pont szerint izolált genomi DNS-t *PvuII* restrikciós endonukleázzal (Thermo Scientific) egy éjszakán át emésztettük a gyártó utasításainak megfelelően. A DNS-t izopropanollal csaptuk ki és 70%-os etanollal mostuk (13000 rpm, 10

perc). A mintákat 0,8%-os agaróz gélen futtattuk DIG-jelölt DNA Molecular Weight Marker VII (Roche) mellett. A fragmentumokat Amersham Hybond-N (GE Healthcare) filterre blottoltuk, és UV fényel kovalensen rögzítettük. A hibridizáció egy éjszakán át zajlott 65°C-on DIG-dUTP jelölt DNS próbával. A DNS szakaszokat Antidigoxigenin-AP Fab fragmentumokkal (Roche) és NBT/BCIP (Roche) előhívó oldattal tettük láthatóvá.

5.4.7.6. Fúziós konstrukciók létrehozása: A *C. parapsilosis* CLIB214 törzs genomi DNS-ét templátként használva az adott génre specifikus 1-es forward és 3-as reverz (upstream régió esetén), valamint 4-es forward és 6-os reverz (downstream régió esetén) primer párokat használva amplifikáltuk a gének up- és downstream régióit. A 3-as és 4-es primerek a homológ szekvenciákon kívül fúziós szekvenciát is tartalmaztak. A *cdHIS1* marker gén esetén a pSN52-es vektort, a *cmLEU2* marker gén esetén a pSN40 vektort használtunk az amplifikációhoz. A marker gének felszaporításához a 2-es univerzális forward, valamint az 5-ös reverz primereket használtuk. Az 5-ös reverz primerek a marker génekkel homológ szekvenciákon kívül az adott génnek megfelelő *S. cerevisiae* genomból származó azonosító szekvenciát, valamint fúziós szekvenciát is tartalmaztak. A konstrukciók összeépítését az up- és downstream, valamint a marker régiók fúziós szekvenciái mentén az 1-es forward és 6-os reverz primerek segítségével építettük össze (4. ábra). A kész konstrukciókkal a *C. parapsilosis* CLIB214 $\Delta his1/\Delta leu2$ kettős auxotróf törzset transzformáltuk, majd a megfelelő szelektív táptalajra szélesztettük.



4. ábra. A fúziós konstrukció összeépítésének elve.

1: upstream forward primer; **2:** univerzális forward primer, 5' végén a "primer_3"-mal homológ fúziós szekvenciával (zöld); **3:** upstream reverz primer, 5' végén "primer_2"-vel homológ fúziós szekvenciával (zöld); **4:** downstream forward primer, 5' végén "primer_5"-tel homológ fúziós szekvenciával (kék); **5:** reverz primer az 5' végén *cdHIS1/cmLEU2* markerekkel homológ szekvenciával, középső részén a *S. cerevisiae* genomból származó azonosító szekvenciával (piros) és 3' végén a "primer_4"-gyel homológ fúziós szekvenciával (kék); **6:** downstream reverz primer.

Up- és downstream régiók felszaporítása: A PCR reakciókat a *DreamTaq* DNS polimeráz (Thermo Scientific) segítségével végeztük. Az 50 µl végtérfogatú reakció az alábbi komponenseket tartalmazta: 1x *DreamTaq* puffer (gyárilag 20 mM MgCl₂-dal), 0,25-0,25 µM forward és reverz primer, 0,2-0,2 mM dNTP (Thermo Scientific), 20-50 ng genomi DNS templát és 1,25 U *DreamTaq* DNS polimeráz. A reakciókörülmények az alábbiak voltak: 30 másodperc 95°C (elődenaturáció), majd 29 cikluson keresztül 10 másodperc 94°C (denaturáció), 20 másodperc 50°C (primer bekötés) és 20 másodperc 72°C (lánc hosszabbítás), végül 2 perc 72°C utópolimerizáció.

Marker gének felszaporítása: A PCR reakciókat az *Expand Long Template* polimeráz (Roche) segítségével végeztük. Az 50 µl végtérfogatú reakció az alábbi komponenseket tartalmazta: 1x *Expand Long Template* puffer (gyárilag 20 mM MgCl₂-dal), 0,25-0,25 µM forward és reverz primer, 0,2-0,2 mM dNTP (Thermo Scientific), 20-50 ng plazmid (pSN40/pSN52) DNS templát és 1 U *Expand Long Template* polimeráz. A reakciókörülmények az alábbiak voltak: 2 perc 94°C elődenaturáció, majd 34 cikluson keresztül 10 másodperc 94°C, 30 másodperc 45°C és 4 perc 68°C, végül 7 perc 68°C utópolimerizáció.

PCR termékek tisztítása: A felszaporított up- és downstream régiókat, valamint a marker géneket tartalmazó fragmentumokat a Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (Geneaid) segítségével tisztítottuk a gyártó utasításainak megfelelően. A tisztított PCR termékeket 30 µl térfogatban eluáltuk.

Fúziós PCR: A fúziós PCR reakciókat a *DreamTaq* DNA Polimeráz (Thermo Scientific) felhasználásával végeztük. Az 50 µl végtérfogatú reakció az alábbi komponenseket tartalmazta: 1x *DreamTaq* puffer (gyárilag 20 mM MgCl₂-dal), 0,25-0,25 µM "Primer_1" forward és "Primer_6" reverz primer, 0,2-0,2 mM dNTP (Thermo Scientific), a tisztított PCR termékekből 0,75 µl upstream, 0,75 µl downstream, valamint 1 µl marker gént (HIS/LEU) tartalmazó DNS fragmentum és 1,25 U *DreamTaq* DNS polimeráz. A reakciókörülmények az alábbiak voltak: 5 perc 94°C elődenaturáció, majd 34 cikluson keresztül 30 másodperc 94°C, 45 másodperc 50°C és 4,5 perc 72°C, végül 10 perc 72°C utópolimerizáció.

***C. parapsilosis* CLIB214-ből történő génkiütéshez használt primerek:**

"Primer_1" az adott gén upstream régiójának felszaporításához használt forward primer:

| Primer neve | Szekvenciája (5'→3') |
|--------------------|-----------------------------|
| CpUGA3_1 | TACCTAGAAGTATTCACGGA |
| CPAR2_703920_1 | ACACCGACACGTGCATTTCT |
| CPAR2_108490_1 | GATCAAGATTGCAATTTAAT |
| CpSOU2_1 | ATCATAAGGTAGATCACGCC |
| CpOLE1_1 | GTCATGAGATCGTCATTCTT |

"Primer_3" az adott gén upstream régiójának felszaporításához használt reverz primer, amely 5' végén fúziós szekvenciát tartalmaz:

| Primer neve | Szekvenciája (5'→3') |
|--------------------|------------------------------------------|
| CpUGA3_3 | cacggcgcgcctagcagcggCAATTTGGACAAAACTATC |
| CPAR2_703920_3 | cacggcgcgcctagcagcggGGGTGATGGCTTAGAAGGAT |
| CPAR2_108490_3 | cacggcgcgcctagcagcggCGTCTAACAAAGATATCGGC |
| CpSOU2_3 | cacggcgcgcctagcagcggTTTTGTGTGTACTCGAATGT |
| CpOLE1_3 | cacggcgcgcctagcagcggTGTGAGATCAGTGTGGGATA |

"Primer_4" az adott gén downstream régiójának felszaporításához használt forward primer, amely 5' végén fúziós szekvenciát tartalmaz:

| Primer neve | Szekvenciája (5'→3') |
|--------------------|------------------------------------------|
| CpUGA3_4 | gtcagcggccgcatccctgcCGCTTAGACAGTATATGATA |
| CPAR2_703920_4 | gtcagcggccgcatccctgcGCACACCCCTCTTTGTATAT |
| CPAR2_108490_4 | gtcagcggccgcatccctgcAGGATGTTTCAAACATCGAC |
| CpSOU2_4 | gtcagcggccgcatccctgcTACTGTCCCATAGATTACGT |
| CpOLE1_4 | gtcagcggccgcatccctgcGGAGAACTTTGGCTTGTTTG |

"Primer_6" az adott gén downstream régiójának felszaporításához használt reverz primer:

| Primer neve | Szekvenciája (5'→3') |
|----------------|----------------------|
| CpUGA3_6 | CCCAAGTTTTTATCCGATAC |
| CPAR2_703920_6 | GATCCACCTAGTGGAGTTTC |
| CPAR2_108490_6 | TTGTTGGAGTACAAGAAGCA |
| CpSOU2_6 | CAAGTCAAGCACGTTCTTTG |
| CpOLE1_6 | GGGTACCATAAAGTCTATAC |

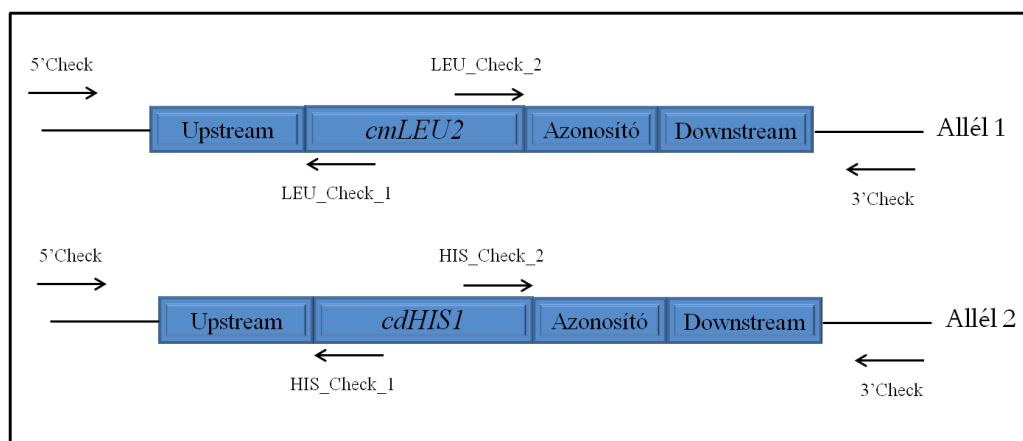
"Primer_5" reverz primer az 5' végén cdHIS1/cmLEU2 markerekkel homológ szekvenciát, középső részén a *S. cerevisiae* genomból származó azonosító szekvenciát és 3' végén a "primer_4"-gyel homológ fúziós szekvenciát tartalmaz:

| Primer neve | Szekvenciája (5'→3') |
|----------------|--------------------------------------------------------------|
| CpUGA3_5 | gcagggatcggccgctgacCGACTATTGTGACATACCTGagctcggatccactagtaacg |
| CPAR2_703920_5 | gcagggatcggccgctgacGGCTTTCACCGATAGTCTCTagctcggatccactagtaacg |
| CPAR2_108490_5 | gcagggatcggccgctgacATACTGTTACCACGGTGCGGagctcggatccactagtaacg |
| CpSOU2_5 | gcagggatcggccgctgacGTAACCCGACGTTGTGCAAGagctcggatccactagtaacg |
| CpOLE1_5 | gcagggatcggccgctgacGAGACACGTAGAGACATCGCagctcggatccactagtaacg |

"Primer_2" univerzális forward primer az 5' végén a "primer_3"-mal homológ fúziós szekvenciát, a 3' végén a cdHIS1/cmLEU2 markerekkel homológ szekvenciát tartalmaz:

| Primer neve | Szekvenciája (5'→3') |
|---------------|------------------------------------------|
| Primer_2 Univ | ccgctgctaggcgcgccgtgACCAGTGTGATGGATATCTG |

5.4.7.7. Fúziós PCR-ek helyes beépülésének ellenőrzése: A kémiai transzformáció sikerességét kolónia PCR segítségével ellenőriztük. Az ellenőrzés két irányból történt az adott génre specifikus "5'Check forward" és a markerekre specifikus "LEU/HIS_Check_1 reverz", valamint a "LEU/HIS_Check_2 forward" és "3'Check reverz" primerek segítségével (5. ábra). A PCR reakciókat *DreamTaq* DNS polimerázzal (Thermo Scientific) a korábban leírtak szerint végeztük. A reakciókörülmények az alábbiak voltak: 3 perc 95°C elődenaturáció, majd 35 cikluson keresztül 30 másodperc 94°C, 30 másodperc 53°C és 30 másodperc 72°C, végül 6 perc 72°C utópolimerizáció.



5. ábra. Fúziók helyes beépülésének ellenőrzése a megfelelő primerekkel.

Kék bokszt: a génkiütést követően a genomba rekombinálandó fúziós konstrukció (homológ upstream régió, *cmLEU2/cdHIS1* marker gén, *S. cerevisiae* genomból származó azonosító szekvenciával és homológ downstream régió); **5'Check:** ellenőrző forward primer; **3'Check:** ellenőrző reverz primer; **LEU/HIS_Check_1:** a *cdHIS1/cmLEU2* markerek 5' szekvenciájával homológ reverz ellenőrző primer; **LEU/HIS_Check_2:** a *cdHIS1/cmLEU2* markerek 3' szekvenciájával homológ forward ellenőrző primer.

"Primer_5'Ch" az adott gén kiütéséhez használt fúziós kazetta beépülési helyétől upstream elhelyezkedő szekvenciával homológ ellenőrző forward primer:

| Primer neve | Szekvenciája (5'→3') |
|-------------------|-----------------------|
| CpUGA3_5'Ch | TTGCCAAAAATCACAAAAGG |
| CPAR2_703920_5'Ch | ACATGATGGCCAAC TTTTGG |
| CPAR2_108490_5'Ch | ACCCACAAGTCAATAAAAAG |
| CpSOU2_5'Ch | GATTACCCAGACAGAGATGA |
| CpOLE1_5'Ch | GATGTCAAAC TCCCTTCCTG |

"Primer_3'Ch" az adott gén kiütéséhez használt fúziós kazetta beépülési helyétől downstream elhelyezkedő szekvenciával homológ ellenőrző reverz primer:

| Primer neve | Szekvenciája (5'→3') |
|-------------------|-----------------------|
| CpUGA3_3'Ch | TGCAATAGCCTGGATAATAT |
| CPAR2_703920_3'Ch | GATGGTTTTCTCTTTTGGTG |
| CPAR2_108490_3'Ch | ACACAATCGAGCTCCTCAAA |
| CpSOU2_3'Ch | AGATGGTTTTCTTCAACGCTC |
| CpOLE1_3'Ch | TTGCTGTACCAGAATGACAA |

"Primer_LEU/HIS_Check_1" a cdHIS1/cmLEU2 markerek 5' szekvenciájával homológ reverz ellenőrző primer:

| Primer neve | Szekvenciája (5'→3') |
|-------------|----------------------|
| LEU Check_1 | GAAGTTGGTGACGCGATTGT |
| HIS Check_1 | AAAATCAATGGGCATTCTCG |

"Primer_LEU/HIS_Check_2" a cdHIS1/cmLEU2 markerek 3' szekvenciájával homológ forward ellenőrző primer:

| Primer neve | Szekvenciája (5'→3') |
|-------------|----------------------|
| LEU Check_2 | TTCCCCTTCAATGTATGCAA |
| HIS Check_2 | TGGGAAGCAGACATTCAACA |

5.4.7.8. RNS kivonás gombából: Az RNS kivonáshoz RiboPure™ RNA Purification Kit, Yeast (Ambion) kit-et használtunk a gyártó utasításainak megfelelően. Az izolált RNS mennyiségét NanoDrop ND-1000-es spektrofotométer, míg a minőségét Agilent 2100 Bioanalyzer készülék segítségével határoztuk meg.

5.4.7.9. cDNS szintézis: A reverz transzkripcióhoz RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit-et (Thermo Scientific) használtunk a gyártó utasításainak megfelelően. Minden reakció 0,5-0,5 µl oligo(dT)₁₈ és random hexamer primereket tartalmazott. A szintézis során maximum 1 µg RNS templátot használtunk. A reakció lépései: 25°C 5 perc, majd 42°C 60 perc és 70°C 5 perc.

5.4.7.10. Valós idejű kvantitatív PCR (qRT-PCR): A génexpressziós vizsgálathoz Maxima SYBR Green qPCR Master Mix kit-et (Thermo Scientific) használtunk a gyártó utasításainak megfelelően. A reakció 20 µl végtérfogatban zajlott, ezért a gyártó által mellékelte protokollban szereplő térfogatokat ennek megfelelően csökkentettük. A program lépései a következők voltak: 95°C 3 perc, majd 50 cikluson keresztül 95°C 10 másodperc, majd 60°C 30 másodperc. A termékek olvadási görbéit 65 - 95°C-os tartományban (0,5°C-os lépésekkel) rögzítettük. A relatív expressziós értékek kiszámítása a $2^{-\Delta(\Delta C_i)}$ eljárással történt, a gyártó által mellékelte szoftverrel. Belső kontrollként az α -tubulin gént használtuk.

qRT-PCR primerek:

| Primer neve | Szekvenciája (5'→3') |
|-----------------------|------------------------|
| UGA3 ReTi frw | TGCGATGAAGTTAGACCAGT |
| UGA3 ReTi rev | TCCTCCGTAGTCATGGTAGA |
| CPAR2_703920 ReTi frw | GTCATCCCAGGTCTCCTAAG |
| CPAR2_703920 ReTi rev | AATTGAGCAACTCTCACTGG |
| CPAR2_108490 ReTi frw | ATGCTGAACCGAAGAATGTA |
| CPAR2_108490 ReTi rev | AGCGTCTCGTTTCTCCTTAC |
| SOU2 ReTi frw | ACTCCATTGGGTAGAGAAGG |
| SOU2 ReTi rev | CAGTTGTGAAAGTAGCAGCA |
| qTub4 ReTi frw | GAACACTTATGCCGAGGACAAC |
| qTub4 ReTi rev | ACTCTCACCACTGACTCCTTGC |

5.4.7.11. Microarray vizsgálat: A microarray vizsgálatokhoz az RNS kivonást, majd a RNS-ek minőségi és mennyiségi vizsgálatát a korábbiakban leírtak szerint végeztük kezeletlen, valamint 3 órán át AA-val indukált vad típusú CLIB214 törzsből. Az AA-val indukált transzkripció profil megállapításához 4 biológiai párhuzamost alkalmaztunk. Az első kettőben a kezeletlen vad típus RNS-ét jelöltük Cyanine 5-tel (Cy5) és az AA-val indukált mintából tisztított RNS-t Cyanine 3-mal (Cy3), míg a másik kettő párhuzamosnál a jelölés fordítva történt. A cDNS szintézist, jelölést és azok *C. parapsilosis* „microarray slide”-hoz hibridizálását Prof. Geraldin Butler és munkatársai végezték Rossignol és mtsi (2007) leírása alapján (Rossignol és mtsi. 2007).

5.4.8. *In vitro* virulencia vizsgálatok

5.4.8.1. *In vitro* fertőzés: Az *in vitro* fertőzésekhez 12 vagy 96 mintahelyes tenyésztőedényeket használtunk. Ezekben 2×10^5 (/ml) illetve 5×10^4 (/100 μ l) gazdasejtet fertőztünk ötszörös mennyiségű élesztősejttel. A PBMC-DM sejteken közvetlenül a fertőzést megelőzően tápoldatot cseréltünk. A gombasejteket az 5.4.1.1. pont szerint szaporítottuk fel, majd 1x PBS-sel történő kétszeri mosást (3000 rpm, 5 perc) követően steril 1x PBS-ben állítottuk be a kívánt sejtkoncentrációt.

5.4.8.2. Fagocitózis vizsgálat: A PBMC-DM sejtek fagocitáló képességének analizéséhez Alexa Fluor 647 (karboxilsav-szukcinimidil-észter) festékkel jelölt élesztősejteket használtunk. Az élesztősejteket egy éjszakán át 30°C-on 200 rpm rázatás mellett 2 ml

YPD/PS tápoldatban neveltük. Másnap az élesztő sejteket kétszer mostuk 1x PBS-ben (3000 rpm, 5 perc), majd 500 µl 1x PBS-ben vettük fel őket. A szuszpenzióhoz 55 µl 1M-os nátrium-karbonátot adtunk (pH10), valamint 10 µl Alexa Fluor 647 festéket (1 mg/ml, DMSO-ban oldva). 30 percig szobahőmérsékleten, fénytől védve inkubáltuk a mintákat, majd háromszor mostuk 1x PBS-sel, végül 200 µl 1x PBS-ben vettük fel. A gombasejteket ötször mostuk 1x PBS-sel, majd a kívánt sejtszámra állítottuk be a szuszpenzió koncentrációját. Ezeket PBMC-DM sejtekkel inkubáltuk 12 mintahelyes tenyésztőedényekben 120 percig, a sejtszámokat tekintve 1:5 gazda: patogén arányban. Az inkubációs idő letelte után a mintákat 1x PBS-sel mostuk, majd mintahelyenként 500 µl 37°C-ra előmelegített TrypLE Express-t (Life Technologies) mértünk a sejtekre, melyeket ezután 45 percig 37°C-on inkubáltunk (5% CO₂, 100% relatív páratartalom). Az inkubációs idő letelte után a sejteket szuszpenzióba vittük, a technikai párhuzamosokat egybemostuk, majd a sejteket 2000 rpm fordulaton 5 percig ülepítettük és 300 µl FACS pufferben (0,5% FBS 1x PBS-ben oldva) felvettük. Az így előkészített mintákat FACSCalibur készülékkel, majd Flowing Software 2.5 kiértékelő szoftverrel elemeztük.

5.4.8.3. Ölési határfok meghatározása: A PBMC-DM sejteket 96 mintahelyes tenyésztőedényben fertőztük *C. parapsilosis* vad típusú, valamint deléciós törzsekkel 1:5 gazda: patogén arányban, három technikai párhuzamost alkalmazva. Kontrollként fagocitákat nem tartalmazó mintahelyekre X-VIVO tápoldatba helyeztük az élesztő szuszpenziót a fertőzéshez használt mennyiségben és térfogatban. A fertőzés előtt a humán sejteken tápoldatot cseréltünk, melyet 37°C-ra előmelegítettünk. A fertőzéshez használt gombasejteket szintén a humán sejteknek megfelelő tápoldatban hígítottuk a megfelelő koncentrációra, majd 100 µl térfogatban adtuk a gazdasejtekhez. 3 óra inkubációt (37°C, 100% relatív páratartalom, 5% CO₂ tenzió) követően a tenyésztőedényt jégre helyeztük és minden további lépést jégen végeztünk, ezzel megakadályozva a további fagocitózist, valamint az élesztők további osztódását. A tápoldattal a letapadt gazda, illetve gombasejteket felszuszpendáltuk, majd a mintahelyeket kétszer átmostuk 200 µl jéghideg steril desztillált vízzel. A szuszpenziót mikrocentrifuga csövekbe gyűjtöttük, majd fecskendőre illesztett 27G vagy 29G jelű injekciós tű segítségével feltártuk a fagocitákat, illetve elválasztottuk az esetleges sarjsejteket. Az élesztősejtszám meghatározását és az ez alapján kalkulált hígítást követően a szuszpenzióból 50 µl-t szélesztettünk YPD/PS táptalajra, amelyeket két napon keresztül 30°C-on inkubáltunk. A telepszámokat meghatároztuk, a hígításokkal korrigálva átlagoltuk és az alábbi formula felhasználásával kiszámítottuk az eliminált élesztők százalékos arányát: [(Átlag Kontroll -

Átlag Fertőzés)/Átlag Kontroll] x100. A kísérlet során három biológiai (három mintahely) és három technikai (három csésze/1 mintahely) párhuzamost alkalmaztunk.

5.4.8.4. Gazdasejtek károsodásának meghatározása: Humán PBMC-DM sejtek gomba általi károsítását a Citotoxicity Detection Kit (LDH, Roche) segítségével végeztük, a gyártó utasításainak megfelelően. A gazdasejteket ebben az esetben is 1:5 gazda: patogén arányban fertőztük vad típusú, valamint deléciós mutáns törzsekkel, három technikai párhuzamost alkalmazva. Kontrollként nem fertőzött humán sejteket, valamint tiszta X-VIVO tápoldatot tartalmazó mintákat alkalmaztunk. A humán sejtek fertőzését a fentiekben leírtaknak megfelelően 1 ml végtérfogatnyi tápoldatban végeztük, majd 24 és 48 óra inkubációt (37°C, 100% relatív páratartalom, 5% CO₂ tenzió) követően felülúszót gyűjtöttünk. A reakciót követően a tiszta tápoldatot tartalmazó mintákat felhasználva meghatároztuk az egyes törzsekhez tartozó minták relatív LDH aktivitását.

5.4.8.5. Akridinnarancs/kristályibolya festés: A festés alapjául Miliotis által publikált protokollt szolgált (Miliotis 1991). A PBMC-DM sejteket 12 mintahelyes tenyésztőedényekbe helyezett korong alakú fedőlemezekre tenyésztettük, differenciáltattuk (hozzávetőlegesen 10⁶ sejt/korong) és fertőztük ötszörös mennyiségű gombasejttel. 3 óra elteltével a mintákat 1x PBS-sel mostuk, majd 0,01%-os akridinnarancs oldattal festettük fél percre. Ezt háromszor követte 1x PBS-es mosás, majd 0,15 M-os kristályibolya festést alkalmaztunk fél percre, amelyet szintén háromszori 1x PBS-es mosással távolítottunk el. A korongokat egy csepp 1x PBS-ben tárgylemezre borítottuk és átlátszó körömlakkal rögzítettük. A festést szobahőmérsékleten, sötétben végeztük. A mintákat Olympus DP-72 fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk.

5.4.8.6. Enzim-kötött immunoszorbens assay (ELISA): A méréshez PBMC/PBMC-DM sejteket használtunk, melyeket 1:5 arányban élesztősejtekkel fertőztünk 500 µl végtérfogatban, két technikai párhuzamost alkalmazva. Az inkubáció időtartama PBMC sejtek esetén 24 és 48 óra, PBMC-DM sejtek esetén pedig 24 óra volt. Ezután felülúszókat gyűjtöttünk és azokat felhasználásig -20°C-on tároltuk. Az enzim-kötött immunoszorbens assay méréseket a DuoSet ELISA Kit (R&D systems) segítségével végeztük, a gyártó utasításainak megfelelően.

5.4.9. In vivo virulencia vizsgálatok, viaszmosoly (*Galleria mellonella*) lárvák fertőzése: A viaszmosoly lárváinak fertőzésekor elsőként az optimális fertőzési gombasejtszámot határoztuk meg. Ehhez az élesztősejteket egy éjszakán át 30°C-on 200 rpm rázatás mellett 2 ml YPD/PS

táplodtatban neveltük. Másnap a sejteket kétszer mostuk 1x PBS-ben, majd a sejtkoncentrációt 10^8 sejt/ml koncentrációra állítottuk be. Ezt követően tízszeres hígításban, öt lépcsőben hígítottuk a szuszpenziót. A sejtek injektálásához 10 μ l térfogatú Hamilton pipettát alkalmaztunk. Az optimális fertőzési sejtkoncentráció megállapítása után tízes csoportokban fertőztük a lárvákat a következők szerint: szúratlan kontroll (épen hagyott lárvák, ez szolgált abszolút negatív kontrollként), 1x PBS-sel injektált csoport, vad típusú törzssel fertőzött csoport, valamint a deléciós törzsekkel fertőzött csoportok. A fertőzést követően 30°C-on tartottuk a lárvákat és naponta vizsgáltuk a túlélési rátát 10 napon keresztül.

5.4.10. *In silico* és statisztikai analízis

5.4.10.1. Microarray adatok kiértékelése: A nyers adatok elemzését Prof. Geraldin Butler és munkatársai végezték Rossignol és mtsi. (2007) és Synnott és mtsi. (2010) leírásainak megfelelően (Rossignol és mtsi. 2007, Synnott és mtsi. 2010).

5.4.10.2. Statisztikai analízis: Az adatok kiértékelését, az átlagok, a szórások és a különbségek szignifikanciájának kiszámítását párosítatlan t-próba analízissel a GraphPad Prism 6 szoftverrel végeztük. A különbségeket $p < 0,05$ értékek esetén tekintettük szignifikánsnak.

5.4.11. Analitikai mérések

5.4.11.1. Zsírsvak analitikai meghatározása: A *Candida* törzsekből egy oltókacsnyi inokulumot 5 ml YPD/PS táplodtatba oltottunk, majd 30°C-on 200 rpm rázatás mellett egy éjszakán át növesztettük. Másnap a felnövesztett kultúrákból 2×10^9 sejtet 100 ml YPD/PS táplodtatba továbboltottunk, majd 24 órán át, 30°C-on 200 rpm rázatás mellett növesztettük. Másnap a sejteket ülepítettük, 1x PBS-el mostuk, majd 50 ml-es falcon csövekben liofilizáltuk. Analitikai mérlegen (Ohaus) 15 ml-es polipropilén csőbe (VWR International) bemért kb. 100 mg liofilizált mintához 50 μ l 2 mg/ml koncentrációjú heptadekánsavat (Sigma) adtunk belső standardként. Ezt követően 5 ml 5% kálium-hidroxid tartalmú metanolos (VWR International) oldattal szuszpendáltuk a mintákat 1 perces vortexeléssel, majd fűtőblokkban (Cole-Palmer) 70°C-on 1 órán át inkubáltuk a zsírok elszappanosítása céljából. Az elegy pH-ját pH2-re állítottuk tömény sósav (VWR International) hozzáadásával, majd 4 ml desztillált vizet és 2 ml kloroformot (VWR International) adtunk az elegyhez. Az extrakció és a centrifugálás után (4000 rpm, 4°C, 15 perc) a kloroformos fázist gyűjtöttük, majd az extrakciós lépést a felső fázissal kétszer megismételtük 1-1 ml kloroform hozzáadásával. Az összegyűjtött kloroformos fázist nitrogén alatt bepárooltuk, majd 4 ml 14% metanolos bór-

trifluorid (Sigma) oldatot adtunk az elszappanosított mintákhoz és 70°C-on 1,5 órán át inkubáltuk. A képződött zsírsav-metil-észtereket n-hexánnal (VWR International) vontuk ki a reakcióelegyből, amelyet nitrogén alatt bepároltunk. Végül a mintákat 100 µl hexánban oldottuk vissza és mintatartó fiolákba pipettáztuk.

