

AZ OPPORTUNISTA HUMÁNPATOGÉN *CANDIDA PARAPSILOSIS*
PATOMECHANIZMUSÁNAK MOLEKULÁRIS SZABÁLYOZOTTSÁGA

DOKTORI ÉRTEKEZÉS

TÓTH RENÁTA

TÉMAVEZETŐ:

DR. GÁCSER ATTILA

EGYETEMI DOCENS

BIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA



SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM
TERMÉSZETTUDOMÁNYI ÉS INFORMATIKAI KAR
MIKROBIOLÓGIAI TANSZÉK

2016

SZEGED

TARTALOMJEGYZÉK

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	5
2. BEVEZETÉS	8
3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	10
3.1. AZ OPPORTUNISTA GOMBAFERTŐZÉSEK JELENTŐSÉGE	10
3.2. A <i>CANDIDA</i> NEMZETSÉG: KLINIKAI JELENTŐSÉG ÉS ELTERJEDÉS.....	11
3.3. <i>CANDIDA</i> NEMZETSÉG ÁLTALÁNOS JELLEMZÉSE.....	13
3.4. A <i>CANDIDA PARAPSILOSIS</i> SZEREPE A KLINIKUMBAN	15
3.5. A <i>CANDIDA PARAPSILOSIS</i> ÁLTALÁNOS JELLEMZÉSE	16
3.6. VIRULENCIA FAKTOROK ÉS AZOK SZEREPE A FERTŐZÉS SORÁN	17
3.6.1. ADHÉZIÓS KÉPESSÉG ÉS ADHEZINEK	18
3.6.2. SZEKRETÁLT HIDROLITIKUS ENZIMEK ÉS JELENTŐSÉGÜK.....	19
3.6.3. A MÁSODLAGOS MORFOLÓGIA VÁLTÁS JELENTŐSÉGE.....	22
3.6.3.1. A másodlagos morfológia váltás molekuláris mechanizmusai	24
Az <i>SPT3</i> szerepe a morfológia váltásban.....	25
3.6.4. KOMPETÍCIÓ A GAZDASZERVEZET NYOMELEMEIÉRT	26
3.6.4.1. A patogén gombák vasforrás hasznosítási mechanizmusai	27
A <i>HAP5</i> szerepe a vas homeosztázisban	29
3.6.5. A BIOFILMKÉPZÉS JELENTŐSÉGE	30
3.6.5.1. A <i>Candida</i> biofilmképzést szabályozó legfontosabb molekuláris faktorok.....	31
3.6.6. FITNESZT KÖZVETLENÜL BEFOLYÁSOLÓ FAKTOROK	32
3.6.6.1. Fitnesszt befolyásoló főbb molekuláris szabályozó útvonalak.....	34
A <i>KEOPS/EKC</i> komplex és a <i>CGII21</i> szerepe a gomba életképességében	35
3.7. VIRULENCIA FAKTOROK AZONOSÍTÁSA ÉS VIZSGÁLATA NAPJAINKBAN	36
4. CÉLKITŰZÉSEK	38
5. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	39
5.1. ALKALMAZOTT TÖRZSEK	39
5.2. TENYÉSZTÉSHEZ FELHASZNÁLT OLDATOK, TÁPOLDATOK, TÁPTALAJOK.....	40
5.3. KÍSÉRLETI MÓDSZEREK.....	43
5.3.1. A THP-1 HUMÁN MONOCITA SEJTVONAL FERTŐZÉSE <i>C. PARAPSILOSIS</i> SEJTEKKEL ÉS GOMBA RNS IZOLÁLÁS.....	43
5.3.2. MOLEKULÁRIS TECHNIKÁK	43
5.3.2.1. RNS szekvenálás	43
5.3.2.2. Deléciós konstrukciók létrehozásához szükséges technikák.....	43
Totál DNS kivonás élesztő sejtekből	43
Fúziós konstrukció létrehozása	44
Upstream és downstream körülhatároló régiók amplifikálása	44
Szelektív marker gének amplifikálása.....	45
PCR termékek tisztítása	45
Fúziós PCR	45
Kolónia PCR a helyes beépülések ellenőrzésére	46
RNS izolálás gombasejtekből	46
cDNS szintézis	46
Valós idejű (real time) PCR	46
5.3.2.3. Rekonstruált törzsek létrehozásához szükséges technikák.....	47
Klónozás GatewayTM (Invitrogen) rendszerrel	47
Visszaépíteni kívánt gének amplifikálása	48
PCR termék tisztítása polietilén-glikollal (PEG).....	49
BP klónozási reakció	49
LR klónozási reakció	49
Bakteriális plazmid izolálása.....	49
5.3.3. BAKTERIÁLIS ÉS ÉLESZTŐ SEJTEK FENNTARTÁSA, KOMPETENS SEJTEK KÉSZÍTÉSE ÉS TRANSZFORMÁLÁSA	50
5.3.3.1. Bakteriális és élesztő sejtek fenntartása.....	50
<i>E. coli</i> sejtek fenntartása és tenyésztése.....	50
<i>C. parapsilosis</i> sejtek fenntartása és tenyésztése	50
5.3.3.2. Kompetens sejtek készítése	51

Kompetens <i>E. coli</i> sejtek előállítása	51
Kompetens <i>C. parapsilosis</i> sejtek előállítása	51
5.3.3.3. Bakteriális és élesztő sejtek transzformálása	51
<i>E. coli</i> sejtek transzformálása	51
<i>C. parapsilosis</i> sejtek transzformálása	51
5.3.4. DELÉCIÓS ÉS REKONSTRUÁLT TÖRZSEK KARAKTERIZÁLÁSA	52
5.3.4.1. Általános fenotipikus analízishez használt módszerek	52
<i>C. parapsilosis</i> deléciós törzsek növekedésének vizsgálata különböző táptalajokon és tápoldatban ..	52
<i>C. parapsilosis</i> deléciós törzsek növekedésének vizsgálata különböző stressz körülmények között ..	53
A létrehozott <i>C. parapsilosis</i> törzsek morfológia váltásának vizsgálata	53
A létrehozott <i>C. parapsilosis</i> törzsek biofilmképzésének vizsgálata	53
<i>C. parapsilosis</i> deléciós törzsek antifungális szerekkel szembeni érzékenységének vizsgálata	54
5.3.4.2. Funkció beazonosítás érdekében használt egyéb kísérleti módszerek	55
A deléciós törzsek növekedésének vizsgálata alternatív szénforrások jelenlétében, vashiányos közegben, egyéb oxidatív stresszor jelenlétében	55
Deléciós törzsek sejtfal összetételének vizsgálata fluoreszcens festési eljárások alkalmazásával	55
Funkció validálás érdekében elvégzett génexpressziós vizsgálatok	56
5.3.5. <i>IN VIVO</i> VIRULENCIA VIZSGÁLATOK	57
5.3.6. STATISZTIKAI ANALÍZIS	57
6. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK	58
6.1. A <i>C. PARAPSILOSIS</i> FERTŐZŐKÉPESSÉGÉT POTENCIÁLISAN BEFOLYÁSOLÓ GÉNEK AZONOSÍTÁSA	58
6.2. <i>C. PARAPSILOSIS</i> DELÉCIÓS MUTÁNS TÖRZSEK LÉTREHOZÁSA	59
6.3. A DELÉCIÓS MUTÁNS KÖNYVTÁR TAGJAINAK SZÉLES KÖRŰ FENOTÍPUSOS VIZSGÁLATA ..	62
6.3.1. A NÖVEKEDÉS VIZSGÁLATA KOMPLEX TÁPKÖZEGBEN ÉS MINIMÁL TÁPTALAJOKON ..	62
6.3.2. A DELÉCIÓS MUTÁNS TÖRZSEK VÁLASZÁNAK VIZSGÁLATA KÜLÖNBÖZŐ TÍPUSÚ STRESSZ KÖRÜLMÉNYEK KÖZÖTT	65
6.3.3. A DELÉCIÓS MUTÁNS TÖRZSEK PSZUDOHIFA KÉPZÉSÉNEK VIZSGÁLATA	67
6.3.4. A DELÉCIÓS MUTÁNS TÖRZSEK BIOFILMKÉPZÉSÉNEK VIZSGÁLATA	68
6.3.5. A DELÉCIÓS MUTÁNS TÖRZSEK ÉRZÉKENYSÉGÉNEK VIZSGÁLATA KÜLÖNBÖZŐ TÍPUSÚ ANTIFUNGÁLIS SZEREK JELENLÉTÉBEN	70
6.4. A DELÉCIÓS MUTÁNS KÖNYVTÁR ÁTFOGÓ JELLEMZÉSÉT KÖVETŐEN KIEMELT <i>C. PARAPSILOSIS</i> MUTÁNS TÖRZSEK ÉS AZOK TOVÁBBI VIZSGÁLATAI	72
6.4.1. A VASFELVÉTELT SZABÁLYOZÓ ÉS AZ ALTERNATÍV SZÉNFORRÁS HASZNOSÍTÁSÁBAN SZEREPET JÁTSZÓ C _{PAR2_100540} TRANSZKRIPCIÓS FAKTOR JELLEMZÉSE	72
6.4.1.1. A <i>C_{PAR2_100540} Δ/Δ</i> deléciós törzs sajátosságai az előzetes vizsgálatok alapján	72
6.4.1.2. A <i>C_{PAR2_100540} Δ/Δ</i> mutáns törzs növekedése vashiányos közegekben	74
6.4.1.3. A vas metabolizmust befolyásoló <i>FRP1</i> gén expressziójának vizsgálata induktív közegben	75
6.4.1.4. A <i>C_{PAR2_100540} Δ/Δ</i> mutáns törzs növekedésének vizsgálata alternatív szénforrás jelenlétében ..	77
6.4.1.5. A légzési láncban szerepet játszó <i>CYCI</i> és <i>COX4</i> gének expressziójának vizsgálata induktív körülmények között	78
6.4.1.6. A <i>C_{PAR2_100540} Δ/Δ</i> mutáns törzs <i>in vivo</i> virulencia vizsgálata	79
6.4.1.7. A <i>C. parapsilosis</i> C _{par2_100540} transzkripció faktor vizsgálatából származó eredmények összefoglalása	80
6.4.2. A MÁSODLAGOS MORFOLÓGIA VÁLTÁS SZABÁLYOZÁSÁT BEFOLYÁSOLÓ C _{PAR2_200390} TRANSZKRIPCIÓS FAKTOR JELLEMZÉSE	83
6.4.2.1. A <i>C_{PAR2_200390} Δ/Δ</i> deléciós törzs sajátosságai az előzetes vizsgálatok alapján	83
6.4.2.2. A <i>C_{PAR2_200390} Δ/Δ</i> mutáns törzs sejtfal összetételének vizsgálata	86
6.4.2.3. A <i>C_{PAR2_200390} Δ/Δ</i> mutáns törzs kitináz és kitin szintáz expressziójának vizsgálata	87
6.4.2.4. A <i>C_{PAR2_200390} Δ/Δ</i> mutáns törzs <i>in vivo</i> virulencia vizsgálata	88
6.4.2.5. A <i>C. parapsilosis</i> C _{par2_200390} transzkripció faktor vizsgálatából származó eredmények összefoglalása	89
6.4.3. A BIOFILMKÉPZÉS SZABÁLYOZÁSÁBAN RÉSZTVEVŐ C _{PAR2_602840} TRANSZKRIPCIÓS FAKTOR JELLEMZÉSE	92
6.4.3.1. A <i>C_{PAR2_602840} Δ/Δ</i> deléciós törzs sajátosságai az előzetes vizsgálatok alapján	92
6.4.3.2. A <i>C_{PAR2_602840} Δ/Δ</i> mutáns törzs sejtfal összetételének vizsgálata különböző sejtfal festékek alkalmazásával	94
6.4.3.3. A biofilmképzést meghatározó transzkripció regulátorok expressziójának vizsgálata a <i>C_{PAR2_602840} Δ/Δ</i> törzsben	95
6.4.3.4. A <i>C_{PAR2_602840} Δ/Δ</i> mutáns törzs <i>in vivo</i> virulencia vizsgálata	96

