

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

**DOKTORI ÉRTEKEZÉS  
SZEKENYI CSILLA**

**TÉMAVEZETŐK:  
PROF. DR. PAPP TAMÁS  
DR. NAGY GÁBOR**

**BIOLÓGIAI DOKTORI ISKOLA**



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

**SZEGED**

**2020**

# Tartalomjegyzék

<b>1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE</b> .....	4
<b>2. BEVEZETÉS</b> .....	6
<b>3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS</b> .....	9
3.1. A JÁROMSPÓRÁS GOMBÁK ÁLTALÁNOS JELLEMZÉSE.....	9
3.2. A JÁROMSPÓRÁS GOMBÁK ÁLTAL OKOZOTT MIKÓZISOK.....	11
3.2.1. A <i>Mucor circinelloides</i> általános jellemzése és szerepe a klinikumban.....	16
3.2.2. A mucormikózist okozó gombák virulenciáját befolyásoló faktorok.....	18
3.3. A COH FEHÉRJECSALÁD, MINT LEHETSÉGES VIRULENCIA FAKTOR.....	22
3.3.1. A CoH fehérjék felfedezése és szerepe baktériumokban.....	22
3.3.2. A CoH fehérjék szerepe fonalas gombákban.....	24
3.4. A PATOGENITÁS GENETIKAI HÁTTERÉNEK VIZSGÁLATA.....	26
3.4.1. DNS bejuttatása járomspórás gombákba.....	26
3.4.2. A transzformálás során bejuttatott DNS sorsa.....	27
3.4.3. A CRISPR-Cas9 rendszer, mint lehetséges génszabályozó eszköz.....	28
<b>4. CÉLKITŰZÉSEK</b> .....	33
<b>5. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK</b> .....	34
5.1. A KUTATÁS SORÁN FELHASZNÁLT TÖRZSEK, SEJTVONALAK.....	34
5.2. ALKALMAZOTT TÁPTALAJOK, TÁPOLDATOK ÉS TENYÉSZTÉSI KÖRÜLMÉNYEK.....	34
5.2.1. A tenyésztés során alkalmazott táptalajok/tápoldatok.....	34
5.2.2. Kísérletek során alkalmazott oldatok, pufferek és reagensek.....	35
5.3. KÍSÉRLETEK SORÁN ALKALMAZOTT INDÍTÓSZEKVENCIÁK.....	36
5.4. VIZSGÁLATI MÓDSZEREK ÉS KÖRÜLMÉNYEK.....	36
5.4.1. Molekuláris módszerek.....	36
5.4.1.1. Genomi DNS kinyerése gombasejtekből.....	36
5.4.1.2. Agaróz gélelektroforézis.....	36
5.4.1.3. DNS visszanyerése agaróz gélből.....	37
5.4.1.4. RNS tisztítás gombasejtekből.....	37
5.4.1.5. cDNS szintézis (reverz transzkripció).....	37
5.4.1.6. Polimeráz láncreakció (PCR) technika.....	37
5.4.1.7. Fúziós konstrukciók létrehozása.....	38
5.4.1.8. qRT-PCR reakciók a transzkripció szintek meghatározásához.....	38
5.5. GOMBASEJTEK FENNTARTÁSA ÉS TRANSZFORMÁLÁSA.....	39
5.5.1. Tenyésztési körülmények.....	39
5.5.2. Gombasejtek protoplaszt transzformációja CRISPR-Cas9 rendszer segítségével.....	39
5.5.3. Monosporangialis telepek izolálása és a mitotikus stabilitás vizsgálata a gének elrontásán követően.....	40
5.6. DISZRUPCIÓS TÖRZSEK KARAKTERIZÁLÁSA.....	41
5.6.1. Általános fenotipikus analízishez használt módszerek.....	41
5.6.1.1. A törzsek növekedési képességének vizsgálata.....	41
5.6.1.2. A gombaspórák vizsgálata transzmissziós elektronmikroszkóp (TEM) segítségével.....	42
5.6.1.3. A gombaspórák felszínének vizsgálata pásztázó elektronmikroszkóp (SEM) segítségével.....	42
5.6.2. Funkció beazonosítás érdekében használt egyéb kísérleti módszerek.....	42
5.6.2.1. A gombaspórák felszínének fluoreszcens festékekkel történő vizsgálata.....	42
5.6.2.2. J774.2 makrofágszerű egér sejtvonal fertőzése <i>Mucor circinelloides</i> törzsek spóráival.....	43
5.6.2.3. <i>Mucor circinelloides</i> spórákat tartalmazó fagoszómák savasodásának vizsgálata makrofágokban.....	44
5.6.2.4. A <i>Mucor circinelloides</i> spórák makrofágok általi eliminációjának vizsgálata.....	44
5.7. IN VIVO VIRULENCIA VIZSGÁLATOK.....	45
5.7.1. <i>Galleria mellonella</i> in vivo fertőzési modell.....	45
5.7.2. <i>Drosophila melanogaster</i> életképesség vizsgálatok.....	45
5.7.3. In vivo egér fertőzési modell.....	45
5.8. BIOINFORMATIKAI ÉS STATISZTIKAI ANALÍZISEK.....	46
5.8.1. Teljes genom szekvenálás analízise.....	46
5.8.2. In silico elemzések.....	46
5.8.3. Statisztikai analízis.....	47

<b>6. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK</b> .....	48
6.1. A CRISPR-CAS9 RENDSZER ALKALMAZÁSA JÁROMSPÓRÁS GOMBÁBAN .....	48
6.1.1. A <i>Mucor circinelloides carB</i> génjének elrontása NHEJ segítségével.....	48
6.1.2. A fitoén dehidrogenáz gén elrontása HDR által .....	50
6.1.3. A CRISPR-Cas9 rendszer alkalmazása járomspórás gombában: összefoglalás/értékelés .....	54
6.2. A COTH FEHÉRJECSALÁD SZEREPE <i>MUCOR CIRCINELLOIDES</i> FONALAS GOMBÁBAN .....	55
6.2.1. CotH-szerű gének azonosítása <i>Mucor circinelloides</i> genomban .....	55
6.2.2. A <i>cotH</i> géncsalád <i>in silico</i> analízise .....	56
6.2.3. A CotH fehérjecsalád szerepe <i>Mucor circinelloides</i> fonalas gombában: összefoglalás/értékelés.....	60
6.3. <i>MUCOR CIRCINELLOIDES COTH</i> MUTÁNS TÖRZSEK LÉTREHOZÁSA ÉS A GÉNEK ELRONTÁSÁNAK IGAZOLÁSA MOLEKULÁRIS BIOLÓGIAI MÓDSZEREKKEL .....	61
6.4. A DISZRUPCIÓS MUTÁNS TÖRZSEK FENOTÍPUSOS VIZSGÁLATA .....	65
6.4.1. A mutáns törzsek növekedésének vizsgálata különböző környezeti feltételek mellett .....	65
6.4.2. A diszrupciós mutáns törzsek válaszána vizsgálata különböző típusú stressz körülmények között .....	70
6.4.3. A <i>cotH</i> diszrupciós törzsek spóráinak jellemzése .....	75
6.4.3.1. A <i>cotH</i> diszrupciós törzsek spóráinak fénymikroszkópos vizsgálata .....	75
6.4.3.2. A <i>cotH</i> diszrupciós törzsek spóráinak TEM vizsgálata .....	75
6.4.3.3. A mutáns spórák vizsgálata SEM segítségével .....	80
6.4.3.4. A mutáns spórák spórafalának vizsgálata fluoreszcens festékekkel .....	81
6.4.4. J774.2 makrofágszerű egér sejtvonal fertőzése <i>cotH</i> mutáns törzsek spóráival .....	82
6.4.5. <i>Mucor circinelloides</i> spórákat tartalmazó fagoszómák savasodásának vizsgálata makrofágokban .....	84
6.4.6. A diszrupciós mutáns törzsek fenotípusos vizsgálata: összefoglalás/értékelés .....	85
6.5. A <i>COTH</i> MUTÁNS TÖRZSEK <i>IN VIVO</i> VIRULENCIA VIZSGÁLATAI .....	88
6.5.1. A <i>cotH</i> mutáns törzsek virulencia vizsgálata <i>in vivo Drosophila melanogaster</i> modellben ..	88
6.5.2. A <i>cotH</i> mutáns törzsek virulencia vizsgálata <i>in vivo Galleria mellonella</i> modellben.....	89
6.5.3. A <i>cotH</i> mutánsok patogenitásának képessége <i>in vivo</i> egér fertőzési modellben .....	90
6.5.4. A <i>cotH</i> mutáns törzsek <i>in vivo</i> virulencia vizsgálatai: összefoglalás/értékelés.....	91
<b>7. ÖSSZEFOGLALÁS</b> .....	93
<b>8. SUMMARY</b> .....	98
<b>9. IRODALOMJEGYZÉK</b> .....	103
<b>10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS</b> .....	122
<b>11. MELLÉKLETEK</b> .....	125

## 1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AIDS	Szerzett immunhiányos tünetegyüttes ( <i>Acquired Immune Deficiency Syndrome</i> )
AmB	Amfotericin-B ( <i>Amphotericin B</i> )
IPS	Rovar fiziológiás sóoldat ( <i>Insect Physiological Saline</i> )
IBD	Gyulladásos bélbetegség ( <i>Inflammatory Bowel Disease</i> )
ATMT	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> -közvetítette transzformáció ( <i>Agrobacterium tumefaciens-Mediated Transformation</i> )
BALB/c	Bagg albino egér törzs ( <i>Bagg albino mouse</i> )
Big-1	Bakteriális Ig-szerű domén 1 ( <i>Bacterial Ig-like domain 1</i> )
BLAST	Szekvencia-hasonlóság kereső programcsomag ( <i>Basic Local Alignment Search Tool</i> )
BSA	Szarvasmarhaszérum albumin ( <i>Bovine Serum Albumin</i> )
Cas9	CRISPR kapcsolt fehérje 9 ( <i>CRISPR Associated 9 Protein</i> )
CBS	<i>Centraalbureau voor Schimmelcultures</i> , Utrecht, Hollandia
cDNS	Kiegészítő DNS ( <i>Complementary DNA</i> )
ConA-FITC	Konkavalin A-fluoreszcein-izotiocianát ( <i>Concavalin A-Fluorescein Isothiocyanate</i> )
CotH	Spóra burok fehérje ( <i>Spore Coat Protein H</i> )
CRISPR	Halmazottan előforduló, szabályos közökkel elválasztott palindromikus ismétlődések ( <i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i> )
crRNS	<i>Crispr-RNS</i>
DKA	Diabéteszes ketoacidózis ( <i>Diabetic Ketoacidosis</i> )
DSB	DNS kettős száltörés ( <i>Double-Stranded Break</i> )
FACS	Fluoreszcencia aktivált sejtválogatás és analízis ( <i>Fluorescence Activated Cell Sorter</i> )
FITC	Fluoreszcein-izotiocianát ( <i>Fluorescein Isothiocyanate</i> )
GPI	Glikozil-foszfatidil-inozitol ( <i>Glycosylphosphatidylinositol</i> )
GPI-AC	GPI-vel rögzített proteinek ( <i>GPI Anchored Proteins</i> )
gRNS	Vezető RNS ( <i>guide RNA</i> )
GRP78	Glükóz által szabályozott receptor 78 ( <i>Glucose Regulated Protein 78</i> )
HBSS	Hank-féle pufferelt sóoldat ( <i>Hanks' Balanced Salt Solution</i> )
HDR	Homológ rekombináción alapuló hibajavítás ( <i>Homology-Directed Repair</i> )
HSCT	Hematopoetikus őssejt transzplantáció ( <i>Hematopoietic Stem-Cell Transplantation</i> )
INF- $\gamma$	Interferon-gamma ( <i>Interferon gamma</i> )
IL-1 $\beta$	Interleukin-1 béta ( <i>Interleukin 1 beta</i> )
J774.2	Egér makrofág sejtvonal neve ( <i>Mouse Macrophage Cell Line</i> )
JGI	<i>Joint Genome Institute</i>
KF	Kalkofluor Fehér ( <i>Calcofluor White</i> )
KV	Kongó Vörös ( <i>Congo Red</i> )
MEA	Malátás táptalaj ( <i>Malt Extract Agar</i> )
MOI	Fertőzési arány ( <i>Multiplicity Of Infection</i> )

MOPS	3-N-morfolin-propánszulfonsav ( <i>N-Morpholino-Propanesulfonic acid</i> )
NCBI	Nemzetközi biológiai adatbázis ( <i>National Center for Biotechnology Information</i> )
NHEJ	Nem homolog végék egyesítése ( <i>Non-Homologous End-Joining</i> )
PAM	Protospacer melletti motívum ( <i>Protospacer Adjacent Motif</i> )
PBS	Foszfát-pufferelt sóoldat ( <i>Phosphate Buffered Saline</i> )
PEG	Polietilén-glikol ( <i>Polyethylene Glycol</i> )
Pfam	Protein családok adatbázisa ( <i>Protein Families Database</i> )
PMC	PEG - szorbitol - MOPS - kalcium-klorid ( <i>PEG-sorbitol-MOPS-Calcium-chloride</i> )
qRT-PCR	Valós idejű kvantitatív PCR ( <i>Quantitative Real-Time PCR</i> )
ROCM	Rhino-orbito-cerebrális mucormikózis ( <i>Rhino-Orbital-Cerebral Mucormycosis</i> )
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SDS	Nátrium-dodecil-szulfát ( <i>Sodium Dodecyl Sulphate</i> )
SEM	Pásztázó elektronmikroszkópia ( <i>Scanning Electron Microscopy</i> )
sgRNS	Egyetlen vezető RNS ( <i>single-guide RNS</i> )
SMC	Szorbitol - MOPS - kalcium-klorid ( <i>Sorbitol-MOPS-Calcium chloride</i> )
SNP	Egy pontos nukleotid-polimorfizmus ( <i>Single Nucleotide Polymorphism</i> )
SZMC	<b>Sz</b> eged <b>M</b> icrobial <b>C</b> ollection, SZTE TTIK Mikrobiológiai Tanszék
TAE	Tris - ecetsav - dinátrium - EDTA ( <i>Tris Base-Acetic acid-EDTA</i> )
TEM	Transzmissziós elektron mikroszkópia ( <i>Transmission Electron Microscopy</i> )
TNF- $\alpha$	Tumor nekrozis faktor alfa ( <i>Tumor Necrosis Factor Alpha</i> )
tracrRNS	Transzaktiváló crRNS ( <i>trans-activating crRNA</i> )
tru-gRNS	Csonkolt vezető RNS ( <i>truncated gRNA</i> )
UTR	Nem transzlálódó régió ( <i>Untranslated Region</i> )
WGS	Teljes genom analízis ( <i>Whole Genome Shotgun</i> )
YNB	Élesztő nitrogénforrás ( <i>Yeast Nitrogen Base</i> )
YNBM	Minimál táptalaj ( <i>Yeast Nitrogen Base Medium</i> )

#### A dolgozatban előforduló legfontosabb gének:

<i>carB</i>	fitoén dehidrogenáz
<i>carRP</i>	fitoén szintáz/likopin cikláz
<i>leuA</i>	$\alpha$ -izopropilmalát izomeráz
<i>pyrG</i>	orotidin-5'-monofoszfát dekarboxiláz
<i>cotH</i>	spóra felszíni fehérje

## 2. BEVEZETÉS

A Mucorales rendbe tartozó fonalas gombák számos képviselőjének van biotechnológiai jelentősége, pl., mint hidrolitikus enzimeket, szerves savakat, alkoholokat és karotinoidokat előállító szervezetek. Emellett említésre méltó az élelmiszeriparban, különösen a fermentált termékek előállításában betöltött szerepük is (Han és mtsi. 2001, Nout és Aidoo 2002). A gombacsoport egyes tagjai (pl. *Rhizopus stolonifer*, *Gilbertella persicaria*, *Mucor mucedo*) mezőgazdasági termékek raktári kártevőiként is ismertek (Hoffmann és mtsi. 2013). A Mucorales rendbe tartozó fajok között számos, a genetikai- és molekuláris kutatásokban is használt modellszervezet található (pl. *Mucor circinelloides*, *Phycomyces blakesleeanus*, *Blakeslea trispora*) (Idnurm és mtsi. 2006, Camino és mtsi. 2015, Roukas 2016, Vellanki és mtsi. 2018), továbbá olyan képviselőik is akadnak, amelyek opportunistá patogén természetét széles körűen vizsgálják (pl. *Rhizopus oryzae*, *Lichtheimia corymbifera*) (Gebremariam és mtsi. 2019, Walther és mtsi. 2019). Az opportunistá kórokozóként ismert fajok vizsgálata az utóbbi évtizedekben, a Mucorales rend tagjai által kiváltott invazív mikózisok, az ún. mucormikózisok növekvő száma miatt, előtérbe került (Ziaee és mtsi. 2016, López-Fernández és mtsi. 2018, Lax és mtsi. 2020). Míg az egészséges immunrendszer hatékonyan képes védekezni a járomspórás gombák által kiváltott fertőzésekkel szemben, addig bizonyos pácienscsoportok körében sérül a természetes immunrendszer alkotta gát, ami lehetőséget biztosít az opportunistá patogén gombák számára kórfolyamat kiváltására. A mucormikózisos megbetegedésekre való hajlamosító tényezők a cukorbetegség és az immunszuppresszióval járó állapotok (rosszindulatú daganatos megbetegedések, szerzett immunhiányos tünetegyüttes (AIDS – *Acquired Immune Deficiency Syndrome*), szerv- és csontvelő-transzplantáció), a különböző traumák (a bőr súlyos sérülései, égési, vagy természeti katasztrófákban szerzett sérülések) (Ibrahim és mtsi. 2012). A fertőzéssel veszélyeztetettek száma napjainkban növekvő tendenciát mutat, így a mucormikózisos megbetegedések is fokozatosan hangsúlyosabb szerepet kapnak a klinikumban (Torres-Narbona és mtsi. 2007, Bitar és mtsi. 2009, Saegeman és mtsi. 2010, Kontoyiannis és mtsi. 2016, Guinea és mtsi. 2017). A mucormikózisokra irányuló növekvő figyelmet azonban nem kizárólag a bővülő esetszám magyarázza, hanem a fertőzéseket kiváltó gombák nagyfokú rezisztenciája a jelenleg alkalmazható legtöbb gombaellenes hatóanyaggal szemben (Riley és mtsi. 2016). Az imént felsoroltak

szükségessé teszik olyan új diagnosztikai és terápiás módszerek kidolgozását, melyek segítséget jelenthetnek a gombafertőzések prevenciójában és kezelésében (Eucker és mtsi. 2008, Gebremariam és mtsi. 2017a, 2019). Ehhez hozzájárulhat a fertőzés folyamatának részletes tanulmányozása és mechanizmusának pontos feltárása, ami magába foglalja a lehetséges virulencia faktorok azonosítását is.

A járomspórás gombák genetikai manipulációja eddig nem vizsgált gének funkciójának megismerését teszi lehetővé, továbbá olyan biológiai folyamatok megértésére nyújt lehetőséget, mint a gazda-patogén interakció. Ehhez olyan génmanipulációs technikákra van szükség, melyekkel biztosítható a stabil genetikai transzformáns törzsek előállítása, mutáns könyvtárak létrehozása, a gének funkcionális vizsgálata, a virulencia faktorok azonosítása és a rekombináns törzsek jellemzése. Bár a rendelkezésünkre álló hagyományos transzformációs módszerek segítségével is lehetséges sikeres genetikai transzformációt végrehajtani a járomspórás gombák egyes fajain, a gének célzott deléciójának, csendesítésének, illetve az exogén DNS stabil integrációjának elérése továbbra is nagy kihívást jelentő feladat (Ibrahim és Skory 2007). Annak érdekében, hogy célzott, helyspecifikus mutációkat hozhassunk létre a gombagenomban, munkánk első fontos célkitűzése egy robusztus, ugyanakkor megbízható génszerkezeti eszköz, a CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) – Cas9 (CRISPR kapcsolt fehérje 9) rendszer járomspórás gombákra, azon belül is a *M. circinelloides* modellorganizmusra történő optimalizálása volt. Ezt a célzott génmódosítást lehetővé tevő rendszert oly módon alkalmaztuk, mely nélkülözi a plazmidokkal való manipulációt, kiküszöbölve a korábbiakban a transzformálás során fellépő nehézségeket (pl. plazmid fennmaradása a sejtben, integrációs problémák).

A közelmúltban írták le a *R. delemar* (*R. oryzae*) opportunista humán patogén gomba két olyan spóra burok fehérjéjét (CotH – *Spore Coat Protein H*), melyek az endoteliális sejteken megtalálható, glükóz által szabályozott receptorral (GRP78 – *Glucose Regulated Protein 78*) állnak receptor-ligand kölcsönhatásban, s ez által vesznek részt a gombafertőzés folyamatában (Gebremariam és mtsi. 2014). A *M. circinelloides* gombafaj esetén 17 db CotH-szerű fehérjét kódoló gént azonosítottunk. A *Rhizopus* nemzetség képviselői szoros filogenetikai kapcsolatban állnak a *Mucor* nemzetség fajaiival, s a bennük előforduló CotH fehérjék nagyfokú aminosavszekvencia-hasonlóságot mutatnak az általunk azonosított *Mucor* CotH-szerű fehérjékkel. Ugyanakkor a CotH fehérjék többségének funkciója továbbra is tisztázatlan maradt mind

*R. delemar*, mind *M. circinelloides* esetében. Mindezek alapján munkánk második fele a CotH fehérjecsald funkcionális vizsgálatát öleli fel, melynek során a CRISPR-Cas9 rendszer segítségével létrehozott genetikailag stabil mutánsok fenotípusos változásait követtük nyomon, választ keresve arra a kérdésre, hogy szereppel bírhatnak-e a *M. circinelloides* fonalas gomba fertőzési és egyéb fiziológiai folyamataiban.



### 3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

#### 3.1. A járomspórás gombák általános jellemzése

A járomspórás gombákat korábban egységes csoportnak vélték (*Zygomycota*) (Barr 1992, Benny és mtsi. 2001), azonban átfogó, molekuláris vizsgálatokon alapuló elemzést követően a taxon jelentős rendszertani átalakuláson esett át (Hibbett és mtsi. 2007, Voigt és mtsi. 2013, Spatafora és mtsi. 2016, Lee és Idnurm 2017). Az új molekuláris filogenetikai alapokon nyugvó rendszertan az egykori *Zygomycota* törzset két törzsre bontja: *Mucoromycota* és *Zoopagomycota*. Az utóbbiban található az *Entomophthorales*, *Basidiobolales*, *Zoopagales* és *Kickxellales* csoportok – ezek között sok állatparazita, kommenzalista faj ismert, illetve ide tartoznak a régebben a *Zygomycota* csoporton belül külön osztályba (*Trichomycetes*) sorolt gombák is (Benny és mtsi. 2014, Spatafora és mtsi. 2016, Lee és Idnurm 2017). Ma a klasszikus járomspórás gombák a *Mucoromycota* törzsben találhatóak, mely a *Dikarya* (*Ascomycota* és a *Basidiomycota*) testvércsoportja, és magába foglalja a *Mucoromycotina*, a *Mortierellomycotina* és *Glomeromycotina* altörzseket. A *Mucoromycota* törzsbe tartozó gombák életciklusuk során nem igénylik víz jelenlétét (Field és mtsi. 2015), és főleg bomló növényi és állati szerves maradványokkal táplálkozó szaprotróf életmódot folytatnak. Ide sorolandók fontos laboratóriumi modellszervezetek (*Phycomyces blakesleeanus*, *Mucor circinelloides*); gazdasági szempontból jelentős, gyümölcsromlást okozó mezőgazdasági és raktári kártevők (*Rhizopus stolonifer*); a gazdanövény gyökérszövetében arbuszkulumokat képző endomikorrhiza-gombák (*Rhizophagus irregularis*), de akadnak közöttük rovarok, fonálférgesek és egyéb gerinctelenek patogénjei vagy parazitái is (*Rhopalomyces elegans*) (Lee és Idnurm 2017). Jellegzetességeiknek tekinthetők a cönocitikus micélium, a kitin és kitozán tartalmú sejtfal és a sporangiumokban ivartalanul képződő sporangiospórák (Spatafora és mtsi. 2016). Eredeti nevüket az ivaros szaporodásuk során megfigyelhető szaporító képletükről, a járomspóráról kapták (más néven zigospóra, gör. *zygos* = járom) (Richardson 2009). A *Mucorales* rend, mely a legváltozatosabb és leginkább tanulmányozott csoport, jelenleg 13 családot, 56 nemzetséget és 300 fajt foglal magába (Lee és Idnurm 2017). Olyan gyakorlati szempontból fontos nemzetségek sorolhatók ide, mint a *Lichtheimia*, *Gilbertella*, *Micromucor*, *Mucor*, *Phycomyces*, *Rhizomucor* és *Rhizopus*. A távol-keleti

ételek (pl. sufu, tempeh, ragi) előállításánál bizonyos *Mucor*, *Rhizopus*, valamint *Actinomucor* fajokat, mint a fermentációhoz szükséges starter kultúrák alkotóit használnak (Han és mtsi. 2001, Nout és Aidoo 2002). Számos törzs tölt be jelentős szerepet extracelluláris enzimek, pl. lipázok, proteázok, amilázok, cellulázok (Godtfredsen 1990, Silveira és mtsi. 2005, Voigt és mtsi. 2016), alkoholok (Millati és mtsi. 2005), telítetlen zsírsavak (Carter 1988, Tang és mtsi. 2016, Kosa és mtsi. 2018, Hussain és mtsi. 2019) és karotinoidok (Iturriaga 2000, 2001, 2005, Mehta és mtsi. 2003, Dufossé 2006, Papp és mtsi. 2006, Voigt és mtsi. 2016, Zhang és mtsi. 2016, Alcalde és mtsi. 2019) termeltetése, valamint szteroidvázis vegyületek sztereospecifikus hidroxilálására során (de Oliveira Silva és mtsi. 2015). Egyes képviselőiket biotechnológiai szempontból nagy érdeklődés övezi, mint lehetséges lipidforrást (Tauk-Tornisiello és mtsi. 2009). A *R. oryzae* ígéretesnek bizonyult a bioremediációban (Zhang és mtsi. 2018), a *M. circinelloides* járomspórás gomba pedig bioüzemanyag-termelő szerkezetként (Carvalho és mtsi. 2015, Zininga és mtsi. 2019), illetve a kőolajszennyezés csökkentésében (Hasanizadeh és mtsi. 2017).

A Mucorales rend egyes képviselői kedvelt modellszervezetek genetikai- és molekuláris biológiai vizsgálatok során. Többek közt a következő területek tanulmányozásához kerültek már alkalmazásra: a karotin bioszintézis folyamata (Zhang és mtsi. 2016, Nicolás és mtsi. 2018); gombák ivaros folyamatai (Schimek és Wöstemeyer 2006, Idnurm és mtsi. 2008, Wöstemeyer és mtsi. 2016, Xu és mtsi. 2017); gomba morfogenezis (Wang és Lin 2012, Lee és mtsi. 2015); patogentitási folyamatok (Ibrahim és mtsi. 2010, 2012, Schwartze és mtsi. 2012, Voelz és mtsi. 2015, Trieu és mtsi. 2017, Gebremariam és mtsi. 2017a, 2017b, 2017c, 2019, Patiño-Medina és mtsi. 2018, 2019); szabályozó mechanizmusok (Rodríguez-Romero és Corrochano 2006, Ruiz-Vázquez és mtsi. 2015) és morfológiai dimorfizmus (Bredenkamp és mtsi. 2010, Ocampo és mtsi. 2012, Lee és mtsi. 2013, 2015, Patiño-Medina és mtsi. 2018). Mindezek alapján elmondhatjuk, hogy e csoport tagjai változatos tulajdonságaik miatt jelentőséggel bírnak az ipar és az alapkutatás területén, azonban fontos megemlíteni, hogy néhány fajuk (pl. a *Lichtheimia*, *Mucor*, *Rhizomucor* és *Rhizopus* nemzetségek fajai) ritka, ugyanakkor életveszélyes humán megbetegedések, ún. mucormikózisok kiváltására képesek (Papanikolaou és Panayotou 2007, Wang és mtsi. 2011, Doggett és Wong 2014).

A Mucorales rendbe tartozó fonalas gombák közül a mucormikózis kialakításáért leginkább a *Rhizopus*, *Lichtheimia* és *Mucor* fajok tehetők felelőssé (Mendoza és mtsi. 2014, Prakash és Chakrabarti 2019). A fertőzések több mint fele

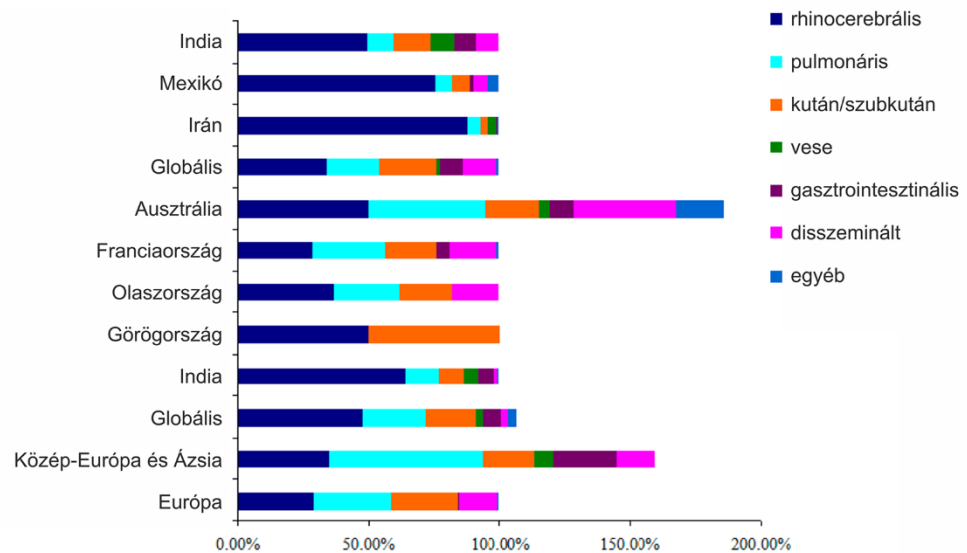
*Rhizopus* fajokhoz köthető, majd ezt követik a *Lichtheimia* és *Mucor* nemzetségek tagjai által kiváltott esetek (Prakash és Chakrabarti 2019). Ez az arány azonban változhat a háttérben meghúzódó alapbetegségtől függően is, mint ahogy azt egy ötven, mucormikózisban szenvedő szervátültetett beteget vizsgáló tanulmány is szemléltetett, ahol a betegséget kiváltó faj az esetek 37%-ában *Mucor*, 35%-ában *Rhizopus* és 13%-ában *Lichtheimia* nemzetség képviselője volt (Singh és mtsi. 2009). A ketoacidózis állapot a *Rhizopus* fajok jelenlétét prediktálja, kortikoszteroiddal történő kezelést követően pedig a betegség okozója nagyobb eséllyel *Lichtheimia* nemzetségbe tartozó faj (Lanternier és mtsi. 2012). A *Rhizopus* fajokat gyakran társítják a rhino-orbito-cerebrális mucormikózishoz (ROCM), míg a *Cunninghamella* fajokat a mucormikózis pulmonáris formájához. *Apophysomyces* és a *Saksenaea* fajokat nagyobb számban izolálják kután mucormikózisokból (Jeong és mtsi. 2019). Megjegyzendő, hogy a Mucorales rendbe tartozó fajok kiváltotta fertőzések száma földrajzi régióként is változhat. Európában a *Lichtheimia* nemzetség tagjai felelősek legtöbbször a mucormikózis kialakításáért (Skiada és mtsi. 2011), míg egyes fajok egy bizonyos földrajzi régió belül okoznak kiugró tendenciával megbetegedést, mint például az *Apophysomyces variabilis* Indiában (Chakrabarti és mtsi. 2003).

### 3.2. A járomspórás gombák által okozott mikózisok

Egy gombát opportunistá human patogénnek tekinthetünk, amennyiben egy normál immunitással rendelkező egészséges szervezetben legfeljebb lokális fertőzések kiváltására képes (pl. kután mikózisok, faringitisz), azonban, ha a gazdaszervezet védekező mechanizmusai sérülnek, a fertőzés akár invazívva vagy szisztémássá is válhat (Köhler és mtsi. 2017). Az invazív gombafertőzések leggyakrabban a *Candida* és *Aspergillus* nemzetségek tagjaihoz köthetők (Klimko és mtsi. 2019). Növekvő tendenciát mutatnak azonban a járomspórás gombák okozta megbetegedések is (Lelievre és mtsi. 2014, López-Fernández és mtsi. 2018, Lax és mtsi. 2020). A mucormikózisos esetek számának növekedése az utóbbi két évtizedben leginkább Franciaországra, Belgiumra, Svájcra, Indiára és Kínára volt jellemző (Prakash és Chakrabarti 2019, Reid és mtsi. 2020). A betegség incidenciájára hatással van az immunhiányos betegek számának növekedése (különösen a szervátültetésben részesült betegekre vonatkozóan), továbbá a javuló és eredményesebb diagnosztika, valamint az azol-típusú gombaellenes szerek (pl. vorikonazol) profilaktikus alkalmazása (Siwek és mtsi. 2004, Reid és mtsi. 2020).

A mucormikózisok kialakulására hajlamosító tényezőnek tekinthetők a daganatos megbetegedések (Meyer és mtsi. 1972, Chretien és mtsi. 2016), azon belül pedig leginkább a vérképzőszervi daganatok (Chamilos és mtsi. 2006, Chretien és mtsi. 2016), az antibiotikumokkal és egyes szteroidokkal (pl. prednizon) való kezelés (Hoang és mtsi. 2020), kemoterápia (Kennedy és mtsi. 2016), a cukorbetegség (Hopkins és Treloar 1997, Roden és mtsi. 2005, Jeong és mtsi. 2019), deferoxamin hatóanyagot tartalmazó gyógyszerek (pl. Desferal) alkalmazása (Ibrahim 2014), a hematopoetikus őssejt-transzplantáció (HSCT –*Hematopoietic Stem-Cell Transplantation*) (Garcia-Vidal és mtsi. 2008, Kontoyiannis és mtsi. 2010, Reid és mtsi. 2020), továbbá szervtranszplantáció esetén alkalmazott (Lanternier és mtsi. 2012, Chitasombat és Kontoyiannis 2016) és egyéb immunszuppressziós terápiák. A modern orvostudomány vívmányai (pl. csontvelő- és szervátültetés, kemoterápia, antibiotikum- és szteroidkezelések) hatására az elmúlt három évtized óta az immunszuppresszált betegek száma folyamatosan bővül, és az így kialakuló mesterséges immunszuppresszió vált az opportunista gombafertőzések legnagyobb rizikófaktorává, főként Európában és az Amerikai Egyesült Államokban (Prakash és Chakrabarti 2019), az egyéb immunhiányos állapotok (autoimmun megbetegedések, AIDS) mellett (Arce-Salinas és Pérez-Silva 2010, Moreira és mtsi. 2016). Nem elhanyagolható hajlamosító tényező továbbá korunk népbetegsége, a cukorbetegség, különösen az ezzel összefüggésben fellépő ketoacidózis (DKA –*Diabetic Ketoacidosis*) (Ribes és mtsi. 2000, Afroze és mtsi. 2017, Jeong és mtsi. 2019). A ketoacidózis állapotában fellépő hiperglikémia és alacsony pH gátolja a fagociták ölü képességét (Ibrahim és mtsi. 2012). A vasat komplexként megkötő egyes gyógyszerekkel (pl. deferoxamin) kezelt betegeknél a mucormikózisok magasabb előfordulási rátával bírnak. Ez a jelenség azzal áll összefüggésben, hogy az ilyen típusú szereket a gombák sziderofórként képesek vasfelvételük során hasznosítani (Reed és mtsi. 2006, Ibrahim 2014). Egészséges gazdaszervezetekben az immunsejtek fagocitikus folyamatok segítségével, továbbá a spórák oxidatív előléssel megakadályozzák a spórák csírázási folyamatainak lejátszódását (Waldorf és mtsi. 1984a, Kontoyiannis és Lewis 2006). Amennyiben neutropénia állapota is fennáll, a beteg fokozott kitétséggel bír a teljes szervezetet érintő (szisztémás) gombás fertőzés kialakulására, ekkor ugyanis a neutrofil granulociták számos, a gomba elleni védekezésben elengedhetetlen funkciója sérül, úgy, mint a kemotaxis, fagocitikus képesség és oxidatív burst (Kontoyiannis és Lewis 2006, Son és mtsi. 2020).

A mucormikózisos megbetegedések felosztása a megbetegített szerv/szövet alapján történik, s ez alapján megkülönböztetünk kután/szubkután (bőr és bőr alatti szövetek), ROCM (orr- és szájüreg, szem, agy), pulmonáris (tüdő), gasztrointesztinális (gyomor, béltraktus), és disszeminált fertőzéseket (Ribes és mtsi. 2000, Singh 2001, Pozo Laderas és mtsi. 2015, Prakash és Chakrabarti 2019) [1. ábra].



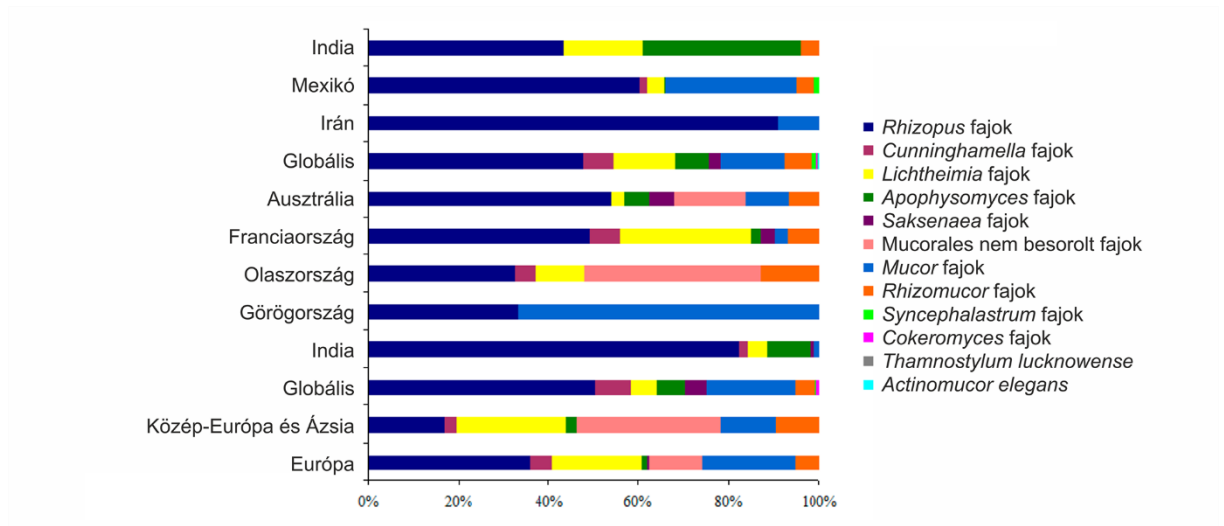
**1. ábra.** A mucormikózis klinikai formái és azok előfordulása különböző tanulmányok adatai alapján. Az ábrán megadott értékek százalékos aránya a szakirodalmi adatokat tükrözi. Egyes esetekben több szerv/szervrendszer érintettsége egyedejűleg jelentkezett (Prakash és Chakrabarti 2019).

A gomba leggyakrabban a környezetben előforduló sporangiospórák belélegzésével jut a szervezetbe, melyet alátámaszt az a tény, hogy a mucormikózisok leggyakrabban ROCM formában manifesztálódnak az arc, orr és szájpad szöveteinek érintettségével (Jeong és mtsi. 2019). Amennyiben a fertőzés a szemet érinti, a központi idegrendszer érintettsége is bekövetkezhet a szemidegen keresztül terjedő kórokozó által (Mattingly és Ramakrishnan 2016). A sporangiospórák bejutásával a tüdőszövetben is kialakulhat fertőzés, melynek tünetei az aspergillózishoz és a bakteriális tüdőgyulladásához hasonlóak, azonban a betegség lefolyása progresszívabb (Ribes és mtsi. 2000). A fertőzés elsődleges helyétől a patogén a véredények invázióját követően számos pontra képes eljutni (pl. agy, szív), s ott másodlagos gócpontot kialakítani. Amennyiben a fertőzés generalizálódik és disszeminált stádiumba kerül, a halálozási arány a 90-100%-ot is elérheti (Tedder és mtsi. 1994, Lax és mtsi. 2020). A fertőzési útvonal a bőrön át is

megvalósulhat, a bőrfelszínt érintő trauma hatására (pl. vágás, égési sérülés, tűszúrás, rovarcsípés) (Cooter és mtsi. 1990, Caceres és mtsi. 1997, Stern és Kagan 1999), valamint gasztroenterális úton (Spellberg 2012, Alfano és mtsi. 2018).

A mucormikózis disszeminált formájának leggyakoribb kiindulási pontja a gomba által megfertőzött tüdő, s ez a megjelenési forma társul a legnagyobb mortalitással (Pozo Laderas és mtsi. 2015). A mucormikózisos megbetegedésre jellemző halálozási arány a HSCT-n átesett, illetve a vérképzőszervi daganatban szenvedő betegek esetén a legmagasabb (Prakash és mtsi. 2018, Reid és mtsi. 2020). A halálozási arány a fertőzés helyétől függően is eltérő: 76% a disszeminált, 55,6% vesesejteket érintő, 42,2% pulmonáris, 31% ROCM, 23% kután/szubkután mucormikózis esetén (Reid és mtsi. 2020).

A Mucorales rend opportunistá humán patogén tagjai az alábbi családba sorolhatók: *Mucoraceae*, *Rhizopodaceae*, *Saksenaeaceae* és *Lichtheimiaceae* (Hoffmann és mtsi. 2013). A Mucorales rend jelenleg 11 nemzetsége, s ezen belül 27 fajhozható összefüggésbe mucormikózisos megbetegedésekkel (Jeong és mtsi. 2019). Ezek közül a legjelentősebbek klinikai szempontból a *Rhizopus*, *Cunninghamella*, *Lichtheimia*, *Apophysomyces*, *Saksenaea*, *Mucor*, *Rhizomucor*, *Syncephalastrum*, *Cokeromyces* fajok, továbbá a *Thamnostylum lucknowense* és az *Actinomucor elegans* [2. ábra]. Az angioinvaszív mucormikózis legfőbb okozói a *R. oryzae*, *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis* és a *Rhizomucor pusillus* (Sugar 2005). A ROCM esetén a *R. delemar*, míg a kután és emésztőrendszert érintő mucormikózis esetén a *R. microsporus* var. *rhizopodiformis* a leggyakrabban izolált járomspórás gomba. A fertőzések több mint feléért a *Rhizopus* nemzetség tagjai felelősek, azon belül is legfőképp a *R. delemar* (McBride és mtsi. 1960, Neame és Rayner 1960, Whiteway és mtsi. 1979, Scholer 1983, Ribes és mtsi. 2000, Skiada és mtsi. 2018), a második legnagyobb esetszámmal a *L. corymbifera* gombafaj bír (Prakash és Chakrabarti 2019). A mucormikózisok további hányadának nagy részét *Mucor* fajok teszik ki (Chayakulkeeree és mtsi. 2006, Jeong és mtsi. 2019). A ROCM leginkább a kezeletlen diabéteszes betegekre jellemző, de előfordulhat szervátültetést követően is. A pulmonáris és disszeminált mucormikózis kialakulásának háttere leggyakrabban a transzplantáció során alkalmazott immunszuppresszió, különösen a HSCT esetén magas a mucormikózisok aránya (9-10%) (Rüping és mtsi. 2009, Kontoyiannis és mtsi. 2010, Reid és mtsi. 2020).



**2. ábra.** A mucormikózis kialakulásáért felelős fajok eloszlása különböző tanulmányok adatai alapján (Prakash és Chakrabarti 2019).

A mucormikózisok kapcsán egységes kezelési javaslat hiánya jellemző, főképp a kis esetszámú fertőzések esetében (Arif és Perfect 2017), ezért a járomspórás gombák által okozott gombafertőzések sikeres kezelésének egyik meghatározó pontja a korai diagnózis felállítása. Ez a biopsziával vett minták mikroszkópos vizsgálatán alapszik, azonban a hifák detektálása csak a mucormikózis tényét jelzi és nem alkalmas a fajazonosításra (Sinkó 2001, Walsh és mtsi. 2012, Yang és mtsi. 2016). További nehézséget jelent, hogy vérből történő kimutatás még akkor is alacsony hatásfokú, mikor disszeminált fertőzésről beszélhetünk (Hamilos és mtsi. 2011). A finom tüvel történő aspirációs biopsziával megállapítható a diagnózis pulmonáris mikózis esetén, amennyiben a komputertomográfia (CT – *Computer Tomography*) vizsgálat során a gomba által létrehozott gócok helyzete meghatározható (Sharma és mtsi. 2017, Skiada és mtsi. 2018). A mucormikózisok szerológiai diagnózisára kidolgozott enzim kapcsolt immunsorbens vizsgálat (ELISA – *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) módszer (Sandven és Eduard 1992) hasonló antigénjeik miatt a járomspórás gombafajok elkülönítésére nem alkalmas (Kaufman és mtsi. 1989). Megoldást jelenthet a nukleinsav alapú azonosítást lehetővé tevő molekuláris biológiai módszerek használata (Nyilasi és mtsi. 2008, Millon és mtsi. 2016, Skiada és mtsi. 2018, Baldin és mtsi. 2018), továbbá az új generációs szekvenáláson alapuló diagnosztikai módszerek (Blauwkamp és mtsi. 2019). Mindezek ellenére a diagnózis felállítása sokszor már a szisztémás érintettség, illetve gyakran csak a beteg halála után következik be (Eucker és mtsi. 2008).

A mucormikózisok kezelése több egyidejű megközelítést igényel: műtéti beavatkozást (a fertőzött szövet/szerv sebészeti eltávolítása), gombaellenes szerek használatát és az alapbetegség orvosi kezelését, amely hajlamosító tényezőként játszott közre a fertőzés során (Yoon és mtsi. 2010, Giudice és mtsi. 2016). A járomspórás gombák elleni terápia során az első választás többnyire az AmB (Amfotericin B) lipid formuláira esik (Luo és mtsi. 2013) legalább 5-10 mg/kg/nap dózisban, mely az ergosterol molekulákkal alkotott komplexe révén képes károsítani a gomba sejtmembránt, annak permeabilitásának megváltoztatása által (Petrikos 2009, Dannaoui 2017), 3 mg/kg/napot meghaladó dózisban történő alkalmazása azonban az emberi szervezet számára vesekárosító hatású (Cornely és mtsi. 2007). A mucormikózisok kezelésére alkalmas gombaellenes szerek száma azonban igen alacsony, ennek oka a járomspórás gombák nagyfokú rezisztenciája a klinikumban gyakran használt antifungális szerekkel szemben, mint pl. az azolok többsége (pl. flukonazol, vorikonazol), vagy az ehinokandinok, melyek mind a candidiázis, mind az aspergillózis esetében többnyire hatásosnak bizonyultak (Ibrahim és mtsi. 2011, Dannaoui 2017). Kivételt képez két triazol, a pozakonazol és az izavukonazol, amelyek *in vitro* és *in vivo* is alkalmasnak bizonyultak járomspórás gombák ellen (Luo és mtsi. 2013, Chowdhary és mtsi. 2015). Az antifungális szerekkel szembeni érzékenység azonban akár az egy nemzetségbe tartozó fajok között is nagyban eltérhet, mint például a pozakonazol esetében, mely a *Mucor* nemzetségbe tartozó gombákkal szemben alig, vagy egyáltalán nem fejt ki gátló hatást (Salas és mtsi. 2012, Sipsas és mtsi. 2018). Ezzel szemben az izavukonazol hatékony a legtöbb Mucorales rendbe tartozó gombafajjal szemben (Arendrup és mtsi. 2015), továbbá invazív mucormikózis kezelése során az AmB-vel megegyező hatékonyságot mutatott (Marty és mtsi. 2016) és kombinálva is alkalmazható (Wei és mtsi. 2019).

### **3.2.1. A *Mucor circinelloides* általános jellemzése és szerepe a klinikumban**

Munkánk a *M. circinelloides* f. *lusitanicus* fonalas gomba vizsgálatára összpontosít, mely az egyik leginkább vizsgált járomspórás modellorganizmusnak tekinthető napjainkban (Garcia és mtsi. 2018, Pérez-Arques és mtsi. 2019). E karotintermelő fonalas gomba teljes genomja 2010 óta ismert és elérhető (<https://mycocosm.jgi.doe.gov/Mucci2/Mucci2.home.html>) (Corrochano és mtsi. 2016), és számos olyan jellemzővel bír, melyek alkalmassá teszik a genetikai és molekuláris vizsgálatokra. Genetikai módosítására többféle transzformációs rendszer is kidolgozásra



került (pl. polietilén-glikol (PEG)-mediált protoplaszt transzformálás, elektroporálás) és nagyszámú mutáns törzs is rendelkezésünkre áll. A *M. circinelloides* gombával végzett kutatások többsége elsősorban a mikrobiális karotinoidok bioszintézis útvonalaiban résztvevő gének és azok termékeinek vizsgálatára irányultak (Iturriaga és mtsi. 2000, 2001, 2005, Papp és mtsi. 2006). *M. circinelloides* segítségével tanulmányozzák továbbá az RNS-interferencia folyamatát és szerepét a gombasejtben (Nicolás és mtsi. 2010, 2015, Calo és mtsi. 2012, Cervantes és mtsi. 2013, Navarro-Mendoza és mtsi. 2018a), a morfológiai dimorfizmus mechanizmusát (Lee és mtsi. 2013, 2015, Valle-Maldonado és mtsi. 2015), a járomspórás gombák patogenitásának genetikai és molekuláris hátterét (Bastidas és mtsi. 2012, Salas és mtsi. 2012, Garcia és mtsi. 2018, Pérez-Arques és mtsi. 2019), vagy egyes, biotechnológiai szempontból potenciálisan kihasználható tulajdonságokat és folyamatokat (pl. karotinoidok, lipidek, zsírsavak, alkohol és enzimek termelése), valamint ezek szabályozását (Sharma és mtsi. 2006, Rodríguez-Frómata és mtsi. 2013, Isarankura Na Ayudhya és mtsi. 2019, Naz és mtsi. 2020).

A Mucorales rend egyes fajai opportunistáknak tekinthetők, amelyek közül a *M. circinelloides* az egyik leggyakoribb halálos kimenetelű mucormikózist kiváltó szervezet (López-Fernández és mtsi. 2018). A Mucorales taxonon belül kialakuló, kórokozó képességgel bíró evolúciós ágak a környezeti niche-hez való alkalmazkodással és új stratégiák megszerzésével emelkedhetek ki nem patogén rokonaik közül (Bliska és mtsi. 2009). Ugyanakkor e fajok különböző törzsei eltérő mértékű virulenciával bírnak, ami arra utalhat, hogy a patogenitási képesség megszerzése kisebb genetikai változások következménye (Li és mtsi. 2011\*).

A *M. circinelloides* egyik jellegzetessége a morfológiai dimorfizmus (Arroyo és mtsi. 2016a), amikor is oxigén hiányában a gomba, élesztő alakot vesz fel (McIntyre és mtsi. 2002, Mysiakina és Funtikova 2008). E jelenség az emésztőszervrendszert érintő mucormikózisoknál is megfigyelhető (Lazar és mtsi. 2014). A *M. circinelloides* fonalas gomba gasztrointesztinális mucormikózist kiváltó képességét mind immunhiányos, mind immunkompetens egyének kapcsán leírták már (Aboltins és mtsi. 2006, Lazar és mtsi. 2014).

A *M. circinelloides* bizonyos tejtermékek romlásáért is felelős. Lee és mtsi. (2014) tejtermékek romlásáért felelős törzsek virulenciáját vizsgálva arra jutottak, hogy azok a klinikai *Mucor* izolátumokhoz hasonlóan virulensnek bizonyultak egér modellben. A tanulmány azt is megjegyezte, hogy az izolátummal fertőzött egerek vastagbél rövidebb volt az egészséges egerekéhez képest (Lee és mtsi. 2014). A vastagbél

lerövidülése gyakran a fekélyes vastagbélgyulladással járó jelenség, amely a gyulladással járó bélbetegség (IBD – *Inflammatory Bowel Disease*) egy előrehaladottabb állapota (Kim és mtsi. 2012). *M. circinelloides* fertőzést követően a baktériumok diverzitása jelentősen megváltozott az egerek bélrendszeri mikrobiótájában, különösképp az *Akkermansia muciniphila* baktériumok és a *Bacteroides* fajok tekintetében. A *Bacteroides* fajokat az IBD-ben észlelt gyulladással járó folyamatok egyik közvetlen okozójaként tartják számon (Saitoh és mtsi. 2002), míg az *A. muciniphila* pozitív kapcsolatban áll a bél egészségével, mivel gátolja a gyulladással járó folyamatokat és erősíti az epitél sejtek integritását (Everard és mtsi. 2013, Reunanen és mtsi. 2015). A *Bacteroides* fajok magasabb, az *A. muciniphila* alacsonyabb szintjét észlelték az egerek bélrendszerében *M. circinelloides* gombával való fertőzést követően, ezáltal megerősítve azt az elképzelést, hogy a mikrobiális összetétel elmozdult egy potenciálisan egészségtelen környezet felé a gombafertőzés hatására (Mueller és mtsi. 2019).

### **3.2.2. A mucormikózist okozó gombák virulenciáját befolyásoló faktorok**

A járomspórás gombák elleni védekező mechanizmusok fontos részét képezik a szérumban található szabad vas speciális vaskötő fehérjék által történő megkötése, a neutrofil granulociták és szöveti makrofágok közvetítette fagocitikus és egyéb folyamatok, valamint az endotél sejtek általi mechanikai védelem (Ghuman és Voelz 2017). Gombafertőzés esetén a szervezet egyik legfontosabb védekezési vonalát a természetes immunválasz sejtjei képezik: a monociták, makrofágok, neutrofil granulociták, dendritikus sejtek, hízósejtek, bazofil és eozinofil granulociták, valamint az epitél sejtek (Schmidt és mtsi. 2016, Roilides és Simitsopoulou 2017).

A bőr és a tüdő alveolusainak részét képező epitél sejtek jelentik a gomba számára az első belépési pontot a gazdaszervezetbe. Az invazív mucormikózis kockázatának kitett betegek esetében gyakran az epitél károsodása figyelhető meg, mely lehetővé teszi a gomba spóráinak extracelluláris fehérjékhez történő adhézióját (Bouchara és mtsi. 1996) és amennyiben a nyugvó spórák ezek segítségével megtapadnak, lehetővé válik a gazdasejtekbe történő invázió (Spreer és mtsi. 2006). Előfordulhat azonban, hogy a szervezet védekező mechanizmusa ezen a ponton sérül (Kontoyiannis és Lewis 2006, Ghuman és Voelz 2017) és a szervezetben megjelenő hifák a neutrofilek kemotaxisát idézik elő, amelyek a növekvő gombafonalakhoz jutva és azok felszínén megtapadva, oxidatív citotoxikus folyamatok révén képesek a hifákat károsítani, illetve elpusztítani. A

közvetlen károsító hatás mellett reaktív oxigén metabolitokat (ROS) és egyéb antimikrobiális enzimeket, továbbá gyulladást keltő citokinek, mint a tumor nekrozis faktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interferon- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ) és interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), valamint kemokinek termelésével indukálják a többi immunsejt aktiválását és toborzását a fertőzött területre, továbbá a T-sejtek differenciálódását (Antachopoulos és Roilides 2005, Wurster és mtsi. 2017). A csökkent immunitású betegek esetén általában mindkét védekezési reakció elégtelen, ezáltal késés vagy teljes hiány alakul ki a korai gyulladós folyamatok lejátsszódásában, mely szövetpusztulást és a fertőzés gyors terjedését vonja maga után (Petrikkos és Tsioutis 2018). A makrofágok képesek gátolni a gombaspórák csírázási folyamatait, azonban az ölési folyamatok nem játszódnak le. Az immunsejtek fagocitáló képességének sérülésekor a szervezet nem képes a gombák szaporodását megakadályozni (Kontoyiannis és Lewis 2006). A neutrofilek kulcsszerepet játszanak a gombás fertőzések leküzdésében: a hifák oxidatív folyamatok révén károsítják, fagocitózis folyamata nélkül (Kontoyiannis és mtsi. 2006, Chamilos és mtsi. 2008a, Hassan és mtsi. 2019). A kortikoszteroid kezelés (Waldorf és mtsi. 1984b), a DKA és a hiperglikémia a szöveti makrofágok és neutrofilek megfelelő működését képes gátolni (Chinn és Diamond 1982, Lecube és mtsi. 2011), míg a neutropénia során a granulociták számának csökkenése segíti elő a gomba invázióját (Gomez és mtsi. 2011, Walsh és Gamaletsou 2013). A *R. delemar* spórái endotél sejtekhez történő adhézióját a GRP78 endoteliális sejtfelszíni receptorok közvetítik, amelynek expressziója a sejtek felszínén jelentősen fokozódik DKA és hiperglikémiás körülmények között a szinuszokban, a tüdőben és az agyban, elősegítve a járomspórák gombák okozta fertőzésekre való hajlam kialakulását (Liu és mtsi. 2010). Az endotél sejteken történő átjutást követően a gombaspórák az érrendszerbe, majd a véráramba kerülnek, ahol a vérlemezkék csírázást gátló és hifakárosító folyamatok révén védekeznek a gombafertőzéssel szemben. A dendritikus sejteket a Mucorales fajok spórái nem, azonban a hifáknak való kitettség aktiválni képes, mely a segítő T- sejtek választ, valamint az interleukin-23 (IL-23) és a TNF- $\alpha$  robusztus felszabadulását eredményezi. Az IL-23 szabályozza a segítő T-17 sejtek, a TNF- $\alpha$  pedig a segítő T 1-sejtek választ (Ghuman és Voelz 2017). Az adaptív immunrendszer másodlagos szerepet játszik a Mucorales által okozott invazív gombás fertőzések elleni védelemben (Roilides és mtsi. 2014). *R. oryzae* és *R. arrhizus* esetében a segítő T-17 sejtek által termelt interleukin-17 (IL-17) azonban elősegíti a neutrofilek toborzását, továbbá a gombaellenes defenzinek felszabadulást, a segítő T 1-sejtek által közvetített INF- $\gamma$  szekréció pedig a hifák károsodását.

A mucormikózis teljes kórfolyamatának kialakulásában nem csak a gazdaszervezet védekező mechanizmusainak sérülése, hanem a kórokozó gomba virulencia faktorai is fontos szerepet játszanak (Casadevall 1999). Jelenlegi tudásunk elsősorban a gazdaszervezet védekező mechanizmusaira vonatkozik, és viszonylag kevés tanulmány összpontosít a kórokozók virulencia faktoraira, pedig a gombák fertőzőképessége nem csupán a gazda vagy a patogén képességeitől függ, hanem azok kölcsönhatásán alapszik (Waldorf és mtsi. 1984a). Virulencia faktornak tekinthetjük a gomba azon tulajdonságait, melyek lehetővé teszik, illetve fokozzák a fertőzőképességét, szerepet játszva a gazda kolonizációjában, illetve a patogén azon képességeit, melyek a gazdaszervezetben történő károsodásért felelősek. Ezen tulajdonságok azonosítása, genetikai és funkcionális analízise, továbbá a patogénitási folyamatok hátterének feltárása szükséges az újonnan megjelenő és a korábbi, növekvő rezisztenciával bíró gombák elleni védekezéshez. A virulencia faktorok azonosítása lehetőséget nyújt új terápiás célpontok azonosítására, valamint hatékonyabb gombaellenes szerek és módszerek kidolgozására.