A zsírsavak gázkromatográfiás vizsgálatát lángionizációs detektorral szerelt Agilent 6890N (Agilent Technologies) típusú gázkromatográfval végeztük. A mérések során HP-Innowax (60m*0,25mm*0,5µm) (Hewlett-Packard) állófázist alkalmaztunk állandó nyomáson (32 psi). Manuálisan 1 µl mintát injektáltunk split-splitless injektorba split üzemmódban 50:1 split aránnyal. Az injektor hőmérséklete 250°C volt. A mérés során a hőmérséklet program 50°C-ról indult, ezt a hőmérsékletet 2 percig tartottuk, majd 20°C/perc felfűtési sebességgel 200°C-ra fűtöttük fel az állófázist. Ezt követően 3°C/perc felfűtési sebességgel 240°C-ra emeltük a termosztát hőmérsékletét és 50 percig ezen a hőmérsékleten tartottuk. A detektor hőmérséklete 250°C volt a futás során, a hidrogén áramlási sebessége 30 ml/perc, a sűrített levegőé 300 ml/perc, a nitrogéné pedig 20 ml/perc volt.

A zsírsav-metil-észter standardokból (metil-palmitát, Rt=22,4 perc; metil-palmitoleát, Rt=23,0 perc; metil-heptadekanoát, Rt=24,7 perc; metil-sztearát, Rt=27,5 perc; metil-oleát, Rt=28,3 perc; metil-linoleát, Rt=29,8 perc; metil-γ-linoleát, Rt=31,0 perc; metil-linolenát, Rt=32,3 perc; és metil-arachidonát Rt=42,1 perc; Sigma-Aldrich, tisztaság ≥98%,) a komponensek azonosításához 1 mg/ml koncentrációjú oldatokat készítettünk n-hexánban és a koncentráció meghatározáshoz kalibrációs oldatsorozatot készítettünk 31,25 µg/ml – 32,00 mg/ml koncentráció tartományban a különálló standard oldatok összemérésével és n-hexánnal történő hígításával. A kalibrációs pontokra lineáris illesztést alkalmaztunk, amelyek korrelációs koefficiensei (≥0,99) megfeleltek az általános analitikai elvárásoknak. A gázkromatográf vezérlését és a kiértékelést az Agilent ChemStation szoftver B.01.03 verziójával végeztük.

5.4.11.2. Proszttaglandin-profil és proszttaglandin E₂ meghatározás fermentléből HPLC-MS módszerrel: A *C. parapsilosis* fermentleveket az 5.4.4. pontban leírtak szerint állítottuk elő. A fermentlevek proszttaglandin-profiljának és proszttaglandin E₂ tartalmának meghatározásához tömegspektrométerrel kapcsolt folyadékkromatográfot (Agilent Technologies) használtunk. A folyadékkromatográf G1312A bináris pumpából, G1379A gáztalanítóból, G1367A automata mintaadagolóból állt, a detektálást pedig 6410 triple kvadrupól tömegspektrométerrel végeztük. Az elválasztás YMC Pack ProC18 (150 mm x 2,1

mm, 5 μ m) állófázison történt YMC ProC18 (20mm x 2,1mm, 5 μ m) előtétoszlop alkalmazásával. A mintákból 20 μ l-t injektáltunk. Az A eluens 0,005% ecetsavat (Biosolve) tartalmazó HPLC tisztaságú víz volt, amelynek a pH-ját ammónia oldattal (Molar Chemicals) pH5,7-re állítottuk. A B eluens 0,005% ecetsavat tartalmazó acetonitril/metanol (Biosolve) (95/5, V/V) elegy volt, amelyhez ugyanannyi ammónia oldatot adtunk (pH5,7), mint az A eluenshez.

A vizsgálat során gradiens elúciót alkalmaztunk 0,3 ml/perc áramlási sebességgel. Az eluensek kiindulási koncentrációja 25% B és 75% A volt, majd 10 perc alatt a B arányát 40%-ra emeltük, és 5 percig ezen az értéken tartottuk. Ezt követően 5 perc alatt 50%-ra emeltük a B eluens arányát és 5 percig 50%-on áramoltattuk. Végül 5 perc alatt visszaállítottuk a kiindulási eluens összetételre a mozgófázist és ezen az értéken tartottuk 10 percig. Így a futásidő 40 perc volt.

A tömegspektrometriás vizsgálatokat negatív ESI ionizációs módban végeztük multiple reaction monitoring (MRM) analizátor beállítások mellett. A mérések során nitrogén kollóziós gázt alkalmaztunk, melynek a hőmérséklete 325°C, az áramlási sebessége 12 l/perc, a nyomás 40 psi volt. A kapilláris feszültség 3800 V, a fragmentálás feszültsége 110 V volt a futás során. A vizsgálatok során minden komponens azonosítására két MRM átmenetet alkalmaztunk. A prosztaglandinok detektálására használt prekursor- és leányionokat, valamint a mérés során alkalmazott ütközési energiákat az 1. táblázat tartalmazza.

1. táblázat. A prosztaglandinok tömegspektrometriás paraméterei

| | Prekursor ion | Leányion | Ütközési energia (V) |
|------------------------------------------------------------------------|---------------|----------|----------------------|
| 13,14-dihidro-15-keto-prosztaglandin F _{2α} | 353,2 | 309,1 | 20 |
| | 353,2 | 291,2 | 20 |
| 11 β -Prosztaglandin F _{2α} | 353,2 | 309,1 | 20 |
| | 353,2 | 291,2 | 20 |
| Prosztaglandin E ₁ | 353,2 | 309,1 | 20 |
| | 353,2 | 273,3 | 20 |
| Prosztaglandin F _{1α} | 355,5 | 311,2 | 20 |
| | 355,5 | 293,2 | 20 |
| Prosztaglandin H ₂ | 351,3 | 271,2 | 15 |
| | 351,3 | 189,1 | 15 |
| Prosztaglandin E ₂ | 351,3 | 271,2 | 15 |
| | 351,3 | 315,1 | 15 |
| Prosztaglandin F _{2α} | 353,2 | 317,2 | 20 |

| | Prekurzor ion | Leányion | Ütközési energia (V) |
|-------------------------------|---------------|----------|----------------------|
| | 353,2 | 273,3 | 20 |
| Prostaglandin D ₂ | 351,3 | 271,2 | 15 |
| | 351,3 | 189,1 | 15 |
| Prostaglandin F _{2β} | 353,2 | 291,2 | 20 |
| | 353,2 | 317,2 | 20 |
| Prostaglandin A ₂ | 333,3 | 271,2 | 20 |
| | 333,3 | 189,2 | 20 |
| Prostaglandin J ₂ | 333,3 | 271,2 | 20 |
| | 333,3 | 189,2 | 20 |
| Prostaglandin B ₂ | 333,3 | 235 | 20 |
| | 333,3 | 175 | 20 |

A vizsgálatok során a prosztaglandinok azonosításához a rendelkezésre álló standard keverékeket (Prostaglandin HPLC mixture, Cyclopentenone Prostaglandin HPLC mixture, Prostaglandin Metabolite HPLC mixture és Prostaglandin H₂; ≥95%, Cayman Chemical) injektáltuk és a komponenseket tömegspektrumuk alapján azonosítottuk és meghatároztuk a retenciós időket: 13,14-dihidro-15-keto-PGF_{2α}, Rt=13,2 perc; 11β-PGF_{2α}, Rt=13,7 perc; PGE₁, Rt=14,8 perc; PGF_{1α}, Rt=14,8 perc; PGH₂, Rt=15,8 perc; PGE₂, Rt=15,9 perc; PGF_{2α}, Rt=16,3 perc; PGD₂, Rt=17,1 perc; PGF_{2β}, Rt=19,6 perc; PGA₂, Rt=23,2 perc; PGJ₂, Rt=23,7 perc és PGB₂, Rt=23,9 perc. Ezt követően a standard oldatok összemérésével és hígításával kalibrációs oldatsorozatot készítettünk 0,5-250,0 ng/ml koncentráció tartományban. A kalibrációs pontokra lineáris illesztést alkalmaztunk, amelyek esetében a korrelációs koefficiens (R²) minden esetben nagyobb vagy egyenlő volt, mint 0,99. A HPLC rendszert és a tömegspektrométert a MassHunter v. B.01.03 Acquisition software-rel vezéreltük, míg az adatfeldolgozás a MassHunter v. B.01.04 Qualification és Quantification software-rel történt.

5.4.11.3. Prostaglandin-profil és prosztaglandin E₂ meghatározás fermentléből HPLC-FLD módszerrel: A *C. parapsilosis* fermentleveket az 5.4.4. pontban leírtak szerint állítottuk elő. A fermentlevek szilárd fázisú extrakciója során Supelco™ Supelclean LC-18, 3 ml SPE csővel (Sigma-Aldrich) dolgoztunk. Az oszlop kondicionálását 3 ml metanollal (VWR International), majd ugyanennyi desztillált vízzel végeztük. A kondicionálás után 100 ml mintát vittünk a töltetre, majd a mintafelvétel után 3 ml desztillált vizes mosás következett. A töltetet szárítottuk, majd 3 ml n-hexánnal (VWR International) kezdtük meg az elúciót. Az oszlopot ismét szárítottuk, majd 3 ml 1% metanolt tartalmazó etil-acetáttal (VWR

International) eluáltuk a proszttaglandinokat az SPE oszlopról, majd a frakciót nitrogén alatt szárazra pároltuk 4 ml-es teflon-szeptumos fiolákban. A fiolákba 3-5 mg kálium-hidrogénkarbonátot (Reanal) mértünk be analitikai mérlegen (Ohaus), amelyhez 100 µl acetonitrilt (VWR International) mértünk. Az elegyhez adtunk további 50 µl 3 mg/ml-es 3-bromometil-6,7-dimetoxi-1-metil-1,2-dihidrokinoxalin-2-on (Br-DMEQ, Dojindo) acetonitriles oldatot és ugyanennyi térfogatban szintén acetonitrilben oldott 0,27 mg/ml-es koronaéter (Sigma-Aldrich) oldatot. A reakcióelegyet légmentesen lezártuk, homogenizáltuk, majd 50°C-os termosztátban (Cole-Palmer) fénytől elzártan 20 percig inkubáltuk. A reakcióidő letelte után a mintát 200 µl-es mikrofiolába pipettáztuk.

A meghatározáshoz fluoreszcens detektorral rendelkező folyadékkromatográfot (Shimadzu) alkalmaztunk. A folyadékkromatográf 2 db LC-20AD pumpából, DGU-14A gáztalanítóból, SIL-10AD mintaadagolóból, CTO-10AS oszloptermosztátból, CBM-20A vezérlőegységből és egy RF-20A fluoreszcens detektorból állt.

A proszttaglandinok elválasztása Phenomenex Kinetex XB-C18 (100 mm × 4,6 mm, 2,6 µm) állófázison történt. Az A eluens 0,1% ecetsavat tartalmazó víz, a B eluens 0,1% ecetsavat tartalmazó acetonitril volt. A vizsgálat során gradiens elúciót alkalmaztunk 1,2 ml/perc áramlási sebességgel. Az eluensek kiindulási összetétele 68% A és 32% B volt, melyet 26 percig tartottunk ezen az értéken, majd 2 perc alatt 36%-ra emeltük a szerves eluens tartalmat. 8 perc után 60%-ra emeltük 4 perc alatt, majd 5 perc után 90%-ra emeltük 2 perc alatt és ezen az értéken tartottuk 5 percig. Végül 3 perc alatt visszaállítottuk a kiindulási állapotra a B eluens arányát és a 65 perces futás végéig ezen az értéken tartottuk. A mintákból 5 µl-t injektáltunk, a fluoreszcens detektálást 370 nm excitációs és 455 nm emissziós hullámhosszknál valósítottuk meg.

A vizsgálatok során a proszttaglandinok azonosításához a rendelkezésre álló standard keverékeket és egyedi standardokat (Prostaglandin HPLC mixture, Cyclopentenone Prostaglandin HPLC mixture, Prostaglandin Metabolite HPLC mixture, Prostaglandin H₂, 8-iso-Prostaglandin E₂; ≥95%, Cayman Chemical) injektáltuk be és ezeket a komponenseket határoztuk meg: 8-izo-PGE₂, Rt=33,5 perc; PGE₂, Rt=34,5 perc; PGD₂, Rt=37,1 perc; PGA₂, Rt=41,0 perc; PGJ₂, Rt=41,1 perc, PGB₂, Rt=42,0 perc és 15-deoxy-Δ^{12,14}-PGJ₂, Rt=46,5 perc. A standardok előkészítését a mintákhoz hasonlóan végeztük, azzal a különbséggel, hogy a kalibráció esetében 100 µl standard acetonitrilben oldott proszttaglandin mixet adtunk a származékképző reakcióhoz az acetonitril helyett. Ezt követően a standard oldatok összemérésével és hígításával kalibrációs oldatsorozatot készítettünk 1,0-1000,0 ng/ml

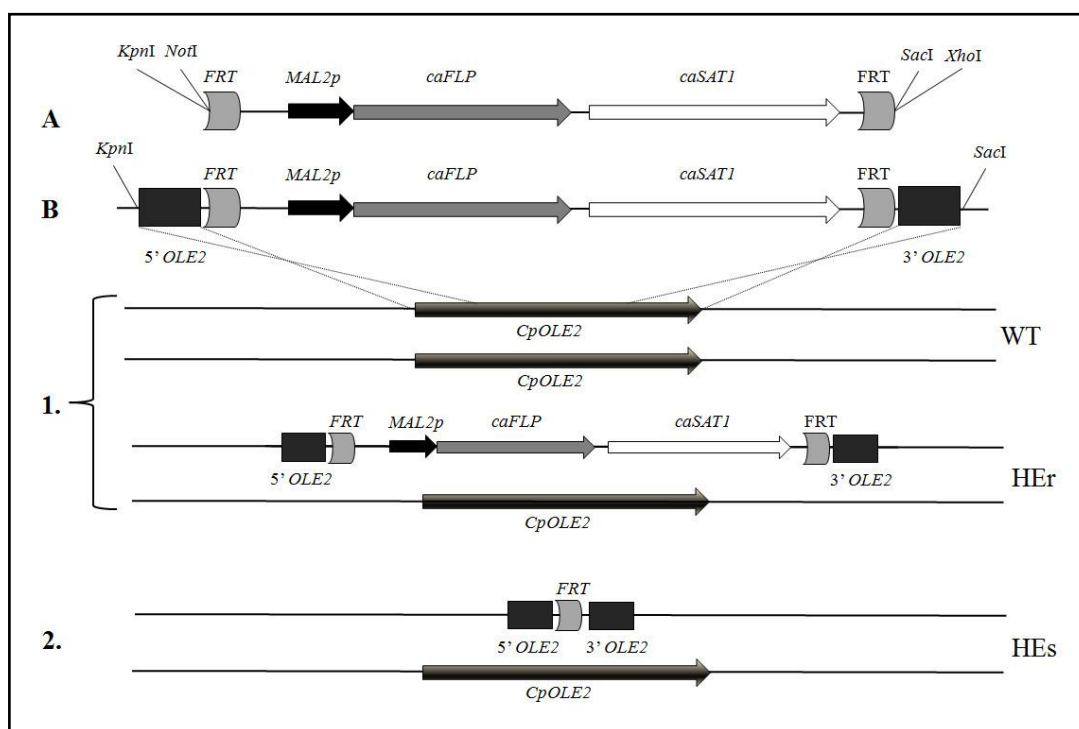
koncentráció tartományban. A kalibrációs pontokra lineáris illesztést alkalmaztunk, amelyek esetében a korrelációs koefficiens (R^2) minden esetben nagyobb vagy egyenlő volt, mint 0,99. A folyadékkromatográf vezérlését és a kiértékelést Shimadzu CLASS-VP 6.14 SP2 verziójával végeztük.

A zsírsavak analitikai meghatározását és a prosztaglandin meghatározásokat Kecskeméti Anita végezte, ezen eredmények az ő PhD munkájának tárgyát képezik.

6. Eredmények és értékelésük

6.1. A *CpOLE2* gén célzott génkiütése a *caSAT1* kazetta segítségével

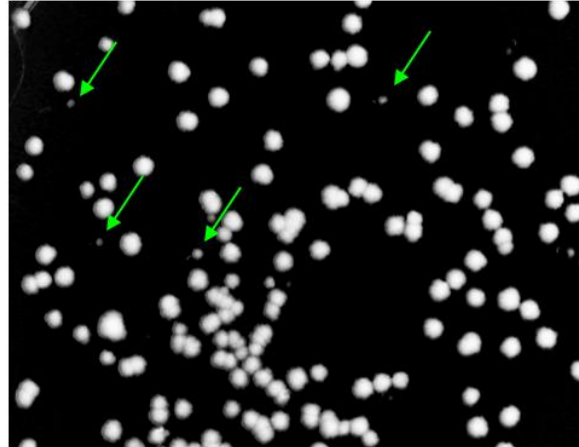
A *C. parapsilosis*-ban azonosított, feltételezett zsírsav deszaturáz virulenciában betöltött szerepének vizsgálatához terveink között szerepelt a *CpOLE2* gén célzott génkiütése, majd a *CpOLE2* génre deléciós mutáns törzsek fiziológiai vizsgálata. A *CpOLE2* gén célzott génkiütéséhez a gén up- és downstream határoló régióit a *caSAT1* flipper kazettát tartalmazó pSFS2 vektorba klónoztuk. A *caSAT1* flipper kazetta tartalmazza a *C. albicans*-adaptált nourseothricin (NAT) antibiotikum rezisztencia gént (*caSAT1*), amely domináns szelekciót biztosít, illetve az indukálható maltóz promóter (*MAL2p*) kontrollja alatt álló helyspecifikus rekombinázt (*caFLP*). A *caSAT1* flipper kazettát két 34 nukleotid hosszúságú, úgynevezett flippáz rekombinációs célszekvencia (*FRT*) határolja. Ezek az *FRT* régiók a *caFLP* rekombinázt specifikus felismerőhelyei (Reuss és mtsi. 2004, Gacser és mtsi. 2007c). A pSFS2 vektoron multiklónozó helyek határolják a *caSAT1* flipper kazettát, ami lehetővé teszi a kazetta módosítását. Ezekre a klónozó helyekre, a kazetta elé és mögé építettük a *CpOLE2* gén up- és downstream régióit, ezáltal létrehozva a *CpOLE2* deléciós kazettát (6. ábra). A deléciós kazettával a *C. parapsilosis* GA1 jelű klinikai izolátumból készített kompetens sejteket transzformáltuk elektroporálás segítségével. A transzformáció során a deléciós kazetta az up- és downstream régiók mentén, homológ rekombinációval, irányítottan beépült a genomba, ezzel a *CpOLE2* gén egyik alléljának eltávolítását eredményezve (*CpOLE2/ΔCpole2:SAT1-flipper*). A promóter-indukció hatására a *caFLP* rekombinázt gén kifejeződött és az *FRT* szekvenciák mentén kivágta a *caSAT1* flipper kazettát csak egy 34 nukleotidnyi *FRT* régiót hagyva maga után a genomban (*ΔCpOLE2/ΔCpole2:FRT*) (6. ábra).



6. ábra. **A:** A *caSAT1* flipper kazetta általános felépítése, **B:** A *CpOLE2* specifikus deléciós kazetta felépítése, **1:** A *CpOLE2* deléciós kazetta homológ rekombinációval történő beépülése a genomi *OLE2* lókuszbba, **2:** A *caSAT1* flipper kazetta eliminálása a genomról,

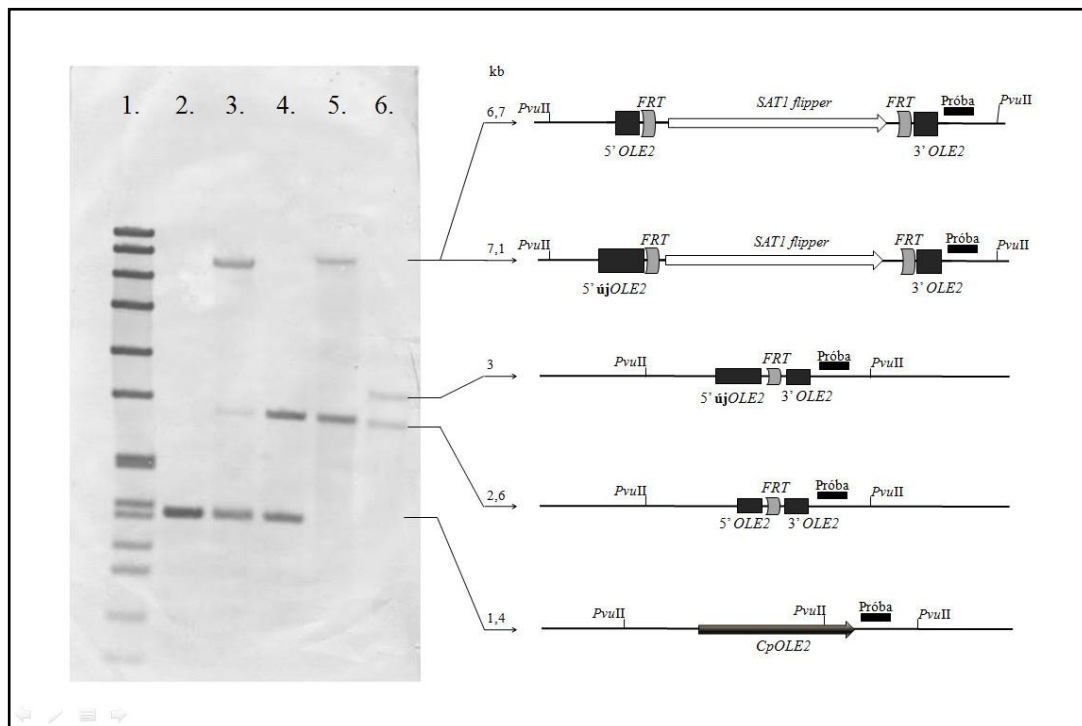
Rövidítések: *KpnI/NoI* és *SacI/XhoI*: restriktív endonukleáz hasítóhelyek, FRT: flippáz gén rekombinációs célszekvencia, *MAL2p*: indukálható maltóz promóter, *caFLP*: flippáz helyspecifikus rekombináz, *caSAT1*: NAT rezisztencia gén; *5' OLE2* és *3' OLE2*: *CpOLE2* gén up- és downstream határoló régiói, WT: vad típusú genomi állapot, ahol a *CpOLE2* gén mindkét allélja intakt, HEr: első transzformációt követő heterozigóta rezisztens állapot, ahol a *CpOLE2* specifikus deléciós kazetta beépült a *CpOLE2* lókuszbba egyik alléljába; HEs: heterozigóta szenzitív állapot.

Az így kapott heterozigóta szenzitív mutánsokat YPD/PS/FLPout táptalajra szélesztettük, amely permisszív koncentrációban tartalmazta a NAT antibiotikumot. Ennek következtében mind a NAT rezisztens, mind a NAT szenzitív sejtek képesek voltak növekedni, azonban a szenzitív sejtek jóval kisebb telepeket képeztek, mint a rezisztensek (7. ábra).



7. ábra. A NAT rezisztens és szenzitív telepek megkülönböztetése YPD/PS/FLPout táptalajon.
zöld nyilak: NAT szenzitív telepek (Gacser és mtsi. 2007c)

A *CpOLE2* gén második alléljának eliminálását a genomból egy nagyobb méretű upstream homológ szekvenciát tartalmazó deléciós kazetta alkalmazásával végeztük, a korábban leírtak szerint. A deléciós kazettában történő változtatást a későbbi egyszerűbb detektálás érdekében hajtottuk végre. A deléciós kazetta helyes homológ beépülésének, illetve az azt követő eliminálását a genomból Southern-hibridizáció segítségével ellenőriztük. Az alkalmazott hibridizációs stratégiát a 8. ábra mutatja be.



8. ábra. Southern hibridizálás *PvuII* emésztett genomi DNS-ekkel, downstream jelölt próba alkalmazásával.

1: DIG-jelölt DNS Molekulasúly marker; 2: GA1 vad típusú törzs (1,4 kb-os hibridizációs fragmentum); 3: heterozigóta rezisztens mutáns *CpOLE2/ΔCpole2:SAT1-flipper* (6,7 és 1,4 kb-os hibridizáló fragmentumok); 4: heterozigóta szenzitív mutáns *CpOLE2/ΔCpole2:FRT* (HEs) (2,6 és 1,4 kb-os hibridizáló fragmentumok); 5: homozigóta rezisztens mutáns *ΔCpole2/ΔCpole2:SAT1-flipper* (7,1 kb-os és 2,6 kb-os hibridizáló fragmentumok); 6: homozigóta szenzitív mutáns *ΔCpole2/ΔCpole2:FRT* (KO) (3 és 2,6 kb-os hibridizáló fragmentumok). Az ábra jobb oldalán az adott genomi szituációt szemléltető sematikus ábra látható. Fekete téglalap: *CpOLE2* gén up- és downstream régiói, szürke téglalap: *FRT* régió, fekete vonal: downstream jelölt próba, üres nyíl: *caSAT1* flipper kazetta, fekete nyíl: *CpOLE2* gén.

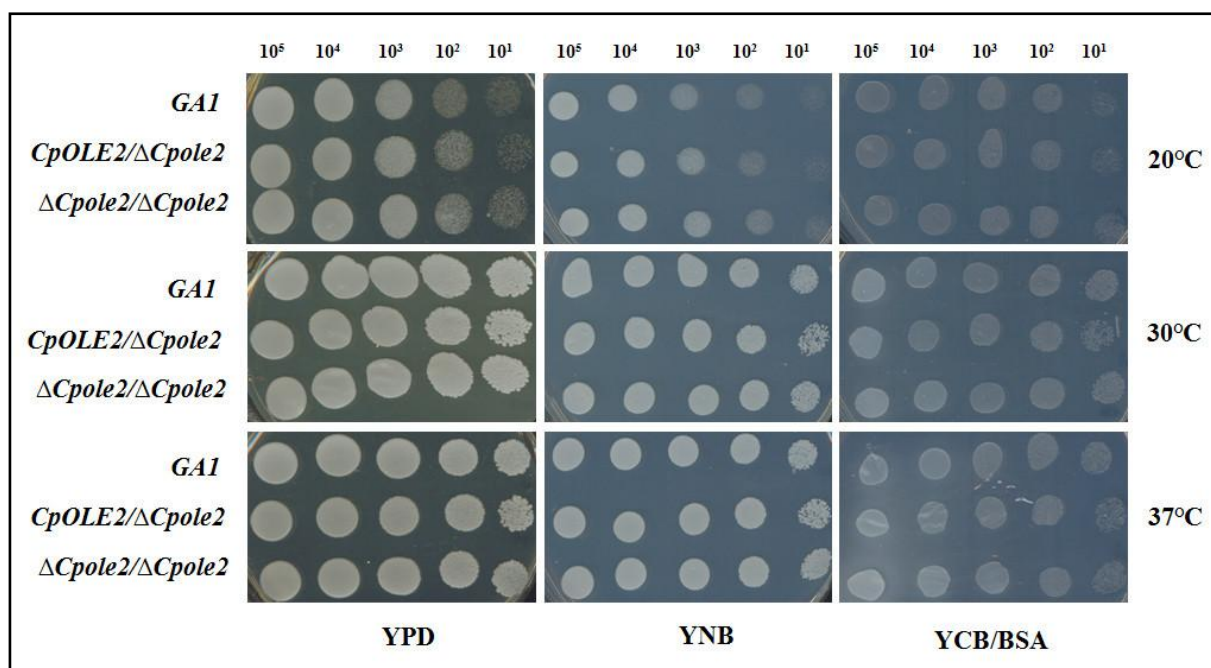
Sikeresen deletáltuk az *CpOLE2* gén mindkét allélját, így létrehozva az *OLE2* homozigóta deléciós mutáns törzset. Ellentétben a *CpOLE1* gén deletálása során tapasztalt nehézségekkel (Nguyen és mtsi. 2011b), a *CpOLE2* génre heterozigóta és homozigóta deléciós mutáns törzsek előállításánál nem ütköztünk akadályokba, ami megfelel a *C. albicans OLE2* gén célzott génkiütésénél tapasztaltakkal (Krishnamurthy és mtsi. 2004).

6.2. A *CpOLE2* mutáns törzsek fiziológiai vizsgálata

A mutáns törzsek életképességében történt változások feltérképezése érdekében különböző vizsgálatokat végeztünk. A növekedési képességet stresszorokkal kiegészített táptalajokon és eltérő hőmérsékleteken analizáltuk. Emellett vizsgáltuk a mutáns törzsek növekedésének pH függését, a törzsek FBS (fetal bovine serum) bontási képességét, valamint pszeudohifa-képzését.