6.4.3.5. A <i>C. parapsilosis</i> Cpar2_602840 transzkripciós faktor vizsgálatából származó eredmények összefoglalása.....	97
6.4.4. A HŐSZENZITIVITÁST BEFOLYÁSOLÓ CPAR2_303700 KINÁZ AZONOSÍTÁSA	99
6.4.4.1. A <i>CPAR2_303700 Δ/Δ</i> deléciós törzs sajátosságai az előzetes vizsgálatok alapján	99
6.4.4.2. <i>CPAR2_303700</i> ORF által meghatározott fehérje <i>in silico</i> analízise.....	102
6.4.4.3. A <i>CPAR2_303700 Δ/Δ</i> mutáns törzs <i>in vivo</i> virulencia vizsgálata	107
6.4.4.4. A <i>C. parapsilosis CPAR2_303700</i> által kódolt kináz vizsgálatából származó eredmények összefoglalása.....	108
7. ÖSSZEFOGLALÁS	110
8. SUMMARY	114
9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	117
10. IRODALOMJEGYZÉK.....	119
11. MELLÉKLETEK	133
1. SZÁMÚ MELLÉKLET: A TANULMÁNY SORÁN ELŐÁLLÍTOTT <i>C. PARAPSILOSIS</i> HOMOZIGÓTA DELÉCIÓS TÖRZSEK.	133
2. SZÁMÚ MELLÉKLET: A TANULMÁNYBAN FELHASZNÁLT PRIMEREK LISTÁJA.	135
3. SZÁMÚ MELLÉKLET: PÉLDA A KÜLÖNBÖZŐ TÍPUSÚ TÁPTALAJOKON TÖRTÉNŐ NÖVEKEDÉSI VIZSGÁLATOKRA.	142
4. SZÁMÚ MELLÉKLET: PÉLDA A KÜLÖNBÖZŐ STRESSZOROK JELENLÉTÉRE ADOTT VÁLASZRA - TÚLÉLÉSI GÖRBÉK.	143

1. Rövidítések jegyzéke

ACE2	Activator of <i>CUP1</i> Expression 2 (<i>CUP1</i> expresszió aktivátor 2)
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome (szerzett immunhiányos tünetegyüttes)
ALS	Agglutinin-Like Sequence (agglutinin-szerű sorozat)
ATCC	American Type Culture Collection
BCR1	Biofilm and Cell Wall Regulator 1 (biofilm és sejtfal szabályozó elem)
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool (Szekvencia-hasonlóság kereső programcsomag)
BPS	Bathophenanthroline disulfonate (batofenantrolin-diszulfonát)
BSA	Bovine Serum Albumin (borjú szérum albumin)
CBF	CCAAT-Binding Factor (CCAAT-kötő faktor)
cDNS	Complementary DNS (kiegészítő DNS)
CGI121	p53-related kinase (p53-függő kináz)
CHS	Chitin synthase (kitin szintáz)
CHT	Chitinase (kitináz)
ConA-FITC	Concanavalin A-Fluorescein Isothiocyanate (konkanavalin A-fluoreszcein-izotiocianát)
COX4	Cytochrome-c Oxidase 4 subunit (citokróm oxidáz 4. alegység)
CPH2	<i>Candida</i> Pseudohyphal regulator 2 (<i>Candida</i> pseudohifa szabályozó faktor 2)
CUG	Cytosine-Uracil-Guanine (citozin-uracil-guanin triplet)
CWH41	Calcofluor White Hypersensitive 41 (kalkofluor fehér hiperszenzitív 41)
CYC1	Cytochrome c1 (citokróm c1)
CZF1	<i>C. albicans</i> zinc-finger protein 1 (<i>C. albicans</i> cink-ujj doménnel rendelkező fehérje 1)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium (Dulbecco által módosított Eagle-féle médium)
DMSO	Dimethyl sulfoxide (dimetil-szulfoxid)
ECM	Extracellular matrix (extracelluláris mátrix)
EFG1	Enhanced filamentous growth 1 (fonalas növekedést elősegítő faktor 1)
EPS	Extracellular Polymer Substrate (extracelluláris polimer szubsztrát)
FBS	Fetal Bovine Serum (újszülött borjú szérum)
FLO11	Flocculation gene 11 (pehelyszerű fenotípust kiváltó gén 11)
FRE	Ferric reductase (vas reduktáz)
FRP1	Ferric Reductase Protein 1 (vas reduktáz protein 1)
GZF3	GATA Zinc Finger protein 3 (GATA szekvencia kötő cink-ujj doménnel rendelkező fehérje 3)
HAP	Heme-Activating Protein (hem-aktiváló fehérje)
HIS1	ATP foszforiboziltranszferáz (hisztidin bioszintézis)
HIV	Human Immunodeficiency Virus (emberi immunhiány-előidéző vírus)
HSP	Heat Shock Protein (hősokk fehérje)
HWP1	Hyphal cell Wall Protein 1 (hifa sejtfal protein 1)
HIGB	Hygromycin B (higromicin B)
KEOPS/EKC	Kinase, Endopeptidase and Other Proteins of small Size / Endopeptidase-like and Kinase associated to transcribed Chromatin

KF	K alkofluor F ehér
Koff	K offein
KV	K ongó V örös
LB	L uria- B ertani medium (Luria-Bertani táptalaj)
LEU2	Izocitrát/izopropil malát dehidrogenáz (leucin bioszintézis)
LIP	L ipase (lipáz)
MAPK	M itogen- A ctivated P rotein K inase (mitogén aktiválta protein kináz)
MFG1	M orphogenetic regulator of F ilamentous G rowth 1 (fonalas növekedés morfológiai szabályozása)
MFS	M ajor F acilitator S uperfamily (fő membrántranszport elősegítő szupercsalád)
MIC	M inimal I nhibitor C oncentration (minimális gátló koncentráció)
MKC1	M AP K inase 1 from <i>C. albicans</i> (<i>C. albicans</i> MAP kináz 1)
MOPS	3-(n-Morpholino) Propanesulfonic Acid (3-3-(N-morfolino)-propánszulfonsav)
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2)-2,5-difeniltetrazóliumbromid
NAC	N on- <i>albicans</i> C andida (nem- <i>albicans</i> <i>Candida</i> faj)
NAT	N ourseothricin N -acetyltransferase (nourseothricin - N-acetil transferáz)
NCBI	N ational C entre for B iology I nformation (nemzetközi biológiai adatbázis)
NDT80	Non-DiTyrosine 80 gén
NRG1	N egative R egulator of G lucose-controlled genes (glükóz szabályozta gének represszora)
NTC	Nourseothricin
ORF	O pen R eadin F rame (nyitott leolvasási keret)
PBMC	P eripheral B lood M ononuclear C ell (perifériás mononukleáris sejtek)
PBMC-DM	P eripheral B lood M ononuclear C ell- D erived M acrophage (perifériás mononukleáris sejtekből származtatott makrofágok)
PBS	P hosphate B uffered S aline (foszfát puffer)
PCR	P olymerase C hain R eaction (polimeráz láncreakció)
PEG	P olyethylene G lycol (polietilén-glikol)
RFG1	R educed F ilamentous G rowth (csökkent fonalas növekedés)
PHR1,2	p H-regulated gene 1,2 (pH szabályozás alatt álló gén 1 és 2)
PS	P enicillin- S treptomycin (penicillin-sztreptomycin)
RBT	R epressed by <i>TUP1</i> (<i>TUP1</i> által szabályozott gén)
RIM101	R egulator of IME2 (IME2 szabályozó elem)
RMSD	R oot M ean S quare D eviation (atomok közötti távolságok négyzetes közepe)
ROS	R eactive O xigen S pecies (reaktív oxigén gyökök)
SAGA	S pt- A da- G cn- A cetyltransferase (Spt-Ada-Gcn-Acetyltransferáz)
SAPP	S ecreted A spartyl P roteinase in <i>parapsilosis</i> (<i>C. parapsilosis</i> szekretált savas proteinázt kódoló gén)
SDS	S odium D odecyl S ulphate (nátrium-lauril-szulfát)
SPT3	S u P pressor of Ty 's (Ty elemek gátlója)
TBP	T ATA- B inding P rotein (TATA-szekvencia kötő fehérje)
TF	T ranscription F actor (transzkripció faktor)
TFB4	T ranscription F actor B subunit 4 (transzkripció faktor B4-es alegység)

TFIIH	T ranscription F actor II H uman (transzkripciós faktor II H)
THP-1	T amm- H orsfall P rotein 1 (Tamm-Horsfall fehérje 1)
TUB4	TUB ulin 4 (gamma tubulin 4)
TUP1	d TMP- U ptake 1 (deoxitimidin 5'-monofoszfát felvétel 1)
UME6	U nscheduled M eiotic gene E xpression 6 (korai meiosis szabályozó gének regulátora)
VT	V ad T ípus
WGA-TRITC	W heat g erm a gglutinin- T etramethyl R hodamine I so- T hiocyanate (búzacsíra agglutinin – tetrametil-rodamin-izotiocianát)
YCB	Y east C arbon B ase (élesztő szénforrás)
YNB	Y east N itrogen B ase (élesztő nitrogénforrás)
YPD	Y east P eptone D -glucose (élesztőkivonat-pepton-D-glükóz)
<i>Candida</i> fajok	nevezéktana (jelölések):
<i>SAP</i>	S ecreted A spartyl P roteinase - szekretált savas proteináz kódoló gén
Sap	S ecreted a spartyl p roteinase - szekretált savas proteináz (fehérje)

2. Bevezetés

Az invazív gombafertőzések (mikózisok) napjainkban egyre komolyabb egészségügyi problémát jelentenek, amelyek megfelelő kezelés hiányában akár halállal is végződhetnek. Míg az egészséges immunrendszer hatékonyan képes védekezni ezen fertőzésekkel szemben, addig bizonyos páciens csoportok körében, például a transzplantáción átesett, HIV (emberi immunhiány-előidéző vírus) fertőzött vagy rosszindulatú daganatos megbetegedésben szenvedő betegeknél, sérül a természetes immunrendszer alkotta gát, ami lehetőséget biztosít az opportunistá patogén gombák elszaporodására.

Az invazív mikózisok egyik leggyakoribb kórokozói a *Candida* fajok. A nemzetségbe tartozó élesztőgombák közül a *Candida albicans* a klinikumban leggyakrabban azonosított faj. Fontos azonban megjegyezni, hogy az úgynevezett „nem-*albicans*” *Candida* fajok (NAC) kiváltotta egészségügyi problémák is egyre nagyobb számban fordulnak elő. Ezek közül kiemelt a *Candida parapsilosis* jelentősége, amely invazív fertőzések esetén számos földrajzi régióban a második leggyakrabban izolálható *Candida* faj. A *C. parapsilosis* előfordulási gyakorisága a gyermekek és alacsony születési súlyú csecsemők körében különösen gyakori, egyes régiókban még a *C. albicans*-t is megelőzi. Veszélyeztetett továbbá valamennyi immunszuppresszált állapotú beteg is, kiváltképpen azok, akiket intenzív osztályokon kezelnek.

A bőrfelszínről gyakran izolálható *C. parapsilosis* egyik fontos biológiai tulajdonsága, hogy képes a horizontális terjedésre. További jellegzetességei közé tartozik, hogy előzetes kolonizáció nélkül is képes invazív fertőzést kiváltani, illetve számos izolátuma rezisztenciát mutat echinocandin típusú antifungális szerekkel szemben.

A faj fertőzőképességét annak virulencia faktorai határozzák meg, melyek közé tartozik például a sejtek adhéziós képessége, a biofilmképzés, hidrolitikus enzimek szekréciója, és a morfológia váltás. Emellett erőteljes kompetícióra képes a gazdával a szervezetben fellelhető létfontosságú nyomelemekért is. Ezek a virulencia faktorok a gombafertőzés különböző stádiumaiban játszanak szerepet.

Annak ellenére, hogy a *C. parapsilosis* klinikai jelentősége az elmúlt évtizedekben egyre inkább nőtt, keveset tudunk a faj genetikai folyamatainak hátteréről, a patogén virulencia faktorairól és azok molekuláris szabályozottságáról, amelyek később akár újgenerációs antifungális szerek célpontjai lehetnének. Különböző molekuláris vizsgálatokat elsősorban a *C. albicans*-szal végeztek, azonban a vizsgálati módszerek

közül később néhányat sikeresen adaptáltak *C. parapsilosis*-ra is. Egy gén szerepének vizsgálata különböző módszerekkel történhet. Ezek egyike a deléciós mutánsok előállítása és azok jellemzése. Ez a módszer az ún. „reverz genetikai” megközelítés, ami ma is gyakran használatos funkció beazonosítás céljából.

Munkánk során ezzel a módszerrel célunk volt olyan *C. parapsilosis* gének vizsgálata, amelyek valamilyen módon összefüggésbe hozhatóak a gomba fertőzőképességének szabályozásával. Ezen gének beazonosítását egy új, célzott megközelítési módszerrel végeztük el, amit a gazda-patogén kölcsönhatást követő teljes gomba RNS szekvenáláson keresztül valósítottunk meg. Az így beazonosított gének mellett kiválasztottunk további olyan szabályozó faktorokat is, amelyekről feltételeztük, hogy a gomba fertőzőképességét szintén befolyásolhatják. Ezt követően elvégeztük az általunk létrehozott deléciós könyvtár tagjainak jellemezését, aminek során célunk volt olyan gének beazonosítása, amelyek a *C. parapsilosis* életképességét, stresszre adott válaszát, morfogenezisét, biofilmképző képességét és antifungális szerekkel szembeni érzékenységét befolyásolják. Munkánk során részletesen vizsgáltuk továbbá azokat a deléciós törzseket, amelyek a gomba morfológia váltását, biofilm képzését, nyomelem felvételét, alternatív szénforrás hasznosítását, sejtfal összetételét és életképességét jelentősen befolyásolták, és amelyeknél egyben egyszerre több rendellenes fenotípus megjelenését is detektáltuk. Ezek esetén meghatároztuk az eltávolított gének pontos funkcióját. Így sikeresen azonosítottunk számos, eddig nem azonosított *C. parapsilosis*-specifikus virulenciával kapcsolatba hozható gént.