A Mucorales rend képviselői számos olyan tulajdonsággal bírnak, melyek elősegítik a mucormikózisok agresszív, gazdaszervezetet romboló lefolyását. Ilyen például a 37 °C-on való növekedési képesség az invazív mucormikózisokat kiváltó (Kaerger és mtsi. 2015) és a spórák mérete a légzőszervet fertőző gombák esetében (Li és mtsi. 2011\*); a dimorfizmus jelensége (Lee és mtsi. 2013); a gazdaszervezet vaskészletének felhasználása a gomba növekedéséhez és fejlődéséhez (Lewis és mtsi. 2013); valamilyen extracelluláris enzim termelésének képessége; az endotél sejtek felszínéhez való kötődés; olyan gének csendesítése a gazdaszervezetben, melyek a patogén felismerésben, a gombaellenes immunválaszban és szövet regenerációban játszanak szerepet (Binder és mtsi. 2014); továbbá az INF- $\gamma$  expressziójának gátlására való képességük (Schmidt és mtsi. 2013).

Gombafertőzések esetén a gazdaszervezet fagocitáló sejtjei receptoraik segítségével (mintázatfelismerő receptorok) ismerik fel a patogén gomba sejtfalának bizonyos elemeit (patogén asszociált molekuláris mintázatokat) nagymértékben befolyásolva a patogén felismerését és a továbbiakban a szervezetből történő eltávolítás hatékonyságát is. A gomba sejtfalösszetétele tehát fontos tényező a gazda-patogén interakciók során. A gazdaszervezetbe való bejutást követően a spórák csírázási és a sejtekbe való behatolási képessége határozza meg a fertőzés további kimenetelét (Pérez-Arques és mtsi. 2019). *Mucor* spórákkal történő fertőzéskor állatmodellekben a legelső folyamatok közé sorolandók a fagocita sejtek toborzása, a spórák internalizálása, továbbá

a granulómák kialakulása. A fagocitózis folyamata megakadályozza a spórák csírázását a gazdaszervezetben, így tehát a korai immunválasz hiánya disszeminált fertőzésekhez vezethet (Voelz és mtsi. 2015, Inglesfield és mtsi. 2018). A virulens *Mucor* spórák azonban képesek túlélni a fagoszómák belsejében, továbbá a csírázási folyamatok is lezajlanak (Li és mtsi. 2011\*). Ebben a szakaszban a sejtfal és sejtmembrán biogenezisével kapcsolatos folyamatok upregulálódnak a spórákban, előrejelezve a sejt felszínének és a gyors hosszanti növekedésnek fontosságát a fagoszómában való túlélés során (Meyers és mtsi. 2017).

Az egyik legáltalánosabb virulencia faktor a Mucorales gombacsoport esetében az emberi szervezetre jellemző, magasabb hőmérsékletre való adaptálódás. A gomba testhőmérsékleten való növekedési képessége alapvető feltétele az invazív szisztémás megbetegedések kialakulásának (Kaerger és mtsi. 2015).

A Mucorales rend egyes képviselői a környezeti feltételektől, illetve a tenyésztési körülményektől függően, egyszer fonalas, másszor pedig élesztő, vagy élesztőszerű formában képesek nőni (Wolff és mtsi. 2002). A dimorfizmus jelensége a hámrétegbe való penetráció és a mélyfertőzés kialakulásának egyik kulcsfaktora (Orlowski 1991). Az élesztő-fonalas átmenet a gomba kalcineurin útjának szabályzása alatt áll (Lee és mtsi. 2013) és ahogy más dimorf gombák esetén is, a kalcineurin a nukleuszba szállított transzkripciós faktorok defoszforilációjával a célgének expresszióját idézi elő (Boyce és Andrianopoulos 2015). A *M. circinelloides* esetében a *cnbR* gén elrontása, valamint kalcineurin inhibitorok hozzáadása megakadályozza az élesztőfázisból való kilépést, továbbá kevésbé virulens mutánsokat eredményez (Lee és mtsi. 2013, 2015), míg a *cnaA* gén delécióna a sejtfal szerkezeti változásait és virulensebb, nagyobb méretű spórák megjelenését vonja maga után. A nagyobb spórák ugyanis közvetlenül a makrofágok általi fagocitózisukat követően intenzív csírázási folyamatokba kezdenek, mely menekülési útvonalként funkcionál a gazdaszervezet immunsejtjeinek elimináló hatása előtt (Li és mtsi. 2011\*).

A vas az emberi szervezetben általában hordozófehérjével együtt, kötött formában van jelen, mely a gomba számára nem, vagy csak igen kismértékben hozzáférhető (Bullen 2006). A vas azonban számos oxido-redukciós folyamat kofaktoraként esszenciálisnak tekinthető a mikroorganizmusok számára, így szükség van olyan hatékony enzimrendszerek jelenlétére, melyek a vas felvételét és annak szabályozását képesek megvalósítani (Eide 1997). Bizonyított továbbá, hogy *Rhizopus* fajok endotél sejtekbe történő bejutása a gazdaszervezet vaskészleteitől függő folyamat

(Liu és mtsi. 2010). A vashiányos környezethez való alkalmazkodást a Mucorales rend képviselői két fő stratégia útján valósítják meg: nagy affinitású vastranszporterek segítségével, illetve főleg polikarboxilsav jellegű sziderofórok termelésével (Navarro-Mendoza és mtsi. 2018b), mint például a *Rhizopus* fajok által termelt rhizoferrin (Thieken és Winkelmann 1992, Carroll és mtsi. 2017). A járomspórás gombák virulenciája kapcsán azonban nem tulajdonítanak túlzottan nagy szerepet az általuk termelt sziderofóroknak, ugyanis a rhizoferrin a deferoxaminhoz képest kevésbé képes a szérumban fellelhető vas megkötésére, továbbá a deferoxamin-kötött vas nem kötődik a transferrinhez, ezért felvétele a gombasejtekbe akadálytalanul lezajlik (de Locht és mtsi. 1994).

Szintén a *Rhizopus* fajokra jellemző, hogy rendelkeznek olyan sziderofór transzport rendszerekkel is, amelyek más mikroorganizmusok által termelt ún. xenosziderofórok felvételét biztosítják. Klinikai megfigyelések, illetve állatkísérletek alapján bebizonyították, hogy a járomspórás gombák képesek a deferoxamin-kelátolt vas hasznosítására, így a deferoxamin használata a klinikumban jelentősen megnöveli a betegek fogékonyságát az ilyen jellegű mikózisok kialakulására (Liu és mtsi. 2015, Chitasombat és Kontoyiannis 2018).

A gombák által termelt extracelluláris enzimek, mint például a *R. oryzae* által termelt szerin-proteázok és szénhidrát-aktív enzimek szerepet játszhatnak az adhézió folyamatában, a tápanyag felvételében, a szövetekben történő terjedésben és a disszeminációban (Hassan és Voight 2019).

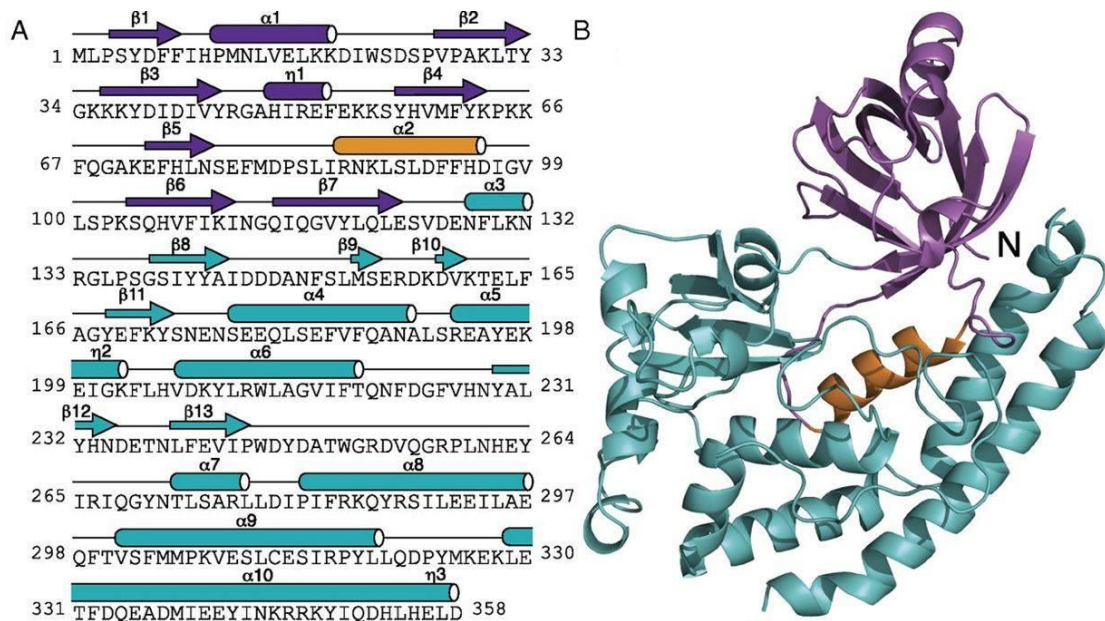
### 3.3. A CotH fehérjecsald, mint lehetséges virulencia faktor

#### 3.3.1. A CotH fehérjék felfedezése és szerepe baktériumokban

A CotH fehérjét a *Bacillus subtilis*-ban írták le először (Naclerio és mtsi. 1996). Kedvezőtlen körülmények között a baktériumsejt endospórát képez, ilyen formában akár hosszú évekig is nyugalmi állapotba kerülhet. A spórafalat (*coat*) legalább 50 fehérjetípus alkotja (Naclerio és mtsi. 1996, Kim és mtsi. 2006) és két fő rétegre különül el; egy elektrondenz külső, és egy lamelláris szerkezetű belső rétegre, ezáltal egy védelmi gyűrű alakul ki a baktericid hatású enzimek és kemikáliák ellen (Naclerio és mtsi. 1996). A patogenitási folyamatokban is számos módon szerepet játszó spórafal a fajokra nézve egyedi, dinamikus struktúra, mely nemcsak a gombasejt alakját, ozmotikus és

mechanikai védelmét biztosítja, hanem antigén révén a gomba felismerését teszi lehetővé az immunrendszer számára, továbbá az adhéziós folyamatok közvetítője is.

A CotH fehérjék atipikus protein-kinázok, illetve egyes esetekben különböző mikroorganizmusok spóráinak strukturális alkotórészét képezik (Lax és mtsi. 2020). Ortológjaik számos gombafajban is megtalálhatók, lokalizációjuk főként a spóraburok felszínére tehető (Saggese és mtsi. 2014). A CotH fehérjék kináz természetét alátámasztja a CotH fehérjék HipA és a foszfoinozitol 4-kináz családdal való szerkezeti hasonlósága is (Scott és Newton 2016). Rendelkeznek egy ATP-kötő zsebbel, valamint aktivációjukhoz kétértékű kationra van szükség, amely rendszerint  $Mg^{2+}$  vagy  $Mn^{2+}$ . Baktériumok esetében a CotH fehérje egy 362 aminosavból álló, 42,8 kDa méretű polipeptid képződik (Naclerio és mtsi. 1996, Zialho és mtsi. 1999), melynek szerkezete [3. ábra] atipikus protein-kináz szerű feltekeredést mutat (Nguyen és mtsi. 2016), és két spórafalat alkotó fehérjét, a CotB-t és a CotG-t foszforilálja (Zilhao és mtsi. 1999). A *cotH* gén eltávolítása kihat a külső spóraburok felépítésére, továbbá csírázásdeficiens fenotípussal jár, bár ennek a folyamatnak a mechanizmusa még nem ismert (Naclerio és mtsi. 1996).



**3. ábra.** Egy CotH fehérje szerkezete és AS sorrendje *B. cereus* baktériumban. **A)** Kékkel a C-terminális, lilával a fehérje N-terminális doménje került jelölésre, a narancssárga szín egy a kinázokra jellemző alfa hélixet ábrázol. **B)** A CotH fehérje másodlagos szerkezeti elemeit kódoló AS szekvencia részletek, az **A)** pontnak megfelelő színekkel ellátva (Nguyen és mtsi. 2016).

*Bacillus cereus* esetén is a CotB és a CotG fehérjék tekinthetők a CotH szubsztrátjának (Nguyen és mtsi. 2016). A CotG fehérje, amely a külső rétegben helyezkedik el, szorosan együttműködik a CotH fehérjével, és jelentős szerepük van az endospóra szerkezetének kialakításában és működésében (Saggese és mtsi. 2014). Továbbá ismert, hogy a CotH fehérje a *cotE* és *gerE* gének szabályozása alatt áll. A *cotE* mutáns spórák esetében a külső burok teljesen hiányzik, míg a *gerE* mutánsoknál a belső réteg nem tud kialakulni. Így a kettős kontroll hiányában a CotH fehérjének megfelelő polipeptid nem képződik (Zilhao és mtsi. 1999). A CotH fehérjék nem csak prokarióta szervezetekben, hanem egyes alacsonyabbrendű eukariótákban, illetve gombákban is megtalálhatók (Gebremariam és mtsi. 2014). Több, mint 2000 CotH homológ szekvencia alapú analízise után megállapították, hogy a bakteriális eredetű CotH fehérjék 30%-a, míg az eukarióta eredetűek 60%-a hordoz szekréciós szignál szekvenciát (Nguyen és mtsi. 2016). A proteincsaládok adatbázisa (Pfam – *Protein Families Database*) alapján a CotH fehérjék hordoznak egy ún. CotH kináz-szerű domént, melyet gyakran követ valamely  $\beta$ -redőkben gazdag egyéb domén, például fibronektin-szerű-domén (Pfam: PF13287), lamin fehérje domén (Pfam: PF00932), kitobióz/HEXB C-terminális domén (Pfam: PF03174), vagy cellulózt kötő domének (Pfam: PF00553). Ezen domének általában valamely szénhidrát megkötéséért felelősek. Számos CotH fehérje tartalmaz továbbá dockerin I-es típusú ismétlődéseket, melyeknek ismert szerepük van a celluloszóma kialakításában (Nguyen és mtsi. 2016).

### 3.3.2. A CotH fehérjék szerepe fonalas gombákban

41 Mucorales izolátum genomját vizsgálva a CotH fehérjék kivétel nélkül prediktálhatóak voltak a patogén képviselők között, amely megfigyelés a virulenciában betöltött esetleges szerepükre utal (Chibucos és mtsi. 2016). A mucormikózisok kapcsán a leggyakrabban izolált faj, a *R. delemar* nyolc különféle CotH fehérjével rendelkezik, melyek közül hat (CotH1-3 és CotH6-8) hordozza a felszíni „MGQTNDGAYRDPTDNN” AS szekvenciát. Ez a motívum a gombaspórák és a gazda endotél sejtei közötti specifikus kölcsönhatás meghatározó tényezője, amely nélkülözhetetlen a gomba további inváziójához (Chibucos és mtsi. 2016, Lax és mtsi. 2020). A CotH3 fehérjével való AS szekvencia hasonlóság alapján valószínűsíthető továbbá e fehérjecsalád jelenléte a következő gombafajok esetén is: *L. corymbifera*, *Lentamyces parricida*, *M. circinelloides*, *M. racemosus*, *M. velutinous*, *Mortierella verticillata* és *R. stolonifer* (Gebremariam és mtsi. 2014). *Mucor* fajok transzkriptomikai



analízise egy-egy „MGQTNDGAYRDPTDNN” AS szekvenciát hordozó *Rhizopus* CotH2/CotH3 és RO3G\_15938 fehérjét kódoló gén homológot azonosított *M. circinelloides*-ben, és összesen 16 CotH-szerű fehérjét prediktált (Annie és mtsi. 2018). A *cotH* transzkriptek száma kétszerese volt a patogénnek vélt törzsek transzkriptomjában, mint a sajtgyártás során alkalmazott *Mucor* törzsek esetében (Annie és mtsi. 2018).

A GRP78 (más néven BiP) a Hsp70 család ER-ben működő tagja, melynek elsődleges szerepe a fehérje foldingban van (Gonzalez-Gronow és mtsi. 2009) és a gomba spóráinak endotélsejtekbe való belépést is közvetíti. A stresszkörülmények a GRP78 receptorok ER-ből történő felszabadulását és a sejtfelszínen való megjelenését idézik elő, kitéve az endotél sejteket a gombaspórák adhéziójának (Ibrahim és mtsi. 2019). A *Rhizopus* nemzetségben azonosított CotH protein kinázok közül kettőnek (CotH2 és CotH3) az endotél sejtekhez való kapcsolódásban, és ez által az endotél sejtekbe történő invázióban van szerepe, míg a többi CotH protein szerepe egyelőre ismeretlen (Gebremariam és mtsi. 2014).

A CotH fehérjéknek a gomba patogenitásában való szerepét előre jelezheti az a tény is, hogy a Mucorales rend patogén képviselői körében a CotH fehérjecsalád jelenléte kimutatható (Gebremariam és mtsi. 2014). A rágcsálók közül az egerek a legszélesebb körben használt modellállatok a mucormikózis tanulmányozására (Schulze és mtsi. 2017, Baldin és mtsi. 2018). Az egér modellekben számos klinikai szempontból fontos járomspórás gombafertőzéssel kapcsolatos jellemzőket tanulmányoztak (Kamei 2001, Gebremariam és mtsi. 2017a), beleértve az emésztőszervrendszeri (Kaur és mtsi. 2018, Mueller és mtsi. 2019), vagy a mucormikózis mélyebb szerveket érintő és szisztémás formáit, amelyeket kísérleti úton indukálnak az állatokban (Lee és mtsi. 2014), illetve a megbetegedésre hajlamosító alapbetegségek jelentőségét (Schulze és mtsi. 2017, Corzo-Leon és mtsi. 2018). Annak érdekében, hogy a klinikai állapotoknak megfelelő kísérleti járomspórás fertőzéseket tanulmányozzanak, nemcsak immunkompetens egerekben, hanem különböző módon immunszuppresszált (például ciklofoszfammal, 5-fluorouracillal vagy kortizon acetáttal) (Ibrahim és mtsi. 2007b, Watkins és mtsi. 2018, Salas és mtsi. 2012, Luo és mtsi. 2014) illetve megbetegített (például *diabetes mellitus* kiváltása sztreptozotocinnal) egerekben is végeztek már megfigyeléseket (Liu és mtsi. 2010, Luo és mtsi. 2014, Gebremariam és mtsi. 2016). A *R. delemar* CotH3 fehérjéje ellen termeltetett IgG poliklonális antitestek alkalmazása megvédte a DKA-ban szenvedő egereket a mucormikózisos megbetegedéstől, továbbá ez a védő hatás megfigyelhető volt neutropéniás egerek esetében is (Gebremariam és mtsi. 2014). A *R. delemar* CotH3

fehérje ellen termelt IgG poliklonális antitestek más, rokon fajok (*L. corymbifera*, *Cunninghamella bertholletiae*, *M. circinelloides*, *M. ramosissimus* és *Rhizomucor* spp.) esetén is védelmet jelentett a mucormikózisos fertőzéssel szemben, amely leginkább a *Rhizomucor* és *Apophysomyces*, legkevésbé a *Mucor* fajok esetén mutatkozott meg (Gebremariam és mtsi. 2014). Továbbá az antitestterápia a szinergikus hatás elérése céljából gombaellenes szerekkel kiegészítve tovább javította a DKA egereknek *R. delemar* fertőzéssel szembeni ellenállóságát. Ezen kutatási eredmények alapján az anti-CoH3 antitestek használatát ígéretes kiegészítő immunterápiás lehetőségként azonosították a humán gyógyászat számára, egy olyan, gyakran halálos betegség ellen, amelynek kezelése gyakran kihívást jelentő feladat (Gebremariam és mtsi. 2019).

Mivel a CoH génfamilia jelenléte egyetemesnek tekinthető a Mucorales rend patogén fajai körében, így az általuk kódolt fehérjék potenciális markerek lehetnek a mucormikózisos megbetegedések gyors diagnosztizálásában. Egérmodellben a *R. delemar* (*R. oryzae*), *M. circinelloides*, *L. corymbifera* és *C. bertholletiae* fonalas gombával történő intraracheális fertőzést követő 24. órában kimutatható a CoH fehérjéket kódoló nukleinsavak jelenléte a vérplazmából, vizeletből és a bronchoalveoláris mosás által kinyert mintákból, amely hozzájárulhat a gyors és hatékony fajazonosításhoz (Baldin és mtsi. 2018).

### 3.4. A patogenitás genetikai hátterének vizsgálata

A járomspórás gombák számos biológiai folyamatának és anyagcsere útvonalának hátterében álló genetikai és molekuláris folyamatok vizsgálata többek közt a bennük szerepet játszó gének módosításával és a mutánsok karakterizálásával történik. A patogenitás hátterének vizsgálata nagyfokú örökléstani és molekuláris ismeretek, valamint hatékony transzformációs rendszerek alkalmazását igényli. Elengedhetetlen szempont a vizsgálni kívánt gének kifejeződése, a megfelelő szelekciós markerek megválasztása, valamint a bevitt DNS stabil fennmaradása és replikációja.

#### 3.4.1. DNS bejuttatása járomspórás gombákba

Transzformációs rendszerekkel lehetőségünk van különböző DNS szakaszokat bejuttatni a járomspórás gombákba (akár genomi integrációval, akár önállóan replikálódó elemként), és utána az így bevitt gén(ek) szerepére következtetni. Egyes járomspórás gombafajok esetében (pl. *M. circinelloides*, *Mortierella alpina*) rendelkezésünkre állnak

megbízható genetikai transzformációs rendszerek a gombák genetikai módosítása céljából, úgy, mint a PEG-mediált protoplaszt transzformáció, az *Agrobacterium tumefaciens*-közvetítette transzformáció (ATMT – *Agrobacterium tumefaciens*-Mediated Transformation), az elektroporáció és a biolisztikus módszer, azonban stabil integratív, illetve null-mutánsok előállítását lehetővé tevő technika kidolgozása továbbra is kihívást jelentő feladat (Ibrahim és Skory 2007). A vizsgálatunk tárgyát képező *M. circinelloides* gomba első sikeres transzformációját 1984-ben hajtották végre a gomba leucin auxotrófiáját komplementálni képes vad típusú (VT) *leuA* gént tartalmazó cirkuláris plazmiddal (van Heeswijck és Roncero 1984). A 2000-es évek elejétől kezdve az exogén DNS elektroporációval való bejuttatása is tért nyert (Schilde és mtsi. 2001, Torres-Martínez és mtsi. 2016, Lee és mtsi. 2013), mely során az intakt sejtek (pl. spórák) vagy protoplasztok sejt falát és a sejtmembránt nagyfeszültségű elektromos impulzusnak teszik ki, átjárhatóvá téve a bejuttatni kívánt DNS számára. Az elektroporáció, melyet a *M. circinelloides* esetében is sikerrel alkalmaztak (Gutiérrez és mtsi. 2011) elvégezhető szferoplasztokon (Kothe és Free 1996) és csírázó spórákon is (Chakraborty és Kapoor 1990). A Mucorales rend tagjain több esetben is alkalmazásra került a biolisztikus módszer (különösen az ipari és biotechnológiai fejlesztések során) (Gonzalez-Hernandez és mtsi. 1997, Bartsch és mtsi. 2002, Skory 2002, Ibrahim és Skory 2007) és az ATMT-t is (Monfort és mtsi. 2003, Nyilasi és mtsi. 2005). A biolisztikus módszer előnye, hogy előkezelés nélküli, intakt gombasejteken is alkalmazható, így segítségével olyan fajok is transzformálhatóak, melyeknél a protoplasztképzés csak nehezen vagy egyáltalán nem megoldható (Klein és mtsi. 1987, Hazell és mtsi. 2000). Az ATMT során gyakran megvalósul az egykópiás integráció, járomspórás gombák esetén azonban stabil transzformánsok ritkán figyelhetők meg. A leggyakrabban alkalmazott génmódosítási eljárás *M. circinelloides* esetén a protoplasztok PEG-közvetítette transzformációján alapszik, melynek előfeltétele a gomba glükán-, mannán- és kitintartalmú sejt falának lítikus enzimátikus emésztése (Iturriaga és mtsi. 1992).

### 3.4.2. A transzformálás során bejuttatott DNS sorsa

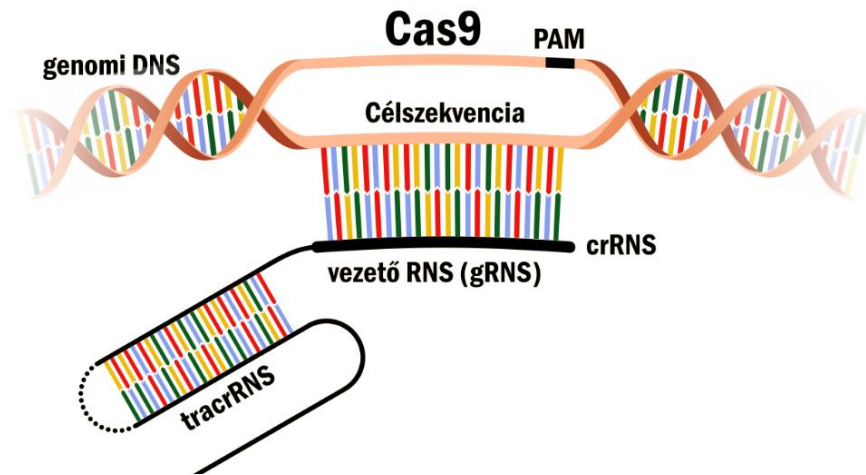
A bejuttatni kívánt cirkuláris DNS a transzformációt követően általában autonóm replikálódó elemként, episzómálisan marad fenn (Iturriaga és mtsi. 1992, Benito és mtsi. 1992, Ortiz-Alvado és mtsi. 2006), a genomba történő, általában ektopikus integráció igen ritka eseménynek tekinthető (Skory 2002, 2004, 2005). További nehézséget jelenthet a cirkuláris plazmidokkal létrehozott mutánsok mitotikus

instabilitása és a szelekciós nyomás megszűnése utáni plazmidvesztés (Appel és mtsi. 2004, Ortiz-Alvarado és mtsi. 2006 Ibrahim és Skory 2007). A transzformáló DNS integrációja a genomba homológ rekombináción alapuló hibajavítási útvonal segítségével is kikényszeríthető, mely extenzív (>1000 bp homológ szakaszokat tartalmazó lineáris DNS fragmentumok használatát igényli (Ibrahim és Skory 2007). Ilyenkor a transzformációs gyakoriság jellemzően alacsony, feltehetőleg egy, a gazdagenomot védő mechanizmusnak köszönhetően, amely meggátolja az idegen DNS genomba történő integrációját és fennmaradását (Obraztsova és mtsi. 2004, Ibrahim és Skory 2007). A lineáris fragmentumokkal való transzformálás során fellépő probléma továbbá a DNS templát esetleges gyűrűvé záródása és autonóm replikálódó elemmé válása, mely a transzformánsok instabilitását növelheti, továbbá gyakran ektopikus integrációhoz és/vagy nem kívánt átrendeződésekhez, konkatamerek képződéséhez vezet (Michielse és mtsi. 2004, Ibrahim és Skory 2007, Meussen és mtsi. 2012, Papp és mtsi. 2013). A Mucorales fajok esetében a bejuttatott plazmid DNS általában nem integrálódik a genomba, akkor sem, ha a plazmid nagyobb, a gazdagenommal homológ szakaszokat hordoz (Skory 2002, 2004, 2005). A fentebb említett nehézségek nagyban megnehezítik a Mucorales renden belül a mutáns könyvtárak felépítését, a génfunkciók jellemzését, a patogenitás vizsgálatokat vagy egyéb a rekombináns törzsek fejlesztésére irányuló kutatásokat.

### **3.4.3. A CRISPR-Cas9 rendszer, mint lehetséges génszabályozó eszköz**

A CRISPR-Cas9 rendszer alapja a baktériumok és archeák nukleinsav-alapú, adaptív immunrendszereként funkcionáló mechanizmus, mely a folyamatosan változó vírusgenomok és idegen plazmidok elleni védelemben játszik szerepet (Marraffini 2015). *E. coli* baktérium genomjában mindaddig ismeretlen sajátos, ismétlődő szekvencia elemeket azonosítottak, melyeket „halmozottan előforduló, szabályos közőkkel elválasztott palindromikus ismétlődéseknek” (CRISPR) nevezték el (Ishino és mtsi. 2018), melyek hasonlóságot mutattak bakteriofágok, ősi vírusok és plazmidok szekvenciáival, így felmerült a lehetősége annak, hogy a rendszer esetlegesen egy egyszerű adaptív „immunrendszer” egyes prokarióták számára (Mojica és mtsi. 2005). Ezt követően összehasonlító genomikai elemzések rávilágítottak arra, hogy a Cas enzimek a CRISPR rendszerrel szorosan együttműködve alakítják ki azt a védekező mechanizmust, mely által a baktériumsejtbe behatoló idegen nukleinsavak felismerésre kerülnek, majd feldarabolódnak (Makarova és mtsi. 2006). Az ismétlődések között olyan

szekvenciák fedezhetők fel (helykitöltők), melyek bázissorrendje teljesen azonos bizonyos prokariótákat fertőzni képes plazmidok és bakteriofágok egy-egy részletével (Pourcel és mtsi. 2005, Mojica és mtsi. 2005) és számuk fágfertőzést követően gyors ütemben növekszik. A CRISPR-helykitöltő szakaszok közelében fedezhetők fel a *cas* gének, melynek mintegy 45 géncsaládja ismert (Haft és mtsi. 2005). A baktériumok vírusok elleni védekező mechanizmusának első szakaszában a víruseredetű nukleinsavak a baktériumsejtbe való bejutásukat követően, a Cas fehérje komplex által elvágódnak. A virális genom azon szakaszát, mely a Cas proteinek segítségével kivágásra kerül és beépül a baktérium genomjába, protospacer-nek nevezzük. A protospacer kiválasztása nem véletlenszerű: gyakran protospacer melletti motívum (PAM – *Protospacer Adjacent Motif*) szekvencia határolja a CRISPR lókuszbba beillesztendő génszakaszt. A PAM szekvenciák bázisösszetétele eltérhet az egyes Cas proteinek között. A *S. pyrogenes* Cas9 fehérjéjének PAM szekvenciája egy három bázispár hosszúságú 5'-NGG szakasz (ahol az N tetszőleges bázis lehet). Ettől a PAM szekvenciától fentebbi irányban lévő ~24-48 bázispáros szakasz kerül kivágásra és beillesztésre a bakteriális kromoszóma CRISPR lókuszanak rövid (~30 bp), palindrom szekvenciái közé. Így a baktérium genomjában létrejön egy olyan struktúra, mely az ismétlődő szekvenciák között tartalmazza a virális genom rövid helykitöltő (*spacer*) DNS szakaszait. A keletkező helykitöltő szekvencia a CRISPR lókuszbba beépülve helykitöltő szakasszá válik, majd a CRISPR lókuszról ezt követően egy kisméretű pre-transzkriptum (pre-crRNS) íródik át, mely kapcsolódási felületet biztosít a transz-aktiváló crRNS-ek (tracrRNS) és a Cas9 endonukleáz számára, melyet a polimeráz III RNS-fehérje komplex általi hasítás követ. Minden crRNS (Crispr-RNS) két részből tevődik össze: egy virális spacer és egy gazda eredetű ismétlődő (*repeat*) szekvenciából. Mivel az idegen DNS identikus a Cas nukleázzal komplexet alkotó crRNS spacer szakaszával, ezért a nukleáz képes felismerni és elhasítani a vele komplementer szekvenciát, tompa végű kettős törést hozva ezzel létre a vírusgenomban (Arras és mtsi. 2016). Egy esetleges új fertőzés esetén a Cas enzimek a helykitöltőkről másolt crRNS-ek segítségével ismerik fel és iktatják ki a célszekvenciát [4. ábra].



**4. ábra.** A CRISPR-Cas9 rendszer alkotóelemei: PAM (3 bázispáros szakasz, ami mellett a *Cas9* hasítani képes), vezető RNS (egyszálú RNS, mely az enzimet célzott helyre irányítja), a tracrRNS és crRNS (mely összekapcsolható egy loop motívumon keresztül); Cas9 (dsDNS hasítást végző endonukleáz enzim).

A crRNS-el és tracrRNS-el végzett kísérletek során kiderült, hogy a kétféle RNS akár fuzionált formában, egyetlen vezető RNS-ként (*single-guide* RNS – sgRNS) is expresszálnak (Nødvig és mtsi. 2015). Az így létrehozott szintetikus, kiméra sgRNS bázispárosodással képes felismerni, és Cas9 endonukleázzal való kölcsönhatás révén elhasítani a kívánt célszekvenciát. A célszekvencia felismerése és hasítása tehát szekvencia komplementaritást igényel a crRNS és a DNS között, és egy PAM motívumot a célszekvencia 3' végén (Mali és mtsi. 2013). A mindössze 20 nt hosszúságú vezető RNS szál megváltoztatásával a CRISPR-Cas9 rendszer alkalmas lehet nemcsak virális nukleinsav, hanem bármilyen DNS szekvencia kívánt helyen történő hasítására, mely alkalmassá teszi a célzott génmanipuláció megvalósítására, továbbá a CRISPR rendszer több, egyedi vezető-RNS (gRNS) egyidejű használatát is lehetővé teszi, mely lehetőséget teremt több lókuszt egyidejű megcélzására is. Ez a rendszer emiatt igen rugalmasnak, költséghatékonynak, kevésbé időigényesnek tekinthető, valamint könnyebb tervezhetőséget és jobb célozhatóságot tesz lehetővé (Sander és Joung 2014).

A CRISPR-Cas9 génmanipulációs módszer alapja a helyspecifikus DNS-kettős száltörés (DSB – *Double-Stranded Break*), a DNS egyszálú törés (SSB – *Single-Stranded Break* („*nick*”), melyek endogén javító mechanizmusok aktiválását, majd az ezt követő hibajavítást indukálják (Jiang és Marraffini 2015). A hibajavításnak, annak alapján, hogy jelen van-e homológ DNS templát, két fő mechanizmusa lehetséges (Jackson 2002). A NHEJ (*Non-Homologous End-Joining*) a nem homológ végek összekapcsolását, ligálását

jelenti (Chang és mtsi. 2017). Ezen útvonal működése során kisebb deléciók, illetve inszerciók jönnek létre, ugyanis a törött szálvégek gyakran nem tartalmazzák a ligáláshoz szükséges 3'OH, illetve 5' foszfát csoportokat, ezért a törött szálvégekhez a Ku70/Ku80 fehérjékből álló komplex, majd exonukleáz aktivitású fehérjék (Mre11-Rad50-Xrs2 komplex) kapcsolódnak és visszaemésztnek néhány bázispárt a törött végekről, ami véletlenszerű folyamat és mutációt eredményezhet. Ezt követően a DNS szál folytonosságát a DNS ligáz IV általi ligálás állítja helyre (Mehta és Haber 2014). A homológ rekombináción alapuló hibajavítás (HDR – *Homology-Directed Repair*) az NHEJ-vel ellentétben hibamentes javító mechanizmus, melyhez szükséges egy ép, homológ templát DNS jelenléte (Zhao és mtsi. 2017). A HDR első lépése egy hosszú, néhány száz bázispáros 3' túlnyúló vég létrehozása a törött DNS molekulán. A szabaddá vált 3' túlnyúló vég stabilizálását a DNS-kötő fehérje (RPA) fehérje egységek, majd a Rad51 fehérje végzi, mely funkcióját tekintve a szekvencia homológia keresésének és felismerésének fehérjéje (Mehta és Haber 2014). A templát alapú javítás a DNS-molekulaszakaszok igen precíz (bázis pontosságú) reciprok cseréje, ezért inszertek és deléciók jelenléte nem gyakori a HDR javító mechanizmust követően (Wright és mtsi. 2018). A CRISPR-Cas9 rendszer működése során indukált DNS-törést követően a HDR során a natív szekvencia helyett gyakorlatilag bármilyen, akár markergénnel vagy restriktációs hellyel ellátott HDR-templát alkalmazása is lehetséges, mely megkönnyíti a sikeres HDR események nyomon követését (Cong és Zhang 2015). A HDR felhasználható a genom specifikus szerkesztésére, beleértve a gének kiütését és inszercióját, helyettesítését és pontmutációk létrehozását (Arnoult és mtsi. 2017). Fonalas gombák esetében a NHEJ (Nødvig és mtsi. 2015, Wenderoth és mtsi. 2017, Wang és mtsi. 2016) és a HDR (Zhang és mtsi. 2016, Pohl és mtsi. 2016) mechanizmusra épülő stratégia is fellelhető a CRISPR-Cas9 rendszert alkalmazó célzott génszerkesztési eljárások között.

A CRISPR-Cas9 rendszer fonalas gombákban történő alkalmazására számos stratégia született, mely magába foglalja a Cas9 endonukleáz és az sgRNS-t kódoló DNS szekvencia integrációját a gazdagenomba, vagy pedig ezen elemek plazmidon történő bevitelét a rendszerbe (Arras és mtsi. 2016, Shi és mtsi. 2019); a Cas9 fehérjét kódoló DNS-sel történő transzformációt követően, *in vitro* átírt sgRNS-ek alkalmazását (Chen és mtsi. 2018); egy előre összeállított Cas9/sgRNS ribonukleoprotein (RNP – *Ribonucleoprotein*) komplexszel való génszerkesztési megközelítést (Wang és mtsi. 2018). Egyes esetekben a Cas9 enzimet kódoló gént tranziensen, egy replikációs origó és a gazdagenommal homológ szekvencia nélküli plazmid részeként juttatják be genomba,

ahol ko-transzformálódik a szelekciós markert hordozó donor DNS-sel együtt kerül a sejtbe (Araozé és mtsi. 2015, Huck és mtsi. 2019), míg egy másik stratégia szerint az endonukleáz kódoló gént egy autonóm módon replikálódó szekvenciát (ARS) hordozó önreplikálódó plazmiddal tartják fenn mindaddig, míg a szelekciós nyomás fennáll (Wenderoth és mtsi. 2017).

Bár a CRISPR-Cas9 rendszer általi génszerkesztés során az RNS irányította nukleázok általában pontosan hasítják a célszekvenciát, lehetséges hátrányként mégis említést kell tennünk az esetleges *off-target* hasításról, melyek nem kívánatos NHEJ-indukálta indelek keletkezéséhez vezethetnek. Ennek elkerülésének egy lehetséges módja a komplement régió 5' végén rövidebb (17-18 nt nagyságú), csonkolt vezető RNS-ek (*truncated* gRNS – *tru-gRNS*) használata (Sander és Joung 2014).

A CRISPR-Cas9 gyors és megbízható genommodosító eszközt kínál a mutáns törzsek előállításához, mely mind az alap, mind az alkalmazott kutatásban segítségül szolgálhat, azonban járomspórás gombák esetén korábban nem alkalmazták.



## 4. CÉLKITŰZÉSEK

Annak ellenére, hogy a járomspórás gombák kiváltotta fertőzések klinikai jelentősége egyre inkább nő, keveset tudunk a fertőzőképességüket meghatározó virulencia faktorokról. Ezen mechanizmusok meghatározása és alapos vizsgálata a jövőben új, hatékonyabb, célzott terápiás kezelések alapját képezhetik. Ehhez elsősorban egy olyan megbízható és könnyen alkalmazható génszabályozó eszközre van szükségünk, melynek segítségével megvalósítható a gazda-patogén interakcióban szereppel bíró gének feltérképezése, funkciójuk megismerése.

Ennek érdekében a következő célok megvalósítását tűztük ki:

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

## 5. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

### 5.1. A kutatás során felhasznált törzsek, sejtvonalak

Transzformációs kísérleteinkhez a *M. circinelloides* f. *lusitanicus* CBS277.49 izolátumot és ennek *leuA*<sup>-</sup> és *pyrG*<sup>-</sup> kétszeres auxotróf mutáns MS12 törzsét alkalmaztuk (Benito és mtsi. 1992, *Szeged Microbial Collection, University of Szeged, Hungary* (SZMC) 12082). Kísérleteinkhez felhasználtuk továbbá a *M. circinelloides* f. *lusitanicus* CBS277.49 izolátum *leuA*<sup>-</sup> és *pyrG*<sup>-</sup> kétszeres auxotróf mutáns MS12 törzsének *pyrG* komplementált (MS12+*pyrG*) törzsét, melyet kutatócsoportunk CRISPR-Cas9 génszerkesztéssel hozott létre.

A fagocitózis vizsgálatok során BALB/c nőstény egerek tumoros sejtcsoportjából izolált monocitaszerű J774.2 sejtvonalat használtunk.

Az *in vivo* patogenitási vizsgálatokat Oregon R ecetmuslica (*Drosophila melanogaster*) törzs (Bloomington Drosophila Stock Center), viaszmony (*Galleria mellonella*) lárvák (BioSystems Technology, TruLarv) és DKA Bagg albino (BALB/c) hím egerek ( $\geq 20$  g) (*National Cancer Institute*) bevonásával végeztük.

### 5.2. Alkalmazott táptalajok, tápoldatok és tenyésztési körülmények

#### 5.2.1. A tenyésztés során alkalmazott táptalajok/tápoldatok

A kísérletek során felhasznált vegyületek a VWR Chemicals gyártótól származtak, ettől eltérő esetben a gyártót külön feltüntettük.

**Minimál tápoldat/táptalaj (YNBM):** 1% (m/V) D-glükóz; 0,15% (m/V) ammónium-szulfát; 0,15% (m/V) Na-L-glutamát; 0,05% (m/V) élesztő nitrogénforrás (YNB – *Yeast Nitrogen Base*) (Sigma-Aldrich); desztillált víz; szükség esetén 0,05% (m/V) uracillal (Sigma-Aldrich) és/vagy 0,05% (m/V) leucinnal (Sigma-Aldrich) kiegészítve (pH=4,5). Szilárd táptalaj előállításához 2% (m/V) agart adtunk a tápoldathoz. PEG-közvetítette protoplaszt-transzformáció során a protoplasztokat 0,8 M szorbitolt és 1% (m/V) agart tartalmazó YNBM fedőagarral összekeverve (pH=3,2) öntöttük 0,8 M szorbitollal kiegészített, 2% agart tartalmazó YNBM táptalajra. Kísérlettől függően a minimál tápoldatot Kongo Vörös (KV) (2 mg/ml); Kalkofluor Fehér (KF) (0,1

mg/ml) sejtfal stresszorokkal, továbbá nátrium-dodecil-szulfát (SDS) (0,004% (m/V)) sejtmembrán detergenssel egészítettük ki. Táptalaj esetén az adott stresszor tartalmú tápoldathoz további 2% (m/V) agart adtunk.

**Élesztő-glükóz táptalaj (YEG):** 1% (m/V) D-glükóz; 0,5% (m/V) élesztőkivonat; desztillált víz; szilárd táptalaj előállításához 2% (m/V) agart adtunk a táptalajhoz.

**Malátás tápoldat/táptalaj (MEA):** 1% (m/V) D-glükóz; 0,5% (m/V) élesztőkivonat; 1% (V/V) malátakivonat; desztillált víz; szilárd táptalaj előállításakor a tápoldathoz 2% (m/V) agart adtunk.

**J774.2 sejtek tenyésztésére használt tápoldat:** RPMI-1640 tápoldat (BioWhittaker) kiegészítve 10% (V/V) 56 °C-on 40 percig hőinaktivált újszülött borjúszérummal (FBS – *Fetal Bovine Serum*) (Euroclone), valamint szükség esetén 100 U/ml penicillin-sztreptomomicinnel (Lonza) és 25 µg/ml AmB-vel (Gibco).

### 5.2.2. Kísérletek során alkalmazott oldatok, pufferek és reagensek

**10x PBS oldat (foszfát pufferelt sóoldat):** 8% (m/V) NaCl; 0,2% (m/V) KCl; 1,44% (m/V) Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,24% (m/V) KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH=7,4); desztillált víz.

#### **Protoplasztképzéshez és PEG-mediált transzformációhoz használt oldatok:**

**Szorbitol (2,4 M):** 43,72 g szorbitol; 100 ml desztillált víz.

**CaCl<sub>2</sub> (1 M):** 14,702 g; 100 ml desztillált víz.

**PEG 4000 (60%-os):** 60 g/100 ml desztillált víz.

**MOPS (3-N-morfolin-propánszulfonsav) (0,5 M):** puffer, 5,231 g/50 ml desztillált víz.

**Nátrium-foszfát puffer:** 1,275 g (25 mM) Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (dinátrium foszfát, monohidrát) és 3,725 g (75 mM) NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (mononátrium foszfát, heptahidrát) desztillált vízben oldva.

**Szorbitol - MOPS - kalcium-klorid (SMC):** (50 ml végtérfogatban) 2,5 ml 1 M CaCl<sub>2</sub>; 1 ml 0,5 M MOPS; 16,65 ml 2,4 M; 38,5 ml desztillált víz.

**PEG 4000 - szorbitol - MOPS - kalcium-klorid (PMC):** 13,33 ml 60%-os PEG4000; 400 µl 0,5 M MOPS; 6,6 ml 2,4 M szorbitol; 1 ml 1 M CaCl<sub>2</sub>; desztillált víz.

**Protoplasztáló oldat:** (30 ml végtérfogatban) 3 ml 100 mM Nátrium-foszfát puffer; 10 ml 2,4 M szorbitol; 17 ml desztillált víz; 0,45 g (1,5% (m/V)) csigaenzim por.

**Fagocitózis kísérletekhez felhasznált oldatok, reagensek:**

**RPMI (Roswell Park Memorial Institute) tápoldat:** RPMI-1640 (Sigma-Aldrich); 0,3 mg/l L-glutamin.

**Foszfát puffer (PBS):** 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; desztillált vízben (pH=7,4).

**FACS (Fluorescence Activated Cell Sorter) puffer:** 0,05% (V/V) Tween-20 (Reanal) PBS pufferben.

***Galleria mellonella* in vivo fertőzéshez használt oldat:**

**IPS (Insect Physiological Saline):** 150 mM NaCl; 5 mM KCl; 10 mM EDTA és 30 mM nátrium-citrát 0,1 M Tris-HCl-ban (pH=6,9).

**5.3. Kísérletek során alkalmazott indítószekvenciák**

A reakcióhoz szükséges oligonukleotid primerek tervezéséhez a PerlPrimer v1.1.5 számítógépes programot használtuk fel (Marshall 2004). Az általunk tervezett indítószekvenciákat az **1. számú mellékletben** mutatjuk be.

**5.4. Vizsgálati módszerek és körülmények****5.4.1. Molekuláris módszerek****5.4.1.1. Genomi DNS kinyerése gombasejtekből**

A kísérletek során alkalmazott *M. circinelloides* törzsek genomi DNS-ének izolálásához ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep™ (Zymo Research) kit-et alkalmaztunk a gyártó utasításainak megfelelően.

**5.4.1.2. Agaróz gélelektroforézis**

A DNS fragmentek szeparálását agaróz gélelektroforézis segítségével végeztük. DNS mintánkhoz mintafelvivő puffert (6x LD puffer (Thermo Scientific™)) adtunk, majd 0,8% (m/V)-os (Lonza) gélen, 80-110 V-os feszültségen kb. 1 órán keresztül futtattuk. Az agaróz gél elkészítéséhez és futtató pufferként is Tris-ecetsav-dinátrium-EDTA (TAE; 40 mM Tris-ecetsav (pH=7,6); 1 mM Na<sub>2</sub>EDTA oldatban) puffert használtunk. A DNS fragmentumok láthatóvá tételéhez etídium-bromidos (0,5 µg/ml)

festést alkalmazunk (etídium-bromid (Sigma-Aldrich) 10 mg/ml, desztillált vízben oldva). A fragmentumok méretének meghatározásához 1 kb-os molekulasúly marker (Thermo Scientific™) steril desztillált víz – molekulasúly marker – 6x DNS mintapuffer 4:1:1 arányú keverékét használtunk. A futtatást követően a DNS termékeket UV fény alatt detektáltunk, majd digitálisan rögzítettük.

#### **5.4.1.3. DNS visszanyerése agaróz gélből**

A gélelektroforézist követően a DNS-t tartalmazó sávokat UV fényel vizualizáltuk és steril szike segítségével kivágtuk a 0,8% (m/V) agarózt tartalmazó gélből. A DNS-t ezt követően Zymoclean Large Fragment DNA Recovery Kit (Zymo Research) segítségével nyertük vissza az agaróz gélből, a gyártó utasításainak megfelelően.

#### **5.4.1.4. RNS tisztítás gombasejtekből**

Gombasejtekből történő RNS tisztításhoz Quick-RNA MiniPrep kitet (Zymo Research) használtunk a gyártó utasításainak megfelelően. Az izolált RNS mennyiségét NanoDrop spektrofotométer (ND-1000 Spectrophotometer, Thermo Scientific™) segítségével határoztuk meg.

#### **5.4.1.5. cDNS szintézis (reverz transzkripció)**

DNáz kezelt RNS mintákból a reverz transzkripciót Maxima H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific™) segítségével végeztük el. Egy reakcióhoz 0,25 µl oligo(dT)18 és 0,25 µl random hexamer (10µM) indítoszekvenciákat használtunk fel. A cDNS szintézist a gyártó utasításainak megfelelően végeztük el.

#### **5.4.1.6. Polimeráz láncreakció (PCR) technika**

Kísérleteink során különböző PCR technikákat alkalmaztunk. A reakciókat T3 Thermocycler (Biometra) készülékben végeztük, a real-time PCR esetében C1000 Thermal Cycler készüléket és CFX96 Real-Time System (Bio-Rad) detektáló rendszert használtunk. qRT-PCR reakciók során a transzkripció szintek meghatározásához a méréseket monosporangiális telepekből izolált RNS-ből reverz transzkripcióval előállított cDNS-ből végeztük el. A reakciókat Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (Thermo Scientific™) segítségével mértük össze, a gyártó utasításai szerint.

#### 5.4.1.7. Fúziós konstrukciók létrehozása

A diszrupciós mutánsok létrehozásához szükséges kazettákat „Fúziós PCR” segítségével (Szewczyk és mtsi. 2006) valósítottuk meg, melyhez a Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix (Thermo Scientific™) kit-et használtuk, a gyártó utasításainak megfelelően. A diszrupciós kazetták szerkesztési elvét a **2. számú melléklet** szemlélteti. A munkafolyamat során felhasznált indítószekvenciákat, melyeket 10 µM-os koncentrációban alkalmaztuk, az **1. számú mellékletben** foglaltuk össze. A fúziós templát DNS konstrukciók létrehozását a célzott gént körülhatároló upstream és downstream szomszédos régiók, valamint a szelekciós marker gén egyenkénti amplifikálása előzte meg. A célgénnel homológ régiók felszaporításának reakciókörülményei a következők voltak: 98 °C, 10 másodperc (s) kezdeti denaturáció; 30 cikluson át 98 °C, 1 s denaturáció; 55 °C, 5 s hibridizáció és 72 °C, 20 s, továbbá 72 °C, 1 perc utópolimerizáció. A szelekciós markerként használt gén az orotidin-5-foszfát-dekarboxilázt kódoló és az uracil auxotrófiát komplementáló *pyrG* volt (Benito és mtsi. 1992). A teljes *pyrG* gén felszaporításához a *M. circinelloides* genomi DNS-ét (5-10 ng) használtuk fel. Alkalmazott reakciókörülmények a *pyrG* gén felszaporítása esetén a következők voltak: 98 °C, 10 s kezdeti denaturáció; 30 cikluson át 98 °C, 1 s denaturáció; 60 °C, 5 s hibridizáció; 72 °C, 45 s polimerizáció, továbbá 72 °C, 1 perc utópolimerizáció. A „Fúziós PCR” létrehozásához egyenlő arányban (1:1:1) alkalmaztuk a fragmentumokat, majd a kapott PCR termékeket a Zymoclean DNA Clean & Concentrator™-5 (Zymo Research) kit által tisztítottuk meg.

#### 5.4.1.8. qRT-PCR reakciók a transzkripció szintek meghatározásához

A méréseket monosporangialis telepekből izolált RNS-ről reverz transzkripcióval előállított cDNS-ből végeztük el CFX96 Real Time System (Bio-rad) berendezés és 2x Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (Thermo Scientific™) segítségével. A reakció első lépése egy 95 °C-os, 3 perces elődenaturáció, majd ezt követi 40 ciklus az alábbi paraméterekkel: 95 °C, 1 perc; 60 °C, 30 s; 72 °C, 30 s. Az így kapott eredményeket a  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  módszer segítségével értékeltük ki (Livak és Schmittgen 2001). Belső kontrollként a *M. circinelloides* aktin (*ACT*) génjét használtuk (Nagy és mtsi. 2014, Dankai és mtsi. 2015). Minden mérés legalább 3 technikai párhuzamossal történt. A reakciókban használt indítószekvenciák listáját az **1. számú melléklet** tartalmazza.

**A reakciók összemérése 20 µl végtérfogatban történt 96 lyukú lemezeken:**

20-50 ng cDNS

10 µM - 10 µM specifikus indítószekvencia [1. számú melléklet]

1x Maxima SYBR Green qPCR Master Mix

## **5.5. Gombasejtek fenntartása és transzformálása**

### **5.5.1. Tenyésztési körülmények**

A gombatörzseket minimál táptalajon (amennyiben szükséges uracillal vagy leucinnal kiegészítve), kéthavonként történő átoltással, 4 °C-on tartottuk fenn, továbbá minden héten elvégeztük a törzsek átoltását MEA táptalajra. Tenyésztésük általában 28 °C-on, négy napig, állandó megvilágítás mellett történt. Esetenként a hőmérsékletet (20-37 °C között) és a tenyésztési időt (leoltástól számított 4 óra – 7 nap) a kísérleteknek megfelelően változtattuk. Az anaerob tenyésztéseket BBL GasPak Anaerobic System (Beckton Dickinson) segítségével végeztük. Későbbi felhasználás esetén a táptalajról gyűjtött micéliumot (desztillált vizes mosás után) fagyasztva tároltuk -80 °C-on. J774.2 sejtek tenyésztése/fenntartása során a fagociták felnevelése a korábban leírt összetételű, a sejtípusnak megfelelő tápoldatban történt, 37 °C, 5% (V/V) CO<sub>2</sub> tenzió és 100%-os relatív páratartalom mellett.

### **5.5.2. Gombasejtek protoplaszt transzformációja CRISPR-Cas9 rendszer segítségével**

Az általunk alkalmazott módszer a van Heeswijck és Roncero (1984) által leírt PEG-mediált transzformáción alapult. Az MS12 törzs minimál táptalajon, 4-5 napon keresztül, fényben nevelt tenyészetéről steril desztillált vízzel lemostuk a sporangiospórákat, majd a tömény spórasuszpenzióból oltótűvel, celofánkoronggal fedett YEG táptalajra oltottunk. A tenyészeteket 28 °C-on, 16 órán keresztül neveltük, majd a micéliumkorongokat protoplasztáló oldatba helyeztük és 3 órán át, szobahőmérsékleten rázatva inkubáltuk (50 RPM). A sejtfal oldásához saját készítésű, éticsiga (*Helix pomatia*) gyomorból preparált lítikus emésztőenzimet használtunk. SMC pufferrel átmosva a micéliumkorongokat a protoplasztokat tölcserbe helyezett gézen keresztül sterilen átszűrtük. A centrifugálással (2162 x g, 10 perc, 4 °C) összegyűjtött

protoplasztokat 5 ml SMC pufferrel mostuk, majd újabb centrifugálás után 250 µl SMC pufferben szuszpendáltuk.

A protospacer szekvenciákkal kölcsönható Alt-R CRISPR crRNS és Alt-R CRISPR-Cas9 tracrRNS molekulákat az IDT-től (Integrated DNA Technologies) szereztük be. A crRNS:tracrRNS duplexek (gRNS) létrehozásához a Nuclease-Free Duplex Buffer-t (IDT) használtuk, a gyártó utasításainak megfelelően. A *M. circinelloides* MS12 és CBS277.49 törzs *carB* génjének diszrupciójához használt protospacer szekvencia az 5' gagcgcattcaagaccac<sup>3</sup> volt. A 250 µl SMC pufferbe felvett protoplasztokhoz a *carB* génre specifikus (kísérlettől függően) 50-100-200 µM gRNS-t (IDT) és 50-100-200 µM Cas9 endonukleázt (IDT) és 20 µl PMC puffert adtunk. Ezután a mintákat fél órán keresztül jégen inkubáltuk. További 2,5 ml PMC puffer hozzáadása után a mintákat 25 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk, majd azokat 25 ml SMC pufferrel hígítva centrifugáltuk (2162 x g, 10 perc, 4 °C). 20 ml SMC pufferrel mostuk a sejteket, majd az ezt követő centrifugálási lépést (2162 x g, 10 perc, 4 °C) után a kiülepített sejteket, 200 µl SMC-ben szuszpendáltuk, és szorbitollal kiegészített YNBM fedőagarral (1% (m/V) agar) összekeverve szorbitolt tartalmazó YNBM csészékre öntöttük (2% (m/V) agar). A csészéket 4-10 napig, állandó megvilágítás mellett, a transzformáns telepek megjelenéséig szobahőmérsékleten inkubáltuk. Irányított mutagenézis esetén 5-10-15 µg fúziós PCR termékkel egészítettük ki a transzformáló közeget. A szelekciót ebben az esetben leucinnal (0,05% (m/V)) kiegészített táptalaj biztosította. Kontrollként a CRISPR-Cas9 rendszer alkotóit és a diszrupciós kazettát nélkülöző elrendezést is alkalmaztunk.

A *cotH* gén elrontása céljából 250 µl SMC pufferbe felvett protoplasztokhoz 5-10 µg fúziós PCR terméket, a génekre specifikus 100 µM gRNS-t (IDT), 10 µM Cas9 endonukleázt (IDT) és 20 µl PMC puffert adtunk. A továbbiakban a fentebb említett protokoll szerint jártunk el. A *cotH* mutánsokat *pyrG* szelekciós markerre szelektáltuk, ezért a táptalajokat leucinnal (0,05% (m/V)) egészítettük ki. A csészéket 4-10 napig, fénytől elzárt helyen, a transzformáns telepek megjelenéséig szobahőmérsékleten inkubáltuk.

### **5.5.3. Monosporangialis telepek izolálása és a mitótikus stabilitás vizsgálata a gének elrontását követően**

A szelektív táptalajon nőtt telepek sporangiospóráit desztillált vízzel lemostuk, majd a spóraszuszpenzióból több lépcsőben tízszeres hígítási sort készítettünk, és ezekből



csészénként 50, illetve 100 µl-t szélesztettünk a szelekciós markert tartalmazó táptalajra. A továbbiakban az egy spórából kinövő transzformáns telepekkkel dolgoztunk, miután továbboltottuk szelektív táptalajra. Egymás után többször (4-5 átoltás), is elvégeztük a monosporangiális telepek izolálását. A transzformánsok mitotikus stabilitásának vizsgálatát minden transzformáció után elvégeztük. Ennek érdekében néhány transzformáns gombatelepet MEA táptalajon növesztettünk 28 °C-on 4-7 napig, majd a sporangiospórák lemosása után azokat ismét MEA táptalajra szélesztettük. Ezt 15 alkalommal megismételtük, végül a sporangiospórákat szelektív táptalajra oltottuk.