6.2.1. A *CpOLE2* mutáns törzsek növekedési képességének vizsgálata különböző táptalajon és hőmérsékleten

A *CpOLE2* mutáns törzsekből, valamint a GA1 vad típusú törzsből több, különböző hígítású sejszuszpenziót csepegtettünk YPD, YNB és YCB/BSA táptalajokra, majd ezeket különböző hőmérsékleten 2 napig inkubáltuk, ezt követően összehasonlítottuk a vizsgált törzsek növekedési képességét. A növekedési tesztekben alkalmazott táptalajok lehetővé tették a minimál táptalajon való növekedési képesség és a BSA-ból származó nitrogén és szén tápanyagként való felhasználásának vizsgálatát, az eltérő hőmérsékleten történő inkubáció pedig lehetővé tette a növekedés hőmérsékletfüggő vizsgálatát. A különböző hőmérsékleten és szénforráson való növekedési képesség fontos szerepet játszhat a gazda-patógén interakciók során a gazdakörnyezethez való alkalmazkodásban (Rosa e Silva és mtsi. 2008, Biswas és mtsi. 2007) A 9. ábra is jól mutatja, hogy sem a különböző hőmérsékleteken, sem a különböző táptalajokon történő inkubáció nem okozott változást a mutáns törzsek növekedési, illetve tápanyag-felhasználási képességében a vad típusú GA1 törzshöz képest. Eredményeink alapján a *CpOLE2* gén nem játszik szerepet a gazdakörnyezetben történő, megváltozott hőmérsékletre és szénforráshoz való alkalmazkodásban.

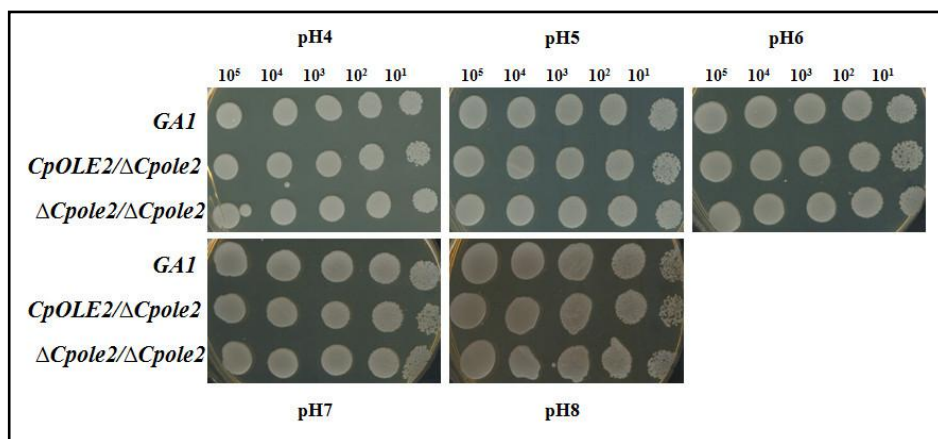


9. ábra. A GA1 vad típusú, a *CpOLE2/ΔCpole2* heterozigóta és a $\Delta Cpole2/\Delta Cpole2$ homozigóta mutáns törzsek növekedése különböző koncentrációkban kicsepegtetve, 20, 30 és 37°C-os hőmérsékleten, YPD, YNB, valamint YCB/BSA táptalajokon.

6.2.2. A *CpOLE2* mutáns törzsek növekedési vizsgálata különböző pH-n

Minden organizmus számára rendkívül fontos a megfelelő pH homeosztázis fenntartása, így ez a patogén *Candida* fajok gazdakörnyezetben, főként fagolizozómákban való túlélésében is szerepet játszik. A patogén megváltozott pH-hoz való alkalmazkodási képessége nagyban befolyásolja a virulenciát (De Bernardis és mtsi. 1998, Coutinho 2009). Mint azt már *C. albicans* esetében kimutatták, a gomba aktívan képes a pH neutralizálására mind lúgos, mind savas közegben, ezáltal megfelelő környezetet képes kialakítani a gazdaszervezetben a fertőzés során (Vylkova és mtsi. 2011).

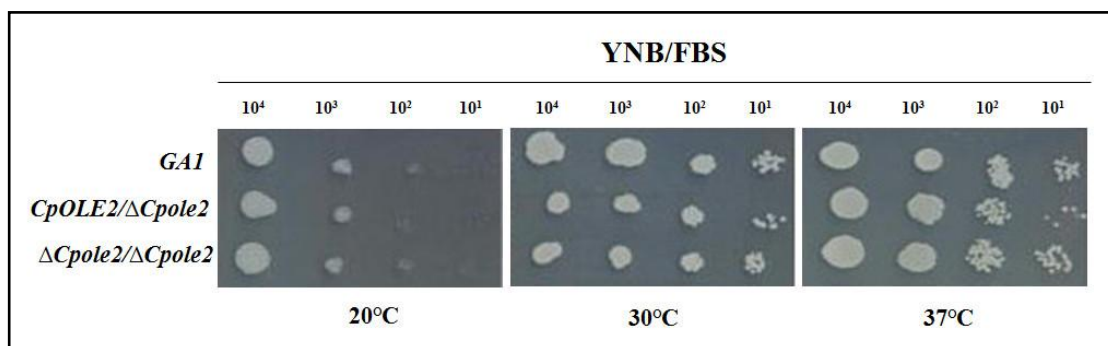
Ennek érdekében megvizsgáltuk, hogy történik-e változás a deléciós mutáns törzsek növekedésében a vad típusú GA1 törzs növekedéséhez képest különböző pH-jú tápközeg alkalmazása esetén. A vizsgálat során YPD táptalajt alkalmaztunk öt különböző pH-ra beállítva pH4 és pH8 közötti tartományban. Az eredményeket a 10. ábra mutatja be. Ezen vizsgálat során sem találtunk eltérést a különböző táptalajokon nevelt vad típusú, valamint mutáns törzsek növekedési képességében. Eredményeink alapján a *CpOLE2* gén nem játszik szerepet a *C. parapsilosis* pH homeosztázisának fenntartásában.



10. ábra. A GA1 vad típusú, a *CpOLE2/ΔCpole2* heterozigóta és a $\Delta Cpole2/\Delta Cpole2$ homozigóta mutáns törzsek növekedése különböző koncentrációkban kicsepegtetve különböző pH-jú táptalajokon nevelve.

6.2.3. A *CpOLE2* mutáns törzsek FBS bontási képessége

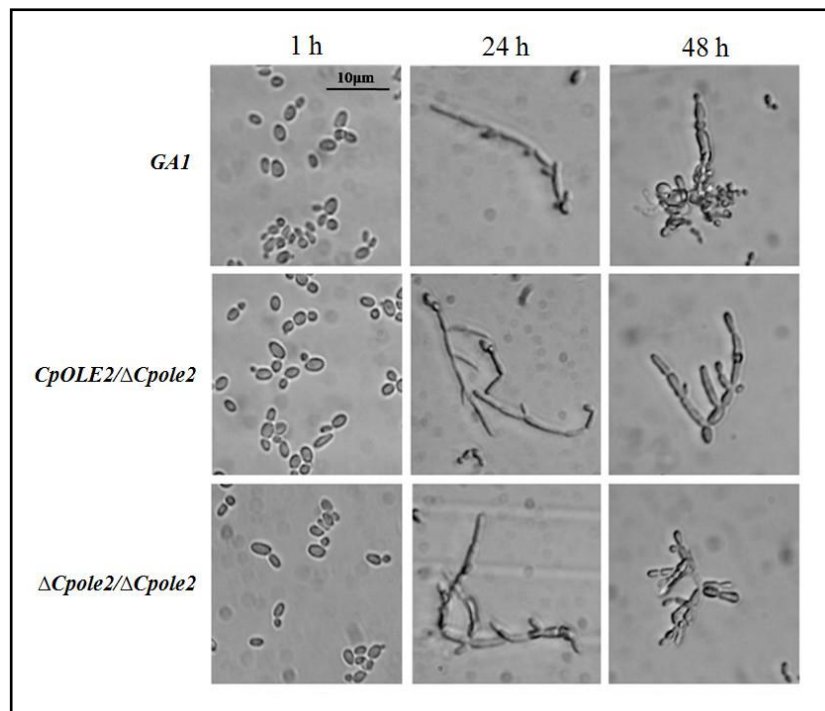
A patogén *Candida* fajok egyik fontos virulenciafaktora a gazdaszérum antimikrobiális peptid molekuláinak bontási képessége (Horvath és mtsi. 2012, Gropp és mtsi. 2009). Az FBS egy komplex fehérje összetételű szérum, melynek a vizsgált gombatörzs általi bontását a telepek körül jelentkező ún. feltisztulási zóna jelzi. Az ilyen típusú aktivitás fontos tényező lehet, mivel a patogén véráramba kerülésekor a szérumfehérjék mikrobakárosító hatását képes kivédeni. Az FBS bontási képesség vizsgálatát minimál táptalajon, 3 különböző hőmérsékletet alkalmazva vizsgáltuk, azonban a mutáns törzsek és a vad típusú törzs FBS bontási képességében nem tapasztaltunk eltérést (11. ábra). Ezek alapján elmondhatjuk, hogy a *CpOLE2* gén nem játszik szerepet az extracelluláris fehérjebontási folyamatokban.



11. ábra. A GA1 vad típusú, a *CpOLE2/ΔCpole2* heterozigóta és a $\Delta Cpole2/\Delta Cpole2$ homozigóta mutáns törzsek FBS bontási képessége különböző koncentrációkban kicsepegtetve különböző hőmérsékleteken.

6.2.4. A *CpOLE2* mutáns törzsek pszeudohifa-képzése

A *C. parapsilosis* sejtek képesek pszeudohifák képzésére, amely elengedhetetlen a biofilm kialakításához, a mesterséges felületeken történő adhézióhoz, valamint a kolonizációhoz. *C. albicans* esetében bizonyították, hogy szérumban jelenlétében indukálódnak a hifa- és biofilmképződéshez szükséges morfológiai változásokat indukáló gének (Ene és mtsi. 2012). Így a pszeudohifaképzés fontos virulenciafaktor ezen patogén gombák körében. Ezért összehasonlítottuk a deléciós törzseink DMEM tápoldatban történő pszeudohifaképzési képességét a GA1 vad típusú törzsével. Eredményeinket a 12. ábrán mutatjuk be, ahol látható, hogy a *CpOLE2* gén eliminálásának hatására nem változik meg a gomba pszeudohifaképző képessége, tehát az Ole2 nem vesz részt adhéziós és biofilmképzési reakciók indukálásában.

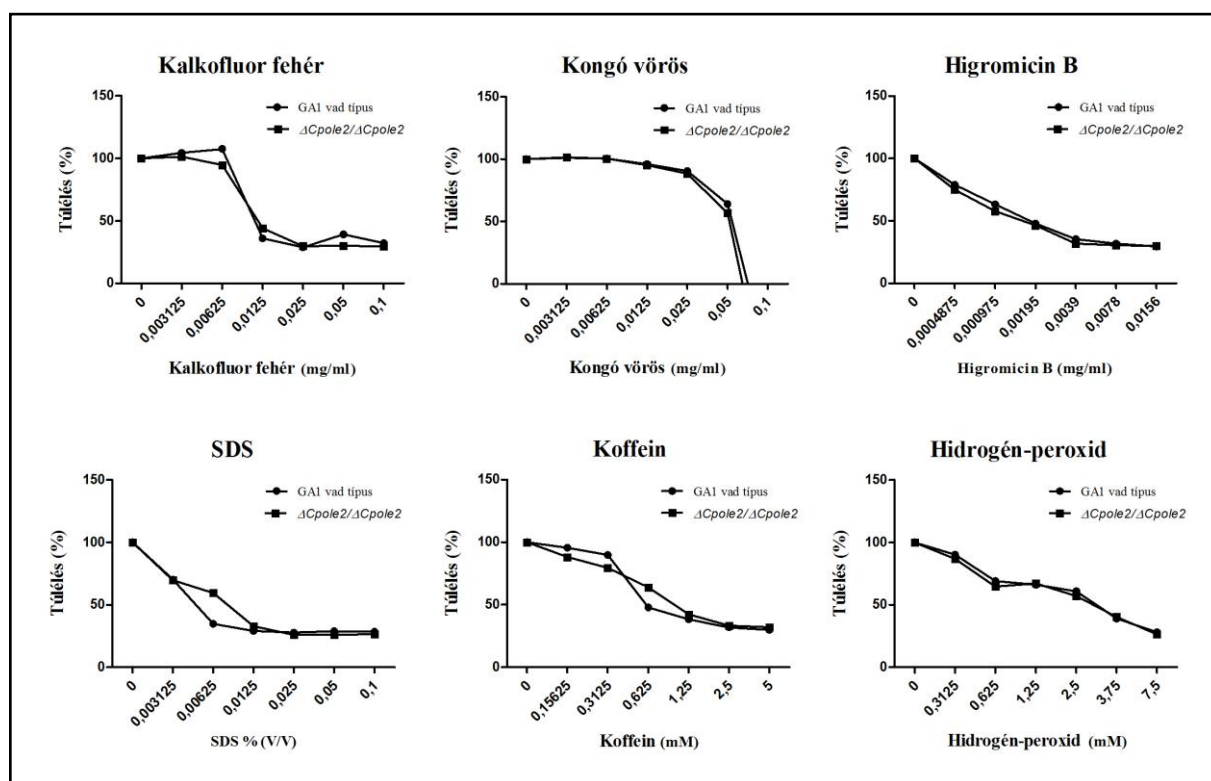


12. ábra. A GA1 vad típusú, a *CpOLE2/ΔCpole2* heterozigóta és a *ΔCpole2/ΔCpole2* homozigóta mutáns törzsek pszeudohifaképzési képessége fénymikroszkópban vizsgálva 1, 24 és 48 óra elteltével, fekete vonal: 10µm hosszúságot jelent.

6.2.5. A *CpOLE2* mutáns törzs növekedése különböző stresszorokat tartalmazó tápközegben

A gazda-patogén kölcsönhatások során a gazdakörnyezetben a patogénnek számos stresszhatással szemben kell ellenállnia, úgymint sejtfalkárosító és oxidatív stresszorok (Jimenez-Lopez és Lorenz 2013, Heilmann és mtsi. 2013). Ezért megvizsgáltuk a *CpOLE2*

homozigóta mutáns törzs, valamint a GA1 vad típusú törzs növekedését különböző koncentrációjú sejtfalkárosító hatóanyagok (kalkoflor fehér, kongó vörös, SDS és koffein) (Heilmann és mtsi. 2013, Calvo és mtsi. 2009), az oxidatív stressz ágens hidrogén-peroxid (Cuellar-Cruz és mtsi. 2008) és a fehérjeszintézis-gátló higromicin B antibiotikum jelenlétében (Gonzalez és mtsi. 1978). A vizsgálatokat 96 lyukú mikrotiter lemezen végeztük YPD/PS tápoldatban, amelyhez különböző koncentrációban kihígított stresszorokat adtunk. A törzsek növekedési képességét 16 óra elteltével vizsgáltuk a tápközeg optikai denzitása alapján (13. ábra).



13. ábra. A $\Delta Cpole2/\Delta Cpole2$ homozigóta mutáns törzs és a GA1 vad típusú törzs növekedési képessége alapján számolt túlélési százalékok grafikus ábrázolása különböző koncentrációjú kalkoflor fehér, kongó vörös, higromicin B, SDS, koffein, valamint hidrogén-peroxid jelenlétében 16 óra inkubáció után.

A 13. ábrán jól látható, hogy a két törzs stresszorok által befolyásolt túlélési képessége között nem tapasztalható különbség. Elmondható, hogy a *CpOLE2* gén nem játszik szerepet sem a sejtfal, sem pedig az oxidatív stresszorokkal szemben mutatott érzékenységben.

Összességében elmondhatjuk, hogy a fiziológiai tulajdonságait tekintve a *CpOLE2* deléciós mutáns törzs nem mutatott változást összehasonlítva a vad típusú GA1 törzssel. Ezen eredmények hasonlóak a *CaOLE2* gén célzott génkiütése során tapasztaltakkal, miszerint a

mutáns törzs növekedési képességei megegyeztek a vad típusú törzsével minden megvizsgált táptalajon (Krishnamurthy és mtsi. 2004).

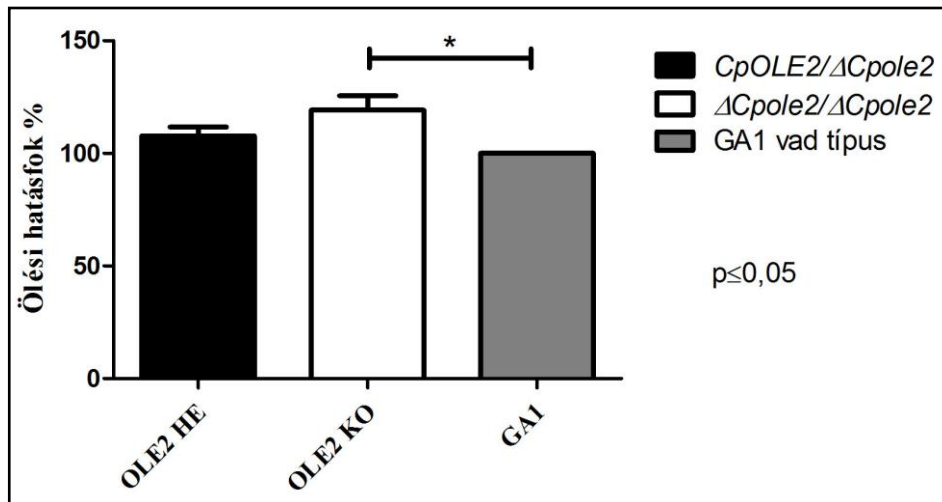
6.3. A *CpOLE2* mutáns törzsek *in vitro* és *in vivo* virulencia vizsgálatai

C. albicans-ban az *OLE2* gént összefüggésbe hozták a gomba prosztaglandin termelésével, amely immunmoduláló hatása révén fontos szerepet játszik a gazda-patogén kölcsönhatások során. Mivel ezek a gomba prosztaglandinok képesek a gazda immunválaszát olyan irányba eltolni, hogy az kedvező legyen a patogénnek a fertőzés során, ezért fontos virulenciafaktorként tartják őket számon (Noverr és mtsi. 2001, Erb-Downward és Noverr 2007). Miután sikeresen végrehajtottuk a *CpOLE2* gén célzott génkiütését a *C. parapsilosis* genomjából, elvégeztük a deléciós mutáns törzsek fiziológiai vizsgálatait. Mivel a mutáns törzsek életképességében nem találtunk eltérést a vad típusú GA1 törzshöz képest, érdeklődésünk arra irányult a továbbiakban, hogy a virulenciában történt-e változás.

6.3.1. Ölési kísérletek humán PBMC-DM sejtekkel

C. parapsilosis esetében korábban már több, a zsírsavszintézisben és metabolizmusban szerepet játszó génről is bizonyították, hogy hiányukban jelentősen csökkent a mutáns törzsek túlélési képessége az ölési kísérletek során (Nguyen és mtsi. 2011b, Toth és mtsi. 2014). A *CpOLE1* zsírsav deszaturáz gén hiányában csökken a telítetlen zsírsavak termelése, ezáltal megváltozik a membránösszetétel, ami lényegesen csökkent virulenciát eredményez (Nguyen és mtsi. 2011b). Azáltal, hogy komplementálni képes a zsírsav-bioszintézis hiányosságait, a lipid metabolizmusért felelős extracelluláris lipáz gének hiánya is nagymértékben csökkenti a *C. parapsilosis* virulenciáját (Toth és mtsi. 2014). A *CpOLE2* deléciós mutáns törzsek virulenciájában bekövetkezett változások felderítése érdekében egy *in vitro* fertőzéses modellt alkalmaztunk, melynek segítségével megvizsgáltuk, hogy a humán PBMC-DM sejtek hogyan képesek eliminálni a *CpOLE2* deléciós mutáns törzseket a vad típusú GA1 törzssel összehasonlítva. A kísérleti elrendezésünkben ismert számú makrofág sejtet fertőztünk ötszörös mennyiségű gombasejttel. A PBMC-DM sejtek ölési hatásfokát a 14. ábra mutatja be. Eredményeink alapján mind a *CpOLE2* heterozigóta mutáns törzset, mind a *CpOLE2* homozigóta deléciós mutáns törzset nagyobb hatékonysággal eliminálták a makrofágok, mint a GA1 vad típusú törzset, azonban ez a különbség csak a homozigóta deléciós mutáns esetében bizonyult szignifikánsnak ($p < 0,05$) (14. ábra). Így elmondható, hogy a feltételezhetően prosztaglandin-bioszintézisben is szerepet játszó *CpOLE2* zsírsav deszaturáz gén hiánya csökkenti a mutáns törzsek túlélését az ölési kísérletek során, ami lehet a

megváltozott zsírsavösszetétel, illetve a gomba prosztaglandinok hiányának következménye is.

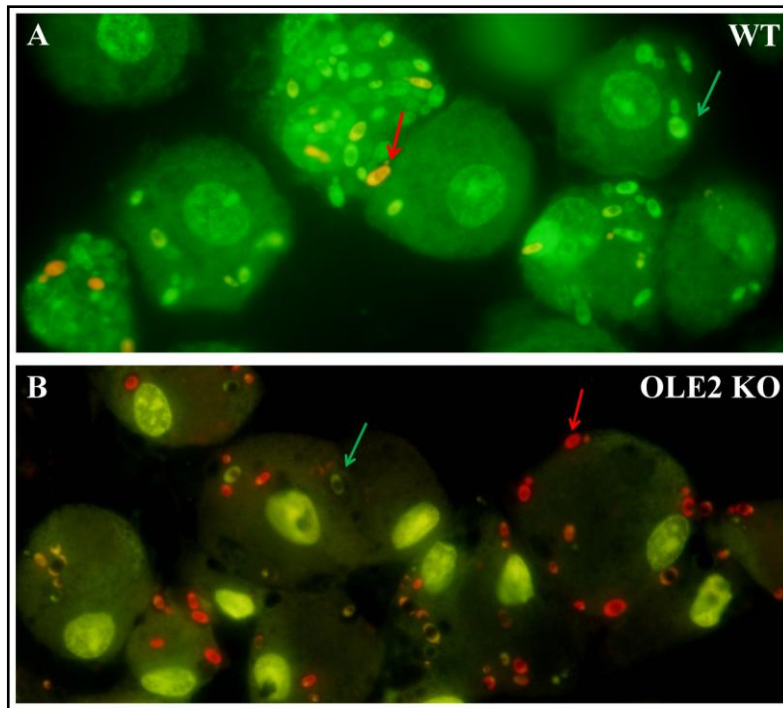


14. ábra. PBMC-DM sejtek *CpOLE2/ΔCpole2* heterozigóta és $\Delta Cpole2/\Delta Cpole2$ homozigóta mutáns törzsekkel szembeni ölési hatékonysága a GA1 vad típusú törzshöz viszonyítva.

Az eredményeket minden donor esetében a vad típusú törzssel szembeni ölési hatékonyságra (100%) normalizáltuk. Az oszlopokon feltüntetett szórások 4 donortól származó PBMC-DM sejtek fertőzéséből mért eredmények. *: szignifikancia, értéke: $p \leq 0,05$

6.3.2. Fagocitózis és ölés vizsgálata akridinnarancs/kristályibolya festéssel

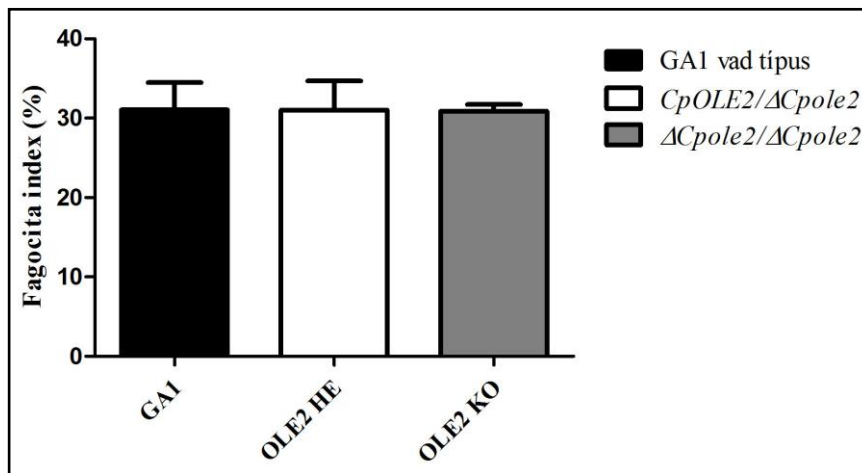
A PBMC-DM ölési hatékonyság vizsgálatok eredményeinek megerősítése érdekében fagocitózis és ölési kísérleteket végeztünk akridinnarancs és kristályibolya festést követő mikroszkópos kísérletek segítségével. Az akridinnarancs egy membrán/sejtfal permeábilis, nukleinsav szelektív fluoreszcens festék, ami kettős szálú DNS-hez kötődve zöld fényt emittál, míg egyszálú DNS-hez kötődve pirosat, ezzel megkülönböztethetővé teszi az élő és elpusztult sejteket (Mirrett 1982). A kristályibolyát a nem fagocitált gombák emissziójának kioltása érdekében alkalmaztuk. A fluoreszcens mikroszkópos képekből egy példát a 15. ábra szemléltet.



15. ábra. **A:** GA1 vad típusú törzssel fertőzött PBMC-DM sejtek akridinnarancs/kristályibolya festését követő fluoreszcens felvétel; **B:** $\Delta Cpole2/\Delta Cpole2$ homozigóta mutáns törzssel fertőzött PBMC-DM sejtek akridinnarancs/kristályibolya festését követő fluoreszcens felvétel.

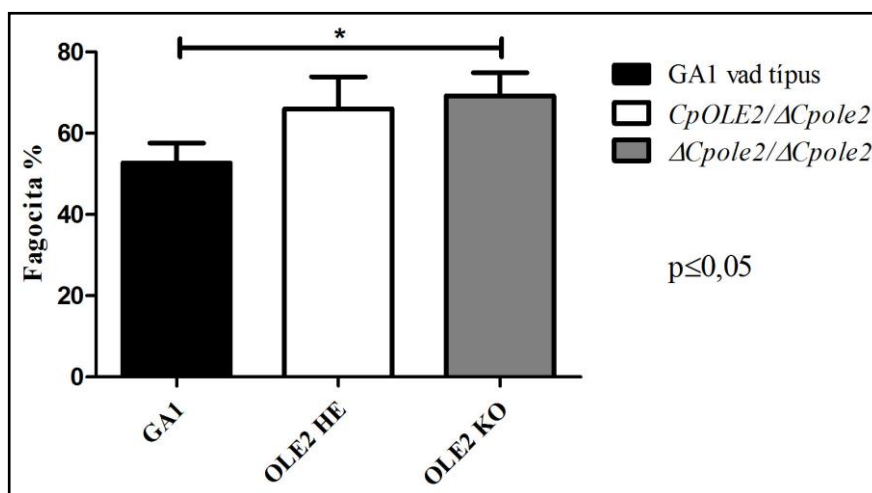
Piros nyíl: elpusztult, fagocitált gombasejt; zöld nyíl: élő, fagocitált gombasejt

Átlagosan 1000 makrofágot számoltunk le törzsenként, valamint 4 különböző donortól származó PBMC-DM sejteken végeztük el a kísérletet. Minden látómező esetében megszámloltuk az összes makrofágot, a fagocitáló makrofágokat, az összes fagocitált gombasejtet és az elpusztult gombasejtek számát. A kapott adatok alapján fagocita indexet $[(\text{fagocitáló makrofágok}/\text{összes fagocitált gomba}) \times 100]$ (16. ábra), fagocita százalékot $[(\text{fagocitáló makrofágok}/\text{összes makrofág}) \times 100]$ (17. ábra), valamint ölési százalékot $[(\text{elpusztult gombák}/\text{összes fagocitált gomba}) \times 100]$ (18. ábra) számoltunk.



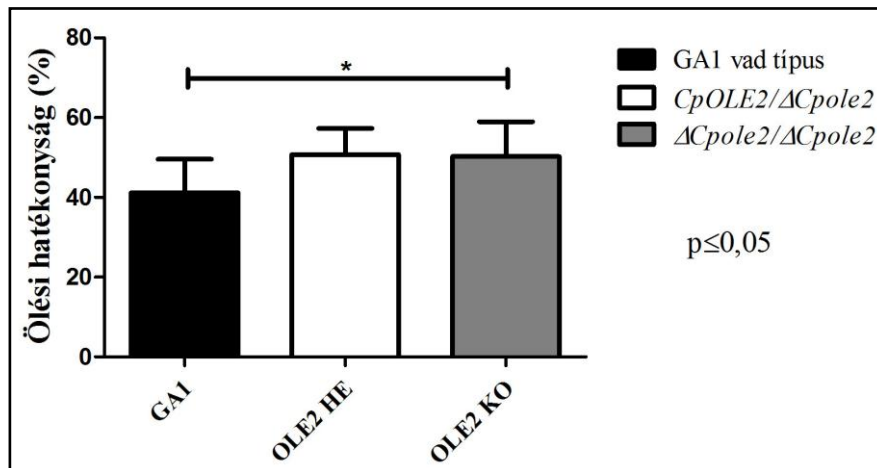
16. ábra. PBMC-DM sejtek GA1 vad típusú, *CpOLE2/ΔCpole2* heterozigóta és $\Delta Cpole2/\Delta Cpole2$ homozigóta mutáns törzsekkel való fertőzéséből származó fagocita index százalékos értékek.