3. Irodalmi áttekintés

3.1. Az opportunistista gombafertőzések jelentősége

Világszerte számos megbetegedés hozható összefüggésbe gombafertőzésekkel. Ezek lehetnek egy betegség elsődleges kórokozói vagy utalhatnak egy már meglévő kóros állapot (pl. szerzett immunhiányos tünetegyüttes (AIDS), daganat) jelenlétére. A gombák okozta fertőzéseket két fő csoportba sorolhatjuk: felszíni - úgymint a bőr és köröm gombásodása –, illetve invazív gombafertőzésekre. Míg az előbbi fertőzések enyhétől súlyosig rangsorolhatóak és diagnosztizálásuk, illetve kezelésük ma már hatékonyan zajlik, addig az utóbbiak minden esetben súlyos fertőzésnek minősülnek, kimutatásuk és terápiájuk rendkívül körülményes és kezelés hiányában akár halállal is végződhetnek.

Egy korábbi összefoglaló tanulmány szerint az invazív gombafertőzések legalább olyan gyakran végződnek halállal, mint a malária és a tuberkulózis esetében (Brown, G. D. és mtsi., 2012). Az egészséges immunrendszer hatékonyan képes védekezni a gombafertőzésekkel szemben, azonban az immunrendszer kóros legyengülése lehetőséget adhat különböző, úgynevezett opportunistista patogének elszaporodására. Immunhiányos állapot kialakulhat például HIV fertőzés következtében, szervtranszplantáció utáni immunszuppresszív terápia alkalmazását követően, sebészeti eljárást követően és rosszindulatú daganat jelenléte esetén is (Maertens és mtsi., 2001; Muskett és mtsi., 2011).

Számos gombafaj köthető invazív fertőzés kialakulásához, melyek megközelítőleg 90%-a sorolható az *Aspergillus*, *Cryptococcus*, *Pneumocystis* vagy *Candida* nemzetségek egyikébe (Brown, G. D. és mtsi., 2012). Az egyes fajok által okozott fertőzések gyakorisága függ a földrajzi elhelyezkedéstől, a betegek életkorától, életkörülményeitől és a társadalmi-gazdasági körülményektől.

Az utóbbi években számos módszert fejlesztettek ki a patogén gombafajok azonosítására annak reményében, hogy az adott fertőzés ellen irányuló, megfelelő terápiás kezelés időben megkezdődhessen. Ezek közül a gyakorlatban is használatos például a MALDI-TOF („matrix-assisted laser desorption/ionization - time of flight - mátrix segített lézerdeszorpciós ionizáció –repülési idő), polimeráz lánc reakció (PCR) és olvadási görbe analízis alapú fajazonosítás, radiográfiák és gomba antigének vérből történő kimutatása (Brown, G. D. és mtsi., 2012; Decat és mtsi., 2013; Neppelenbroek és mtsi., 2014). Azonban egyelőre ezeknek a módszereknek egyike sem elég hatékony, specifikus, szenzitív vagy éppen hozzáférhető minden diagnosztikai laboratórium számára ahhoz, hogy az invazív mikózisokat kellő mértékben megelőzzük és visszaszorítsuk (Brown, G. D.

és mtsi., 2012). A gombafertőzések elleni küzdelmet tovább nehezíti az antibiotikum rezisztens izolátumok megjelenése, továbbá az a tény, hogy a jelenleg rendelkezésünkre álló gombaellenes szereknek viszonylag magas a gazdaszervezetet károsító hatása, illetve a kezelésekhez használt gyógyszerek között gyakran lép fel nemkívánatos keresztreakció.

3.2. A *Candida* nemzetség: klinikai jelentőség és elterjedés

A *Candida* nemzetségbe tartozó fajok az opportunisták mikózisok egyik leggyakoribb kórokozói, amelyek sokszor ún. nozokomiális (kórházi környezetben kialakuló) fertőzésekért felelősek (Pfaller és Diekema 2007). Évente világszerte körülbelül 400 ezer új, *Candida* okozta véráramfertőzést (candidemia) regisztrálnak, amelyek többsége a fejlett országokra jellemző (Brown, G. D. és mtsi., 2012). A nemzetségbe tartozó fajok által kiváltott invazív fertőzések közül azonban jelentős a nyálkahártyát –például a szájüregi nyálkahártyát (~10 millió) és hüvely nyálkahártyát (~70 millió) – érintő fertőzések száma is (Matee és mtsi., 2000; Sobel 2007).

A *Candida* fajok a természetes humán bőr- és bélflóra, valamint a szájüreg és genitáliák normál flórájának is részét képezik. Bizonyos körülmények között azonban a gazdaszervezet és a mikrobák közötti egyensúly felbomolhat azáltal, hogy a gazdaszervezet nem képes kontrollálni a gomba növekedését, ami kommenzalista-patogén átmenetet eredményez. Erre példa a széles spektrumú antibiotikum használat következtében történő lokális gombafertőzések megjelenése (Amici és mtsi., 1994; Carr és mtsi., 1998). Ez esetben endogén eredetű gombafertőzésről beszélünk. Azonban hosszabb időn keresztül történő kórházi kezelést követően, a gombafertőzést okozó *Candida* fajok lehetnek exogén eredetűek is. Potenciális forrásként tekinthető a kórházakban dolgozó emberek kezének bőrfelszíne, illetve a nem megfelelő módon sterilizált implantált orvosi eszközök (Trofa és mtsi., 2008). Ekkor az élesztő sejtek a véráramba kerülve szisztémás megbetegedést okozhatnak, ami során létfontosságú belső szervek gyulladása alakulhat ki. Az invazív kandidiázis következménye lehet például a szívbelhártya gyulladása (endocarditis), hashártyagyulladás (peritonitis), agyhártyagyulladás (meningitis) és a csonthártya gyulladása (osteomyelitis), melyek kezelés nélkül halálhoz vezethetnek (Pfaller és Diekema 2007; Trofa és mtsi., 2008). *Candida* fajok okozhatnak továbbá ízületi gyulladást (arthritis), szemgyulladást (endophthalmitis), a középső és külső fül gyulladását (otomycosis) és körömfertőzést (onychomycosis) is (Trofa és mtsi., 2008).

Az elmúlt évtizedek óta a *Candida* fajok által okozott egészségügyi problémák jelentősége és száma egyre inkább növekszik. Megjegyzendő, hogy a *Candida* fajok

kiváltotta fertőzések száma földrajzi régióként változhat (Brown, G. D. és mtsi., 2012). Míg Észak-Amerikában a *Candida* fajok által kiváltott nozokomiális fertőzések gyakorisága egyre inkább növekszik, addig Európában csökkenő tendenciát mutat (Yapar 2014). A *Candida* nemzetségbe tartozó élesztőgombák közül a legtöbb fertőzés kialakításáért a *C. albicans* tehető felelőssé, azonban egyre nagyobb egészségügyi problémát jelentenek az úgynevezett nem-*albicans* (NAC) fajok, úgymint a *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* és *C. krusei* által kiváltott megbetegedések is (Pfaller és Diekema 2007). A NAC fajok elterjedésének legfőbb oka feltételezhetően az azol típusú antifungális szerek (pl. flukonazol) széles körű elterjedése és az intravénás katéterek gyakori használata (Yapar 2014; Ravinder 2015).

A *C. tropicalis* jellegzetessége, hogy főleg neotropeniával, illetve rosszindulatú hematológiai daganattal rendelkező betegek körében gyakori. Földrajzi elterjedését illetően Dél-Amerikában a második leggyakrabban, míg Dél-Kelet Ázsiában a véráramból leggyakrabban izolálható *Candida* fajoként ismert (Pfaller és Diekema 2007; Kothavade és mtsi., 2010). Egy másik NAC faj, a *C. krusei* regionális elterjedését tekintve a kelet-európai régióra (Csehország, Szlovákia és Lengyelország) jellemző, és a *C. tropicalis*-hoz hasonlóan, a vérképző szervrendszert érintő daganatban szenvedő betegek veszélyeztetettek leginkább az általa okozott fertőzésekre (Hachem és mtsi., 2008; Pfaller és mtsi., 2008). Egyes tanulmányok szerint jelenleg a *C. glabrata* (Malani és mtsi., 2005; Foster és mtsi., 2007), míg más tanulmányok alapján a *C. parapsilosis* a második leggyakrabban izolálható faj invazív gombafertőzések tekintetében világszerte (Trofa és mtsi., 2008; Hays és mtsi., 2011). Az előfordulási gyakoriság nagymértékben függ a földrajzi elhelyezkedéstől, az érintett betegek korától, valamint a fertőzöttek alapbetegségétől. Ennek megfelelően a *C. glabrata* gyakran izolálható észak-amerikai, illetve bizonyos észak- és közép-európai országok kórházaiban, továbbá gyakrabban fordul elő az idősebb korosztályban, valamint a daganattal rendelkező betegekben (1. ábra) (Pfaller és Diekema 2007; Pfaller és mtsi., 2010; Guinea 2014; Quindos 2014). Ezzel szemben *C. parapsilosis* fertőzések Dél-Amerikában, Ausztráliában, valamint Afrika és Európa egyes mediterrán területein (pl. Spanyolország) fordulnak elő gyakran (1. ábra) (Guinea 2014; Quindos 2014), emellett sokkal gyakrabban izolálható a 18 év alatti gyermekek körében, illetve gyakran fertőz csecsemőket és alacsony születési súlyú újszülötteket (Pfaller és mtsi., 2010; Guinea 2014).

Hazánkban készült összefoglaló tanulmányok alapján – melyek a Magyarországra jellemző nemzetközi adatokra, valamint helyi klinikai adatokra (Szeged, Budapest) támaszkodnak – elmondható, hogy az invazív candidiázist okozó mikroorganizmusok

közül még mindig a *C. albicans* a leggyakrabban előforduló faj (Dóczi és mtsi., 2012; Pongrácz és mtsi., 2015). Emellett azonban a *C. parapsilosis* előfordulási gyakorisága egyre inkább nő, amely az újszülötteket érintő fertőzések tekintetében, megközelíti a *C. albicans* előfordulását, összhangban az előbb említett globális trenddel (Dóczi és mtsi., 2012).

Mindezekből adódóan, fokozódó orvosi jelentőségük miatt a *Candida* kutatásokra egyre több figyelmet fordítanak, ezek közül is kiemelt figyelmet kapnak az egyre szélesebb körben elterjedő NAC fajok, úgymint a *C. parapsilosis*.



1. ábra. A nem-*albicans* *Candida* fajok előfordulási gyakorisága világszerte. (Quindos 2014)

3.3. *Candida* nemzetség általános jellemzése

A *Candida* nemzetség tagjai az *Ascomycota* törzs, *Saccharomycetales* rendjének, *Saccharomycetaceae* (élesztőgombafélék) családjába tartoznak. A nemzetség számos fajára jellemző, hogy az úgynevezett CUG kládba tartozik, azaz a CUG kodon által univerzálisan kódolt leucin aminosav helyett szerint kódol (Massey és mtsi., 2003). A megközelítőleg 200 faj közül számos izolálható a környezetből (talaj, felszíni vizek), mások magasabbrendű szervezetekkel (ízeltlábúak, emlősök) folytatnak kommenzalista életmódot (Nguyen és mtsi., 2007; Pereira és mtsi., 2013). Ez utóbbiak bizonyos körülmények között okozhatnak opportunista fertőzéseket. A csoportban haploid (pl. *C.*

glabrata) és diploid (pl. *C. albicans*) genomi státusszal rendelkező fajok is találhatóak, többségük ivartalanul szaporodik, azonban néhány faj esetében paraszexuális (*C. albicans*), és ivaros szaporodást (*Lodderomyces elongisporus*) is megfigyeltek (Bennett és Johnson 2005; Butler és mtsi., 2009; Ene és Bennett 2014).

Az élesztő sejtek megjelenését tekintve kerekük vagy enyhén oválisak, méretüket illetően pedig a 2-6 μm -es tartományba tehetőek. Az általuk létrehozott telepmorfológia lehet sima, ráncos vagy gyűrött felszínű, fehér vagy enyhén krémszínű (Laffey és Butler 2005).

A *Candida* nemzetségben több dimorf gombafaj is található. A jelenség a sejtmorfológia megváltozását jelenti, ami bizonyos környezeti körülmények között következik be (ld. 3.6.3. fejezet). Az opportunistá patogén fajok esetében ez a tulajdonság egyike a legfontosabb virulenciát befolyásoló faktoroknak. A *Candida* nemzetségbe tartozó fajok esetén három különböző megjelenési formát különböztetünk meg. Ezek az élesztő, a megnyúlt élesztő (pszeudohifa) és a valódi fonalas (hifa) struktúrák (Thompson és mtsi., 2011). A csoport tagjai közül a *C. albicans*, *C. dubliniensis* és egyes tanulmányok alapján a *C. tropicalis* fajok mindhárom formában előfordulnak (Thompson és mtsi., 2011). Ezzel szemben a *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii* és *C. lusitaniae* csupán élesztő és pszeudohifa képzésére képesek, míg a *C. glabrata* többnyire csak élesztő formában fordul elő (Boisnard és mtsi., 2008; Thompson és mtsi., 2011; Lastauskiene és mtsi., 2015). Fontos megjegyezni, hogy az élesztő struktúra is fontos szerepet játszik a patogén gombák virulenciájában, mivel a bejutást követően az a gomba szisztémás elterjedését segíti elő (Saville és mtsi., 2003).