## **5.6. Diszrupciós törzsek karakterizálása**

### **5.6.1. Általános fenotipikus analízishez használt módszerek**

#### **5.6.1.1. A törzsek növekedési képességének vizsgálata**

A gombasejteket az 5.5.1 pontban leírtaknak megfelelően előneveltük. A spórák csírázási képességének meghatározásához a telepekről steril desztillált vízzel lemostuk a spórákat, majd 30 ml minimál táptalajra oltottuk azokat úgy, hogy a spórakoncentrációt minden esetben  $10^6$  spóra/ml-re állítottuk be. A telepátmérő növekedésének vizsgálatához szilárd YNBM táptalaj közepére  $10^4$  spórárt cseppentettünk, amit steril fülke alatt bezárítottunk. A leoltástól számítva 4 napon keresztül vizsgáltuk a növekvő telepek átmérőjét és 4. napon mért száraztömegét. A növekedés vizsgálatokat különböző hőmérsékleteken (20, 28, 35 °C), valamint anaerob körülmények között is elvégeztük.

A stressztoleranciát vizsgáló kísérletek alkalmával a táptalajokat KR, KF stresszorokkal és SDS sejtmembrán detergenssel egészítettük ki az 5.2.1. fejezetben leírt módon, illetve a gomba törzsek menadionra és  $H_2O_2$ -re való érzékenységét 96 lyukú mikrotiter lemezen vizsgáltuk, ahol a menadion 0-10 mM, a  $H_2O_2$  végső koncentrációja pedig 0 és 0,5 mM közötti, továbbá az egy lyukra eső sporangiospórák végső koncentrációja  $10^4$ /ml volt. Háttérkontrollként 200 µl YNBM tápoldatot alkalmaztunk. A mikrotiter lemezeket 3 napig 28 °C-on, állandó hőmérsékleten tenyésztettük és a tenyészet optikai denzitását 620 nm-en Jupiter HD plate leolvasó segítségével (ASYS Hitech GmbH) határoztuk meg. Minden mérést 3 párhuzamosban végeztünk. Az átlagolás, illetve a háttérabszorbancia levonása után a stresszorok hatásának kiszámítását a növekedési kontrollhoz (100%) viszonyítva adtuk meg.

### 5.6.1.2. A gombaspórák vizsgálata transzmissziós elektronmikroszkóp (TEM) segítségével

A *M. circinelloides* gombaspórák paramétereinek megállapítását, továbbá szerkezetének vizsgálatát (JEM-1400Flash; JEOL) transzmissziós elektronmikroszkóppal (TEM) végeztük el. A statisztikai analízishez párosítatlan, kétmintás t-próbát alkalmaztunk a GraphPad Prism 7.00 (GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com) program segítségével. A cirkularitási index meghatározása az alábbi képlet alapján történt:  $CI_i = 2\sqrt{\pi A_i}/\pi_i$ , ahol  $A_i$  a vizsgált objektum területe, a  $\pi_i$  pedig a vizsgált objektum kerülete.

### 5.6.1.3. A gombaspórák felszínének vizsgálata pásztázó elektronmikroszkóp (SEM) segítségével

Az gombaspórák felszínének nagy felbontású, optikai vizsgálatát pásztázó elektronmikroszkóp (SEM) segítségével végeztük el. A mintákat 2,5% glutáraldehidben szobahőmérsékleten 2 órát inkubáltuk, majd 50%, 70%, 80%, 90% és 100%-os etanollal 2x15 perces időtartamokban víztelenítettük. A mintákat ezután terc-butil-alkohol: abszolút etanol 1:2, 1:1, 2:1 arányú keverékébe, majd 100%-os terc-butil alkoholba helyeztük 1-1 órára, szobahőmérsékleten. A mintákat végül tömény terc-butil alkoholban 4 °C-on tároltuk, és egy éjszakán át fagyasztva szárítottuk. A mintákat a mintatartó korongra rögzítettük, majd a szükséges aranyréteg felvitelét követően (Quorum Technologies SC 7620 'Mini') a Hitachi S4700 SEM segítségével vizsgáltuk.

## 5.6.2. Funkció beazonosítás érdekében használt egyéb kísérleti módszerek

### 5.6.2.1. A gombaspórák felszínének fluoreszcens festékekkel történő vizsgálata

A gombaspórákat 1x PBS pufferrel háromszor mostuk (2162 x g, 5 perc). A pelletet 0,5 ml 1% (m/V) szarvasmarhaszérum albumin (BSA) (blocking) oldatban szuszpendáltuk fel és 30 percen át szobahőn egyenletesen forgatva inkubáltuk. A sejteket 1x PBS-sel háromszor mostuk, végül 400 µl 1x PBS-ben szuszpendáltuk fel. A vizsgálandó törzsek spóráit  $10^7$ /ml koncentrációban tartalmazó PBS oldatban (pH=7,4) festettük 45 percig 0,5 ml 5 µg/ml KF festékek oldattal a kitin detektálása, továbbá 100 µg/ml Konkavalin A-fluoreszcein-izotiocianát festékes oldattal (ConA-FITC) a mannozil származékok detektálása céljából. Festést követően a mintákat 1x PBS oldattal mostuk 5

alkalommal. A festés minden lépése közvetlen fénytől elzárta, lehetőség szerint sötétben történt. A festett gombasejtekről a fluoreszcens felvételek Zeiss AxioScope 40 mikroszkóppal és AxioCam Mrc kamerával készültek. A kitin detektálásához 350 nm excitációs és 432 nm emissziós szűrőt használtunk, míg az Konkavalin A-fluoreszcein-izotiocianát festést követően 495 nm excitációs és 515 nm emissziós értékkel bíró szűrőt alkalmaztunk. A minták mérését FlowSight Imaging Flow Cytometer (Amnis) készülékkal is elvégeztük, a kiértékeléshez pedig a hozzá tartozó IDEAS 6.2 szoftvert használtuk. A fluoreszcens mikroszkóppal készült minták esetében a festékek intenzitását a különböző törzsek esetében az ImageJ2 (Fiji) alkalmazás segítségével határoztuk meg.

#### **5.6.2.2. J774.2 makrofágyszerű egér sejtvonal fertőzése *Mucor circinelloides* törzsek spóráival**

A *cotH* diszrupciós mutáns törzsek J774.2 makrofágok általi fagocitózisához a gombaspórákat PBS-sel történő mosás után 250 µl 0,1 M-os Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-tal pufferelt 0,1 mg/ml koncentrációjú fluoreszcein-izotiocianát ('Isomer I') (FITC) oldatban (Invitrogen) inkubáltuk 15 percen keresztül fénytől elzárva, majd 5x mostuk jég hideg PBS oldattal. A makrofágokat CellMask Deep Red Plasma Membrane (Invitrogen) fluoreszcens festékkel festettük fénytől elzárta 10 percen át, 2x mostuk PBS oldattal. A J774.2 sejteket 2x10<sup>5</sup>/mintahely mennyiségben 24 mintahelyes lemezbe helyeztük. A jelölt gombasejteket ötszörös mennyiségben adtuk a fagocitákhoz (10<sup>6</sup> és 90 percen keresztül 37 °C-on, 100% (V/V)-os páratartalom és 5% (V/V)-os CO<sub>2</sub> tenzió mellett inkubáltuk. A J774.2 sejteket összegyűjtöttük és centrifugáltuk (1000 x g, 10 perc, 4 °C), majd 200 µl 0,05% (V/V) Tween-20 (Reanal) oldatot tartalmazó PBS-ben szuszpendáltuk. A minták mérését FlowSight® Imaging Flow Cytometer (Amnis) készülékkal végeztük, a kiértékeléshez az IDEAS 6.2 szoftvert használtuk. A fagocitáló sejtek meghatározása a gombával nem fertőzött J774.2 sejtek kizáró kapuzásával történt. A fagocitált gombasejtek számát mintánként 200 makrofágról készült kép alapján vizsgáltuk, míg a fagocitikus indexet (PI) a következő képlettel határoztuk meg:

$$PI = [\text{egy fagocitáló sejtre eső átlagos spóraszám}] \times [\text{legalább egy spórárt tartalmazó fagocitáló sejtek százalékos aránya}].$$

### 5.6.2.3. *Mucor circinelloides* spórákat tartalmazó fagoszómák savasodásának vizsgálata makrofágokban

A makrofágokat pHrodo Red fluoreszcens festékekkel festett CoH mutáns sejtekkel fertőztük 12 lyukú sejtenyésztő lemezben. A fertőzési arány (MOI – *Multiplicity of infection*) 5:1 volt. A fertőzés 37 °C-on 5%-os CO<sub>2</sub> tenzió mellett zajlott. A pHrodo Red megfelelő beállítás mellett az intracelluláris savas kompartmentumokban intenzív fluoreszcenciát mutat. MEA táptalajon felszaporított 1 hetes gombatenyészetek spóráit  $2 \times 10^7$  mennyiségben Hank-féle pufferelt sóoldatban (HBSS, Gibco) kétszer mostuk, majd 200 µl HBSS-ben szuszpendáltuk őket. A szuszpenzió 200 µl-jéhez 22 µl Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> oldatot (1 M, pH=10), majd 1 µl KF oldatot (10 mM) adtunk, majd a mintákat 15 percen át fénytől elzárva inkubáltuk. A további mosásokat, a fertőzési lépéseket, a makrofágok méréshez való előkészítését az 5.6.2.2. alfejezetben közölt módon hajtottuk végre. A fagoszómák savasodásának mértékét az alábbiak szerint kalkuláltuk:

$$[\text{pHrodo Red+ sejtek az összes mért sejt \% -ában}] / [\text{a fagocitáló sejtek az összes mért sejt \% -ában}] \times 100.$$

### 5.6.2.4. A *Mucor circinelloides* spórák makrofágok általi eliminációjának vizsgálata

A makrofágok *M. circinelloides* spórákat elpusztító képességét Németh és mtsi. (2013) alapján élőcsíraszám meghatározás segítségével állapítottuk meg. A J774.2 sejteket MOI 5:1 dózisban fertőztük, majd 37 °C-on 5%-os CO<sub>2</sub> tenzió mellett 180 percig inkubáltuk. A gombák 100% túlélési értékének meghatározásához gombával inokulált, de makrofág nélküli kontroll tenyésztőhelyeket alkalmaztunk. Kezelésenként 3 technikai párhuzamossal dolgoztunk. Három óra elteltével a tenyésztőlemezekből rázás után mikrocentrifuga csövekbe mértük a felülúszókat, és steril desztillált vizet pipettáztunk a tenyésztőhelyekbe a makrofágok lizálása céljából. A szuszpenziókat PBS-sel hígítottuk, majd 100-100 µl-jeit triplikátumban MEA táptalajra szélesztettük. Két nap 28 °C-on történő inkubáció után meghatároztuk az élő csíraszámot. Az élesztősejtek makrofágok általi eliminációjának hatékonyságát az alábbi képlet segítségével számoltuk ki:

$$\text{CFU}_{\text{fertőzött}} \times 100 / \text{CFU}_{\text{kontroll}},$$

ahol a makrofágmentes kontroll kezelésekhöz tartozó CFU-k átlagos száma, a CFU<sub>fertőzött</sub> pedig a fertőzött makrofágok kezeléseikhez tartozó CFU-k átlagos száma.

## 5.7. *In vivo* virulencia vizsgálatok

### 5.7.1. *Galleria mellonella in vivo* fertőzési modell

A fertőzés előtti éjszaka a 0,18-0,35 g tömegű *G. mellonella* lárvákat (BioSystems Technology, TruLarv) 28 °C-on, sötétben inkubáltuk a kísérlet megkezdéséig, majd fertőzés előtt a lárvák hasi oldalát etanollal sterilizáltuk, ezt követően az utolsó lábkezdemenyen keresztül fertőztük 20 µl IPS-ben szuszpendált  $5 \times 10^6$  gombaspórával U-100 ((29G) x 12,7 mm) steril inzulinos tű segítségével (BD Micro-Fine™). Törzsenként 20 lárvát használtunk, kontrollként 20-20 µl IPS oldattal injektált lárvákat alkalmaztunk. A fertőzést követően a lárvákat 28 °C-on, sötétben tartottuk, és a túlélést napi rendszerességgel ellenőriztük.

### 5.7.2. *Drosophila melanogaster* életképesség vizsgálatok

A kísérletsorozatot Dr. Sinka Rita kutatócsoportja (SZTE TTIK, Genetika Tanszék) végezte el számunkra. A spóraszuszpenziókat steril foszfát-puffer sóoldattal (PBS, pH=7,4) készítettük, 4 napos, 25 °C-on, minimál táptalajon nevelt tenyészetekből. A friss inokulum végső koncentrációját  $10^7$  spóra/ml-re állítottuk be. Az Oregon R *Drosophila* tenyészetet 25 °C-on, kukoricadara táptalajon tartották fenn. A fertőzés az altatott legyek thorax tájékába szűrt  $10^7$  spóra/ml koncentrációjú spóraszuszpenzióval valósult meg. A legyek száma meghatározott időpontokban (naponta, 7 napig) került rögzítésre a túlélés monitorozása céljából. Minden kísérlet kb. 60 légy bevonásával zajlott.

### 5.7.3. *In vivo* egér fertőzési modell

Az *in vivo* egér fertőzési modellben történő kísérleteket Ashraf Ibrahim kutatócsoportja (Harbor-UCLA Medical Center) végezte el számunkra. A DKA BALB/c hím egerekben ( $\geq 20$  g) (National Cancer Institute) nyolc óra táplálékmevontást követően a DKA állapotot 190 mg/testsúly kg sztreptozotocin (0,2 ml citrát pufferben (pH=4,2) oldva) egyszeri beinjektálásával váltották ki a fertőzést megelőző tizedik napon. A sztreptozotocin kezelést követően 7 nappal a glikozúriát és ketonúriát megerősítették az egerek vizeletmintájának ellenőrzésével. Az állatoknak a második nap 250 mg/ml kortizon-acetátot (Sigma-Aldrich: SLBN0203V), a harmadik naptól kezdve pedig a bakteriális fertőzések kezelésére szolgáló készítményt (Baytril 50 µg/ml) adtak. A

fertőzést intratracheálisan, 25 µl PBS-ben felvett  $2,5 \times 10^6$  ( $1 \times 10^8$  spóra/ml) mennyiségű friss spórával végezték. Az egerek túlélését 7 napon át, naponta monitorozták.

## 5.8. Bioinformatikai és statisztikai analízisek

### 5.8.1. Teljes genom szekvenálás analízise

A teljes genom szekvenálást Dr. Bodai László kutatócsoportja (SZTE TTIK Biokémiai és Molekuláris Biológiai Tanszék) végezte el (nem publikált adat). Mintafájloknak a következőket választottuk: MS12, MS12-*ΔcotH3+pyrG*, MS12-*ΔcotH4+pyrG* *Mucor* törzsekből származó, paired-end szekvenálással nyert minták (300 bp read hossz), mintánként R1, R2 fastq.gz fájlok. A referenciagenom a *Mucor circinelloides*\_v2\_masked\_scaffolds.fasta (<https://genome.jgi.doe.gov/portal/pages/projectStatus.jsf?db=Mucci2>) volt. A Fastq fájlok ellenőrzése, minőségi kontrollja a FastQC, a „Pair-end fastq read” fájlok trimmelése pedig a TrimGalore program segítségével valósult meg. A minimális read hossz (*length*) (36 bp) volt. A kiválasztott readok referencia genomra térképezése a „bwa-mem” programmal, az eredmények vizualizálása Qualimap program segítségével valósult meg. A variáns analízist megelőzően a technikai duplikátumok kiszűrése a GATK/Picard MarkDuplicates (Van der Auwera és mtsi. 2013) eszköz felhasználásával történt. A térképezés kimenetéből BAM fájlok generálását követően, a duplikált readokat „SAMtools flag” eljárással való megjelöléssel kizárásra kerültek a variáns analízisből (Etherington és mtsi. 2015). A kapott szekvenciák alapján a mutáns törzsekben azonosításra került targetált régiók szekvencia-hasonlóság kereső programcsomaggal (BLAST – *Basic Local Alignment Search Tool*) való kereséssel validálhatók. Amennyiben a megfelelő minta BAM fájl a targetált régió genomi pozíciójával összevetve nem mutat átfedést (lefedettség), akkor az adott régió elrontottnak tekinthető. A variáns analízis a SAMtools/bcftools (Li és mtsi. 2009), FreeBayes és Bedops v2.4.39 (Neph és mtsi. 2012) programokkal egyaránt megvalósult.

### 5.8.2. *In silico* elemzések

Az vizsgált DNS fragmentumok szekvenálását az LGC Genomics vállalat végeztette. A DNS szekvenciák ellenőrzése a Bioedit 7.2.5 program (Hall 1999) segítségével történt, míg a nt szekvenciák analízisét a Nemzetközi biológiai adatbázis

(NCBI) BLAST 2 programjának segítségével végeztük (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). A feltételezett CotH fehérjék szekvenciájának elemzéséhez a Swiss Expasy Server (<http://www.expasy.ch>) programjait használtuk (Hulo és mtsi. 2008). A molekulatömegek meghatározásához a ProtParam (Gasteiger és mtsi. 2005), a transzmembrán domének kereséséhez pedig a HMMTOP (Tusnady és Simon 2001) és TMPred (Hofmann és Stoffel 1993) programokat alkalmaztuk. A fehérjékben található motívumok és domének keresését a Motif Scan (MyHits) program (Pagni és mtsi. 2004) segítségével végeztük. A CotH fehérjék hosszát a Peptide Properties Calculator (<http://biotools.nubic.northwestern.edu/proteincalc.html>) és szignál szekvenciáinak jelenlétét a SignalP 4.1 Server (Nielsen 2017) segítségével határoztuk meg. A protein szekréciónak feltételezett lokalizációjának helyét a PSORT WWW Server WoLF PSORT: *Protein Localization Predictor* programjával prediktáltuk (Horton és mtsi. 2007). Az ortológ fehérjék keresését a JGI (*Joint Genome Institute*) Fungal Genome Portal adatbázisban (<http://genome.jgi.doe.gov/programs/fungi/index.jsf>) hozzáférhető több száz gombagenomot bevonva valósítottuk meg, ortológ keresés funkciót és alapbeállításokat alkalmazva. A GPI-SOM programmal a glikozil-foszfatidil-inozitol-horgonyok (GPI-horgonyok) predikcióját valósítottuk meg (Fankhauser és Mäser 2005). A BLAST analíziseket a fehérjék szekvenciájának betáplálásával végeztük a <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov> (blastp) program segítségével baktérium és gomba genomok (kizárva a *Mucoraceae* családot) közti kereséssel, az alapbeállításokat alkalmazva.

### 5.8.3. Statisztikai analízis

A kísérletek statisztikai analízise a GraphPad Prism v 6.0 szoftverrel, parametrikus t-teszt, nem-parametrikus Gehan-Breslow-Wilcoxon, Log-rank (Mantel-Cox) vagy One Way ANOVA teszt használatával történt. Statisztikailag szignifikáns eltérést abban az esetben állapítottunk meg, ha  $p < 0,05$  volt. A kísérlet típusától függően bizonyos esetekben a kiértékelést, az átlagok és szórások, valamint a különbségek szignifikanciájának kiszámítását Microsoft Excel program segítségével végeztük, utóbbi esetben párosított vagy párosítatlan t-próbát alkalmaztunk.

## 6. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

### 6.1. A CRISPR-Cas9 rendszer alkalmazása járomspórás gombában

#### 6.1.1. A *Mucor circinelloides carB* génjének elrontása NHEJ segítségével

A biológiai folyamatokban szerepet játszó gének vizsgálatához szükségünk van egy olyan megbízható és könnyen alkalmazható génmanipulációs eszközre, melynek segítségével a génfunkciók tanulmányozhatók. Járomspórás gombák esetén hagyományos transzformációs módszerekkel nem lehet stabil integratív mutánsokat rutinszerűen előállítani, így érdemesnek véltük a CRISPR-Cas9 rendszer tesztelését és optimalizálását, az általunk modellorganizmusként használt *M. circinelloides* fonalas gombában. A CRISPR-Cas9 eljárás teszteléséhez a karotinbioszintézisben résztvevő egyik gént választottuk ki. A *carB* gén alkalmazásával a genomszerkesztés eredménye egyszerű színszelekcióval követhető, így nem feltétlenül volt szükség külön szelekciós markergén bevitelére és mind a NHEJ, mind a HDR javító mechanizmusok vizsgálata megvalósíthatóvá vált.

A járomspórás gombákban a karotinoid-bioszintézis végső terméke a  $\beta$ -karotin (Papp és mtsi. 2009), melynek bioszintézisében részt vevő gének a következők: a *carB*, amely a fitoén dehidrogenáz aktivitásért felelős enzimet és a *carRP*, amely a fitoén szintáz (a fehérje C-terminális szakasza) és a likopin cikláz (a fehérje N-terminális része) aktivitásokért felelős fehérjét kódolja (Ruiz-Hidalgo és mtsi. 1999). A *carB* és a *carRP* gének működése összehangolt, közös szabályzás alatt áll, a gének klaszterszerűen helyezkednek el, egymáshoz viszonylag közel, mindössze 446 bp távolságra (Iturriaga és mtsi. 2000). Amennyiben a *carB* gént, vagy a *carRP* gén fitoén szintáz aktivitást kódoló részét elrontjuk, karotin bioszintézis folyamata nem játszódik le egészében, így fehér színű telepeket kapunk.

Az általunk felhasznált *M. circinelloides* mutáns MS12 (*leuA*<sup>-</sup> és *pyrG*<sup>-</sup>) és CBS277.49 vad típusú törzsében a karotin-bioszintézis teljes folyamata végbemegy, ezáltal szilárd táptalajon növesztve élénksárga telepeket alkotnak. Kísérletünk során a fentebb említett két törzset transzformáltuk a *carB* génre specifikus *in vitro* szintetizált grNS szekvenciával és Cas9 nukleázzal. Fontosnak tartottuk megvizsgálni a grNS és Cas9 enzim mennyiségének hatását a genomszerkesztési hatékonyságra [1. táblázat].

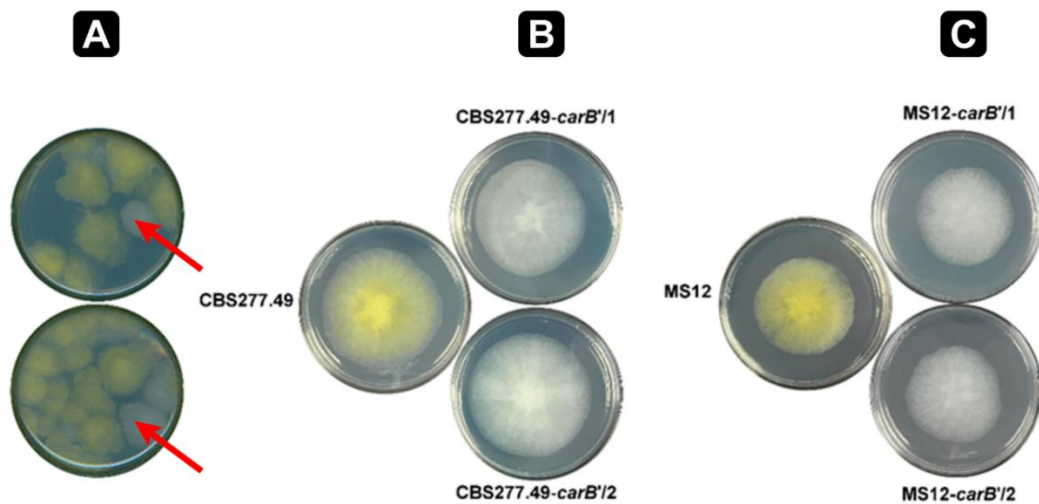


Ennek érdekében a rendszer komponenseit a transzformálás során 50-200  $\mu\text{M}$ -os koncentrációban alkalmaztuk. 50  $\mu\text{M}$  gRNS és 50  $\mu\text{M}$  Cas9 enzim hozzáadásával nem tudtunk fehér, azaz a *carB* gén elrontására utaló fenotípusú telepeket izolálni. Kísérleteink során a gRNS és a Cas9 enzim 100  $\mu\text{M}$ -os koncentrációja bizonyult a leghatékonyabbnak, azonban a komponensek ezen felüli mennyiségi növelése nem járult hozzá a rendszer hatékonyabb működéséhez. Ennek ismeretében, a továbbiakban kísérleteinkhez a gRNS-t és a Cas9 enzimet 100  $\mu\text{M}$ -os koncentrációban alkalmaztuk, amelyhez az alábbi transzformációs hatékonyság társult:  $1,25 \times 10^4$  az MS12 és  $2 \times 10^4$  a CBS277.49 esetén.

**1. táblázat.** Az alkalmazott CRISPR-Cas9 rendszer hatékonysága NHEJ javító mechanizmus alkalmazása során, ill. az optimális gRNS és Cas9 enzim koncentráció meghatározása CBS277.49-es és MS12 törzsek esetében, a *carB* gén elrontása során. A transzformálások során alkalmazott gRNS és Cas9 enzim koncentrációk. A célzott diszruptió sikeressége a transzformációt követően izolált telepek azon százalékát mutatja be, melyekben a genomszerkesztés sikeres volt.

Törzs	Transzformáció elemei	Javító mechanizmus	Transzformációs hatékonyság (telep/ $10^5$ protoplaszt)	A genomszerkesztés sikeressége
<i>M. circinelloides</i> CBS277.49	Cas9 (50 $\mu\text{M}$ ), gRNS (50 $\mu\text{M}$ )	-	0	0
<i>M. circinelloides</i> CBS277.49	Cas9 (100 $\mu\text{M}$ ), gRNS (100 $\mu\text{M}$ )	NHEJ	$2 \times 10^4$	100%
<i>M. circinelloides</i> CBS277.49	Cas9 (200 $\mu\text{M}$ ), gRNS (200 $\mu\text{M}$ )	NHEJ	$1,5 \times 10^4$	100%
<i>M. circinelloides</i> MS12	Cas9 (50 $\mu\text{M}$ ), gRNS (50 $\mu\text{M}$ )	-	0	0
<i>M. circinelloides</i> MS12	Cas9 (100 $\mu\text{M}$ ), gRNS (100 $\mu\text{M}$ )	NHEJ	$1,25 \times 10^4$	100%
<i>M. circinelloides</i> MS12	Cas9 (200 $\mu\text{M}$ ), gRNS (200 $\mu\text{M}$ )	NHEJ	$1,2 \times 10^4$	100%

A transzformánsok azonosítását a karotinbioszintézis-útvonalban történő beavatkozást követő jellegzetes fenotípusos eltérés, azaz a fehér gombatelepek megjelenése tette lehetővé [5. ábra]. Ez a fenotípus arra utal, hogy a vezető RNS-szálnak sikerült a célszekvenciául szolgáló *carB* gént felismerni, majd a Cas9 nukleáz elhasította a DNS-t és a NHEJ hibajavító mechanizmus miatt deléció alakul ki a célzott régióban.



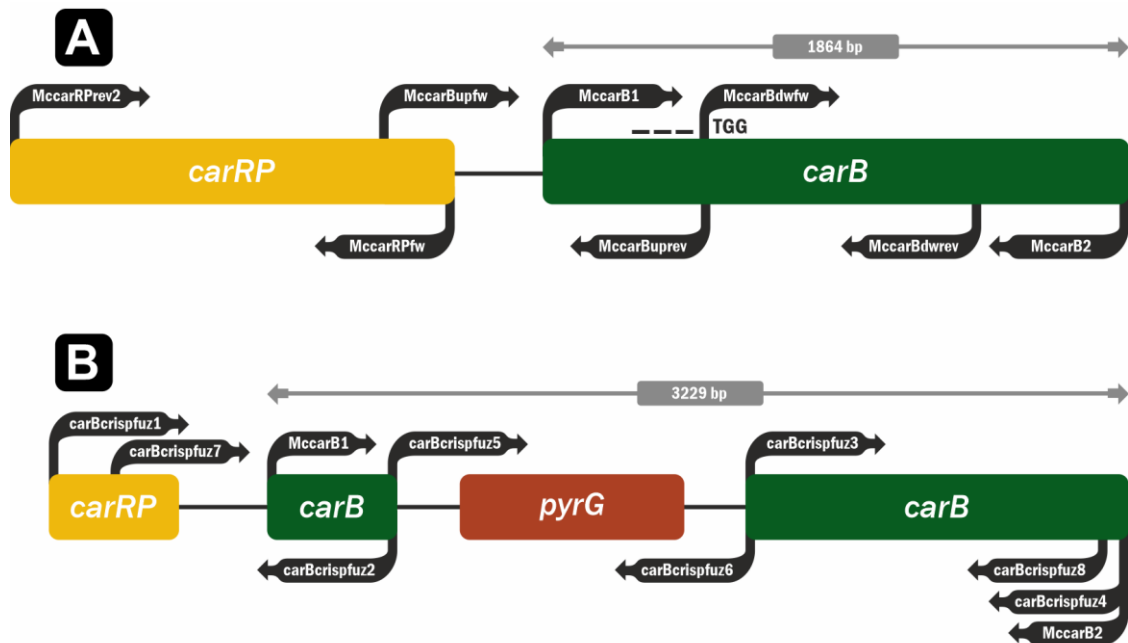
**5. ábra.** A *carB* génre specifikus gRNS-el és Cas9 nukleázzal transzformált *M. circinelloides* CBS277.49 és MS12 törzsek telepei. **A)** A *M. circinelloides* MS12 és CBS277.49 törzsek telepei, ahol a piros nyilak jelölik a *carB* deficiens mutánsokat. **B)** A bal oldali csészén CBS277.49-es izolátum (VT), a jobb oldali két csészén pedig a transzformálást követően izolált két *carB*-mutáns telep látható (CBS277.49-*carB*'1 és CBS277.49-*carB*'2). **C)** A bal oldali csészén a vad típusú MS12 törzs, a jobb oldali két csészén pedig a transzformálást követően izolált *carB*-mutánsok (MS12-*carB*'1 és MS12-*carB*'2) láthatók.

A transzformánsok vizsgálata során mind a CBS277.49 [5. ábra B)], mind pedig az MS12 [5. ábra C)] esetében sikerült fehér telepeket izolálnunk. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a *carB* génre specifikus gRNS-el és Cas9 nukleázzal kotranszformált *M. circinelloides* törzsekben a karotin bioszintézis folyamata a fitoénképződés szintjén megállt. Annak érdekében, hogy bizonyítsuk, a mutáns fenotípus hátterében valóban a *carB* gén elrontása áll, az érintett régiót PCR segítségével amplifikáltuk, majd szekvenciáját meghatároztuk. A szekvenálás eredménye kiterjedt, 2,3 kb nagyságot is meghaladó deléciókat mutatott ki, melyek a protospacer szekvenciától 5' irányban helyezkedtek el. A deléció tehát nemcsak a *carB*-t, hanem a vele szomszédos *carRP* gént is érintette.

### 6.1.2. A fitoén dehidrogenáz gén elrontása HDR által

A gének elrontásának HDR-en alapuló megvalósítása érdekében egy olyan diszrupciós kazettát hoztunk létre, mely a *carB* génnel homológ szekvenciákat, továbbá az uracil auxotrófia komplementációjáért felelős orotidin-5'-monofoszfát-dekarboxiláz

(*pyrG*) génjét tartalmazza [6. ábra]. A genomba integrált DNS szakaszt, a HDR-t irányító homológ szakaszokat és az elemzések során felhasznált indítószekvenciák bekötési helyét a [6. ábra] szemlélteti. Sikeres genomszerkesztés esetén a *carB* génbe ékelődő *pyrG* gén miatt az előbbi működésképtelenné válik, az előállított mutáns törzsek pedig képesek uracil-mentes, kizárólag leucinnal kiegészített táptalajon növekedni, továbbá hordozzák a jellegzetes fehér fenotípust is.

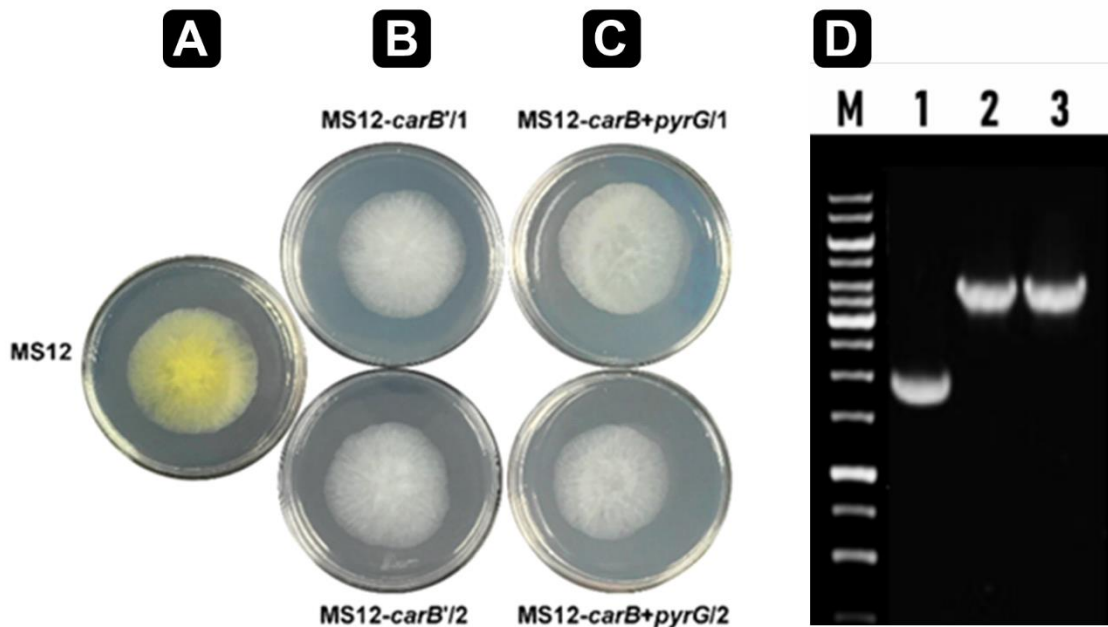


**6. ábra.** A *Mucor circinelloides carB* génjének célzott elrontása céljából létrehozott kazetta sematikus ábrája és a kísérleteink során felhasznált indítószekvenciák helyzete [1. számú melléklet]. Az ábrán a klaszterszerűen elhelyezkedő *carRP* (sárga téglalap) és a *carB* (zöld téglalap), a *pyrG* gén (bordó téglalap), valamint a protospacer szekvencia helyzete látható, amely a start kodontól 220 és 239 bp-ra található szekvencia részlet komplementerét képezi. **A)** A *carRP* és *carB* gén eredeti, genomi elrendeződése. **B)** A diszrupciós kazetta felépítése.

Kísérleteink során önmagában csak a templát DNS alkalmazása nem vezetett eredményre [2. táblázat]. 5 µg templát DNS (diszrupciós kazetta), 100 µM Cas9 enzim és 100 µM gRNS 10<sup>5</sup> számú protoplaszthoz való hozzáadásával 2 telepet sikerült izolálnunk [7. ábra A)-C)]. A transzformánsok izolálását követően DNS-t izoláltunk a mutánsokból, majd arról PCR segítségével, az *MccarB1* és *MccarB2* indítószekvenciák [1. számú melléklet] felhasználásával, amplifikáltunk egy 3.8 kb nagyságú fragmentet [7. ábra D)].

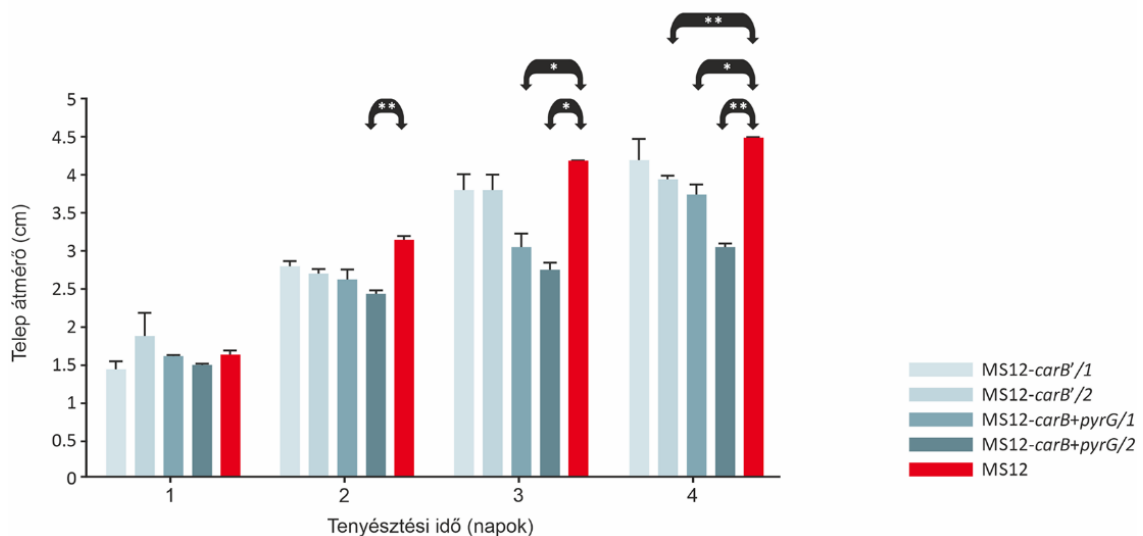
**2. táblázat.** A CRISPR-Cas9 rendszer elemeinek, továbbá a DNS-templát, valamint ezek kombinációjának hatékonysága HDR javító mechanizmus alkalmazása során MS12 törzs esetében. A célzott diszrupciós sikeressége a transzformációt követően izolált telepek azon százalékát mutatja be, melyekben a diszrupció a megfelelő helyen mutatkozott meg.

Törzs	Transzformáció elemei (A)	Javító mechanizmus	Transzformációs hatékonyság (telep/10 <sup>5</sup> protoplaszt)	Célzott diszrupció sikeressége (B)
<i>M. circinelloides</i> MS12	Cas9 (100 µM), gRNR (100 µM), templát DNS (5 µg)	HDR	2	100%
<i>M. circinelloides</i> MS12	templát DNS (5, 10 vagy 15 µg)	-	0	0
<i>M. circinelloides</i> MS12	Cas9 (100 µM), gRNS (100 µM)	-	0	0



**7. ábra.** A *M. circinelloides* MS12 törzs, valamint a kísérleteink során létrehozott mutáns törzsek összehasonlítása, illetve a *pyrG* gén integrációjának igazolása során kapott amplifikációs mintázat agaróz gélelektroforézise. **A)** Nem transzformált, kettős auxotróf MS12 törzs. **B)** A *carB* deficiens, NHEJ által létrehozott MS12-*carB*'/1 és MS12-*carB*'/2 mutánsok. **C)** *PyrG* markergént hordozó, HDR által létrehozott MS12-*carB*+*pyrG*/1 és MS12-*carB*+*pyrG*/2 mutánsok, illetve **D)** azok PCR általi ellenőrzése *MccarB1* és *MccarB2* indítószekvenciák használatával [1. számú melléklet]. **M)** GeneRuler 1 kb DNS létra (Thermo Scientific™); **1)** MS12 törzs; **2)** MS12-*carB*+*pyrG*/1 törzs; **3)** MS12-*carB*+*pyrG*/2 törzs.

A PCR termékek szekvencia elemzése igazolta, hogy a *pyrG* gén sikeresen integrálódott a célszekvenciába nukleotid pontosan. A transzformáns izolátumok nem szelektív körülmények között, legalább 15 átoltási ciklus után is, mitótikusan stabilnak bizonyultak. A *carB* mutánsok morfológiája nem különbözött a szülői törzseknél megfigyelttől. A karotinoid bioszintézis megszakításából fakadó morfológiai változások hiányát más szervezetekben is megfigyelték, például *Fusarium fujikuroi*, *N. crassa*, *Xanthophyllomyces dendrorhous* vagy *P. blakesleeanus* esetében (Avalos és Limón 2015). Ugyanakkor az általunk létrehozott *M. circinelloides carB* mutánsok csökkent növekedést mutattak 35 °C-on, ami arra utal, hogy a karotinoidtartalom befolyással bír a gomba túlélésére magasabb hőmérsékleten [8. ábra]. Ez egybevágh az a megállapítással, hogy a karotinoidok védőhatást gyakorolhatnak *M. circinelloides* fonalas gombára magasabb hőmérsékleten, továbbá, hogy a  $\beta$ -karotin és a karotinoidok antioxidáns természetük által szerepet játszanak az oxidatív stressz elleni védekezésben (Avalos és Limón 2015). Eredményeink alapján a *carB*-mutánsok menadionnal és hidrogén-peroxiddal szembeni érzékenysége nem változott az eredeti törzsekkel szemben, ami arra utal, hogy a karotinoid-tartalom nem játszik jelentős szerepet a *M. circinelloides* oxidatív stressz elleni védekezésben, legalábbis a vizsgált oxidálószer tekintetében.



**8. ábra.** *Mucor circinelloides carB* mutánsok növekedése 35 °C-on. Az MS12-*carB'*/1; MS12-*carB'*/2; MS12-*carB*+*pyrG*/1; MS12-*carB*+*pyrG*/2 és MS12 törzseket minimál táptalajon tenyésztettük folyamatos megvilágítás mellett. A \* és \*\* értékek szignifikáns eltérést jeleznek az MS12 törzshöz képest a kétmintás, t-próba alapján, ahol \*:  $p \leq 0,05$  és \*\*:  $p \leq 0,01$ .

### **6.1.3. A CRISPR-Cas9 rendszer alkalmazása járomspórás gombában: összefoglalás/értékelés**

Kísérleteink során sikeresen alkalmaztuk a CRISPR-Cas9 rendszert *M. circinelloides* járomspórás fonalas gombában, a fitoén-dehidrogenázt kódoló *carB* gén elrontásán keresztül. A CRISPR-Cas9 rendszer oly módon történő alkalmazása, mely során a hibajavítás NHEJ úton történt, sikeresnek mondható *M. circinelloides* fonalas gomba esetén, továbbá a létrehozott *carB* mutánsok genetikailag stabilnak bizonyultak. Figyelembe kell vennünk azonban, hogy a mutánsok genomjában nagyméretű deléciókat detektáltunk a PAM szekvenciától 5' irányban, mely mutációk befolyásolták a szomszédos gént is. Gombák esetén a NHEJ során keletkező indelek létrejötte ismert jelenség, azonban ezek hossza lényegesen kisebb, általánosságban néhány tíz nt hosszúságú (Nødvig és mtsi. 2015, Fuller és mtsi. 2015). Mivel eredményeink azt mutatják, hogy a NHEJ nagyméretű deléciókat okozhat a *M. circinelloides* esetében, ezért nem alkalmas precíz, irányított mutációk kivitelezésére, illetve a transzformáció során előállított mutánsok genomi szintű vizsgálata nélkülözhetetlen a kísérleteket követően.

Fonalas gombák CRISPR-Cas9 rendszerrel történő génszerkesztése során felmerülő problémák leggyakrabban a Cas9 és sgRNS elégtelen kifejeződése (Wang és mtsi. 2016\*), az alacsony szerkesztési hatékonyság (Matsu-Ura és mtsi. 2015), a pozitív transzformánsok szelekciójának nehézsége (Weber és mtsi. 2017), a Cas9 általi toxicitás (Morgens és mtsi. 2017) és az *off-target* hatás (Schuster és Kahmann 2019). Az *in vitro* szintetizált gRNS és a Cas9 protein natív formában való használata hatékonynak bizonyult, továbbá kiküszöbölte a CRISPR-Cas9 rendszer alkotóelemeinek génmanipulációt követő fennmaradását, ami a Cas9 általi toxicitás fő okozója lehet. A kettős szálú DNS törés növelheti a HDR általi javítás gyakoriságát, ahogy azt *S. cerevisiae* és *C. glabrata* esetén is ismert (DiCarlo és mtsi. 2013, Enkler és mtsi. 2016). A Cas9 nukleázzal történő hasítást követően a *carB*-homológ fragmentumoknak köszönhetően a *pyrG* gén integrációját valósítottuk meg a gomba saját homológ rekombináción alapuló javítási mechanizmusa révén, így a pozitív klónok szelekciójának általános nehézsége is kiküszöbölésre került. Az általunk tapasztalt transzformációs gyakoriság alacsonynak tekinthető, azonban hangsúlyozni kell, hogy minden korábbi kísérlet, amely a klasszikus genetikai transzformációs módszereket alkalmazta ugyanazon templát DNS *Mucor* genomba történő integrálása céljából, sikertelennek bizonyult. A HDR olyan stabil transzformánsokat eredményezett, amelyekben a gén

elrontása és a szelekciós marker megfelelő helyre történő integrálása végbement. Sem az integrált DNS degradálódására, sem reorganizálódására utaló jeleket nem találtunk.

## 6.2. A CotH fehérjecsalád szerepe *Mucor circinelloides* fonalas gombában

A CRISPR-Cas9 rendszer járomspórás gombára történő optimalizálását követően a *M. circinelloides* fonalas gombában ismeretlen szereppel bíró *cotH* géncsalád átfogó vizsgálatát kezdhettük meg, melyre eddig a transzformálás nehézségeiből kifolyólag nem volt lehetőségünk.

### 6.2.1. CotH-szerű gének azonosítása *Mucor circinelloides* genomon

JGI MycoCosm *M. circinelloides* f. *lusitanicus* genom adatbázisban (<https://genome.jgi.doe.gov/Mucci2/Mucci2.home.html>) a CotH-doménnel való homológiai keresés által 17 *cotH*-szerű gént és azt kódoló fehérjét azonosítottunk, melyeket saját névvel láttunk el [3. táblázat].

**3. táblázat.** *Mucor circinelloides* genomjában azonosított CotH fehérje homológokat kódoló gének genomai pozíciója és elnevezése a JGI MycoCosm genom adatbázisban, az azonosított CotH-szerű proteinek JGI MycoCosm adatbázisban szereplő fehérje azonosító kódja, illetve a dolgozatban használt elnevezéseik.

A gén elnevezése a JGI MycoCosm genom adatbázisban	A JGI MycoCosm adatbázisban szereplő fehérje azonosító kód	Genomi pozíció	Dolgozatban használt elnevezés
fgenesh1_pg.04_#_1077	163402	scaffold_04:3619489-3621215	<i>cotH1</i>
estExt_Genemark1.C_041216	184292	scaffold_04:3624356-3626724	<i>cotH2</i>
Genemark1.5065_g	109302	scaffold_03:4195375-4197670	<i>cotH3</i>
fgenesh1_kg.13_#_7_#_896	157567	scaffold_13:68044-70136	<i>cotH4</i>
fgenesh1_pg.03_#_1241	162126	scaffold_03:4199213-4201042	<i>cotH5</i>
estExt_fgenesh1_pg.C_011037	188068	scaffold_01:3650875-3652572	<i>cotH6</i>
Mucci1.fgeneshMC_pg.5_#_961	83004	scaffold_05:3045066-3047115	<i>cotH7</i>
Mucci1.fgeneshMC_pg.1_#_615	76509	scaffold_01:4065803-4067778	<i>cotH8</i>
Mucci1.fgeneshMC_pg.2_#_1279	78987	scaffold_02:851742-853602	<i>cotH9</i>
Genemark1.2134_g	106371	scaffold_02:438426-440317	<i>cotH10</i>
Genemark1.3405_g	107642	scaffold_02:4177973-4179826	<i>cotH11</i>
Genemark1.7780_g	112017	scaffold_05:3066683-3068624	<i>cotH12</i>
Genemark1.10886_g	115123	scaffold_09:739842-741851	<i>cotH13</i>
fgenesh1_pg.04_#_767	163092	scaffold_04:2557436-2559313	<i>cotH14</i>
fgenesh1_pg.05_#_237	163852	scaffold_05:801902-803707	<i>cotH15</i>
estExt_Genemark1.C_011941	182734	scaffold_01:5891871-5893829	<i>cotH16</i>
fgenesh1_pg.08_#_221	166651	scaffold_08:720456-722159	<i>cotH17</i>

A CotH-domén (Pfam: PF08757) a CotH fehérjecsaldra jellemző egyedi fehérje alegység, mely a szakirodalmi adatok szerint kináz funkcióval bír számos faj esetén (Nguyen és mtsi. 2016). Érdemes megjegyezni, hogy a CotH-domén egésze nem, csak bizonyos AS-ak pozíciója konzervált, és a domén nagy változatosságot mutat az egyes CotH-szerű fehérjék esetében [3. számú melléklet].

### 6.2.2. A *cotH* géncsalád *in silico* analízise

Az European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI) adatbázis alapján (Madeira és mtsi. 2019) történő keresés után megállapítottuk, hogy a CotH fehérjecsald több mint 1000 fajban prediktálható, s előfordul mind prokariótákban (1020 faj), mind az eukariótákban (73 faj), jellemzően a spóráképző fajokat magukba foglaló csoportokban (pl. Bacillales és Clostridiales vagy Mucorales és Neocallimastigales), de megtalálható egyes vírusokban (5 faj) és archeákban is (9 faj). A Pfam adatbázisban (El-Gebali és mtsi. 2019) való keresés alapján a CotH fehérje a gomba taxonok közül négy csoportban képviselt: a Chytridiomycota rendben négy, a Mucormycota rendben tizenhárom, a Zoopagomycota csoportban egy és a Dikarya taxonban négy fajjal. Érdemes megemlíteni, hogy bár a CotH fehérjecsald egyes vírusoktól (*Bacillus virus G*) kezdve az euglenozoákig (*Trypanosoma cruzi*) számos fajban előfordul keresési eredményünk alapján, szerepe csak néhány esetben tisztázott (pl. *B. subtilis*, *R. delemar*) (Naclerio és mtsi. 1996, Zilhao és mtsi. 1999, Nguyen és mtsi. 2016, Gebremariam és mtsi. 2014).

*R. delemar* CotH3 fehérjével való AS szekvencia hasonlóság alapján a CotH fehérjecsald jelenlétét valószínűsítették *L. corymbifera*, *L. parvicida*, *M. circinelloides*, *M. racemosus*, *M. velutinous*, *M. verticillata* és *R. stolonifer* esetében (Gebremariam és mtsi. 2014). A *Rhizopus* CotH3 fehérje hordoz egy olyan AS szekvenciát, melyet a gombaspórák és a gazda endotél sejtek közötti specifikus, receptor-ligand kötésért tartanak felelősnek (Annie és mtsi. 2018). A CotH3 fehérje ellen termeltetett IgG poliklonális antitestek védelmet biztosítottak a DKA-ban szenvedő egereknek a *Rhizopus* által kiváltott mucormikózissal szemben (Gebremariam és mtsi. 2014), illetve más, rokon fajok (*L. corymbifera*, *C. bertholletiae*, *M. circinelloides*, *M. ramosissimus* és *Rhizomucor* spp.) esetén is meggátolták a betegség kialakulását.



Mindezeket összevetve a CotH3 patogenitásában betöltött szerepe miatt fontosnak véltük az általunk azonosított 17 *cotH*-szerű gén által kódolt fehérjék AS szekvenciáinak összevetését a fentebb említett fehérjével [4. táblázat]. Az NCBI Blast (*NCBI Resource Coordinators* 2016) által prediktált eredményeink alapján a legnagyobb hasonlóságot a CotH4 (49,3%), a CotH6 (52,1%) és a CotH13 (72,9%) mutatta. Érdeemes megemlíteni, hogy a CotH4, CotH6 és CotH13 esetén homológia valószínűsíthető a „CotH-motívumként” leírt *R. delemar* AS szekvenciával [9. ábra].

„CotH-motívum”	-----MGQTNDGAYRDPDND
CotH4	WDAYWQEQTNDGAYIDTNE
CotH6	WDGYWAMQTNDGAYKDYAN
CotH13	WDGYWMAQTNDGAYKDGETN

**9. ábra.** *Rhizopus delemar* CotH3 fehérjében azonosított „CotH-motívumként” leírt AS szekvencia és az azzal legnagyobb homológiát mutató *Mucor circinelloides* CotH-szerű proteinek AS szekvenciájának összehasonlítása illesztés formájában.

**4. táblázat.** *Rhizopus delemar* CotH3 fehérjével való szekvencia hasonlóság.

Dolgozatban használt elnevezés	Szekvencia azonosság (%)	Szekvencia lefedettség (%)
<i>cotH1</i>	35,2	42,5
<i>cotH2</i>	34,2	42,5
<i>cotH3</i>	32,5	36,2
<i>cotH4</i>	49,3	79,2
<i>cotH5</i>	32,5	36,2
<i>cotH6</i>	52,1	94,5
<i>cotH7</i>	31,1	32,0
<i>cotH8</i>	27,0	35,8
<i>cotH9</i>	31,8	32,3
<i>cotH10</i>	36,4	24,6
<i>cotH11</i>	34,4	30,2
<i>cotH12</i>	35,0	46,1
<i>cotH13</i>	72,9	90,2
<i>cotH14</i>	32,6	39,6
<i>cotH15</i>	31,3	28,1
<i>cotH16</i>	34,8	30,2
<i>cotH17</i>	28,9	42,9

Ezt követően elvégeztük az azonosított 17 CotH-szerű fehérje *in silico* jellemzését *M. circinelloides*-ben. A továbbiakban, a dolgozatban részletesen tárgyalt CotH1-CotH6 fehérjék *in silico* elemzését mutatjuk be. Jellemzésük során figyelembe vettük a fehérjék sejten belüli lehetséges lokalizációját; szignál peptid és GPI-horgony lehetséges jelenlétét; továbbá ortológia-keresést hajtottunk végre [5. táblázat]. A CotH proteinek esetében prediktált doméneket a 4. számú melléklet tartalmazza.

A *cotH1* gén (1727 nt) egy 555 AS hosszúságú fehérjét kódol. A CotH1 fehérje szignál peptiddel rendelkezik és feltehetőleg az extracelluláris térben lokalizálódik, számított tömege 61,7 kDa. A 182-532 AS közötti régió egy CotH-doménnek (Pfam: PF08757) felel meg. AS szekvenciája a RO3T\_09276 *Rhizopus* fehérjével mutat leginkább hasonlóságot [5. táblázat], a *R. delemar* CotH3 fehérjével pedig 42,5%-os lefedettség mellett 35,2%-os szekvencia azonosságot mutat [4. táblázat]. A molekulák szignál peptid része, mely a fehérjék N-terminálisán található 16-30 aminosavból álló szakasz, irányítja a peptideket a szekréción útjára át a célpontjukhoz (Owji és mtsi. 2018). Predikciónk alapján a CotH1 fehérje rendelkezik ilyen szekvencia részlettel [5. táblázat].

A *cotH2* gén által kódolt 621 AS hosszúságú 66,92 kDa-os CotH2 fehérje a *Rhizopus* CotH3 fehérjével 34,2%-ban egyezik meg [4. táblázat]. Legnagyobb hasonlóságot a *R. delemar* (RO3T\_09275) fehérjével mutatja (68%) 99%-os lefedettség mellett [5. táblázat]. Kisebbséggel ( $E$ -érték=3e+02) prediktálható a fehérjén belül 1-4 AS pozícióban egy Big-1 (Bakteriális Ig-1-szerű) (Pfam: PF02369) domén részlet [4. számú melléklet]. A géntermék továbbá feltehetőleg tartalmaz szignál peptidet, mely az extracelluláris térben történő lokalizációjához szükséges, illetve GPI-horgonyt.

A *cotH3* gén terméke egy 707 AS hosszúságú, szignál peptiddel rendelkező, feltehetőleg extracelluláris térben lokalizálódó, 77,85 kDa nagyságú fehérje. 457-474 AS pozícióban az *in silico* elemzések kimutattak egy SBDS (Shwachman-Bodian-Diamond szindróma) proteinre (Ribosome maturation protein Sdo1/SBDS protein) jellemző domént (Pfam: PF09377) ( $E$ -érték= 0,0018) [4. számú melléklet]. Az SBDS fehérje a sejtmagban lokalizálódik, ahol fontos szerepet játszik a riboszóma biogenezisében (Savchenko és mtsi. 2005, Shammass és mtsi. 2005, Menne és mtsi. 2007), továbbá szerepet játszhat a növekedésben, a sejtciklus progressziójában és az apoptózis szabályozásában (Nihrane és mtsi. 2009). A *M. circinelloides* CotH3 a legnagyobb hasonlóságot a *R. delemar* (RO3T\_02653) fehérjével mutatja (36%) 77%-os lefedettség mellett [5. táblázat], míg a *Rhizopus* CotH3 fehérjével való azonossága 32,5% [4. táblázat].

A *cotH4* gén által kódolt protein feltehetőleg az extracelluláris térben lokalizálódó, szignál peptiddel rendelkező, 592 AS hosszúságú, 65,31 kDa molekulatömegű fehérje. 1-7 AS pozícióban hordozza a ( $E$ -érték = 1,7e+03) Big-domén egy részletét (Pfam: PF02369). A CotH4 protein 523-590 AS közötti régiója alaninban gazdag ( $E$ -érték= 0,00025). 567-574 AS között egy ATP/GTP-kötő motívum, ún. P-loop

található [4. számú melléklet]. Legnagyobb hasonlóságot egy prediktált *R. delemar* (RO3T\_00116) fehérjével mutatja [5. táblázat], a *Rhizopus* CotH3 proteinnel pedig 49,3%-ban azonos [4. táblázat].

A *cotH5* gén által kódolt 569 AS hosszúságú, 64,7 kDa molekulatömegű szignál peptiddel rendelkező fehérje, mely feltételezhetőleg a mitokondriumban lokalizálódik. Legnagyobb hasonlóságot a RO3T\_00453 *R. delemar*-ban megtalálható proteinnel mutat [5. táblázat]. Feltehetőleg egy ATP/GTP-kötő motívumot (Prosite ID: PDOC00017) hordoz az 512-519 AS pozícióban [4. számú melléklet].

A *cotH6* gén által kódolt 524 AS hosszúságú, extracelluláris lokalizációjú fehérje feltételezetten sejtfal-kötő ismétlődést (PF01473) tartalmaz (E-érték=45) a 366-388 AS pozícióban. A CotH6 fehérje 100%-os szekvencia lefedettség mellett a legnagyobb hasonlóságot a *R. delemar* (RO3T\_04188) fehérjéjével mutatja [5. táblázat], míg a *Rhizopus* CotH3 proteinnel 94,5%-os lefedettség mellett 52,1%-os hasonlóságot mutat [4. táblázat].

**5. táblázat.** A CotH fehérjék *in silico* jellemzése *Mucor circinelloides*-ben. A táblázatban feltüntettük a vizsgált fehérjék feltételezett sejten belüli lokalizációját; szignál peptid és GPI-horgony lehetséges jelenlétét; továbbá az ortológ keresés folyamata során eredményül kapott legközelebbi proteinek kódját, az adott ortológ fehérjét hordozó organizmus nevét és az ortológgal való azonosság fokát a feltüntetett szekvencia lefedettség mellett.