Az oszlopokon feltüntetett szórások 4 donortól származó PBMC-DM sejtek fertőzéséből mért eredmények. *: szignifikancia, értéke: $p \leq 0,05$



17. ábra. PBMC-DM sejtek GA1 vad típusú, *CpOLE2/ΔCpole2* heterozigóta és $\Delta Cpole2/\Delta Cpole2$ homozigóta mutáns törzsekkel való fertőzéséből származó fagocita százalékos értékek.

Az oszlopokon feltüntetett szórások 4 donortól származó PBMC-DM sejtek fertőzéséből mért eredmények. *: szignifikancia, értéke: $p \leq 0,05$



18. ábra. PBMC-DM sejtek GA1 vad típusú, *CpOLE2/ΔCpole2* heterozigóta és *ΔCpole2/ΔCpole2* homozigóta mutáns törzsekkel való fertőzéséből származó ölési hatékonyságok százalékos értéke.

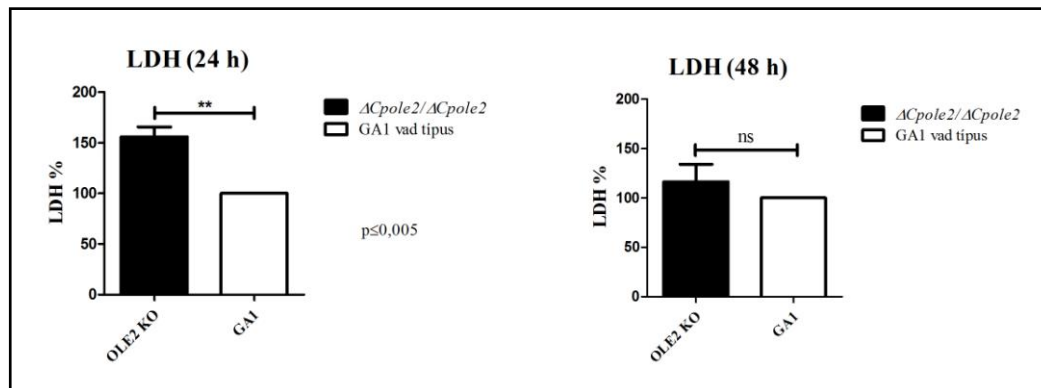
Az oszlopokon feltüntetett szórások 4 donortól származó PBMC-DM sejtek fertőzéséből mért eredmények. *: szignifikancia, értéke: $p \leq 0,05$

Nem tapasztaltunk különbséget a különböző fertőzésekből származó fagocita index értékek között, amely érték utal a fagocitáló makrofágokra jutó összes fagocitált gomba arányára. A fagocita százalék és ölési hatékonyság értékek esetében azonban már a heterozigóta mutáns törzsnél is látható a különbség, míg a homozigóta mutáns esetében ez a különbség már szignifikáns a vad típusú törzshöz képest ($p < 0,05$). A deléciós mutáns törzsek esetében nagyobb arányban voltak megfigyelhetők fagocitáló makrofágok az összes makrofág számához viszonyítva. Ezenkívül a fagocitáló makrofágok nagyobb hatékonysággal voltak képesek elpusztítani az általuk fagocitált deléciós mutáns élesztősejteket. Eredményeink a *CpOLE2* mutáns törzs csökkent virulenciájára utalnak, mert bár közel azonos számú gombasejtet fagocitáltak a makrofágok mind a vad típusú, mind a mutáns sejtekből, a már fagocitált sejteket szignifikánsan (10-20%) nagyobb hatékonysággal tudták eliminálni a mutáns sejtek esetében. Emellett a mutáns sejtek jelentősen több makrofágot aktiváltak. Ezen megállapítások hasonlóak a szekretált lipáz gének deléciójával nyert mutáns törzsek ölési kísérletei során tapasztaltakkal (Toth és mtsi. 2014).

6.3.3. A *CpOLE2* homozigóta mutáns törzs PBMC-DM sejteket károsító hatásának vizsgálata

Az *in vitro* fertőzések során megvizsgáltuk a különböző törzseink PBMC-DM sejteket károsító hatását az ún. laktát dehidrogenáz (LDH) teszt alkalmazásával. Az LDH egy stabil citoplazmatikus enzim, amely a gazdasejt plazmamembrán károsodása során azonnal

felszabadul a felülúszóba, ezért az LDH-felszabadulás kolorimetriás mérésével megállapíthatjuk a gazdasejtek károsodásának mértékét (Decker és Lohmann-Matthes 1988). A mérések során a fertőzést 6 donortól származó PBMC-DM sejteken végeztük, majd 24, illetve 48 óra elteltével felülúszót gyűjtöttünk. A sejtmentes felülúszókban mértük a relatív LDH értékeket (19. ábra).



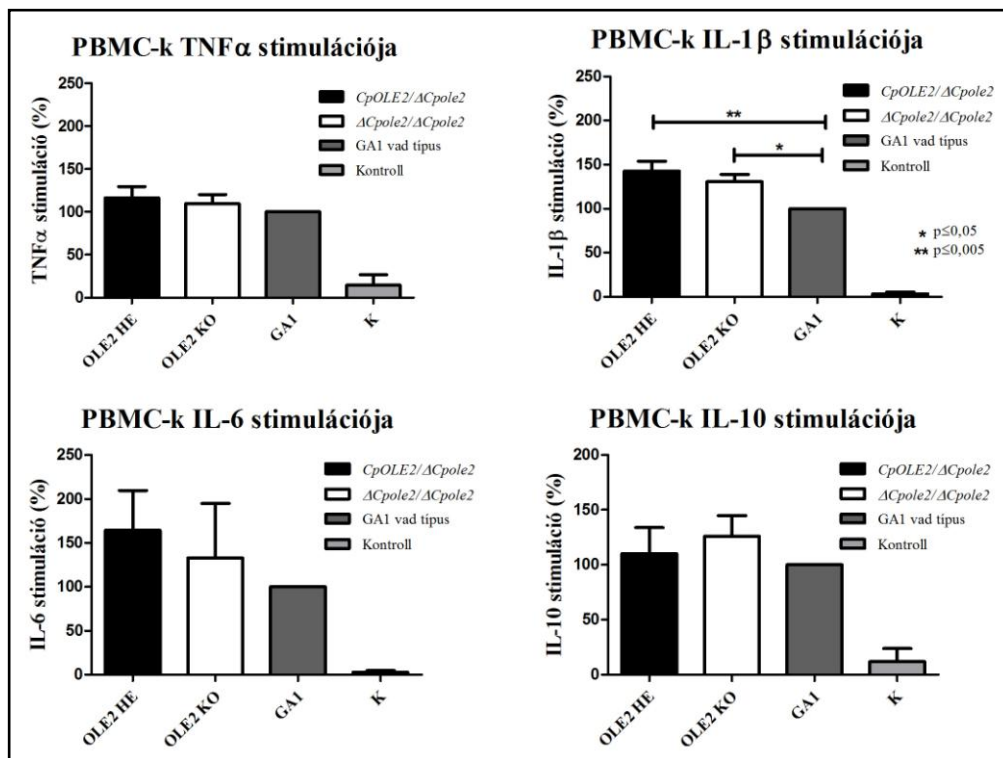
19. ábra. GA1 vad típusú és $\Delta Cpole2/\Delta Cpole2$ homozigóta mutáns törzsekkel fertőzött PBMC-DM sejtek felülúszójából mért relatív LDH mennyiség %-osan feltüntetve, a GA1 törzsre vonatkoztatva, 24 és 48 óra után.

Az eredményeket minden donor esetében a vad típusú törzs általi gazdasejt károsító hatásra (100%) normalizáltuk. Az oszlopokon feltüntetett szórások 6 donortól származó PBMC-DM sejteken mért eredmények. **: szignifikancia, értéke: $p \leq 0,005$, ns: nem szignifikáns.

A mérések alapján a fertőzés 24. órájában a *CpOLE2* deléciós mutáns törzs PBMC-DM sejteket károsító hatása szignifikánsan magasabbnak bizonyult a vad típusú törzshöz képest. Ezek az eredmények alátámasztják a fagocitózis kísérletek során tapasztalt magasabb fagocita aktivációt és hatékonyabb gomba eliminálást. A hevesebb reakció a makrofágok nagyobb mértékű pusztulását is eredményezi az interakció során (Lin és mtsi. 2004, Schilling és mtsi. 2013, Miao és mtsi. 2011). Csoportunkban jelenleg is folynak vizsgálatok arra vonatkozóan, hogy a *C. parapsilosis* képes-e programozott sejthalált indukálni makrofágokban. Előzetes eredményeink arra utalnak, hogy a *C. albicans*-hoz hasonlóan a *C. parapsilosis* is képes piroptózist kiváltani a gazdasejtekben, ami gyulladással, intenzív citokin szekrécióval és sejtlyúzzal jár. Annak megállapításához azonban, hogy a *CpOLE2* gén szerepet játszhat-e a piroptózis indukciójában, még további vizsgálatok szükségesek. Érdekes módon, 48 óra elteltével már nem tapasztaltunk különbséget a vad típusú, illetve a *CpOLE2* deléciós törzsszel fertőzött makrofágok LDH szekréciójában, ami arra utal, hogy a *CpOLE2* gén hiánya a gazdasejtekkel való interakciót a fertőzés későbbi szakaszában már nem befolyásolja.

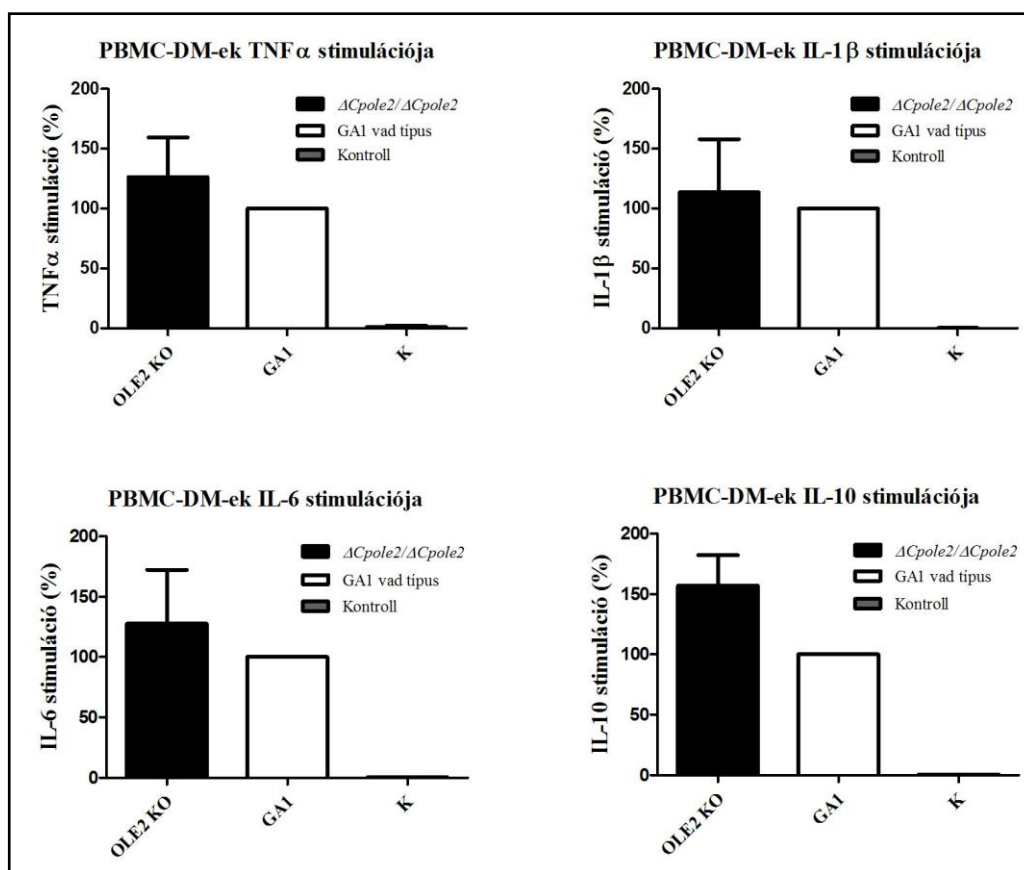
6.3.4. A *CpOLE2* mutáns törzsek pro- és anti-inflammatorikus citokintermelést stimuláló hatásának vizsgálata PBMC és PBMC-DM sejteken

A patogén hatékony eliminálásához a makrofágok fagocitáló és ölési képességein túl a pro- és anti-inflammatorikus citokintermelési képessége is elengedhetetlen. A pro-inflammatorikus TNF α , IL-1 β és IL-6 citokineknek számtalan, az adaptív immunválaszt indukáló hatása ismert, elősegítve a patogén elleni hatékony védekezést. Ellenben az anti-inflammatorikus IL-10 citokinnek immunszuppresszálo hatása van, ami szintén elengedhetetlen a gazda hatékony immunválaszához, megelőzve a túlzott immunreakciót (Toth és mtsi. 2014, Netea és mtsi. 2006). A pro- és anti-inflammatorikus citokinek aránya meghatározó a gazda immunválaszában, ezért megvizsgáltuk a *CpOLE2* deléciós mutáns törzsek citokintermelést stimuláló hatását PBMC és PBMC-DM sejteken, összehasonlítva a GA1 vad típusú törzs által kiváltott stimulációval. A fertőzést követően sejtmertes felülúszókból ELISA módszer segítségével mértük a citokin mennyiségeket. A mért citokin mennyiségeket minden donor esetében, a vad típusú törzs által stimulált mennyiségekre (100%) normalizáltuk, ezzel elkerülve az eltérő donorok miatt adódó különbségeket. A PBMC sejtek esetében 5 donoron végeztük a kísérleteket (20. ábra). A PBMC-DM sejtek esetében 4 donor felhasználásával végeztük a méréseket (21. ábra).



20. ábra. GA1 vad típusú, *CpOLE2/ Δ Cpole2* heterozigóta és Δ *Cpole2/ Δ Cpole2* homozigóta mutáns törzsek pro- (TNF α , IL-1 β és IL-6) és anti-inflammatorikus (IL-10) citokintermelést stimuláló hatása PBMC sejteken.

A mért citokin mennyiségeket minden donor esetében, a vad típusú törzs által stimulált mennyiségekre (100%) normalizáltuk. K: nem indukált PBMC sejtek. Az oszlopokon feltüntetett szórások 5 donortól származó PBMC sejteken mért eredmények. *: szignifikancia, értéke: $p \leq 0,05$; **: szignifikancia, értéke: $p \leq 0,005$



21. ábra. GA1 vad típusú és $\Delta Cpole2/\Delta Cpole2$ homozigóta mutáns törzsek pro- (TNF α , IL-1 β és IL-6) és anti-inflammatorikus (IL-10) citokintermelést stimuláló hatása PBMC-DM sejteken.

A mért citokin mennyiségeket minden donor esetében, a vad típusú törzs által stimulált mennyiségekre (100%) normalizáltuk. K: nem indukált PBMC-DM sejtek. Az oszlopokon feltüntetett szórások 4 donortól származó PBMC-DM sejteken mért eredmények.

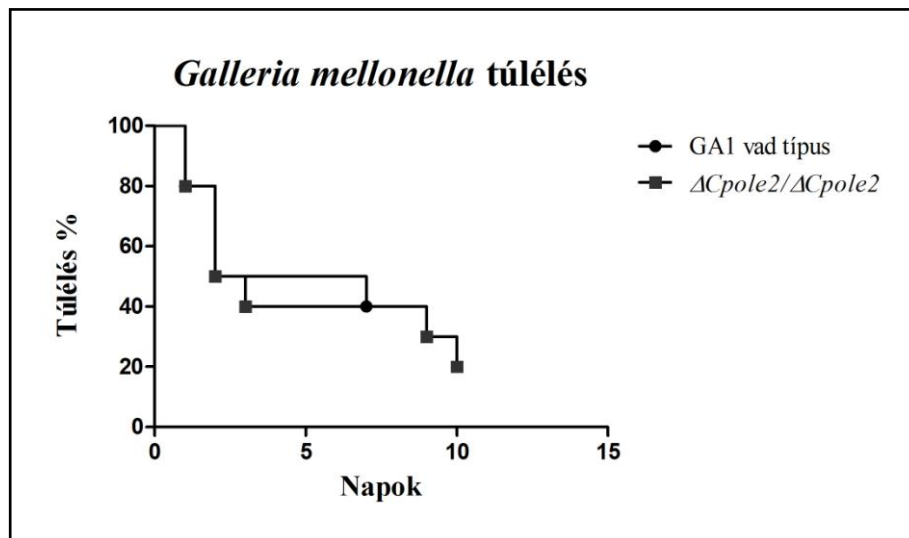
A PBMC-k stimulációját követően a *CpOLE2* deléciós mutáns törzsek emelkedett pro- és anti-inflammatorikus citokintermelést indukáltak, összehasonlítva a GA1 vad típusú törzsszel. Ez a megnövekedett indukció azonban csak az IL-1 β pro-inflammatorikus citokin esetében bizonyult szignifikánsnak. A PBMC-DM sejtekkel végzett kísérletekben hasonló változást indukált a *CpOLE2* homozigóta deléciós mutáns törzs a citokintermelésben, azonban ez a változás egyik citokin esetében sem bizonyult szignifikánsnak.

A *CpOLE2* deléciós mutáns törzsek tendenciájában magasabb, de nem szignifikáns pro- és anti-inflammatorikus citokintermelést indukálnak PBMC és PBMC-DM sejteken, mint a GA1 vad típusú törzs. Ez a mérsékelt indukció utalhat a *CpOLE2* gén virulenciában betöltött szerepére. Az IL-1 β pro-inflammatorikus citokin szignifikánsan (30-40%) emelkedett

expressziója alátámasztja, hogy a *CpOLE2* deléciós mutáns törzs intenzívebb makrofág aktivációt vált ki a fertőzés során, ami a gombasejtek hatékonyabb eliminálását eredményezi (Netea és mtsi. 2010, Toth és mtsi. 2014).

6.3.5. Viaszmoly (*Galleria mellonella*) lárvák fertőzése *CpOLE2* homozigóta mutáns törzssel

A *Galleria mellonella* lárva modell segítségével *in vivo* körülmények között hatékonyan vizsgálható a *Candida* törzsekre adott immunválasz. Mivel a lárvák immunrendszere funkcionális és strukturális hasonlóságot mutat az emlősök veleszületett immunrendszerével (Jacobsen 2014), megvizsgáltuk, hogy a *CpOLE2* deléciós mutáns törzs virulenciája hogyan változik a vad típusú törzshöz képest a lárvák fertőzésekor. A kísérleteket minden törzs esetében 10 lárva fertőzésével végeztük, valamint PBS-sel injektált és nem injektált kontrollokat használtunk. A lárvák túlélését 10 napon keresztül, naponta vizsgáltuk (22. ábra).



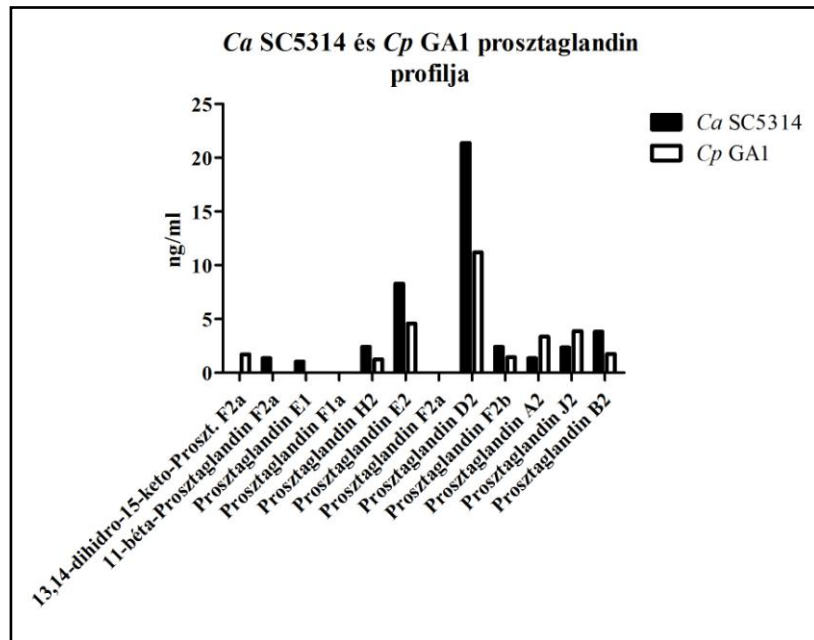
22. ábra. *Galleria mellonella* túlélés GA1 vad típusú és $\Delta Cpole2/\Delta Cpole2$ homozigóta mutáns törzs fertőzését követően a túlélési százalék bemutatásával.

A *Galleria mellonella* lárvák túlélése alapján nem találtunk különbséget a *CpOLE2* deléciós mutáns törzs és a GA1 vad típusú törzs lárvákat károsító hatásában. Azonban a modell immunrendszerének működése még nem ismert teljes egészében, így elképzelhető, hogy mérsékelt virulencia különbségek kimutatására nem alkalmas. A továbbiakban éger modellben is el kell végezni az *in vivo* virulencia vizsgálatokat.

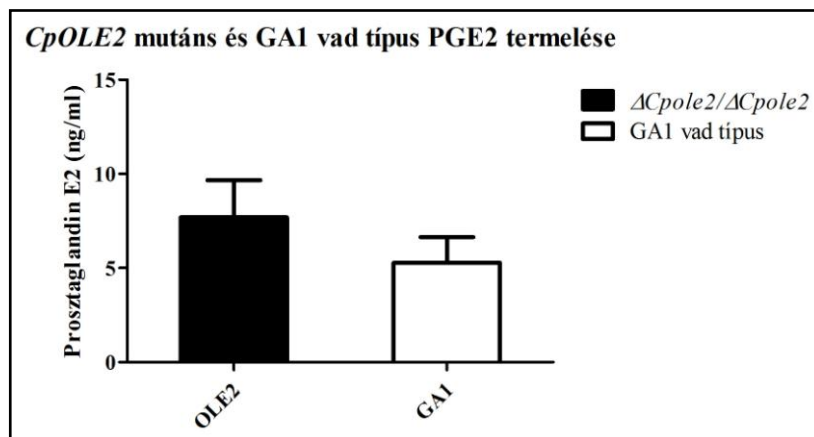
6.4. A *C. parapsilosis* GA1 és *CpOLE2* deléciós törzsek proszttaglandin termelése

Megbizonyosodtunk arról, hogy a *CpOLE2* deléciós törzsben a fiziológiai tulajdonságokat vizsgáló kísérletek alapján a növekedési képességet tekintve nem történt változás, azonban a virulenciája egyértelműen lecsökkent. Mivel *C. albicans*-ban az *OLE2* gént összefüggésbe hozták a gomba proszttaglandin termelésével, megvizsgáltuk a *CpOLE2* mutáns törzs proszttaglandin termelését (Erb-Downward és Noverr 2007).

A proszttaglandinok 20 szénatomos bioaktív lipidek, melyek többsége AA-ból képződő, ciklopentaton gyűrűvel rendelkező molekula. Emlősökben többnyire minden szövetben és szervben megtalálhatóak és számtalan szabályozó funkciót látnak el, mint pl. láz és gyulladás indukálása, immunrendszer moduláció, sejtnövekedés/szaporodás irányítása (Haeggstrom és mtsi. 2010, Funk 2001). Számos patogén gombafaj esetén megfigyelték, hogy képes az emlős proszttaglandin E_2 -höz hasonló proszttaglandin termelésére. Ezek a gomba proszttaglandinok a patogén fajok esetében fontos virulenciafaktornak számítanak, mivel a gazda immunválaszát olyan irányba tolhatják el a fertőzés során, hogy az kedvezzen a gomba kolonizációjának (Noverr és mtsi. 2002). *C. albicans*-ban a *CaOLE2* gént összefüggésbe hozták a proszttaglandin termeléssel (Erb-Downward és Noverr 2007). *C. parapsilosis* esetében még nem vizsgálták a proszttaglandin-termelési képességet, ezért elvégeztük a GA1 vad típusú törzs AA-as indukciót követő proszttaglandin-profiljának vizsgálatát HPLC-MS analízis segítségével, ahol kontrollként a proszttaglandin termelő *C. albicans* SC5314 törzset használtuk (23. ábra). Ezt követően megvizsgáltuk a *CpOLE2* deléciós mutáns törzs proszttaglandin E_2 termelését is és összehasonlítottuk a GA1 vad típusú törzsével (24. ábra).



23. ábra. *C. albicans* SC5314 és *C. parapsilosis* GA1 prosztaglandin-profilja HPLC-MS analízis alapján.



24. ábra. A $\Delta Cpole2/\Delta Cpole2$ homozigóta deléciós mutáns és a GA1 vad típusú törzs prosztaglandin E₂ termelés vizsgálata HPLC-MS analízis segítségével.

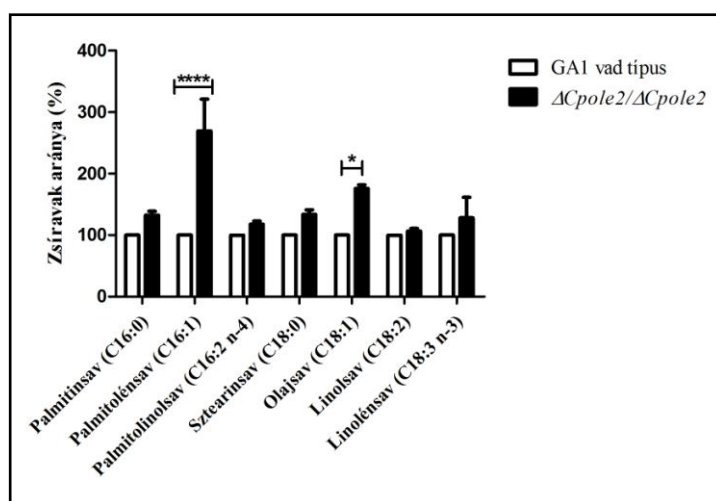
Az oszlopokon feltüntetett szórások 3 biológiai és 3 statisztikai párhuzamosból származnak.

A prosztaglandin-profilok vizsgálatát követően megállapítható, hogy a *C. parapsilosis* a *C. albicans*-hoz hasonló mennyiségű gomba prosztaglandin előállítására képes exogén AA-as indukciót követően. A PGE₂-n kívül egyéb prosztaglandinok mellett a PGD₂ termelése volt megfigyelhető mindkét törzs esetében. Továbbá elmondható, hogy a *CpOLE2* deléciós mutáns törzs a vad típusú GA1 törzssel közel azonos mennyiségű PGE₂ termelésére volt képes az AA-as indukciót követően. Eredményeink alapján a *CpOLE2* gén terméke nem

szükséges a *C. parapsilosis* prosztaglandin termeléséhez, ellentétben a *C. albicans*-nál tapasztaltakkal (Erb-Downward és Noverr 2007).

6.5. A *CpOLE2* mutáns törzs zsírsavprofiljának meghatározása

A prosztaglandin mérési kísérleteinkkel bizonyítottuk, hogy a *CpOLE2* gén nem vesz részt a *C. parapsilosis* prosztaglandin termelésében. Korábbi vizsgálataink azonban egyértelműen bizonyították a *CpOLE2* gén virulenciában betöltött szerepét. Annak megállapítására, hogy a megváltozott virulencia hátterében milyen - a gén terméke által szabályozott - folyamatok állhatnak, alaposan áttanulmányoztuk a *C. albicans OLE2* génről ezidáig publikált ismereteket. Ezek alapján a *CaOLE2* gént is a *S. cerevisiae* $\Delta 9$ deszaturáz *OLE1* génjével homológ génnek azonosították, azonban a *CaOLE2* gén terméke nem mutatott $\Delta 9$ deszaturáz aktivitást, mivel nem tudta komplementálni a *S. cerevisiae OLE1* gén hiányát (Krishnamurthy és mtsi. 2004). Feltételezték azonban, hogy a gén terméke egyéb deszaturáz aktivitással rendelkezik, illetve a prosztaglandin-bioszintézisben is szerepe van (Krishnamurthy és mtsi. 2004, Erb-Downward és Noverr 2007). A *de novo* zsírsav-bioszintézis és ezáltal az útvonalban szerepet játszó gének fontos virulenciafaktorai lehetnek a *C. parapsilosis*-nak is. A *CpOLE2* deléciós mutáns törzs *de novo* zsírsav-bioszintézisben betöltött szerepének felderítése érdekében gázkromatográfiás (GC) analízis segítségével megvizsgáltuk a mutáns törzs zsírsavprofilját és összehasonlítottuk a GA1 vad típusú törzs zsírsavprofiljával (25. ábra).