A dimorfizmus egyik fő oka a sejtfallal kapcsolatos szabályozó mechanizmusok megváltozása. A *Candida* fajok sejtfalára vonatkozó információk többsége elsősorban a *C. albicans* sejtfalának vizsgálatából származik. Bár a fajok között az egyes komponensek arányaiban eltérések lehetnek, a felépítés alapja megegyezik. A *Candida* sejtek sejtfala vastag, főként poliszacharidokból áll. Két fő réteget különböztetünk meg, egy kompakt belső és egy lazább szerkezetű külső réteget (Netea és mtsi., 2008). A belső réteg alapját egy vékony kitin réteg alkotja, amelyre épül a β -1,3 és β -1,6 glükán alegységek alkotta, vastagabb β -glükán váz. Ezek a β -glükán alegységek egymáshoz és a bazális kitin réteghez is kovalensen kötődnek. A külső réteg mannoproteinekből áll, ami fehérjékkel asszociált N- vagy O-kötött mannóz polimerben gazdag. Az itt található fehérjék glikozil-foszfatidil-inozitol (GPI) egységekkel kapcsolódnak a belső réteg elemeihez (Netea és mtsi., 2008). A *C. albicans* sejtfalában kis mennyiségben lipidek is megtalálhatóak. Fontos megemlíteni, hogy a gomba sejtfal nem egy merev struktúra. Mivel a sejt egyes életciklusai és a külső

környezeti tényezők (pl. stressz) egyaránt befolyásolják annak szerveződését, ezért egy dinamikusan változó struktúráról beszélhetünk (Gow és mtsi., 2012).

A rendelkezésünkre álló valamennyi adatbázis a *C. albicans* SC5314 izolátum genomi szekvenciáját tartalmazza, amelyről általánosságban elmondható, hogy 8 kromoszóma párral rendelkezik, mérete megközelítőleg 14 Mb és több mint 6000 gén található benne (Butler és mtsi., 2009). Az utóbbi évek egyik áttörést okozó eredménye volt számos más *Candida* faj genomszekvenciájának meghatározása, ami új távlatokat nyitott a nem-*albicans Candida* fajok vizsgálatára.

3.4. A *Candida parapsilosis* szerepe a klinikumban

A *C. parapsilosis*-t Puerto Ricóban Ashford izolálta először (1928) egy hasmenéses beteg székletéből és a *Monilia psilosis* (mai nevén *C. albicans*) vélt rokonaként *Monilia parapsilosis*-ként nevezte el (Trofa és mtsi., 2008). A gomba 1932-ben kapta meg a *C. parapsilosis* nevet (Nosek és mtsi., 2009). A fajt ekkor még nem hozták összefüggésbe betegségek kialakításával. Azonban, miután 1940-ben, a faj egyik izolátuma egy intravénás droghasználó szívbelhártya gyulladását, majd később halálát okozta, a *C. parapsilosis*-t patogén gombaként tartják számon (Trofa és mtsi., 2008).

A *C. parapsilosis* az egyik legjelentősebb NAC faj, amely számos tanulmány szerint leginkább a gyermekek és csecsemők körében fordul elő. A világ eltérő régióiból származó beszámolók alapján elmondható, hogy az újszülötteket érintő *Candida* fertőzések nagy százaléka (akár 66%) ezzel a fajjal hozható összefüggésbe (Rodriguez és mtsi., 2006; Pammi és mtsi., 2013). Korábban, Ballot és munkatársai Dél-Afrikában, egy újszülött intenzív osztályon regisztrált kandidiázisok elemzése során arra a megfigyelésre jutottak, hogy az esetek 54,2%-át a *C. parapsilosis* okozta, míg a *C. albicans* csupán az esetek 27,1%-ban volt izolálható (Ballot és mtsi., 2013). Egy másik, spanyolországi beszámoló szerint, számos helyi kórház adatainak elemzése során kiderült, hogy a 16 év alatti betegek körében a *Candida* fertőzések 46,8%-ért volt felelős a *C. parapsilosis* a *C. albicans*-szal szemben (36,5%) (Peman és mtsi., 2011). 2013-ban Pammi és munkatársai több mint 30 különböző tanulmány összesítéseként azt mutatták be, hogy az újszülötteket érintő kandidiázisok 33,4%-át a *C. parapsilosis* okozta, továbbá azt, hogy kifejezetten az alacsony születési súllyal világrajött újszülöttek a veszélyeztetettek (Pammi és mtsi., 2013). Mindezek mellett a *C. parapsilosis* az intenzív osztályokon kezelt, valamennyi legyengült immunstátuszú beteg körében is előfordul (Silva 2010). Ezen csoportok érintettsége többek között annak köszönhető, hogy a faj izolátumai megtalálhatóak az újszülötteknek adott

magas glükóz, illetve lipid tartalmú mesterséges tápanyagforrásokban, valamint képes számos, nem megfelelően sterilizált orvosi eszközön biofilmet képezve fennmaradni (Solomon és mtsi., 1984; Weems és mtsi., 1987; Lupetti és mtsi., 2002; Kojic és Darouiche 2004). Ilyen eszközök lehetnek például a vénás katéterek, protézisek és egyéb beültetésre váró implantátumok is. A *C. parapsilosis* klinikai izolátumok további jellegzetességei közé tartozik, hogy a *C. albicans*-szal ellentétben képesek primer kolonizáció nélkül is invazív fertőzést kiváltani, és az echinocandin típusú antifungális szerekkel szemben is nagyfokú rezisztenciát mutatnak (Perlin 2007; Trofa és mtsi., 2008). Mindezen tényezők és a *C. parapsilosis* által okozott fertőzések egyre növekvő gyakorisága hatékony kimutatási és kezelési módszerek kifejlesztését teszi szükségessé.

3.5. A *Candida parapsilosis* általános jellemzése

1995-ben megállapították, hogy a *C. parapsilosis*-ként azonosított izolátumok között jelentős mértékű genetikai változatosság található. Az egyes izolátumok nemcsak genetikai markereikben, hanem a kórfolyamat kiváltó képességükben, illetve az antibiotikumokkal szembeni érzékenységükben is drasztikus mértékben különböztek. A beazonosított izolátumokat három csoportra osztották (I., II., és III.) (Lin és mtsi., 1995). Ezen csoportokat, a további molekuláris vizsgálatoknak köszönhetően, ma három különböző fajként kezelik, melyek a következők: *Candida sensu stricto* (korábban I. csoport) vagy *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis* (II. csoport) és *C. metapsilosis* (III. csoport) (Tavanti és mtsi., 2005). A klinikumban található izolátumok döntő többsége *C. parapsilosis* faj, melyet előfordulási gyakorisága alapján a *C. orthopsilosis* követ, és végül a legkevésbé virulens *C. metapsilosis* (Gácsér és mtsi., 2007a; Bertini és mtsi., 2013; Németh és mtsi., 2013). Az egyes fajok elkülönítése terápiás és epidemiológiai szempontból is fontos.

A *C. parapsilosis* diploid organizmus, amely kizárólag ivartalan módon szaporodik és a CUG klád tagja. Megjelenését tekintve, a sejtek előfordulhatnak élesztő formában vagy képezhetnek pszeudohifát. Az általa létrehozott kolóniákra jellemző lehet a sima vagy ráncos telepmorfológia, de bizonyos izolátumok esetén megfigyeltek koncentrikus, illetve gyűrött telepeket is (Laffey és Butler 2005). Ez utóbbiak esetében a pszeudohifa megjelenési forma dominál az élesztő struktúra felett (Laffey és Butler 2005).

A CDC317 nevű izolátum genomszekvenciája 2009 óta áll rendelkezésünkre, melynek mérete 13 Mb és közel 5700 gént tartalmaz (Butler és mtsi., 2009). A *C. parapsilosis* genomszekvencia elemzése során kiderült, hogy a közeli rokonnak vélt *C. albicans* és *C. parapsilosis* között lényegesen kisebb a hasonlóság, mint azt várni lehetett

(~59%). Ez annak köszönhető, hogy számos olyan gén található a *C. parapsilosis* genomjában, ami nem rendelkezik *C. albicans* homológgal, illetve magas azon gének száma is, amelyek csak *C. albicans*-ban vannak jelen (Nosek és mtsi., 2009). Ezen eredmények a *C. albicans* vizsgálataiból nyert információk általános érvényű hasznosítása helyett a NAC fajok külön-külön történő vizsgálatára hívják fel a figyelmet.

3.6. Virulencia faktorok és azok szerepe a fertőzés során

Egy patogén gomba esetén a helyi vagy szisztémás fertőzés kialakításához elengedhetetlen olyan, úgynevezett virulencia faktorok birtoklása, amelyek elősegítik a gazda kolonizációját. A kialakulásukról szóló, egyik legelfogadottabb elmélet szerint ezek a faktorok a gazdaszervezetben uralkodó, korlátozott környezeti körülményekhez történő adaptáció eredményei, amik a gomba túlélési esélyeit növelik. A gazdaszervezetbe történő bejutást követően számos olyan transzkripcionális változás következik be a patogén organizmusban, amelyek az adott környezetben elősegítik a túlélést, az alkalmazkodást és végül az abban történő elszaporodást (Hube 2004). Az egyes szignalizációs útvonalak aktiválódása függ a fertőzés kiindulási helyétől (pl. szövet típusától), az abban uralkodó környezeti körülményektől és a fertőzés stádiumától is (Hube 2004). *C. albicans* esetében például bizonyos gének expresszióját (pl. *PHR1* és *PHR2*, ld. 3.6.6. fejezet) a mikro környezet kémhatása szabályozza, így hozzájárulva a fertőzés kialakulásához (De Bernardis és mtsi., 1998).

A gombafertőzést illetően 4 fő stádiumot tudunk elkülöníteni: (1) kolonizációt, (2) lokális felszíni fertőzést, (3) mélyre hatoló, lokális fertőzést és végül (4) az egész szervezetet érintő, szisztémás fertőzést (Naglik és mtsi., 2003). A *Candida* fajok közül a *C. albicans* virulencia faktorai a leginkább jellemzettek. Az elmúlt pár évtizedben azonban intenzív kutatás irányult a NAC fajok, köztük a *C. parapsilosis* virulencia faktorainak vizsgálatára is. A *C. parapsilosis* virulencia faktorai közé tartozik például az adhézión és biofilmképző képesség, a másodlagos morfológia váltás, a különböző hidrolitikus enzimek szekréciója, továbbá a gomba gazdával vívott kompetíciója a szervezetben fellelhető létfontosságú nyomelemekért. Az egyes virulencia faktorokat a továbbiakban részletesen tárgyaljuk.

3.6.1. Adhéziós képesség és adhezinek

A *Candida* fajok virulencia faktorai közé tartozik a sejtek adhéziós képessége, amely elősegíti a sejtek egymáshoz tapadását, illetve azok számos felszínen (epitél sejtek, akril anyagú felszínek) történő rögzülését és azt követően a biofilm képzését (Panagoda és mtsi., 2001). Egyes tanulmányok az adhéziós képességet a sejt felszín hibrofób tulajdonságával hozzák összefüggésbe, mások nem találtak ilyen jellegű korrelációt (Panagoda és mtsi., 2001; Raut és mtsi., 2010).

A sejtek adhéziós képességét elősegítik az úgynevezett *ALS* (agglutininszerű sorozat) gének által kódolt sejt felszíni glikoproteinek vagy más néven adhezinek (Hoyer 2001). *C. albicans* esetén eddig 8 különböző *ALS* gént írtak le (*ALS1-7*, *ALS9*), melyek közül kiemelt szereppel az *ALS3* által kódolt glikoprotein rendelkezik mind a gombasejtek kitapadása, mind pedig azok virulenciája szempontjából (Liu és Filler 2011). A Hwp1 (hifa sejt fal protein 1), az Als3-hoz hasonlóan, egy hifa-asszociált adhezin (kifejezetten a fertőzés során képzett valódi hifák felszínén expresszálódik) és szintén jelentős szereppel rendelkezik a fertőzés kialakításában (Staab és mtsi., 1999). Adhéziót követően a kitapadt sejtek biofilmet képeznek, amelyhez az Als3 és a Hwp1 glikoproteinek is nagymértékben hozzájárulnak (Nobile és mtsi., 2008). A gombasejtek adhéziójában részt vesznek továbbá integrinszerű sejt felszíni fehérjék, proteázok és egyéb sejt fal asszociált fehérjék is (Zhu és Filler 2010; Naglik és mtsi., 2011; Mayer és mtsi., 2013).