Név	Hossz (AS)	Feltételezett lokalizáció	Szignál peptid	GPI-horgony	Feltételezett ortológ (Best Hit)	Leghasonlóbb ortológgal való azonosság (%) és szekvencia lefedettség (%)
<i>cotH1</i>	555	extracelluláris	+	-	RO3T_09276 <i>R. delemar</i>	59 (97)
<i>cotH2</i>	621	extracelluláris	+	+	RO3T_09275 <i>R. delemar</i>	68 (99)
<i>cotH3</i>	707	extracelluláris	+	-	RO3T_02653 <i>R. delemar</i>	36 (77)
<i>cotH4</i>	592	extracelluláris	+	+	RO3T_01116 <i>R. delemar</i>	67 (97)
<i>cotH5</i>	569	mitokondriális	+	-	RO3T_00453 <i>R. delemar</i>	35 (95)
<i>cotH6</i>	524	extracelluláris	+	-	RO3T_04188 <i>R. delemar</i>	63 (100)
<i>cotH7</i>	594	extracelluláris	+	-	77075 <i>P. blakesleeanus</i>	47 (90)
<i>cotH8</i>	589	extracelluláris	+	-	RO3T_04401 <i>R. delemar</i>	55 (91)
<i>cotH9</i>	595	extracelluláris	+	-	140728 <i>P. blakesleeanus</i>	38 (98)
<i>cotH10</i>	570	extracelluláris	+	+	140724 <i>P. blakesleeanus</i>	41 (90)
<i>cotH11</i>	596	extracelluláris	+	-	RO3T_02653 <i>R. delemar</i>	52 (93)
<i>cotH12</i>	607	extracelluláris	+	+	77204 <i>P. blakesleeanus</i>	52 (92)
<i>cotH13</i>	590	extracelluláris	+	-	RO3T_11881 <i>R. delemar</i>	69 (98)
<i>cotH14</i>	581	extracelluláris	-	-	64709 <i>P. blakesleeanus</i>	38 (99)
<i>cotH15</i>	581	extracelluláris	+	-	RO3T_02653 <i>R. delemar</i>	52 (97)
<i>cotH16</i>	524	sejtmagi	-	-	RO3T_04401 <i>R. delemar</i>	50 (97)
<i>cotH17</i>	590	extracelluláris	+	-	64709 <i>P. blakesleeanus</i>	39 (96)

### 6.2.3. A CotH fehérjecsald szerepe *Mucor circinelloides* fonalas gombában: összefoglalás/értékelés

A CotH-doménnel történő homológia-keresés alapján 17 *cotH*-szerű gént azonosítottunk JGI MycoCosm *M. circinelloides* f. *lusitanicus* genom adatbázisban, melyeket saját névvel láttunk el. A *M. circinelloides* gombában található CotH proteinek közül, AS szekvenciájuk alapján a CotH4 (49,3%), a CotH6 (52,1%) és a CotH13 (72,9%) proteinek mutatják a legnagyobb hasonlóságot a patogenitásban ismert szereppel bíró, *R. delemar* CotH3 proteinnel. Továbbá, e három fehérjében a szakirodalomban „CotH-motívumként” ismert szekvencia is azonosítható volt. A *M. circinelloides*-ben azonosított CotH-szerű fehérjék lehetséges sejten belüli lokalizációja főképp extracelluláris jellegű, továbbá a CotH14 és CotH16 fehérjék kivételével szignál peptid jelenléte felétételezhető esetükben. A CotH2, CotH4, CotH10 és CotH12 proteinek feltehetőleg rendelkeznek GPI-horgonnyal, továbbá a CotH2 és CotH4 proteinek Big-1 doménnel, mely egy 95 AS hosszúságú, felszíni fehérje, és az intimin/invazin család tagjaként az emlős gazdasejtekhez történő kapcsolódás és invázió közvetítése által fontos tényezője lehet a patogenitásnak (Halaby és mtsi. 1999, Matsunaga és mtsi. 2003, Mei és mtsi. 2015). A baktérium külső membránját a C-terminális lektin-szerű doménjéhez rögzíti, mely után a gazdasejt membránján található receptorokkal való kapcsolat meg tud valósulni (Kelly és mtsi. 1999, Hamburger 1999, Luo és mtsi. 2000). A GPI-vel rögzített proteinek (GPI-AP) mindenütt megtalálhatók az eukarióta szervezetekben és számos biológiai funkciójuk lehet, például szerepük lehet a ligand felismerésben, enzimatis aktivitásokban, sejt-sejt kölcsönhatásban és a gazdaszervezet védelmében (Ferguson és mtsi. 1994). Számos GPI-AP részt vesz a sejtfa szerkezetének kialakításában és átrendeződési folyamatainak szabályozásában *S. cerevisiae* esetében, elengedhetlenné téve GPI bioszintézis folyamatát a gomba morfogenezise szempontjából (Arroyo és mtsi. 2007). A GPI-AP mutánsok a vad típustól eltérő telepmorfológiát, jelentősen lassabb növekedést, sejtlyizist és rendellenes „sejt a sejtben” fenotípust mutatnak *N. crassa* esetében (Bowman és mtsi. 2006). Egyes spórafal proteinekben található Big-1 domén és GPI- horgony, mint például a selyemlepkék nozemózisát okozó *Nosema bombycis* SWP5 spórafal fehérje esetében (Li és mtsi. 2011). Mindezek alapján úgy gondoljuk, hogy a CotH2 és CotH4 fehérjék sejtfa asszociált proteinek lehetnek. A CotH6 protein AS szekvenciája egy baktériumokból ismert 20 AS hosszúságú motívum, ún. sejtfa-kötő ismétlődések jelenétét valószínűsítette. E motívumot hordozó fehérjék funkciójukat tekintve többnyire

kolint kötő fehérjék vagy glükóz-transzferázok (Shah és mtsi. 2004), melyeket virulencia faktorokként is azonosítottak *Streptococcus pneumoniae* baktériumban (Fernández-Tornero és mtsi. 2001). A CotH4 és CotH6 protein olyan ATP/GTP-kötő motívummal rendelkezik, mely a kinázok sajátosságának tekinthető (Hulo és mtsi. 2006, 2008).

A CotH fehérjék *in silico* analízise alapján a CotH fehérjecsalád feltehetőleg egy többféle funkcióval bíró protein család, melynek egyes tagjai nagy hasonlóságot mutatnak a *R. delemar*-ban azonosított, patogenitásban szerepet játszó CotH3 proteinnel, míg más képviselői a karotintermelő, fonalas modellorganizmus *P. blakesleanus* ismeretlen szerepű fehérjéivel mutatnak magas fokú AS szekvencia azonosságot. A *Mucor* CotH fehérjékben *in silico* prediktált, patogenitáshoz köthető motívumok jelenléte miatt a patogenitással való kapcsolat, a CotH-motívum általános jelenléte okán pedig a spórázás, s az ahhoz köthető egyéb biológiai folyamatok (például csírázás, spóramorfológia) miatt a CotH1-CotH6 fehérjéket választottuk ki további analízisre.

### **6.3. *Mucor circinelloides cotH* mutáns törzsek létrehozása és a gének elrontásának igazolása molekuláris biológiai módszerekkel**

Az általunk azonosított gének jellemzésének céljából azok célzott elrontását a 6.1-es fejezetben leírt *M. circinelloides* fonalas gombára optimalizált genomszerkesztő eljárás segítségével vittük véghez. Ehhez minden génre egyedi diszrupciós kazettákat hoztunk létre a *carB* mutáns létrehozásával leírt módszer segítségével [2. melléklet]. A dolgozatban szereplő *cotH* gének elrontásának mechanizmusát a *cotH1* gén elrontásának példáján keresztül mutatjuk be. Az elrontására tervezett diszrupciós kazetta sematikus képét az 5. számú melléklet tartalmazza. A *M. circinelloides* MS12 (*leuA*- és *pyrG*) protoplasztjait transzformáltuk a célgénre specifikus gRNS-sel, a templát DNS-sel és Cas9 nukleázzal. A génre specifikus protospacer szekvencia a következő volt: 5'TGCCATCAAGTTGCGTGCTG'3, mely a 706-726 genomi pozíciót lefedő szekvencia komplementere.

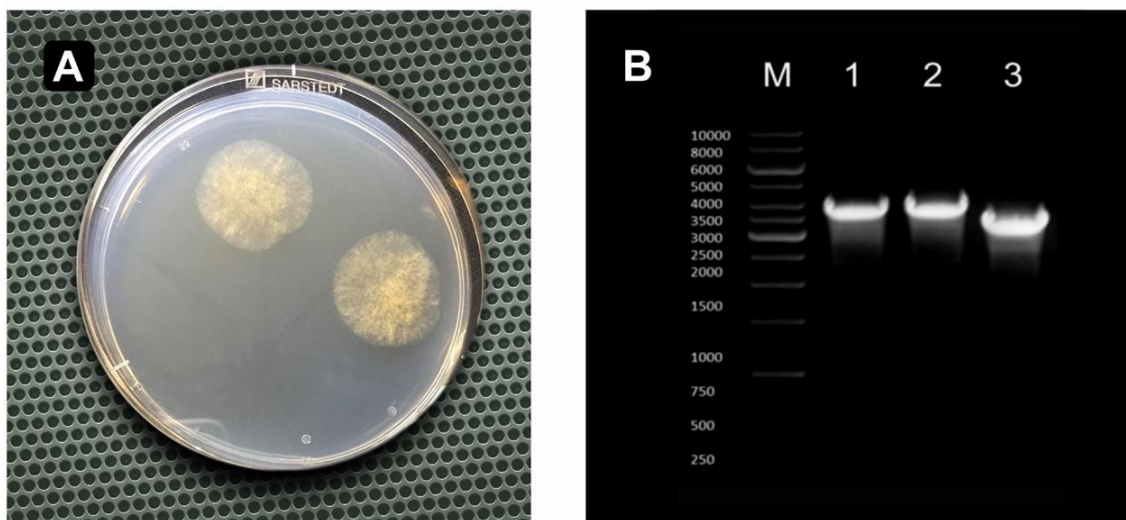
A *cotH2*, *cotH3*, *cotH4* és *cotH5* gének esetében hasonló módon jártunk el. Elrontásuk céljából a 6. táblázatban ismertetett szekvenciájú protospacer szekvenciákat alkalmaztuk. A gének promóterét és a protospacer szekvenciától forward irányban található kódoló régiót; a *cotH* géneket kódoló szekvenciát a protospacer-től upstream szakaszt és a *pyrG* gént saját promóterével és terminátor szekvenciájával hagyományos PCR keretein belül szaporítottuk fel. A „Fúziós PCR” során az adott génre specifikus

indítószekvenciákkal [1. számú melléklet] létrehoztuk a *cotH* génekkel homológ szakaszokat hordozó templát DNS-t, majd a CRISPR-Cas9 rendszer komponenseivel együtt célzott génszerkesztést hajtottunk végre.

**6. táblázat.** A *cotH* gének elrontása céljából végrehajtott genetikai transzformálás során felhasznált protospacer szekvenciák és azok genomi pozíciója.

A genetikai transzformálás során felhasznált protospacer szekvenciák		
Szekvencia elnevezése	Szekvencia	Genomi pozíció
McCotH1gRNS	5'TGCCATCAAGTTGCGTGCTG'3	706-726
McCotH2gRNS	5'GCCTTGAGTCCTGAAGTCGA'3	1192-1212
McCotH3gRNS	5'TCCACTATGGAGAATACCAT'3	1399-1419
McCotH4gRNS	5'AAGGCCAAGATCACTTTCAT'3	517-537
McCotH5gRNS	5'CTACCCGTTATTCCTACGCCAG	780-803
McCotH6gRNS	5'TAGCACGAAGACAGTCGGCA'3	670-691

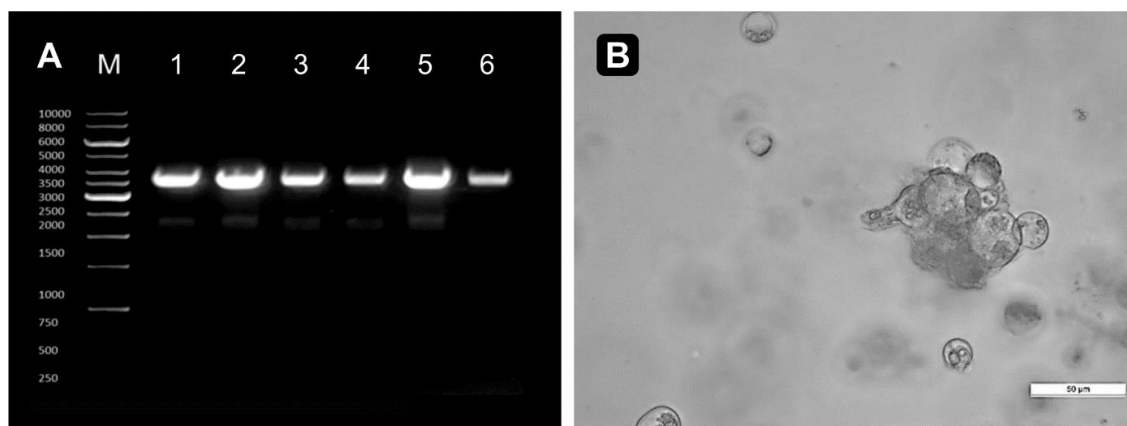
A templát DNS-sel történő, Cas9, gRNS és PEG-mediált protoplaszt transzformálás során kapott transzformációs gyakoriság 2 telep/10<sup>5</sup> protoplaszt volt [10. ábra A)]. A kapott telepek előszelekciónját minden *cotH* gén esetében hagyományos PCR segítségével végeztük, a "nested upstr frw" és "nested upstr rev" indítószekvenciák [2. számú melléklet] segítségével [10. ábra B)].



**10. ábra.** A mutánsok előszelekciónja. **A)** Az MS12- $\Delta$ *cotH1*+*pyrG* transzformánsok telepei szelektív táptalajon, **B)** illetve azok PCR alapú genomi ellenőrzése az "MccotH1/7" és "MccotH1/8" indítószekvenciákkal [1. számú melléklet] történő amplifikációt követően. **M)** GeneRuler 1 kb DNS létra (Thermo Scientific™); **1)** MS12- $\Delta$ *cotH1*+*pyrG*/1 törzs; **2)** MS12- $\Delta$ *cotH1*+*pyrG*/2 törzs; **3)** MS12 törzs.

A transzformációs gyakoriság a *cotH2* gén elrontása esetében 1 telep/ $10^5$  protoplaszt, a *cotH3* gén esetében 1 telep/ $10^5$  protoplaszt, a *cotH4* gén esetében 4 telep/ $10^5$  protoplaszt, a *cotH5* gén esetében pedig 6 telep/ $10^5$  protoplaszt volt, melyek mindegyike a PCR alapú előszűrés során a *pyrG* megfelelő helyre történő integrációját jelezte. A transzformáns izolátumok még nem szelektív körülmények között is, legalább 15 átoltási ciklus után is, megőrizték stabilitásukat, tehát mitotikusan stabilnak tekinthetők.

A *cotH6* gén elrontása folyamán rendszerint olyan telepeket kaptunk, melyek bár képesek voltak a szelektív táptalajon történő növekedésre, az "*MccotH6/7*" és "*MccotH6/8*" indítószekvenciákkal [1. számú melléklet] történő, hagyományos PCR során kapott eredmények alapján azonban a szelekciós markergén templát DNS-sel történő genomi integrációja nem valósult meg, tehát a diszrupciós kazettát feltehetőleg extrakromoszómálisan hordozták, vagy nagyobb valószínűséggel a templát DNS segítségével a *pyrG* génben történő mutáció javításra került [11. ábra A)]. Szelektív táptalajon 18 óra elteltével fénymikroszkóp alatt vizsgálva a protoplasztokból kiinduló hifák növekedését, lassan növvő, majd elhaló telepek képződését detektáltuk, melyek nem fejlesztettek molekuláris ellenőrzésre alkalmas mennyiségű micéliumot [11. ábra B)]. A hifaképzés a regenerálódást követően megindult, azonban a telepek 1 napos növekedés után elpusztultak. Mindezek alapján arra következtettünk, hogy a *cotH6* gén egy olyan fontos funkcióval bírhat, melynek kiesése letális a gomba számára.



**11. ábra. A)** A *cotH6* gén elrontás során nyert transzformáns telepek hagyományos PCR általi ellenőrzésének agaróz gélelektroforézises mintázata. **M)** GeneRuler 1 kb DNS létra (Thermo Scientific™); **1-5)** A kapott telepek (feltételezett *cotH6* mutánsok); **6)** MS12 törzs. A transzformánsokból felszaporított géntermék a szülői törzssével megegyező méretűnek bizonyult (3824 bp). **B)** Feltételezett *cotH6* mutánsok 18 órával a transzformálás után. A méretskála 50 µm-nek felel meg.

A PCR alapú előszelekciót követően qRT-PCR segítségével ellenőriztük az elrontani kívánt gének kifejeződését, mely alapján megállapítottuk, hogy a génszerkesztést követően az elrontani kívánt gének expressziója nem volt detektálható. Ezt követően az 5' nem transzlálódó régióra (*Untranslated Region* – UTR) tervezett forward és a szelekciós markergén felszaporítására használt reverz indítószekvenciák [1. számú melléklet] segítségével felszaporított szakaszok szekvenciájának meghatározásával igazoltuk a *pyrG* megfelelő helyre történő integrációját. A CRISPR-Cas9 rendszer egy nagy specifitással bíró, egyszerű működésű és nagy hatékonyságú génmódosítási módszer, mely széles körben került alkalmazásra nem csak a biológiai kutatásokban, hanem orvosbiológiai alkalmazásban is (Song és mtsi. 2019). A CRISPR-Cas9 rendszer által okozott *off-target* hatások esetleges előfordulása a genom szerkesztése során azonban egy ismert jelenség, melynek hátterében állhat a PAM közelében található (10-12 nt-on belüli) eltérés miatti enzim felismerési probléma, illetve a rendszerben jelen lévő magas Cas9/gRNS koncentráció is (Pattanayak és mtsi. 2013). Minél magasabb a Cas9 enzimnek és a vezető RNS szálnak a koncentrációja a transzformáció során, annál nagyobb gyakorisággal következik be a genomban *off-target* hatás, melynek kiküszöbölésére olyan megoldások születtek, mint az inszertált *cas9* gén plazmiddal történő utólagos eliminációja a rendszerből (Wang és mtsi. 2016\*), továbbá a jelen dolgozatban ismertetett eljárás (Nagy és mtsi. 2017) is megoldásul szolgálhat, ugyanis az endonukleáz a transzformálást követően nem marad fenn a gombában. Mivel a nem specifikus hasítások számának meghatározására a WGS egy széleskörben alkalmazott eljárás (Smith és mtsi. 2014, Dong és mtsi. 2019, Li és mtsi. 2019), ezért az általunk alkalmazott tranzien CRISPR-Cas9 rendszer során előforduló *off-target* események gyakoriságát két mutáns (MS12- $\Delta$ *cotH3*+*pyrG* és MS12- $\Delta$ *cotH4*+*pyrG*) esetében e módszerrel ellenőriztük [7. táblázat].

**7. táblázat.** A WGS analízisbe bevont mutáns törzsek, az elrontott gének azonosítója, a diszruptiót érintő kromoszómák helyzete és a *cotH3* és *cotH4* gének pozíciója.

Törzs	Targetált gén azonosítója	Kromoszóma/scaffold	Pozíció (bp)
MS12 (Benito és mtsi. 1992, SZMC 12082)			
MS12- $\Delta$ <i>cotH3</i> + <i>pyrG</i>	Genemark1.5065_g, CotH	scaffold_03	4195375-4197670
MS12- $\Delta$ <i>cotH4</i> + <i>pyrG</i>	fgenesh1_kg.13_#_7_#_896_1_CCIA_ CCIB_EXT_A, CotH	scaffold_13	68044-70136



A WGS analízis során a mutánsokból nyert genomszekvenciákat összevetettük a recipiens törzs (CBS277.49) genomszekvenciájával. Amennyiben a szekvencia adatokat összehasonlítva nincs egyezés az adott gént érintő pozícióban a gén elrontása igazolásra kerül. A szekvenciaanalízis eredménye alapján az MS12- $\Delta$ *cotH3*+*pyrG* és az MS12- $\Delta$ *cotH4*+*pyrG* mutáns törzsek esetében a gén elrontása megvalósult, az adott gének (*cotH3*, *cotH4*) szerepüket a továbbiakban nem tudják betölteni, tehát diszrupciós mutánsokról beszélhetünk [6. számú melléklet].

A CRISPR-Cas9 rendszer használata során gyakran felmerül a specificitás/pontosság (azaz az *on-target* és az *off-target* hasítás aránya) kérdése. A rendszer genomhasítási pontosságáról a variáns analízis által kaphatunk pontosabb képet, mely a vizsgált mutánsokban keletkező indelek (rövid inszerciók és deléciók) és egy pontos nukleotid-polimorfizmusok (SNP) referencia genommal való összevetése által valósulhat meg. A variáns analízis három különböző eszközzel kapott eredményeit (GATK, Samtools, Freebays) a 8. táblázat összesíti.

**8. táblázat.** Az összes eszköz által azonosított variánsok száma.

Minta	SNP	Indel
MS12	293	51
MS12- $\Delta$ <i>cotH3</i> + <i>pyrG</i>	304	47
MS12- $\Delta$ <i>cotH4</i> + <i>pyrG</i>	299	51

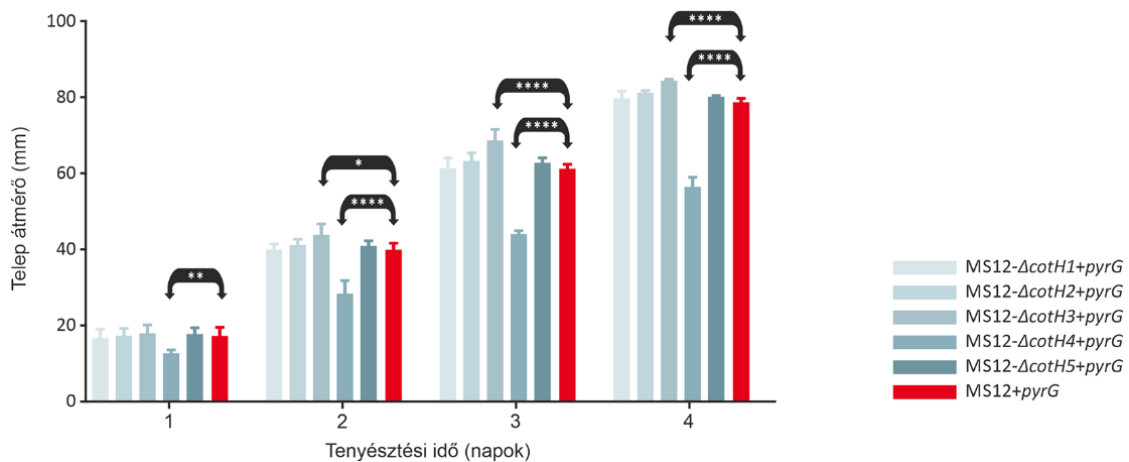
Az általunk alkalmazott CRISPR technika használata során *off-target* hatás nem volt tapasztalható, hiszen a variáns analízis nem mutatott ki a referencia genomtól szignifikánsan eltérő számú SNP-eket, továbbá indeleket a vizsgált törzsek genomjában. Mindezeket figyelembe véve a CRISPR-Cas9 rendszer, ezen plazmidokat nélkülöző, HDR alapú alkalmazása járomspórás gombákban megbízható génszerkesztési stratégiának bizonyult.

## 6.4. A diszrupciós mutáns törzsek fenotípusos vizsgálata

### 6.4.1. A mutáns törzsek növekedésének vizsgálata különböző környezeti feltételek mellett

A járomspórás gombák fajtái eltérő mértékben virulensek, mely összefüggésben állhat az egyes fajok optimális növekedési hőmérséklete közötti különbséggel. Ezek alapján a *M. circinelloides* gomba a Mucorales taxonon belül, egy a *Rhizopus* fajoknál

kevésbé patogén fajnak tekinthető (Khan és mtsi. 2009). A létrehozott diszrupciós törzsek jellemzése során megvizsgáltuk az egyes törzsek életképességét esetlegesen érintő változásokat. Kísérleteinkben elsőként minimál táptalajon teszteltük a mutáns törzsek növekedését, a gomba növekedési hőmérsékleti optimumát jelentő 28 °C-on. A növekedési kinetikát 4 napon át a telepátmérők és a telepek száraztömegének mérésével határoztuk meg. A száraztömegre vonatkozó adatok korreláltak a telepátmérők mérésekor kapott adatokkal, utóbbit a [12. ábra] mutatja be. A gomba növekedési optimumán történő tenyésztés során az MS12- $\Delta$ *cotH3*+*pyrG* és az MS12- $\Delta$ *cotH4*+*pyrG* mutáns törzsek esetében tapasztaltunk növekedési rendellenességet, az előbbi esetében egy fokozott növekedést, míg a *cotH4* mutáns törzs esetében szignifikánsan csökkent növekedést figyeltünk meg az MS12+*pyrG* törzsköz képest [12. ábra].



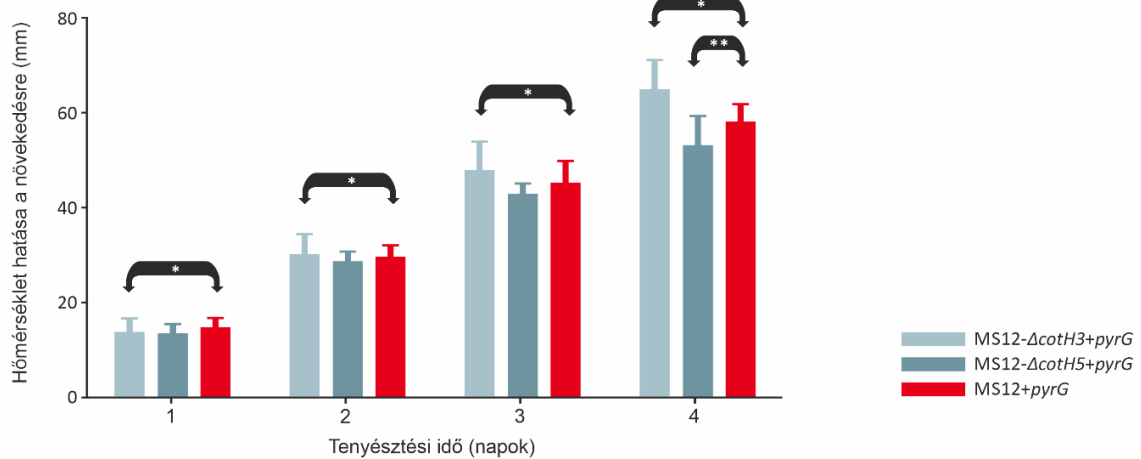
**12. ábra.** A mutáns törzsek telepátmérőjének nyomon követése, 4 napon át, a gomba növekedési hőmérsékleti optimumán (28 °C). A szignifikanciaszint megállapítására kétmintás varianciaanalízist (One Way ANOVA) alkalmaztunk, ahol \*:  $p \leq 0,05$ ; \*\*:  $p \leq 0,01$ ; és \*\*\*\*:  $p \leq 0,0001$ .

Az uracil auxotrofia csökkent növekedéssel és virulenciával járhat, mivel a pirimidin bioszintézis útja befolyással bír ezen folyamatokra (D'Enfert és mtsi. 1996, Retallack és mtsi. 1999, Corbacho és mtsi. 2011, Ying és mtsi. 2013, Binder és mtsi. 2018). *L. corymbifera* esetében a *pyrG* gén komplementációja helyreállította a szülői fenotípust, mely bizonyítja, hogy a *pyrG* mutánsok alkalmazhatók recipiens törzsként genetikai manipulációs kísérletek során (Ibragimova és mtsi. 2020), ezért a létrehozott mutáns törzsek jellemzése során összehasonlításul a *M. circinelloides* f. *lusitanicus* MS12 törzsének *pyrG* komplementált (MS12+*pyrG*) törzsét alkalmaztuk.

A hőmérsékleti optimumon tenyésztett gombatepek fiatal, elágazó hifáit 24 óra elteltével a kitinhez kötődő KV festékkel festettük a hifákban esetlegesen bekövetkező morfológiai változások könnyebb nyomon követése érdekében, majd fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk azokat. Eredményeink alapján nem tapasztaltunk a hifák morfológiájában eltérést a kontroll törzshöz képest [7. számú melléklet].

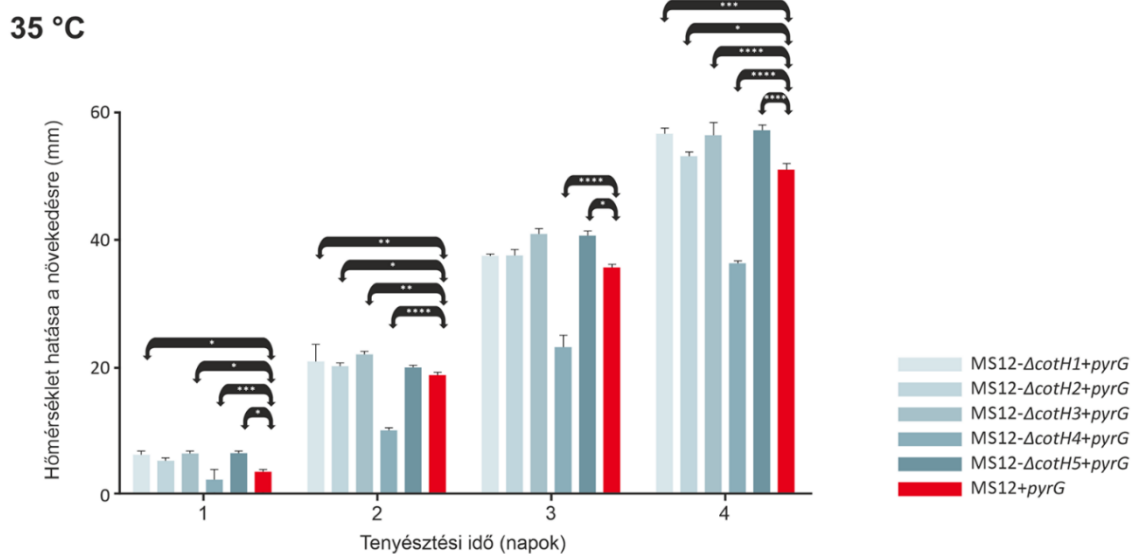
A patogén gombafajok életképességét, szaporodását és a sikeres kolonizációt nagymértékben befolyásolja az, hogy a gombafertőzés során képesek-e alkalmazkodni a gazdaszervezetben uralkodó környezeti körülményekhez, például a megváltozott hőmérsékletre, ezért a törzsek növekedését az optimális növekedési hőmérséklettől eltérő hőmérsékleten (20 °C-on [13. ábra] és 35 °C-on [14. ábra]) is megvizsgáltuk. A hőmérséklet csökkenése nem befolyásolta a *cotH1*, *cotH2*, *cotH4* törzsek telepátmérőinek méretét, azonban az *MS12-ΔcotH3+pyrG* törzs növekedése szignifikánsan elmaradt a kontroll törzs növekedéséhez képest az első ( $p=0,0170$ ), második ( $p=0,0193$ ) és harmadik ( $p=0,0184$ ) napokon is. Az *MS12-ΔcotH5+pyrG* törzs esetében szintén csökkent növekedés volt megfigyelhető a negyedik napon mért teleptmérők tekintetében ( $p=0,0071$ ) [14. ábra].

### 20 °C



**13. ábra.** A mutáns törzsek telepátmérőjének nyomon követése, 4 napon át, a gomba növekedési hőmérsékleti optimumától alacsonyabb hőmérsékleten (20 °C). Az y tengelyen a hőmérséklet változásának hatását láthatjuk a telepátmérőkre vonatkoztatva, melyet az alapján számoltunk ki, hogy az adott törzs 28 °C-on mért telepátmérőjének értékéből (mm) kivontuk a 20 °C-on megfigyelt telepátmérők értékét (mm), ezzel meghatározva a hőmérséklet változásának hatására bekövetkező eltérést (mm). A szignifikancia számolást kétmintás, párosított t-próbával végeztük el, az *MS12+pyrG* törzshöz viszonyítva, ahol \*:  $p \leq 0,05$ ; \*\*:  $p \leq 0,01$ .

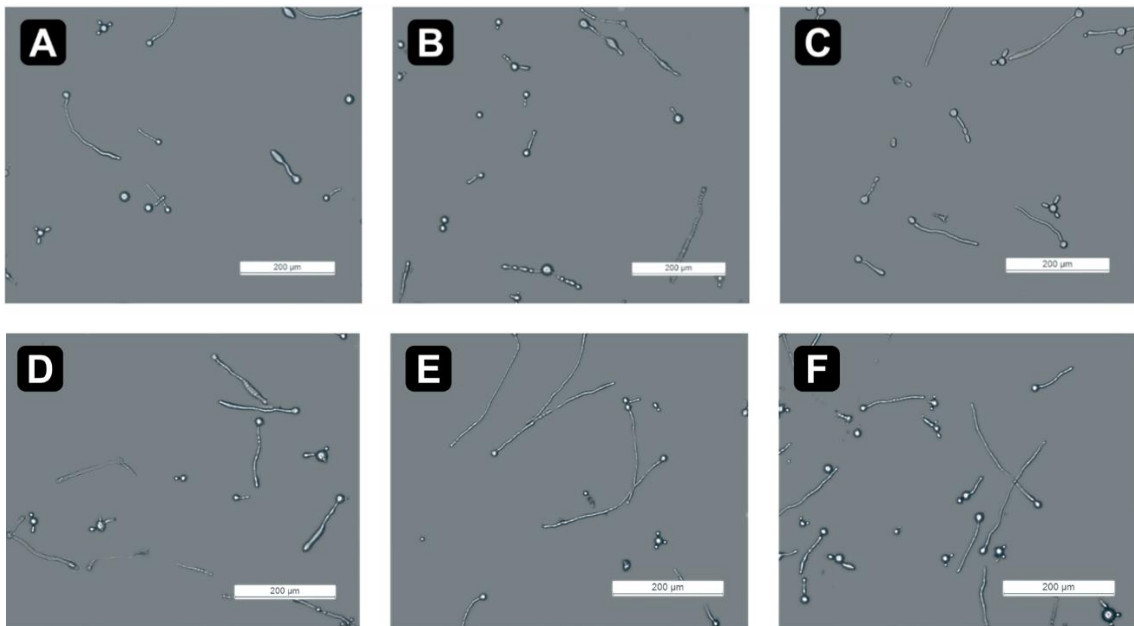
A 35 °C-on történő tenyésztés a *cotH4* mutáns növekedését a kontrollhoz képest szignifikánsan kevésbé befolyásolta a tenyésztési idő első ( $p=0,000237$ ), második ( $p < 0,00001$ ), harmadik ( $p < 0,00001$ ) és negyedik ( $p < 0,00001$ ) napján. Az MS12- $\Delta cotH3+pyrG$  és MS12- $\Delta cotH5+pyrG$  mutáns törzsek érzékenyebbnak bizonyultak a magasabb hőmérséklettel szemben, továbbá magasabb hőmérséklet hatására a *cotH1* és *cotH2* mutánsok is csökkent növekedést mutattak [14. ábra]. Hasonló jelenséget írtak le a *C. neoformans* Ras1 és Cdc24 mutánsok esetében is, melyek 37 °C-on növekedési defektussal bírtak, továbbá a kriptokokkózisz vizsgálatára alkalmazott egérmodellben csökkent virulenciát mutattak (Nichols és mtsi. 2007).



**14. ábra.** A mutáns törzsek telepátmérőjének nyomon követése, 4 napon át, a gomba növekedési hőmérsékleti optimumától magasabb hőmérsékleten (35 °C). A hőmérséklet, mutánsok növekedésre gyakorolt hatását a 13. ábra leírásában ismertetett módon ábrázoltuk. A szignifikancia számolást kétmintás, párosított t-próbával végeztük el, az MS12+*pyrG* törzshöz viszonyítva, ahol \*:  $p \leq 0,05$ ; \*\*:  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*:  $p \leq 0,001$  és \*\*\*\*:  $p \leq 0,0001$ .

A gazdaszervezetet alacsony szöveti oxigénkoncentráció jellemzi, így kísérleteink során a diszruptív törzsek növekedését anaerob körülmények mellett is vizsgáltuk. A *M. circinelloides* gomba ilyen körülmények mellett élesztő, vagy élesztőszerű formában képes nőni (Lee és mtsi. 2013). A dimorfizmus képessége sok esetben fontos tulajdonság a patogentitás szempontjából. Korábbiakban kutatócsoportunk teljes transzkriptom analízist is elvégzett *M. circinelloides* fonalgomba eltérő környezeti feltételek mellett történő tenyésztése során, ahol a *cotH4* gén emelkedett expressziót mutatott anaerob

körülmények között (nem publikált eredmény), mely előrevetítette a CotH4 fehérje jelentőségét az oxigénhiányos környezethez való alkalmazkodásban. Kísérleteink során minimál tápoldatban, anaerob környezeti feltételek mellett tenyésztett diszruptációs törzsekből mintát vettünk a tenyésztés 2. napján és a gombaspórák morfológiáját fénymikroszkóppal vizsgáltuk. Eredményeink arra engednek következtetni, hogy a *cotH* gének hiányában is keletkeznek élesztőszerű sejtek, és sem alakban, sem a növekedés ütemében nem tapasztaltunk eltérést [15. ábra].



**15. ábra.** *Mucor circinelloides* sejtek fénymikroszkópos képe minimál tápoldatban történő, anaerob környezetben történő tenyésztés 2. napján. **A)** MS12- $\Delta$ *cotH1*+*pyrG* törzs sejtjei; **B)** MS12- $\Delta$ *cotH2*+*pyrG* törzs sejtjei; **C)** MS12- $\Delta$ *cotH3*+*pyrG* törzs sejtjei; **D)** MS12- $\Delta$ *cotH4*+*pyrG* törzs sejtjei; **E)** MS12- $\Delta$ *cotH5*+*pyrG* törzs sejtjei; **F)** MS12+*pyrG* törzs sejtjei. A méretskála 200 µm-nek felel meg.

A megváltozott hőmérséklet *cotH* mutánsokra gyakorolt hatását a **9. táblázatban** foglaltuk össze.

**9. táblázat.** A hőmérséklet változásának hatása a *cotH* mutánsok növekedésére. Amennyiben a *cotH* mutánsok növekedésére, a kontrollhoz képest a hőmérséklet változása szignifikánsan jobban hatott, kék, ellenkező esetben piros jelölést alkalmaztunk. Az optimum hőmérsékleten történő tenyésztés mellett, az MS12+*pyrG* törzshöz képest szignifikánsan jobban növekvő törzseket zöld, a növekedési defektussal bíró mutánsokat lila színekkel láttuk el.

Tenyésztési hőmérséklet	Tenyésztési idő (napok)	MS12- <i>ΔcotH1+pyrG</i>	MS12- <i>ΔcotH2+pyrG</i>	MS12- <i>ΔcotH3+pyrG</i>	MS12- <i>ΔcotH4+pyrG</i>	MS12- <i>ΔcotH5+pyrG</i>
28 °C	1					
	2					
	3					
	4					
20 °C	1					
	2					
	3					
	4					
35 °C	1					
	2					
	3					
	4					

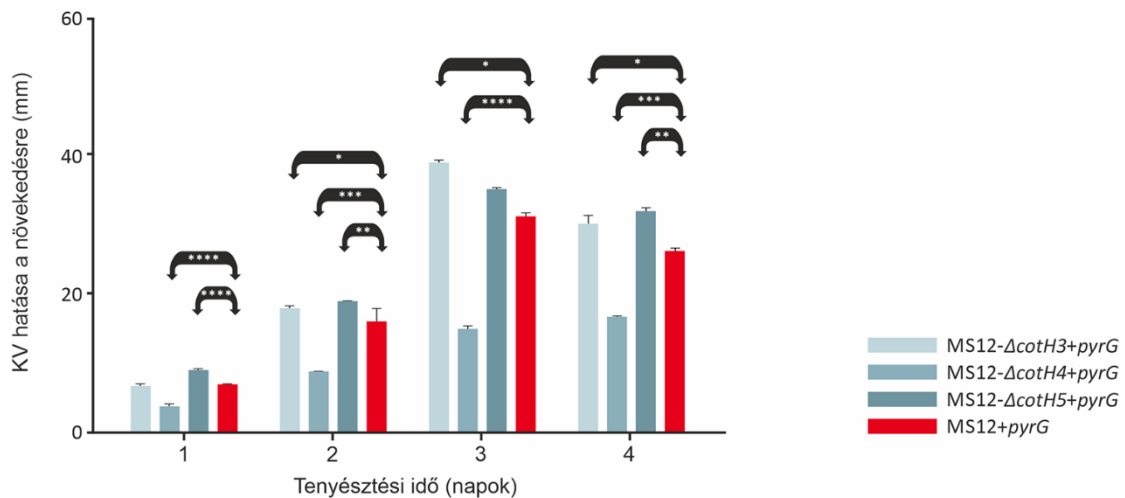
#### 6.4.2. A diszrupciós mutáns törzsek válaszáinak vizsgálata különböző típusú stressz körülmények között

A gombák sejtfal-mutánsainak azonosítására gyakran alkalmazott módszer a KV és KF festékekkel történő érzékenységi vizsgálat (Ram és Klis, 2006), ezért a diszrupciós törzsek sejtfalának integritását KV és KF festéket [16. és 17. ábra] tartalmazó táptalajokon vizsgáltuk meg, hiszen a sejtfal összetételének megváltozása a gomba virulenciájának egyik befolyásoló tényezője lehet (Ram és Klis 2006, Garcia-Rubio és mtsi. 2020). A KF és KV festékek a gomba sejtfalában képződő kitinláncokhoz kötődve képesek gátolni azon összeszerelő enzimeket működését, melyek a kitin  $\beta$ -1,3-glükán láncokkal való összekapcsolását hivatottak megvalósítani (Ram és Klis 2006). Kísérletünket a sejtmembránt károsító SDS detergenssel is elvégeztük (Plaine és mtsi. 2008).

A vizsgálatot szilárd YNBM táptalajon egy pontba történő leoltással végeztük el, majd azt követő 4 napon át a telepátmérőket és a telepek 4. napon mért száraztömegét határoztuk meg. Mivel a telepátmérő mérések és száraztömeg mérések korreláltak, így a dolgozatban csak az előbbi került feltüntetésre [16. és 17. ábra]. A kiértékelés során

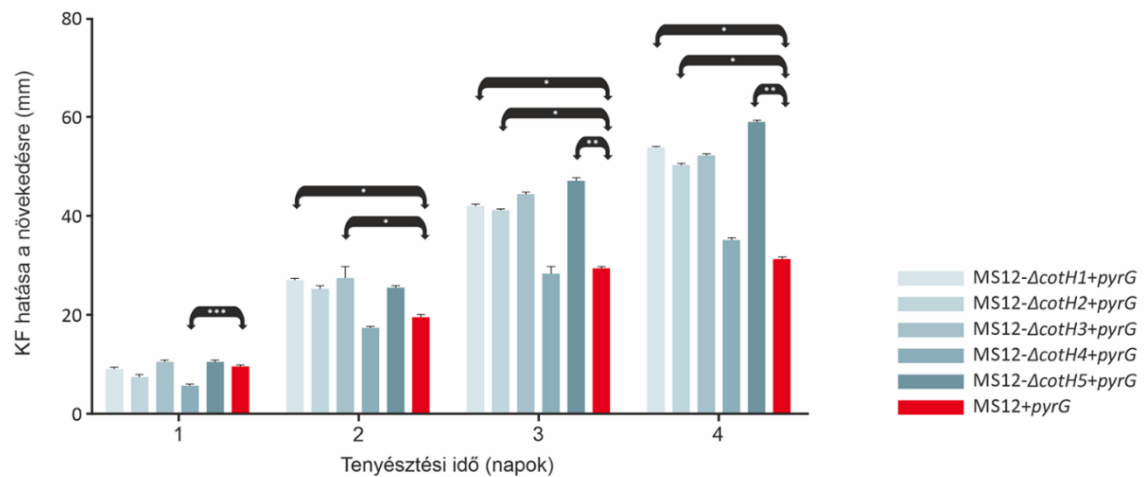
figyelembe vettük az egyes törzsek normál táptalajon való növekedése során tapasztalt defektusokat is.

Megfigyeléseink szerint a KV minden törzs növekedésére szignifikáns hatással bírt a normál táptalajon történő tenyésztéshez képest. A KV festék azonban ugyanolyan mértékben befolyásolta a *cotH1* és *cotH2* diszrupciós törzsek növekedését, mint a kontrollét. A *cotH3* törzs a KV festékekkel szemben a vizsgálatunk második ( $p=0,03838$ ), harmadik ( $p=0,0213$ ) és negyedik napján is ( $p=0,0251$ ) szignifikánsan érzékenyebbnek bizonyult. A KV, a *cotH4* diszrupciós törzs, mely csökkent növekedést mutatott normál körülmények között, növekedését szignifikánsan kevésbé befolyásolta, mint a kontroll törzsét ( $p \leq 0,0001$ ). Ezzel szemben a *cotH5* mutáns, a *cotH3* mutánsal hasonlóan érzékenyebbnek bizonyult a KV sejtfal stresszorral szemben, az első ( $p=0,000017$ ), második ( $p=0,0053$ ) és negyedik ( $p=0,0058$ ) napokon. A **16. ábrán** mutatjuk be, hogy az egyes törzsek telepátmérője minimál táptalajon KV hatására mennyivel változott meg, majd ez a változás hogyan viszonyul a kontroll törzséhez képest.



**16. ábra.** A 2 mg/ml koncentrációjú KV sejtfal stresszor hatása a *cotH* mutáns törzsek növekedésére, 4 napon át, 28 °C-on történő inkubáció esetén. Az y tengelyen a KV hatását láthatjuk a telepátmérőkre vonatkoztatva, melyet az alapján számoltunk ki, hogy az adott törzs minimál táptalajon mért telepátmérőjének értékéből (mm) kivontuk a KV jelenlétében megfigyelt telepátmérők értékét (mm), ezzel meghatározva a KV hatására bekövetkező változást (mm). A szignifikancia számolást kétmintás, párosított t-próbával végeztük el, az MS12+*pyrG* törzshöz viszonyítva, ahol \*:  $p \leq 0,05$ ; \*\*:  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*:  $p \leq 0,001$  és \*\*\*\*:  $p \leq 0,0001$ .

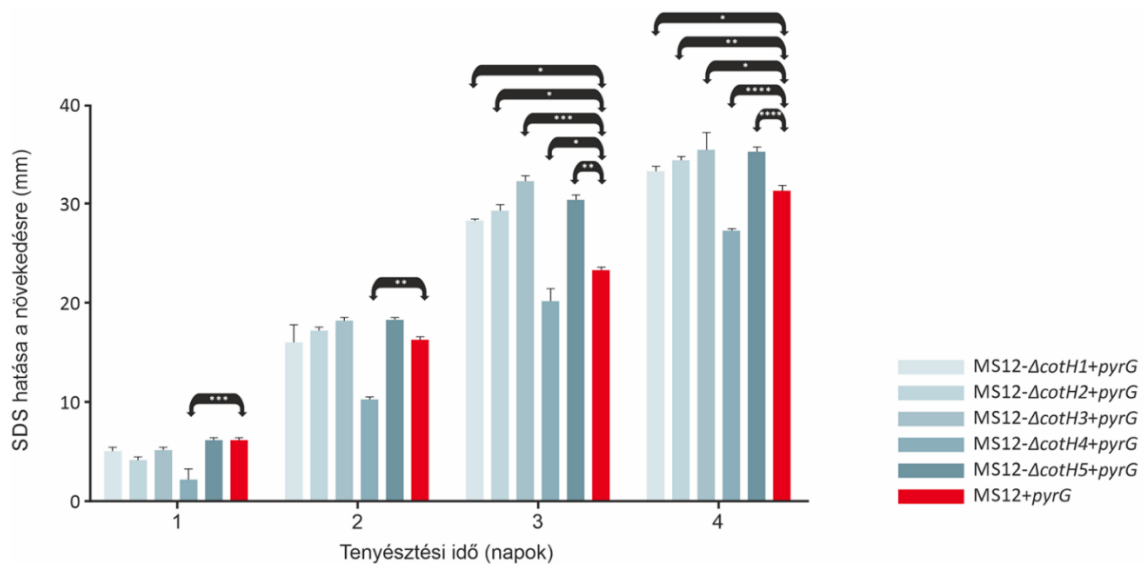
A KF festék alkalmazása során az MS12- $\Delta$ *cotH1*+*pyrG* törzs a második ( $p=0,0267$ ), a harmadik ( $p=0,0453$ ) és negyedik ( $p=0,0389$ ) napon, az MS12- $\Delta$ *cotH2*+*pyrG* törzs a harmadik ( $p=0,0147$ ) és negyedik napon ( $p=0,0321$ ) mért telepátmérője mutatott szignifikáns eltérést az MS12+*pyrG* törzséhez képest. A *cotH3* mutáns esetében a második ( $p=0,0174$ ) és negyedik ( $p=0,0190$ ), a *cotH4* mutáns esetén kizárólag az első ( $p=0,0002$ ) napon tapasztaltunk a kontrolltól szignifikánsan eltérő érzékenységet a KF stresszorral szemben [17. ábra].



**17. ábra.** 0,1 mg/ml koncentrációjú KF sejtfal stresszor hatása a *cotH* mutáns törzsek növekedésére szilárd táptalajon, 4 napon át, 28 °C-on történő inkubáció esetén. A KF hatását a 16. ábra leírásában ismertetett módon ábrázoltuk. A szignifikancia számolást kétmintás, párosított t-próbával végeztük el, az MS12+*pyrG* törzshöz viszonyítva, ahol \*:  $p \leq 0,05$ ; \*\*:  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*:  $p \leq 0,001$ .

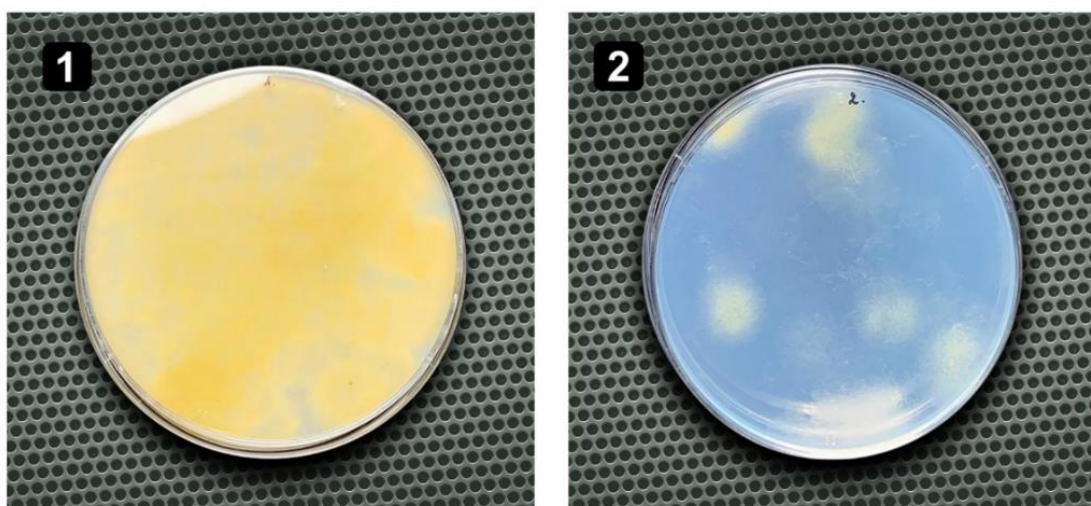
Megfigyeléseink alapján az SDS membrán detergens a *cotH1*, *cotH2*, *cotH3* és *cotH5* mutáns törzsek növekedésére a harmadik tenyésztési naptól számítva bírt szignifikánsan gátló hatással. Az MS12- $\Delta$ *cotH4*+*pyrG* törzs ellenállóbbnak bizonyult a detergenssel szemben, a tenyésztés első ( $p=0,0004$ ), második ( $p=0,0025$ ), harmadik ( $p=0,049$ ) és negyedik ( $p < 0,00001$ ) napján is [18. ábra].





**18. ábra.** 0,004% SDS membrán detergens hatása a *cotH* mutáns törzsek növekedésére szilárd táptalajon, 4 napon át, 28 °C-on történő inkubáció esetén. Az SDS hatását a **16. ábra** leírásában ismertetett módon ábrázoltuk. A szignifikancia számolást kétmintás, párosított t-próbával végeztük el, az MS12+*pyrG* törzshöz viszonyítva, ahol \*:  $p \leq 0,05$ ; \*\*:  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*:  $p \leq 0,001$ .

Ezt követően hidrogén-peroxiddal kezelt mutáns spórákat  $10^3/\text{ml}$  koncentrációban szélesztettünk minimál táptalajra, majd azok növekedését 2 napon át kísértük figyelemmel. A kísérlet során egyedül az MS12+ $\Delta$ *cotH4*+*pyrG* törzs spórái bizonyultak érzékenyebbnak a hidrogén-peroxiddal szemben, a spórák életképessége szignifikánsan lecsökkent [**19. ábra**].



**19. ábra.** A spórák életképességét reprezentáló csészefotók hidrogén-peroxid kezelést követő második napon. 1) MS12+*pyrG* törzs spóráiból felövő telepek; 2) Az MS12+ $\Delta$ *cotH4*+*pyrG* törzs felövő telepei.

Megvizsgáltuk továbbá a törzsek hidrogén-peroxiddal szembeni érzékenységét, mely során 96 lyukú mikrotiter tenyésztőlemezen, különböző hidrogén-peroxid koncentrációk (0-0,5 mM) mellett, RPMI tápoldatban 2 napon át monitoroztuk a mutáns törzsek növekedési képességét, azonban a kontrollhoz képest különbséget nem detektáltunk.

A fő kitinszintáz hordozó *chs3* vagy a megfelelő Chs3p aktivitáshoz szükséges *chs4 – chs7* génekben mutációt hordozó *S. cerevisiae* mutánsok, ellenállóbbak a KV és KF festékekkel szemben (Roncero és mtsi. 1988, Imai és mtsi. 2005). A sejtfal-mutánsok sejtfalának többségében több kitin halmozódik fel, mint a vad típusú sejtekben, ezért megfigyelhető egy fokozottabb érzékenység a sejtfal stresszorokkal szemben. Az olyan *S. cerevisiae* mutánsok, melyek sérültek a  $\beta$ -1,3-glükán (pl. *fks1* és a *gas1*) vagy  $\beta$ -1,6-glükán (pl. *kre6* és *cwh41*) szintézis folyamatában, a mannopeptidek mannozilációjában (pl. *mnn9* és *vrg1*) vagy a GPI-horgony bioszintézisében (pl. *gpi1* és *gpi3*) szintén hiperszenzitívnek bizonyultak (Ram és mtsi. 1994, Imai és mtsi. 2005) a sejtfal stresszorokkal szemben. A KV sejtfal stresszorral szemben a *cotH3* és *cotH5* mutáns érzékenyebbnak, míg a *cotH4* diszrupciós törzs ellenállóbbnak bizonyult, mivel esetében a stresszor, a gomba növekedését szignifikánsan kevésbé befolyásolta, mint a kontroll törzsét. Eredményeinket a **10. táblázatban** foglaltuk össze.

**10. táblázat.** Különböző stresszorok hatása a *cotH* mutánsok növekedésére. Ha a kontrollhoz (MS12+*pyrG*) képest az adott *cotH* mutáns az alkalmazott stresszor jelenlétére szignifikánsan érzékenyebbnak bizonyult, kékkel, ha ellenállóbbnak, pirossal jelöltük.

Alkalmazott stresszor	Tenyésztési idő (napok)	MS12- <i>ΔcotH1+pyrG</i>	MS12- <i>ΔcotH2+pyrG</i>	MS12- <i>ΔcotH3+pyrG</i>	MS12- <i>ΔcotH4+pyrG</i>	MS12- <i>ΔcotH5+pyrG</i>
KV (2 mg/ml)	1					
	2					
	3					
	4					
KF (0,1 mg/ml)	1					
	2					
	3					
	4					
SDS (0,004% (m/V))	1					
	2					
	3					
	4					

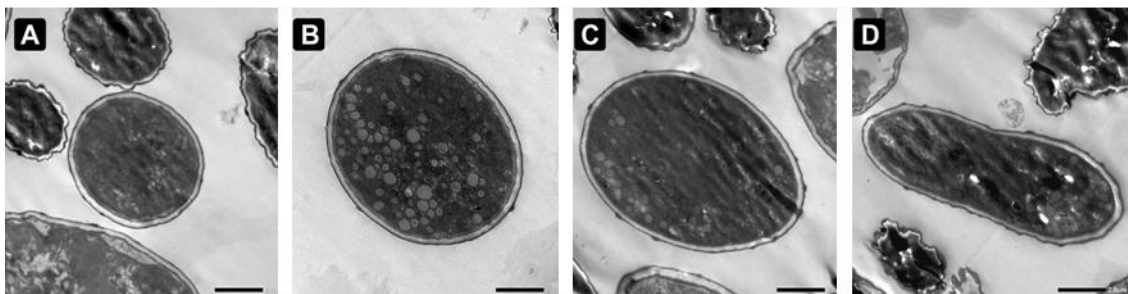
### 6.4.3. A *cotH* diszrupciós törzsek spóráinak jellemzése

#### 6.4.3.1. A *cotH* diszrupciós törzsek spóráinak fénymikroszkópos vizsgálata

Mivel a CotH fehérjék spóraképző gombafajokban megtalálható ortológjait elsősorban a spóra felszín, vagy a spóraburok szerkezeti elemeként tartjuk számon (Zilhao és mtsi. 1999, Naclerio és mtsi. 1996, Kim és mtsi. 2006), fontosnak tartottuk a *M. circinelloides cotH* mutánsok spóráinak csírázási képességének vizsgálatát. Ennek érdekében a folyadéktenyészetben nevelt törzseket fénymikroszkópos vizsgálatoknak vetettük alá, s megállapítottuk, hogy a *cotH1*, *cotH2*, *cotH3*, *cotH4* *cotH5* gének elrontása nem befolyásolja a csírázási képességet az MS12+*pyrG* törzshöz képest.

#### 6.4.3.2. A *cotH* diszrupciós törzsek spóráinak TEM vizsgálata

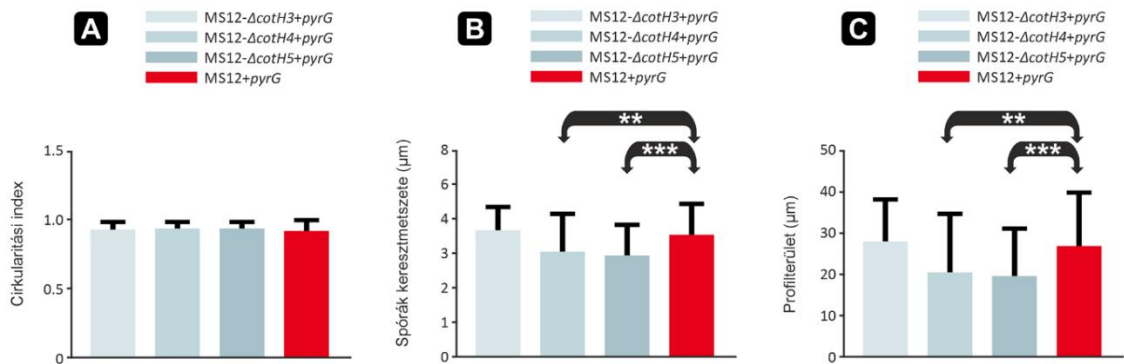
A *M. circinelloides* spóráira jellemző a méretbeni és alaki diverzitás (Li és mtsi. 2011\*). A spórák lehetnek kis vagy nagy spórák, alak szerint pedig gömbölyűek vagy ellipszoidok. Az említett kategóriák között átmenetek figyelhetők meg, tehát inkább eloszlásról beszélhetünk [20. ábra].