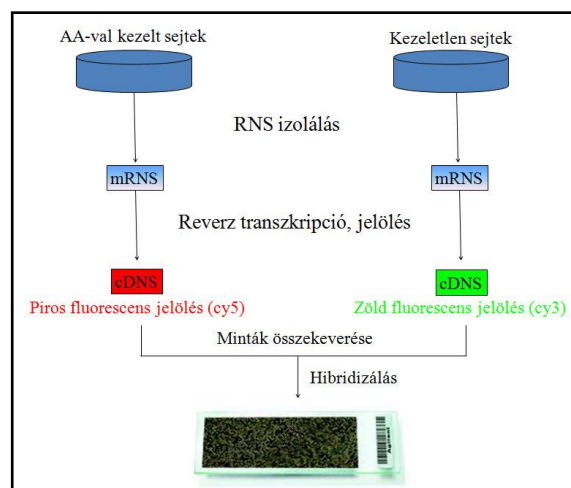


25. ábra. A $\Delta Cpole2/\Delta Cpole2$ homozigóta deléciós mutáns törzs által termelt palmitinsav (C16:0), palmitolénsav (C16:1), palmitolinolsav (C16:2 n-4), sztearinsav (C18:0), olajsav (C18:1), linolsav (C18:2) és α -linolénsav (C18:3) százalékos aránya, a GA1 vad típusú törzs által termelt zsírsavakhoz viszonyítva. A szórás értékeit az oszlopokon tüntettük fel. *: $p \leq 0,05$, ****: $p \leq 0,00005$.

A zsírsavak mérése alapján a *CpOLE2* deléciós mutáns törzs eltérést mutatott a GA1 vad típusú törzshöz képest, a deléciós törzsnél ugyanis az egyszeresen telítetlen palmitolénsav (C16:1) és olajsav (C18:1) feldúsulását figyeltük meg. Ezek az egyszeresen telítetlen zsírsavak $\Delta 9$ deszaturáz segítségével keletkeznek a telített palmitinsavból (C16:0), illetve sztearinsavból (C18:0). További lépésként a $\Delta 12$ deszaturáz segítségével, egy további kettős kötés beépülésével képződik a kétszeresen telítetlen linolsav (C18:2) és palmitolinolsav (C16:2n-4). Mivel a profil alapján nagyobb arányban figyelhetjük meg az egyszeresen telítetlen zsírsavakat a mutáns törzs esetében, így feltételezzük, hogy a *CpOLE2* gén terméke nem csak $\Delta 9$ deszaturáz funkciót lát el. A *C. albicans OLE2* gén vizsgálatáról egyetlen tanulmány található a szakirodalomban. Megfigyeléseink összhangban vannak a *CaOLE2* génnél tapasztaltakkal, miszerint az nem képes komplementálni a *S. cerevisiae* $\Delta 9$ deszaturáz *OLE1* gén hiányát. (Krishnamurthy és mtsi. 2004).

6.6. A prosztaglandin bioszintézisben szerepet játszó gének azonosítása microarray analízis segítségével

Mivel a *CpOLE2* gén nem játszik szerepet a *C. parapsilosis* prosztaglandin termelésében, ezért a bioszintézisben résztvevő további gének azonosítása céljából AA-as indukciót követő microarray analízist végeztünk. Az 1 órán át AA-val indukált és nem indukált CLIB214 vad típusú törzsekből totál RNS-t izoláltunk, majd miután meggyőződünk az RNS-ek minőségéről és mennyiségéről, reverz transzkripcióval fluoreszcensen jelölt - Cyanine 5 (Cy5) és Cyanine 3 (Cy3) - cDNS próbákat hoztunk létre. A különböző fluoreszcens festékekkel jelölt, indukált és nem indukált mintákat összekevertük és a microarray lemezhez hibridizáltuk (26. ábra).

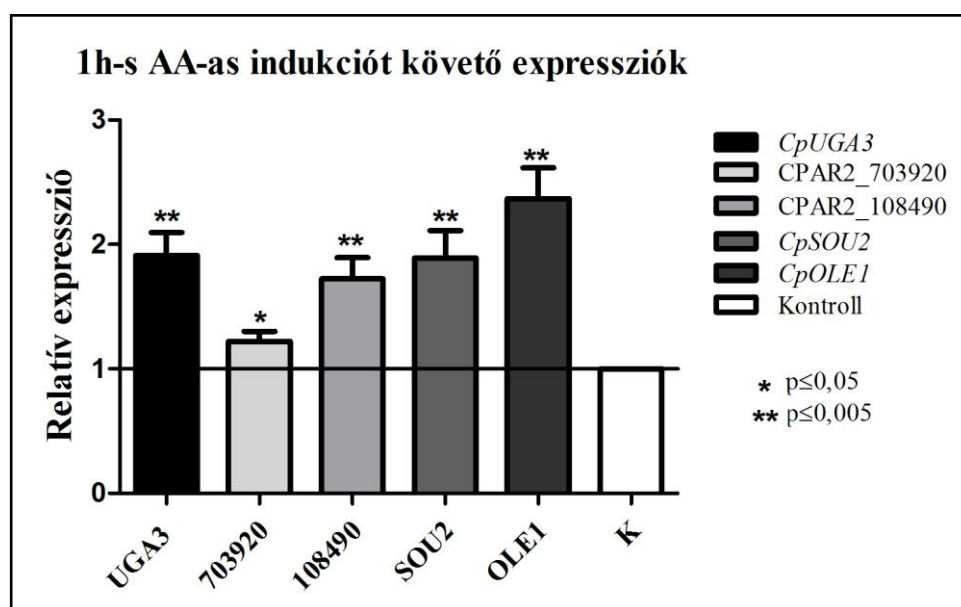


26. ábra. Microarray analízishez használt kísérleti elrendezés.

A hibridizálást követően szkenneltük a microarray lemezeket, majd feldolgoztuk az adatokat. Az AA-as indukció következtében a teljes genomot reprezentáló chip-en csak 5 gén mutatott megváltozott expressziót, amelyek azonban szignifikánsak voltak és minden gén esetében az expresszió növekedését tapasztaltuk. Azonosítottuk a *CpUGA3* gént, aminek ortológjai „cink ujj” DNS-kötő domént tartalmazó transzkripciós faktorok (Vandeputte és mtsi. 2011); a *CpSOU2* gént, melynek ortológjai sztereo-specifikus karbonil-reduktáz gének (Janbon és mtsi. 1998); a *CpOLE1* zsírsav deszaturáz gént (*de novo* zsírsav-bioszintézis esszenciális enzime) és további 2, ismeretlen funkciójú gént. A CPAR2_703920 gén ortológjai citokróm-c aktivitással rendelkeznek. A CPAR2_108490 ortológjairól annyit tudunk, hogy gomba típusú vakuólum elhelyezkedést mutatnak.

6.7. Microarray adatok validálása valós idejű kvantitatív RT-PCR (qRT-PCR) segítségével

Annak érdekében, hogy megbizonyosodjunk a microarray adatok helyességéről, valós idejű kvantitatív RT-PCR-t alkalmaztunk a kezeletlen és az 1 órán át AA-val kezelt CLIB214 vad típusú törzsön (27. ábra).



27. ábra. A *CpUGA3*, CPAR2_703920, CPAR2_108490, *CpSOU2* és *CpOLE1* gének relatív expressziós értékei 1 órás AA-as indukciót követően az 1 órás kezeletlen kontrollhoz (K) viszonyítva. Az oszlopokon feltüntettük a szórásokat. *: szignifikancia, értéke: $p \leq 0,05$; **: szignifikancia, értéke: $p \leq 0,005$.

A qRT-PCR-rel kapott eredmények minden esetben alátámasztották a microarray analízis eredményeit, mivel minden gén esetében szignifikáns génexpresszió növekedés volt tapasztalható az AA-as indukció hatására.

6.8. A microarray során azonosított gének célzott génkiütése fúziós PCR technika segítségével

A microarray analízis alapján azonosított gének célzott génkiütését fúziós PCR technika segítségével valósítottuk meg. A *C. albicans*-ban Noble és Johnson (2005) által kidolgozott technikát *C. parapsilosis*-ba is adaptálták. A fúziós kazetták létrehozásához a gének upstream (5' flank) és downstream (3' flank) régióit PCR segítségével, a CLIB 214 vad típusú törzs totál DNS-ét felhasználva felszaporítottuk. Továbbá az ún.: HIS/LEU marker géneket (*cdHIS1* és *cmLEU2*) amplifikáltuk a megfelelő plazmid (pSN52 és pSN40) DNS alkalmazásával, az adott génre specifikus jelölő szekvenciákat hordozó és univerzális primerek segítségével. A fúziós konstrukciókat a felszaporított flank régiók és valamelyik marker gén felhasználásával, a megfelelő primerek segítségével PCR reakció során összeépítettük. Minden gén esetében két fúziós konstrukciót készítettünk. A fúziós kazettával a *C. parapsilosis* CLIB 214 $\Delta his1/\Delta his1/\Delta leu2/\Delta leu2$ dupla auxotróf törzsből készített kémiai kompetens *Candida* sejteket transzformáltuk. A transzformánsokat kolónia PCR segítségével ellenőriztük. Minden esetben 2 független heterozigóta (hisztidin auxotróf) és két független homozigóta mutáns törzset állítottunk elő.

A transzformációk során minden gén esetében sikerült a heterozigóta mutánsok előállítása, valamint a *Cp OLE1* gén kivételével a homozigóta deléciós törzsek előállítása. Mivel már korábban bizonyították a *CpOLE1* gén esszenciális voltát, létrehoztak és jellemezték egy *CpOLE1* homozigóta deléciós mutáns törzset és bizonyították annak $\Delta 9$ deszaturáz aktivitását (Nguyen és mtsi. 2011b), a továbbiakban nem végeztünk ezzel a törzssel kísérleteket.

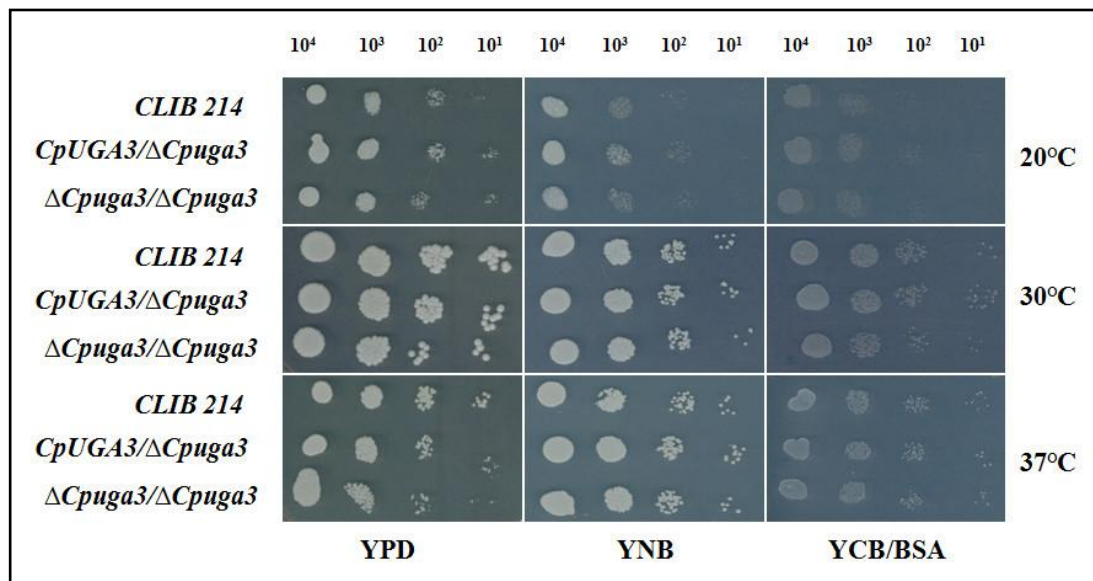
6.9. A *CpUGA3*, *CPAR2_703920*, *CPAR2_108490* és *CpSOU2* deléciós mutáns törzsek fiziológiai vizsgálatai

Annak érdekében, hogy megtudjuk történt-e változás az előállított mutáns törzsek életképességében, megvizsgáltuk azok növekedési képességét különböző táptalajokon, stresszorok hatására és eltérő hőmérsékleti körülmények között, valamint vizsgáltuk a mutáns törzsek pH függését és FBS bontási képességét. Mivel nem tapasztaltunk eltérést a mutánsok

életképességében a különböző körülmények között, ezért csak a *CpUGA3* mutánon keresztül szemléltetem a kísérleti eredményeket.

6.9.1. A deléciós mutáns törzsek növekedési vizsgálata különböző táptalajon és hőmérsékleten a *CpUGA3* heterozigóta és homozigóta mutáns törzseken bemutatva

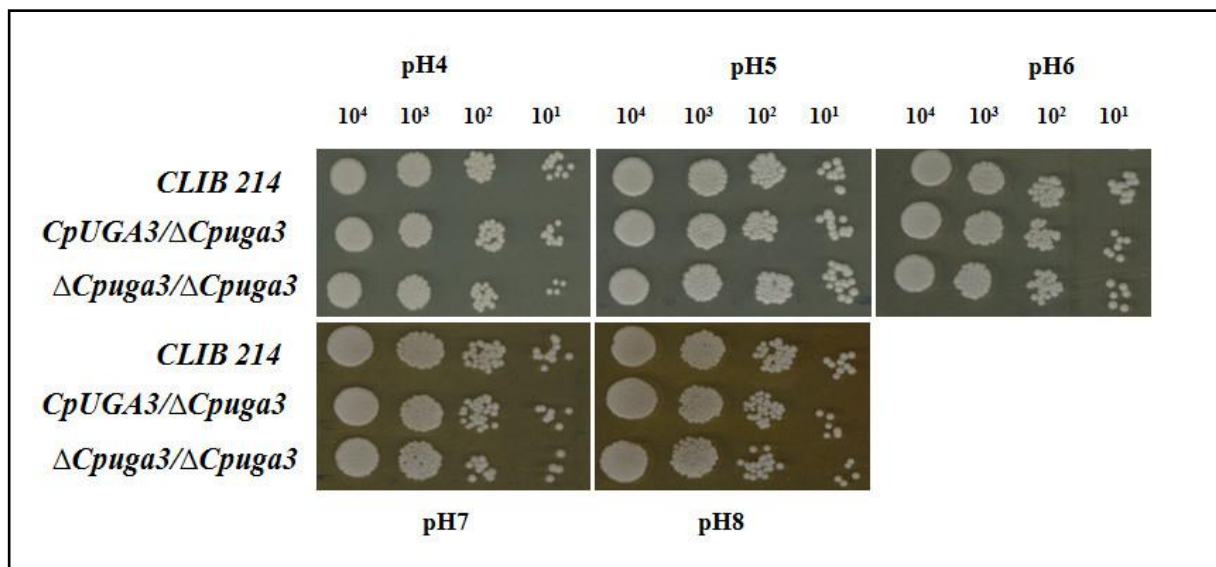
A különböző hőmérsékletre és szénforrásokhoz való alkalmazkodás fontos virulenciafaktor lehet a gazda-patogén interakciók során. A gazdakörnyezethez való alkalmazkodásban az eltérő körülmények közötti növekedési képesség fontos szerepet játszhat (Rosa e Silva és mtsi. 2008, Biswas és mtsi. 2007). Elvégeztük a növekedési kísérleteket a deléciós mutáns törzsekkel, valamint a CLIB214 vad típusú törzssel, ahogyan azt a korábban bemutatott *CpOLE2* mutáns törzs esetén is tettük. Vizsgáltuk a mutáns törzsek különböző hőmérsékleten és táptalajon való növekedési képességét (minimál táptalaj és BSA-t egyedüli nitrogén- és szénforrásként tartalmazó táptalajok), összehasonlítva a CLIB214 vad típusú törzssel (28. ábra). A *CpUGA3* törzsön bemutatva az eredményeket, sem a különböző hőmérsékleteken, sem a különböző táptalajokon nem tapasztaltunk eltérést a mutáns törzsek növekedési, illetve tápanyag-felhasználási képességében a vad típusú CLIB214 törzshöz képest. Eredményeink alapján elmondható, hogy a *CpUGA3*, *CPAR2_703920*, *CPAR2_108490* és *CpSOU2* gének nem játszanak szerepet a gazdakörnyezetben történő, megváltozott hőmérsékleti körülményekhez és szénforráshoz való alkalmazkodásban.



28. ábra. A CLIB214 vad típusú, *CpUGA3/ΔCpuga3* heterozigóta és $\Delta Cpuga3/\Delta Cpuga3$ homozigóta mutáns törzsek növekedése különböző koncentrációkban kicsepegtetve, 20, 30 és 37°C-on, YPD, YNB, valamint YCB/BSA táptalajokon.

6.9.2. A mutáns törzsek növekedési vizsgálata különböző pH-n a *CpUGA3* heterozigóta és homozigóta mutáns törzseken bemutatva

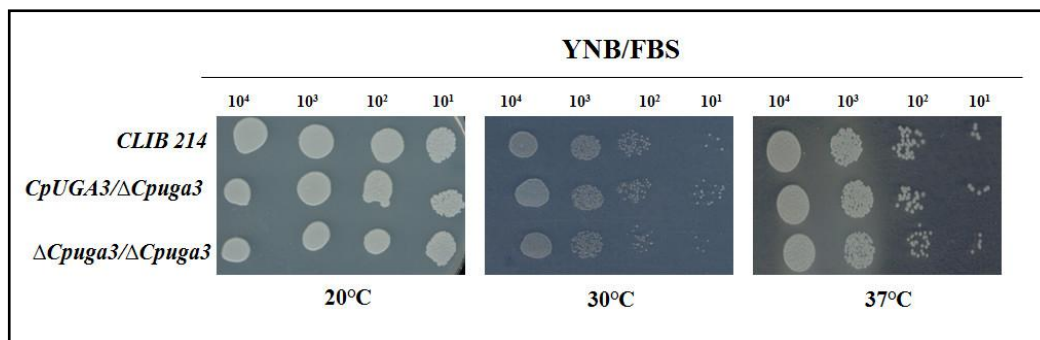
Annak érdekében, hogy megtudjuk, hogy a *CpUGA3*, CPAR2_703920, CPAR2_108490 és *CpSOU2* gének szerepet játszanak-e a megváltozott pH-jú környezethez való alkalmazkodásban, megvizsgáltuk a mutáns törzsek különböző pH-jú táptalajokon való növekedését is, összehasonlítva a CLIB214 vad típusú törzsszel. Az eredményeket szintén a *CpUGA3* törzsön mutatom be, mivel ez esetben sem találtunk eltérést a különböző körülmények között nevelt mutáns törzsek és a CLIB214 vad típusú törzs növekedési képességeiben (29. ábra). A vizsgálataink alapján egyik gén sem vesz részt a különböző pH-jú tápközegekhez történő alkalmazkodásban.



29. ábra. A CLIB214 vad típusú, *CpUGA3/ΔCpuga3* heterozigóta és $\Delta C p u g a 3 / \Delta C p u g a 3$ homozigóta mutáns törzsek növekedése különböző koncentrációkban kicsepegtetve különböző pH-jú táptalajokon nevelve.

6.9.3. A mutáns törzsek FBS bontási képessége a *CpUGA3* heterozigóta és homozigóta mutáns törzseken bemutatva

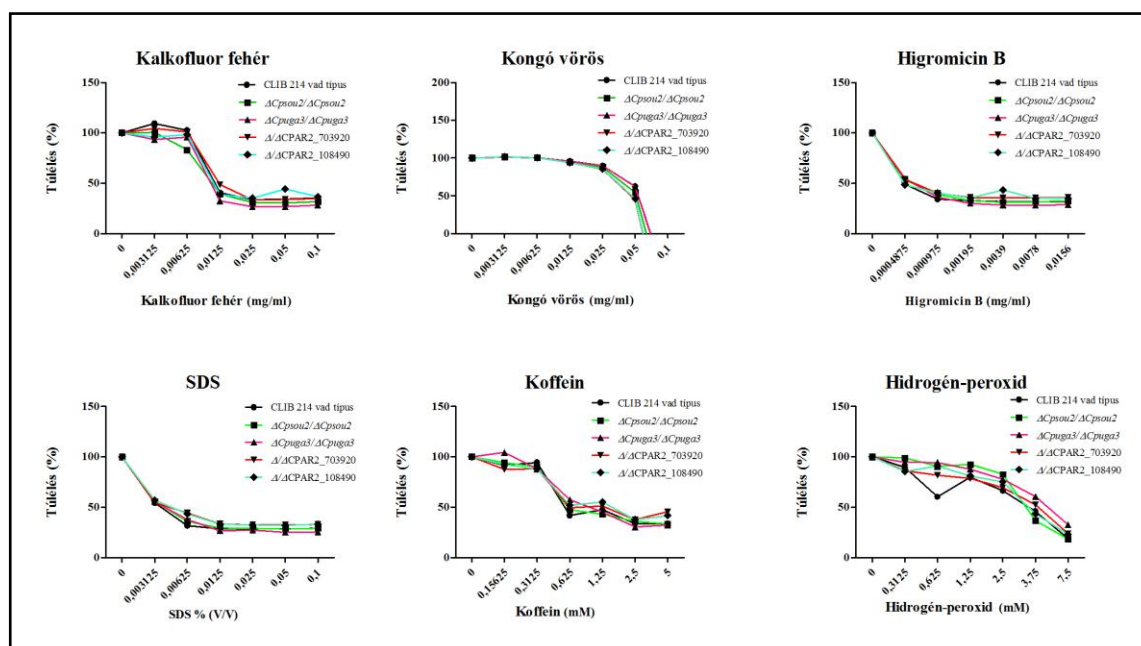
A mutáns törzsek FBS bontási képességét is megvizsgáltuk, annak érdekében, hogy megvizsgáljuk, a gének szerepet játszanak-e a szérumfehérjék bontásában. A 30. ábrán látható, hogy a *CpUGA3* törzs FBS bontási képességében nem volt tapasztalható változás, összehasonlítva a vad típusú törzsszel. Hasonló eredményt kaptunk a többi deléziós mutáns vizsgálatakor is, amiből megállapítható, hogy a *CpUGA3*, CPAR2_703920, CPAR2_108490 és *CpSOU2* gének nem vesznek részt extracelluláris fehérjebontási folyamatokban.



30. ábra. A CLIB214 vad típusú, *CpUGA3/ΔCpuga3* heterozigóta és $\Delta Cpuga3/\Delta Cpuga3$ homozigóta mutáns törzsek FBS bontási képessége különböző koncentrációkban kicsepegtetve.

6.9.4. A *CpUGA3*, CPAR2_703920, CPAR2_108490 és *CpSOU2* deléciós mutáns törzsek növekedése különböző stresszorokat tartalmazó tápközegben

Megvizsgáltuk a *CpUGA3*, CPAR2_703920, CPAR2_108490 és *CpSOU2* homozigóta mutáns törzsek növekedési képességeit különböző sejtfalkárosító (kalkoflor fehér, kongó vörös, SDS, koffein) (Heilmann és mtsi. 2013, Calvo és mtsi. 2009) és oxidatív stresszorzal (hidrogén-peroxid) (Cuellar-Cruz és mtsi. 2008) kiegészített tápoldatokban, valamint egy fehérjesszintézis-gátló antibiotikumot (higromicin B) tartalmazó tápoldatban. A törzsek növekedési képességét 16 óra elteltével vizsgáltuk a tápközeg optikai denzitása alapján (31. ábra).



31. ábra. A *CpUGA3*, CPAR2_703920, CPAR2_108490 és *CpSOU2* homozigóta deléciós mutáns törzsek és a CLIB214 vad típusú törzs növekedési képessége különböző koncentrációjú kalkoflor fehér, kongó vörös, higromicin B, SDS, koffein, valamint hidrogén-peroxid hatására 16 óra inkubáció után.

A 31. ábrán jól látható, hogy a deléciós mutáns törzsek és a CLIB214 vad típusú törzs stresszorokkal befolyásolt növekedési képességei között nem tapasztalható jelentős különbség. A *CpUGA3*, *CPAR2_703920*, *CPAR2_108490* és *CpSOU2* gének ezek alapján nem játszanak szerepet sem a sejtfalkárosító, sem pedig az oxidatív stressz ágensekkel szemben mutatott tűrőképességben, amely stresszkörülmények a gazda-patógén kölcsönhatások során kialakulhatnak a gazdakörnyezetben (Jimenez-Lopez és Lorenz 2013, Heilmann és mtsi. 2013).

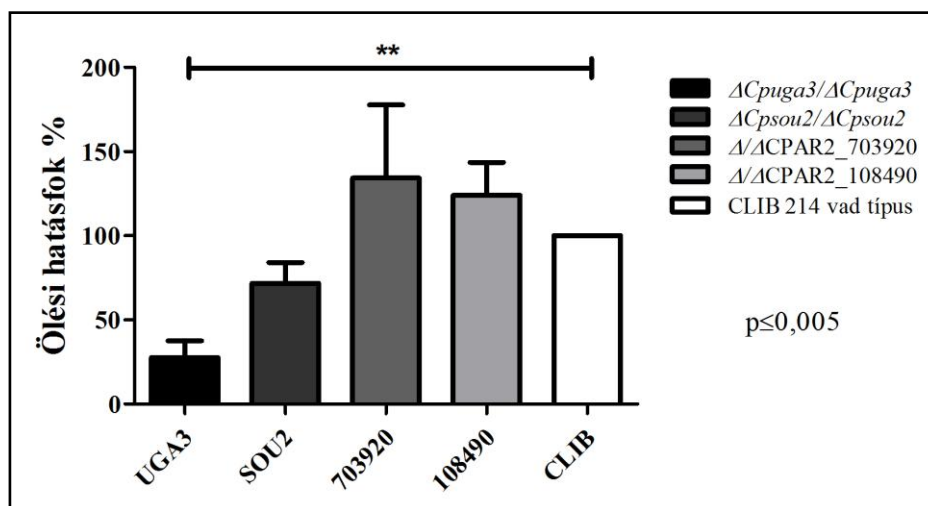
Összességében elmondhatjuk, hogy a fiziológiai tulajdonságaikat tekintve, a *CpUGA3*, *CPAR2_703920*, *CPAR2_108490* és *CpSOU2* deléciós mutáns törzsek nem mutattak változást a vad típusú CLIB214 törzshöz képest.

6.10. A *CpUGA3*, *CPAR2_703920*, *CPAR2_108490* és *CpSOU2* deléciós mutáns törzsek virulencia vizsgálatai

Mivel a microarray vizsgálat során azonosított génekre deletált törzsek növekedési képességében és stressztűrő képességében nem találtunk eltérést a vad típusú CLIB214 törzshöz képest, megvizsgáltuk, hogy változott-e a törzsek *in vitro* és *in vivo* virulenciája a deléció hatására.

6.10.1. A mutáns törzsekkel végzett ölési kísérletek humán PBMC-DM sejtek felhasználásával

A korábbiakban leírtak szerint, *in vitro* fertőzés során vizsgáltuk, hogy a humán PBMC-DM sejtek hogyan képesek eliminálni a *CpUGA3*, *CpSOU2*, *CPAR2_703920* és *CPAR2_108490* deléciós mutáns törzseket a vad típusú CLIB214 törzssel összehasonlítva. A kapott értékeket a CLIB214 vad típusnál kapott adatokra (100%) normalizáltuk, amely eredményeket a 32. ábra mutatja be.



32. ábra. PBMC-DM sejtek *CpUGA3*, *CpSOU2*, CPAR2_703920 és CPAR2_108490 homozigóta mutáns törzsekkel szembeni ölési hatékonysága, százalékosan feltüntetve, a CLIB214 vad típusú törzshöz viszonyítva.

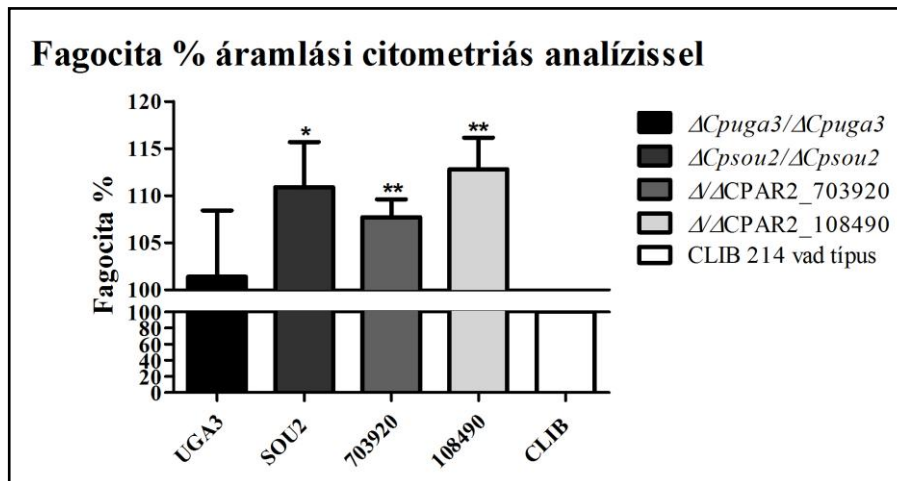
Az eredményeket minden donor esetében a vad típusú törzs általi ölési hatékonyságra (100%) normalizáltuk. Az oszlopokon feltüntetett szórások 4 donortól származó PBMC-DM sejteken mért eredmények. **: szignifikancia, értéke: $p \leq 0,005$.

Eredményeink alapján mind a *CpUGA3*, mind a *CpSOU2* deléciós mutáns törzset kisebb hatékonysággal voltak képesek eliminálni a makrofágok a CLIB214 törzshöz képest. Ez a különbség a *CpUGA3* mutáns törzs esetében szignifikánsnak bizonyult, amely alapján elmondható, hogy az *uga3* transzkripciós faktor hiányában a *C. parapsilosis* virulenciája fokozódik. Ez a megfigyelés nem feltétlenül ellentétes a *C. albicans* esetében tapasztaltakkal, miszerint *in vivo* egérfertőzéses modellben, ahol 10 transzkripciós faktor mutáns törzssel fertőztek („pool” fertőzés) a *CaUGA3* deléciós mutáns törzs hipo-kolonizációs fenotípust mutatott (Vandeputte és mtsi. 2011). Ez a fenotípus azonban a többi 9 transzkripciós faktor mutáns törzs által befolyásolt fenotípus. A CPAR2_703920 és CPAR2_108490 mutáns törzsek esetében a PBMC-DM sejtek ölési hatékonysága magasabbnak bizonyult a vad típusú CLIB214 törzshöz képest, azonban ez a különbség nem bizonyult szignifikánsnak.