Bár a *C. parapsilosis* genomban öt különböző *C. albicans ALS* ortológ is megtalálható, azok virulenciában betöltött szerepéről keveset tudunk (Rossignol és mtsi., 2009), emellett az Als proteineket kódoló gének száma izolátumonként is változik (Pryszcz és mtsi., 2013). Az újabb kutatások azonban elősegítik a *C. parapsilosis* adhéziót elősegítő fehérjék pontos szerepének megismerését. Egy friss tanulmány szerint a *CPAR2_404800* azonosító alatt szereplő Als kódoló régió elengedhetetlen a sejtek adhéziós képességéhez és aktív szerepet játszik a gomba virulenciájában is (Bertini és mtsi., 2016). Egy másik csoport olyan *C. parapsilosis* sejt felszíni (többek között Als) proteinek beazonosításáról számol be, amelyek közvetlenül képesek a gazdaszervezet extracelluláris mátrix (ECM) elemeihez kötődni (Kozik és mtsi., 2015). A gomba adhéziós képességének vizsgálata tehát a jövőben is fontos, mivel nagy valószínűséggel a gazda által felállított mechanikai gát átlépésének első lépése lehet.

3.6.2. Szekretált hidrolitikus enzimek és jelentőségük

Számos tanulmány támasztja alá, hogy a hidrolitikus enzimek szekréciója jelentős mértékben hozzájárul a *Candida* fajok fertőzőképességéhez. Ezek közül kiemelendő a savas proteinázok, lipázok és foszfolipázok szerepe, amelyek a gazda szöveiteinek károsításán keresztül tápanyaghoz juttatják a gombasejteket és védelmet nyújthatnak a gazdaszervezet védekező mechanizmusaival szemben is. Mivel a *Candida* fajok közül a legnagyobb klinikai jelentőséggel a *C. albicans* rendelkezik, ezért mindezidáig a legtöbb kutatás is ezen faj hidrolitikus enzimeinek vizsgálatára irányult. A továbbiakban a *C. albicans* és a *C. parapsilosis* esetén rendelkezésünkre álló ismereteinket tárgyaljuk.

Savas proteinázok

A szekretált savas proteinázok (secreted aspartyl proteinase, Sap) fertőzésben betöltött szerepéről számos tanulmány szolgál bizonyítékokkal. A patogén *Candida* fajok egyik sajátossága, hogy nagy mennyiségben szekretálnak proteinázokat, míg a kevésbé virulens (pl. *C. orthopsilosis*, *C. metapsilosis*) vagy apatogén fajokra (pl. *C. kefyr*) ez nem jellemző (Naglik és mtsi., 2003). Elmondható az is, hogy a bőr felszínéről nyert izolátumok proteolitikus aktivitása is lényegesen alacsonyabb, mint a fertőzésekből izolálható törzseké. Tehát a patogenitás mértéke és a szekretált proteináz aktivitás között szoros a korreláció.

C. albicans esetén eddig 10 különböző *SAP* gént írtak le (*SAP1-SAP10*), melyek által kódolt enzimek összefüggésbe hozhatóak invazív szöveti penetrációval (Naglik és mtsi., 2003). A Sap-ok élettani jelentősége, hogy széles körű szubsztrátspecifitásuk miatt számos extracelluláris mátrix fehérjét (kollagén, fibronectin, laminin, stb.), valamint immunológiai szempontból is fontos antimikrobiális peptidet (immunoglobulinok, laktoferrin, komplement rendszer fehérjéi) képesek lebontani, ami elengedhetetlen a gazda szöveiteibe történő behatoláshoz (Naglik és mtsi., 2003). A Sap enzimek aktivitása továbbá összefüggésbe hozható a gazdaszervezet fehérjéinek alternatív energiaforrásként történő hasznosításával, a gombasejtek adhézións képességének növelésével (feltehetőleg a gazdasejtek/szövetek felszínének módosításán keresztül), illetve a gomba sejtfal integritásával is (Naglik és mtsi., 2003; Buu és Chen 2013). A *C. albicans* szekretált proteináz kódoló gének közül kiemelendő a *SAP4* és *SAP6* szerepe, amelyek összefüggésbe hozhatóak a gomba lokális, de kiváltképp szisztémás elterjedésével (Naglik és mtsi., 2003).

C. parapsilosis esetén 3 *SAPP* kódoló régiót azonosítottak (*SAPP1-SAPP3*). A három gén által kódolt savas proteináz közül a Sapp1 a leginkább jellemzett. A *C.*

parapsilosis *SAPP1* gén duplikációjának köszönhetően két kódoló régiót tudunk elkülöníteni, a *SAPP1a*-t és *SAPP1b*-t. A korábban csoportunkban végzett kísérletek eredményeként elmondható, hogy a *sapp1a* Δ/Δ -*sapp1b* Δ/Δ homozigóta deléciós mutáns törzs humán perifériás vérből származó mononukleáris sejtek (PBMC) és azokból differenciáltatott makrofágok (PBMC-DM) *in vitro* fertőzését követően jelentős mértékben csökkent virulenciát mutatott (Horvath és mtsi., 2012). Így alátámasztásra került a *C. parapsilosis* szekretált proteinázok virulenciában betöltött szerepe is.

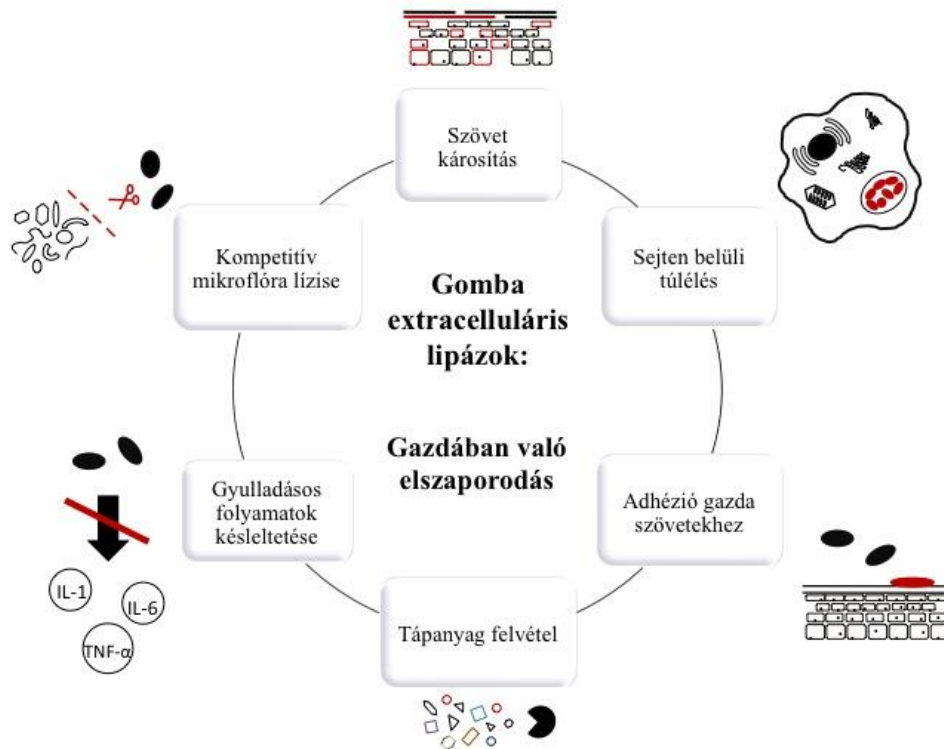
Szekretált foszfolipázok

A *C. albicans* szekretált foszfolipázok virulenciában játszott szerepét több tanulmány is alátámasztja. Barrett-Bee és munkatársai megfigyelték, hogy az epitéliális sejtek felszínén hatékonyabban megtapadni képes *C. albicans* klinikai izolátumok magas foszfolipáz aktivitással rendelkeztek (Barrett-Bee és mtsi., 1985). Egy további tanulmány igazolta, hogy a foszfolipázok a gazdasejt károsításában is részt vesznek (Pugh és Cawson 1977).

A *C. parapsilosis* esetén azonban a foszfolipáz virulenciában játszott szerepe vitatható. Egy korábbi átfogó tanulmány arról számol be, hogy a *C. parapsilosis* klinikai izolátumok közel 50%-ánál detektálható foszfolipáz aktivitás (Ghannoum 2000). Ezzel szemben mások nem detektáltak enzimaktivitást egyetlen *C. parapsilosis* izolátum vizsgálata során sem (Shimizu és mtsi., 1996; Kantarcioglu és Yucel 2002). Így az enzim virulenciában játszott szerepe *C. parapsilosis*-ban továbbra is kérdéses.

Szekretált lipázok

A gomba szekretált lipázainak fertőzésben játszott szerepe rendkívül szerteágazó (2. ábra). A szekretált lipázok egyik legfontosabb szerepe a gazdaszervezet lipid forrásainak bontása és ezzel tápanyag biztosítása a gombasejtek számára. Szerepet játszanak továbbá a gombasejtek gazdaszöveteken történő kitapadásában, a szövetkárosításban, feltehetőleg a kompetitív mikroflóra lízisében és hozzájárulnak az immunrendszerrel szembeni védekezéshez is (Tóth, R. és mtsi., 2016). Számos tanulmány bizonyítja, hogy a gomba szekretált lipázai a gazda immunválaszát sejt, szövet és szervezet szinten egyaránt befolyásolják.



2. ábra. A gomba szekretált lipázok virulenciában betöltött szerepe. (Tóth, R. és mtsi., 2016).

C. albicans esetében 10 különböző lipáz enzim kódoló gént (*LIP1-LIP10*) azonosítottak (Hube és mtsi., 2000). Ezek a fertőzést követően különbözőképpen szabályozódnak és az egyes gének expressziója függ a fertőzés adott stádiumától (Stehr és mtsi., 2004). A gomba virulenciájában a *LIP5* és a *LIP8* gének töltik be a legjelentősebb szerepet (Stehr és mtsi., 2004; Gácsér és mtsi., 2007b).

A *C. albicans*-szal ellentétben, *C. parapsilosis*-ban csak két lipáz szekrécióért felelős gén található meg. Ezen gének a *C. albicans* *LIP1*-el mutattak nagyfokú homológiát és a *LIP1* és *LIP2* elnevezést kapták (Neugnot és mtsi., 2002). A *LIP1* és *LIP2* gének *Saccharomyces cerevisiae*-ben és *Pichia pastoris*-ban történő expresszálatása során bizonyították, hogy a két gén közül csak a *LIP2* kódol funkcionális fehérjét (Neugnot és mtsi., 2002; Brunel és mtsi., 2004). A *C. parapsilosis*-ban előállított *lip1Δ/Δ-lip2Δ/Δ* - lipáz szekrécióra képtelen - homozigóta deléciós törzs alkalmazásával bizonyításra került a szekretált lipázok virulenciában betöltött szerepe is. Rágcsáló és humán primer sejtek alkalmazásakor nagyobb hatékonyságú volt a *lip1Δ/Δ-lip2Δ/Δ* sejtek eliminálása és hatékonyabb gyulladásos immunválasz jött létre, mint a vad típusú sejtek jelenlétében (Gácsér és mtsi., 2007c; Nagy és mtsi., 2011; Tóth, A. és mtsi., 2014a). Ez alapján elmondható, hogy a gomba szekretált lipázai modulálhatják a gazda gyulladásos

folyamatait (Gácsér és mtsi., 2007c; Tóth, A. és mtsi., 2014a). Később, a fagocitózis egyes stádiumainak vizsgálata során bizonyítást nyert, hogy a szekretált lipázok hiánya hatékonyabb gombasejt felismerést, makrofág aktivációt és fagocitózist eredményezett (Tóth, R. és mtsi., 2015).

Korábban bizonyítottuk, hogy más *Candida* fajokhoz hasonlóan, a *C. parapsilosis* is rendelkezik gazdasejten belüli, úgynevezett túlélési stratégiákkal (Tóth, R. és mtsi., 2014b). Megjegyzendő, hogy a lipáz deficiens sejtek bekebelezését követően korai fago-lizoszóma aktiváció történik (Nagy és mtsi., 2011; Tóth, A. és mtsi., 2014a). Ez alapján arra következtethetünk, hogy a gomba szekretált lipázai befolyásolhatják a fagocitózist követő fago-lizoszóma kolokalizációt. Így az extracelluláris lipázok is szerepet játszhatnak a gomba intracelluláris túlélő stratégiáiban.

Rekonstruált (mesterségesen előállított) humán szövetek *lip1Δ/Δ-lip2Δ/Δ* sejtekkel történő fertőzését követően a szövetkárosodás mértéke minimális volt és a kezelt szövet nem mutatott hisztopatológiai elváltozásokat a vad típusú törzssel szemben. Továbbá a *lip1Δ/Δ-lip2Δ/Δ* sejtek epitél felszínhez történő kitapadása is lényegesen rosszabbnak minősült, mint a vad típusú törzs esetén (Gácsér és mtsi., 2007c). Mindezekkel tehát bizonyításra került, hogy a *C. parapsilosis* extracelluláris lipázok szerepet játszanak a gazdaszövethez történő adhézióban és a szövetkárosításban is.