**20. ábra.** *Mucor circinelloides* MS12+*pyrG* spórák TEM képe. **A-D)** *M. circinelloides* spórák képe, mely szemlélteti a gömbölyű és ellipszoid alak közötti átmenetet. A méreetskála 2  $\mu$ m-nek felel meg.

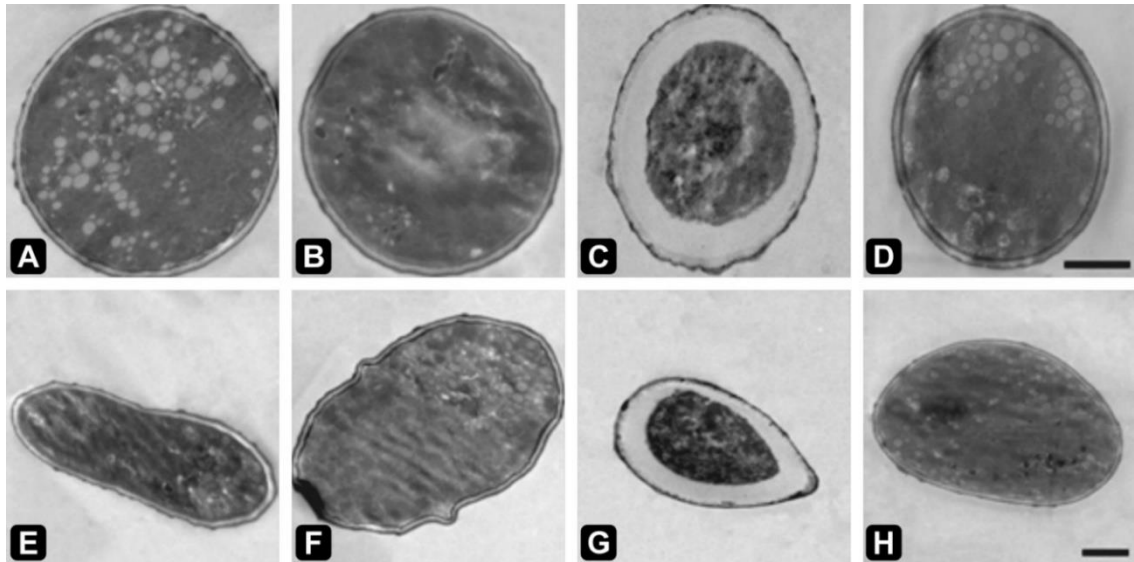
A spórák hossz- és keresztmetszetének (szélességének) eloszlását, profilterületét és cirkularitását TEM segítségével vizsgáltuk. A spórák hossz-és keresztmetszeti átlagának megállapítása után a spórák profilterülete, tehát a spórák átlagos mérete is meghatározásra került. Eredményeink tükrözik a *Mucor* spórák alaki és méretbeni diverzitását [20. ábra]. Profilterületük 7,77-75,35  $\mu$ m között található, mely a keresztmetszetük (2,71-7,87  $\mu$ m), hosszmetsetük (3,65-12,19  $\mu$ m) értékéből következik.

A spórák alakjára a cirkularitási index megadásával tudunk következtetni. A mutáns törzsek spórái a kontroll törzs (MS12+*pyrG*) spóráinak alaki jellegzeteségeit mutatják [21. ábra A)], vagyis a vizsgált *cotH* gének elrontásának nincs hatása a spórák alakjára *M. circinelloides* fonalas gombában. A mutáns spórák keresztmetszetében az MS12- $\Delta$ *cotH4*+*pyrG* ( $p=0,0060$ ) és MS12- $\Delta$ *cotH5*+*pyrG* ( $p \leq 0,0001$ ) törzsek esetében szignifikáns csökkentést figyeltünk meg [21. ábra B)], továbbá a kontroll törzs átlagos 26,81  $\mu\text{m}$  méretével szemben a *cotH4* elrontását követően a profilterület 20,53  $\mu\text{m}$ -re ( $p=0,0096$ ), a *cotH5* diszrupcióját követően 19,42  $\mu\text{m}$ -re ( $p=0,0002$ ) csökkent [21. ábra C)]. A *cotH1*, *cotH2* és *cotH3* gének elrontása nem befolyásolta sem a spórák méretét, sem alakját.

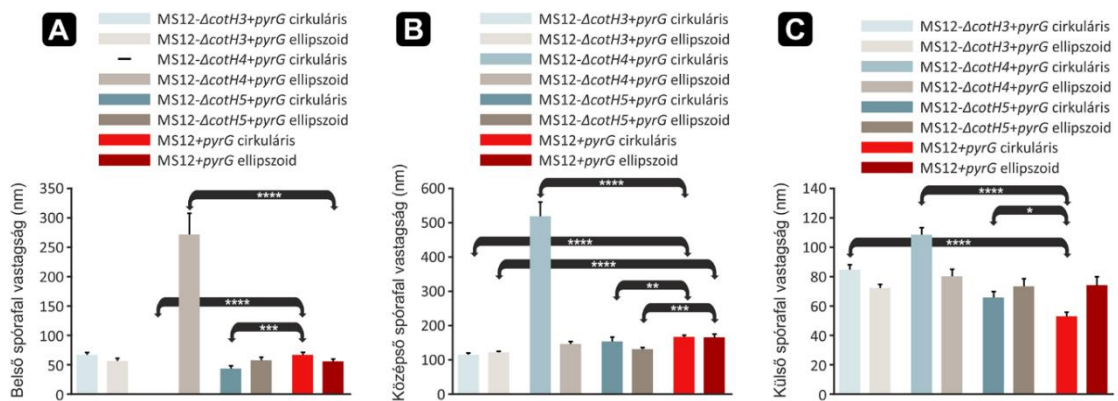


**21. ábra.** A) A spórák cirkularitásának meghatározása TEM segítségével. B) A spórák keresztmetszeti átlaga TEM alapú mérések alapján. C) A spórák méretének (profilterület) meghatározása TEM segítségével. A szignifikancia számolást kétmintás, t-próba alapján végeztük el, ahol \*\*:  $p \leq 0,01$  és \*\*\*:  $p \leq 0,001$ .

Mivel a *Mucor* spórák alakja kétféle lehet (Li és mtsi. 2011\*), így érdemesnek láttuk a spórák szerkezetét ellipszoid és cirkuláris spórák esetében külön-külön vizsgálni [22. ábra]. Ezt figyelembe véve meghatároztuk a spórák falának belső [23. ábra A)], középső [23. ábra B)] és külső [23. ábra C)] rétegének vastagságát is.

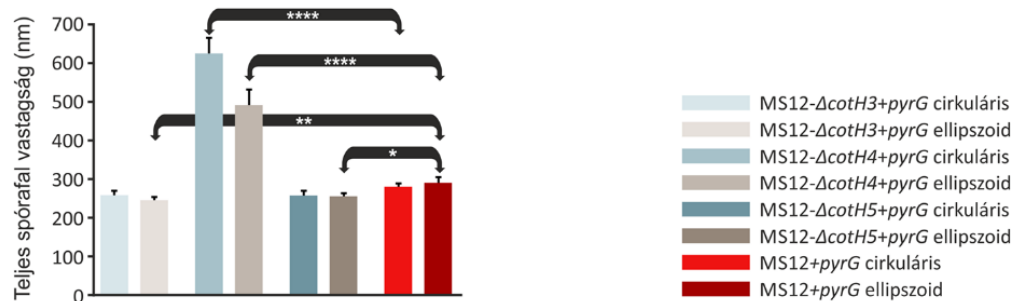


**22. ábra.** *Mucor circinelloides* spórák TEM képe. **A)** MS12+*pyrG* törzs egy cirkuláris alakú spórája; **B)** MS12- $\Delta$ *cotH3*+*pyrG* törzs egy cirkuláris alakú spórája; **C)** MS12- $\Delta$ *cotH4*+*pyrG* törzs egy cirkuláris alakú spórája; **D)** MS12- $\Delta$ *cotH5*+*pyrG* törzs egy cirkuláris alakú spórája. **E)** MS12+*pyrG* törzs egy ellipszoid alakú spórája; **F)** MS12- $\Delta$ *cotH3*+*pyrG* törzs egy ellipszoid alakú spórája; **G)** MS12- $\Delta$ *cotH4*+*pyrG* törzs egy ellipszoid alakú spórája; **H)** MS12- $\Delta$ *cotH5*+*pyrG* törzs egy ellipszoid alakú spórája. A méretskála 2  $\mu$ m-nek felel meg.



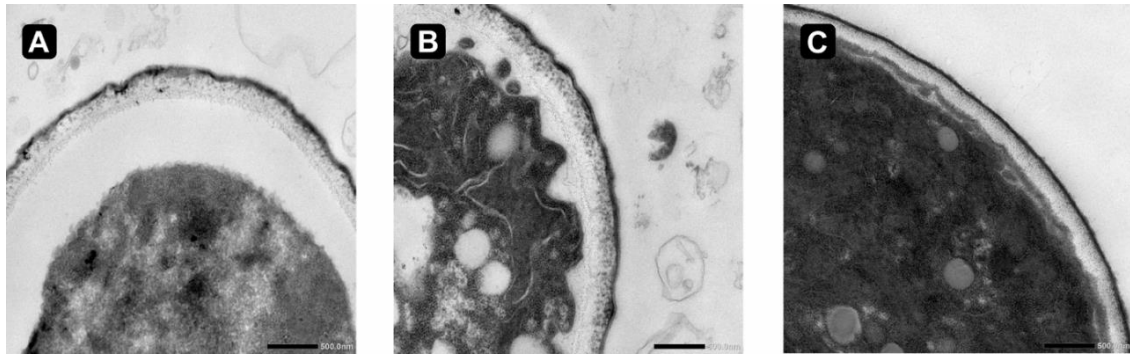
**23. ábra.** A mutáns spórák spórafal rétegeinek vastagsága TEM mérések alapján. A belső **A)**, középső **B)** és külső **C)** spórafal rétegében bekövetkező változások cirkuláris és ellipszoid spórák esetében. A szignifikancia számolást kétmintás, t-próba alapján végeztük el, ahol \*:  $p \leq 0,05$ ; \*\*:  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*:  $p \leq 0,001$  és \*\*\*\*:  $p \leq 0,0001$ .

A *cotH3* gén elrontását követően a cirkuláris spórák falának külső rétegének vastagsága a szülői törzs átlagosan 53,12 nm falvastagságához képest 85,30 nm volt ( $p < 0,0001$ ), míg a középső réteg vastagsága átlagosan 52,23 nm-rel csökkent ( $p < 0,0001$ ) [23. ábra]. Ezáltal összességében a mutánsok esetében a teljes spórafal vastagsága (261,08 nm) az MS12+*pyrG* (283,38 nm) törzséhez hasonlónak bizonyult, eltérés tehát a spórafal rétegvastagságainak arányában mutatkozott, azaz a spórafal külső rétegének vastagodásában és a középső réteg vékonyodásában. Az ellipszoid spórák esetében a teljes spórafal vastagság átlagosan 246,81 nm-re csökkent ( $p = 0,0092$ ), mivel a középső réteg vastagságában szignifikáns csökkenés következett be ( $p < 0,0001$ ), a belső és külső réteg azonban változatlan maradt [24. ábra].



**24. ábra.** A mutáns spórák teljes spórafal vastagsága TEM mérések alapján. **A)** A teljes spórafal vastagsága a cirkuláris spórák esetében a kontroll törzshöz viszonyítva, kétmintás, t-próba alapján, ahol \*:  $p \leq 0,05$ ; \*\*:  $p \leq 0,01$  és \*\*\*\*:  $p \leq 0,0001$ .

A *cotH4* mutáció esetén a cirkuláris spórák spórafal szerkezete jelentős változáson esett át [25. ábra B]): a géndiszrupció hatására a spórafal belső rétege nem alakult ki a mutáns spórákban. A középső réteg az MS12+*pyrG* spórafalának (164 nm) átlagosan 3,16-szorosa lett, továbbá a külső réteg vastagsága is átlagosan a kétszerese a kontroll törzsének (53,12 nm). Ez összességében egy rendkívül vastag, átlagosan 627,66 nm rétegvastagságú spórafalat eredményezett. Az ellipszoid spórák spórafal szerkezete azonban a *cotH4* gén elrontásának hatására eltérő mintázatot mutat [25. ábra A]): a spórafal középső rétegében ezúttal nem tapasztaltuk a cirkuláris spórákra jellemző vastagodást. A belső spórafal réteg kialakult, mely esetében a cirkuláris spórák setfalának középső rétegéhez hasonló vastagodást véltünk felfedezni, mely az MS12+*pyrG* átlagos belső spórafal rétegének [25. ábra C)] (54,81 nm) a 4,94-szerese (270,55 nm).



**25. ábra.** A) Az MS12- $\Delta$ *cotH4*+*pyrG* törzs egy ellipszoid és B) cirkuláris alakú spórájának TEM képe. A C) ábrán a kontroll MS12+*pyrG* törzs spórája látható. A méretskála 500  $\mu$ m-nek felel meg.

A *cotH5* mutánsok cirkuláris spórafalának belső (42,81 nm) és középső (151,31 nm) rétegének nagysága szignifikánsan lecsökkent ( $p=0,0005$ ) az MS12+*pyrG* törzséhez képest (66,26 nm és 160 nm), a teljes spórafalra vonatkoztatott eltérés azonban nem minősült szignifikánsnak. Az ellipszoid spórák esetében a teljes spórafal vastagsága szignifikánsan csökkent ( $p=0,0040$ ) a kontrollhoz képest, melynek oka a középső rétegben bekövetkező változás volt ( $p < 0,0001$ ) [23. ábra].

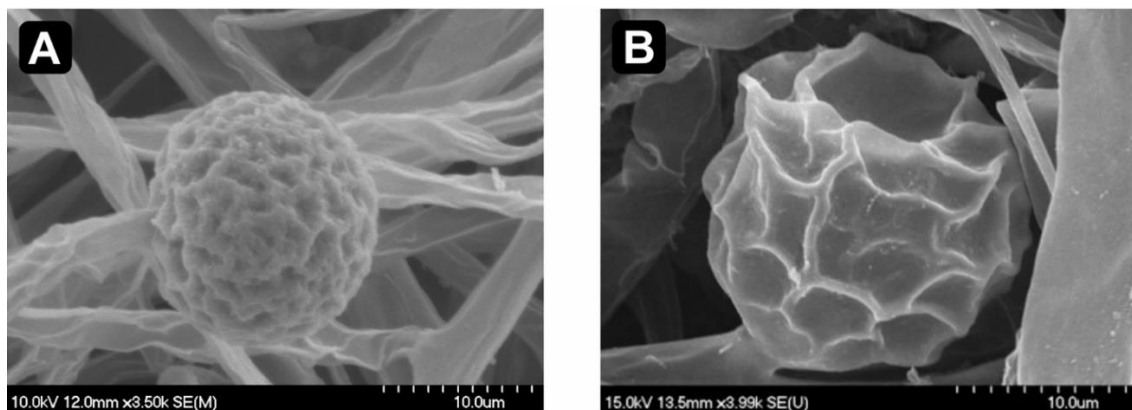
A CotH3 fehérjének tehát feltehetőleg szerepe van a cirkuláris alakkal rendelkező spórák falának középső és külső-, míg ellipszoid spórák esetén a középső réteg kialakításában. A CotH4 fehérje hiányában a cirkuláris spórák középső spórafal rétege rendellenesen megvastagszik, belső réteg pedig nem képződik. Ezzel ellentétben, az ellipszoid spórák esetében mindhárom réteg kialakul, és a belső réteg megvastagszik. Összeségében azonban elmondható, hogy a *cotH4* mutáns törzsek spórafala a spóra alakjától függetlenül jellegzetes fenotípust mutat. A CotH5 protein szerepe valószínűsíthető a cirkuláris spórák mindhárom rétegének, míg az ellipszoid spórák esetében a spórafal középső rétegének kialakításában. Bizonyítottuk továbbá, hogy a CotH4 és CotH5 fehérje meghatározó tényezője a spórák méretének kialakításának, hiányukban kisebb gombaspórák képződnek. Eredményeinket a **11. táblázatban** foglaltuk össze.

**11. táblázat.** A *cotH* gének szerepe a spórafal rétegeinek kialakításában. Amennyiben vizsgálataink alapján valamely gén befolyásolta az adott szerkezeti elem kialakítását, azt + jellel jelöltük a táblázatban. – jelölés esetén nem találtunk összefüggést az adott gén és a spórafal rétegeinek kialakítása között.

	cirkuláris spórák			ellipszoid spórák		
	belső	középső	külső	belső	középső	külső
<i>cotH1</i>	-	-	-	-	-	-
<i>cotH2</i>	-	-	-	-	-	-
<i>cotH3</i>	-	+	+	-	+	-
<i>cotH4</i>	+	+	+	+	+	-
<i>cotH5</i>	+	+	+	-	+	-

#### 6.4.3.3. A mutáns spórák vizsgálata SEM segítségével

A *cotH* diszrupciós törzsek spóráinak felszínét, továbbá sporangiumait is megvizsgáltuk SEM segítségével. A gombaspórák felszínének pásztázó elektronmikroszkópos vizsgálata során eltérést egyik *cotH* mutáns sem mutatott, viszont a sporangiumok morfológiájában jelentős változást tapasztaltunk az MS12- $\Delta$ *cotH5*+*pyrG* törzs esetében, melynek sporangiumainak felszínét makrobegyűrődések jellemzik [26. **ábra B**].



**26. ábra.** *Mucor circinelloides* sporangiumainak SEM által készített képe. **A)** Az MS12+*pyrG*, **B)** az MS12- $\Delta$ *cotH5*+*pyrG* törzs sporangiuma látható. A méretskála 10  $\mu$ m-nek felel meg.

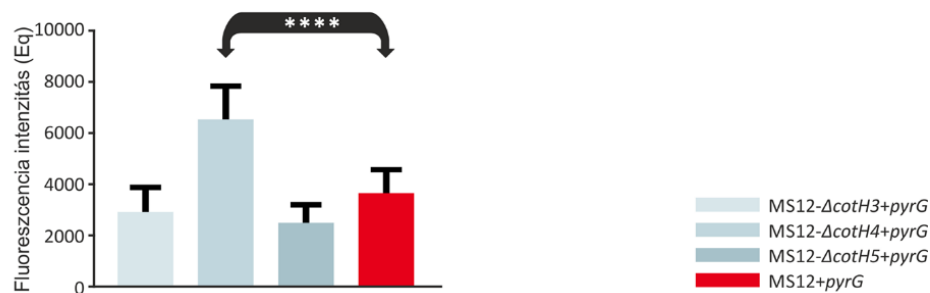
A SEM mintapreparáció egyik lépése a minták felszálló alkoholsorral történő kezelése. Amennyiben a CotH5 fehérje hiánya miatt a sporangiumok fala elveszti szilárdságát, az így, statikailag instabil sporangium elvesztheti szférikus alakját az alkoholsorral történő kezelés hatására, kialakítva a fentebb említett fenotípust [26. **ábra B**].



#### 6.4.3.4. A mutáns spórák spórafalának vizsgálata fluoreszcens festékekkel

A *cotH3*, *cotH4* és *cotH5* diszrupciós törzsek spóráinak szerkezetében a célzott génelrontást követően a sejtfa szerkezetére kiterjedő fenotipikus változásokat detektáltunk. A spórafal szerkezeti változásának, továbbá az előzetes vizsgálatainknál tapasztalt sejtfa stresszorzal szembeni rezisztencia okát elsősorban a sejtfaösszetételének vizsgálatán keresztül kerestük. A gomba sejtfa összetétele jól monitorozható az egyes sejtfa komponensekhez kötődő fluoreszcens festékek alkalmazásával (Ram és Klis, 2006, Rodrigues és mtsi. 2015), ezért a gombaspórák KF festékekkel festettük, majd fluoreszcens képalkotó áramlási citometriával vizsgáltuk.

Kísérletünkben a KF festék segítségével a sejtben megtalálható összes kitin jelölését végeztük el. Az áramlási citometriás felvételek alapján [8. számú melléklet] meghatározható az átlagos gombasejtenkénti pixelintenzitás [9. számú melléklet], ami utal a festődés intenzitására és ezzel a kitin tartalomra. A *cotH4* deléciós törzs esetében a KF festék intenzitása szinginikánsan magasabb volt a kontroll törzshöz képest, melyet a 9. számú melléklet szemléltet. E tekintetben a többi *cotH* mutáns törzs esetében nem tapasztaltunk szignifikáns eltérést. A spórákat fluoreszcens mikroszkópos eljárással is megvizsgáltuk, amely vizsgálat alátámasztotta az áramlási citometriával kapott eredményeket, miszerint a *cotH4* mutáns esetében kitin felhalmozódás megy végbe a sejtfaiban [27. ábra].



**27. ábra.** Fluoreszcens mikroszkópos eljárással meghatározott KF festett spórák által kibocsátott intenzitás mértéke az MS12-*cotH3*+*pyrG*; MS12-*cotH4*+*pyrG*; MS12-*cotH5*+*pyrG* és MS12+*pyrG* törzsek esetében. A szignifikancia értékek párosított, kétmintás, t-próba alapján az MS12+*pyrG* törzshöz viszonyítva értendők, ahol \*\*\*\*:  $p \leq 0,0001$ .

A gombaspórák mellett KF festett fiatal hifák vizsgálatát is elvégeztük, azonban szembetűnő változásokat nem tapasztaltunk, így elmondhatjuk, hogy a változás csak a gombaspórákra volt jellemző, a hifákra nem [10. számú melléklet].

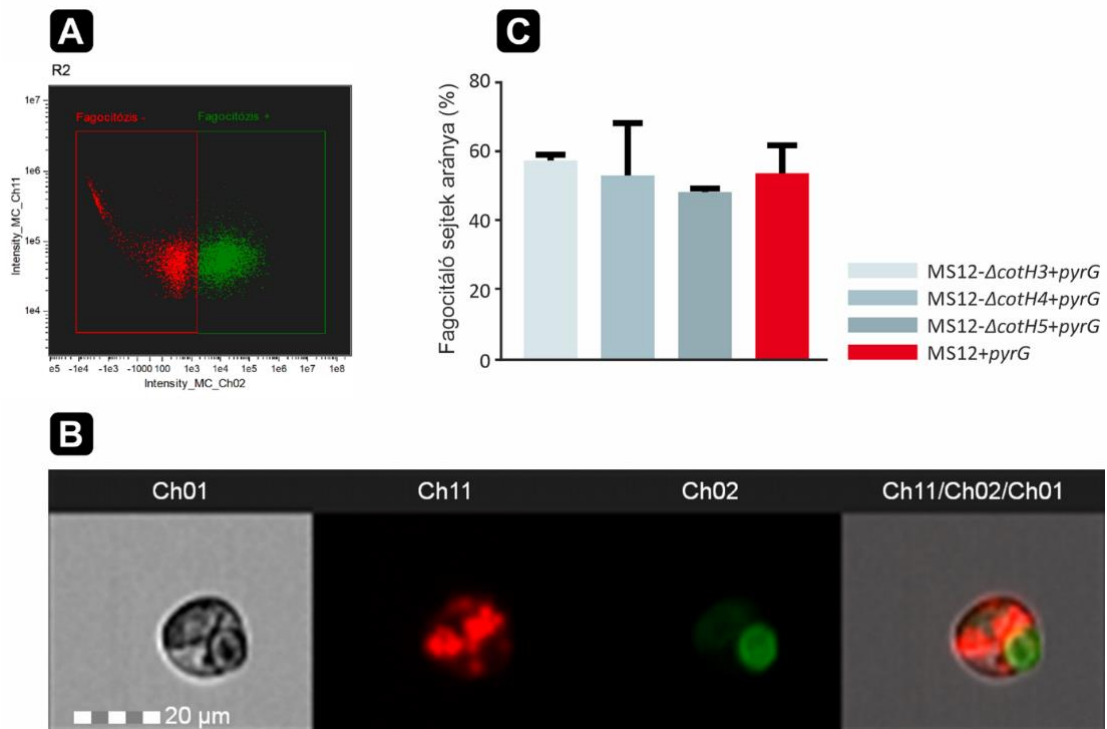
A mannozilszármazékok jelölését a Concanavalin A Lectin (Con A) - FITC festékkoldattal vittük véghez, majd a festett gombaspórákat képalkotó áramlási citométerrel vizsgáltuk. Mannozilszármazékok tekintetében nem tapasztaltunk eltéréseket a mutáns törzsek esetében.

#### **6.4.4. J774.2 makrofágszerű egér sejtvonal fertőzése *cotH* mutáns törzsek spóráival**

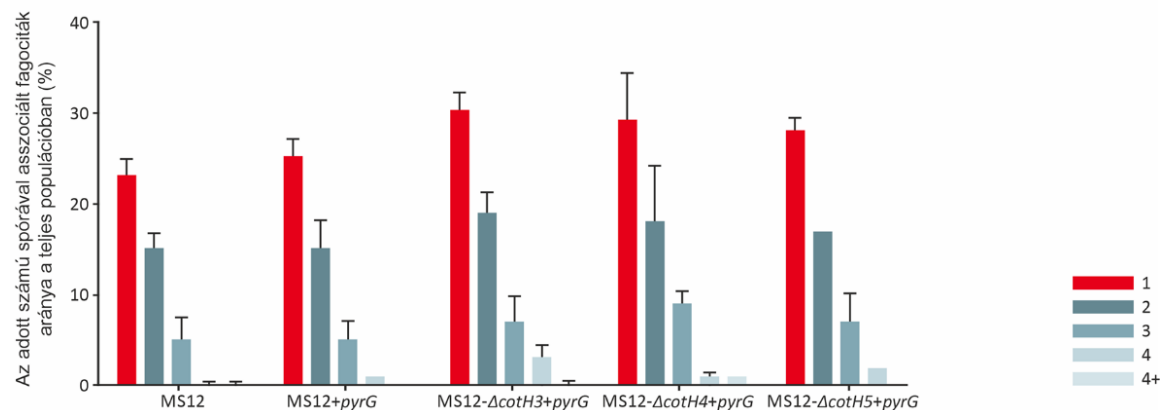
A spórasejtfalban bekövetkező változást mutató mutánsok makrofágok általi fagocitózisának mértékét áramlási citométer segítségével követtük nyomon. Az *in vitro* interakciókat a *cotH3*, *cotH4* és *cotH5* mutáns törzsek spóráival végeztük, mivel a TEM és SEM vizsgálatok alapján e gombatörzsek esetén tapasztaltunk spórákat érintő változásokat (6.4.3. fejezet).

Alexa Fluor 488 jelölt gombaspórák és J774.2 makrofágok háromórás inkubációja után elvégzett áramlási citometriás analízis eredményei szerint a teljes makrofág populációra vonatkoztatva, az asszociáló makrofágok aránya a *cotH* mutáns izolátumok esetében a következők voltak: 57,45% (MS12- $\Delta$ *cotH3*+*pyrG*), 53,50% (MS12- $\Delta$ *cotH4*+*pyrG*), 48,55% (MS12- $\Delta$ *cotH5*+*pyrG*), 56,17% (MS12) és 53,57% (MS12+*pyrG*).

Miután meghatároztuk egyes fagocitáló makrofágok arányát [28. ábra] és az egy makrofág által fagocitált spórák átlagos számát [29. ábra], megállapítottuk az egyes törzsekre jellemző fagocitózis indexet, ami a számolt sejtek által összesen fagocitált gombaspórák számát mutatja meg. A J774.2 sejtek gombaölő hatékonysága, illetve fagocitáló képessége a *cotH* mutáns törzsek esetében a kontrollal megegyező volt.



**28. ábra.** A J774.2 makrofágszerű egér sejtek gombaölő hatékonysága a *Mucor circinelloides cotH* mutánsok, továbbá az MS12+pyrG törzsek sejtjeivel szemben. **A)** A kapuzás sémája látható, ahol a piros populáció a makrofágszerű egér sejteket (Fagocitózis -), a zöld populáció a spórákkal interakcióban lévő sejteket (Fagocitózis +) jelenti. **B)** Ch01: fénymikroszkópos képek; Ch011: CellMask Deep Red Plasma Membrane detektálására használt csatorna; Ch02: FITC detektálására használt csatorna; Ch011/Ch02/Ch01 (merged): a Ch011, Ch01 és Ch02 egymásra vetített képe. Az áramlási citométer által készített fluoreszcens mikroszkópos képek méretskálája 20  $\mu$ m-nek felel meg. **C)** Az asszociáló makrofágok aránya a *cotH* mutáns izolátumok esetében.

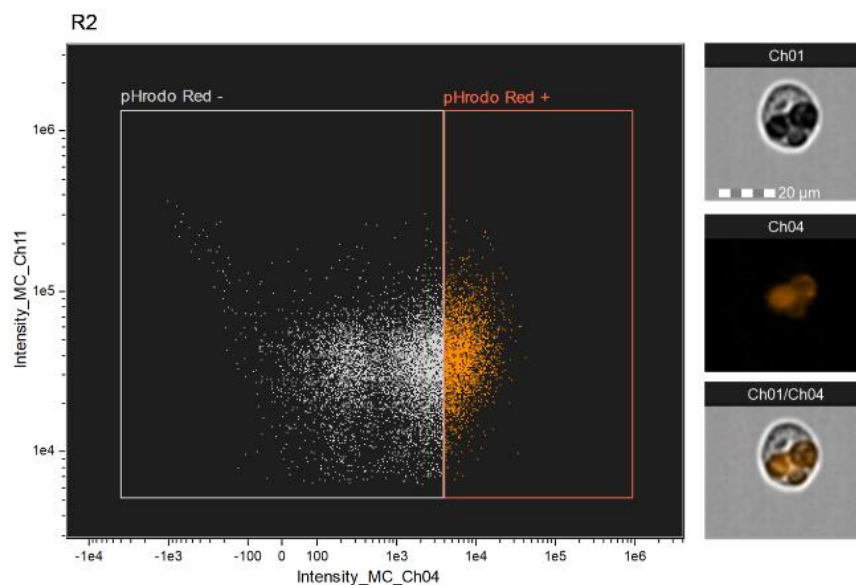


**29. ábra.** A fagocitált spórák átlagos száma a fagocitáló sejtpopuláción belül.

A *cotH* mutánsok spóráit a J774.2 makrofágok a kontrollhoz hasonló mértékben tudták fagocitálni, s az adott számú spórával asszociált makrofágok aránya is az MS12+*pyrG* törzsre jellemző arányokat mutatta a teljes makrofág populációhoz viszonyítva. A *cotH3* és *cotH4* mutánsok esetében a J774.2 sejtek négy spóránál többet is képesek voltak bekebelezni, mely sem a kontroll, sem pedig a többi vizsgált *cotH* mutáns esetében nem volt megfigyelhető [29. ábra].

#### 6.4.5. *Mucor circinelloides* spórákat tartalmazó fagoszómák savasodásának vizsgálata makrofágokban

A fagocitózist követően a *Mucor* spóráknak a fagoszómán belüli citotoxikus környezettel kell megbírkóznuk, úgy, mint a savasodás, a tápanyagok hiánya, oxidáció és az antimikrobiális proteinek jelenléte (Pérez-Arques és mtsi. 2019). Ebben a kísérletben a savasodott fagoszómákban intenzíven fluoreszkáló pHrodo™ Red pH-szenzitív fluorofórral jelöltünk a *M. circinelloides* sejteket [30. ábra]. A makrofágokat a festett spórákkal koinkubáltuk, majd a fagoszómák savasodásának hatékonyságát képalkotó áramlási citométerrel vizsgáltuk.



**30. ábra.** Reprezentatív felvételek pHrodo™ Reddel festett *Mucor circinelloides* sejtekkel fertőzött J774.2 sejtekről az Amnis FlowSight® Imaging Flow Cytometerrel történő mérést követően. Az ábra bal oldalán a kapuzás sémája látható, mely megadja a pHrodo™ Red+ sejtek számát az összes mért sejt %-ában. A jobb oldali ábrán a pHrodo™ Red+ sejtek láthatók. Ch01: fénymikroszkópos képek; Ch04: a pHrodo™ Red detektálására használt csatorna; Ch01/Ch04 (merged): a Ch01 és Ch04 fúziója.

A CotH fehérjék hiánya azonban nem volt hatással a fagoszómák savasodása, tehát ezt a folyamatot nem befolyásolják a vizsgált CotH fehérjék. Miután a *Mucor* spórák a fagoszómák belsejébe kerülnek, a sejtfa és sejtmembrán biogenezisével kapcsolatos folyamatok upregulálódnak, s kezdetét veszi a spórák csírázása (Meyers és mtsi. 2017). Fontosnak véltük megvizsgálni, hogy a bekebelezett spórák életképességére befolyással van-e a CotH fehérjék hiánya, így a spórák túlélését, 180 percig tartó J774.2 sejtekkel történő inkubációját követően, MEA táptalajra szélesztve vizsgáltuk. A CotH fehérjék hiánya nem befolyásolta szignifikánsan a spórák túlélését az *in vitro* interakciót követően.

#### **6.4.6. A diszrupciós mutáns törzsek fenotípusos vizsgálata: összefoglalás/értékelés**

A patogén gombák esetében a stresszre történő reagáló képesség döntő fontosságú a gazdaszervezet környezetéhez való adaptáció során (Bahn és mtsi. 2007). A gomba gazdaszervezetbe kerülését követően elsődlegesen a gazda fagocitáló sejtjeivel lép interakcióba, ahol a fagocita sejtek intracelluláris ölési mechanizmusai révén elsősorban oxidatív stressznek van kitéve. Az ezzel szembeni ellenálló képesség kialakítása egy kulcsfontosságú kritérium a sikeres kolonizáció érdekében, továbbá az adaptáció elengedhetetlen ahhoz, hogy tartós fertőzés jöjjön létre (Cooney és Klein 2008). A *cotH* diszrupciós törzsek növekedését ezért különböző környezeti feltételek mellett, továbbá stresszorok jelenlétében is megvizsgáltuk. A gomba növekedési optimumán (28 °C) történő tenyésztés során az MS12- $\Delta$ *cotH3*+*pyrG* mutáns szignifikánsan jobban, az MS12- $\Delta$ *cotH4*+*pyrG* törzs pedig kevésbé nőtt a kontroll törzshöz képest. Az utóbbi törzs, alacsonyabb és magasabb hőmérsékleten megőrizte jellegzetes növekedési defektusát, azonban érdemes megemlíteni, hogy bár a *cotH* mutánsok növekedésére jelentős hatással volt a tenyésztési hőmérséklet növelése, addig a *cotH4* mutánsra e tényező szignifikánsan kevésbé hatott az MS12+*pyrG* törzshöz képest. Mivel a KV és KF festékekkel történő érzékenységi vizsgálat felfedheti az esetleges sejtfa-mutánsokat, diszrupciós törzseinket az említett sejtfa stresszorokat tartalmazó táptalajon vizsgáltuk meg. A KV festék az MS12- $\Delta$ *cotH3*+*pyrG* és MS12- $\Delta$ *cotH4*+*pyrG* mutánsokra, míg a KF az összes vizsgált *cotH* mutáns növekedésére szignifikáns hatással bírt, mely a *cotH1*, *cotH2*, *cotH3* és *cotH5* törzsek esetében a stresszorral szembeni érzékenységgént, a *cotH4* esetében pedig egy fokozottabb ellenálló-képességként mutatkozott meg. A KV és KF festékekkel szembeni érzékenység megváltozásának egy lehetséges magyarázata lehet a *cotH* mutánsok sejtfaának szerkezeti megváltozása. A spórák sejtfa szerkezetének

megváltozására szintén utalhat az MS12- $\Delta cotH4+pyrG$  törzs esetében megfigyelt hidrogén-peroxiddal szembeni fokozott érzékenység is. Az SDS sejtmembrán detergenssel szembeni érzékenysége a *cotH1*, *cotH2*, *cotH3* és *cotH5* törzseknek a harmadik napon vált szignifikánssá a kontrollhoz képest, ekkor a gomba intenzív spóráképző folyamatai zajlanak (Vellanki és mtsi. 2018).

Mivel a CotH fehérjék ortológjait leginkább spóra felszíni, vagy a spóraburok szerkezeti elemeként tartjuk számon (Kim és mtsi. 2006), fontosnak tartottuk a *M. circinelloides cotH* mutánsok spóra-morfológiájának megvizsgálását. A TEM mérések rávilágítottak arra a tényre, hogy a spórák méretének kialakításában a CotH4 és CotH5 fehérjék szerepet játszanak, hiányukban kisebb gombaspórák képződnek. *M. circinelloides* esetén ismert a spórák mérete és virulenciája közötti összefüggés, miszerint a kisebb méretű spórák kevésbé tekinthetők virulensnek, továbbá mivel nem képesek intenzív csírázási folyamatokra a makrofágok általi fagocitózist követően, így a gazdaszervezet elimináló hatása által elpusztulnak. A spórafal mindhárom rétegének kialakításában a *cotH* géneknek jelentős szerepük van, azonban e gének szerepe a cirkuláris és ellipszoid spórák esetében eltérő lehet, ugyanis a *cotH4* mutáns cirkuláris spóráiban a spórafal belső rétege nem alakul ki, míg a középső réteg és a külső réteg megvastagszik. Ezzel szemben az ellipszoid spórákban a belső spórafal réteg kialakul, s míg a spórafal középső rétege változatlan marad, megvastagszik. A SEM képalkotó eljárás által kapott eredményeink alapján úgy gondoljuk, hogy a CotH5 fehérje szerepet játszhat a *M. circinelloides* sporangiumainak kialakításában. Ez összefüggésben állhat azzal a jelenséggel, hogy a *cotH5* deléciós törzs szignifikánsan kisebb spórákat képez.

Hogy a lehetséges sejtfelszerkezeti változások okát feltárjuk, a gombaspórákat olyan fluoreszcens festékekkel festettük, amelyek képesek a sejtfa egy-egy komponenséhez specifikusan kötődni. A gombák sejtfa az első struktúra, ami a gazdasejtrel érintkezik, ezért kulcsszerepet játszik a fertőzési folyamatokban, azáltal, hogy lehetővé teszi a gazda sejtjeihez/szöveteihez való tapadást, az antigenitást és az immunválaszt (Sundstrom 2002, Arroyo és mtsi. 2016b). A dinamikus, poliszacharid összetételében folyamatosan változó sejtfa az immunfelismerés és az antifungális szerek elleni rezisztencia kialakulásának egyik fontos tényezője (Munro és Gow 2001, Walker és mtsi. 2008, Hopke és mtsi. 2016). A gombasejtek sejtfaát megvizsgáltuk epifluoreszcens mikroszkópos eljárással, mely alkalmas a sejtekben fellelhető kitin kimutatására (Hoch és mtsi. 2005) és a nagy mintaszámmal való vizsgálatot lehetővé tevő áramlási citometria segítségével (Costa-de-Oliveira és mtsi. 2013) is. Az MS12-

*ΔcotH4+pyrG* törzs sejtfalában változást detektáltunk az összkitin tartalomban. A kitin, mely a fonalas gombák sejtfalának 1-15%-t alkotja, az N-acetilglükózamin β-1,4-homopolimerje, melyet a sejtben lévő kitin szintáz enzimek szintetizálnak (Arroyo és mtsi. 2016b). Ez a poliszacharid a legtöbb gombafajban β-1,3-glükánnal együtt lelhető fel, és alapvető szerepet játszik a gombasejt sértetlenségének megőrzésében és strukturális szilárdságának fenntartásában a növekedés és morfogenezis folyamán (Klis és mtsi. 1994, de Groot és mtsi. 2004). Az, hogy a *cotH4* génben történő mutációt követően a spórafal összkitin mennyisége jelentősen megnő, a *cotH4* mutáns spórafal szerkezeti változására utalhat, továbbá fennáll annak a lehetősége is, hogy a sejtfal és sejtmembrán elválik, és a két struktúra között anyag- (pl. kitin) felhalmozódás zajlik le. Ezt a feltételezést mind a TEM, mind a sejtalkomponenseket vizsgáló áramlási citometriás és fluoreszcens mikroszkópos kísérletek eredményei is alátámasztották. Mivel a fiatal hifák fluoreszcens festése során a kontrollhoz képest nem tapasztaltunk eltérő fenotípust, így úgy véljük, hogy a kitintartalomban történő változások kizárólag a gombaspórákra összpontosulnak az MS12-*ΔcotH4+pyrG* törzs esetében.

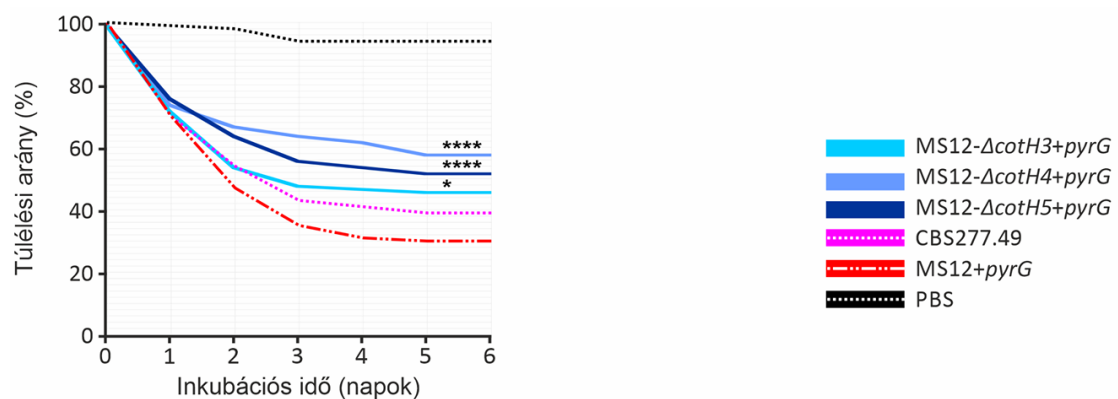
A gombasejtek csökkent *in vivo* virulenciája és gyengébb túlélési képessége gyakran annak köszönhető, hogy a gazdaszervezetbe került gombasejteket az immunsejtek (pl. makrofágok) hatékonyabban képesek fagocitálni, majd elpusztítani. A *cotH* mutánsok esetében ez az állítás nem áll fenn, ugyanis a legalább egy gombasejtet fagocitáló sejtek arányában nem volt kimutatható különbség a *pyrG* komplementált és a mutáns törzsek között, továbbá, annak ellenére, hogy az MS12-*ΔcotH3+pyrG*, MS12-*ΔcotH4+pyrG* és MS12-*ΔcotH5+pyrG* törzsek spóráinak méretében és/vagy spórafal szerkezetében is jelentős változást detektáltunk, a fagocitáló makrofágok arányában nem volt szignifikáns eltérés. Érdeemes azonban megjegyezni, hogy az MS12-*ΔcotH3+pyrG* és MS12-*ΔcotH4+pyrG* törzs spóráiból a makrofágszerű sejtek képesek voltak négyenél többet is bekebelezni. Az *in vitro* vizsgálataink alapján a CotH fehérjék hiányában is képesek voltak a makrofágok felismerni és bekebelezni a gombaspórákat, továbbá a fagoszómák savasodását nem befolyásolták a vizsgált CotH fehérjék. A diszrupciós törzsek spóráinak életképességét nem befolyásolta szignifikánsan a fagoszómák citotoxikus környezete sem.

## 6.5. A *cotH* mutáns törzsek *in vivo* virulencia vizsgálatai

### 6.5.1. A *cotH* mutáns törzsek virulencia vizsgálata *in vivo* *Drosophila melanogaster* modellben

Az állati fertőzési modellek alkalmazása elengedhetetlen a gombafertőzések patomechanizmusának vizsgálatához, különösképp, ha olyan megbetegedésről beszélünk, mint a mucormikózis, mely esetében a klinikai vizsgálatok megtervezése különösen nehéz a fertőzés alacsony előfordulási gyakorisága, a kórokozók változatossága, a fertőzési útvonalak és a háttérben meghúzódó alapbetegségek sokfélesége miatt (Jacobsen 2019). A fertőzésben szerepet játszó gének, illetve fehérjék szerepéről ugyan nyerhetünk információt *in vitro* kísérletek segítségével is, azonban a szisztémás fertőzés során játszott funkciók tisztázása csak *in vivo* modellben lehetséges.

A *cotH* gének patogenitásában való szerepét először *D. melanogaster* ecetmuslica modellorganizmus segítségével vizsgáltuk [31. ábra]. Kísérleteinkbe az MS12- $\Delta$ *cotH1*+*pyrG*, MS12- $\Delta$ *cotH2*+*pyrG*, MS12- $\Delta$ *cotH3*+*pyrG*, MS12- $\Delta$ *cotH4*+*pyrG*, MS12- $\Delta$ *cotH5*+*pyrG*, továbbá kontrollként az MS12+*pyrG* és a CBS277.49 VT törzseket vontuk be. A *cotH3* ( $p=0,0122$ ), *cotH4* ( $p < 0,0001$ ) és *cotH5* ( $p < 0,0001$ ) mutáns törzsek patogenitása szignifikánsan csökkent a kontrollhoz képest (MS12+*pyrG*). A *cotH1* és *cotH2* mutáns esetén nem tapasztaltunk szignifikáns eltérést a kontrollhoz képest Oregon-R *D. melanogaster* modellben.



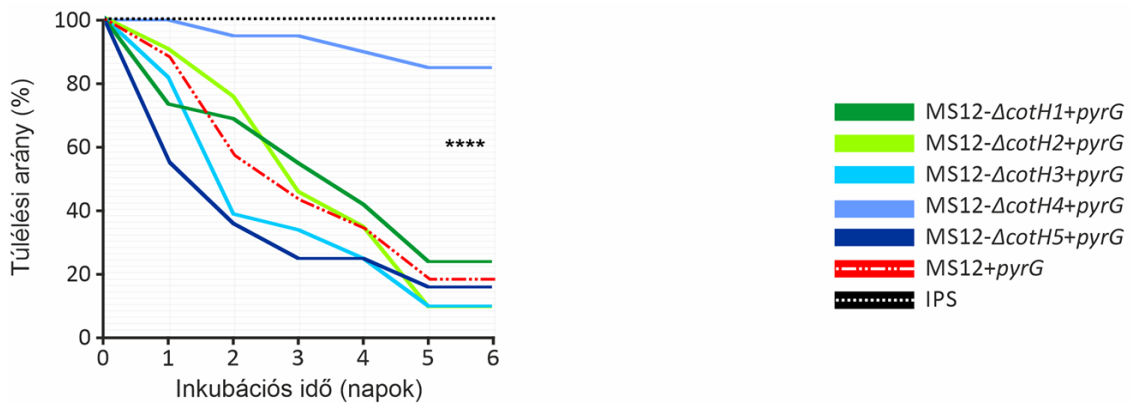
**31. ábra.** A *cotH* gének patogenitásának vizsgálata VT Oregon-R *Drosophila melanogaster* ecetmuslica modellben. A különbségek szignifikanciájának kiszámítását Log-rank (Mantel-Cox) teszttel végeztük, az MS12+*pyrG* törzshöz viszonyítva, ahol \*:  $p \leq 0,05$  és \*\*\*\*:  $p \leq 0,0001$ . Kezeletlen kontrollként PBS-t alkalmaztunk (fekete szaggatott vonal).



Mivel a *cotH3*, *cotH4* és *cotH5* mutáns törzsekkel történő fertőzést követően a *D. melanogaster* ecetmuslicák túlélése magasabb volt a kontroll törzssel való fertőzött legyekéhez képest, ezért a CotH3, CotH4 és CotH5 fehérjéknek szerepe lehet a *M. circinelloides* virulenciájában.

### 6.5.2. A *cotH* mutáns törzsek virulencia vizsgálata *in vivo* *Galleria mellonella* modellben

A CotH proteinek patogenitásban betöltött szerepének vizsgálatához a *G. mellonella*, nagy viaszmolylárva modell rendszert is bevontuk, amelynek során a lárvákat az MS12+*pyrG*, valamint a *cotH* mutáns törzsekkel fertőztük és monitoroztuk a lárvák túlélését [32. ábra]. A kezeletlen és IPS-sel kezelt kontroll csoport esetén a lárvák közül egy sem pusztult el a kísérlet befejezéséig.

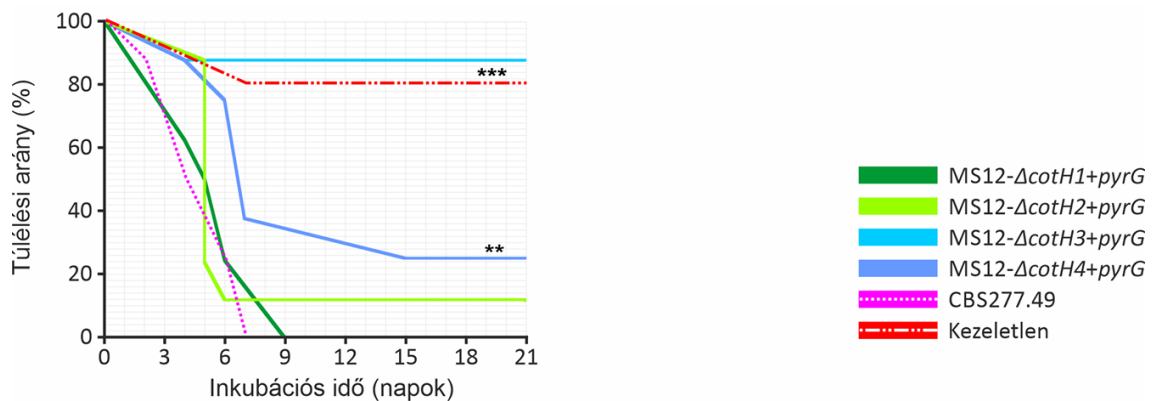


**32. ábra.** A *cotH* gének patogenitásának vizsgálata *Galleria mellonella* modellben. A különbségek szignifikanciájának kiszámítását Log-rank (Mantel-Cox) teszttel végeztük, az MS12+*pyrG* törzshöz viszonyítva, ahol \*\*\*\*:  $p \leq 0,0001$ . Kezeletlen kontrollként IPS-t alkalmaztunk (fekete szaggatott vonal).

A 32. ábrán megfigyelhető, hogy az MS12- $\Delta$ *cotH4*+*pyrG* törzsekkel fertőzött lárvák túlélési görbéje szignifikánsan eltér a kontroll törzssel fertőzött lárvák túlélési görbétől, az említett mutáns törzs patogenitása lecsökkent. A *cotH1*, *cotH2*, *cotH3* és *cotH5* mutánsok esetében szignifikáns eltérést nem tapasztaltunk a törzsek patogenitása szempontjából *G. mellonella* modellben.

### 6.5.3. A *cotH* mutánsok patogenitásának képessége *in vivo* egér fertőzési modellben

Mivel a járomspórás gombák spóráinak belélegzése a leggyakoribb fertőzési útvonal, ezért ennek imitálására az intratracheális vagy intranazális belélegeztetés a legszélesebb körben alkalmazott modell, de szisztémás mucormikózis is indukálható a gomba intravénás beoltásával, általában a fark vénájába történő szúrás által (Lopez-Fernandez és mtsi. 2018, Liu és mtsi. 2015). A CotH fehérjék szerepét *R. delemar* gombafajban DKA egér modell segítségével vizsgálták, mely során a pulmonáris mucormikózist a gombaspórák intratracheális úton történő belélegeztetésével indukálták (Gebremariam és mtsi. 2014). *M. circinelloides* esetében korábban még nem alkalmaztak intratracheális úton történő egér fertőzési modellt, ezért először a vad típusú gomba, egerekre gyakorolt fertőzőképességének vizsgálatát végeztük el, ahol a DKA egereket intratracheális úton fertőztük. A rendszer optimalizálását DKA BALB/c hím egerek, *M. circinelloides* CBS277.49 törzsének spóráival való fertőzéssel valósítottuk meg. A vad típusú CBS277.49 törzs virulensnek bizonyult DKA egér modellben az intratracheális fertőzés során, így tehát a további kísérleteink során kontrollként alkalmaztuk. A DKA BALB/c hím egerek fertőzését a *cotH* mutáns törzsekkel is elvégeztük. A *cotH3* mutáns avirulensnek bizonyult DKA egér modellben, a *cotH4* mutáns patogenitása pedig szignifikánsan csökkent a kontrollhoz képest [33. ábra]. Az egérkísérletek elvégzésének idejében a *cotH5* mutáns még nem állt rendelkezésünkre.



**33. ábra.** DKA BALB/c hím egerek ( $\geq 20$  g) (National Cancer Institute) ( $n=5$ ) egerek túlélése *cotH* mutánsokkal történő fertőzést követően. A fertőzés intratracheálisan, 25  $\mu$ l PBS-ben felvett  $2,5 \times 10^6$  ( $1 \times 10^8$  spóra/ml) mennyiségű friss spórával történt. A különbségek szignifikanciájának kiszámítását Log-rank (Mantel-Cox) teszttel végeztük, a CBS277.49 törzshöz viszonyítva.

#### **6.5.4. A *cotH* mutáns törzsek *in vivo* virulencia vizsgálatai: összefoglalás/értékelés**

A járomspórás gombák okozta fertőzések vizsgálatának kedvelt, nem gerinces modellorganizmusa a *Drosophila melanogaster* (Chamilos és mtsi. 2008b, Shirazi és mtsi. 2014, Younes és mtsi. 2020, Wurster és mtsi. 2020). Immunsejtjeinek mintázatfelismerő receptorai a konzervált mikrobiális mintázatok felismerését követően aktiválják a sejtes választ, amely specifikus az adott mikroorganizmusra (Gottar és mtsi. 2006, Ferrandon és mtsi. 2007). Jól jellemzett veleszületett immunitása miatt a *D. melanogaster* megfelelő modell a mucormikózis immunopatogenezisének tanulmányozására (Chamilos és mtsi. 2008b), ezért több esetben is alkalmasnak bizonyult különféle törzsek virulenciájának meghatározására (Alarco és mtsi. 2004, Shelburne és mtsi. 2015, Jacobsen 2019), ezért a *cotH* mutánsok virulenciájának vizsgálatára először *D. melanogaster* fertőzési modellt alkalmaztunk, ahol az MS12- $\Delta$ *cotH3*+*pyrG*, MS12- $\Delta$ *cotH4*+*pyrG* és MS12- $\Delta$ *cotH5*+*pyrG* törzsek szignifikánsan kevésbé patogénnek bizonyultak a kontrollhoz képest. Az MS12- $\Delta$ *cotH4*+*pyrG* mutánsal fertőzött *G. mellonella* lárvák túlélési görbéje alapján, a *cotH4* gén elvesztése csökkent patogenitáshoz vezet *M. circinelloides*-ben.

Az MS12- $\Delta$ *cotH4*+*pyrG* törzs tehát mindkét alkalmazott modellben csökkent virulenciát mutatott. Érdeemes azonban megemlíteni, hogy a *Galleria* és *Drosophila* fertőzéseket követően, a monitorozás során javasolt inkubációs hőmérséklet az adott gomba hőmérsékleti optimuma, azonban a *cotH4* mutáns e hőmérsékleten növekedési defektussal bír. Mivel a 35 °C-on való tenyésztés is szignifikánsan befolyásolja az említett mutáns növekedését, így tehát az ezen a hőmérsékleten történő inkubáció sem küszöbölné ki a kontrollhoz képest megfigyelt növekedési dekeftus problémáját. Az ennél magasabb hőmérsékleten, 37 °C-on, folyadék közegben a *M. circinelloides* morfológiailag dimorf jellege miatt élesztőszerű formában képes csak növekedni. A *M. circinelloides* heterotallikus szerveződésű gomba, mely során a zigospórák kialakulásához két kompatibilis párosodási típus [(-) és (+)] szükséges. A *M. circinelloides* f. *lusitanicus* (+) párosodási típusú izolátumok kisebb spórái kevésbé bizonyultak virulensnek *G. mellonella* modellszervezetben végzett *in vivo* kísérletek során, összehasonlítva a (-) párosodási típusú izolátumok nagyobb spóráival szemben (Li és mtsi. 2011\*). A *CotH4* fehérje hiányában a törzs szignifikánsan kisebb spórákat hoz létre. Feltételezhetjük, hogy a spórák méretének változása esetünkben is kapcsolatban

állhat a virulencia csökkenésével, azonban ezt az összefüggést nem detektáltuk a *cotH5* törzs esetében, mely szintén kisebb spórákkal rendelkezik, mint az MS12+*pyrG*. Ez alapján tehát úgy gondoljuk, a csökkent patogenitás oka nem kizárólag a spórák méretének megváltozása.

A gerinctelen gazdaszervezetek alkalmazásának fő korlátja az, hogy ezekben a modellekben kapott eredmények vajon adaptálhatók-e emlősökre és végső soron az emberi szervezetre. Az adaptív immunrendszer és a specifikus szervek, például a tüdő, hiánya azonban befolyásolhatja a patogenezist, így ahhoz, hogy a mutáns törzsek patogenitásban betöltött szerepéről pontosabb képet kapjunk, indokolt gerinces modellben is tanulmányozni azokat, így a *cotH* mutánsok virulenciáját *in vivo* egér fertőzési modellben is megvizsgáltuk. Sikerült azonosítanunk két olyan proteint, mely befolyásolta a *M. circinelloides* fonalas gomba fertőzőképességét DKA egér modellben: a *cotH3* mutáns avirulensnek bizonyult, a *cotH4* mutáns patogenitása pedig szignifikánsan lecsökkent a kontrollhoz képest. Az azonban, hogy az egerek átlagos testhőmérséklete 36,6 °C (Refinetti 2010) befolyásolhatja a hőmérséklet szenzitívnek bizonyuló MS12- $\Delta$ *cotH3*+*pyrG* törzs növekedését, azáltal pedig virulenciáját egér modellben, de nem magyarázza a mutáns, *Drosophila* fertőzések során tapasztalt csökkent virulenciáját. Mindezek alapján a CotH3 protein patogenitásban betöltött lehetséges szerepét két modellorganizmusban kapott eredményeink is alátámasztják.

A *cotH* gének diszrupcióját követően a mutáns törzsekben tapasztalt fenotípusokat, illetve a gének lehetséges funkcióját a **11. számú mellékletben** foglaltuk össze.

## 7. ÖSSZEFOGLALÁS

A Mucorales rend fajai által okozott gombás fertőzéseket mucormikózisnak nevezzük. Ez a ritka, humán megbetegedés leggyakrabban olyan betegeknél fordul elő, akik immunszuppresszív kezelés alatt állnak vagy vérképzőszervi rosszindulatú daganat szövődményeként immunhiányos állapotban szenvednek. A mucormikózis etiológiai ágenseként leggyakrabban azonosított fajok a *Rhizopus*, *Lichtheimia* és *Mucor* nemzetségekhez tartoznak. A gombás fertőzésekre fogékony populáció növekedése miatt a mucormikózisos esetek száma is növekvő tendenciát mutat.

A Mucorales rend tagjai rezisztenciát mutatnak a rutinszerűen alkalmazott gombaellenes szerek többségével szemben (pl. echinokandinok és azolok). A fent említett tények mindegyike sürgetővé teszi az azonosítást lehetővé tevő molekuláris módszerek fejlesztését, valamint új gombaellenes célpontok és stratégiák felfedezését. E célok elérése érdekében elengedhetetlen a mucormikózis patomechanizmusának tisztázása, a gazda-patogén interakciók feltárása, valamint a potenciális virulencia faktorok és biomarkerek azonosítása. E célok eléréséhez szükséges egy olyan molekuláris és genetikai manipulációs módszer járomspórás gombákra történő adaptációjára, mely segítségével rutinszerűen állíthatók elő a génfunkciók vizsgálatára alkalmas mutáns törzsek.