6.10.2. Fagocitózis vizsgálata áramlási citometriával (FACS)

A PBMC-DM sejtek ölési hatékonyságát vizsgáló kísérletek elvégzése után megvizsgáltuk a makrofágok fagocitáló képességét a *CpUGA3*, *CpSOU2*, CPAR2_703920 és CPAR2_108490 deléciós mutáns törzsekkel szemben. A kísérletekhez Alexa Fluor 647 festékkel jelölt élesztősejtekkel fertőztük a makrofágokat 1:5 gazda: patogén arányban és 3

óra múlva vizsgáltuk a fagocitáló képességet. A nyers adatokat Flowing Software 2.5 kiértékelő szoftverrel elemeztük. Eredményeinket a 33. ábra mutatja be.



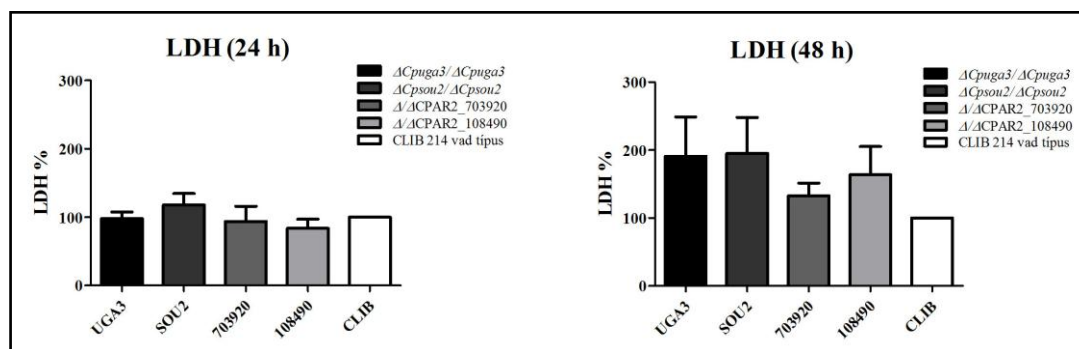
33. ábra. PBMC-DM sejtek CLIB214 vad típusú, *CpUGA3*, *CpSOU2*, CPAR2_703920 és CPAR2_108490 homozigóta mutáns törzsekkel való fertőzéséből származó fagocita százalék értékek, minden esetben a vad típusra (CLIB214) normalizálva (100%).

Az oszlopokon feltüntetett szórások 4 donortól származó PBMC-DM sejteken mért eredmények. *: szignifikancia, értéke: $p \leq 0,05$; **: szignifikancia, értéke: $p \leq 0,005$.

Az áramlási citometriás analízis segítségével mért fagocita százalék értékek a *CpUGA3* mutáns törzs kivételével, minden mutáns esetében csekély mértékben, de szignifikánsan magasabbnak bizonyultak a CLIB214 vad típusú törzshöz képest. Ez a *CpSOU2*, CPAR2_703920 és CPAR2_108490 deléciós törzsek csökkent virulenciájára utal. A *CpUGA3* mutáns esetében nem mutatkozott magasabb fagocita aktiváció, ami megerősíti az ölési kísérleteknél tapasztalt kisebb ölési hatékonyságot.

6.10.3. A *CpUGA3*, CPAR2_703920, CPAR2_108490 és *CpSOU2* deléciós mutáns törzsek PBMC-DM sejteket károsító hatásának vizsgálata

Az *in vitro* fertőzések során megvizsgáltuk a különböző törzseink PBMC-DM sejteket károsító hatását. A károsító hatás mértékének megállapítását LDH teszttel végeztük. A mérések során a fertőzést a korábbiakban leírtak szerint, 6 donortól származó PBMC-DM sejteken végeztük. A sejtmentes felülúszókban mértük a relatív LDH értékeket, majd az eredményeket a CLIB214 vad típusú törzsre (100%) normalizáltuk (34. ábra).



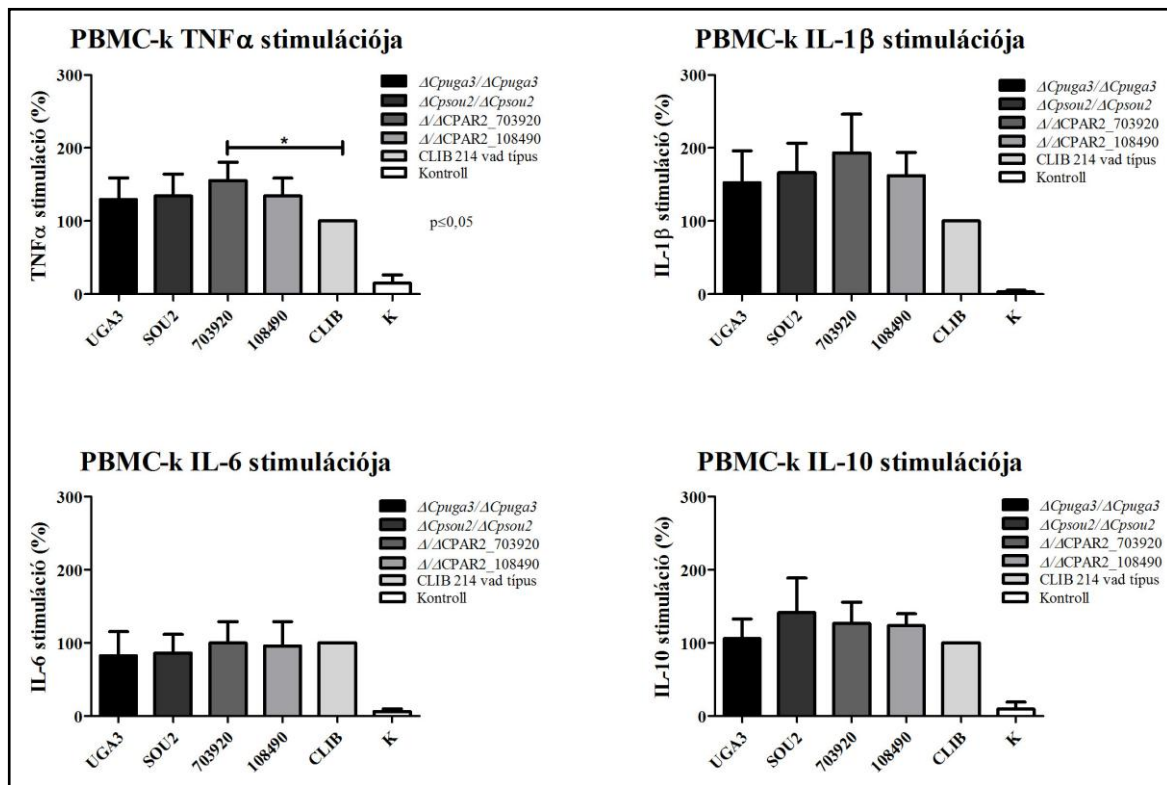
34. ábra. CLIB214 vad típusú és *CpUGA3*, *CpSOU2*, *CPAR2_703920* és *CPAR2_108490* homozigóta mutáns törzsekkel fertőzött PBMC-DM sejtek felülúszójából mért relatív LDH mennyiség %-os értéke a CLIB214 törzsre vonatkoztatva, 24 és 48 óra inkubáció után.

Az eredményeket minden donor esetében a vad típusú törzs általi gazdasejt károsító hatásra (100%) normalizáltuk. Az oszlopokon feltüntetett szórások 4 donortól származó PBMC-DM sejteken mért eredmények.

Méréseink alapján 24 óra elteltével nem tapasztaltunk különbséget a deléciós törzsek PBMC-DM sejteket károsító hatásában, összehasonlítva a CLIB214 vad típusú törzsszel. 48 órás együtt-inkubálás után azonban a deléciós mutáns törzseink, főként a *CpUGA3* és *CpSOU2* mutáns törzsek, nagyobb hatékonysággal károsították a makrofág sejteket, mint a CLIB214 vad típusú törzs, habár ez a különbség statisztikailag nem volt szignifikáns.

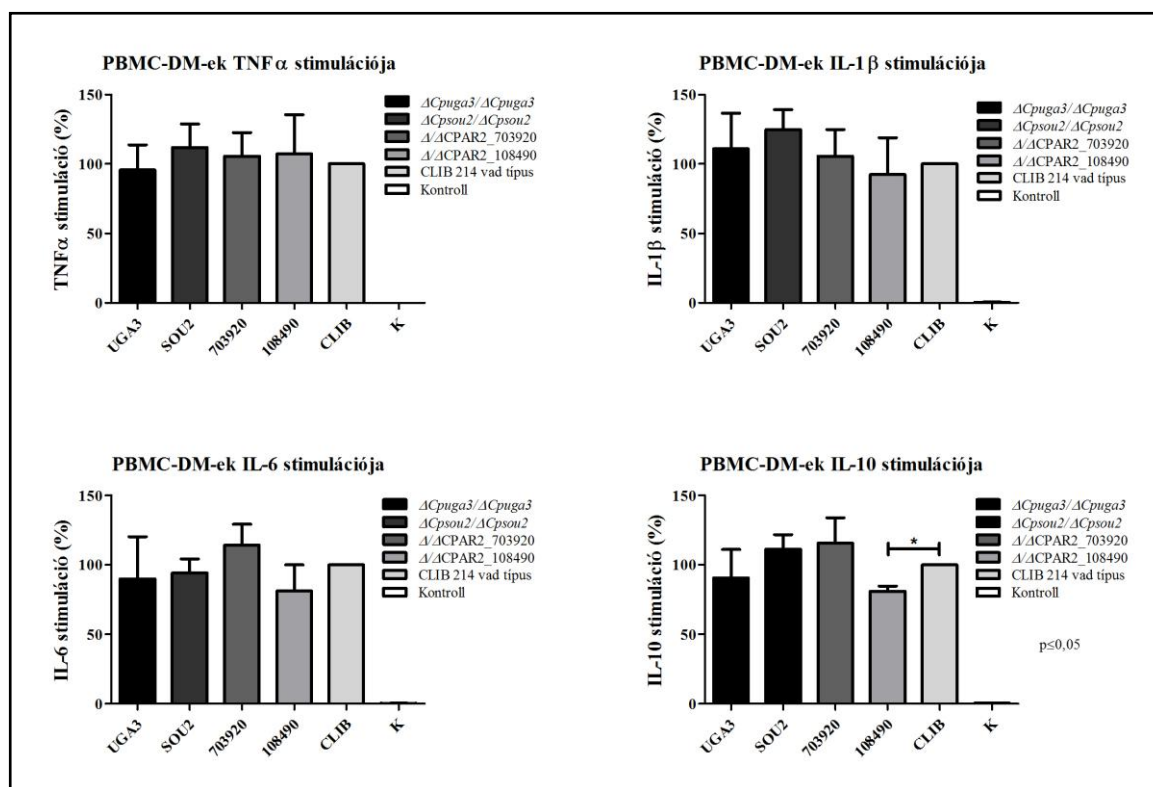
6.10.4. A *CpUGA3*, *CPAR2_703920*, *CPAR2_108490* és *CpSOU2* deléciós mutáns törzsek pro- és anti-inflammatorikus citokintermelést stimuláló hatásának vizsgálata PBMC és PBMC-DM sejteken

A pro- és anti-inflammatorikus citokinek aránya meghatározó a gazda immunválaszában, ezért megvizsgáltuk a *CpUGA3*, *CpSOU2*, *CPAR2_703920* és *CPAR2_108490* deléciós törzsek citokintermelést stimuláló hatását PBMC és PBMC-DM sejteken, összehasonlítva a CLIB214 vad típusú törzs általi stimulációval. A korábbiakban leírtak szerint fertőztük a PBMC és a PBMC-DM sejteket a deléciós, valamint a vad típusú élesztő törzsekkel. A sejtmentes felülúszókból ELISA segítségével mértük a termelődött citokinek mennyiségét. Minden donor esetében a vad típusú törzs által stimulált mennyiségekre (100%) normalizáltuk a kapott eredményeket, elkerülve ezzel az eltérő donorok miatt adódó különbségeket. A PBMC sejtek esetében 5 donoron (35. ábra), a PBMC-DM sejtek esetében pedig 3 donor felhasználásával végeztük a méréseket (36. ábra).



35. ábra. CLIB214 vad típusú, *CpUGA3*, *CpSOU2*, CPAR2_703920 és CPAR2_108490 homozigóta mutáns törzsek pro- (TNF α , IL-1 β és IL-6) és anti-inflammatorikus (IL-10) citokintermelést stimuláló hatása PBMC sejteken.

A mért citokin mennyiségeket minden donor esetében a vad típusú törzs által stimulált mennyiségekre (100%) normalizáltuk. K: nem indukált PBMC sejtek Az oszlopokon feltüntetett szórások 5 donortól származó PBMC sejteken mért eredmények. *: szignifikancia, értéke: $p \leq 0,05$.



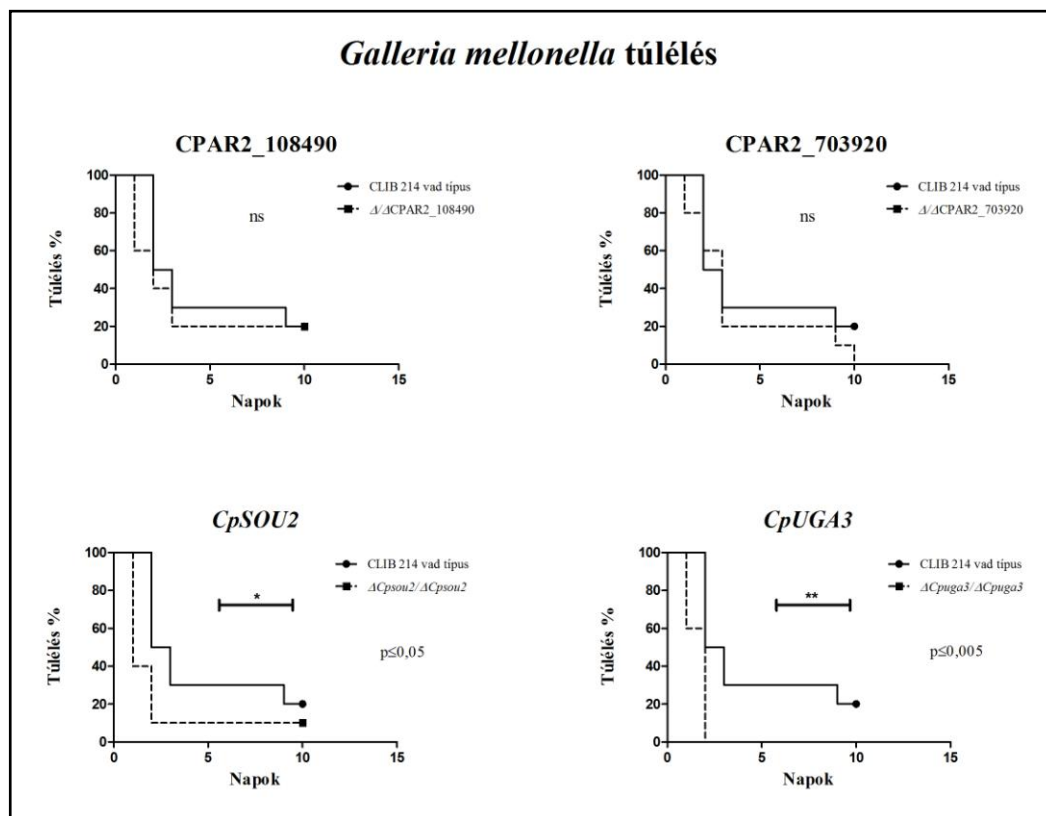
36. ábra. CLIB214 vad típusú, *CpUGA3*, *CpSOU2*, CPAR2_703920 és CPAR2_108490 homozigóta mutáns törzsek pro- (TNF α , IL-1 β és IL-6) és anti-inflammatorikus (IL-10) citokintermelést stimuláló hatása PBMC-DM sejteken.

A mért citokin mennyiségeket minden donor esetében a vad típusú törzs által stimulált mennyiségekre (100%) normalizáltuk. K: nem indukált PBMC-DM sejtek. Az oszlopokon feltüntetett szórások 3 donortól származó PBMC-DM sejteken mért eredmények. *: szignifikancia, értéke: $p \leq 0,05$.

A PBMC sejtek stimulációját követően a deléciós mutáns törzsek emelkedett pro-inflammatorikus citokintermelést indukáltak, összehasonlítva a CLIB214 vad típusú törzssel. Ez az emelkedett indukció azonban csak a CPAR2_703920 mutáns TNF α indukció esetében bizonyult szignifikánsnak, ami összefüggésbe hozható a korábban, a fagocitózis kísérletek során tapasztalt nagyobb mértékű makrofág aktivációval. A PBMC-DM sejtekkel végzett kísérletekben a deléciós mutáns törzsek nem mutattak kifejezett eltérést a citokintermelés indukálásában, összehasonlítva a CLIB214 vad típusú törzssel, csak a CPAR2_108490 mutáns esetében tapasztaltunk kissé csökkentést az anti-inflammatorikus IL-10 mennyiségében. A vizsgálatok alapján az *in vitro* ölési és fagocitózis kísérletek során megfigyelt deléciós fenotípusokkal nem hozható kapcsolatba a megváltozott citokintermelés.

6.10.5. Viaszmoly (*Galleria mellonella*) lárvák fertőzése *CpUGA3*, *CPAR2_703920*, *CPAR2_108490* és *CpSOU2* deléciós mutáns törzsekkel

A *Galleria mellonella* lárva modell segítségével *in vivo* fertőzéses modellünkben is megvizsgáltuk a *CpUGA3*, *CpSOU2*, *CPAR2_703920* és *CPAR2_108490* deléciós mutáns törzsek virulenciájában bekövetkező változásokat. A kísérleteket minden törzs esetében 10 lárva fertőzésével végeztük, valamint PBS-sel injektált és nem injektált kontrollokat használtunk. A lárvák túlélését 10 napon keresztül, naponta vizsgáltuk (37. ábra).



37. ábra. *Galleria mellonella* túlélés CLIB214 vad típusú és *CpUGA3*, *CpSOU2*, *CPAR2_703920*, valamint *CPAR2_108490* homozigóta mutáns törzssel való fertőzést követően a túlélési százalék bemutatásával. *: szignifikancia, értéke: $p \leq 0,05$; **: szignifikancia, értéke: $p \leq 0,005$; ns: nem szignifikáns.

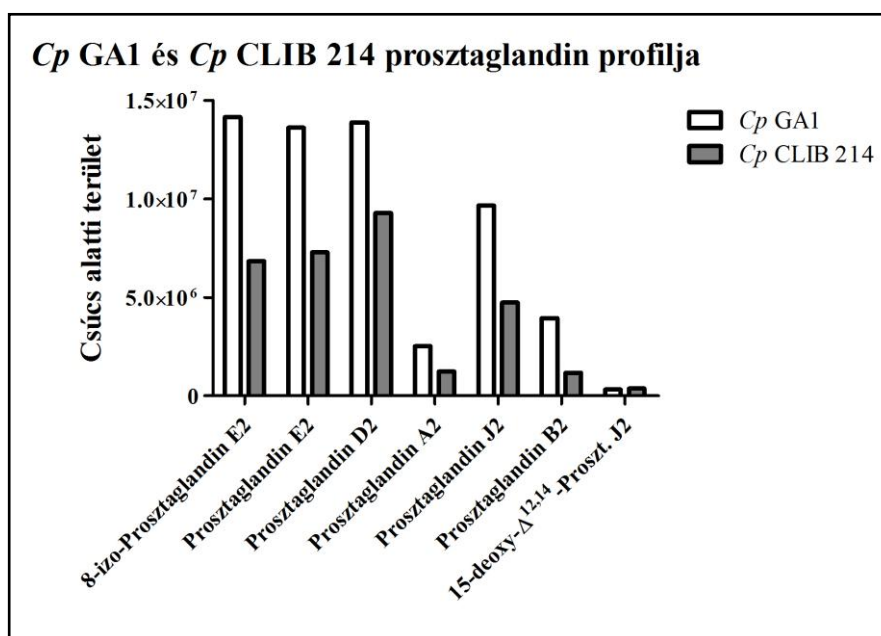
A *Galleria mellonella* lárvák túlélése alapján nem találtunk különbséget a *CPAR2_703920*, illetve a *CPAR2_108490* deléciós törzsek és a CLIB214 vad típusú törzs lárvákat károsító hatásában. A *CpUGA3* és *CpSOU2* mutáns törzsek esetében azonban szignifikáns különbségeket tapasztaltunk a lárvák túlélésében a vad típusú törzssel történő fertőzéshez képest. A *CpSOU2* deléciós mutáns törzssel történő fertőzés hatására a lárvák túlélése már a 3. napon 10%-ra csökkent, míg a vad típusú törzsnél a 10. napon még mindig

élt a lárvák 20%-a. A *CpUGA3* deléciós mutáns törzs esetében még drasztikusabb volt a különbség, mivel ez a törzs a 3. napra elpusztította a lárvák 100%-át. *In vivo* kísérleteink megerősítik az *in vitro* virulencia vizsgálatok eredményét, miszerint a *CpUGA3* mutáns törzs virulensebb fenotípust mutat a vad típusú törzshöz képest.

6.11. A *C. parapsilosis* CLIB214 és a *CpUGA3* deléciós mutáns proszttaglandin termelése

Mivel az AA a gomba proszttaglandin prekuzora és jelenlétében proszttaglandinok termelődését mutattuk ki *C. parapsilosis*-ban, ezért az AA-as indukciót követő microarray analízis során megváltozott expressziót mutató gének termékei feltételezhetően szerepet játszhatnak a proszttaglandin bioszintézisében. Ezért a továbbiakban elvégeztük a deléciós és a szülői törzsek proszttaglandin-termelésének vizsgálatát és összehasonlítását.

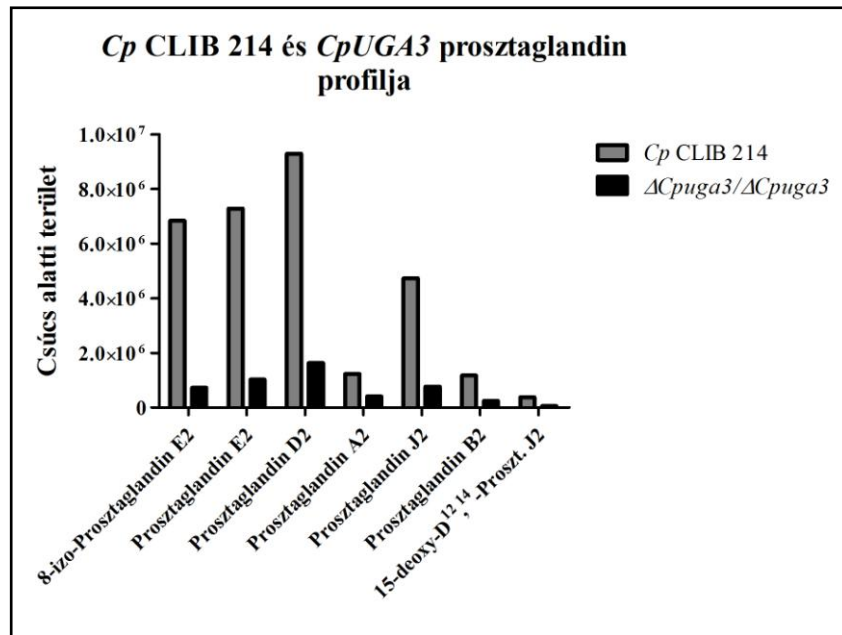
Mivel a deléciós mutáns törzseinket a CLIB214 törzsben állítottuk elő, ezért megvizsgáltuk ezen törzs proszttaglandin-profilját és összehasonlítottuk a GA1 törzsével HPLC-FLD analízis segítségével (38. ábra).



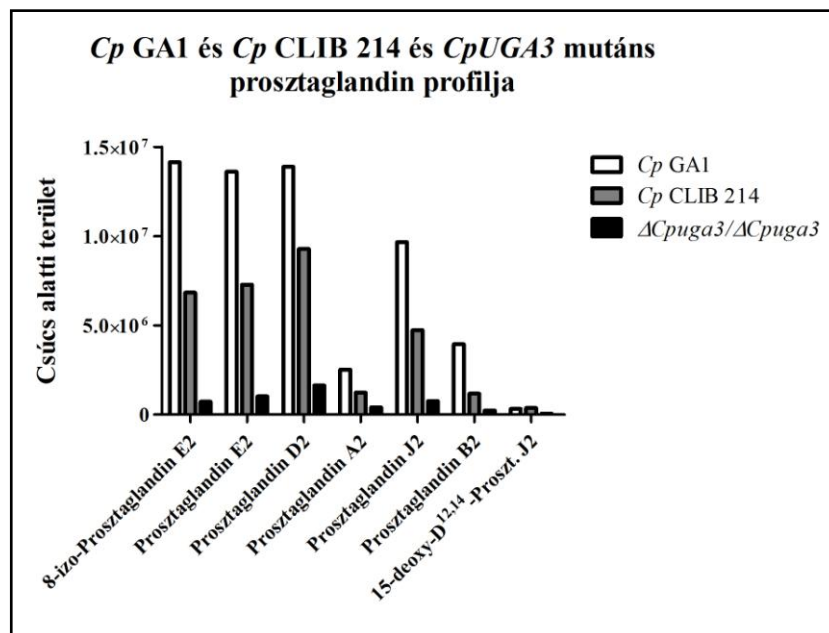
38. ábra. GA1 és CLIB214 vad típusú törzsek proszttaglandin-profilja HPLC-FLD analízissel.

A HPLC-FLD analízis segítségével megbizonyosodtunk arról, hogy a CLIB214 vad típusú törzs ugyan kevesebb mennyiségben, de hasonlóan a GA1 törzshöz képes a gomba proszttaglandinok termelésére.

Mivel a *CpUGA3* egy transzkripció faktorot kódol, ezért különösen érdekes volt számunkra az, hogy a deléciós törzsből milyen prosztoglandin termelődést tapasztalunk. A *CpUGA3* deléciós törzs és a CLIB214 vad típusú törzs prosztoglandin termelésének összehasonlítását a 39. ábra mutatja be.



39. ábra. A *CpUGA3* homozigóta deléciós mutáns törzs és a CLIB214 vad típusú törzs prosztoglandin-profilja HPLC-FLD analízissel.



40. ábra. A GA1 és a CLIB214 vad típusú törzsek és *CpUGA3* homozigóta deléciós mutáns törzs prosztoglandin-profilja HPLC-FLD analízissel.

A prosztaglandin-profilok vizsgálata alapján megállapítható, hogy a CLIB214 vad típusú törzs a GA1 vad típusú törzshöz hasonlóan képes gomba prosztaglandinok előállítására AA-as indukciót követően. Az eredmények alapján a *CpUGA3* gén prosztaglandin-bioszintézisben betöltött szerepét feltételezhetjük, mivel a *CpUGA3* deléciós mutáns törzs AA-as indukciót követő prosztaglandin-termelése lényegesen lecsökkent a vad típusú törzsekhez viszonyítva (40. ábra).

A patogén gombák által termelt gomba prosztaglandint az emlős prosztaglandin E-vel (PGE_2) azonos eikozanoidnak találták. A PGE_2 -t „Janus” (kétarcú) eikozanoidnak is nevezik, mivel célsejtől függően egyaránt részt vesz a pro- és az anti-inflammatorikus reakciók kialakításában is. A gazdaszervezet szempontjából nézve két főbb hatást különíthetünk el. Egyrészt gátolja az 1-es típusú helper-T sejt immunválaszt, azaz a fagocitózist és a limfocita proliferációt; másfelől pedig indukálja a 2-es típusú immunválaszt, azaz az immunglobulin E (IgE) termelést, valamint a szöveti eozinofília kialakulását. Tehát a gomba prosztaglandin a fertőzés során a gazda immunválaszt olyan irányba tolja el, hogy az mintegy elősegítse a gomba kolonizációját és biztosítsa a patogén tartós jelenlétét a gazdaszervezetben (Erb-Downward és Noverr 2007, Noverr és mtsi. 2001). A *CpUGA3* mutáns törzsnél tapasztalt virulencia változások magyarázata további vizsgálatokat igényel, amelyek jelenleg is folynak laborunkban. Továbbá a *CpSOU2*, *CPAR2_703920* és *CPAR2_108490* deléciós törzsek prosztaglandin termelés vizsgálatai is további kutatás tárgyát képezi laborunkban.