Emellett, az *in vivo* emlős állatmodellekkel elvégzett kísérletek eredményei megerősítették a gomba szekretált lipázok szisztémás fertőzésben játszott szerepét is, mivel a *lip1Δ/Δ-lip2Δ/Δ* sejtek esetében csökkent az egyes szervek (pl. máj, vese) kolonizációjának mértéke és gyorsabb volt a gomba eliminációja, mint a vad típusú törzsé (Gácsér és mtsi., 2007c; Trofa és mtsi., 2011).

3.6.3. A másodlagos morfológia váltás jelentősége

A morfológiai dimorfizmus jelensége számos *Candida* fajra jellemző, ami a gomba virulenciájának egyik legfontosabb meghatározója. A másodlagos morfológia váltás főbb okai közé sorolható a gazda szérum egyes komponenseinek jelenléte, a megváltozott széndioxid tenzió, megváltozott hőmérsékleti körülmények és pH, egyes nyomelemek hiánya, éhezés vagy ezek kombinációja (Brown, A. J. és Gow 1999). A folyamatot számos transzkripció faktor által szabályozott komplex mechanizmus sorozat irányítja.

Korábbi tanulmányokban bemutatták, hogy a valódi hifa létrehozására képtelen *C. albicans* sejtek jelentős mértékben csökkent virulenciát mutatnak, míg a hiperfilamentáló fenotípusú gombasejtek virulensebbek (Lo, H. J. és mtsi., 1997; Kadosh és Johnson 2001;

Carlisle és mtsi., 2009). Később bizonyításra került, hogy az élesztő formában maradt gombasejtek virulenciájának csökkenése a másodlagos struktúra elvesztése mellett, egyben az úgynevezett hifa-asszociált proteinek hiányának is köszönhető (Connolly és mtsi., 2013). Ezzel alátámasztották, hogy a morfológia váltás következtében számos, a fertőzőképességet egyéb módon is befolyásoló gén transzkripciója is megváltozik, amelyek a fertőzés egyes stádiumait közvetve vagy közvetlenül is befolyásolhatják. Például a kifejezetten hifa-asszociált Als3 (agglutinin-szerű sorozat 3), Hwp1 (hifa sejtfal protein 1) és Rbt5 (*TUP1* által szabályozott protein) glikoproteinek a sejtek adhéziós képességét és a biofilmképzést is elősegítik (Staab és mtsi., 1999; Liu és Filler 2011). Emellett, egyes savas proteináz kódoló gének expressziója és az élesztő-hifa átalakulás is összehangolt szabályozás alatt állhat. Naglik és mtsai. (2003) vizsgálataiban például az élesztő formában ragadt sejtek csökkent *SAP4* és *SAP6* expressziót mutattak, míg a hiperfilamentáló fenotípussal rendelkező mutáns sejtekben ugyanezen gének expressziója lényegesen magasabb volt (Naglik és mtsi., 2003).

A hifa, mint másodlagos struktúra azonban önmagában is fontos szereppel bír, hiszen fizikai-mechanikai úton, ún. aktív penetrációval járul hozzá a gazda szöveteinek és sejteinek károsításához. Ugyanakkor a gazdasejtekbe történő bejutás történhet passzív módon is (indukált endocitózis), úgynevezett invazin fehérjék segítségével, melyhez szintén hozzájárulhatnak hifa-asszociált sejtfelszíni fehérjék (pl. Als3) (Phan és mtsi., 2007). Emellett, a hifa fontos szereppel bír a gazdasejtekből történő kijutásban is: *C. albicans* sejtek fagocitózisát követően azok aktívan képesek valódi hifa képzésre, ami a fagocita sejt membránjának lízisét okozza. A makrofágokból történő menekülés ezenkívül exocitózis indukálással is történhet, amit élesztő sejtek és hifaképző sejtek esetén is megfigyeltek (Bain és mtsi., 2012). Bár a jelenség pontos mechanizmusa nem ismert, lehetséges, hogy sejtfal-asszociált fehérjék is részt vesznek az exocitózis indukálásában.

C. parapsilosis esetében lényegesen kevesebb információ áll rendelkezésünkre a gomba másodlagos morfológiájának virulenciában játszott szerepéről. Csoportunk által már korábban bizonyításra került, hogy a gomba által képzett pszeudohifák virulenciában betöltött szerepe jelentős, ugyanis a képletek nagyobb mértékű gazdasejt és szövet károsítást váltottak ki és ellenállóbbaknak is bizonyultak a gazda immunsejtjeivel szemben (Németh és mtsi., 2013). Egy, a sejt-sejt interakciót részletesebben vizsgáló későbbi tanulmány szerint nincs összefüggés a pszeudohifák hossza (<20 μm esetén), sem pedig azok térbeli elhelyezkedése és a fagocitózis hatékonysága között (Tóth, R. és mtsi., 2014b). Ez azonban ellentmond a *C. albicans* esetében megfigyeltekkel. Habár *C. albicans* esetében sem találtak összefüggést a hifák hossza (<20 μm esetén) és a fagocitózis

hatékonysága között, azonban a makrofágok hifa sejtek iránt mutatott affinitását befolyásolta azok térbeli elhelyezkedése (Lewis és mtsi., 2012). Megfigyelték azt is, hogy a nyúlvánnyal rendelkező sejtek esetén a makrofágok nagyobb valószínűséggel közelítettek a blasztospóra (élesztő) irányából, mint az abból eredő hifák irányából. A jelenség magyarázata az élesztő és valódi hifa struktúrák különböző sejtfal szerkezetében állhat (Lewis és mtsi., 2012). A két fajban megfigyeltek alapján elmondható, hogy a fagocita sejtek a pszeudohifákat és a valódi hifákat másként ismerik fel. A *C. parapsilosis* által képzett pszeudohifák a fagocitózist nagy mértékben nem befolyásolják (Tóth, R. és mtsi., 2014b), azonban hozzájárulnak a gomba gazdasejt- és szövetkárosító képességéhez, illetve a biofilm képzéséhez (Laffey és Butler 2005; Németh és mtsi., 2013).

Mindezek alapján kétségtelen, hogy a másodlagos morfológia váltás jelentős mértékben hozzájárul a gomba virulenciájához, ám az, hogy ez mennyiben tulajdonítható a struktúra fizikai jelenlétének és mennyiben a morfológia váltással járó egyéb tulajdonságok – úgymint sejtfelszíni proteinek, megváltozott szignalizációs útvonalak – megváltozásának, továbbra is kérdéses.

3.6.3.1. A másodlagos morfológia váltás molekuláris mechanizmusai

A legtöbb rendelkezésünkre álló információ az élesztőgombák morfológia váltásáról, a *S. cerevisiae* tanulmányozásából ered. Ismert, hogy a másodlagos morfológia kialakításának folyamatát több szignalizációs útvonal is szabályozza. Ezek közül a cAMP-PKA (ciklikus adenozin monofoszfát-protein kináz A) és a MAPK (mitogén aktivált protein kináz A) útvonalak éhezés (nitrogén vagy szénforrás hiány) következtében aktiválódnak (Madhani és mtsi., 1997; Pan és Heitman 2002). *S. cerevisiae*-ben mindkét szignalizációs útvonal egyik legfontosabb downstream eleme a *FLO11* (pehelyszerű fenotípust kiváltó gén 11) gén (Lo, W. S. és Dranginis 1996; Rupp és mtsi., 1999). A gén expressziója az invazív és fonalas növekedést, továbbá a biofilmképzést is számottevően befolyásolja (pozitív regulátor). Ugyanakkor a *FLO11* átíródását számos transzkripciós és egyéb faktor szabályozza. Ilyenek például a Rim101 (multifunkcionális regulátor), Flo8 (PKA aktiváció), Ste12/Tec1 (MAPK aktiváció), Mss11 (PKA és MAPK aktiváció), Rpd31 hiszton deacetiláz komplex 3 tagja, Mfg1 (fonalas növekedés morfológiai szabályozója) és sokan mások (Madhani és Fink 1997; Rupp és mtsi., 1999; Barwell és mtsi., 2005; van Dyk és mtsi., 2005; Barrales és mtsi., 2008; Ryan és mtsi., 2012). A felsoroltak közül számos gén konzervált, így megtalálható például *C. albicans*-ban is. Ismert, hogy az Mfg1, Flo8 és Mss11 faktorok együtt végzik a fonalas növekedés szabályozását *C. albicans*-ban

(Ryan és mtsi., 2012). Az említett három pozitív regulátor bármelyikének hiánya filamentációban, biofilmképzésben és invazív növekedésben is bekövetkező rendellenességekhez vezet. Ezek fertőzésben játszott szerepét igazolja, hogy a *mfg1Δ/Δ* mutáns sejtek *Galleria mellonella* infekciós modellben csökkent virulenciát mutattak (Ryan és mtsi., 2012).

A morfológia váltást azonban bizonyos negatív regulátorok is szabályozzák. *C. albicans*-ban ezek közé sorolható legjelentősebb faktorok például az Rfg1 (csökkent fonalas növekedés), Nrg1 (glükóz szabályozta gének represszora) és Tup1 (deoxitimidin 5'-monofoszfát felvétel szabályozás), melyek - feltehetőleg együttműködve - represszálják a fonalas növekedésért felelős gének kifejeződését (Braun és Johnson 1997; Braun és mtsi., 2001; Kadosh és Johnson 2001). Kódoló génjeikben bekövetkező mutáció esetén a sejtek indukció nélkül is fonalas növekedést, valamint csökkent mértékű virulenciát mutattak. Az *rfg1Δ/Δ*, *nrg1Δ/Δ* és *tup1Δ/Δ* deléciós törzseknél továbbá, a megváltozott morfológián kívül, más, sejt-fal-asszociált gének (*ALS3*, *HWPI*, stb.) és sejtosztódást szabályozó elemek expressziójában is változás következett be (Kadosh és Johnson 2005). Mindezen folyamatok arra utalnak, hogy a gombasejtek morfológia váltását egy komplex regulátoros hálózat szabályozza.

Az *SPT3* szerepe a morfológia váltásban

Egy további, fonalas növekedést szabályozó faktor az Spt3 (Ty elemek gátlója). Ez a transzkripciós faktor az úgynevezett SAGA (Spt-Ada-Gcn-Acetiltranszferáz), valamint SAGA-szerű további komplexek (SLIK és SALSA) tagját képezi, amelyek több, mint 20 alegységből állnak (Dudley és mtsi., 1999; Pray-Grant és mtsi., 2002; Sterner és mtsi., 2002). A rendkívül konzervált SAGA transzkripciós koaktivátor komplex az élesztő genomban található gének mintegy 10%-át szabályozza (Huisinga és Pugh 2004). Számos funkcióval rendelkezik, amelyek közül kiemelendő a hiszton acetil transzferáz aktivitás (Gcn5 alegység), telomer fenntartás és az RNS-polimeráz II függő transzkripció szabályozás (Brownell és mtsi., 1996; Bhaumik és Green 2002; Atanassov és mtsi., 2009). Az evolúciósan szintén konzervált Spt3 protein bizonyos gének promóterében található TATA box elemekhez történő TBP (TATA-szekvencia kötő fehérje) fehérjék kötődését szabályozza (Bhaumik és Green 2002). A szabályozás lehet átíródást indukáló és gátló hatású is. A transzkripciós faktor önmagában az élesztő genom génjeinek körülbelül 3%-át szabályozza (Lee és mtsi., 2000). Az *SPT3* deléciója univerzálisan érinti valamennyi SAGA-szerű komplex TBP toborzó funkcióját.

Korábbi tanulmányok alapján *S. cerevisiae*-ben az Spt3 olyan folyamatok szabályozásában vesz részt, amelyek a sejtek életciklusának G1/START átmenetében történnek. Ilyen például a sporuláció, párosodás (mating), valamint az invazív és fonalas növekedés is (Hirschhorn és Winston 1988; Lo, W. S. és Dranginis 1996; Winston és Sudarsanam 1998).

A Laprade és munkatársai által létrehozott *spt3Δ/Δ* deléciós törzs jellegzetessége, hogy nem képes másodlagos struktúrák létrehozására, sem pedig invazív növekedésre. A törzsnél továbbá növekedési rendellenességet és sima telepmorfológiát figyeltek meg (Laprade és mtsi., 2002). Bizonyították továbbá, hogy az Spt3 a *FLO11* gén átíródását is jelentős mértékben befolyásolja, ami a fonalszerű növekedés elindításához elengedhetetlen (ld. 3.6.3.1.). *C. albicans*-ban az *SPT3* funkcionális ortológjának azonosítására is sor került. A *CaSPT3* *S. cerevisiae* *spt3Δ/Δ* deléciós törzsbe juttatása teljes mértékben helyreállította a gén hiányában bekövetkezett rendellenességeket (Laprade és mtsi., 2002). Azonban meglepő módon, a gén hiánya *C. albicans*-ban hiperfilamentáló fenotípust okozott. A sejtek induktív körülmények hiányában is rendkívüli módon megnyúlt hifákat hoztak létre, amelyek aggregálódva “pehelszerű” struktúrákat képeztek. Emellett a *C. albicans* *spt3Δ/Δ* deléciós törzs esetén gyűrött telepmorfológiát, növekedési rendellenességet és csökkent virulenciát is tapasztaltak (Laprade és mtsi., 2002).