A legfrissebb kutatások rámutattak a CotH fehérje család fontosságára a járomspórás *R. delemar* patogenitása kapcsán, kutatásunk ezért elsősorban e géncsalád átfogó elemzésére, mint például a virulenciában betöltött szerepének tisztázására összpontosult. A *Mucor* genomban azonosított feltételezett spórafelszíni fehérjéknek azonban csak egy része mutatott homológiát azokkal a *Rhizopus* fehérjékkel, melyek kapcsolatban állnak a gomba patogenitásával. Azt a lehetőséget is figyelembe kellett tehát vennünk, hogy a CotH fehérjecsalád egy sokrétű, akár számos biológiai folyamatban is szerepet játszó proteincsalád, s ennek érdekében számos kísérletet terveztünk a spórafelszíni fehérjék *M. circinelloides* gombában betöltött szerepének tisztázására. A CotH fehérjék funkcionális elemzése során nyomon követtük a CRISPR-Cas9 rendszer által létrehozott genetikailag stabil mutánsok fenotípusos változásait, hogy megválaszolhassuk azt a kérdést, hogy a CotH fehérjék milyen szerepet játszanak a *M. circinelloides* gomba patogenezisében, illetve egyéb fiziológiai folyamataiban.

A NHEJ hibajavító mechanizmus segítségével történő génszerkesztési kísérleteink során a *M. circinelloides* mutáns MS12 (*leuA*<sup>-</sup> és *pyrG*<sup>-</sup>) és CBS277.49 vad típusú törzseit a *carB* génre specifikus *in vitro* szintetizált gRNS szekvenciával és Cas9 nukleázzal transzformáltuk. A gRNS-t és a Cas9 enzimet 100 µM-os koncentrációban alkalmazva  $1,25 \times 10^4$  (MS12) és  $2 \times 10^4$  (CBS277.49) transzformációs hatékonyságot értünk el. Azért, hogy a *carB* génben történő mutációt igazolni tudjuk, a *carB*-t, valamint a vele szomszédos *carRP* gént tartalmazó régiót PCR segítségével amplifikáltuk, az így kapott termékeket pedig megszekvenáltattuk, melynek eredménye alátámasztotta a célgénben történő deléciónak létrejöttét. A szekvenálás azonban a mutánsok genomjában nagyméretű, 2,3 kb nagyságot is meghaladó deléciók jelenlétét tárta fel a PAM szekvenciától 5' irányban, mely mutációk befolyásolták a szomszédos *carRP* gént is. A *carB* gén elrontásának HDR-en alapuló megvalósítása érdekében létrehoztunk egy olyan diszrupciós kazettát, mely a *carB* génnel homológ szekvenciákat, továbbá az uracil auxotrófia komplementációjáért felelős orotidin-5'-monofoszfát-dekarboxiláz (*pyrG*) génjét tartalmazza. 5 µg templát DNS, 100 µM Cas9 enzim és 100 µM gRNS 10<sup>5</sup> számú protoplaszthoz való hozzáadásával 2 telepet sikerült izolálnunk, melyek genomi DNS-ében igazoltuk a *pyrG* gén sikeres integrációját a célszekvenciába. A transzformáns izolátumok nem szelektív körülmények között is, legalább 15 átoltási ciklus után is, megőrizték stabilitásukat. Sem az integrált DNS degradálódására, sem reorganizálódására utaló jeleket nem találtunk. Járomspórás gombákban tehát először, sikeresen alkalmaztuk a CRISPR-Cas9 rendszert, s ezt követőleg megkezdhetjük egyes géncsaládok átfogó vizsgálatát.

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

A *cotH1-6* gének elrontása céljából olyan diszrupciós kazettákat hoztunk létre, melyek tartalmazták a célzott gének promóter és az 5' UTR régióját, továbbá a 3' UTR és terminális régiókat, valamint a *pyrG* gént. Az így létrehozott diszrupciós kazettát templát DNS-ként alkalmaztuk a CRISPR-Cas9 módszerrel megvalósított HDR során, létrehozva öt, *cotH*-mutáns törzset. A *cotH* gének CRISPR-Cas9 rendszerrel végrehajtott specifikus géndiszrupciójának sikerességét hagyományos PCR, qRT-PCR, Sanger szekvenálás és a *cotH3* és *cotH4* mutáns esetében WGS segítségével validáltuk. A *cotH* gének diszrupciója során tapasztalt transzformációs gyakoriság 2-6 telep/10<sup>5</sup> protoplaszt volt. A *cotH6* gén elrontására tett kísérletek során tapasztalt jelenségek alapján, miszerint a transzformálást követően a feltehetőleg mutáns telepek nem bizonyultak életképesnek, arra következtettünk, hogy a *cotH6* gén olyan fontos funkcióval bírhat, melynek hiánya letális a gomba számára.

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

Mivel a sejtfal összetételének megváltozása befolyásolhatja a gomba virulenciáját, ezért diszrupciós törzseink érzékenységét megvizsgáltuk KV és KF festékekkel szemben, melyeket gyakran alkalmaznak sejtfal mutánsok azonosítására. A KV festékekkel szemben az MS12- $\Delta$ *cotH3*+*pyrG* és MS12- $\Delta$ *cotH5*+*pyrG* mutánsok szignifikánsan érzékenyebbek, míg az MS12- $\Delta$ *cotH4*+*pyrG* szignifikánsan ellenállóbbnak bizonyult. KF az összes vizsgált *cotH* mutáns növekedésére szignifikáns hatással bírt, mely a *cotH1*, *cotH2*, *cotH3* és *cotH5* törzsek esetében a stresszorzal szembeni érzékenységeként, a *cotH4* esetében pedig egy fokozottabb ellenállóképességként mutatkozott meg. A KV és KF festékekkel szembeni érzékenység megváltozásának egy lehetséges magyarázata lehet a *cotH* mutánsok sejtfalának szerkezeti megváltozása. Az MS12- $\Delta$ *cotH4*+*pyrG* törzs spóráinak életképessége szignifikánsan lecsökkent hidrogén-peroxiddal való kezelést követően. Az MS12- $\Delta$ *cotH4*+*pyrG* mutáns ellenállóbbnak bizonyult az SDS membrán detergenssel szemben.

Az SDS detergenssel szemben a harmadik naptól kezdve a *cotH1*, *cotH2*, *cotH3* és *cotH5* mutánsok fokozott érzékenységet mutattak.

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

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

A spórák J774.2 makrofágokkal történő interakcióját áramlási citométer segítségével követtük nyomon. Annak ellenére, hogy az MS12- $\Delta$ *cotH3*+*pyrG*, MS12- $\Delta$ *cotH4*+*pyrG* és MS12- $\Delta$ *cotH5*+*pyrG* törzsek spóráinak méretében, illetve spórafal szerkezetében is jelentős változást detektáltunk, az egy makrofág által fagocitált gombasejtek számában nem volt szignifikáns különbség, azonban az MS12- $\Delta$ *cotH3*+*pyrG* és MS12- $\Delta$ *cotH4*+*pyrG* törzs spóráiból a J774.2 sejtek képesek voltak négynél többet is bekebelezni. Ezt követően a J774.2 sejteket a mutáns törzsek spóráival koinkubáltuk, majd képkötő áramlási citométerrel vizsgáltuk a pHrodo™ Red+ makrofágok arányát. A fagoszómák savasodását nem befolyásolják a vizsgált CotH



fehérjék, továbbá a CotH fehérjék hiánya nem befolyásolta szignifikánsan a spórák túlélését az *in vitro* interakciót követően.

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

Járomspórás gombák genetikai módosítására először a *carB* gén célzott elrontásán keresztül, sikeresen adaptáltuk a CRISPR-Cas9 módszert. Az általunk *M. circinelloides* fonalas gombára optimalizált génszerkesztési eszköz egy plazmidok használatát nélkülöző, *off-target* hatások nélküli, megbízható genomszerkesztési eljárásnak bizonyult, mely a NHEJ és HDR hibajavító útvonal általi géndiszrupciót is lehetővé teszi. 17 *cotH*-szerű gént azonosítottunk a *M. circinelloides* f. *lusitanicus* genomjában, melyek *in silico* analízise bővítette a CotH fehérjékkel kapcsolatos ismereteinket. A CRISPR rendszer segítségével öt *cotH* gén sikeres diszrupcióját hajtottuk végre. Két mutáns törzs WGS analízisével is validáltuk eredményeinket. A CotH1, CotH2, CotH3, CotH4 és CotH5 proteineknek szerepük van az eltérő hőmérsékletekhez való adaptációban, továbbá a sejtfal szerkezetének kialakításában. Igazoltuk továbbá azt a tényt, hogy a CotH3, CotH4 és CotH5 fehérjék részt vesznek a spórafal szerkezetének, továbbá a CotH5 protein a sporangiumok falának kialakításában. Bizonyítottuk továbbá, hogy a spórák méretének kialakítása a *cotH4* és *cotH5* génektől függő folyamat, hiányukban kisebb gombaspórák képződnek. A CotH4 protein befolyásolja a spórák sejtfalának összkitin tartalmát, ezáltal a spórafal összetételét. A CotH3 fehérje virulenciában betöltött szerepét igazoltuk *D. melanogaster* és DKA egér modellben. A CotH4 fehérje virulenciában betöltött szerepét igazoltuk *D. melanogaster*, *G. mellonella* és DKA egér modellben. A *cotH5* gén diszrupciós törzssel való fertőzést követően *D. melanogaster* modellorganizmusban csökkent patogenitást tapasztaltunk.

## 8. SUMMARY

Mucormycosis is an invasive fungal infection caused by certain members of the filamentous fungal order Mucorales. It most frequently occurs in patients who have an underlying immunocompromised status due to immunosuppressive treatment or haematological malignancy. The species most frequently identified as the etiological agents of mucormycosis belong to the genera *Rhizopus*, *Lichtheimia* and *Mucor*. The frequency of systemic mucormycosis has been increasing, mainly because of the elevating ratio of susceptible population.

Furthermore, Mucorales fungi display intrinsic resistance to the majority of routinely used antifungal agents (e.g., echinocandins and most azoles), which also limits the number of possible therapeutic options. All of the above mentioned issues urge the improvement of molecular identification methods and the discovery of new antifungal targets and strategies. To achieve these goals, clarification of the pathomechanism of mucormycosis, understanding the interaction of these fungi with their hosts, and the identification of potential virulence factors and new biomarkers are essential. All these studies need the adaptation and routine application of molecular and genetic manipulation methods. Appropriate tools for genetic manipulation, including efficient and reliable methods for genetic transformation, are basic requirements of cell biological and molecular studies, as well as of strain improvement by genetic and metabolic engineering.

As recent results have pointed out the importance of the CotH protein family in connection with virulence, our research was focused mainly on the extensive analysis of these genes and the clarification of their role in the virulence. However, that only a subset of the putative spore surface proteins identified in the *Mucor* genome showed homology to *Rhizopus* proteins associated with fungal pathogenicity. Thus, we also had to consider the possibility that the CotH family is a diverse group of proteins involved in many biological processes, and so forth we designed several experiments to elucidate the role of spore surface proteins in *Mucor*. Based on this, we attempted to perform the functional analysis of the CotH proteins, which involved monitoring the phenotypic alterations of genetically stable mutants created by the use of CRISPR-Cas9 system. To reveal whether CotH proteins play a role in the pathogenesis and other biological processes of the *M. circinelloides* fungus.

In our gene engineering experiments using the NHEJ error repair mechanism, we transformed the *M. circinelloides* double auxotrophic MS12 (*leuA*- and *pyrG*-) and a wild-type strain CBS277.49 to disrupt the *carB* gene. Using 100  $\mu$ M gRNA and Cas9, transformation (i.e. disruption) frequencies were found to be  $1.25 \times 10^4$  and  $2 \times 10^4$  colonies per  $10^5$  protoplasts for MS12 and CBS277.49, respectively. To prove the mutation in the *carB* gene, a region containing the targeted *carB* and the adjacent *carRP* genes was amplified by PCR from the DNA of the isolated transformants. However, more than 2.3 kb long deletions were detected upstream from the protospacer adjacent motif (PAM) sequence in the resulting mutants. These deletions also affected the adjacent *carRP* gene. To achieve HDR-based disruption of the *carB* gene, we created a disruption cassette, which served as the template DNA containing the *pyrG* gene as a selection marker and two fragments homologous to the target site to direct the HDR. When *carB* was targeted, transformation frequency was two colonies per  $10^5$  protoplasts. Gene disruption occurred *via* the integration of the selection marker at the appropriate sites, indicating the usefulness of this methodology to obtain targeted gene disruption and/or integration in *Mucor*. Stability of the mutants was proven. No signs of degradation or reorganization of the integrated DNA were found. Thus, in Mucoral fungi, we successfully applied the CRISPR-Cas9 system for the first time.

17 *cotH*-like genes were identified in *M. circinelloides* f. *lusitanicus* genome database. After the identification of the possible CotH-like proteins in the *M. circinelloides* genome, we have executed *in silico* analyses in order to gain information about their characteristics and possible role. Based on predictions by NCBI Blast, the highest similarity between *Mucor* CotH-like proteins and *Rhizopus* CotH3 was found in CotH4 (49.3%), CotH6 (52.1%) and CotH13 (72.9%). It is important to note that these three proteins carry at least a part of the AA sequence described as "CotH motif". We predicted the putative intracellular localization of CotH-like proteins identified in *M. circinelloides*, based on which they were found to be predominantly extracellular in nature, and also examined the possible presence of signal peptide and GPI anchor in the proteins. Based on the *in silico* analysis of the CotH protein family, it has possibly a wide variety of functions, and some of its members exhibit great similarity with protein CotH3 recognised in *R. delemar*, known for taking playing role pathogenicity; while other members show a high level of AS sequence similarity with certain proteins of carotene-producing filamentous model organism *P. blakesleeanus*, whose function is unknown.

To disrupt the *cotH1-6* genes, disruption cassettes were generated containing the promoter and 5' UTR regions of the target genes, as well as the 3' UTR and terminal regions and the *pyrG* gene, which encodes orotidine-5'-phosphate decarboxylase and complements the uracil auxotrophy of MS12 and were used as a template DNA to disrupt five *cotH* genes. To prove the specific gene disruption in *cotH* genes we performed conventional PCR, and to detect the template DNA-carrying properties of homozygous disruption strains, qRT-PCR and Sanger sequencing. In the case of the *cotH3* and *cotH4* mutants, the presence of disruption was validated using WGS. All of the mutants proved to be mitotically stable. Transformation frequency observed during the disruption of *cotH* genes was 2-6 colonies/ $10^5$  protoplasts. Based on the phenomena observed during attempts to disrupt the *cotH6* gene we concluded that its disruption may be lethal for the fungus.

During cultivation at the optimum growth of the fungus (28 °C) the MS12- $\Delta$ *cotH4+pyrG* disruption mutant showed significantly decreased and MS12- $\Delta$ *cotH3+pyrG* had significantly increased growth. The MS12- $\Delta$ *cotH4+pyrG* strain retained its characteristic growth defect at lower and higher temperatures as well, and its growth was less affected by the cultivation on higher temperatures than the control strain. Strains *cotH1*, *cotH2*, *cotH3*, and *cotH5* were found to be more sensitive to a higher temperature compared to the control strain. The *cotH3* mutant proved to be heat sensitive at 20 °C and 35 °C.

Changes in cell wall composition can be a factor in fungal virulence, accordingly, sensitivity tests were performed with CR and CFW dyes, which are often used to identify cell wall mutants in fungi. The MS12- $\Delta$ *cotH3+pyrG* and MS12- $\Delta$ *cotH5+pyrG* disruption mutant strains had increased sensitivity to CR dye, and the MS12- $\Delta$ *cotH4+pyrG* mutant proved to be more resistant to the CR cell wall stressor. CFW showed a significant effect on the growth of all *cotH* mutants, which was shown to be more sensitive to the stressor in case of *cotH1*, *cotH2*, *cotH3*, and *cotH5* mutants and to be more resistant in case of the *cotH4* mutant strain. A possible explanation for the change in susceptibility to CV and CFW dye may be the structural change in the cell wall of *cotH* mutants, which may also be related to the increased sensitivity of MS12- $\Delta$ *cotH4+pyrG* spores to hydrogen peroxide. The MS12-*cotH4+pyrG* disruption strain had increased resistance to SDS membrane detergent. The effect of SDS was observed from the third day of the cultivation time in case of the *cotH1*, *cotH2*, *cotH3* and *cotH5* strains, at which time intensive spore-forming processes of the fungus take place.

Using TEM, we examined the length, cross-sectional distribution, profile area and circularity of the spores, as well as the structure of the cell wall. Based on our results, the spores of the MS12+*pyrG* strain used as control have a profile area of 7.77-75.35  $\mu\text{m}^2$ , a cross-section of the spores were 2.71-7.87  $\mu\text{m}$  and a longitudinal cross-section of the spores were 3.65-12.19  $\mu\text{m}$ . Disruption of the *cotH1*, *cotH2* and genes did not affect either the shape or size of the spores. CotH4 and CotH5 proteins play a role in spore size formation. The examination of the spore wall layers by TEM revealed that *cotH* genes play a significant role in the formation of all the three layers, however, the role of these genes in the formation of the wall of circular and ellipsoidal spores may be different. In the wall of the circular spores of the MS12- $\Delta$ *cotH3*+*pyrG* strain, a thinner middle layer was observed, at the same time the thickening of the outer wall also took place. A decrease in the thickness of the middle layer could also be detected in the case of ellipsoidal spores. Based on all this, we can say that the CotH3 protein plays role mostly in the formation of the middle layer of the spore wall. The *cotH4* gene is essential for the formation of the inner layer of the cell wall of circular spores. In its absence, the middle layer abnormally thickens, however, in the case of ellipsoidal spores this affects the inner layer. The spore wall of *cotH4* mutant strains, regardless of the shape of the spore abnormally thickens, resulting in the appearance of a characteristic phenotype. CotH5 protein is likely to play role in the formation of all three layers of circular spores, whereas in the case of ellipsoidal spores the formation of the middle layer of the spore wall.

Following mutation in the *cotH4* gene, the total chitin content of the spore wall was significantly increased, which is probably related to a change in some layers of the cell wall. There is also the possibility that the cell wall and cell membrane are separated and material accumulation between the two structures, e.g. accumulation of chitin occurs. Fluorescent staining of young hyphae has demonstrated that changes in chitin content are limited to fungal spores for strain MS12- $\Delta$ *cotH4*+*pyrG*.

As phagocytic cells in the host can recognize certain elements of the cell wall of a pathogenic fungus using their receptors in fungal infections, the composition of the cell wall of the fungus may be an important determinant in host-pathogen interactions. To explore the efficiency of J774.2 macrophages in the recognition and elimination of spores produced by the mutant strains, the interaction of spores with macrophages was monitored using a flow cytometer. Although a significant change in the spore size and spore wall structure of MS12- $\Delta$ *cotH3*+*pyrG*, MS12- $\Delta$ *cotH4*+*pyrG* and MS12- $\Delta$ *cotH5*+*pyrG* strains was detected, no significant difference was found in the number of

fungal cells phagocytosed by a macrophage. Subsequently, J774.2 cells were coincubated with the labelled spores and then the ratio of pHrodo™ Red + macrophages was examined by imaging flow cytometry. Acidification of phagosomes is not affected by the examined CotH proteins, and the absence of CotH proteins did not affect the survival of spores after *in vitro* interaction with macrophages.

The *cotH3*, *cotH4*, and *cotH5* mutant strains showed reduced virulence in an *in vivo* *Drosophila* infection model. Our results highlighted the possible role of the *cotH3*, *cotH4*, and *cotH5* genes in pathogenicity of *M. circinelloides*. The *in vivo* viability studies in *G. mellonella* also confirmed the role of CotH4 protein in virulence. We first examined the infectivity of wild-type fungi (CBS277.49) in mice. Viability studies in DKA mice demonstrated that CotH3 and CotH4 proteins affect the pathogenicity of *M. circinelloides*.

For the first time in Mucoral fungi, the CRISPR-Cas9 system was successfully applied through targeted disruption of the *carB* gene encoding phytoene dehydrogenase. The genetic engineering tool we optimized for *M. circinelloides* filamentous fungus proved to be a reliable genome editing method without the use of plasmids, nor any *off-target* effects, which also allowed us to perform gene disruption by the NHEJ and HDR error repair mechanisms. 17 *cotH*-like genes were identified in *M. circinelloides* f. *lusitanicus* genome, the *in silico* analysis of which has expanded our knowledge of CotH proteins. Successful disruption of five *cotH* genes was performed using the CRISPR system. We validated our results by WGS analysis of two mutant strains. The CotH1, CotH2, CotH3, CotH4, and CotH5 proteins play a role in adaptation to different temperatures as well as in developing the cell wall structure. We also demonstrated that CotH3, CotH4, and CotH5 proteins are involved in spore wall and the CotH5 protein in the sporangial wall formation. We further demonstrated that spore size formation is a process dependent on the *cotH4* and *cotH5* genes, in the absence of which smaller fungal spores are formed. The CotH4 protein affects the total chitin content of the cell wall of spores, thereby affecting the composition of the spore wall. The role of CotH3 protein in virulence was confirmed in *D. melanogaster* and DKA mouse models, and the role of CotH4 protein in virulence was confirmed in *D. melanogaster*, *G. mellonella* and DKA mouse models. Following infection of the *cotH5* mutant strain, reduced pathogenicity was observed in a *D. melanogaster* model organism.

## 9. IRODALOMJEGYZÉK

- ABOLTINS C.A., WILLIAM A.B.P., SOLANO T.R. (2006) Fungemia secondary to gastrointestinal *Mucor indicus* infection. *Clin. Infect. Dis.* **42**(1):154-155.
- AFROZE S.N., KORLEPARA R., RAO G.V., MADALA J. (2017) Mucormycosis in a diabetic patient: a case report with an insight into its pathophysiology. *Contemp. Clin. Dent.* **8**(4):662–666.
- ALARCO A.M., MARCIL A., CHEN J., SUTER B., THOMAS D. és mtsi. (2004) Immune-deficient *Drosophila melanogaster*: a model for the innate immune response to human fungal pathogens. *J. Immunol.* **172**(9):5622–5628.
- ALCALDE E., CERDÁ-OLMEDO E., AL-BABILI S. (2019) Apocarotenoids produced from  $\beta$ -carotene by dioxygenases from *Mucor circinelloides*. *Microbiology.* **165**(4):433–438.
- ALFANO G., FONTANA F., FRANCESCA D., ASSIRATI G., MAGISTRI P. és mtsi. (2018) Gastric mucormycosis in a liver and kidney transplant recipient: case report and concise review of literature. *Transplant. Proc.* **50**(3):905–909.
- ANNIE L., LAURENCE M.C., STÉPHANIE M.S., EMMANUEL C., JEAN-LUC J. és mtsi. (2018) Comparative analysis of five *Mucor* species transcriptomes. *Genomics.* **111**(6):1306-1314.
- ANTACHOPOULOS C. & ROILIDES E. (2005) Cytokines and fungal infections. *Br. J. Haematol.* **129**(5):583-96.
- APPEL K.F., WOLFF A.M., ARNAU J. (2004) A multicopy vector system for genetic studies in *Mucor circinelloides* and other zygomycetes. *Mol. Gen. Genet.* **271**(5):595-602.
- ARAZOE T., MIYOSHI K., YAMATO T., OGAWA T., OHSATO S. és mtsi. (2015) Tailor-made CRISPR/Cas system for highly efficient targeted gene replacement in the rice blast fungus. *Biotechnol. Bioeng.* **112**(12):2543–2549.
- ARCE-SALINAS C.A. & PÉREZ-SILVA E. (2010) Mucormycosis complications in systemic lupus erythematosus. *Lupus.* **19**(8):985–988.
- ARENDRUP M.C., JENSEN R.H., MELETIADIS J. (2015) *In vitro* activity of isavuconazole and comparators against clinical isolates of the Mucorales order. *AAC.* **59**(12):7735-42.
- ARIF S. & PERFECT J.R. (2017) Emergence of the molds other than *Aspergillus* in immunocompromised patients. *Clin. Chest. Med.* **38**(3):555-573.
- ARNOULT N., CORREIA A., MA J., MERLO A., GARCIA-GOMEZ S. és mtsi. (2017) Regulation of DNA repair pathway choice in S and G2 phases by the NHEJ inhibitor CYREN. *Nat.* **549**(7673):548–552.
- ARRAS S.D., CHUA S.M., WIZRAH M.S., FAINT J.A., YAP A.S. és mtsi. (2016) Targeted genome editing *via* CRISPR in the pathogen *Cryptococcus neoformans*. *PloS One.* **11**(10):e0164322.
- ARROYO J., FARKAŠ V., SANZ A.B., CABIB E. (2016a) Strengthening the fungal cell wall through chitin-glucan cross-links: effects on morphogenesis and cell integrity. *Cell. Microbiol.* **18**(9):1239–1250.
- ARROYO J., SARFATI J., BAIXENCH M.T., RAGNI E., GUILLÉN M. és mtsi. (2007) The GPI-anchored Gas and Crh families are fungal antigens. *Yeast.* **24**(4):289–296.
- ARROYO M.A., SCHMITT B.H., DAVIS T.E., RELICH R.F. (2016b) Detection of the dimorphic phases of *Mucor circinelloides* in blood cultures from an immunosuppressed female. *Case. Rep. Infect. Dis.* **1-4**:3720549.
- AVALOS J. & LIMÓN M.C. (2015) Biological roles of fungal carotenoids. *Curr. Genet.* **61**(3):309-24.
- BAHN Y.S., XUE C., IDNURM A., RUTHERFORD J.C., HEITMAN J. és mtsi. (2007) Sensing the environment: lessons from fungi. *Nat. Rev. Microbiol.* **5**(1):57–69.
- BALDIN C., SOLIMAN S.S.M., JEON H.H., ALKHAZRAJI S., GEBREMARIAM T. és mtsi. (2018) PCR-based approach targeting Mucorales specific gene family for the diagnosis of mucormycosis. *J. Clin. Microbiol.* **56**(10):e00746-18.
- BARR D.J.S. (1992) Evolution and kingdoms of organisms from the perspective of a mycologist. *Mycologia.* **84**:1-11.

- BARTSCH S., SCHIMEK C., WÖSTEMEYER J.** (2002) Microprojectile bombardment as a reliable method for transformation of the mucoralean fungus *Absidia glauca*. *Mycoscience*. **43**:213-217.
- BASTIDAS R.J., SHERTZ C.A., LEE S.C., HEITMAN J., CARDENAS M.E.** (2012) Rapamycin exerts antifungal activity *in vitro* and *in vivo* against *Mucor circinelloides* via FKBP12-dependent inhibition of Tor. *Eukaryot. Cel.* **11**(3):270-81.
- BENITO E.P., DÍAZ-MINGUEZ J.M., ITURRIAGA E.A., CAMPUZANO V., ESLAVA E.P.** (1992) Cloning and sequence analysis of the *Mucor circinelloides* *pyrG* gene encoding orotidine-5'-monophosphate decarboxylase: use of *pyrG* for homologous transformation. *Gene*. **116**:59-67.
- BENNY G.L., HUMBER R.A., VOIGT K.** (2014) Zygomycetous fungi: phylum Entomophthoromycota and subphyla Kickxellomycotina, Mortierellomycotina, Mucoromycotina, and Zoopagomycotina. In: *Systematics and evolution. The Mycota*. McLaughlin D.J., Spatafora J.W., (eds.), pp. **209–250**.
- BINDER U., MAURER E., LASS-FLÖRL C.** (2014) Mucormycosis: from the pathogens to the disease. *Clin Microbiol Infect. Suppl.* **6**:60-6.
- BINDER U., NAVARRO-MENDOZA M.I., NASCHBERGER V., BAUER I., NICOLAS F.E. és mtsi.** (2018) Generation of a *Mucor circinelloides* reporter strain—A promising new tool to study antifungal drug efficacy and mucormycosis. *Genes*. **9**(12):613.
- BITAR D., VAN CAUTEREN D., LANTERNIER F., DANNAOUI E., CHE D. és mtsi.** (2009) Increasing incidence of zygomycosis (mucormycosis), France, 1997-2006. *Emerg. Infect. Dis.* **15**(9):1395–1401.
- BLAUWKAMP T.A., THAIR S., ROSEN M.J., BLAIR L., LINDNER M.S. és mtsi.** (2019) Analytical and clinical validation of a microbial cell-free DNA sequencing test for infectious disease. *Nat. Microbiol.* **4**(4):663–674.
- BLISKA J.B. & CASADEVALL A.** (2009) Intracellular pathogenic bacteria and fungi—a case of convergent evolution? *Nat. Rev.* **7**(2):165–71.
- BOUCHARA J.P., OUMEZIANE N.A., LISSITZKY J.C., LARCHER G., TRONCHIN G. és mtsi.** (1996) Attachment of spores of the human pathogenic fungus *Rhizopus oryzae* to extracellular matrix components. *Eur. J. Cell. Biol.* **70**(1):76-83.
- BOWMAN S.M., PIWOWAR A., AL DABBOUS M., VIERULA J., FREE S.J.** (2006) Mutational analysis of the glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor pathway demonstrates that GPI-anchored proteins are required for cell wall biogenesis and normal hyphal growth in *Neurospora crassa*. *Eukaryot. Cel.* **5**(3):587–600.
- BOYCE K.J. & ANDRIANOPOULOS A.** (2015) Fungal dimorphism: the switch from hyphae to yeast is a specialized morphogenetic adaptation allowing colonization of a host. *FEMS Microbiol. Rev.* **39**(6):797-811.
- BREDENKAMP A., VELANKAR H., VAN ZYL W.H., GÖRGENS J.F.** (2010) Effect of dimorphic regulation on heterologous glucose oxidase production by *Mucor circinelloides*. *Yeast*. **27**(10):849-60.
- BULLEN J.J.** (2006) Natural resistance, iron and infection: A challenge for clinical medicine. *J. Med. Microbiol.* **55**(3):251-258.
- CACERES A.M., SARDINA C., MARCANO C., GUEVARA R., BARROS J. és mtsi.** (1997) *Apophysomyces elegans* limb infection with a favorable outcome: case report and review. *Clin. Infect. Dis.* **25**(2):331-2.
- CALO S., NICOLÁS F.E., VILA A., TORRES-MARTÍNEZ S., RUIZ-VÁZQUEZ R.M.** (2012) Two distinct RNA-dependent RNA polymerases are required for initiation and amplification of RNA silencing in the basal fungus *Mucor circinelloides*. *Mol. Microbiol.* **83**(2):379-394.
- CAMINO L.P., IDNURM A., CERDÁ-OLMEDO E.** (2015) Diversity, ecology, and evolution in *Phycomyces*. *Fungal Biol.* **119**(11):1007-1021.
- CARROLL C.S., GRIEVE C.L., MURUGATHASAN I., BENNET A.J., CZEKSTER C.M. és mtsi.** (2017) The rhizoferrin biosynthetic gene in the fungal pathogen *Rhizopus delemar* is a novel member of the *NIS* gene family. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **89**:136–146.
- CARTER J.P.** (1988) Gamma-linoleic acid as a nutrient. *Food Technol.* **128**(9):1411-4.



- CARVALHO A.K.F., RIVALDI J.D., BARBOSA J.C., DE CASTRO H.F. (2015) Biosynthesis, characterization, enzymatic transesterification of single cell oil of *Mucor circinelloides* – A sustainable pathway for biofuel production. *Bioresour. Technol.* **181**:47–53.
- CASADEVALL A. (2007) Determinants of virulence in the pathogenic fungi. *Fungal Biol. Rev.* **21**(4):130–132.
- CERVANTES M., VILA A., NICOLÁS F.E., MOXON S., DE HARO J.P. és mtsi. (2013) A single argonaute gene participates in exogenous and endogenous RNAi and controls cellular functions in the basal fungus *Mucor circinelloides*. *PLoS One.* **8**(7):e69283.
- CHAKRABARTI A., GHOSH A., PRASAD G.S., DAVID J.K., GUPTA S. és mtsi. (2003) *Apophysomyces elegans*: An emerging zygomycete in India. *J. Clin. Microbiol.* **41**(2):783–788.
- CHAKRABORTY B.N. & KAPOOR M. (1990) Transformation of filamentous fungi by electroporation. *Nucleic Acids Res.* **18**(22):6737.
- CHAMILOS G., LEWIS R.E., HU J., XIAO L., ZAL T. és mtsi. (2008b) *Drosophila melanogaster* as a model host to dissect the immunopathogenesis of zygomycosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **105**(27):9367–9372.
- CHAMILOS G., LEWIS R.E., LAMARIS G., WALSH T.J., KONTOYIANNIS D.P. (2008a) Zygomycetes hyphae trigger an early, robust proinflammatory response in human polymorphonuclear neutrophils through toll-like receptor 2 induction but display relative resistance to oxidative damage. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**(2):722–724.
- CHAMILOS G., LUNA M., LEWIS R.E., BODEY G.P., CHEMALY R. és mtsi. (2006) Invasive fungal infections in patients with hematologic malignancies in a tertiary care cancer center: an autopsy study over a 15-year period (1989–2003). *Haematologica.* **91**(7):986–989.
- CHANG H., PANNUNZIO N.R., ADACHI N., LIEBER M.R. (2017) Non-homologous DNA end joining and alternative pathways to double-strand break repair. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **18**(8):495–506.
- CHAYAKULKEEREE M., GHANNOUM M., PERFECT J. (2006) Zygomycosis: the reemerging fungal infection. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **25**(4):215–29.
- CHEN B.X., WEI T., YE Z.W., YUN F., KANG L.Z. és mtsi. (2018) Efficient CRISPR-Cas9 gene disruption system in edible-medicinal mushroom *Cordyceps militaris*. *Front. Microbiol.* **9**:1157.
- CHIBUCOS M.C., SOLIMAN S., GEBREMARIAM T., LEE H., DAUGHERTY S. és mtsi. (2016) An integrated genomic and transcriptomic survey of mucormycosis-causing fungi. *Nat. Commun.* **7**:12218.
- CHINN R.Y. & DIAMOND R.D. (1982) Generation of chemotactic factors by *Rhizopus oryzae* in the presence and absence of serum: relationship to hyphal damage mediated by human neutrophils and effects of hyperglycemia and ketoacidosis. *Infect. Immun.* **38**(3):1123–9.
- CHITASOMBAT M.N. & KONTOYIANNIS D.P. (2016) Treatment of mucormycosis in transplant patients: role of surgery and of old and new antifungal agents. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **29**(4):340–345.
- CHITASOMBAT M.N. & NIPARUCK P. (2018) Deferiprone as adjunctive treatment for patients with invasive mucormycosis: A retrospective case series. *Infect. Dis. Rep.* **10**(2):7765.
- CHOWDHARY A., SINGH P.K., KATHURIA S., HAGEN F., MEIS J.F. (2015) Comparison of the EUCAST and CLSI broth microdilution methods for testing isavuconazole, posaconazole, and amphotericin B against molecularly identified Mucorales species. *Antimicrob. Agents Chemother.* **59**(12):7882–7887.
- CHRETIEN M.L., LEGOUGE C., PAGÈS P.B., LAFON I., FERRANT E. és mtsi. (2016) Emergency and elective pulmonary surgical resection in haematological patients with invasive fungal infections: a report of 50 cases in a single centre. *Clin Microbiol Infect.* **22**(9):782–787.
- CONG L. & ZHANG F. (2015) Genome engineering using CRISPR-Cas9 system. *Methods Mol. Biol.* **1239**:197–217.
- COONEY N.M. & KLEIN B.S. (2008) Fungal adaptation to the mammalian host: it is a new world, after all. *Curr. Opin. Microbiol.* **11**(6):511–516.
- COOTER R.D., LIM I.S., ELLIS D.H., LEITCH I.O.W. (1990) Burn wound zygomycosis caused by *Apophysomyces elegans*. *J. Clin. Microbiol.* **28**(9): 2151–2153.

- CORBACHO I., TEIXIDÓ F., VELÁZQUEZ R., HERNÁNDEZ L.M., OLIVERO I.** (2011) Standard YPD, even supplemented with extra nutrients, does not always compensate growth defects of *Saccharomyces cerevisiae* auxotrophic strains. *Antonie Van Leeuwenhoek.* **99**(3):591-600.
- CORNELY O.A., MAERTENS J., BRESNIK M., EBRAHIMI R., ULLMANN A.J. és mtsi.** (2007) Liposomal amphotericin B as initial therapy for invasive mold infection: a randomized trial comparing a high-loading dose regimen with standard dosing (AmBiLoad trial). *Clin. Infect. Dis.* **10**:1289-97.
- CORROCHANO L.M., KUO A., MARCET-HOUBEN M., POLAINO S., SALAMOV A. és mtsi.** (2016) expansion of signal transduction pathways in fungi by extensive genome duplication. *Curr. Biol.* **26**(12):1577–1584.
- CORZO-LEON D.E., CHORA-HERNANDEZ L.D., RODRIGUEZ-ZULUETA A.P., WALSH T.J.** (2018) *Diabetes mellitus* as the major risk factor for mucormycosis in Mexico: Epidemiology, diagnosis, and outcomes of reported cases. *Med. Mycol.* **56**(1):29-43.
- COSTA-DE-OLIVEIRA S., SILVA A.P., MIRANDA I.M., SALVADOR A., AZEVEDO M.M. és mtsi.** (2013) Determination of chitin content in fungal cell wall: an alternative flow cytometric method. *Cytometry.* **83**(3):324–328.
- D'ENFERT C., DIAQUIN M., DELIT A., WUSCHER N., DEBEAUPUIS J.P. és mtsi.** (1996) Attenuated virulence of uridine-uracil auxotrophs of *Aspergillus fumigatus*. *Infect.* **64**(10):4401–4405.
- DANKAI W., PONGPOM M., VANITTANAKOM N.** (2015) Validation of reference genes for real-time quantitative RT-PCR studies in *Talaromyces marneffeii*. *J. Microbiol. Methods.* **118**:42–50.
- DANNAOUI E.** (2017) Antifungal resistance in mucorales. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **50**(5):617–621.
- DE GROOT P.W., DE BOER A.D., CUNNINGHAM J., DEKKER H.L., DE JONG L. és mtsi.** (2004) Proteomic analysis of *Candida albicans* cell walls reveals covalently bound carbohydrate-active enzymes and adhesins. *Eukaryot. Cel.* **3**:955–965.
- DE LOCHT M.D., BOELAERT J.R., SCHNEIDER Y-J.** (1994) Iron uptake from ferrioxamine and from ferrirrhizoferrin by germinating spores of *Rhizopus microsporus*. *Biochem. Pharmacol.* **47**(10):1843-50.
- DE OLIVEIRA SILVA E., FURTADO N.A.J.C., ALEU J., COLLADO I.G.** (2015) Non-terpenoid biotransformations by *Mucor* species. *Phytochem. Rev.* **14**:745-764.
- DICARLO J.E., NORVILLE J.E., MALI P., RIOS X., AACH J. és mtsi.** (2013) Genome engineering in *Saccharomyces cerevisiae* using CRISPR-Cas system. *Nucleic Acids Res.* **41**(7):4336–4343.
- DOGGETT J.S. & WONG B.** (2014) Mucormycosis. *In: Endocrine emergencies.* Loriaux L. (ed.), pp. **57–63.**
- DONG Y., LI H., ZHAO L., KOOPMAN P., ZHANG F. és mtsi.** (2019) Genome-wide *off-target* analysis in CRISPR-Cas9 modified mice and their offspring. *G3 (Bethesda).* **9**(11):3645–3651.
- DUFOSSÉ L.** (2006) Microbial production of food grade pigments. *Food Technol. Biotechnol.* **44**(3):313-321.
- EIDE D.** (1997) Molecular biology of iron and zinc uptake in eukaryotes. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**(4):573-7.
- EL-GEBALI S., MISTRY J., BATEMAN A., EDD S.R., LUCIANI A. és mtsi.** (2019) The Pfam protein families database in 2019. *Nucleic Acids Res.* **47**(1):427–432.
- ENKLER L., RICHER D., MARCHAND A.L., FERRANDON D., JOSSINET F.** (2016) Genome engineering in the yeast pathogen *Candida glabrata* using the CRISPR-Cas9 system. *Sci. Rep.* **6**:35766.
- ETHERINGTON G.J., RAMIREZ-GONZALEZ R.H., MACLEAN D.** (2015) Bio-samtools 2: a package for analysis and visualization of sequence and alignment data with SAMtools in Ruby. *Bioinformatics.* **31**(15):2565-2567.
- EUCKER J., SEZER O., GRAF B., POSSINGER K.** (2008) *Mucormycoses/Mucormykosen.* **44**(7-8):253-260.

- EVERARD A., BELZER C., GEURTS L., OUWERKERK J.P., ART C. és mtsi. (2013) Crosstalk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **110**(22):9066-9071.
- FANKHAUSER N. & MÄSER P. (2005) Identification of GPI anchor attachment signals by a Kohonen self-organizing map. *Bioinformatics*. **21**(9):1846-1852.
- FERGUSON M.A., BRIMACOMBE J.S., COTTAZ S., FIELD R.A., GÜTHER L.S. és mtsi. (1994) Glycosyl-phosphatidylinositol molecules of the parasite and the host. *Parasitology*. **108**(S1):S45-S54.
- FERNÁNDEZ-TORNERO C., LÓPEZ R., GARCÍA E., GIMÉNEZ-GALLEGO G., ROMERO A. (2001) A novel solenoid fold in the cell wall anchoring domain of the pneumococcal virulence factor LytA. *Nat. Struct. Biol.* **8**(12):1020–1024.
- FERRANDON D., IMLER J.L., HETRU C., HOFFMANN J.A. (2007) The *Drosophila* systemic immune response: sensing and signalling during bacterial and fungal infections. *Nat. Rev. Immunol.* **7**(11):862–874.
- FIELD K.J., RIMINGTON W.R., BIDARTONDO M.I., ALLINSON K.E., BEERLING D.J. és mtsi. (2015) First evidence of mutualism between ancient plant lineages (*Haplomitriopsida* liverworts) and Mucoromycotina fungi and its response to simulated Palaeozoic changes in atmospheric CO<sub>2</sub>. *New Phytol.* **205**(2):743–756.
- FULLER K.K., CHEN S., LOROS J.J., DUNLAP J.C. (2015) Development of the CRISPR/Cas9 system for targeted gene disruption in *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryot. Cel.* **14**(11):1073-1080.
- GARCIA A., VELLANKI S., LEE C.S. (2018) Genetic tools for investigating Mucorales fungal pathogenesis. *Curr. Clin. Microbiol. Rep.* **5**(3):173-180.
- GARCIA-RUBIO R., DE OLIVEIRA H.C., RIVERA J., TREVIJANO-CONTADOR N. (2020) The fungal cell wall: *Candida*, *Cryptococcus*, and *Aspergillus* species. *Front. Microbiol.* **10**:2993.
- GARCIA-VIDAL C., UPTON A., KIRBY K.A., MARR K.A. (2008) Epidemiology of invasive mold infections in allogeneic stem cell transplant recipients: biological risk factors for infection according to time after transplantation. *Clin. Infect. Dis.* **47**(8):1041–1050.
- GASTEIGER E., HOOGLAND C., GATTIKER A., DUVAUD S., WILKINS M.R. és mtsi. (2005) Protein identification and analysis tools on the ExpASY server. In: *The Proteomics Protocols Handbook*. Walker J.M. (ed.), pp. 571-607.
- GEBREMARIAM T., ALKHAZRAJI S., BALDIN C., KOVANDA L., WIEDERHOLD N.P. és mtsi. (2017a) Prophylaxis with isavuconazole or posaconazole protects immunosuppressed mice from pulmonary mucormycosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **61**:e02589-16.
- GEBREMARIAM T., ALKHAZRAJI S., LIN L., WIEDERHOLD N.P., GARVEY E.P. és mtsi. (2017b) Prophylactic treatment with VT-1161 protects immunosuppressed mice from *Rhizopus arrhizus* var. *arrhizus* infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* **61**:e00390-17.
- GEBREMARIAM T., ALKHAZRAJI S., SOLIMAN S., GU Y., JEON H.H. és mtsi. (2019) Anti-CotH3 antibodies protect mice from mucormycosis by prevention of invasion and augmenting opsonophagocytosis. *Sci. Adv.* **5**(6):eaaw1327.
- GEBREMARIAM T., LIN L., LIU M., KONTOYIANNIS D.P., FRENCH S. és mtsi. (2016) Bicarbonate correction of ketoacidosis alters host-pathogen interactions and alleviates mucormycosis. *J. Clin. Invest.* **126**(6):2280-2294.
- GEBREMARIAM T., LIU M., LUO G., BRUNO V., PHAN Q.T. és mtsi. (2014) CotH3 mediates fungal invasion of host cells during mucormycosis. *J. Clin. Invest.* **124**(1):237–250.
- GEBREMARIAM T., WIEDERHOLD N.P., ALQARIHI A., UPPULURI P., AZIE N. és mtsi. (2017c) Monotherapy or combination therapy of isavuconazole and micafungin for treating murine mucormycosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **72**(2):462-466.
- GHUMAN H. & VOELZ K. (2017) Innate and adaptive immunity to Mucorales. *J. Fungi.* **3**(3):48.
- GIUDICE G., CUTRIGNELLI D.A., SPORTELLI P., LIMONGELLI L., TEMPESTA A. és mtsi. (2016) Rhinocerebral mucormycosis with orosinus involvement: diagnostic and surgical treatment guidelines. *Endocr. Metab. Immune. Disord. Drug. Targets.* **16**(4):264–269.
- GODTFREDSSEN S.E. (1990) Microbial lipases. In: *Microbial enzymes and biotechnology*. Fogarty W.M., Kelly C.T. (ed.), pp. 255-274.

- GOMES M.Z., LEWIS R.E., KONTOYIANNIS D.P. (2011) Mucormycosis caused by unusual mucormycetes, non-*Rhizopus*, -*Mucor*, and -*Lichtheimia* species. *Clin. Microbiol. Rev.* **24**(2):411–445.
- GONZALEZ-GRONOW M., SELIM M.A., PAPALAS J., PIZZO S.V. (2009) GRP78: a multifunctional receptor on the cell surface. *Antioxid. Redox Signal.* **11**(9):2299–2306.
- GONZALEZ-HERNANDEZ G.A., HERRERA-ESTRELLA L., ROCHA-RAMIREZ V., RONCERO M.I., GUTIERREZ-CORONA J.F. (1997) Biolistic transformation of *Mucor circinelloides*. *Mycol. Res.* **101**:953–956.
- GOTTAR M., GOBERT V., MATSKEVICH A.A., REICHHART J.M., WANG C. és mtsi. (2006) Dual detection of fungal infections in *Drosophila* via recognition of glucans and sensing of virulence factors. *Cell.* **127**(7):1425–1437.
- GUINEA J., ESCRIBANO P., VENA A., MUÑOZ P., MARTÍNEZ-JIMÉNEZ M.D.C. és mtsi. (2017) Increasing incidence of mucormycosis in a large Spanish hospital from 2007 to 2015: Epidemiology and microbiological characterization of the isolates. *PLoS One.* **12**(6):e0179136.
- GUTIÉRREZ A., LÓPEZ-GARCÍA S., GARRE V. (2011) High reliability transformation of the basal fungus *Mucor circinelloides* by electroporation. *J. Microbiol. Methods.* **84**(3):442–6.
- HAFT D.H., SELENGUT J., MONGODIN E.F., NELSON K.E. (2005) A guild of 45 CRISPR-associated (Cas) protein families and multiple CRISPR/Cas subtypes exist in prokaryotic genomes. *PLoS Comput. Biol.* **1**(6):e60.
- HALABY D.M., POUPON A., MORNON J. (1999) The immunoglobulin fold family: sequence analysis and 3D structure comparisons. *Protein Eng.* **12**(7):563–571.
- HALL T.A. (1999) BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* **41**:95–98.
- HAMBURGER Z.A., BROWN M.S., ISBERG R.R., BJORKMAN P.J. (1999) Crystal structure of invasins: a bacterial integrin-binding protein. *Science.* **286**(5438):291–295.
- HAMILOS G., SAMONIS G., KONTOYIANNIS D.P. (2011) Pulmonary mucormycosis. *Semin Respir Crit Care Med.* **32**(6):693–702.
- HAN B.Z., ROMBOUTS F.M., NOUT M.J.R. (2001) A Chinese fermented soybean food. *Int. J. Food Microbiol.* **65**(1–2):1–10.
- HASANIZADEH P., MOGHIMI H., HAMED J. (2017) Biosurfactant production by *Mucor circinelloides* on waste frying oil and possible uses in crude oil remediation. *Water Sci. Technol.* **76**(7–8):1706–1714.
- HASSAN M.I.A. & VOIGT K. (2019) Pathogenicity patterns of mucormycosis: epidemiology, interaction with immune cells and virulence factors. *Medical Mycology.* **57**(S2):S245–S256.
- HAZELL B.W., TE’O V.S., BRADNER J.R., BERGQUIST P.L., NEVALAINEN K.M. (2000) Rapid transformation of high cellulose producing mutant strains of *Trichoderma reesei* by microprojectile bombardment. *Lett. Appl. Microbiol.* **30**(4):282–6.
- HIBBETT D.S., BINDER M., BISCHOFF J.F., BLACKWELL M., CANNON P.F. és mtsi. (2007) A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycol. Res.* **111**(5):509–47.
- HOANG K., ABDO T., REINERSMAN J.M., LU R., HIGUITA N. (2020) A case of invasive pulmonary mucormycosis resulting from short courses of corticosteroids in a well-controlled diabetic patient. *Med. Mycol. Case Rep.* **29**:22–24.
- HOCH H.C., GALVANI C.D., SZAROWSKI D.H., TURNER J.N. (2005) Two new fluorescent dyes applicable for visualization of fungal cell walls. *Mycologia.* **97**:580–588.
- HOFFMANN K., PAWŁOWSKA K.J., WALTHER G., WRZOSEK M., DE HOOG G.S. és mtsi. (2013) The family structure of the Mucorales: a synoptic revision based on comprehensive multigene-genealogies. *Persoonia.* **30**:57–76.
- HOFMANN K. & STOFFEL W. (1993) TMBASE—A database of membrane spanning protein segments. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **374** 166.
- HOGAN L.H., KLEIN B.S., LEVITZ S.M. (1996) Virulence factors of medically important fungi. In: *Clin. Microb. Rev.*, pp. **469–488**.

- HOPKE A., NICKE N., HIDU E.E., DEGANI G., POPOLO L.** (2016) Neutrophil attack triggers extracellular trap-dependent *Candida* cell wall remodeling and altered immune recognition. *PLoS Pathog.* **12**:e1005644.
- HOPKINS M.A. & TRELOAR D.M.** (1997) Mucormycosis in *diabetes*. *Am. J. Crit. Care.* **6**(5):363–367.
- HORTON P., PARK K.-J., OBAYASHI T., FUJITA N., HARADA H. és mtsi.** (2007) WoLF PSORT: protein localization predictor. *Nucleic Acids Res.* **35**(Web Server):W585–W587.
- HUCK S., BOCK J., GIRARDELLO J., GAUERT M., PUL Ü.** (2019) Marker-free genome editing in *Ustilago trichophora* with the CRISPR-Cas9 technology. *RNA biology.* **16**(4):397–403.
- HULO N., BAIROCH A., BULLIARD V., CERUTTI L., CUCHE B.A. és mtsi.** (2008) The 20 years of PROSITE. *Nucleic Acids Res.* **36**:D245-9.
- HULO N., BAIROCH A., BULLIARD V., CERUTTI L., DE CASTRO E. és mtsi.** (2006) The PROSITE database. *Nucleic Acids Res.* **34**:D227–D230.
- HUSSAIN S.A., HAMEED A., KHAN M.A.K., ZHANG Y., ZHANG H. és mtsi.** (2019) Engineering of fatty acid synthases (FASs) to boost the production of medium-chain fatty acids (MCFAs) in *Mucor circinelloides*. *J. Mol. Sci.* **20**(3):786.
- IBRAGIMOVA S., SZEBENYI C., SINKA R., ALZYUOD E.I., HOMA M. és mtsi.** (2020) CRISPR-Cas9-based mutagenesis of the mucormycosis-causing fungus *Lichtheimia corymbifera*. *Int. J. Mol. Sci.* **21**(10):3727.
- IBRAHIM A.S. & SKORY C.D.** (2007) Genetic manipulation of zygomycetes. *In: Medical Mycology.* Kavanagh K. (ed.), pp. **305-326**.
- IBRAHIM A.S.** (2014) Host-iron assimilation: pathogenesis and novel therapies of mucormycosis. *Mycoses.* **57**(S3):S13–17.
- IBRAHIM A.S., GEBERMARIAM T., FU Y., LIN L., HUSSEINY M.I. és mtsi.** (2007) The iron chelator deferasirox protects mice from mucormycosis through iron starvation. *J. Clin. Invest.* **117**(9):2649-2657.
- IBRAHIM A.S., GEBREMARIAM T., LIN L., LUO G., HUSSEINY M.I. és mtsi.** (2010) The high affinity iron permease is a key virulence factor required for *Rhizopus oryzae* pathogenesis. *Mol. Microbiol.* **77**(3):587-604.
- IBRAHIM A.S., GEBREMARIAM T., LUO G., FU Y., FRENCH S.W. és mtsi.** (2011) Combination therapy of murine mucormycosis or aspergillosis with iron chelation, polyenes, and echinocandins. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55**(4):1768-1770.
- IBRAHIM A.S., SPELLBERG B., WALSH T.J., KONTOYIANNIS D.P.** (2012) Pathogenesis of Mucormycosis. *Clin. Infect. Dis.* **54**(S1):S16–22.
- IBRAHIM I.M., ABDELMALEK D.H., ELFIKY A.A.** (2019) GRP78: A cell's response to stress. *Life Sci.* **226**:156–163.
- IDNURM A., RODRÍGUEZ-ROMERO J., CORROCHANO L.M., SANZ C., ITURRIAGA E.A. és mtsi.** (2006) The *Phycomyces mada* gene encodes a blue-light photoreceptor for phototropism and other light responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **103**(12):4546–4551.
- IDNURM A., WALTON F.J., FLOYD A., HEITMAN J.** (2008) Identification of the sex genes in an early diverged fungus. *Nature.* **451**(7175):193-6.
- IMAI K., NODA Y., ADACHI H., YODA K.** (2005) A novel endoplasmic reticulum membrane protein Rcr1 regulates chitin deposition in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **280**(9):8275-8284.
- INGLESFIELD S., JASIULEWICZ A., HOPWOOD M., TYRRELL J., YOULDEN G. és mtsi.** (2018) Robust phagocyte recruitment controls the opportunistic fungal pathogen *Mucor circinelloides* in innate granulomas *in vivo*. *mBio.* **9**:e02010-17.
- ISARANKURA NA AYUDHYA N., LAOTENG K., SONG Y., MEECHAI A., VONGSANGNAK W.** (2019) Metabolic traits specific for lipid-overproducing strain of *Mucor circinelloides* WJ11 identified by genome-scale modeling approach. *PeerJ.* **7**:e7015.
- ISHINO Y., KRUPOVIC M., FORTERRE P.** (2018) History of CRISPR-Cas from encounter with a mysterious repeated sequence to genome editing technology. *J. Bacteriol.* **200**(7):e00580-17.

- ITURRIAGA E.A., DÍAZ-MÍNGUEZ J.M., BENITO E.P., ÁLVAREZ M.I., ESLAVA A.P.** (1992) Heterologous transformation of *Mucor circinelloides* with the *Phycomyces blakesleeanus leu1* gene. *Curr. Genet.* **21**(3):215-23.
- ITURRIAGA E.A., PAPP T., BREUM J., ARNAU J., ESLAVA A.P.** (2005) Strain and culture conditions improvement for  $\beta$ -carotene production in *Mucor*. In: *Microbial Processes and Products. Methods in Biotechnology*. Barredo J.-L. (ed.), pp. **239-256**.
- ITURRIAGA E.A., VELAYOS A., ESLAVA A.P.** (2000) Structure and function of genes involved in the biosynthesis of carotenoids in the Mucorales. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **5**:263-274.
- ITURRIAGA E.A., VELAYOS A., ESLAVA A.P., ALVAREZ M.I.** (2001) The genetics and molecular biology of carotenoid biosynthesis in *Mucor*. *Recent Res. Dev. Genet.* **1**:79-92.
- JACKSON S.P.** (2002) Sensing and repairing DNA double-strand breaks. *Carcinogenesis.* **23**(5):687-696.
- JACOBSEN I.D.** (2019) Animal models to study mucormycosis. *J. Fungi.* **5**(2):27.
- JEONG W., KEIGHLEY C., WOLFE R., LEE W.L., SLAVIN M.A. és mtsi.** (2019) The epidemiology and clinical manifestations of mucormycosis: a systematic review and metaanalysis of case reports. *Clin. Microbiol. Infect.* **25**(1):26–34.
- JIANG W. & MARRAFFINI L.A.** (2015) CRISPR-Cas: New tools for genetic manipulations from bacterial immunity systems. *Annu. Rev. Microbiol.* **69**:209–228.
- KAERGER K., SCHWARTZE V.U., DOLATABADI S., NYILASI I., KOVÁCS S.A. és mtsi.** (2015) Adaptation to thermotolerance in *Rhizopus* coincides with virulence as revealed by avian and invertebrate infection models, phylogeny, physiological and metabolic flexibility. *Virulence.* **6**(4):395–403.
- KAMEI K.** (2001) Animal models of zygomycosis—*Absidia*, *Rhizopus*, *Rhizomucor*, and *Cunninghamella*. *Mycopathologia.* **152**(1):5-13.
- KAUFMAN L., TURNER L.F., MCLAUGHLIN D.W.** (1989) Indirect enzyme linked immunosorbent assay for zygomycosis. *J. Clin. Microbiol.* **27**(9):1979-82.
- KAUR H., GHOSH A., RUDRAMURTHY S.M., CHAKRABARTI A.** (2018) Gastrointestinal mucormycosis in apparently immunocompetent hosts-A review. *Mycoses.* **61**(12):898-908.
- KELLY G., PRASANAN S., DANIELL S., FLEMING K., FRANKEL G. és mtsi.** (1999) Structure of the cell-adhesion fragment of intimin from enteropathogenic *Escherichia coli*. *Nat. Struct. Biol.* **6**(4):313-8.
- KENNEDY K.J., DAVESON K., SLAVIN M.A., VAN HAL S.J., SORRELL T.C. és mtsi.** (2016) Australia and New Zealand mycoses interest group of the australasian society for infectious diseases. Mucormycosis in Australia: contemporary epidemiology and outcomes. *Clin. Microbiol. Infect.* **22**(9):775–781.
- KHAN Z.U., AHMAD S., BRAZDA A., CHANDY R.** (2009) *Mucor circinelloides* as a cause of invasive maxillofacial zygomycosis: an emerging dimorphic pathogen with reduced susceptibility to posaconazole. *J. Clin. Microbiol.* **47**(4):1244–1248.
- KIM H., HAHN M., GRABOWSKI P., MCPHERSON D.C., OTTE M.M. és mtsi.** (2006) The *Bacillus subtilis* spore coat protein interaction network. *Mol. Microbiol.* **59**(2):487-502.
- KIM J.J., SHAJIB M.S., MANOCHA M.M., KHAN W.I.** (2012) Investigating intestinal inflammation in DSS-induced model of IBD. *J. Vis. Exp.* **60**:3678.
- KLEIN T.M., WOLF E.D., WU R, SANFORD J.C.** (1987) High velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. *Nature.* **24**:384–386.
- KLIMKO N., KHOSTELIDI S., SHADRIVOVA O., VOLKOVA A., POPOVA M. és mtsi.** (2019) Contrasts between mucormycosis and aspergillosis in oncohematological patients. *Med. Mycol.* (S2):S138–S144.
- KLIS F.M.** (1994) Cell wall assembly in yeast. *Yeast.* **10**:851–869.
- KONTOYIANNIS D.P., LEWIS R.E.** (2006) Invasive zygomycosis: update on pathogenesis, clinical manifestations, and management. *Infect. Dis. Clin. North Am.* **20**(3):581–607.
- KONTOYIANNIS D.P., MARR K.A., PARK B.J., ALEXANDER B.D., ANAISSIE E.J. és mtsi.** (2010) Prospective surveillance for invasive fungal infections in hematopoietic stem cell transplant recipients, 2001–2006: Overview of the transplant-associated infection surveillance network (TRANSNET) database. *Clin. Infect. Dis.* **50**(8):1091-100.