7. Összefoglalás

Mivel egyre növekszik a veszélyeztetett populációk köre, az elmúlt 20, 30 évben egyre nagyobb hangsúlyt kapnak a gombák általi megbetegedéseket okozó tényezőkre irányuló kutatások. A kórházi megbetegedések negyedik legfőbb okozóiként a *Candida* gombákat tartják számon. A *Candida* nemzetség számos humán patogén faja közül az opportunistá *C. parapsilosis* egyre nagyobb jelentőséggel bír a nosokomiális fertőzések során, köszönhetően annak, hogy képes horizontális terjedésre, kiváló adhézíós képességekkel bír, továbbá előzetes kolonizáció nélkül is képes fertőzés kialakítására. A *C. parapsilosis* a második leggyakrabban izolált *Candida* faj candidiázisok esetében, valamint egyes speciális betegcsoportok esetében még a *C. albicans*-nál is nagyobb az előfordulása. A *C. parapsilosis* fertőzések kialakulásához hozzájárulhatnak bizonyos rizikófaktorok, mint pl. az extrém magas glükóz-, illetve lipidtartalmú oldatok alkalmazása, protézisek és egyéb implantátumok alkalmazása vagy sebészeti (legtöbbször a gasztrointesztinális rendszert érintő) beavatkozások. A leginkább érintett célcsoportok az újszülöttek, szervtranszplantáltak és az idősek.

A *Candida* fertőzések patomechanizmusát számos virulenciafaktor határozza meg, amelyek közül a legjelentősebbek közé tartoznak a gazdasejteken történő kitapadás, a pszeudohifa- és biofilmképzés, valamint a hidrolitikus enzimek szekréciója. Annak ellenére, hogy intenzív kutatások folynak a gombák virulenciafaktorainak meghatározása érdekében, igen keveset tudunk ezekről a tényezőkről a *C. parapsilosis* esetében, jóllehet ezek a kutatások alapul szolgálhatnak a diagnózis, a kezelés és a lehetséges megelőzés hatékonyságának növelésében. Annak érdekében, hogy jobban megismerjük a gazda-patogén kölcsönhatásban szerepet játszó mechanizmusokat, célul tűztük ki a *C. parapsilosis* egy lehetséges virulenciafaktorának, a gomba eredetű bioaktív lipidek bioszintézis útvonalának vizsgálatát. A bioaktív lipidek egyik csoportja a prosztaglandinok (eikozanoidok, prosztanoidok), amelyek 20 szénatomos zsírsavakból szintetizálódó lipid komponensek. Emlősökben többnyire minden szövetben és szervben megtalálhatóak. A szervezetben autokrin és parakrin mediátorokként vannak jelen, amelyek közvetlenül az endotéliumra, vérlemezkékre és hízósejtekre fejtik ki hatásukat. A központi idegrendszer jelátvivői, valamint szerepet játszanak gyulladási folyamatokban és az immunitásban is. Emlősökben a prosztaglandinok bioszintézise két lépésből áll. A folyamat az eikozanoid-bioszintézis ciklooxygenációs útvonalán keresztül zajlik. Első lépésben AA-ból ciklooxygenázok jelenlétében (COX-1, COX-2) PGH₂ keletkezik, ezt követően ezen intermedierből a PGE₂ szintáz által katalizált PGE₂ szintetizálódik. Annak ellenére, hogy a gombáknál nem található

ciklooxigenáz homológ, néhány patogén faj képes a gazdától származó AA-ból gomba prosztaglandin előállítására. *C. albicans* esetében a zsírsav deszaturáz *ole2* enzimet potenciális kulcsfaktorként azonosították a prosztaglandin bioszintetikus folyamatban. A gomba prosztaglandin fontos szerepet játszhat a patogenezisben, a gazda prosztaglandin-függő immunválaszának modulálásával. Mivel *C. parapsilosis* esetében ezen bioszintetikus útvonalakat kevésbé tanulmányozták, célul tűztük ki: 1.) a *C. parapsilosis* prosztaglandin termelésének vizsgálatát; 2.) a *CpOLE2* gén *de novo* zsírsav-, illetve prosztaglandin-bioszintézisben betöltött szerepének vizsgálatát; 3.) további, a prosztaglandin-bioszintézisben szerepet játszó gének azonosítását és jellemzését.

Munkánk során AA-as indukciót követő HPLC analízis segítségével igazoltuk, hogy a *C. parapsilosis* sejtek képesek a *C. albicans*-hoz hasonló mennyiségű gomba prosztaglandin előállítására. A *C. parapsilosis*-ban azonosított feltételezett zsírsav deszaturáz (*CpOle2*) prosztaglandin-bioszintézisben játszott szerepének vizsgálata érdekében létrehoztuk a homozigóta *OLE2* deléciós törzset egy, a *Candida* fajokra optimalizált helyspecifikus rekombinázt alkalmazó génkiütési rendszer ismételt alkalmazásával. Megállapítottuk, hogy a mutáns törzs növekedési és stressztűrő képessége nem különbözik a vad típusú törzstől, azonban a deléción csökken a virulenciát okozott. Ezt követően HPLC-MS analízis segítségével megvizsgáltuk a PGE₂-höz hasonló gomba prosztaglandin termelést a vad típusú és a *CpOLE2* homozigóta deléciós törzsből AA-as indukciót követően. Az eredmények alapján a deléciós törzs prosztaglandin-termelése nem különbözik a vad típusú törzshöz képest, tehát elmondható, hogy a *CpOLE2* gén nem szükséges a *C. parapsilosis* prosztaglandin-bioszintézisében.

A *de novo* zsírsav-bioszintézis és ezáltal az útvonalban szerepet játszó gének fontos virulenciafaktorai lehetnek a *C. parapsilosis*-nak. A *CpOLE2* gént, mint ahogyan a *CaOLE2* gént is, a *S. cerevisiae* $\Delta 9$ deszaturáz *OLE1* génjével homológ gének azonosították. Annak érdekében, hogy a *CpOLE2* deléciós törzs *de novo* zsírsav-bioszintézisben betöltött szerepét felfedjük, gázkromatográfiás (GC) analízis segítségével megvizsgáltuk a mutáns törzs zsírsav-profilját és azt összehasonlítottuk a GA1 vad típusú törzs zsírsav-profiljával. Köszönhetően a zsírsav-profilban feldúsuló egyszerűen telítetlen zsírsavaknak, a *CpOLE2* gén termékének $\Delta 12$ deszaturáz aktivitását feltételezhetjük. Ezen eredmények egybevágóak a *C. albicans*-nál tapasztaltakkal, miszerint *CaOLE2* gén terméke nem volt képes komplementálni a *S. cerevisiae* $\Delta 9$ deszaturáz gén hiányát, azonban bizonyították a deszaturáz aktivitását.

Mivel a *CpOLE2* génről bebizonyosodott, hogy nem játszik szerepet a gomba prosztaglandin termelésében, célul tűztük ki a *C. parapsilosis* prosztaglandin-szerű molekulák bioszintetikus útvonalának felderítését. Ehhez AA-val indukált és nem indukált vad típusú törzs expressziós mintázatát hasonlítottuk össze microarray analízissel. Összesen öt gén esetében tapasztaltunk megváltozott expressziót. Azonosítottuk a *CpUGA3* gént, melynek ortológjai „cink ujj” DNS-kötő domént tartalmazó transzkripciós faktorok; a *CpSOU2* gént, melynek ortológjai sztereo-specifikus karbonil-reduktázok; a *CpOLE1* zsírsav deszaturáz gént (*de novo* zsírsav-bioszintézis esszenciális enzime) és további 2, ismeretlen funkciójú gént. A CPAR2_703920 gén ortológjai citokróm-c aktivitással rendelkeznek, míg a CPAR2_108490 gén ortológjai gomba típusú vakuólum elhelyezkedést mutatnak. Az azonosított, feltételezhetően a prosztaglandin-bioszintézisben szerepet játszó gének funkcionális vizsgálata érdekében deléciós mutánsokat hoztunk létre egy, a *C. parapsilosis*-ra optimalizált fúziós PCR technika alkalmazásával. Miután megállapítottuk, hogy a mutáns törzsek növekedési és stressztűrő képességüket tekintve nem különböznek a vad típusú törzstől, elvégeztük a mutáns törzsek virulencia vizsgálatait. A virulencia kísérletek során a CPAR2_703920 és a CPAR2_108490 deléciós törzsek nem mutattak jelentős virulencia változást. Figyelemre méltó azonban, hogy a *CpUGA3* és *CpSOU2* mutáns törzsek az *in vitro* ölési kísérletek, valamint az *in vivo* *Galleria mellonella* fertőzési kísérletek során hipervirulens fenotípust mutattak. A jelenség magyarázata további vizsgálatokat igényel, amelyek jelenleg is folynak laborunkban.

Mivel a *CpUGA3* egy transzkripciós faktort kódol, ezért különösen érdekes volt számunkra az, hogy a deléciós törzsben milyen prosztaglandin termelődést tapasztalunk. A *CpUGA3* deléciós törzs prosztaglandin-termelési képességének a CLIB214 vad típusú törzsszel történő összehasonlítása során bizonyítottuk a *CpUGA3* deléciós mutáns prosztaglandin-termelésének jelentős - egy nagyságrenddel történő - csökkenését, amely egyértelműen arra utal, hogy a *CpUga3* fehérje a prosztaglandin bioszintézis út egyik regulátora lehet.

Munkánk során bizonyítottuk, hogy a *C. parapsilosis* sejtek képesek exogén AA-ból gomba prosztaglandinok előállítására, amelyek fontos virulenciafaktorként játszhatnak szerepet a gomba patogenezisében. Megállapítottuk, hogy a *CpOLE2* gén nem játszik szerepet a prosztaglandin-bioszintézisben, ennek ellenére a mutáns törzsek csökkent virulenciát mutattak a vad típushoz képest. Ezt a virulenciacsökkenést kiválthatja a gomba *de novo* zsírsav-bioszintézisében bekövetkezett változás, ugyanis a mutáns törzs zsírsav-profiljában az egyszerűen telítetlen zsírsavak felhalmozódását

figyeltük meg. Ez a tény a *CpOLE2* gén $\Delta 12$ deszaturáz aktivitására utal. További 5 gént azonosítottunk AA-as indukciót követő microarray analízis segítségével, melyeknek feltételezhetően szerepük van a gomba prosztaglandin bioszintézisében. Az ötből négy gén esetében homozigóta deléciós mutáns törzseket hoztunk létre. A mutáns törzsek esetében nem tapasztaltunk jelentős virulencia változást. Ennek ellenére a *CpUGA3* és *CpSOU2* mutáns törzsek esetében az *in vitro* ölési kísérletek, valamint az *in vivo* *Galleria mellonella* túlélési kísérletek során hipervirulens fenotípust mutattunk ki. A *CpUGA3* transzkripció faktor deléciós törzs AA-as indukciót követő prosztaglandin-termelés vizsgálata alapján feltételezzük a *CpUGA3* gén prosztaglandin-bioszintézisben betöltött szerepét. A *CpUGA3* deléciós mutáns egy nagyságrenddel kevesebb gomba prosztaglandin termelésére volt képes a vad típusú törzsekhez viszonyítva.

8. Summary

C. parapsilosis is an opportunistic human pathogen that can colonize and cause disease in immunocompromised patients (with AIDS, organ transplantation etc.) or in particular patient groups such as neonates or elders. *C. parapsilosis* is the second most commonly isolated *Candida* species from blood cultures, and it even outranks *C. albicans* in some European, Asian and South American hospitals.

Despite the increasing clinical prevalence, little is known about the virulence factors of *C. parapsilosis*. Thus, in our recent study, we investigated the biosynthetic pathway of fungal prostaglandins, a putative virulence factor of *C. parapsilosis*. Prostaglandins are fatty acid metabolites build up of 20 carbon atoms. Mammals produce immune response regulator prostaglandins from arachidonic acid by the contribution of COX1 and COX2 cyclooxygenases. Although fungi do not possess cyclooxygenase homologs, several pathogenic species are able to produce prostaglandins from host originated arachidonic acids. In case of *C. albicans* the fatty acid desaturase homolog Ole2 and the multicopper oxidase homolog Fet3 enzymes were identified as potential key factors of the prostaglandin biosynthetic process. Due to the ability of prostaglandins to block Th1-type and promote Th2-type immune response, fungal prostaglandin E₂ (PGE₂) can shift the host's immune response towards promoting the fungi to colonize and carry out chronic inflammation. In our recent study we investigated the role of the putative $\Delta 9$ fatty acid desaturase CpOle2 in the *de novo* fatty acid and prostaglandin biosynthesis of the emerging human pathogen *C. parapsilosis*. We generated a homozygous *CpOLE2* deletion mutant through repeated application of a caSAT1 flipper KO cassette. We characterized the pseudohyphae formation, FBS utilization ability and growth ability on different pH and temperature of the *CpOLE2* deletion mutant compared to that of the wild type strain. The mutant strain was found to show the same characteristics as the wild type. According to the *in vitro* virulence assays the *CpOLE2* deletion mutant showed slightly reduced virulence compared to the wild type strain. We characterized the prostaglandin profile of *C. parapsilosis* with HPLC-MS analysis and compared to that of *C. albicans*. We revealed that *C. parapsilosis* can produce fungal prostaglandins, similarly to *C. albicans*, from supplemented arachidonic acid (AA). Wild type-like PGE₂ production was detected in *CpOLE2* deletion mutant, which indicates that the *CpOLE2* gene does not participate in the *C. parapsilosis* prostaglandin biosynthesis. Overall fatty acid production study by gas chromatography (GC) highlighted the accumulation of mono-unsaturated fatty acids in the *CpOLE2* deletion mutant, which indicates the $\Delta 12$ -

desaturase activity of CpOle2. This finding correlates with the results in *C. albicans*, where *CaOLE2* gene was not able to complement the absence of *S. cerevisiae* $\Delta 9$ -desaturase gene, but the desaturase activity was confirmed.

In order to identify genes that can participate in the *C. parapsilosis* prostaglandin biosynthesis, we carried out a microarray analysis on the wild type strain after AA treatment. According to the microarray data we found 5 genes that showed upregulation in response to the AA treatment. Notably, one of the up-regulated genes was the homologue of *UGA3*, a putative transcription factor with zinc cluster DNA-binding motif, which has been shown to be required for utilization of gamma-aminobutyrate (GABA) as a nitrogen source. We also found *SOU2* gene, which has orthologues with stereo-specific carbonyl-reductase activity and *OLE1*, the fatty acid desaturase gene as a potential member of the *C. parapsilosis* specific prostaglandin biosynthetic pathway. A previous work on *CpOLE1* gene proved its essential role in the *de novo* fatty acid synthesis of *C. parapsilosis*. The remaining two genes we have identified were putative genes, CPAR2_108490 and CPAR2_703920. The latter one has orthologues with cytochrome-c activity. In order to determine whether these genes participate in the prostaglandin biosynthetic pathway, we used reverse genetics and knocked out these genes using the fusion PCR technique. After obtaining mutant strains, we characterized their FBS utilization ability and growth ability on different pH and temperature. We found no difference in comparison to that of the wild type strain. We carried out different virulence assays and found that the deletion mutant strains have slightly different virulence abilities than the wild type strain. Interestingly, the *CpUGA3* and *CpSOU2* deletion mutant strains showed hyper-virulent phenotype in *in vitro* killing and *in vivo* *Galleria mellonella* survival assays. As the *CpUGA3* is a transcription factor gene, it might be the first step of the prostaglandin biosynthetic pathway, therefore we analyzed the prostaglandin production of the *CpUGA3* deletion mutant strain by HPLC-FLD and compared it to that of the wild type. Notably, we found an explicit reduction in the prostaglandin production of the mutant strain, which suggests the role of the UGA3 protein in the prostaglandin biosynthetic pathway.

In this recent work we demonstrated that *C. parapsilosis* produces fungal prostaglandins, similarly to *C. albicans*, from the exogenic AA. In order to investigate this pathway we generated a deletion mutant strain of the *CpOLE2*, a putative $\Delta 9$ fatty acid desaturase. We revealed that the *CpOLE2* gene does not participate in the fungal prostaglandin production. On the other hand the fatty acid profile analysis may suggest a $\Delta 12$ -, rather than a $\Delta 9$ -desaturase activity of the CpOle2. In order to identify other

genes that can participate in the prostaglandin biosynthetic pathway, we carried out a microarray analysis after AA treatment. We identified 5 over-expressed genes, one with a transcription factor activity (*CpUGA3*). In order to determine whether these genes participate in the prostaglandin biosynthetic pathway, we knocked out these genes using the fusion PCR technique. By the analysis of the prostaglandin production in the *CpUGA3* deletion mutant, we found a strongly reduced prostaglandin production in comparison with that of the wild type strain. These results suggest that the *CpUGA3* transcription factor plays significant role in the *C. parapsilosis* prostaglandin biosynthetic pathway.

9. Irodalomjegyzék

- Almirante, B., Rodriguez, D., Cuenca-Estrella, M., Almela, M., Sanchez, F., Ayats, J., Alonso-Tarres, C., Rodriguez-Tudela, J.L., and Pahissa, A. (2006). Epidemiology, risk factors, and prognosis of *Candida parapsilosis* bloodstream infections: case-control population-based surveillance study of patients in Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. J Clin Microbiol 44, 1681-1685.
- Asencio, M.A., Garduno, E., Perez-Giraldo, C., Blanco, M.T., Hurtado, C., and Gomez-Garcia, A.C. (2005). Exposure to therapeutic concentrations of ritonavir, but not saquinavir, reduces secreted aspartyl proteinase of *Candida parapsilosis*. Chemotherapy 51, 252-255.
- Ashford, B.K. (1928). Certain Conditions of the Gastro-Intestinal Tract in Porto Rico and Their Relation to Tropical Sprue. Am J Trop Med Hyg 1-8:507-538
- Baillie, G.S., and Douglas, L.J. (1999). Role of dimorphism in the development of *Candida albicans* biofilms. J Med Microbiol 48, 671-679.
- Ballot, D.E., Bosman, N., Nana, T., Ramdin, T., and Cooper, P.A. (2013). Background changing patterns of neonatal fungal sepsis in a developing country. J Trop Pediatr 59, 460-464.
- Barrett-Bee, K., Hayes, Y., Wilson, R.G., and Ryley, J.F. (1985). A comparison of phospholipase activity, cellular adherence and pathogenicity of yeasts. J Gen Microbiol 131, 1217-1221.
- Bennett, R.J. (2010). Coming of age--sexual reproduction in *Candida* species. PLoS Pathog 6, e1001155.
- Betz, M., and Fox, B.S. (1991). Prostaglandin E2 inhibits production of Th1 lymphokines but not of Th2 lymphokines. J Immunol 146, 108-113.
- Bezerra-Bussoli, C., Baffi, M.A., Gomes, E., and Da-Silva, R. (2013). Yeast diversity isolated from grape musts during spontaneous fermentation from a Brazilian winery. Curr Microbiol 67, 356-361.
- Biswas, S., Van Dijck, P., and Datta, A. (2007). Environmental sensing and signal transduction pathways regulating morphopathogenic determinants of *Candida albicans*. Microbiol Mol Biol Rev 71, 348-376.
- Bloomfield, D.K., and Bloch, K. (1960). The formation of delta 9-unsaturated fatty acids. J Biol Chem 235, 337-345.
- Breyer, R.M., Bagdassarian, C.K., Myers, S.A., and Breyer, M.D. (2001). Prostanoid receptors: subtypes and signaling. Annu Rev Pharmacol Toxicol 41, 661-690.
- Brockhoff, H. (1974). Model of interaction of polar lipids, cholesterol, and proteins in biological membranes. Lipids 9, 645-650.
- Brunel, L., Neugnot, V., Landucci, L., Boze, H., Moulin, G., Bigey, F., and Dubreucq, E. (2004). High-level expression of *Candida parapsilosis* lipase/acyltransferase in *Pichia pastoris*. J Biotechnol 111, 41-50.
- Buczynski, M.W., Dumlaio, D.S., and Dennis, E.A. (2009). Thematic Review Series: Proteomics. An integrated omics analysis of eicosanoid biology. J Lipid Res 50, 1015-1038.
- Butler, G., Rasmussen, M.D., Lin, M.F., Santos, M.A., Sakthikumar, S., Munro, C.A., Rheinbay, E., Grabherr, M., Forche, A., Reedy, J.L., et al. (2009). Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight *Candida* genomes. Nature 459, 657-662.
- Calvo, I.A., Gabrielli, N., Iglesias-Baena, I., Garcia-Santamarina, S., Hoe, K.L., Kim, D.U., Sanso, M., Zuin, A., Perez, P., Ayte, J., and Hidalgo, E. (2009). Genome-wide screen of genes required for caffeine tolerance in fission yeast. PLoS One 4, e6619.

- Coronado-Castellote, L., and Jimenez-Soriano, Y. (2013). Clinical and microbiological diagnosis of oral candidiasis. J Clin Exp Dent 5, e279-e286.
- Coutinho, H.D. (2009). Factors influencing the virulence of *Candida* spp. West Indian Med J 58, 160-163.
- Cuellar-Cruz, M., Briones-Martin-del-Campo, M., Canas-Villamar, I., Montalvo-Arredondo, J., Riego-Ruiz, L., Castano, I., and De Las Penas, A. (2008). High resistance to oxidative stress in the fungal pathogen *Candida glabrata* is mediated by a single catalase, Cta1p, and is controlled by the transcription factors Yap1p, Skn7p, Msn2p, and Msn4p. Eukaryot Cell 7, 814-825.
- d'Enfert, C. (2006). Biofilms and their role in the resistance of pathogenic *Candida* to antifungal agents. Curr Drug Targets 7, 465-470.
- Dagdeviren, M., Cerikcioglu, N., and Karavus, M. (2005). Acid proteinase, phospholipase and adherence properties of *Candida parapsilosis* strains isolated from clinical specimens of hospitalised patients. Mycoses 48, 321-326.
- De Bernardis, F., Muhlschlegel, F.A., Cassone, A., and Fonzi, W.A. (1998). The pH of the host niche controls gene expression in and virulence of *Candida albicans*. Infect Immun 66, 3317-3325.
- Decker, T., and Lohmann-Matthes, M.L. (1988). A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity. J Immunol Methods 115, 61-69.
- Demeure, C.E., Yang, L.P., Desjardins, C., Raynauld, P., and Delespesse, G. (1997). Prostaglandin E2 primes naive T cells for the production of anti-inflammatory cytokines. Eur J Immunol 27, 3526-3531.
- Dias, J.C., Rezende, R.P., Rosa, C.A., Lachance, M.A., and Linardi, V.R. (2000). Enzymatic degradation of nitriles by a *Candida guilliermondii* UFMG-Y65. Can J Microbiol 46, 525-531.
- Ding, C., and Butler, G. (2007). Development of a gene knockout system in *Candida parapsilosis* reveals a conserved role for *BRC1* in biofilm formation. Eukaryot Cell 6, 1310-1319.
- Dittrich, F., Zajonc, D., Huhne, K., Hoja, U., Ekici, A., Greiner, E., Klein, H., Hofmann, J., Bessoule, J.J., Sperling, P., and Schweizer, E. (1998). Fatty acid elongation in yeast--biochemical characteristics of the enzyme system and isolation of elongation-defective mutants. Eur J Biochem 252, 477-485.
- Dostal, J., Dlouha, H., Malon, P., Pichova, I., and Hruskova-Heidingsfeldova, O. (2005). The precursor of secreted aspartic proteinase Sapp1p from *Candida parapsilosis* can be activated both autocatalytically and by a membrane-bound processing proteinase. Biol Chem 386, 791-799.
- Durand, T., Bultel-Ponce, V., Guy, A., Berger, S., Mueller, M.J., and Galano, J.M. (2009). New bioactive oxylipins formed by non-enzymatic free-radical-catalyzed pathways: the phytoprostanes. Lipids 44, 875-888.
- Durand, T., Bultel-Ponce, V., Guy, A., El Fangour, S., Rossi, J.C., and Galano, J.M. (2011). Isoprostanes and phytoprostanes: Bioactive lipids. Biochimie 93, 52-60.
- el-Mohandes, A.E., Johnson-Robbins, L., Keiser, J.F., Simmens, S.J., and Aure, M.V. (1994). Incidence of *Candida parapsilosis* colonization in an intensive care nursery population and its association with invasive fungal disease. Pediatr Infect Dis J 13, 520-524.
- Ene, I.V., Adya, A.K., Wehmeier, S., Brand, A.C., MacCallum, D.M., Gow, N.A., and Brown, A.J. (2012). Host carbon sources modulate cell wall architecture, drug resistance and virulence in a fungal pathogen. Cell Microbiol 14, 1319-1335.
- Erb-Downward, J.R., and Noverr, M.C. (2007). Characterization of prostaglandin E2 production by *Candida albicans*. Infect Immun 75, 3498-3505.

- Fernanado, P.H., Panagoda, G.J., and Samaranayake, L.P. (1999). The relationship between the acid and alkaline phosphatase activity and the adherence of clinical isolates of *Candida parapsilosis* to human buccal epithelial cells. APMIS 107, 1034-1042.
- Fridkin, S.K. (2005). The changing face of fungal infections in health care settings. Clin Infect Dis 41, 1455-1460.
- Funk, C.D. (2001). Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. Science 294, 1871-1875.
- Fusek, M., Smith, E.A., Monod, M., Dunn, B.M., and Foundling, S.I. (1994). Extracellular aspartic proteinases from *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, and *Candida parapsilosis* yeasts differ substantially in their specificities. Biochemistry 33, 9791-9799.
- Fusek, M., Smith, E.A., Monod, M., and Foundling, S.I. (1993). *Candida parapsilosis* expresses and secretes two aspartic proteinases. FEBS Lett 327, 108-112.
- Gacser, A., Schafer, W., Nosanchuk, J.S., Salomon, S., and Nosanchuk, J.D. (2007a). Virulence of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* in reconstituted human tissue models. Fungal Genet Biol 44, 1336-1341.
- Gacser, A., Stehr, F., Kroger, C., Kredics, L., Schafer, W., and Nosanchuk, J.D. (2007b). Lipase 8 affects the pathogenesis of *Candida albicans*. Infect Immun 75, 4710-4718.
- Gacser, A., Trofa, D., Schafer, W., and Nosanchuk, J.D. (2007c). Targeted gene deletion in *Candida parapsilosis* demonstrates the role of secreted lipase in virulence. J Clin Invest 117, 3049-3058.
- Ghannoum, M.A. (2000). Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. Clin Microbiol Rev 13, 122-143, table of contents.
- Gonzalez, A., Jimenez, A., Vazquez, D., Davies, J.E., and Schindler, D. (1978). Studies on the mode of action of hygromycin B, an inhibitor of translocation in eukaryotes. Biochim Biophys Acta 521, 459-469.
- Gropp, K., Schild, L., Schindler, S., Hube, B., Zipfel, P.F., and Skerka, C. (2009). The yeast *Candida albicans* evades human complement attack by secretion of aspartic proteases. Mol Immunol 47, 465-475.
- Guinea, J. (2014). Global trends in the distribution of *Candida* species causing candidemia. Clin Microbiol Infect.
- Haeggstrom, J.Z., Rinaldo-Matthis, A., Wheelock, C.E., and Wetterholm, A. (2010). Advances in eicosanoid research, novel therapeutic implications. Biochem Biophys Res Commun 396, 135-139.
- Hata, A.N., and Breyer, R.M. (2004). Pharmacology and signaling of prostaglandin receptors: multiple roles in inflammation and immune modulation. Pharmacol Ther 103, 147-166.
- Hawser, S.P., and Douglas, L.J. (1994). Biofilm formation by *Candida* species on the surface of catheter materials *in vitro*. Infect Immun 62, 915-921.
- Heilmann, C.J., Sorgo, A.G., Mohammadi, S., Sosinska, G.J., de Koster, C.G., Brul, S., de Koning, L.J., and Klis, F.M. (2013). Surface stress induces a conserved cell wall stress response in the pathogenic fungus *Candida albicans*. Eukaryot Cell 12, 254-264.
- Hirao, H., Kumar, D., Thiel, W., and Shaik, S. (2005). Two states and two more in the mechanisms of hydroxylation and epoxidation by cytochrome P450. J Am Chem Soc 127, 13007-13018.
- Horvath, P., Nosanchuk, J.D., Hamari, Z., Vagvolgyi, C., and Gacser, A. (2012). The identification of gene duplication and the role of secreted aspartyl proteinase 1 in *Candida parapsilosis* virulence. J Infect Dis 205, 923-933.
- Hruskova-Heidingsfeldova, O., Dostal, J., Majer, F., Havlikova, J., Hradilek, M., and Pichova, I. (2009). Two aspartic proteinases secreted by the pathogenic yeast *Candida parapsilosis* differ in expression pattern and catalytic properties. Biol Chem 390, 259-268.