Ezek alapján elmondható, hogy az Spt3 jelentős szereppel rendelkezik a másodlagos morfológia kialakításában. Bár az *SPT3* konzervált funkcióval rendelkezik, a két fajban történő eltávolítása során kapott ellentétes fenotípusok arra utalnak, hogy szabályozottsága ellentétes lehet *C. albicans*-ban és *S. cerevisiae*-ben. Emellett *C. albicans*-ban az Spt3, az eddig ismert represszorokon (Tup1, Nrg1, Rfg1) kívül, a fonalas növekedés egy további negatív regulátoraként került azonosításra. Mivel *S. cerevisiae*-ben a SAGA transzkripciós faktor komplex és így az Spt3 is a Tup1, Nrg1 és Rox1 (Rfg1 *S. cerevisiae* megfelelője) faktoroktól eltérően, teljesen más szabályozó funkcióval rendelkezik, ezért feltételezhető, hogy az Spt3 általi morfológia szabályozás független az eddig leírt mechanizmusoktól (Laprade és mtsi., 2002).

3.6.4. Kompetíció a gazdaszervezet nyomelemeiért

Bizonyos nyomelemek – úgymint a vas, réz, cink, mangán, stb. – minden élő organizmus számára kis mennyiségben ugyan, de esszenciálisak a túléléshez és növekedéshez, mivel számos fehérje és enzim megfelelő működését biztosítják. Ezen fehérjék által szabályozott

legfontosabb folyamatok közé tartozik például a sejtlegzés, sejt anyagcsere és a DNS szintézis (Munoz és mtsi., 2009).

Mivel egyes nyomelemek elérhetősége korlátozott és mennyiségük kevés, ezért egy fertőzés során folyamatos a patogén gomba és a gazdaszervezet nyomelemekért folytatott kompetíciója. A gazdaszervezetben egyes nyomelemek (pl. vas) rendszerint nagy affinitású fehérjékhez kötött állapotban találhatóak meg, ami korlátozza bizonyos mikroorganizmusok számára azok hozzáférhetőségét. Azonban egyes gombafajok, többek között a *C. albicans* is, különböző stratégiákat fejlesztettek ki, amelyek segítségével a kötött állapotú fémionok számukra is elérhetővé válhatnak (Almeida és mtsi., 2009).

Míg a réz és mangán megszerzése érdekében folytatott stratégiák és az azok virulenciában játszott szerepe kevésbé kutatott, addig az extracelluláris térből történő cink- és vasfelvétel mechanizmusai már számos gombafajban jól ismertek. *C. albicans*-ban a gazdaszervezettől történő cink megszerzése úgynevezett cinkofór (cink-kötő) fehérjékkel zajlik (*Pra1*), melyeket a gomba a mikro környezetébe szekretál (Citiulo és mtsi., 2012). Ezt követően a gombasejtek a sejtfelszínen található cink transzporterek (*Zrt1*) segítségével veszik fel a szállító fehérjéktől a cink elemeket (Citiulo és mtsi., 2012). A cinkofór fehérjék extracelluláris térbe történő szekrécióját az adott környezeti körülmények közül leginkább a közeg pH-ja befolyásolja (alkalikus közeg indukáló hatása). A *PRA1* deléciója nem csupán a gombasejt cink felvételét szabályozza, hanem a gazdasejtek károsodásának mértékét is (Citiulo és mtsi., 2012). Tehát a gomba cink asszimiláló képessége, a fertőzés bizonyos stádiumaiban, befolyásolhatja annak virulenciáját.

A legtöbb kutatás eddig a patogén gombák azon stratégiáinak megismerésére irányult, amelyek a gazdától történő vasforrás megszerzését segítik elő. Ezeket a következő fejezetben tárgyaljuk.

3.6.4.1. A patogén gombák vasforrás hasznosítási mechanizmusai

A gazdaszervezetben található vas ionok citotoxikus hatásuk miatt (pl. reaktív oxigén gyök képződésekor katalizátor funkció) szabad formában nem, csak proteinekhez kötött állapotban találhatóak meg (Hiraishi és mtsi., 1991). Ilyen fehérje például a ferritin, ami az intracelluláris térben köti meg a vas ionokat. Egy további vaskötő protein a transferrin, amely a vérben keringő vas nyomelemeket köti meg és szállítja. A legtöbb vas ion azonban a vörösvértestekben található hemoglobin részét képezi, ahol az az oxigén kötésében és szállításában játszik szerepet (Munoz és mtsi., 2009). Mivel a vas mint nyomelem a gazdaszervezetben csak különböző proteinekhez kötött állapotban található meg, ezért

annak felszabadításához a patogén gombák különböző stratégiákat fejlesztettek ki (Almeida és mtsi., 2009).

Ezek egyike a hem-vas felszabadító rendszer, ami a hemoglobinhoz (és egyéb hem-fehérjékhez) kötött vas ionok felszabadítását végzi (Moors és mtsi., 1992). Korábban bizonyítást nyert, hogy a *C. albicans* rendelkezik hemolitikus aktivitással (Watanabe és mtsi., 1999). A hemolízist követően a gomba plazmamembrán felszínén található hem-receptorok (pl. Rbt5, Csa1, Pga7) megkötik a hemoglobint, melyet annak endocitózisa követ, majd különböző intracelluláris enzimek segítségével (pl. Hmx1p) zajlik a vas porfirin vázból történő felszabadítása (Santos és mtsi., 2003; Weissman és Kornitzer 2004).

Az extracelluláris térből történő vas asszimiláció megvalósulhat sziderofórok (vaskötő fehérjék) segítségével is. Eddigi ismereteink alapján a *C. albicans* sejtek nem képesek sziderofórok termelésére, azonban koinfekció vagy a közegben előforduló mikroflóra jelenléte esetén képesek más fajok vasat tartalmazó sziderofórait megszerezni (Heymann és mtsi., 2002; Almeida és mtsi., 2009). A jelenséget vas parazitizmusként is ismerik.

A fentiek mellett vas asszimiláció vas reduktáz rendszer segítségével is történik (Almeida és mtsi., 2009). Ennek során a patogén a gazda vasraktározó fehérje komplexeiből (pl. transferrin, ferritin) szerzi meg a nyomelemet. Patogén organizmusok számára a transferrin hasznosíthatóbb vasforrásnak bizonyult, mint a rendkívüli módon stabil ferritin, amelyből csak savas kémhatású közegben lehetséges a vas felszabadítása (Almeida és mtsi., 2008). A gombasejtek a plazmamembránon található felszíni vasreduktázok (*S. cerevisiae*-ben Fre proteinek) segítségével végzik a vas ionok kelátortól történő felszabadítását és az oldhatatlan három értékű vas ionok (Fe^{3+}) kétértékű vas ionokká (oldható Fe^{2+}) történő átalakítását. Az így felszabaduló vas ionokat multiprotein komplexek továbbítják az intracelluláris térbe. A multiprotein komplexek egyaránt tartalmaznak rézfüggő vasoxidázokat (Fe^{2+} oxidációja a kevésbé toxikus Fe^{3+} -vá) és permeázokat (Fe^{3+} transzport) is (Almeida és mtsi., 2009). Ez előbbi esetén megjegyzendő a réz vasfelvételben játszott szerepe, mivel a rézfüggő vasoxidáz működésének hiányában a transferrinből történő vas elvonás sikertelen (Almeida és mtsi., 2008). A vas reduktáz rendszer az intracelluláris vasraktárok mozgósításában, illetve a sziderofóroktól történő vas megszerzésében is szerepet játszik (Yun és mtsi., 2001; Singh és mtsi., 2007).

C. albicans-ban már számos *S. cerevisiae* FRE ortológot azonosítottak, melyek közül a *RBT2* (*FRE10*), *CFL1* (*FRE1*) és *FRP1* (*FRE5*) funkcióját meg is határozták, továbbá azonosították az *FTR1* vas transzportert, amely a gomba virulenciájának szabályozásában is részt vesz (Hammacott és mtsi., 2000; Ramanan és Wang 2000; Knight

és mtsi., 2002; Jones és mtsi., 2004; Liang és mtsi., 2009b) . Ugyanakkor egyéb gének – úgymint a fonalas növekedést befolyásoló *TUPI* gén, illetve az adhéziót szabályozó *ALS3* gén – általi vas regulációt is megfigyeltek már, ami ugyancsak a szabályozó rendszer komplexitására hívja fel a figyelmet (Knight és mtsi., 2002; Almeida és mtsi., 2008).

A vas asszimilációját a környezet pH-ja is befolyásolja, mivel savas kémhatású közegben jobb a vas ionok hozzáférhetősége. *C. albicans*-ban a Rim101 (*IME2* szabályozó elem) pH szenzitív transzkripciós faktor alkalikus közegben indukálja számos gén expresszióját, többek között azokét, melyek a vasfelvétel redukciós útvonalában játszanak szerepet (Almeida és mtsi., 2009). Ezen gének közé tartozik például az *FRP1* (vas reduktáz protein 1) is (Liang és mtsi., 2009a). A Rim101 transzkripciós faktor jelentős szereppel rendelkezik a gomba virulenciájának kialakításában is (Davis és mtsi., 2000). Mindezek alapján levonható a következtetés, miszerint a gazdaszervezetben rendelkezésre álló vasforrások jelenléte befolyásolja a *C. albicans* patogenitását.

A HAP5 szerepe a vas homeosztázisban

C. albicans-ban a Hap5 (hem-aktiváló fehérje 5) transzkripciós faktor a CCAAT szekvencia-kötő komplex (CBF) tagjaként bizonyítottan szerepet játszik a gomba vasháztartásának szabályozásában (Baek és mtsi., 2008). Az evolúcionálisan konzervált CBF komplex jellemzője, hogy számos eukarióta gén promóter régiójában megtalálható CCAAT szekvenciát tartalmazó régióhoz (CCAAT-box) képes kötődni, így különböző folyamatok szabályozásában vesz részt (Cousty és mtsi., 1996; Thon és mtsi., 2010). Ezek közé tartozik például a mitokondriális légzési lánc citokróm fehérjéit (hem-proteinek) kódoló gének (*CYC*: citokróm c; *COX*: citokróm oxidáz) upstream aktivációs régiója (UAS) is (Buschlen és mtsi., 2003). Tehát a komplex, többek között, a légzési lánc szabályozásában is részt vesz. Ennek meghibásodása esetén sem a *S. cerevisiae*, sem pedig a *C. albicans* nem képes az alternatív szénforrások hasznosítására (McNabb és mtsi., 1995; Johnson és mtsi., 2005).

A Hap5 protein a Hap2 és Hap3 alegységekkel együtt a CBF komplex egyik DNS-kötő alegységét képezi, amely a komplex működése szempontjából esszenciális. *S. cerevisiae*-ben a *HAP5* mutációja vagy hiánya esetén a komplex nem képes a DNS-hez kötődni, és a mutáns sejtek életképtelenek például alternatív szénforrás jelenlétében (McNabb és mtsi., 1995). A *C. albicans hap5Δ/Δ* mutáns törzs esetében alternatív szénforrás alkalmazásakor a mitokondriális légzési láncban szereplő gének expressziója (*CYC*, *COX*) és a sejtek morfológiája is megváltozik (Johnson és mtsi., 2005). Azonban egy másik tanulmány szerint, a *C. albicans HAP5* gén delécióját követően kapott mutáns

sejtek vas homeosztázisa is felborult (Baek és mtsi., 2008). Bizonyításra került, hogy az *FRP1* vas reduktáz (ld. fentebb) promóter régiója CCAAT motívumokkal rendelkezik, aminek köszönhetően az a CBF szabályozása alatt áll (Baek és mtsi., 2008). Korábbi tanulmányok alapján ismert, hogy az *FRP1* expresszióját alkalikus közegben a Rim101 transzkripció faktor befolyásolja, azonban a vas reduktáz expresszióját más regulátorok is szabályozhatják. A *hap5Δ/Δ* deléciós törzs vizsgálatai arra utaltak, hogy az *FRP1* expresszióját a CBF komplex aktívan befolyásolja, amihez a Hap5 jelenléte esszenciális. Ez nem csupán lúgos kémhatás jelenlétében következik be, hanem vaskelátor okozta vas limitált környezeti körülmények között is. Ilyen körülmények között, a Hap5 hiányában súlyos növekedési rendellenességet tapasztaltak, ami az *FRP1* alacsony expressziós szintjével hozható összefüggésbe (Baek és mtsi., 2008). Tehát a CBF a Rim101 szignalizációs útvonaltól függetlenül, egy kritikus faktor a vashiányos közeghez történő adaptációban.