- KONTOYIANNIS D.P., YANG H., SONG J., KELKAR S.S., YANG X. és mtsi. (2016) Prevalence, clinical and economic burden of mucormycosis-related hospitalizations in the United States: A retrospective study. *BMC Infect. Dis.* **16**(1):730.
- KOSA G., ZIMMERMANN B., KOHLER A., EKEBERG D., AFSETH N.K. és mtsi. (2018) High-throughput screening of Mucoromycota fungi for production of low- and high-value lipids. *Biotechnol. Biofuels.* **11**:66.
- KOTHE G.O. & FREE S.J. (1996) Protocol for the electroporation of *Neurospora* spheroplasts. *Fungal Genet. Rep.* Vol. 43, Article 13.
- KÖHLER J.R., HUBE B., PUCCIA R., CASADEVALL A., PERFECT J.R. (2017) Fungi that infect humans. *Microbiol. Spectr.* **5**(3).
- LANTERNIER F., SUN H.Y., RIBAUD P., SINGH N., KONTOYIANNIS D.P. és mtsi. (2012) Mucormycosis in organ and stem cell transplant recipients. *Clin. Infect. Dis.* **54**(11):1–8.
- LAX C., PÉREZ-ARQUES C., NAVARRO-MENDOZA M.I., CÁNOVAS-MÁRQUEZ J.T., TAHIRI G. és mtsi. (2020) Genes, pathways, and mechanisms involved in the virulence of Mucorales. *Genes.* **11**(3):317.
- LAZAR S.P., LUKASZEWICZ J.M., PERSAD K.A., REINHARDT J.F. (2014) Rhinocerebral *Mucor circinelloides* infection in immunocompromised patient following yogurt ingestion. *Del. Med. J.* **86**(8):245–248.
- LECUBE A., PACHÓN G., PETRIZ J., HERNÁNDEZ C., SIMÓ R. (2011) Phagocytic activity is impaired in type 2 diabetes mellitus and increases after metabolic improvement. *PLoS One.* **6**(8):e23366.
- LEE S.C. & IDNURM A. (2017) Fungal sex: the Mucoromycota. *Microbiol. Spectr.* **5**(2).
- LEE S.C., BILLMYRE R.B., LI A., CARSON S., SYKES S.M. és mtsi. (2014) Analysis of a food-borne fungal pathogen outbreak: virulence and genome of a *Mucor circinelloides* isolate from yogurt. *mBio.* **5**(4):e01390-14.
- LEE S.C., LI A., CALO S., HEITMAN J. (2013) Calcineurin plays key roles in the dimorphic transition and virulence of the human pathogenic zygomycete *Mucor circinelloides*. *PLoS Pathog.* **9**(9):e1003625.
- LEE S.C., LI A., CALO S., INOUE M., TONTHAT N.K. és mtsi. (2015) Calcineurin orchestrates dimorphic transitions, antifungal drug responses and host–pathogen interactions of the pathogenic mucoralean fungus *Mucor circinelloides*. *Mol. Microbiol.* **97**(5):844-65.
- LÉLIEVRE L., GARCIA-HERMOSO D., ABDOUL H., FRENCH MYCOSIS STUDY GROUP (2014) Posttraumatic mucormycosis: a nationwide study in France and review of the literature. *Medicine.* **93**(24):395–404.
- LEWIS R.E. & KONTOYIANNIS D.P. (2013) Epidemiology and treatment of mucormycosis. *Future Microbiol.* **8**(9):1163-75.
- LI C.H., CERVANTES M., SPRINGER D.J., BOEKHOUT T., RUIZ-VAZQUEZ R.M. és mtsi. (2011\*) Sporangiospore size dimorphism is linked to virulence of *Mucor circinelloides*. *PLoS Pathog.* **7**(6):e1002086.
- LI H., HANDSAKER B., WYSOKER A., FENNELL T., RUAN J. és mtsi. (2009) The Sequence alignment/map (SAM) format and SAMtools. *Bioinformatics.* **25**:2078-9.
- LI J., MANGHWAR H., SUN L., WANG P., WANG G. és mtsi. (2019) Whole genome sequencing reveals rare *off-target* mutations and considerable inherent genetic or/and somaclonal variations in CRISPR/Cas9-edited cotton plants. *Plant Biotechnol. J.* **17**(5):858–868.
- LI Z., PAN G., LI T., HUANG W., CHEN J. és mtsi. (2011) SWP5, a spore wall protein, interacts with polar tube proteins in the parasitic microsporidian *Nosema bombycis*. *Eukaryot. Cel.* **11**(2):229–237.
- LIU M., LIN L., GEBREMARIAM T., LUO G., SKORY C.D. és mtsi. (2015) Fob1 and Fob2 proteins are virulence determinants of *Rhizopus oryzae* via facilitating iron uptake from ferrioxamine. *PLoS Pathog.* **11**(5):e1004842.
- LIU M., SPELLBERG B., QUYNH T., PHAN Q.T., FU Y. és mtsi. (2010) The endothelial cell receptor GRP78 is required for mucormycosis pathogenesis in diabetic mice. *J. Clin. Invest.* **120**(6):1914-24.
- LIVAK K.J. & SCHMITTGEN T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* **25**(4):402-408.

- LÓPEZ-FERNÁNDEZ L., SANCHIS M., NAVARRO-RODRÍGUEZ P., NICOLÁS F.E., SILVA-FRANCO F. és mtsi. (2018) Understanding *Mucor circinelloides* pathogenesis by comparative genomics and phenotypical studies. *Virulence*. **9**(1):707–720.
- LUO G., GEBREMARIAM T., CLEMONS K.V., STEVENS D.A., IBRAHIM A.S. (2014) Heat-killed yeast protects diabetic ketoacidotic-steroid treated mice from pulmonary mucormycosis. *Vaccine*. **32**(29):3573-6.
- LUO G., GEBREMARIAM T., LEE H., FRENCH S.W., WIEDERHOLD N.P. és mtsi. (2013) Efficacy of liposomal amphotericin B and posaconazole in intratracheal models of murine mucormycosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **57**(7):3340-7.
- LUO Y., FREY E.A., PFUETZNER R.A., CREAGH A.L., KNOECHEL D.G. és mtsi. (2000) Crystal structure of enteropathogenic *Escherichia coli* intimin-receptor complex. *Nature*. **405**(6790):1073-7.
- MADEIRA F., PARK Y.M., LEE J., BUSO N., GUR T. és mtsi. (2019) The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019. *Nucleic Acids Res.* **47**(W1):W636–W641.
- MAKAROVA K.S., GRISHIN N.V., SHABALINA S.A., WOLF Y.I., KOONIN E.V. (2006) A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action. *Biol Direct*. **1**:7.
- MALI P., YANG L., ESVELT K.M., AACH J., GUELL M. és mtsi. (2013) RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*. **339**(6121):823-6.
- MARRAFFINI L.A. (2015) CRISPR-Cas immunity in prokaryotes. *Nature*. **526**(7571):55–61.
- MARSHALL O.J. (2004) PerlPrimer: cross-platform, graphical primer design for standard, bisulphite and real-time PCR. *Bioinformatics*. **20**(15):2471–2472.
- MARTY F.M., OSTROSKY-ZEICHNER L., CORNELY O.A., MULLANE K.M., PERFECT J.R. és mtsi. (2016) Isavuconazole treatment for mucormycosis: a single-arm open-label trial and case-control analysis. *Lancet Infect. Dis.* **16**(7):828-837.
- MATSUNAGA J., BAROCCHI M.A., CRODA J., CRODA P.J., YOUNG A.T. és mtsi. (2003) Pathogenic *Leptospira* species express surface-exposed proteins belonging to the bacterial immunoglobulin superfamily. *Mol. Microbiol.* **49**(4):929-945.
- MATSU-URA T., BAEK M., KWON J., HONG C. (2015) Efficient gene editing in *Neurospora crassa* with CRISPR technology. *Fungal Biol. Rev.* **2**:4.
- MATTINGLY J.K. & RAMAKRISHNAN V.R. (2016) Rhinocerebral mucormycosis of the optic nerve. *Otolaryngology--head and neck surgery: official journal of american Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery*. **155**(5):888–889.
- MCBRIDE R.A., CORSON J.M., DAMMIN G.J. (1960) Mucormycosis: two cases of disseminated disease with cultural identification of *Rhizopus*. *Am. J. Med.* **28**(1):832–846.
- MCINTYRE M., BREUM J., ARNAU J., NIELSEN J. (2002) Growth physiology and dimorphism of *Mucor circinelloides* (*syn. racemosus*) during submerged batch cultivation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **58**(4):495-502.
- MEHTA A. & HABER J.E. (2014) Sources of DNA double-strand breaks and models of recombinational DNA repair. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **6**(9):a016428.
- MEHTA B.J., OBRAZTSOVA I.N., CERDÁ-OLMEDO E. (2003) Mutants and intersexual heterokaryons of *Blakeslea trispora* for production of  $\beta$ -carotene and lycopene. *Appl. Envir. Microbiol.* **69**(7):4043-4048.
- MEI S., ZHANG J., ZHANG X., TU X. (2015) Solution structure of leptospiral LigA4 Big domain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **467**(2):288-292.
- MENDOZA L., VILELA R., VOELZ K., IBRAHIM A.S., VOIGT K. és mtsi. (2014) Human fungal pathogens of Mucorales and Entomophthorales. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **5**(4):a019562.
- MENNE T.F., GOYENECHEA B., SÁNCHEZ-PUIG N., WONG C.C., TONKIN L.M. és mtsi. (2007) The Shwachman-Bodian-Diamond syndrome protein mediates translational activation of ribosomes in yeast. *Nat. Genet.* **39**(4):486–495.
- MEUSSEN B.J., DE GRAAF L.H., SANDERS J.P., WEUSTHUIS R.A. (2012) Metabolic engineering of *Rhizopus oryzae* for the production of platform chemicals. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **94**(4):875-86.



- MEYER R.D., ROSEN P., ARMSTRONG D. (1972) Phycomycosis complicating leukemia and lymphoma. *Ann. Intern. Med.* **77**(6):871-9.
- MEYERS G.L., JUNG K., BANG S., KIM J., KIM S. és mtsi. (2017) The water channel protein aquaporin 1 regulates cellular metabolism and competitive fitness in a global fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Environ. Microbiol. Rep.* **9**:268–278.
- MICHELSE C.B., SALIM K., RAGAS P., RAM A.F., KUDLA B. és mtsi. (2004) Development of a system for integrative and stable transformation of the zygomycete *Rhizopus oryzae* by *Agrobacterium*-mediated DNA transfer. *Mol. Gen. Genomics.* **271**(4):499-510.
- MILLATI R., EDEBO L., TAHERZADEH M.J. (2005) Performance of *Rhizopus*, *Rhizomucor*, and *Mucor* in ethanol production from glucose, xylose, and wood hydrolyzates. *Enzyme Microbial Technol.* **36**:294-300.
- MILLON L., HERBRECHT R., GRENOUILLET F., MORIO F., ALANIO A. és mtsi. (2016) Early diagnosis and monitoring of mucormycosis by detection of circulating DNA in serum: retrospective analysis of 44 cases collected through the French Surveillance Network of Invasive Fungal Infections (RESSIF). *Clin. Microbiol. Infect.* **22**(9):810.e1–810.e8.
- MOJICA F.J., DÍEZ-VILLASEÑOR C., GARCÍA-MARTÍNEZ J., SORIA E. (2005) Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *J. Mol. Evol.* **60**(2):174-82.
- MONFORT A., CORDERO L., MAICAS S., POLAINA J. (2003) Transformation of *Mucor miehei* results in plasmid deletion and phenotypic instability. *FEMS Microbiol. Lett.* **224**(1):101-6.
- MONTAÑO D.E. & VOIGT K. (2020) Host immune defense upon fungal infections with Mucorales. *J. Fungi.* **6**(3):173.
- MOREIRA J., VARON A., GALHARDO M.C., SANTOS F., LYRA M. és mtsi. (2016) The burden of mucormycosis in HIV-infected patients: a systematic review. *J Infect.* **73**(3):181–188.
- MORGENS D.W., WAINBERG M., BOYLE E.A., URSU O., ARAYA C.L. és mtsi. (2017) Genome-scale measurement of *off-target* activity using Cas9 toxicity in high-throughput screens. *Nat. Commun.* **8**:15178.
- MUELLER K.D., ZHANG H., SERRANO C.R., BILLMYRE R.B., HUH E.Y. és mtsi. (2019) Gastrointestinal microbiota alteration induced by *Mucor circinelloides* in a murine model. *J. Microbiol.* **57**(6):509–520.
- MUNRO C.A. & GOW N.A. (2001) Chitin synthesis in human pathogenic fungi. *Med. Mycol.* **39**:41–53.
- MYSIAKINA I.S. & FUNTIKOVA N.S. (2008) Metabolic characteristics and lipid composition of yeastlike cells and mycelium of *Mucor circinelloides* var. *lusitanicus* INMI grown at a high glucose content in the medium. *Mikrobiologija.* **77**(4) 460-464.
- NACLERIO G., BACCIGALUPI L., ZILHAO R., DE FELICE M., RICCA E. (1996) *Bacillus subtilis* spore coat assembly requires *cotH* gene expression. *J. Bacteriol.* **178**(15):4375–4380.
- NAGY G., FARKAS A., CSERNETICS Á., BENCSIK O., SZEKERES A. és mtsi. (2014) Transcription of the three HMG-CoA reductase genes of *Mucor circinelloides*. *BMC Microbiol.* **14**:93.
- NAGY G., SZEBENYI C., CSERNETICS Á., VAZ A.G., TÓTH E.J. és mtsi. (2017) Development of a plasmid free CRISPR-Cas9 system for the genetic modification of *Mucor circinelloides*. *Sci. Rep.* **7**(1):16800.
- NAVARRO-MENDOZA M.I., PÉREZ-ARQUES C., LÓPEZ-GARCÍA S., NAVARRO E., TORRES-MARTÍNEZ S. és mtsi. (2018a) Molecular tools for carotenogenesis analysis in the Mucoral *Mucor circinelloides*. *Methods Mol. Biol.* **1852**:221-237.
- NAVARRO-MENDOZA M.I., PÉREZ-ARQUES C., MURCIA L., MARTÍNEZ-GARCÍA P., LAX C. és mtsi. (2018b) Components of a new gene family of ferroxidases involved in virulence are functionally specialized in fungal dimorphism. *Sci. Rep.* **8**(1):7660.
- NAZ T., NOSHEEN S., LI S., NAZIR Y., MUSTAFA K. és mtsi. (2020) Comparative analysis of  $\beta$ -Carotene production by *Mucor circinelloides* strains CBS 277.49 and WJ11 under light and dark conditions. *Metabolites.* **10**(1):38.
- NCBI RESOURCE COORDINATORS (2016) Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Res.* **44**(D1):D7–D19.

- NEAME P. & RAYNER D. (1960) Mucormycosis: a report on twenty-two cases. *Arch. Pathol.* **70**:143–150.
- NÉMETH T., TÓTH A., SZENZENSTEIN J., HORVÁTH P., NOSANCHUK J.D. és mtsi. (2013) Characterization of virulence properties in the *C. parapsilosis sensu lato* species. *PLoS One*. **8**(7):e68704.
- NEPH S., KUEHN M.S., REYNOLDS A.P., HAUGEN E., THURMAN R.E. és mtsi. (2012) BEDOPS: high-performance genomic feature operations. *Bioinformatics*. **28**(14):1919–1920.
- NGUYEN K.B., SREELATHA A., DURRANT E.S., LOPEZ-GARRIDO J., MUSZEWSKA A. és mtsi. (2016) Phosphorylation of spore coat proteins by a family of atypical protein kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. **113**(25):e3482–e3491.
- NICHOLS C.B., PERFECT Z.H., ALSPAUGH J.A. (2007) A Ras1-Cdc24 signal transduction pathway mediates thermotolerance in the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Mol. Microbiol.* **63**(4):1118–30.
- NICOLÁS F.E., MOXON S., DE HARO J.P., CALO S., GRIGORIEV I.V. és mtsi. (2010) Endogenous short RNAs generated by Dicer 2 and RNA-dependent RNA polymerase 1 regulate mRNAs in the basal fungus *Mucor circinelloides*. *Nucl Acids Res.* **38**(16):5535–41.
- NICOLÁS F.E., NAVARRO-MENDOZA M.I., PÉREZ-ARQUES C., LÓPEZ-GARCÍA S., NAVARRO E. és mtsi. (2018) Molecular tools for carotenogenesis analysis in the Mucoral. *Methods Mol. Biol.* **1852**:221–237.
- NICOLÁS F.E., VILA A., MOXON S., CASCALES M.D., TORRES-MARTÍNEZ S. és mtsi. (2015) The RNAi machinery controls distinct responses to environmental signals in the basal fungus *Mucor circinelloides*. *BMC Genomics*. **16**(1):237.
- NIELSEN H. (2017) In: *Protein Function Prediction (Methods in Molecular Biology)*. Kihara D. (ed.), pp. 59–73.
- NIHRANE A., SEZGIN G., DSILVA S., DELLORUSSO P., YAMAMOTO K. és mtsi. (2009) Depletion of the Shwachman-Diamond syndrome gene product, SBDS, leads to growth inhibition and increased expression of OPG and VEGF-A. *Blood Cells Mol. Dis.* **42**(1):85–91.
- NØDVIK C.S., NIELSEN J.B., KOGLE M.E., MORTENSEN U.H. (2015) A CRISPR-Cas9 system for genetic engineering of filamentous fungi. *PLoS One*. **10**(7):e0133085.
- NOUT M.J.R. & AIDOO K.E. (2002) Asian Fungal Fermented Food. In: *Industrial Applications. The Mycota*. Osiewacz H.D. (ed.), pp. 23–47.
- NYILASI I., ACS K., PAPP T., NAGY E., VÁGVÖLGYI C. (2005) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Mucor circinelloides*. *Folia Microbiol.* **50**(5).
- NYILASI I., PAPP T., CSERNETICS A., KRIZSÁN K., NAGY E. és mtsi. (2008) High-affinity iron permease (FTR1) gene sequence-based molecular identification of clinically important Zygomycetes. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **14**(4):393–397.
- OBRAZTSOVA I.N., PRADOS N., HOLZMANN K., AVALOS J., CERDÁ-OLMEDO E. (2004) Genetic damage following introduction of DNA in *Phycomyces*. *Fungal Genet. Biol.* **41**(2):168–80.
- OCAMPO J., MCCORMACK B., NAVARRO E., MORENO S., GARRE V. és mtsi. (2012) Protein kinase A regulatory subunit isoforms regulate growth and differentiation in *Mucor circinelloides*: essential role of PKAR4. *Eukaryot. Cel.* **11**(8):989–1002.
- ORLOWSKI M. (1991) *Mucor* dimorphism. *Microbiol. Rev.* **55**(2):234–258.
- ORTIZ-ALVARADO R., GONZALEZ-HERNANDEZ G.A., TORRES-GUZMAN J.C., GUTIERREZ-CORONA J.F. (2006) Transformation of *Mucor circinelloides* with autoreplicative vectors containing homologous and heterologous ARS elements and the dominant Cbxr carboxine-resistance gene. *Curr. Microbiol.* **52**(3):178–181.
- OWJI H., NEZAFAT N., NEGAHDARIPOUR M., HAJIEBRAHIMI A., GHASEMI Y. (2018) A comprehensive review of signal peptides: Structure, roles, and applications. *Eur. J. Cell Biol.* **97**(6):422–441.
- PAGNI M., IOANNIDIS V., CERUTTI L., ZAHN-ZABAL M., JONGENEEL C.V. és mtsi. (2004) MyHits: a new interactive resource for protein annotation and domain identification. *Nucleic Acids Res.* **32**:W332–5.

- PAPANIKOLAOU S. & PANAYOTOU M.G. (2007) Lipid production by oleaginous Mucorales cultivated on renewable carbon sources. *Eur. J. Lipid Sci. Tech.* **109**:1060–1070.
- PAPP T., CSERNETICS A., NAGY G., BENCSEK O., ITURRIAGA E.A. és mtsi. (2013) Canthaxanthin production with modified *Mucor circinelloides* strains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97**(11):4937–4950.
- PAPP T., CSERNETICS Á., NYILASI I., ÁBRÓK M., VÁGVÖLGYI C. (2009) Genetic transformation of Zygomycetes fungi. In: *Progress in Mycology*. Rai M., Kövics Gy. (ed.), pp. 75–94.
- PAPP T., VELAYOS A., BARTÓK T., ESLAVA A.P., VÁGVÖLGYI C. és mtsi. (2006) Heterologous expression of astaxanthin biosynthesis genes in *Mucor circinelloides*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **69**(5):526–531.
- PATIÑO-MEDINA J.A., VALLE-MALDONADO M.I., MALDONADO-HERRERA G., PÉREZ-ARQUES C., JÁCOME-GALARZA I.E. és mtsi. (2019) Role of Arf-like proteins (Arf1 and Arf2) of *Mucor circinelloides* in virulence and antifungal susceptibility. *Fungal Genet. Biol.* **129**:40–51.
- PATIÑO-MEDINA J.A., MALDONADO-HERRERA G., PÉREZ-ARQUES C., ALEJANDRE-CASTAÑEDA V., REYES-MARES N.Y. és mtsi. (2018) Control of morphology and virulence by ADP-ribosylation factors (Arf) in *Mucor circinelloides*. *Curr. Genet.* **64**(4):853–869.
- PATTANAYAK V., LIN S., GUILINGER J.P., MA E., DOUDNA J.A., & LIU D.R. (2013) High-throughput profiling of off-target DNA cleavage reveals RNA-programmed Cas9 nuclease specificity. *Nat. Biotechnol.* **31**(9):839–843.
- PÉREZ-ARQUES C., NAVARRO-MENDOZA M.I., MURCIA L., LAX C., MARTÍNEZ-GARCÍA P. és mtsi. (2019) *Mucor circinelloides* Thrives inside the Phagosome through an Atf-Mediated Germination Pathway. *mBio.* **10**(1):e02765–18.
- PETRIKKOS G. & TSIOUTIS C. (2018) Reviews recent advances in the pathogenesis of Mucormycoses. *Clin. Ther.* **40**(6):894–902.
- PETRIKKOS G.L. (2009) Lipid formulations of amphotericin B as first-line treatment of zygomycosis. *Clin. Microbiol. Infect.* (S5):87–92.
- PLAINE A., WALKER L., DA COSTA G., MORA-MONTES H.M., MCKINNON A. és mtsi. (2008) Functional analysis of *Candida albicans* GPI-anchored proteins: roles in cell wall integrity and caspofungin sensitivity. *Fungal Genet. Biol.* **45**(10):1404–1414.
- POHL C., KIEL J. A., DRIESSEN A.J., BOVENBERG R.A., NYGARD Y. (2016) CRISPR/Cas9 based genome editing of *Penicillium chrysogenum*. *ACS Synth. Biol.* **5**(7):754–764.
- POURCEL C., SALVIGNOL G., VERGNAUD. G. (2005) CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies. *Microbiology.* **151**(3):653–663.
- POZO LADERAS J.C., PONTES MORENO A., POZO SALIDO C., ROBLES ARISTA J.C., LINARES SICILIA M.J. (2015) Mucormycosis diseminadas en pacientes sin inmunodeficiencias: una enfermedad que también existe [Disseminated mucormycosis in immunocompetent patients: A disease that also exists]. *Rev. Iberoam. Micol.* **32**(2):63–70.
- PRAKASH H. & CHAKRABARTI A. (2019) Global epidemiology of mucormycosis. *J. Fungi.* **5**(1):26.
- PRAKASH H., GHOSH A.K., RUDRAMURTHY S.M., SINGH P., XESS I. és mtsi. (2018) A prospective multicenter study on mucormycosis in India: Epidemiology, diagnosis, and treatment. *Med. Mycol.* **57**(4):395–402.
- RAM A.F., WOLTERS A., HOOPEN R.T., KLIS F.M. (1994) A new approach for isolating cell wall mutants in *Saccharomyces cerevisiae* by screening for hypersensitivity to calcofluor white. *Yeast.* **10**(8):1019–1030.
- RAM A.F. & KLIS F.M. (2006) Identification of fungal cell wall mutants using susceptibility assays based on Calcofluor white and Congo red. *Nat. Protoc.* **1**(5):2253–2256.
- REED C., IBRAHIM A., EDWARDS J.E.JR., WALOT I., SPELLBERG B. (2006) Deferasirox, an iron-chelating agent, as salvage therapy for rhinocerebral mucormycosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**(11):3968–3969.
- REFINETTI R. (2010) The circadian rhythm of body temperature. *Front. Biosci.* **1**(15):564–94.

- REID G., LYNCH J.P., FISHBEIN M.C., CLARK N.M. (2020) Mucormycosis. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* **41**(1):099–114.
- RETALLACK D.M., HEINECKE E.L., GIBBONS R., DEEPE G.S., WOODS J.P. (1999) The URA5 gene is necessary for *Histoplasma capsulatum* growth during infection of mouse and human cells. *Infect. Immun.* **67**(2):624–629.
- REUNANEN J., KAINULAINEN V., HUUSKONEN L., OTTMAN N.A., BELZER C. és mtsi. (2015) *Akkermansia muciniphila* adheres to enterocytes and strengthens the integrity of the epithelial cell layer. *Appl. Environ. Microbiol.* **81**(11):3655–62.
- RIBES J.A., VANOVER-SAMS C.L., BAKER D.J. (2000) Zygomycetes in human disease. *Clin. Microbiol. Rev.* **13**(2):236–301.
- RICHARDSON M. (2009) The ecology of the Zygomycetes and its impact on environmental exposure. *Clinical Microbiology and Infectious Diseases.* **15**(S5):2–9.
- RILEY T.T., MUZNY C.A., SWIATLO E., LEGENDRE D.P. (2016) Breaking the mold: a review of mucormycosis and current pharmacological treatment options. *Ann Pharmacother.* **50**(9):747–757.
- RODEN M.M., ZAOUTIS T.E., BUCHANAN W.L., KNUDSEN T.A., SARKISOVA T.A. és mtsi. (2005) Epidemiology and outcome of zygomycosis: a review of 929 reported cases. *Clin. Infect. Dis.* **41**(5):634–653.
- RODRIGUES J., FONSECA F.L., SCHNEIDER R.O., GODINHO R.M., FIRACATIVE C. (2015) Pathogenic diversity amongst serotype C VGIII and VGIV *Cryptococcus gattii* isolates. *Sci. Rep.* **5**:11717.
- RODRÍGUEZ-FRÓMETA R.A., GUTIÉRREZ A., TORRES-MARTÍNEZ S., GARRE V. (2013) Malic enzyme activity is not the only bottleneck for lipid accumulation in the oleaginous fungus *Mucor circinelloides*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97**(7):3063–3072.
- RODRÍGUEZ-ROMERO J., CORROCHANO L.M. (2006) Regulation by blue light and heat shock of gene transcription in the fungus *Phycomyces*: proteins required for photoinduction and mechanism for adaptation to light. *Mol. Microbiol.* **61**(4):1049–59.
- ROILIDES E. & SIMITSOPOULOU M. (2017) Immune responses to Mucorales growth forms: Do we know everything? *Virulence.* **8**(8):1489–1491.
- ROILIDES E., ANTACHOPOULOS C., SIMITSOPOULOU M. (2014) Pathogenesis and host defence against Mucorales: the role of cytokines and interaction with antifungal drugs. *Mycoses.* **57**(S3):S40–S7.
- RONCERO C., VALDIVIESO M.H., RIBAS J.C., DURÁN A. (1988) Isolation and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* mutants resistant to Calcofluor white. *J. Bacteriol.* **170**(4):1950–1954.
- ROUKAS T. (2016) The role of oxidative stress on carotene production by *Blakeslea trispora* in submerged fermentation. *Crit. Rev. Biotechnol.* **36**(3):424–433.
- RUIZ-HIDALGO M.J., ESLAVA A.P., ALVAREZ M.I., BENITO E.P. (1999) Heterologous expression of the *Phycomyces blakesleeanus* phytoene dehydrogenase gene (*carB*) in *Mucor circinelloides*. *Curr. Microbiol.* **39**(5):259–264.
- RUIZ-VÁZQUEZ R.M., NICOLÁS F.E., TORRES-MARTÍNEZ S., GARRE V. (2015) Chapter two—distinct RNAi pathways in the regulation of physiology and development in the fungus *Mucor circinelloides*. *Adv. Genet.* **91**: 55–102.
- RÜPING M.J.G.T., HEINZ W.J., KINDO A.J., RICKERTS V., LASS-FLÖRL C. és mtsi. (2009) Forty-one recent cases of invasive zygomycosis from a global clinical registry. *J. Antimicrob. Chemother.* **65**(2):296–302.
- SAEGEMAN V., MAERTENS J., MEERSSEMAN W., SPRIET I., VERBEKEN E. és mtsi. (2010) Increasing incidence of mucormycosis in University Hospital, Belgium. *Emerging Infect. Dis.* **16**(9):1456–1458.
- SAGGESE A., SCAMARDELLA V., SIREC T., CANGIANO G., ISTATO R. és mtsi. (2014) Antagonistic role of CotG and CotH on spore germination and coat formation in *Bacillus subtilis*. *PLoS One.* **9**(8):e104900.
- SAITOH S., NODA S., AIBA Y., TAKAGI A., SAKAMOTO M. és mtsi. (2002) *Bacteroides ovatus* as the predominant commensal intestinal microbe causing a systemic antibody response in inflammatory bowel disease. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **9**(1):54–59.

- SALAS V., PASTOR F.J., CALVO E., ALVAREZ E., SUTTON D.A. és mtsi. (2012) *In vitro* and *in vivo* activities of posaconazole and amphotericin B in a murine invasive infection by *Mucor circinelloides*: poor efficacy of posaconazole. *Antimicrob. Agents Chemother.* **56**(5):2246-50.
- SAMBROOK J., FRITSCH E.F., MANIATIS T. (1989) Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor, New York.
- SANDER J.D. & JOUNG J.K. (2014) CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nat. Biotech.* **32**(4):347-355.
- SANDVEN P. & EDUARD W. (1992) Detection and quantitation of antibodies against *Rhizopus* by enzyme-linked immunosorbent assay. *APMIS.* **100**(11):981-7.
- SAVCHENKO A., KROGAN N., CORT J.R., EVDOKIMOVA E., LEW J.M. és mtsi. (2005) The Shwachman-Bodian-Diamond syndrome protein family is involved in RNA metabolism. *J. Biol. Chem.* **280**(19):19213-19220.
- SCHILDE C., WÖSTEMEYER J., BURMESTER A. (2001) Green fluorescent protein as a reporter for gene expression in the mucoralean fungus *Absidia glauca*. *Arch. Microbiol.* **175**(1):1-7.
- SCHIMEK C. & WÖSTEMEYER J. (2006) Pheromone action in the fungal groups Chytridiomycota, and Zygomycota, and in the Oomycota. In: *Growth, Differentiation and Sexuality, The Mycota*. Kűes U., Fischer R. (eds.), pp. 215-231.
- SCHMIDT S., SCHNEIDER A., DEMIR A., LASS-FLORL C., LEHRNBECHER T. (2016) Natural killer cell-mediated damage of clinical isolates of mucormycetes. *Mycoses.* **59**(1):34-8.
- SCHMIDT S., TRAMSEN L., PERKHOFER S., LASS-FLÖRL C., HANISCH M. és mtsi. (2013) *Rhizopus oryzae* hyphae are damaged by human natural killer (NK) cells, but suppress NK cell mediated immunity. *Immunobiology.* **218**(7):939-44.
- SCHOLER H.J., MULLER E., SCHIPPER M.A.A. (1983) Mucorales. In: *Fungi Pathogenic for Humans and Animals*. Howard D.W. (ed.), pp. 9-59.
- SCHULZE B., RAMBACH G., SCHWARTZE V.U., VOIGT K., SCHUBERT K. és mtsi. (2017) Ketoacidosis alone does not predispose to mucormycosis by *Lichtheimia* in a murine pulmonary infection model. *Virulence.* **8**(8):1657-1667.
- SCHUSTER M. & KAHMANN R. (2019) CRISPR-Cas9 genome editing approaches in filamentous fungi and oomycetes. *Fungal Genet. Biol.* **130**:43-53.
- SCHWARTZE V.U., HOFFMANN K., NYILASI I., PAPP T., VÁGVÖLGYI C. és mtsi. (2012) *Lichtheimia* species exhibit differences in virulence potential. *PloS One.* **7**(7):e40908.
- SCOTT J.D. & NEWTON A.C. (2016) Bacterial spore coat protein kinases: A new twist to an old story. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **113**(25):6811-6812.
- SHAH D.S., JOUCLA G., REMAUD-SIMEON M., RUSSELL R.R. (2004) Conserved repeat motifs and glucan binding by glucansucrases of oral streptococci and *Leuconostoc mesenteroides*. *J. Bacteriol.* **186**(24):8301-8308.
- SHAMMAS C., MENNE T.F., HILCENKO C., MICHELL S.R., GOYENECHEA B. és mtsi. (2005) Structural and mutational analysis of the SBDS protein family. Insight into the leukemia-associated Shwachman-Diamond Syndrome. *J. Biol. Chem.* **280**(19):19221-19229.
- SHARMA A.K., SPUDICH J.L., DOOLITTLE W.F. (2006) Microbial rhodopsins: functional versatility and genetic mobility. *Trends Microbiol.* **14**(11):463-469.
- SHARMA S., GUPTA P., GUPTA N., LAL A., BEHERA D. és mtsi. (2017) Pulmonary infections in immunocompromised patients: the role of image-guided fine needle aspiration cytology. *Cytopathology.* **28**(1):46-54.
- SHELBURNE S.A., AJAMI N.J., CHIBUCOS M.C., BEIRD H.C., TARRAND J. és mtsi. (2015) Implementation of a pan-genomic approach to investigate holobiont-infecting microbe interaction: a case report of a leukemic patient with invasive mucormycosis. *PloS One.* **10**(11):e0139851.
- SHI T.Q., GAO J., WANG W.J., WANG K.F., XU G.Q. és mtsi. (2019) CRISPR/Cas9-Based Genome editing in the filamentous fungus *Fusarium fujikuroi* and its application in strain engineering for gibberellic acid production. *ACS Synth. Biol.* **8**(2):445-454.

- SHIRAZI F.**, FARMAKIOTIS D., YAN Y., ALBERT N., DO K.A. és mtsi. (2014) Diet modification and metformin have a beneficial effect in a fly model of obesity and mucormycosis. *PLoS One*. **9**(9):e108635.
- SILVEIRA G.G.D.**, OLIVEIRA G.M.D., RIBEIRO E.J., MONTI R., CONTIERO J. (2005) Microbial rennet produced by *Mucor miehei* in solid-state and submerged fermentation. *Braz. Arch. Biol. Tech.* **48**:931-937.
- SINGH N.** (2001) Trends in the epidemiology of opportunistic fungal infections: predisposing factors and the impact of antimicrobial use practices. *Clin. Infect. Dis.* **33**(10):1692-6.
- SINGH N.**, AGUADO J.M., BONATTI H., FORREST G., GUPTA K.L. és mtsi. (2009) Zygomycosis in solid organ transplant recipients: a prospective, matched case-control study to assess risks for disease and outcome. *J. Infect. Dis.* **200**(6):1002–1011.
- SINKÓ J.** (2001) Az invazív gombainfekciók terápiája: jelen és jövő. *Lege Artis Medicinae*. **11**(3).
- SIPSAS N.V.**, GAMALETSOU M.N., ANASTASOPOULOU A., KONTOYIANNIS D.P. (2018) Therapy of Mucormycosis. *J. Fungi*. **4**(3):90.
- SIWEK G.T.**, DODGSON K.J., DE MAGALHAES-SILVERMAN M. (2004) Invasive zygomycosis in hematopoietic stem cell transplant recipients receiving voriconazole prophylaxis. *Clin. Infect. Dis.* **39**(4):584–587.
- SKIADA A.**, LASS-FLOERL C., KLIMKO N., IBRAHIM A., ROILIDES E. és mtsi. (2018) Challenges in the diagnosis and treatment of mucormycosis. *Med. Mycol.* **56**(S1):93–101.
- SKIADA A.**, PAGANO L., GROLL A., ZIMMERLI S., DUPONT B. és mtsi. (2011) Zygomycosis in Europe: Analysis of 230 cases accrued by the registry of the European Confederation of Medical Mycology (ECMM) working group on zygomycosis between 2005 and 2007. *Clin. Microbiol. Infect.* **17**(12):1859–1867.
- SKORY C.D.** (2002) Homologous recombination and double-strand break repair in the transformation of *Rhizopus oryzae*. *Mol. Genet. Genomics*. **268**(3):397-406.
- SKORY C.D.** (2004) Repair of plasmid DNA used for transformation of *Rhizopus oryzae* by gene conversion. *Curr. Genet.* **45**(5):302-310.
- SKORY C.D.** (2005) Inhibition of non-homologous end joining and integration of DNA upon transformation of *Rhizopus oryzae*. *Mol. Gen. Genomics*. **274**(4):373-383.
- SMITH C.**, GORE A., YAN W., ABALDE-ATRISTAIN L., LI Z. és mtsi. (2014) Whole-genome sequencing analysis reveals high specificity of CRISPR/Cas9 and TALEN-based genome editing in human iPSCs. *Cell Stem Cell*. **15**(1):12–13.
- SON H.J.**, SONG J.S., CHOI S., JUNG J., KIM M.J. és mtsi. (2020) Risk factors for mortality in patients with pulmonary mucormycosis. *Mycoses*. **63**(7):729-736.
- SONG Y.** (2019) A new CRISPR scissor. *Nat. Chem. Biol.* **15**(4):315.
- SPATAFORA J.W.**, CHANG Y., BENNY G.L., LAZARUS K., SMITH M.E. és mtsi. (2016) A phylum-level phylogenetic classification of zygomycete fungi based on genome-scale data. *Mycologia*. **108**(5):1028–1046.
- SPELLBERG B.** (2012) Gastrointestinal mucormycosis: an evolving disease. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **8**(2):140–142.
- SPREER A.**, RÜCHEL R., REICHARD U. (2006) Characterization of an extracellular subtilisin protease of *Rhizopus microsporus* and evidence for its expression during invasive rhinoorbital mycosis. *Med. Mycol.* **44**(8):723-31.
- STERN L.E.** & KAGAN R.J. (1999) Rhinocerebral mucormycosis in patients with burns: case report and review of the literature. *J. Burn Care Rehabil.* **20**(4):303–306.
- SUGAR A.M.** (2005) Agents of mucormycosis and related species. In: *Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases*. Mandell G.L., Bennett J.E., Dolin R. (eds.), pp. 2973–2984.
- SUNDSTROM P.** (2002) Adhesion in *Candida* spp. *Cell. Microbiol.* **4**:461-9.
- SZEWCZYK E.**, NAYAK T., OAKLEY C.E., EDGERTON H., XIONG Y. és mtsi. (2006) Fusion PCR and gene targeting in *Aspergillus nidulans*. *Nat. Protoc.* **1**(6):3111–3120.
- TANABE Y.**, O'DONNELL K., SAIKAWA M., SUGIYAMA J. (2000) Molecular phylogeny of parasitic Zygomycota (Dimargaritales, Zoopagales) based on nuclear small subunit ribosomal DNA sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* **16**(2):253-62.

- TANG X., ZAN X., ZHAO L., CHEN H., CHEN Y.Q. és mtsi. (2016) Proteomics analysis of high lipidproducing strain *Mucor circinelloides* WJ11: an explanation for the mechanism of lipid accumulation at the proteomic level. *Microb. Cell. Factories*. **15**:35.
- TAUK-TORNISIELO S.M., ARASATO L.S., ALMEIDA A.F., DE GOVONE J.S., MALAGUTTI E.N. (2009) Lipid formation and  $\gamma$ -linolenic acid production by *Mucor circinelloides* and *Rhizopus* sp., grown on vegetable oil. *Braz. J. Microbiol.* **40**(2):342-345.
- TEDDER M., SPRATT J.A., ANSTADT M.P., HEGDE S.S., TEDDER S.D. és mtsi. (1994) Pulmonary Mucormycosis: Results of medical and surgical therapy. *Ann. Thorac. Surg.* **57**(4):1044-50.
- THIEKEN A. & WINKELMANN G. (1992) Rhizoferrin: A complexone type siderophore of the Mucorales and Entomophthorales (Zygomycetes). *FEMS Microbiol. Lett.* **73**(1-2):37-41.
- TORRES-MARTÍNEZ S., RUIZ-VÁZQUEZ R.M. (2016) RNAi pathways in *Mucor*: A tale of proteins, small RNAs and functional diversity. *Fungal Genet. Biol.* **90**:44-52.
- TORRES-NARBONA M., GUINEA J., MARTÍNEZ-ALARCÓN J., MUÑOZ P., GADEA I. és mtsi. (2007) Impact of zygomycosis on microbiology workload: a survey study in Spain. *J. Clin. Microbiol.* **45**(6): 2051–2053.
- TRIEU T.A., NAVARRO-MENDOZA M.I., PÉREZ-ARQUES C., SANCHIS M., CAPILLA J. és mtsi. (2017) RNAi-based functional genomics identifies new virulence determinants in mucormycosis. *PLoS Pathog.* **13**(1):e1006150.
- TURLAND N.J., WIERSEMA J.H., BARRIE F.R., GREUTER W., HAWKSWORTH D.L. és mtsi. (2018) International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants (Shenzhen Code) adopted by the Nineteenth International Botanical Congress Shenzhen, China, July. *In: Regnum Vegetabile 159. Glashütten: Koeltz Botanical Books.*
- TUSNADY G.E. & SIMON I. (2001) The HMMTOP transmembrane topology prediction server. *Bioinformatics.* **17**(9):849–850.
- VALLE-MALDONADO M.I., JÁCOME-GALARZA I.E., GUTIÉRREZ-CORONA F., RAMÍREZ-DÍAZ M.I., CAMPOS-GARCÍA J. és mtsi. (2015) Selection of reference genes for quantitative real time RT-PCR during dimorphism in the zygomycete *Mucor circinelloides*. *Mol. Biol. Rep.* **42**(3):705-711.
- VAN DER AUWERA G.A., CARNEIRO M.O., HARTL C., POPLIN R., DEL ANGEL G. és mtsi. (2013) From FastQ data to high confidence variant calls: the Genome Analysis Toolkit best practices pipeline. *Curr Protoc Bioinformatics.* **43**(1110):11.10.1–11.10.33.
- VAN HEESWIJCK R. & RONCERO M.I.G. (1984) High frequency transformation of *Mucor* with recombinant plasmid DNA. *In: Carlsberg Res. Commun*, pp. **691-702**.
- VELLANKI S., NAVARRO-MENDOZA M.I., GARCIA A., MURCIA L., PEREZ-ARQUES C. és mtsi. (2018) *Mucor circinelloides*: Growth, maintenance, and genetic manipulation. *Curr Protoc Microbiol.* **49**(1):e53.
- VOELZ K., GRATACAP R.L., WHEELER R.T. (2015) A zebrafish larval model reveals early tissue-specific innate immune responses to *Mucor circinelloides*. *Dis Mod Mechan.* **8**(11):1375-88.
- VOIGT K., VAAS L., STIELOW B., DE HOOG G.S. (2013) The zygomycetes in a phylogenetic perspective. *Persoonia.* **30**: i-iv.
- VOIGT K., WOLF T., OCHSENREITER K., NAGY G., KAERGER K. és mtsi. (2016) Genetic and metabolic aspects of primary and secondary metabolism of the Zygomycetes *In: Biochemistry and Molecular Biology, The Mycota*. Hoffmeister D. (ed.), pp. **414**.
- WALDORF A.R., LEVITZ S.M., DIAMOND R.D. (1984a) *In vivo* bronchoalveolar macrophage defense against *Rhizopus oryzae* and *Aspergillus fumigatus*. *J. Infect. Dis.* **150**(5):752-60.
- WALDORF A.R., RUDERMAN N., DIAMOND R.D. (1984b) Specific susceptibility to Mucormycosis in murine diabetes and bronchoalveolar macrophage defense against *Rhizopus*. *J. Clin. Investig.* **74**(1):150-60.
- WALKER L.A., MUNRO C.A., DE BRUIJN I., LENARDON M.D., MCKINNON A. (2008) Stimulation of chitin synthesis rescues *Candida albicans* from echinocandins. *PLoS Pathog.* **4**:e1000040.
- WALSH T.J. & GAMALETSOU M.N. (2013) Treatment of fungal disease in the setting of neutropenia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* **2013**:423-7.

- WALSH T.J., GAMALETSSOU M.N., MCGINNIS M.R., HAYDEN R.T., KONTOYIANNIS D.P. (2012) Early clinical and laboratory diagnosis of invasive pulmonary, extrapulmonary and disseminated mucormycosis (zygomycosis). *Clin. Infect. Dis.* **54**(S1):S55-60.
- WALTHER G., WAGNER L., KURZAI O. (2019) Updates on the taxonomy of Mucorales with an emphasis on clinically important taxa. *J. Fungi.* **5**(4):106.
- WANG H., LA RUSSA M., QI L.S. (2016) CRISPR/Cas9 in genome editing and beyond. *Annu. Rev. Biochem.* **85**:227-264.
- WANG L. & LIN X. (2012) Morphogenesis in fungal pathogenicity: shape, size, and surface. *PLoS Pathog.* **8**(12):e1003027.
- WANG L., CHEN W., FENG Y., REN Y., GU Z. és mtsi. (2011) Genome characterization of the oleaginous fungus *Mortierella alpina*. *PLoS One.* **6**(12):e28319.
- WANG Q., COBINE P.A., COLEMAN J.J. (2018) Efficient genome editing in *Fusarium oxysporum* based on CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein complexes. *Fungal Genet. Biol.* **117**:21-29.
- WANG Y., WEI D., ZHU X., PAN J., ZHANG P. és mtsi. (2016\*) A 'suicide' CRISPR-Cas9 system to promote gene deletion and restoration by electroporation in *Cryptococcus neoformans*. *Sci. Rep.* **6**:31145.
- WATKINS T.N., GEBREMARIAM T., SWIDERGALL M., SHETTY A.C., GRAF K.T. és mtsi. (2018) Inhibition of EGFR signaling protects from mucormycosis. *mBio.* **9**(4):e01384-18.
- WEBER J., VALIANTE V., NØDVIG C.S., MATTERN D.J., SLOTKOWSKI R.A. és mtsi. (2017) Functional reconstitution of a fungal natural product gene cluster by advanced genome editing. *ACS Synth. Biol.* **6**(1):62-68.
- WEI L.W., WANG H., SONG Y.G., YU J. (2019) Disfiguring *Mucor irregularis* infection cured by amphotericin b and itraconazole: a case report and treatment experience. *Mycopathologia.* **184**(5):677-682.
- WENDEROTH M., PINECKER C., VOß B., FISCHER R. (2017) Establishment of CRISPR/Cas9 in *Alternaria alternata*. *Fungal Genet. Biol.* **101**:55-60.
- WHITEWAY D.E., VIRATA R.L. AND WRISS L.C. (1979) Mucormycosis. *Arch. Intern. Med.* **139**:944-956.
- WOLFF A.M., APPEL K.F., PETERSEN J.B., POULSEN U., ARNAU J. (2002) Identification and analysis of genes involved in the control of dimorphism in *Mucor circinelloides* (syn. *racemosus*). *FEMS Yeast Res.* **2**(2):203-13.
- WÖSTEMEYER J., SCHIMEK C., WETZEL J., BURMESTER A., VOIGT J. és mtsi. (2016) Pheromone action in the fungal groups Chytridiomycetes and Zygomycetes and in the Oophytes. In: *Growth, differentiation and sexuality, The Mycota*. Wendland J. (ed.), pp. 203-234.
- WRIGHT W.D., SHAH S.S., HEYER W.D. (2018) Homologous recombination and the repair of DNA double-strand breaks. *J. Biol. Chem.* **293**(27):10524-10535.
- WURSTER S., TATARA A.M., ALBERT N.D., IBRAHIM A.S., HEITMAN J. és mtsi. (2020) Tornadic shear stress induces a transient, calcineurin-dependent hypervirulent phenotype in Mucorales molds. *mBio.* **11**(3):e01414-20.
- WURSTER S., THIELEN V., WEIS P., WALTHER P., ELIAS J. és mtsi. (2017) Mucorales spores induce a proinflammatory cytokine response in human mononuclear phagocytes and harbor no rodlet hydrophobins. *Virulence.* **8**(8):1708-1718.
- XU W., LIANG G., PENG J., LONG Z., LI D. és mtsi. (2017) The influence of the mating type on virulence of *Mucor irregularis*. *Sci. Rep.* **7**(1):10629.
- YANG M., LEE J.H., KIM Y.K., KI C.S., HUH H.J. és mtsi. (2016) Identification of mucorales from clinical specimens: a 4-year experience in a single institution. *Ann. Lab. Med.* **36**(1):60-63.
- YANG D., PAN L., CHEN Z., DU H., LUO B. és mtsi. (2018) The roles of microsporidia spore wall proteins in the spore wall formation and polar tube anchorage to spore wall during development and infection processes. *Exp. Parasitol.* **187**:93-100.
- YING S.H., FENG M.G., KEYHANI N.O. (2013) Use of uridine auxotrophy (*ura3*) for markerless transformation of the mycoinsecticide *Beauveria bassiana*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97**(7):3017-3025.



- YOON Y.K., KIM M.J., CHUNG Y.G., SHIN I.Y. (2010) Successful treatment of a case with rhino-orbital-cerebral mucormycosis by the combination of neurosurgical intervention and the sequential use of amphotericin B and posaconazole. *J. Korean Neurosurg. Soc.* **47**(1):74–77.
- YOUNES S., AL-SULAITI A., NASSER E., NAJJAR H., KAMAREDDINE L. (2020) *Drosophila* as a model organism in host-pathogen interaction studies. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **10**:214.
- ZHANG X., LI X., YANG H., CUI Z. (2018) Biochemical mechanism of phytoremediation process of lead and cadmium pollution with *Mucor circinelloides* and *Trichoderma asperellum*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **157**:21–28.
- ZHANG Y., NAVARRO E., CÁNOVAS-MÁRQUEZ J.T., ALMAGRO L., CHEN H. és mtsi. (2016) A new regulatory mechanism controlling carotenogenesis in the fungus *Mucor circinelloides* as a target to generate  $\beta$ -carotene over-producing strains by genetic engineering. *Microb. Cell. Fact.* **15**:99.
- ZHAO X., WEI C., LI J., XING P., LI J. és mtsi. (2017) Cell cycle-dependent control of homologous recombination. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* **49**(8):655–668.
- ZIAEE A., ZIA M., BAYAT M., HASHEMI J. (2016) Molecular identification of *Mucor* and *Lichtheimia* species in pure cultures of Zygomycetes. *Jundishapur J Microbiol.* **9**(4):e35237.
- ZILHAO R., NACLERIO G., HENRIQUES A.O., BACCIGULAPI L., C.P. MORAN C.P. JR., RICCA E. (1999) Assembly requirements and role of CotH during spore coat formation in *Bacillus subtilis*. In: *Journal of Bacteriology*, pp. **2631–2633**.
- ZININGA J.T., PURI A.K., GOVENDER A., SINGH S., PERMAUL K. (2019) Concomitant production of chitosan and lipids from a newly isolated *Mucor circinelloides* ZSKP for biodiesel production. *Bioresour. Technol.* **272**:545-551.

## 10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt köszönetet szeretnék mondani **Prof. Dr. Vágvölgyi Csabának**, a Szegedi Tudományegyetem Természettudományi és Informatikai Kar Mikrobiológiai Tanszékének vezetőjének, hogy támogatta munkámat és lehetővé tette, hogy szakdolgozatom után doktori értekezésemet is a tanszéken készíthessem el.

Különösen hálás vagyok témavezetőmnek, **Prof. Dr. Papp Tamásnak**. Köszönöm példaértékű útmutatását, és hogy az elmúlt évek során áldozatkészen irányította és segítette munkámat. Bátorítása, irányadó tanácsai nélkül ez a dolgozat nem születhetett volna meg. Köszönöm, hogy a csoportja része lehettem, és ezzel magas színvonalú kutatómunkában vehettem részt. Köszönöm a részvételi lehetőséget a sok konferencián, hogy közlelről megismerhettem szakterületünk nemzetközi tudományos közösségét és tapasztalatot szerezhettem. Szívből köszönöm megtisztelő bizalmát és támogatását.

Azon szerencsések közé tartozom, kinek útját két témavezető is maximális törődéssel egyengedte a PhD évek során. Hálával tartozom témavezetőmnek, **Dr. Nagy Gábornak**, amiért munkámat mindvégig támogatta, megosztotta velem széleskörű szaktudását. Köszönöm a rengeteg segítséget, biztatást. Köszönöm, hogy önállóságra tanított, melyet a belém fektetett bizalma tett lehetővé.

A legtöbb köszönet azonban a Szüleimet és a Családomat illeti, akik mindvégig szeretetteljesen támogattak, biztattak és egész életemben önzetlenül mellettem álltak. Köszönöm **Édesanyámnak, Szebenyi Eleonórának**, hogy a mai napig minden nap törődik velem és támaszként, példamutatásával segíti egész életem. Köszönöm **Édesapámnak, Szebenyi Szilárdnak**, szeretetét, segítségét, belém vetett rendíthetetlen bizalmát. Köszönöm **Testvéremnek, Szebenyi Hannának** kedves jellemét, őszinte szeretetét. Köszönöm, hogy biztatok bennem és mindig támogattok.

Szerencsés lehetek, hogy az elmúlt évtizedben ezen a rögös úton nem egyedül, hanem **Ürmös Zoltán** mellett haladhattam. Köszönök mindent, minden napot, minden biztatást, minden dicséretet. Köszönöm, hogy segítettél hinni magamban és Társamként jártad be velem ezt az utat.

Köszönöm továbbá barátnőmnek, **Patyi Andreának**, hogy mindig megtalálta a módját annak, hogy támogasson és mindig rendíthetetlenül mellettem állt.

Szeretném megköszönni **Nagynénéimnek**, továbbá családjaiknak és minden rokonomnak a támogatást és a biztatást.

Köszönöm munkatársaimnak és barátaimnak, **Dr. Bokor Eszternek**, **Dr. Nyilasi Ildikónak**, **Dr. Csernetics Árpádnak**, **Dr. Tóth Eszter Juditnak**, **Kartali Tündének**, **Pál Sárának**, **Endre Gábornak** a megnyugtató beszélgetéseket, valamint, hogy a legnehezebb pillanatokban is támogattak, és mindig jó hangulatot teremtettek kedvességükkel, törődésükkel. Köszönöm továbbá **Amanda Grace Vaz** és **Sandugash Ibragimova** kolleganőimnek és **Jäger Olivérnek** a csapatmunkát és a 309-es labor minden jelenlegi és volt munkatársának segítségét, továbbá a labor kellemes légkörét. Hálás köszönet továbbá valamennyi szakdolgozónak, akik hozzájárultak a projekt elvégzéséhez.

Hálásan köszönöm **Dr. Papp Csaba** tanácsait, segítségét a fluoreszcens mikroszkópozások kapcsán. Köszönettel tartozom **Petkovits Tamásnak** a scanning elektronmikroszkópos képek elkészítésében nyújtott segítségéért. Köszönöm **Dr. Sinka Ritának** és kutatócsoportjának (SZTE TTIK Genetikai Tanszék) a *Drosophila melanogaster in vivo* életképessé vizsgálatokban nyújtott segítségéért. A teljes genom szekvenálásban nyújtott segítségért köszönettel tartozom **Dr. Bodai Lászlónak** és kutatócsoportjának (SZTE TTIK Biokémiai és Molekuláris Biológiai Tanszék), a szekvenálás analíziséért pedig **Dr. Nagy Gábornak**, az SZTE TTIK Biokémiai és Molekuláris Biológiai Tanszék munkatársának. Az *in vivo* egér fertőzési modellben történő kísérleteket köszönöm **Prof. Dr. Ashraf Ibrahim** kutatónak és kutatócsoportjának (Harbor-UCLA Medical Center). Köszönöm **Dr. Patai Rolandnak** a TEM mérések során nyújtott segítségét. Külön hálával tartozom **Dr. Homa Mónikának** az áramlási citométerrel végzett kísérletekben nyújtott segítségéért. Köszönöm Édesapámnak, **Szebenyi Szilárdnak** a dolgozatban szereplő ábrák grafikai megoldásaiban nyújtott segítségét és **Testvéremnek** az idegen nyelvű szövegek lektorálását.

Házi bírálóimnak, **Dr. Németh Tibornak** és **Dr. Hatvani Lórántnak** köszönöm, hogy értékes szakmai és formai vonatkozású bírálataikkal segítették a dolgozat végleges verziójának kialakítását.

Köszönettel tartozom **Hargitai Fanninak**, **Lengyel Boglárkának**, **Csordás Anitának**, **Szabó Anikónak** és **Magyar Adriennek** az adminisztrációs és hivatalos ügyek intézéséért, **Lele Máriának** és **Deákné Kulcsár Melindának** a technikai

segítségeikért, továbbá minden munkatársamnak a munkám során nyújtott legapróbb segítségeikért is.

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

A kutatás az **LP2016-8/2016**, **GINOP-2.3.2-15-2016-00035** és az **NKFI K 131796** számú projektek, továbbá az „AZ INNOVÁCIÓS ÉS TECHNOLÓGIAI MINISZTERIUM ÚNKP-20-4 - KÓDSZÁMÚ ÚJ NEMZETI KIVÁLÓSÁG PROGRAMJÁNAK A NEMZETI KUTATÁSI, FEJLESZTÉSI ÉS INNOVÁCIÓS ALAPBÓL FINANSZÍROZOTT SZAKMAI TÁMOGATÁSÁVAL KÉSZÜLT.”