- Huang, Y.S., Pereira, S.L., and Leonard, A.E. (2004). Enzymes for transgenic biosynthesis of long-chain polyunsaturated fatty acids. *Biochimie* 86, 793-798.
- Hube, B., Stehr, F., Bossenz, M., Mazur, A., Kretschmar, M., and Schafer, W. (2000). Secreted lipases of *Candida albicans*: cloning, characterisation and expression analysis of a new gene family with at least ten members. *Arch Microbiol* 174, 362-374.
- Jacobsen, I.D. (2014). *Galleria mellonella* as a model host to study virulence of *Candida*. *Virulence* 5, 237-239.
- Jahn, U., Galano, J.M., and Durand, T. (2008). Beyond prostaglandins--chemistry and biology of cyclic oxygenated metabolites formed by free-radical pathways from polyunsaturated fatty acids. *Angew Chem Int Ed Engl* 47, 5894-5955.
- Janbon, G., Sherman, F., and Rustchenko, E. (1998). Monosomy of a specific chromosome determines L-sorbose utilization: a novel regulatory mechanism in *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 5150-5155.
- Jaworski, J.G., and Stumpf, P.K. (1974). Fat metabolism in higher plants. Properties of a soluble stearyl-acyl carrier protein desaturase from maturing *Carthamus tinctorius*. *Arch Biochem Biophys* 162, 158-165.
- Jenni, S., Leibundgut, M., Maier, T., and Ban, N. (2006). Architecture of a fungal fatty acid synthase at 5 Å resolution. *Science* 311, 1263-1267.
- Jimenez-Lopez, C., and Lorenz, M.C. (2013). Fungal immune evasion in a model host-pathogen interaction: *Candida albicans* versus macrophages. *PLoS Pathog* 9, e1003741.
- Kainou, K., Kamisaka, Y., Kimura, K., and Uemura, H. (2006). Isolation of Delta12 and omega3-fatty acid desaturase genes from the yeast *Kluyveromyces lactis* and their heterologous expression to produce linoleic and alpha-linolenic acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 23, 605-612.
- Kalinski, P., Hilkens, C.M., Snijders, A., Snijdewint, F.G., and Kapsenberg, M.L. (1997). IL-12-deficient dendritic cells, generated in the presence of prostaglandin E2, promote type 2 cytokine production in maturing human naive T helper cells. *J Immunol* 159, 28-35.
- Kantarcioglu, A.S., and Yucel, A. (2002). Phospholipase and protease activities in clinical *Candida* isolates with reference to the sources of strains. *Mycoses* 45, 160-165.
- Kock, J.L., Sebolai, O.M., Pohl, C.H., van Wyk, P.W., and Lodolo, E.J. (2007). Oxylin studies expose aspirin as antifungal. *FEMS Yeast Res* 7, 1207-1217.
- Kock, J.L., Strauss, C.J., Pohl, C.H., and Nigam, S. (2003). The distribution of 3-hydroxy oxylin in fungi. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 71, 85-96.
- Kreusch, A., and Karstaedt, A.S. (2013). Candidemia among adults in Soweto, South Africa, 1990-2007. *Int J Infect Dis* 17, e621-623.
- Krishnamurthy, S., Plaine, A., Albert, J., Prasad, T., Prasad, R., and Ernst, J.F. (2004). Dosage-dependent functions of fatty acid desaturase Ole1p in growth and morphogenesis of *Candida albicans*. *Microbiology* 150, 1991-2003.
- Kuhn, D.M., Chandra, J., Mukherjee, P.K., and Ghannoum, M.A. (2002a). Comparison of biofilms formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic surfaces. *Infect Immun* 70, 878-888.
- Kuhn, D.M., George, T., Chandra, J., Mukherjee, P.K., and Ghannoum, M.A. (2002b). Antifungal susceptibility of *Candida* biofilms: unique efficacy of amphotericin B lipid formulations and echinocandins. *Antimicrob Agents Chemother* 46, 1773-1780.
- Kuhn, D.M., Mukherjee, P.K., Clark, T.A., Pujol, C., Chandra, J., Hajjeh, R.A., Warnock, D.W., Soil, D.R., and Ghannoum, M.A. (2004). *Candida parapsilosis* characterization in an outbreak setting. *Emerg Infect Dis* 10, 1074-1081.
- Laffey, S.F., and Butler, G. (2005). Phenotype switching affects biofilm formation by *Candida parapsilosis*. *Microbiology* 151, 1073-1081.

- Langenbach, R., Morham, S.G., Tiano, H.F., Loftin, C.D., Ghanayem, B.I., Chulada, P.C., Mahler, J.F., Lee, C.A., Goulding, E.H., Kluckman, K.D., *et al.* (1995). Prostaglandin synthase 1 gene disruption in mice reduces arachidonic acid-induced inflammation and indomethacin-induced gastric ulceration. Cell 83, 483-492.
- Lim, H., Paria, B.C., Das, S.K., Dinchuk, J.E., Langenbach, R., Trzaskos, J.M., and Dey, S.K. (1997). Multiple female reproductive failures in cyclooxygenase 2-deficient mice. Cell 91, 197-208.
- Lin, Y., Choksi, S., Shen, H.M., Yang, Q.F., Hur, G.M., Kim, Y.S., Tran, J.H., Nedospasov, S.A., and Liu, Z.G. (2004). Tumor necrosis factor-induced nonapoptotic cell death requires receptor-interacting protein-mediated cellular reactive oxygen species accumulation. J Biol Chem 279, 10822-10828.
- Lockhart, S.R., Messer, S.A., Pfaller, M.A., and Diekema, D.J. (2008). Geographic distribution and antifungal susceptibility of the newly described species *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* in comparison to the closely related species *Candida parapsilosis*. J Clin Microbiol 46, 2659-2664.
- Los, D.A., and Murata, N. (1998). Structure and expression of fatty acid desaturases. Biochim Biophys Acta 1394, 3-15.
- Louie, A., Baltch, A.L., Smith, R.P., Franke, M.A., Ritz, W.J., Singh, J.K., and Gordon, M.A. (1994). Tumor necrosis factor alpha has a protective role in a murine model of systemic candidiasis. Infect Immun 62, 2761-2772.
- Lynen, F. (1980). On the structure of fatty acid synthetase of yeast. Eur J Biochem 112, 431-442.
- McIlroy, A., Caron, G., Blanchard, S., Fremaux, I., Duluc, D., Delneste, Y., Chevailler, A., and Jeannin, P. (2006). Histamine and prostaglandin E up-regulate the production of Th2-attracting chemokines (CCL17 and CCL22) and down-regulate IFN-gamma-induced CXCL10 production by immature human dendritic cells. Immunology 117, 507-516.
- McKeon, T.A., and Stumpf, P.K. (1982). Purification and characterization of the stearyl-acyl carrier protein desaturase and the acyl-acyl carrier protein thioesterase from maturing seeds of safflower. J Biol Chem 257, 12141-12147.
- McNeil, M.M., Nash, S.L., Hajjeh, R.A., Phelan, M.A., Conn, L.A., Plikaytis, B.D., and Warnock, D.W. (2001). Trends in mortality due to invasive mycotic diseases in the United States, 1980-1997. Clin Infect Dis 33, 641-647.
- Medrano, D.J., Brilhante, R.S., Cordeiro Rde, A., Rocha, M.F., Rabenhorst, S.H., and Sidrim, J.J. (2006). Candidemia in a Brazilian hospital: the importance of *Candida parapsilosis*. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 48, 17-20.
- Messer, S.A., Jones, R.N., and Fritsche, T.R. (2006). International surveillance of *Candida* spp. and *Aspergillus* spp.: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2003). J Clin Microbiol 44, 1782-1787.
- Miao, E.A., Rajan, J.V., and Aderem, A. (2011). Caspase-1-induced pyroptotic cell death. Immunol Rev 243, 206-214.
- Milotis, M.D. (1991). Acridine orange stain for determining intracellular enteropathogens in HeLa cells. J Clin Microbiol 29, 830-831.
- Miranda, I., Silva, R., and Santos, M.A. (2006). Evolution of the genetic code in yeasts. Yeast 23, 203-213.
- Mirrett, S. (1982). Acridine orange stain. Infect Control 3, 250-252.
- Miyazawa, T., Yamamoto, M., and Danjo, H. (2013). Chemoselective acylation of (hydroxyalkyl)phenols catalyzed by *Candida antarctica* lipase B. Biotechnol Lett 35, 625-630.

- Moran, C., Grussemeyer, C.A., Spalding, J.R., Benjamin, D.K., Jr., and Reed, S.D. (2009). *Candida albicans* and non-*albicans* bloodstream infections in adult and pediatric patients: comparison of mortality and costs. *Pediatr Infect Dis J* 28, 433-435.
- Morham, S.G., Langenbach, R., Loftin, C.D., Tiano, H.F., Vouloumanos, N., Jennette, J.C., Mahler, J.F., Kluckman, K.D., Ledford, A., Lee, C.A., and Smithies, O. (1995). Prostaglandin synthase 2 gene disruption causes severe renal pathology in the mouse. *Cell* 83, 473-482.
- Murakami, M., and Kudo, I. (2004). Recent advances in molecular biology and physiology of the prostaglandin E2-biosynthetic pathway. *Prog Lipid Res* 43, 3-35.
- Murata, N., and Wada, H. (1995). Acyl-lipid desaturases and their importance in the tolerance and acclimatization to cold of *cyanobacteria*. *Biochem J* 308 (Pt 1), 1-8.
- Murayama, S.Y., Negishi, Y., Umeyama, T., Kaneko, A., Oura, T., Niimi, M., Ubukata, K., and Kajiwara, S. (2006). Construction and functional analysis of fatty acid desaturase gene disruptants in *Candida albicans*. *Microbiology* 152, 1551-1558.
- Naglik, J.R., Challacombe, S.J., and Hube, B. (2003). *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev* 67, 400-428, table of contents.
- Narumiya, S., Sugimoto, Y., and Ushikubi, F. (1999). Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiol Rev* 79, 1193-1226.
- Nawrot, U., Pajaczowska, M., Fleischer, M., Przondo-Mordarska, H., Samet, A., Piasecka-Pazik, D., Komarnicka, J., Sulik-Tyszka, B., Swoboda-Kopec, E., Cieslik, J., *et al.* (2013). Candidaemia in polish hospitals - a multicentre survey. *Mycoses* 56, 576-581.
- Needleman, P., Turk, J., Jakschik, B.A., Morrison, A.R., and Lefkowitz, J.B. (1986). Arachidonic acid metabolism. *Annu Rev Biochem* 55, 69-102.
- Netea, M.G., Gow, N.A., Munro, C.A., Bates, S., Collins, C., Ferwerda, G., Hobson, R.P., Bertram, G., Hughes, H.B., Jansen, T., *et al.* (2006). Immune sensing of *Candida albicans* requires cooperative recognition of mannans and glucans by lectin and Toll-like receptors. *J Clin Invest* 116, 1642-1650.
- Netea, M.G., Simon, A., van de Veerdonk, F., Kullberg, B.J., Van der Meer, J.W., and Joosten, L.A. (2010). IL-1beta processing in host defense: beyond the inflammasomes. *PLoS Pathog* 6, e1000661.
- Neu, N., Malik, M., Lunding, A., Whittier, S., Alba, L., Kubin, C., and Saiman, L. (2009). Epidemiology of candidemia at a Children's hospital, 2002 to 2006. *Pediatr Infect Dis J* 28, 806-809.
- Neugnot, V., Moulin, G., Dubreucq, E., and Bigey, F. (2002). The lipase/acyltransferase from *Candida parapsilosis*: molecular cloning and characterization of purified recombinant enzymes. *Eur J Biochem* 269, 1734-1745.
- Nguyen, L.N., Gacser, A., and Nosanchuk, J.D. (2011a). Secreted lipases supply fatty acids for yeast growth in the absence of *de novo* fatty acid synthesis. *Virulence* 2, 538-541.
- Nguyen, L.N., Gacser, A., and Nosanchuk, J.D. (2011b). The stearoyl-coenzyme A desaturase 1 is essential for virulence and membrane stress in *Candida parapsilosis* through unsaturated fatty acid production. *Infect Immun* 79, 136-145.
- Nguyen, L.N., Trofa, D., and Nosanchuk, J.D. (2009). Fatty acid synthase impacts the pathobiology of *Candida parapsilosis in vitro* and during mammalian infection. *PLoS One* 4, e8421.
- Nguyen, N.H., Suh, S.O., and Blackwell, M. (2007). Five novel *Candida* species in insect-associated yeast clades isolated from Neuroptera and other insects. *Mycologia* 99, 842-858.
- Nosek, J., Holesova, Z., Kosa, P., Gacser, A., and Tomaska, L. (2009). Biology and genetics of the pathogenic yeast *Candida parapsilosis*. *Curr Genet* 55, 497-509.

- Noverr, M.C., Erb-Downward, J.R., and Huffnagle, G.B. (2003). Production of eicosanoids and other oxylipins by pathogenic eukaryotic microbes. Clin Microbiol Rev 16, 517-533.
- Noverr, M.C., Phare, S.M., Toews, G.B., Coffey, M.J., and Huffnagle, G.B. (2001). Pathogenic yeasts *Cryptococcus neoformans* and *Candida albicans* produce immunomodulatory prostaglandins. Infect Immun 69, 2957-2963.
- Noverr, M.C., Toews, G.B., and Huffnagle, G.B. (2002). Production of prostaglandins and leukotrienes by pathogenic fungi. Infect Immun 70, 400-402.
- Nucci, M., and Marr, K.A. (2005). Emerging fungal diseases. Clin Infect Dis 41, 521-526.
- Nucci, M., Queiroz-Telles, F., Alvarado-Matute, T., Tiraboschi, I.N., Cortes, J., Zurita, J., Guzman-Blanco, M., Santolaya, M.E., Thompson, L., Sifuentes-Osornio, J., *et al.* (2013). Epidemiology of candidemia in Latin America: a laboratory-based survey. PLoS One 8, e59373.
- Omura, T. (1999). Forty years of cytochrome P450. Biochem Biophys Res Commun 266, 690-698.
- Pammi, M., Holland, L., Butler, G., Gacser, A., and Bliss, J.M. (2013). *Candida parapsilosis* is a significant neonatal pathogen: a systematic review and meta-analysis. Pediatr Infect Dis J 32, e206-216.
- Panagoda, G.J., Ellepola, A.N., and Samaranayake, L.P. (2001). Adhesion of *Candida parapsilosis* to epithelial and acrylic surfaces correlates with cell surface hydrophobicity. Mycoses 44, 29-35.
- Papon, N., Courdavault, V., Clastre, M., and Bennett, R.J. (2013). Emerging and emerged pathogenic *Candida* species: beyond the *Candida albicans* paradigm. PLoS Pathog 9, e1003550.
- Pereira, E., Figueira, C., Aguiar, N., Vasconcelos, R., Vasconcelos, S., Calado, G., Brandao, J., and Prada, S. (2013). Microbiological and mycological beach sand quality in a volcanic environment: Madeira archipelago, Portugal. Sci Total Environ 461-462, 469-479.
- Pereira, S.L., Leonard, A.E., and Mukerji, P. (2003). Recent advances in the study of fatty acid desaturases from animals and lower eukaryotes. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 68, 97-106.
- Pfaller, M.A., and Diekema, D.J. (2007). Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. Clin Microbiol Rev 20, 133-163.
- Pfaller, M.A., Diekema, D.J., Gibbs, D.L., Newell, V.A., Meis, J.F., Gould, I.M., Fu, W., Colombo, A.L., and Rodriguez-Noriega, E. (2007). Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance study, 1997 to 2005: an 8.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* species and other yeast species to fluconazole and voriconazole determined by CLSI standardized disk diffusion testing. J Clin Microbiol 45, 1735-1745.
- Pichova, I., Pavlickova, L., Dostal, J., Dolejsi, E., Hruskova-Heidingsfeldova, O., Weber, J., Ruml, T., and Soucek, M. (2001). Secreted aspartic proteases of *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* and *Candida lusitanae*. Inhibition with peptidomimetic inhibitors. Eur J Biochem 268, 2669-2677.
- Pugh, D., and Cawson, R.A. (1977). The cytochemical localization of phospholipase in *Candida albicans* infecting the chick chorio-allantoic membrane. Sabouraudia 15, 29-35.
- Ramage, G., Martinez, J.P., and Lopez-Ribot, J.L. (2006). *Candida* biofilms on implanted biomaterials: a clinically significant problem. FEMS Yeast Res 6, 979-986.
- Ratledge, C. (1989). Microbial routes to lipids. Biochem Soc Trans 17, 1139-1141.
- Reuss, O., Vik, A., Kolter, R., and Morschhauser, J. (2004). The SAT1 flipper, an optimized tool for gene disruption in *Candida albicans*. Gene 341, 119-127.

- Ricciotti, E., and FitzGerald, G.A. (2011). Prostaglandins and inflammation. Arterioscler Thromb Vasc Biol 31, 986-1000.
- Rinaldo-Matthis, A., and Haeggstrom, J.Z. (2010). Structures and mechanisms of enzymes in the leukotriene cascade. Biochimie 92, 676-681.
- Rosa e Silva, L.K., Staats, C.C., Goulart, L.S., Morello, L.G., Pelegrinelli Fungaro, M.H., Schrank, A., and Vainstein, M.H. (2008). Identification of novel temperature-regulated genes in the human pathogen *Cryptococcus neoformans* using representational difference analysis. Res Microbiol 159, 221-229.
- Rossignol, T., Logue, M.E., Reynolds, K., Grenon, M., Lowndes, N.F., and Butler, G. (2007). Transcriptional response of *Candida parapsilosis* following exposure to farnesol. Antimicrob Agents Chemother 51, 2304-2312.
- Rudnick, D.A., Perlmutter, D.H., and Muglia, L.J. (2001). Prostaglandins are required for CREB activation and cellular proliferation during liver regeneration. Proc Natl Acad Sci U S A 98, 8885-8890.
- Ruzicka, F., Hola, V., Votava, M., and Tejkalova, R. (2007). Importance of biofilm in *Candida parapsilosis* and evaluation of its susceptibility to antifungal agents by colorimetric method. Folia Microbiol (Praha) 52, 209-214.
- Santos, M.A., Ueda, T., Watanabe, K., and Tuite, M.F. (1997). The non-standard genetic code of *Candida* spp.: an evolving genetic code or a novel mechanism for adaptation? Mol Microbiol 26, 423-431.
- Schaller, M., Borelli, C., Korting, H.C., and Hube, B. (2005). Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. Mycoses 48, 365-377.
- Schaller, M., Krnjaic, N., Niewerth, M., Hamm, G., Hube, B., and Korting, H.C. (2003). Effect of antimycotic agents on the activity of aspartyl proteinases secreted by *Candida albicans*. J Med Microbiol 52, 247-249.
- Schilling, J.D., Machkovech, H.M., He, L., Diwan, A., and Schaffer, J.E. (2013). TLR4 activation under lipotoxic conditions leads to synergistic macrophage cell death through a TRIF-dependent pathway. J Immunol 190, 1285-1296.
- Schlichting, I., Berendzen, J., Chu, K., Stock, A.M., Maves, S.A., Benson, D.E., Sweet, R.M., Ringe, D., Petsko, G.A., and Sligar, S.G. (2000). The catalytic pathway of cytochrome p450cam at atomic resolution. Science 287, 1615-1622.
- Schuster, V.L. (1998). Molecular mechanisms of prostaglandin transport. Annu Rev Physiol 60, 221-242.
- Schuster, V.L. (2002). Prostaglandin transport. Prostaglandins Other Lipid Mediat 68-69, 633-647.
- Schweizer, E., and Hofmann, J. (2004). Microbial type I fatty acid synthases (FAS): major players in a network of cellular FAS systems. Microbiol Mol Biol Rev 68, 501-517, table of contents.
- Sergeeva, M.G., Gonchar, M.V., Mevkh, A.T., and Varfolomeyev, S.D. (1997). Prostaglandin E2 biphasic control of lymphocyte proliferation: inhibition by picomolar concentrations. FEBS Lett 418, 235-238.
- Serhan, C.N. (2005). Mediator lipidomics. Prostaglandins Other Lipid Mediat 77, 4-14.
- Shibata, Y., Henriksen, R.A., Honda, I., Nakamura, R.M., and Myrvik, Q.N. (2005). Splenic PGE2-releasing macrophages regulate Th1 and Th2 immune responses in mice treated with heat-killed BCG. J Leukoc Biol 78, 1281-1290.
- Shin, J.H., Kee, S.J., Shin, M.G., Kim, S.H., Shin, D.H., Lee, S.K., Suh, S.P., and Ryang, D.W. (2002). Biofilm production by isolates of *Candida* species recovered from nonneutropenic patients: comparison of bloodstream isolates with isolates from other sources. J Clin Microbiol 40, 1244-1248.

- Smith, S. (1994). The animal fatty acid synthase: one gene, one polypeptide, seven enzymes. FASEB J 8, 1248-1259.
- Smith, S., Witkowski, A., and Joshi, A.K. (2003). Structural and functional organization of the animal fatty acid synthase. Prog Lipid Res 42, 289-317.
- Smith, W.L., DeWitt, D.L., and Garavito, R.M. (2000). Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. Annu Rev Biochem 69, 145-182.
- Spiteller, G. (2010). Is lipid peroxidation of polyunsaturated acids the only source of free radicals that induce aging and age-related diseases? Rejuvenation Res 13, 91-103.
- Stehr, F., Felk, A., Gacser, A., Kretschmar, M., Mahnss, B., Neuber, K., Hube, B., and Schafer, W. (2004). Expression analysis of the *Candida albicans* lipase gene family during experimental infections and in patient samples. FEMS Yeast Res 4, 401-408.
- Stukey, J.E., McDonough, V.M., and Martin, C.E. (1989). Isolation and characterization of *OLE1*, a gene affecting fatty acid desaturation from *Saccharomyces cerevisiae*. J Biol Chem 264, 16537-16544.
- Stukey, J.E., McDonough, V.M., and Martin, C.E. (1990). The *OLE1* gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes the delta 9 fatty acid desaturase and can be functionally replaced by the rat stearoyl-CoA desaturase gene. J Biol Chem 265, 20144-20149.
- Synnott, J.M., Guida, A., Mulhern-Haughey, S., Higgins, D.G., and Butler, G. (2010). Regulation of the hypoxic response in *Candida albicans*. Eukaryot Cell 9, 1734-1746.
- Tavanti, A., Davidson, A.D., Gow, N.A., Maiden, M.C., and Odds, F.C. (2005). *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* groups II and III. J Clin Microbiol 43, 284-292.
- Tavanti, A., Hensgens, L.A., Mogavero, S., Majoros, L., Senesi, S., and Campa, M. (2010). Genotypic and phenotypic properties of *Candida parapsilosis sensu strictu* strains isolated from different geographic regions and body sites. BMC Microbiol 10, 203.
- Tehlivets, O., Scheuringer, K., and Kohlwein, S.D. (2007). Fatty acid synthesis and elongation in yeast. Biochim Biophys Acta 1771, 255-270.
- Thompson, D.S., Carlisle, P.L., and Kadosh, D. (2011). Coevolution of morphology and virulence in *Candida* species. Eukaryot Cell 10, 1173-1182.
- Toke, D.A., and Martin, C.E. (1996). Isolation and characterization of a gene affecting fatty acid elongation in *Saccharomyces cerevisiae*. J Biol Chem 271, 18413-18422.
- Tortorano, A.M., Prigitano, A., Lazzarini, C., Passera, M., Deiana, M.L., Cavinato, S., De Luca, C., Grancini, A., Lo Cascio, G., Ossi, C., *et al.* (2013). A 1-year prospective survey of candidemia in Italy and changing epidemiology over one decade. Infection 41, 655-662.
- Toth, A., Nemeth, T., Csonka, K., Horvath, P., Vagvolgyi, C., Vizler, C., Nosanchuk, J.D., and Gacser, A. (2014). Secreted *Candida parapsilosis* lipase modulates the immune response of primary human macrophages. Virulence 5.
- Trofa, D., Gacser, A., and Nosanchuk, J.D. (2008). *Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen. Clin Microbiol Rev 21, 606-625.
- Uemura, H. (2012). Synthesis and production of unsaturated and polyunsaturated fatty acids in yeast: current state and perspectives. Appl Microbiol Biotechnol 95, 1-12.
- Ushikubi, F., Segi, E., Sugimoto, Y., Murata, T., Matsuoka, T., Kobayashi, T., Hizaki, H., Tuboi, K., Katsuyama, M., Ichikawa, A., *et al.* (1998). Impaired febrile response in mice lacking the prostaglandin E receptor subtype EP3. Nature 395, 281-284.
- van Asbeck, E.C., Clemons, K.V., and Stevens, D.A. (2009). *Candida parapsilosis*: a review of its epidemiology, pathogenesis, clinical aspects, typing and antimicrobial susceptibility. Crit Rev Microbiol 35, 283-309.

- Vandeputte, P., Ischer, F., Sanglard, D., and Coste, A.T. (2011). *In vivo* systematic analysis of *Candida albicans* Zn2-Cys6 transcription factors mutants for mice organ colonization. PLoS One 6, e26962.
- Vylkova, S., Carman, A.J., Danhof, H.A., Collette, J.R., Zhou, H., and Lorenz, M.C. (2011). The fungal pathogen *Candida albicans* autoinduces hyphal morphogenesis by raising extracellular pH. MBio 2, e00055-00011.
- Wada, H., Schmidt, H., Heinz, E., and Murata, N. (1993). *In vitro* ferredoxin-dependent desaturation of fatty acids in cyanobacterial thylakoid membranes. J Bacteriol 175, 544-547.
- Warude, D., Joshi, K., and Harsulkar, A. (2006). Polyunsaturated fatty acids: biotechnology. Crit Rev Biotechnol 26, 83-93.
- Weems, J.J., Jr. (1992). *Candida parapsilosis*: epidemiology, pathogenicity, clinical manifestations, and antimicrobial susceptibility. Clin Infect Dis 14, 756-766.
- Wei, D., Li, M., Zhang, X.X., Zhou, H., and Xing, L.J. (2006). A novel Delta12-fatty acid desaturase gene from methylotrophic yeast *Pichia pastoris* GS115. Acta Biochim Pol 53, 753-759.
- Williams, C.S., Mann, M., and DuBois, R.N. (1999). The role of cyclooxygenases in inflammation, cancer, and development. Oncogene 18, 7908-7916.
- Xess, I., Jain, N., Hasan, F., Mandal, P., and Banerjee, U. (2007). Epidemiology of candidemia in a tertiary care centre of north India: 5-year study. Infection 35, 256-259.
- Xu, D., Sillaots, S., Davison, J., Hu, W., Jiang, B., Kauffman, S., Martel, N., Ocampo, P., Oh, C., Trosok, S., *et al.* (2009). Chemical genetic profiling and characterization of small-molecule compounds that affect the biosynthesis of unsaturated fatty acids in *Candida albicans*. J Biol Chem 284, 19754-19764.
- Zeldin, D.C. (2001). Epoxygenase pathways of arachidonic acid metabolism. J Biol Chem 276, 36059-36062.
- Zhao, X.J., McElhaney-Feser, G.E., Bowen, W.H., Cole, M.F., Broedel, S.E., Jr., and Cihlar, R.L. (1996). Requirement for the *Candida albicans* FAS2 gene for infection in a rat model of oropharyngeal candidiasis. Microbiology 142 (Pt 9), 2509-2514.
- Zhao, X.J., McElhaney-Feser, G.E., Sheridan, M.J., Broedel, S.E., Jr., and Cihlar, R.L. (1997). Avirulence of *Candida albicans* FAS2 mutants in a mouse model of systemic candidiasis. Infect Immun 65, 829-832.

10. Köszönetnyilvánítás

Elsősorban szeretném megköszönni Prof. Dr. Vágvolgyi Csabának, a Szegei Tudományegyetem Természettudományi és Informatikai Kar Mikrobiológiai Tanszék vezetőjének, hogy doktori értekezésem elkészítéséhez biztosította a feltételeket a tanszéken.

Nagyon köszönöm témavezetőimnek Dr. Hamari Zsuzsanna docensnek, hogy mindig lelkiismeretesen tanított és segítette a munkámat, valamint Dr. Gácsér Attila tudományos főmunkatársnak, hogy a csoportjában végezhettem a munkámat egy fantasztikus csapatban és rendkívül magas színvonalú kutatómunkát végző laborban.

Köszönettel tartozom Dr. Szekeres Andrásnak és Kecskeméti Anitának a prosztaglandin és zsírsavmérések kivitelezéséért.

Köszönet illeti Prof. Dr. Geraldine Butlert és csoportját a microarray analízisben nyújtott segítségükért.

Hálás vagyok Lele Máriának és Deákné Kulcsár Melindának, hogy a tanszéki anyukáim voltak és segítettek minden technikai probléma leküzdésében.

Köszönöm Dr. Palágyi Andrásnének, Kreisch Istvánnének, Szőnyi Jánosnének és Lengyel Boglárkának a munkámmal kapcsolatos gazdasági ügyek intézését.

Hálásan köszönöm a Gácsér csoport jelenlegi és egykori összes dolgozójának, technikusunknak Dávid Edinának, doktorált kollégáimnak: Dr. Németh Tibor Mihálynak, Dr. Horváth Péter Ferencnek; PhD hallgató kollégáimnak: Csonka Katalinnak, Szenzenstein Juditnak, Tóth Adélnak, Tóth Renátának, Papp Csabának, Luis Antonio Pérez García-nak, MSC hallgatóinknak: Papp Henriettának, Riba Adriennek, BSC hallgatóinknak: Bernátsky Reginának, Berta Bálintnak, Molnár Gergőnek segítségüket, a csapatmunkát és a labor kellemes légkörét.

Köszönet illeti továbbá az SZTE TTIK Mikrobiológiai Tanszékének valamennyi munkatársát és mindazokat, akik bármilyen formában segítettek értekezésem elkészültét.

Köszönöm a legjobb barátaimnak Bolla Beatrixnak, Micsik Tímeának és Szenzenstein Juditnak, hogy mindig támaszaim voltak/lesznek. Nagyon köszönöm a támogatásukat és a barátságukat, nekik is köszönhetően „Egy sziklával kevesebb”.

Végezetül nagyon hálás vagyok a családomnak, Édesanyámnak, a Kishúgomnak, Nagyszüleimnek, Keresztapámnak és családjának, valamint Keresztanyámnak, hogy tökéletes háttérrel biztosítottak, támogattak és rengeteg szeretetet és törődést adtak.