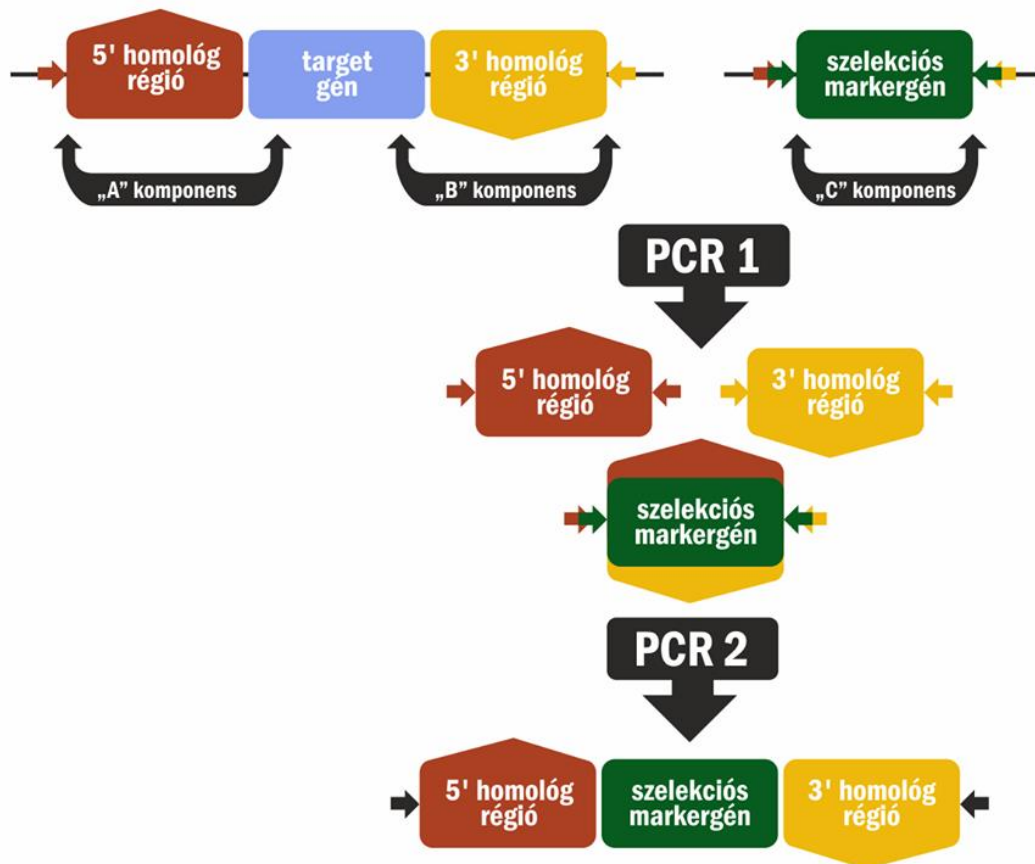
## 11. MELLÉKLETEK

### 1. számú melléklet. A kísérletek során felhasznált indítószekvenciák listája.

A dolgozatban szereplő géndiszruptiók megvalósításához használt indítószekvenciák		
Primer	5'-3'	Termék
<i>A carB</i> gén elrontásához használt indítószekvenciák		
<i>MccarB/1</i>	CTGTGCAGGTGCCAGCGCATCACC	Promóter és kódoló régió (protospacer-től upstream irányban)
<i>MccarB/2</i>	GGTGGTCTTGAATGCGCTCGTCCAG	
<i>MccarB/3</i>	TGGAGCTGCTGCGATGCGACAAC	<i>A carB</i> gént kódoló szekvencia (protospacer-től downstream irányban)
<i>MccarB/4</i>	GTCTTGCTCTTCATATGACCAATAG	
<i>MccarB/5</i>	CCGATCTGGACGAGCGCATTCAAGACCACCTGCC TCAGCATTGGTACTTG	A <i>pyrG</i> saját promóterével és terminátor szekvenciájával
<i>MccarB/6</i>	GTAGTTGTTGTCGCATCGCAGCAGCTCCAGTACAC TGGCCATGCTATCG	
<i>MccarB/7</i>	CTTGTGGTAGACAATGTAGTTGTC	Fúziós PCR termék
<i>MccarB/8</i>	CGTCAAAGCTCTCCTGATAAGCCTC	
<i>A cotH1</i> gén elrontásához használt indítószekvenciák		
<i>McCotH1/1</i>	ACGACGATCCCATAAGAACTC	Promóter és kódoló régió (protospacer-től upstream irányban)
<i>McCotH1/2</i>	CGACACCAGTAAAGAGATTGGA	
<i>McCotH1/3</i>	CATGTACTCTACTGTTGGTGTAC	<i>A cotH1</i> gént kódoló szekvencia (protospacer-től downstream irányban)
<i>McCotH1/4</i>	ATGTCTTCTTGAGCCTACAG	
<i>McCotH1/5</i>	CAGATGAGCTCCAATCTCTTTACTGGTGTCTCGTCC TCAGCATTGGTACTTG	A <i>pyrG</i> saját promóterével és terminátor szekvenciájával
<i>McCotH1/6</i>	GCTACCAACAGTAGAGTACATGGTACACTGGCCA TGCTATCGTGATAACTG	
<i>McCotH1/7</i>	CTGATCATGAGCCAGGTACAG	Fúziós PCR termék
<i>McCotH1/8</i>	GTTTAGATCTCCGTTGTGGCAG	
<i>A cotH2</i> gén elrontásához használt indítószekvenciák		
<i>McCotH2/1</i>	GAATCTTGGCGTCCATTTTCATCC	Promóter és kódoló régió (protospacer-től upstream irányban)
<i>McCotH2/2</i>	CTCTTCTTGAGTGCAACTGTCTG	
<i>McCotH2/3</i>	TGGATGCCAATGGCAATGTC	<i>A cotH2</i> gént kódoló szekvencia (protospacer-től downstream irányban)
<i>McCotH2/4</i>	CAGAGGCAAGAAGGGATCTG	
<i>McCotH2/5</i>	CTGTAGGCGGTCAGACAGTTGCACTCAAGAAGAG	A <i>pyrG</i> saját promóterével és terminátor szekvenciájával
<i>McCotH2/6</i>	CACCATTGACGACATTGCCATTGGCATCCAGTAC	
<i>McCotH2/7</i>	CAAACTACAGTTGTCTAGAAGCC	Fúziós PCR termék
<i>McCotH2/8</i>	ATGAGAGCCTTTAGATAATGTGCC	
<i>A cotH3</i> gén elrontásához használt indítószekvenciák		
<i>McCotH3/1</i>	TCCCTCAGAGCAATATAGCA	Promóter és kódoló régió (protospacer-től upstream irányban)
<i>McCotH3/2</i>	GCCAACAATGACACCAACAG	
<i>McCotH3/3</i>	ATTTACACGACAAACATCTCC	<i>A cotH3</i> gént kódoló szekvencia (protospacer-től downstream irányban)
<i>McCotH3/4</i>	CTCTCATACATTCCAACAGCA	
<i>McCotH3/5</i>	TCATTTCAGGACAGTCTGTTGGTGTCAATTGTTGGC TGCCTCAGCATTGGTACTTG	A <i>pyrG</i> saját promóterével és terminátor szekvenciájával
<i>McCotH3/6</i>	TTCAAACGATACGGGAGATGTTTGTCTGTGAAA TGTACACTGGCCATGCTATCG	
<i>McCotH3/7</i>	AGTTACTAACGCTGTGCT	Fúziós PCR termék
<i>McCotH3/8</i>	GATTTGAGGACGGGATAGGG	
<i>A cotH4</i> gén elrontásához használt indítószekvenciák		

<i>McCotH4/1</i>	AAGGCAATGTGTTGTGATGG	Promóter és kódoló régió (protospacer-től upstream) <i>A cotH4</i> gént kódoló szekvencia (protospacer-től)  A <i>pyrG</i> saját promóterével és terminátor szekvenciájával
<i>McCotH4/2</i>	AGAGCCAGTGTAGTAAGGGA	
<i>McCotH4/3</i>	TCT GTC AAG GAA GCT GTT TCT G	
<i>McCotH4/4</i>	ACAAACAAC ACTACCATGTAAC	
<i>McCotH4/5</i>	CTGCTGACGCTGACGTCCCTTACTACACTGGCTCT TGTTGCCTCAGCATTGGTATTG	
<i>McCotH4/6</i>	AGCTCTTCCTTGGCAGAAACAGCTTCCTTGACAGA GTACACTGGCCATGCTATCG	
<i>McCotH4/7</i>	TGAAACATGCCAGCAATCAC	
<i>McCotH4/8</i>	CAAGAGCAAGGGATCATAGG	
A <i>cotH5</i> gén elrontásához használt indítószekvenciák		
<i>McCotH5/1</i>	GATAGCCTCGGTTGAATGTG	Promóter és kódoló régió (protospacer-től upstream) <i>A cotH5</i> gént kódoló szekvencia (protospacer-től)  A <i>pyrG</i> saját promóterével és terminátor szekvenciájával
<i>McCotH5/2</i>	AGATGCGATCAATGGAAATGG	
<i>McCotH5/3</i>	CAACAACATCCCATTTCGATACTG	
<i>McCotH5/4</i>	TAGATTTGCGCAAACAGCAATAGG	
<i>McCotH5/5</i>	ACAATTACGAAGCGCCATTTCCATTGATCGCATCT TGCCCTCAGCATTGGTACTT	
<i>McCotH5/6</i>	TGCCATTGACGGCAGTATCGAATGGGATGTTGTT GGTACACTGGCCATGCTATCG	
<i>McCotH5/7</i>	CATCACATATTGGACAGCGT	
<i>McCotH5/8</i>	ATCAACTTCTTCAACTTCCTCC	
A <i>cotH6</i> gén elrontásához használt indítószekvenciák		
<i>McCotH6/1</i>	CTTACTCATCCTTGGCGAAATCC	Promóter és kódoló régió (protospacer-től upstream) <i>A cotH6</i> gént kódoló szekvencia (protospacer-től)  A <i>pyrG</i> saját promóterével és terminátor szekvenciájával
<i>McCotH6/2</i>	GTACGAGTAGGTGGACGCAG	
<i>McCotH6/3</i>	TGAAGGCTATATCCAAGATACCGT	
<i>McCotH6/4</i>	ACCAACCCTCTGTTCTATCGT	
<i>McCotH6/5</i>	GTCGATGTTGGCTCTGCGTCCACCTACTCGTACTG CCTCAGCATTGGTACTTG	
<i>McCotH6/6</i>	GTTGCTTGACGGTATCTTGGATATAGCCT TCAGTACACTGGCCATGCTATCG	
<i>McCotH6/7</i>	GCATCACATTCAAACAACGG	
<i>McCotH6/8</i>	CTCTGTAAACGAAATGCTGG	
A dolgozatban szereplő gének diszruptiójának ellenőrzésére használt indítószekvenciák		
<i>MccarRPfw</i>	ATGCTGCTCACCTACATGGAAG	<i>carRP</i>
<i>MccarRPrev2</i>	TTAAATGGTATTTAGATTTCTCA	
<i>MccarB1</i>	ATGTCCAAGAAACACATTGTCATTA	<i>carB</i>
<i>MccarB2</i>	TTAAATGACATTAGAGTTATGAACG	
<i>MccarBupfw</i>	TAGCCAATGACAGCGGTGACGC	A protospacer-től upstream régió
<i>MccarBuprev</i>	GTTGTGCGCATCGCAGCAGCTCCA	
<i>MccarBdwfw</i>	TGGAGCTGCTGCGATGCGACAAC	A protospacer-től downstream régió
<i>MccarBdwrev</i>	CGTCAAAGCTCTCCTGATAAGCCTC	
<i>MccotH1qPCR/1</i>	AAGTCTCCTTACTATGAACCC	A <i>cotH1</i> gén egy szakasza
<i>MccotH1qPCR/2</i>	GTTCTTCAACATTTAGTCCA	
<i>MccotH2qPCR/1</i>	GTCAAGCGTTTCTTCAAGCCT	A <i>cotH2</i> gén egy szakasza
<i>MccotH2qPCR/2</i>	TACCGTTACCGAGCAAACCA	
<i>MccotH3qPCR/1</i>	AATGTCTGTAGTAGAGCCTATTGA G	A <i>cotH3</i> gén egy szakasza
<i>MccotH3qPCR/2</i>	GGATGTCTGTCTCGTAAAGTT GTC	
<i>MccotH4qPCR/1</i>	TCAACTACGACACTCTCAAGG	A <i>cotH4</i> gén egy szakasza
<i>MccotH4qPCR/2</i>	GTCCAGCCAAAGATGTACC	
<i>MccotH5qPCR/1</i>	AATTTCTCAAGGACGCACCA	A <i>cotH5</i> gén egy szakasza
<i>MccotH5qPCR/2</i>	CTCCACTGCTGATGTAACCA	
qRT-PCR során alkalmazott referenciagénter tervezett indítószekvenciák		
<i>McAktin1</i>	CAC TCC TTC ACT ACC ACC GCT GA	Az aktin ( <i>ACT</i> ) gén egy szakasza
<i>McAktin2</i>	GAG AGC AGA GGA TTG AGC AGC AG	

2. számú melléklet. A templát DNS elkészítésének sematikus ábrája.



Bordó téglalap: az elrontani kívánt géntől 5' irányban található szekvencia, mely a célgén promóterét és az 5'UTR régiót foglalja magába; a diszrupciós kazetta "A" komponense; amplifikációja "upstr frw" és "upstr rev" indítószekvenciapárokkal történt (bordó nyilak). Kék téglalap (target gén): az elrontani kívánt gén szekvenciája. Sárga téglalap: az elrontani kívánt géntől 3' irányban található szekvencia, mely a célgén terminális régióját és a 3'UTR régiót foglalja magába; a diszrupciós kazetta "B" komponense, amelyet a "downst frw" és "downst rev" indítószekvencia párok használatával készítettünk el (sárga nyilak). Zöld téglalap: szelekciót biztosító vitamin auxotrófia marker gén szekvenciája, a diszrupciós kazetta "C" komponense; elkészítése olyan specifikus indítószekvenciákkal történt, amelyek egyik része az elrontani kívánt gén 5' irányú (bordó-zöld nyíl bordó része) vagy 3' irányú (zöld-sárga nyíl sárga része) szekvenciájával, másik része pedig a szelekciós markergén szekvenciájával homológ (nyíl zöld része). A 3 komponens összeépítése a "nested upstr frw" és "nested upstr rev" (fekete nyíl) indítószekvenciákkal történt. Az ábrán jelölt PCR 1 téglalap a gén "A", "B" és "C" komponensének felszaporítását jelöli, míg a PCR 2 téglalap a végső diszrupciós kazetta létrehozására utal.

**3. számú melléklet.** A CotH-domén jelenléte *Mucor circinelloides* CotH fehérjékben. A *Rhizopus delemar* „CotH-motívumként” leírt szekvencia pozícióját sárgával jelöltük.

```

cotH3  YLP PSEKLDVSHK-----NQTLSYKHL
cotH4  NDA QSWVWSLPEG-----TFYADRNWF
cotH5  NLP ASYKIKFNKK-----DLLFG-YRKI
cotH6  NPA QSWRWTLSPG-----DYINERNNF
cotH7  QFT FAYNIKLDKKKD---DDTLSGYQKL
cotH8  WVS LSYNVKIKKKA----DDDLFGYKKL
cotH9  SLP LSYKVKLSKK-----GGDLYHYRRF
cotH10 FLD LAYKIKLPK-----GSDLNYRRF
cotH11 WMP LSYNIKLDKK-----DRLDYRRV
cotH12 EFA QSYKVKLNEFTKTGPKELIYGRTTI
cotH13 NNA QSWNWALNGG-----DMLGNRNF
cotH14 SYD LSYKIKLQK-----DDDLNYRRI
cotH15 WLP LSYNLKLDKH-----DRLKYRRV
cotH16 SQK LSYKFKIPK-----KQDLDFRRF
cotH17 VIP LSYTLKMKTKG----SDSLYGYKKL

cotH3  LL SLAS PSYI ERIASDIARAAGLAVPGESFA V FV DQPY L MGLMEDIYKTOFLRNE
cotH4  KI HMEE PTOI EKLYADIARKMGTYANEANLV FFI KEGM TENMLDDVIMYSYINA
cotH5  KL SLTT PSYI ERIAFDLAESFGLPTTRYSYA LFI NKPY LFGIEEDFSNPWVANE
cotH6  KI NMEE PTOM EKLYADCLRAMGTIANQANMV YFI GQGF TENMLDDVKDPSYIRS
cotH7  KL TTVS PSYM EBITTEMLYAAQPATKASYV LFI NRAI LFTLMEKYDKDWLANE
cotH8  KL AMGY ASYI ERVAFATLKS VGPCTEYSYI VFF NKPA FYGLIETFQDPWLANE
cotH9  KL SMAI ISYM ERIDAYATAESIGLPTGKYSYA VFF NQPL LFGFLDNFKNPWPRNV
cotH10 KL AMGT ASYM EKIVSEIADSIGLPTTKISYV VFI DQAV LEAFAENFKSPWVRNE
cotH11 KL ALAT PSYI EQLAYDVIKSTGLASSEESYV VLL DKEL LFGIIDTFKDPWLANV
cotH12 KL AHET PFEV EKIMLDCLAASGGATLQGSFV L FV NKPM LYLMIDDSTTNFINAA
cotH13 KL HMEE PTOI ERIDYSVVLHALGTYANEANMV L FV GQFF TENMLDDITEFSYINA
cotH14 KL SMST ASYM ERIDAYDIKSIGMPTSEYSYA VYF DQAI LFGIETFQDPWPKNE
cotH15 KL ALDT PSYI EQLAYDIKSVGLASAEESYV VFM DQPL LFGIETFQDPWLANT
cotH16 KL SMAT PSYM DQISSDIAESIGIPTQYSYV VFI DKAI LFGLAEMFKNPWIRNV
cotH17 KL ALGM PSYM ECVSYSTLKA VGPASGESYI VFI QKPA L MGLIETFQDPWTANV

cotH3  FGNGS-DAYEN I LMSGDYN-----ATLDYLGED-----
cotH4  MFYDGKAPEQM PLYDGGSG-----
cotH5  FNNGVKEGFNQ I L MNGAIR-----SNLQYLGES-----
cotH6  VFYDGNPPKQM PLEDGATG-----
cotH7  FNAGGSK-YPH I L MEGEGG-----SKDS-----
cotH8  FADGDKK-YKS YLYQGQAM-----SMTQ--TQF-----
cotH9  FNGGKKKGFQD ALMKASPNYGVNPSLLTDAIGNATDD-----
cotH10 FNNGKKN-NNQ ALFVCTAN-----AKLDNVTIT-----
cotH11 FDNNGSK-YNN HLYQAVFS-----TANS--SAVN-----
cotH12 LRGGNQKFQYT PTKGNAMN-----
cotH13 LFHGGKAPAKQ LLYDGMSC-----
cotH14 FNNG-KK-FNQ ALFVADVSGNQGGSSSSGMPGAPTQNTESGASGQQQNTMAGSPP
cotH15 FANGSSS-YKN YLYQGVFM-----TPQS--AAQG-----
cotH16 FANGDKK-FKQ ALFVADV SAGREGGP--QPGGPGGP---SGPGG-----
cotH17 FGGGDAN-YKS YLYQGQIA-----APNQ--TVP-----

cotH3  -----QTKYNQSTNDNEVEPNNYYSIQQTADIRQSRTSFRGLIAFT
cotH4  -----ADFNPATG---YDNFVNPVESPLD-----QDAIAPFA
cotH5  -----EKPYLEVKVKR---FGDTAYSIKAKP--TQGKADMKLIALT
cotH6  -----AGFQYIEDPYD-YGAFKPTVGSPEG-----SEAIYPLA
cotH7  -----VRADLSYKGNP SAYSAYNASAYSVSEKSLGVES--LDDLTTFI
cotH8  -----LVSDLSYGDNTTLYSLGQYKIKAGTKGDEKPKDFKELRDFT
cotH9  SSQPD LNNVKLNSTIQ-PSKSDLSYLGDNVTLYT-QQYSVSED PSSGSAN--FTRIMDLC
cotH10 TTAPTADNLT-NTTAT-TIKSDLSYLGDNATLYS-LPYPAKEDPATGTAN--YTRIMDFT
cotH11 -----HTSDLSY-DNITAYQDQYKIKQEAASKGDKV--NFKPLMEFT
cotH12 -----PSFEGNLVYKDDLQESYNDTIYKLEDEGNMCKDMNKTNEKTPLI
cotH13 -----ADFLYHPGNLDGYASWAPNAANSQG-----YEALDPLC
cotH14 SGGMGGGGMGGGSNMLQSSSDLSYLGDNVTLYT-SHYPVKEDPRNGSAN--YTRIVELT
cotH15 -----HISDLSYM-SNLTAYGDGQYKIKQEAASKGDKV--NWEPLQEF
cotH16 PGGPGGGGPGHG---GPRPDL SYLGDNVTVYS- IKYPAKENPSK GKAN--HTRIMDLT
cotH17 -----VFSDSL SYGENTTLYSLGQYKIKAGTDRKDETADDFKDLQEF

cotH3  QFLINTSDTVDNV-----EPVTAWNRYLETSSFLKSAALEVLLGNTNGMIAAAR YFLY
cotH4  EAIAAVDFSKDAE-----VQAI AQYFDYDQFLRFMVEFLTGSWDAMWQEQT DGAY
cotH5  KFLKDAPSTEPN-----AVAIWNQHLDTDSVLRSLALEVFLGDTDGMISSGD YYIY
cotH6  KAFHGLNVKDDDD-----IKGFEMFDVDQFLRFMVEYLGGSWDGMWAMQT DGAY
cotH7  KFIHQREFQKTANAEAISATVPEWEKQLDVENFLVSMAFEFLOGGWDGMLQNSN YFLY
cotH8  KFINETT NATS-----VKEWNKKTLDGFTRAMAIENLLGFSDAMMTLAD FYVY
cotH9  KFISEQSN TSDS-----AAVDLWHEKIDVTSFLRGI AFEIVTSQSDAMLANGN YMLY
cotH10 KFLSEQ-NTTVDD-----SVISLWEEKIDVTSFLRGLA FEVITSSMDGMLGVHN YILY

```



```

cotH11 KFIATAPTNTSD-----AVAVWKKELDISFLRSMALVLLGFSDDGNTMAD YYLY
cotH12 EFIKELSTIDPTQMVD--EATKGPLEKLLNPHNLMIHMALNFLSGSWDGGFWHOAS YYLT
cotH13 KAFNETNVADNAA-----LATFENQFDTDHFMRFMVMEYLAGHWDCYVWMAQT DGAY
cotH14 KFISEQSNVTSND-----SAASLWEQYMDVTSFLRGLALEIVISDSDGFTMGN YILY
cotH15 EFISTAPTNQSD-----AVATWRKHLDTDSFLRSMALVLLGYSDGTFAMAD YVYV
cotH16 KFISEQPTSDGSD-----VSIPLWHEKADVSSFLRGLAMEIVTSNADGMLTMGN YILY
cotH17 KYINSTTSNTT-----VDEWEKHLDTVEVFRAMAVENLLGFSDAVMTLLN FYVY

cotH3 INPNGS-HVTEIPSTMENTM NTAAFNLSDLWGSNVSTYPGFNSQNRPTLDEFLQVPDFE
cotH4 ID-TNENKLYMLAQDFDATE VNLV--FDKDFVNKSFQDWWKQFPNAFLINKLLSNPSVN
cotH5 EDPAHQGRFVMIYDLDLTD SASRHYVSTLKGDYTKFLGYN-EKRPTLHQILKVPEFK
cotH6 KDYANNNTWYMLGQDYDGT VNLV--VDP--LNWYQKYIANYTDAVLINGLLQNQLA
cotH7 KSP-EKNRFVWISWDYDYVM -SGPVNMKSIVQGDYTTYKGF--TRPTIALLNVEPFK
cotH8 SDP-DTKRMVTPADLDTSI -SIFLKSXYMLDGNYSNHPGFH--LRPTLKHFFANQEF
cotH9 DDL-ENERLVMSNQDFDISM -TAFLSAEAMHGGNYSRFPGF--ERPTLRSLLAVPEFK
cotH10 DDR-ENERLVEAQDFDLTL -TSGGQMPNLFAGDYTTFPGLN--STPLATRMLAVPKFR
cotH11 ENP-DANNFYIIPSDMLTM -STIFKLDMMWGSNYSTFPGMG--SRPTLMMKILQVPEFK
cotH12 KET-SSGQWTFEISYDFDETF LGAPRYMSTTPYENFTRPDSQR---PLIDAVIKSPYYK
cotH13 KD-GETNKWYMLGQDYDATE VNLASPEGMQFTSVSYKDFPARYPGGIMINRLLNADKK
cotH14 DDL-DNERILFSGQDFDLTM -TSINNATLMNSGNYSDFPNFS--TRPTLSRLFLVPEFK
cotH15 QNL-EEDNYFYIIPSDMLTF -SSMFSLNEMWGSNYSTFPGLK--TRPTLMMKILQVQFN
cotH16 DDL-EHKRILFSGQDFDLTM -STIFNATLMNGGNYTEFPGF--TRPLAPALLAVPAFK
cotH17 NDPKNPGRYIYIPADLDTTI -TALYELDYLLSGDYSKHPGF--IRPTLSKLFVSNPVM

cotH3 QDFKDIISQISQN-LTNPEIISKRIDALAGLI
cotH4 NTFQNYLKTVEE-IFNYDTLKAYVEARHNEI
cotH5 SKFESIIRNVIQQRDNQDFLYQRIDALSVMI
cotH6 DTFEGYLQDTPVKQ-LFNNDTLGRHIMAYREFI
cotH7 TMFEKNIKI IADE-IYNPTKADPVIDSVANLI
cotH8 NNYEHLILLNLSQT-LVNPVTMNPFFIDSVDVMI
cotH9 REIHDLVYNFTRD-LVNPDIMNPRIDDLTYTFI
cotH10 SEFDNLIIRNYTTG-LVNPVVMNPRIDELMTEFI
cotH11 QQYEQLLVNISQGL-TNPNVVMNKRINDLVDMI
cotH12 AEFKVVQTLVQR-FFKASAINPRLEAWKAMLI
cotH13 ATFEKYLTEVTRV-LFNNTLTNRALALHNEFI
cotH14 QEFENLIVNMTKT-LVNPDIILTSRINQLYEMLI
cotH15 KQYNELIINLTKT-LINPNKTNDRINNLVGMFI
cotH16 QEFEKLIIFNFTKY-LVNPEVLNPRVEQLYKMLI
cotH17 DHYQHVLNLNTQQ-LINPATMYPFIDSVVKMLI

```

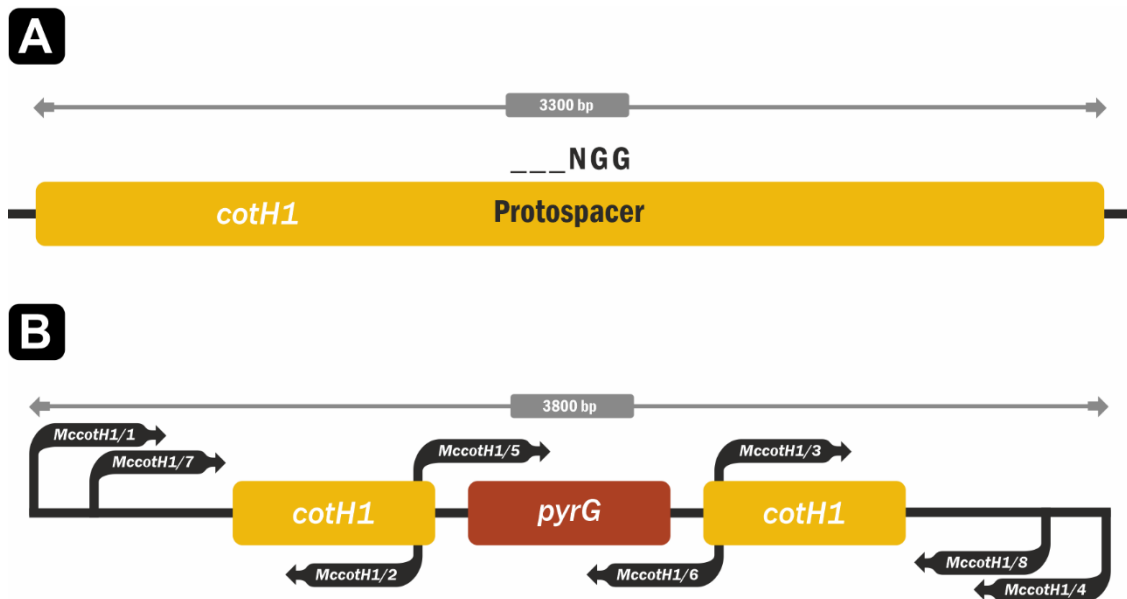
**4. számú melléklet.** A CotH-szerű fehérjékben feltételezeten jelen lévő alegységek és motívumok a Motif Scan (MyHits) program (Pagni és mtsi. 2004) találatai alapján.

Dolgozatban használt elnevezés	Prediktált domén <sup>1</sup>	Valószínűség <sup>2</sup>	Pozíció (AS)
<i>cotH1</i>	-	-	-
<i>cotH2</i>	Big-1 (Pfam: PF02369)	3e+02	1-4
<i>cotH3</i>	SBDS fehérje C-terminális (Pfam: PF09377)	0,0018	457-474
<i>cotH4</i>	ATP/GTP-kötő motívum (Prosité ID: PDOC00017)	-	567-574
	alanin-gazdag régió (Prosité ID: PDOC50099)	0,00025	23-590
	Big-1 (Pfam: PF02369)	1,7e+03	1-7
	prenil transzferáz alpha alegység ismétlődések (Pfam: PF01239)	8,7e+02	402-439
	P63C (Pfam: PF10546)	0,001	393-411
	VirB (Pfam: (PF03135)	0,0023	1-14
<i>cotH5</i>	ATP/GTP-kötő motívum (Prosité ID: PDOC00017)	-	512-519
<i>cotH6</i>	Sejtfal-kötő ismétlődés (PF01473)	45	366-388
<i>cotH7</i>	Nukleáris Lokalizációs Szignál (NLS) (Prosité ID: PS50079)	2,1e+04	203-220
<i>cotH8</i>	Nukleáris Lokalizációs Szignál (NLS) (Prosité ID: PS50079)	2,1e+04	216-233
	Big-1 (Pfam: PF02369)	9,8e+02	1-4
<i>cotH9</i>	Nukleáris Lokalizációs Szignál (NLS) (Prosité ID: PS50079)	2,1e+04	213-227
<i>cotH10</i>	treonin-gazdag régió (Prosité ID: PDOC50099)	0,097	302-320
<i>cotH11</i>	-	-	-
<i>cotH12</i>	nebulin ismétlődések (Pfam: PF00880)	1,3e+03	305-314
			452-461
<i>cotH13</i>	sejtfal-kötő ismétlődés (PF01473)	43	369-389
<i>cotH14</i>	glicin-gazdag régió (Prosité ID: PDOC50099)	0,0074	274-325
	szérin-gazdag régió (Prosité ID: PDOC50099)	1,3	527-542
	oktapeptid ismétlődés (Pfam: PF03373)	3,2	252-259
<i>cotH15</i>	-	-	-
<i>cotH16</i>	leucin cipzár (Prosité ID: PDOC00029)	-	398-419
	Forkhead N-terminalis régió (Pfam: PF08430)	0,0013	262-275
<i>cotH17</i>	glicin-gazdag régió (Prosité ID: PDOC50099)	2,8e-06	300-332
	extenzin fehérje-szerű régió (Pfam: PF04554)	1,5	498-507

<sup>1</sup> A CotH-doménon kívül prediktált domének.

<sup>2</sup> Valószínűség alatt a matematikai statisztikában használatos várható értéket értjük. Változóként az angol eredetiből származtatva az E betűvel jelöljük (Expectation).

**5. számú melléklet.** A *cotH1* gén elrontására tervezett diszrupciós kazetta sematikus ábrája.



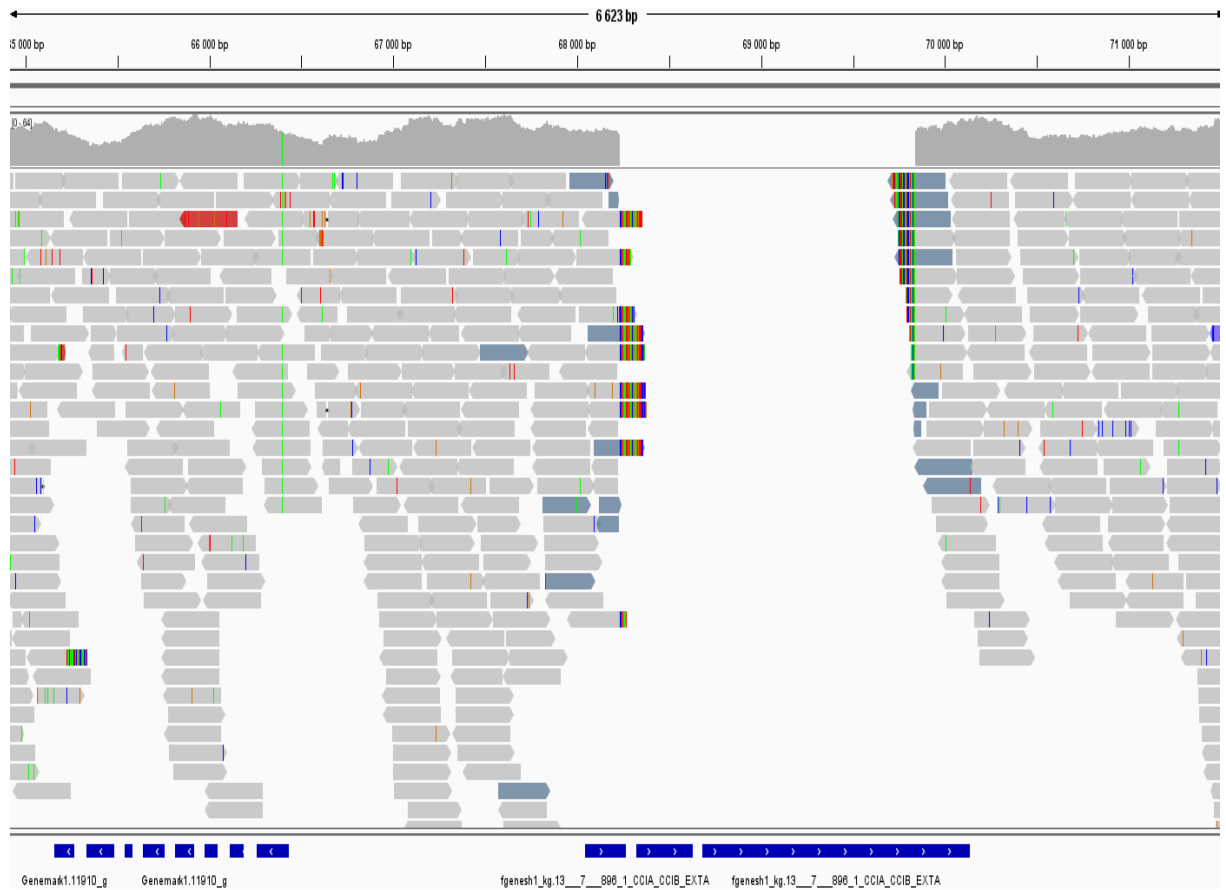
**A)** A *cotH1* gén eredeti, genomi elrendeződése. **B)** A HDR hibajavító mechanizmus során donor DNS-ként szolgáló diszrupciós kazetta felépítése. Felső sárga téglalap: a deletálni kívánt gén szekvenciája és a vezető RNS pozíciója. Bal oldali sárga téglalap (5' UTR régió): a deletálni kívánt géntől 5' irányban található szekvencia; amplifikációja "*MccotH1/1*" és "*MccotH1/2*" [1. számú melléklet] indítószekvenciapárokkal történt (fekete nyilak). Jobb oldali sárga téglalap (3' UTR régió): a deletálni kívánt géntől 3' irányban található szekvencia, a diszrupciós kazetta; amelyet a "*MccotH1/3*" és "*MccotH1/4*" [1. számú melléklet] indítószekvencia párok használatával készítettünk el (fekete nyilak). Bordó téglalap: szelektiót biztosító vitamin auxotrófia marker gén szekvenciája; elkészítése az "*MccotH1/5*" és "*MccotH1/6*" indítószekvenciákkal történt. A 3 komponens (sárga téglalap, bordó téglalap és zöld téglalap) összeépítése az "*MccotH1/7*" és "*MccotH1/8*" (fekete nyilak) [1. számú melléklet] indítószekvenciákkal történt.

**6. számú melléklet.**

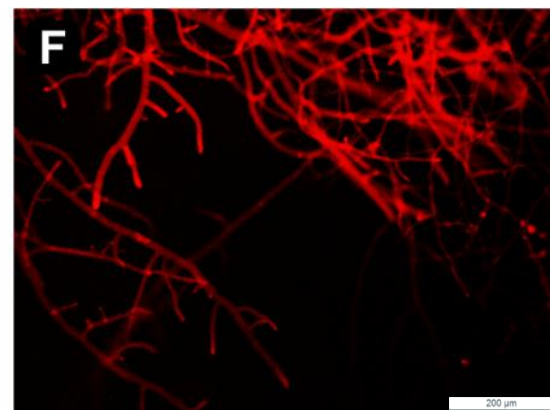
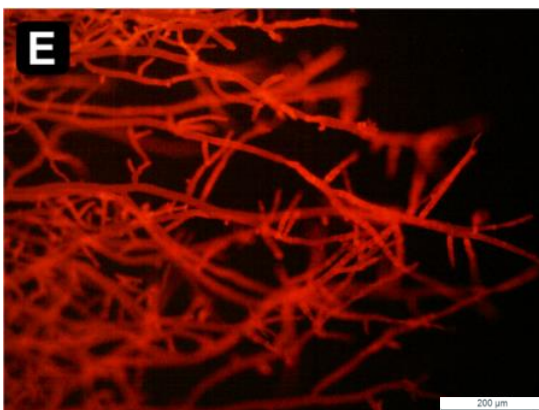
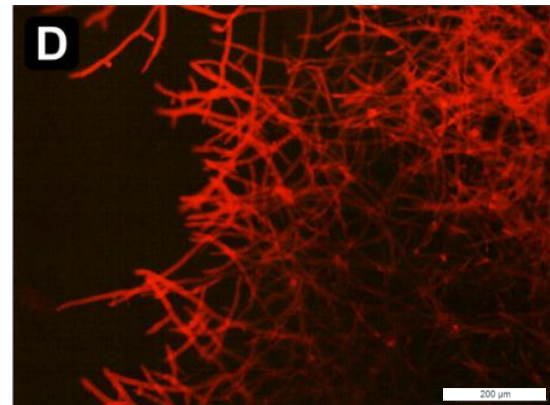
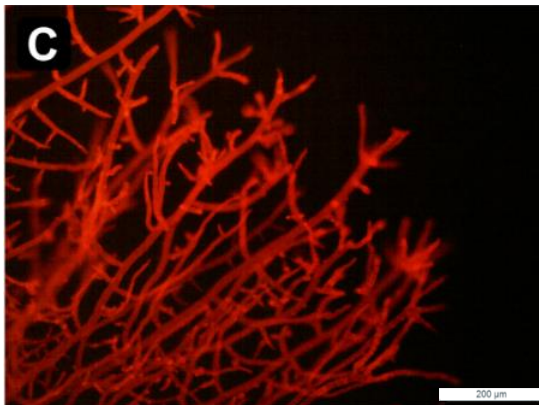
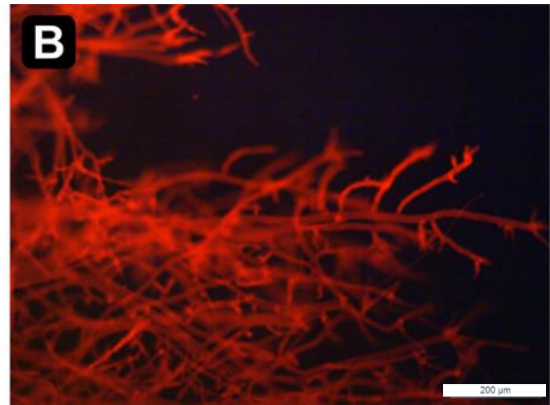
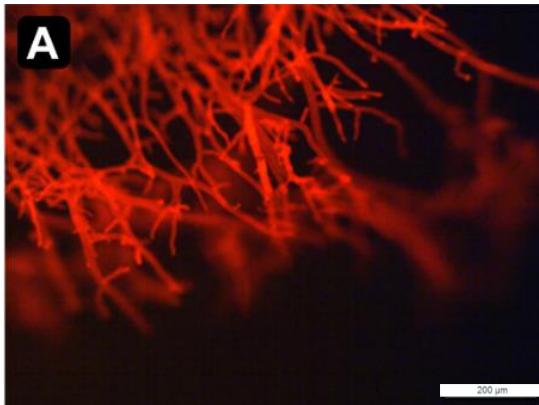
A) Az MS12- $\Delta$ *cotH3*+*pyrG* mutáns teljes genom szekvenálással való analízise. A *Mucor circinelloides* genomjának 4195375-4197670 bp-ok közé eső szakaszára nézve (*cotH3*), a referenciagenommal átfedő mutáns genomi régió nem volt detektálható.



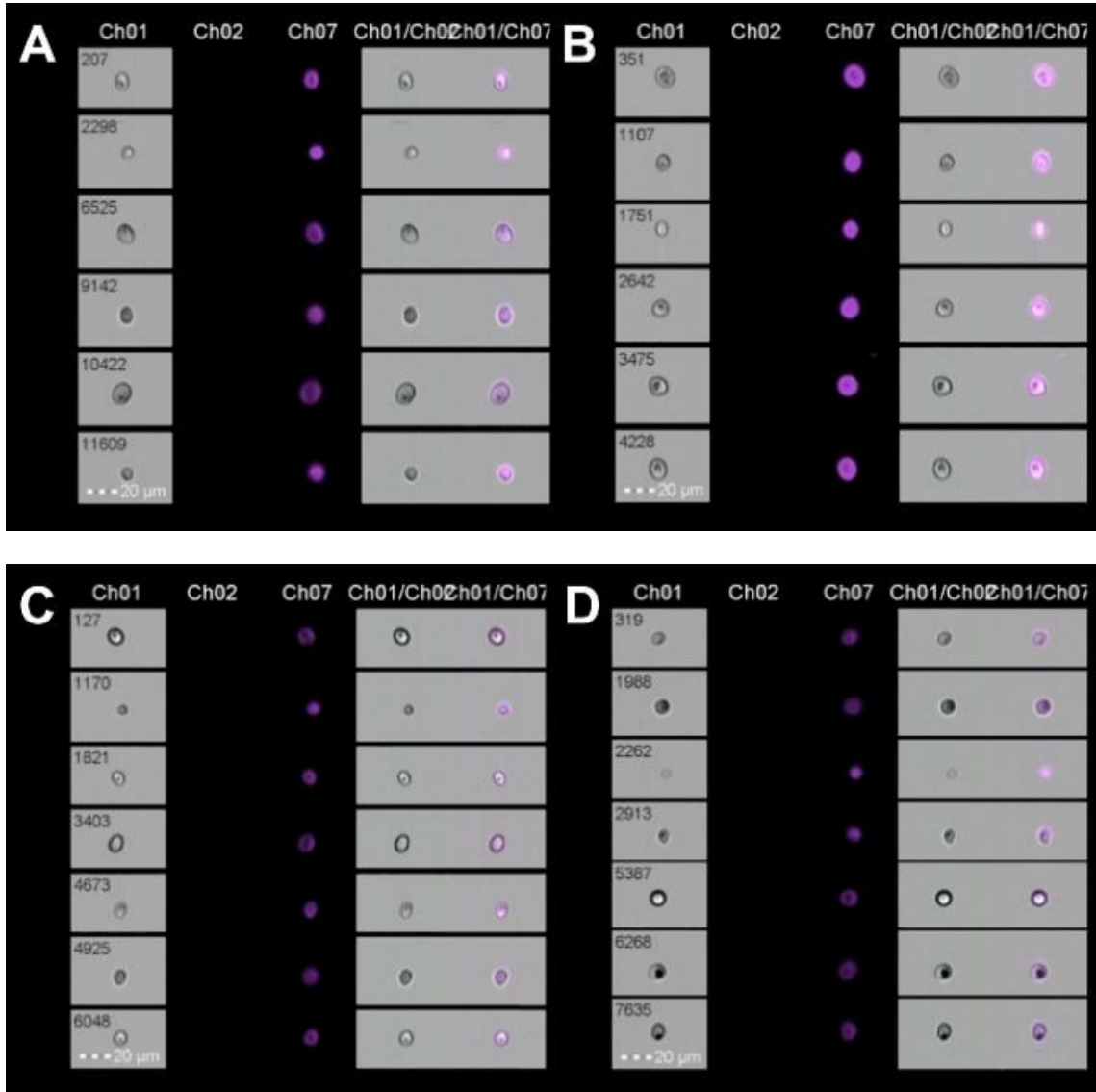
**B)** Az MS12-*ΔcotH4+pyrG* mutáns teljes genom szekvenálással való analízise. A *Mucor circinelloides* genomjának 68044-70136 bp-ok közé eső szakaszára nézve (*cotH4*), a referenciagenommal átfedő mutáns genomi régió jelenléte nem volt kimutatható.



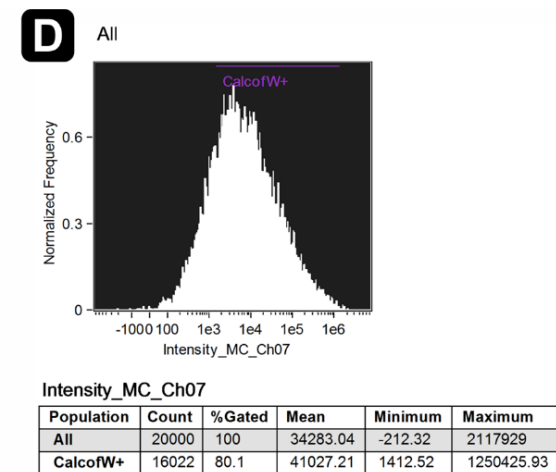
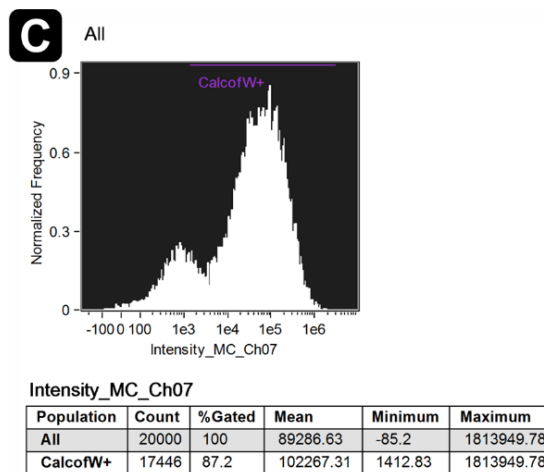
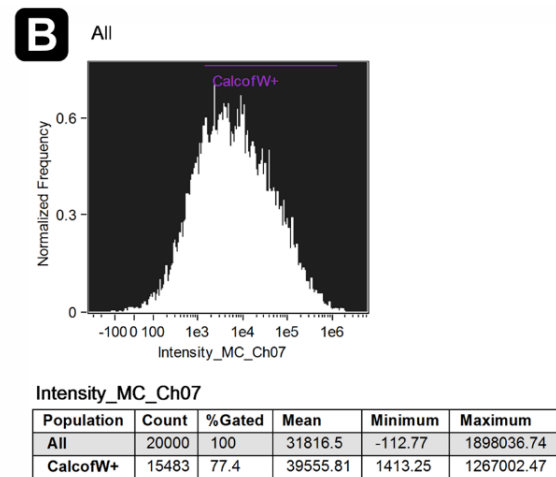
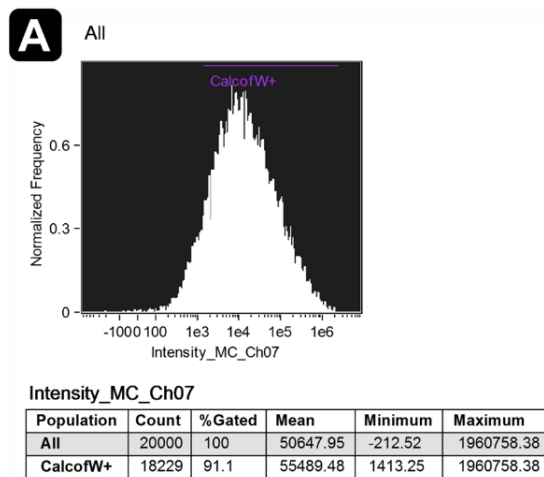
**7. számú melléklet.** Fiatal hifák vizsgálata KF festést követően fluoreszcens mikroszkópiát alkalmazva. Az MS12- $\Delta$ *cotH1*+*pyrG* (A); MS12- $\Delta$ *cotH2*+*pyrG* (B); MS12- $\Delta$ *cotH3*+*pyrG* (C); MS12- $\Delta$ *cotH4*+*pyrG* (D); MS12- $\Delta$ *cotH5*+*pyrG* (E) és az MS12+*pyrG* (F) törzsek fiatal hifáinak fluoreszcens mikroszlópos képe KV festést követően. A méretskála 200  $\mu$ m-nek felel meg.



**8. számú melléklet.** Reprezentatív felvételek KF festéssel jelölt *Mucor* spórákról. Ch01: fénymikroszkópos képek; Ch07: a KF detektálására használt csatorna; Ch01/Ch07 (merge): a Ch01 és a Ch07 fúziója, ahol a spórákról készült pillanatfelvételek szemléltetik a mért intenzitásbeli különbségeket. **A)** MS12-*cotH3*+*pyrG* KF festett spórái; **B)** MS12-*cotH4*+*pyrG* törzs KF-rel festett spórái; **C)** MS12-*cotH5*+*pyrG* törzs KF-rel festett spórái; **D)** MS12+*pyrG* törzs KF-rel festett spórái.

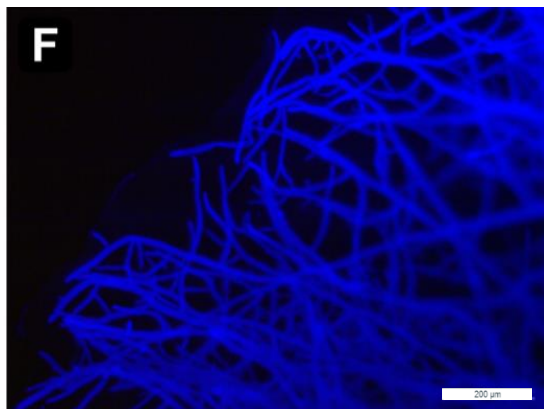
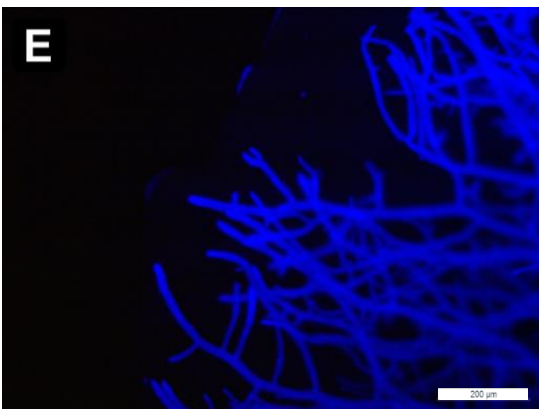
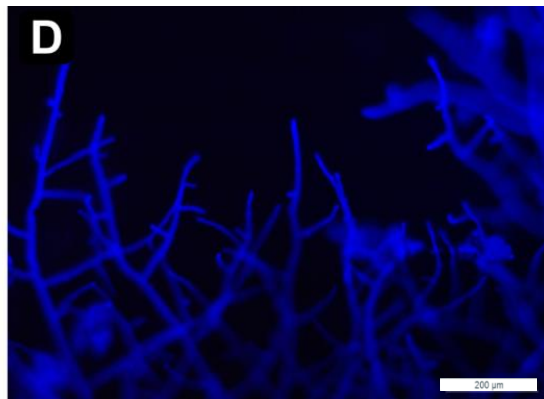
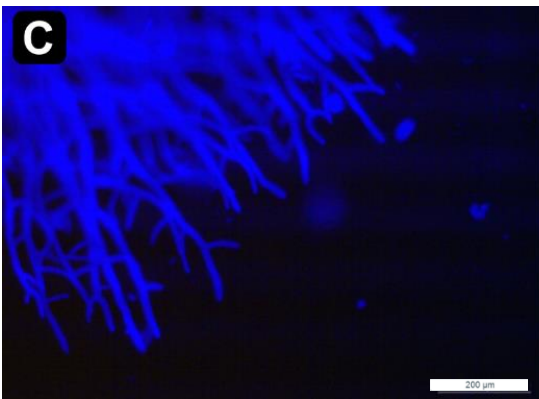
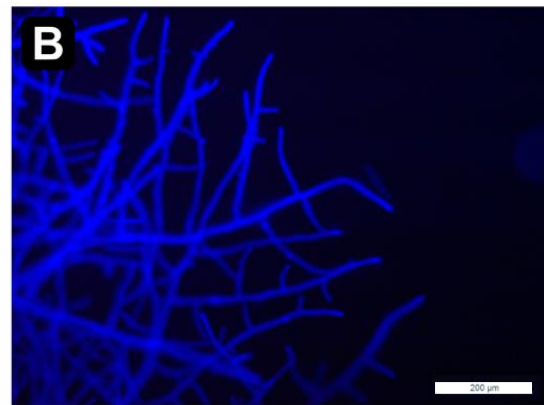
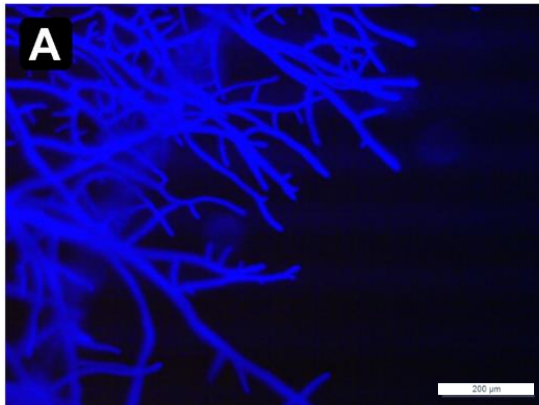


**9. számú melléklet.** A gombasejteket KF festékekkel festettük, majd áramlási citométerrel vizsgáltuk. All: az összes mért sejt; %Gated: az adott kapun belülre eső sejtek aránya az összes mért sejt százalékában; Mean: a KF festékből származó fluoreszcencia intenzitások átlaga; Minimum: a mért legalacsonyabb KF intenzitás értéke; Maximum: a mért legmagasab KF intenzitás értéke; Intensity\_MC\_Ch07: KF-ből származó fluoreszcencia intenzitás. Az MS12+*pyrG* törzs **A)** az MS12-*cotH3*+*pyrG* törzs **B)** az MS12-*cotH4*+*pyrG* törzs **C)** és az MS12-*cotH5*+*pyrG* törzs **D)** KF-rel festett spóráinak intenzitására vonatkozó értékek.





**10. számú melléklet.** Fiatal hifák vizsgálata KF festést követően fluoreszcens mikroszkópiát alkalmazva. Az MS12- $\Delta$ *cotH1*+*pyrG* (A); MS12- $\Delta$ *cotH2*+*pyrG* (B); MS12- $\Delta$ *cotH3*+*pyrG* (C); MS12- $\Delta$ *cotH4*+*pyrG* (D); MS12- $\Delta$ *cotH5*+*pyrG* (E) és az MS12 +*pyrG* (F) törzsek fiatal hifáinak fluoreszcens mikroszlópos képe KV festést követően. A méretskála 200  $\mu$ m-nek felel meg.



**11. számú melléklet.** A CotH fehérjék szerepe *Mucor circinelloides* fonalas gombában.

Fehérje	Tapasztalt fenotípus	Lehetséges funkció
CotH1	Hőszenszitivitás 20 °C-on	Eltérő hőmérsékleti viszonyokhoz való alkalmazkodás
	KF festékkel szembeni fokozott érzékenység	A sejtfal szerkezetének kialakítása
	SDS membrán detergenssel szembeni fokozott érzékenység	A sejtmembrán szerkezetének kialakítása
CotH2	Hőszenszitivitás 20 °C-on	Eltérő hőmérsékleti viszonyokhoz való alkalmazkodás
	KF festékkel szembeni fokozott érzékenység	A sejtfal szerkezetének kialakítása
	SDS membrán detergenssel szembeni fokozott érzékenység	A sejtmembrán szerkezetének kialakítása
CotH3	Fokozottabb növekedés 28 °C-on	Eltérő hőmérsékleti viszonyokhoz való alkalmazkodás
	Hőszenszitivitás 35 °C-on	Eltérő hőmérsékleti viszonyokhoz való alkalmazkodás
	A spórafal középső rétegének vékonyodása cirkuláris és ellipszoid spórákban	Spórafal középső rétegének kialakítása
	KV festékkel szembeni fokozott érzékenység	A sejtfal szerkezetének kialakítása
	KF festékkel szembeni fokozott érzékenység	A sejtfal szerkezetének kialakítása
	SDS membrán detergenssel szembeni fokozott érzékenység	A sejtmembrán szerkezetének kialakítása
	Csökkent patogenitás <i>D. melanogaster</i> modellben Avirulens DKA egér modellben	Virulenciában betöltött szerep Virulenciában betöltött szerep
CotH4	Növekedési defektus 28 °C-on	Eltérő hőmérsékleti viszonyokhoz való alkalmazkodás
	Növekedési defektus és hőtolerancia 35 °C-on	Eltérő hőmérsékleti viszonyokhoz való alkalmazkodás
	KV festékkel szembeni csökkent érzékenység	A sejtfal szerkezetének kialakítása
	KF festékkel szembeni csökkent érzékenység	A sejtfal szerkezetének kialakítása
	SDS membrán detergenssel szembeni rezisztencia	A sejtmembrán szerkezetének kialakítása
	A spórák hidrogén-peroxiddal szembeni fokozott érzékenysége	A spórák sejtfal szerkezetének kialakítása
	A spórafal rendellenesen megvastagodása/a cirkuláris spórák sejtfalának belső rétege nem alakul ki	A spórafal belső rétegének kialakítása
	Csökkent patogenitás <i>D. melanogaster</i> modellben	Virulenciában betöltött szerep
	Csökkent patogenitás <i>G. mellonella</i> modellben	Virulenciában betöltött szerep
	Csökkent patogenitás DKA egér modellben	Virulenciában betöltött szerep
	Kisebb spórák	A spórák méretének befolyásolása
	A spórafal összkitin mennyisége megnő	A spórafal kialakítása
CotH5	Hőszenszitivitás 20 °C-on	Eltérő hőmérsékleti viszonyokhoz való alkalmazkodás
	Hőszenszitivitás 35 °C-on	Eltérő hőmérsékleti viszonyokhoz való alkalmazkodás
	KV festékkel szembeni fokozott érzékenység	A sejtfal szerkezetének kialakítása
	Csökkent patogenitás <i>D. melanogaster</i> modellben	Virulenciában betöltött szerep
	A cirkuláris spórák spórafalának belső és középső rétegének vékonyodása/ az ellipszoid spórák spórafalának külső rétegének vékonyodása	A cirkuláris spórák falának mindhárom rétegének, az ellipszoid spórák falának középső rétegének kialakítása
	Kisebb spórák	A spórák méretének befolyásolása
Sporangiumok szerkezeti változása	Sporangiumok szerkezetének kialakítása	