3.6.5. A biofilmképzés jelentősége

Az invazív gombafertőzés egyik legfőbb módja a nem megfelelően sterilizált orvosi eszközökkel történő tartós érintkezés. Ezeken az eszközökön a gomba a megtapadást követően biofilmet képezhet, ami a fertőzés potenciális forrásaként ismert. Patogén gombafajok nemcsak abiotikus, de biotikus felszíneket (pl. nyálkahártya) is aktívan kolonizálnak (Fanning és Mitchell 2012).

A biofilm felépítését tekintve egy olyan extracelluláris mátrix, amit élesztőszerű és hifa- vagy pszedohifaszerű gombasejtek alkotnak, az általuk termelt extracelluláris polimer anyagokba (EPS) vagy nyálkába ágyazódva (Fanning és Mitchell 2012). A biofilmképzés 3 fő stádiumra osztható: (1) az élesztő sejtek abiotikus/biotikus felszínen történő kitapadása és kolonizációja, (2) a kitapadt sejtek által bazális réteg kialakítása, (3) majd morfogenezist követően hifák és/vagy pszedohifa sejtek bazális rétegre telepedése és az EPS anyagainak szintézise (Nobile és Mitchell 2006). Az így létrehozott érett biofilm ezt követően vastagszik, majd bizonyos környezeti körülmények (pl. éhezés) hatására élesztő sejtek válnak le róla és kezdik meg új felszín kolonizációját (Nobile és Mitchell 2006).

Az érett biofilm kialakításához olyan faktorok jelenléte szükséges, melyek elősegítik a sejtek különböző felszíneken történő megtapadását (adhezinek, invazinok), egymással történő kapcsolódását (adhezinek, egyéb sejt felszíni és sejt-sejt kommunikációban résztvevő jelmolekulák), a morfogenezis indukálását (számos transzkripció faktor és kináz) és a biofilm EPS elemeinek termelődését is (Nobile és

Mitchell 2006). Tehát a biofilmképzés egy rendkívül összetett folyamat, amely számos szignalizációs útvonal és szabályozó mechanizmus összehangolt működése következtében valósul meg. A kapott struktúra védelmet biztosít a gazdaszervezet számos védekező mechanizmusával szemben (gombasejtek limitált hozzáférhetősége, oxidatív immunválasz kivédése) és szerepet játszik az antifungális drogrezisztencia kialakulásában is (korlátozott szubsztrát diffúzió, efflux pumpák koordinált upregulációja) (Mathe és Van Dijck 2013). A biofilmbe ágyazott sejtek metabolikus aktivitása is összehangolt, ami például a szekréción mechanizmusok miatt is fontos (Mathe és Van Dijck 2013).

3.6.5.1. A *Candida* biofilmképzést szabályozó legfontosabb molekuláris faktorok

C. albicans-ban számos szignalizációs útvonal esetén található legalább egy olyan faktor, amely hozzájárul a biofilmképzés szabályozásához. Például a sejtek anyagcsere folyamatai közül az aminosav szintézist szabályozó *GCN4*, melynek deléciója esetén csökken a gomba által képzett biofilm szerves anyag tartalma (Garcia-Sanchez és mtsi., 2004). Egy másik tanulmány szerint az EPS-be ágyazódott sejtek efflux pumpáinak szabályozását végző gének (*CDR1* – *Candida* drog rezisztencia gén 1, *MDR1* – multidrog rezisztencia gén 1) expressziójában is emelkedést figyeltek meg (Mukherjee és mtsi., 2003). Ez hozzájárulhat a biofilm antifungális szerekkel szembeni rezisztenciájának kialakulásához. A mátrix drogrezisztenciájának szabályozásában a hősokk protein Hsp90 is bizonyítottan részt vesz (Robbins és mtsi., 2011; Mayer és mtsi., 2013). Egy friss tanulmány szerint a gomba egyik szekretált savas proteináza (Sap9) is hozzájárulhat a biofilm kialakításához (Dutton és mtsi., 2016). Tehát a gomba biofilmképzésében számos, egymástól független szabályozási mechanizmus vesz részt.

A *C. albicans* biofilmképzésének legfontosabb regulátorai azonban azon transzkripciós faktorok közül kerülnek ki, amelyek a mátrix kialakulásának egyes stádiumait közvetlenül szabályozzák. Ezek közül kiemelendő a Bcr1 (biofilm és sejtfal szabályozó elem), Efg1 (fonalas növekedést elősegítő faktor 1), Tec1 (transzpozon kontrol 1), Ndt80 (Non-DiTyrosine 80 gén), Rob1, Brg1 (biofilm reguláló gének) és Ace2 (*CUP1* expresszió aktivátor 2) szerepe (Ramage és mtsi., 2002; Kelly és mtsi., 2004; Nobile és Mitchell 2005; Sellam és mtsi., 2010; Nobile és mtsi., 2012). A felsorolt faktorok bármelyikének hiánya esetén a *C. albicans* rendellenes biofilmképzését figyelték meg.

A *Candida* fajok által képzett biofilm összetételét és felépítését tekintve rendkívül változatos. A *C. albicans* egy sűrű, főleg élesztő sejtek alkotta bazális réteget és egy arra épülő vastag, hifákban és pszeudohifákban gazdag, de kevésbé kompakt réteget képez.

Ezzel szemben a *C. parapsilosis* által képzett biofilm jellemzője, hogy csak élesztő és pszeudohifa sejteket tartalmaz, illetve a struktúra kevésbé komplex, valamint a biomassza mennyisége is kisebb (Trofa és mtsi., 2008).

A *C. parapsilosis* biofilmképzésének hátterében álló molekuláris mechanizmusokról mindezidáig főleg Prof. Geraldine Butler-nek és csoportjának köszönhetően tudunk. A csoport bebizonyította, hogy a *C. albicans*-hoz hasonlóan, a *BCR1*, *EFG1* és *ACE2* gének a *C. parapsilosis* biofilmképzését is befolyásolják (Ding és Butler 2007; Connolly és mtsi., 2013; Holland és mtsi., 2014). *C. albicans*-ban az Efg1 a mátrix képződésén kívül a sima-ráncos telepmorfológia váltásában is részt vesz, a Bcr1 legtöbbször bizonyos sejtfelszíni fehérjék kifejeződését szabályozza, az Ace2 pedig a sejtek adhéziós képességét befolyásolja (Nobile és Mitchell 2005; Zordan és mtsi., 2007; Finkel és mtsi., 2012). További vizsgálatok alapján több olyan gén azonosítására is sor került, amelyek a *C. albicans*-ban nem, csak a *C. parapsilosis*-ban játszhatnak szerepet a biofilmképzésben. Ezek a *CZF1* (*C. albicans* cink-ujj doménnel rendelkező fehérje 1), *UME6* (korai meiosis szabályozó gének regulátora), *CPH2* (*Candida* pszeudohifa szabályozó faktor 2) és *GZF3* (GATA szekvencia kötő cink-ujj doménnel rendelkező fehérje 3) transzkripciós faktorok (Holland és mtsi., 2014). A Czf1 a biofilmképzés korai szakaszában a sejtek adhéziós tulajdonságainak szabályozását végezheti, a Cph2 és Ume6 faktorok a fonalas növekedés regulációjával köthetők össze, míg a Gzf3 feltehetőleg az oxidatív stressz válasz kialakításában vehet részt (Holland és mtsi., 2014). Bár *C. albicans*-ban az *NDT80* a biofilmképzést a fonalas növekedés szabályozásán keresztül végzi, *C. parapsilosis* esetén ezen faktor szerepe továbbra is kérdéses. Ez utóbbi faj esetén a *NDT80* gén deléciója súlyos mértékű növekedési rendellenességet okozott (Holland és mtsi., 2014).

Mindezekből látszik, hogy a *C. parapsilosis* biofilm-képzés molekuláris mechanizmusainak feltérképezése megkezdődött, azonban a *C. albicans*-szal szemben ez még koránt sem teljes.

3.6.6. Fitneszt közvetlenül befolyásoló faktorok

A patogén *Candida* fajok életképességét és szaporodását az befolyásolja, hogy milyen gyorsan képesek alkalmazkodni a folyamatosan változó környezethez (pl. pH, hőmérséklet), mennyire flexibilisek az anyagcsere folyamataik, milyen hatékonyak a tápanyagszerző mechanizmusaik és a stressz elhárítására specializálódott rendszereik (Mayer és mtsi., 2013). A *C. albicans* vizsgálatain keresztül ma már számos olyan tényezőt ismerünk, melyek a gomba fitneszt és egyben virulenciáját is befolyásolják.

Az egyik ilyen fontos tényező a gazdaszervezetben uralkodó környezeti kémhatáshoz történő alkalmazkodás, amely – a különböző szervektől függően – a savastól (pH2) az enyhén lúgos (pH8) környezethez történő alkalmazkodást is jelentheti. Mint már említettük (ld. 3.6.4.1.), az alacsony mellett a magas kémhatás is súlyos stresszhatásként kezelendő, mivel az nagymértékben befolyásolja például a nyomelemek felvételét (Almeida és mtsi., 2009). A környezeti pH-hoz történő alkalmazkodásban *C. albicans* esetében számos gén részt vesz, amelyek közül kiemelten fontos a *PHR1* (expresszió lúgos közegben) és *PHR2* (savas közegben) szerepe (Saporito-Irwin és mtsi., 1995; Muhlschlegel és Fonzi 1997). A *Phr1* a szisztémás fertőzés kialakításában vesz részt, míg a *Phr2* a lokális (pl. vaginális) fertőzések kialakulásához járul hozzá (De Bernardis és mtsi., 1998). Szintén részt vesz a környezeti pH-hoz történő alkalmazkodásban a globális regulátor szereppel bíró *Rim101* transzkripciós fehérje is (ld. 3.6.4.1.). A *C. albicans* az aktuális környezeti pH-hoz nem csak alkalmazkodni tud, de annak megváltoztatására is képes. Egy korábbi tanulmány szerint glükóz hiányában a sejtek aminosavakat vagy egyéb amino-csoporttal rendelkező vegyületeket metabolizálnak, majd a keletkező ammóniát kiválasztják, ami a környezetbe kerülve megváltoztatja annak pH-ját (Vylkova és mtsi., 2011). Az így létrehozott lúgosabb közeg morfogenezist indukál, amely pedig szoros összefüggésben áll a virulencia szabályozásával (Vylkova és mtsi., 2011).

A környezeti pH-hoz történő alkalmazkodáson kívül a gombasejtek anyagcserében megnyilvánuló adaptációja is befolyásolja a gazdaszervezetben történő fennmaradást. Míg a vér és bizonyos szervek glükóz ellátottsága magas, addig más környezeti körülmények (pl. fagocita sejtek belseje) esetén egyéb szénforrások állnak csupán a patogén gombasejtek rendelkezésére. Ilyenek az aminosavak, -tejsav, lipidek, foszfolipidek és proteinek (Mayer és mtsi., 2013). Ilyen körülmények között fontosak az alternatív energiaforrások hatékony asszimilációjára specializálódott folyamatok, úgymint glikolízis, glükoneogenezis, az éhezés következtében aktiválódó glioxalát ciklus és hasonló rendszerek jelenléte. Ezek mindegyike fontos szerepet játszik a gazda kolonizációjában és a virulenciában is (Lorenz és Fink 2001; Ene és mtsi., 2012). Megfigyelték továbbá, hogy az alternatív szénforráson történő növekedés elősegítette a gombasejtek más környezeti stresszorokkal szembeni rezisztenciáját is, emellett a gomba virulenciája is növekedett (Ene és mtsi., 2012).

A folyamatosan változó környezeti körülmények között, az életbenmaradás mellett a fertőzőképesség megtartása miatt is esszenciálisak a stresszválaszt szabályozó rendszerek. Ilyen környezeti stressz például a magas hőmérséklet (hősokk), ozmotikus stressz, illetve a reaktív oxigén (ROS) és nitrogén gyökök jelenléte. A gombasejtek a megváltozott

hőmérséklet ellen hősokk fehérjékkel (Hsp-k) védekeznek, amelyek magas hőmérsékleten szabályozzák a proteinek stabilitását, illetve gátolják a fehérje aggregátumok képződését (Lindquist 1992). A hősokk proteinek ezenkívül oxidatív stressz esetén és éhezés következtében is aktiválódnak (Mayer és mtsi., 2013). *C. albicans*-ban 6 fő Hsp ismert, amelyek különböző folyamatokban játszanak szerepet az antifungális szerekekkel szembeni rezisztencia kialakításától a fagocitózist követő védekező mechanizmusokig (Mayer és mtsi., 2013). Ezek többségéről bizonyításra került, hogy a gomba virulenciáját is befolyásolják (Mayer és mtsi., 2013). A magas hőmérséklettel szembeni tolerancia történhet trehalóz felhalmozással is, amely mint kémiai “chaperon” (dajkafehérje) végzi a fehérjék stabilizálását (Mayer és mtsi., 2013).

Az ozmotikus sokkot követő vízvesztés ellensúlyozásának egyik legfontosabb mechanizmusa *C. albicans* esetén a sejtek glicerol bioszintézisének felgyorsítása (Wachtler és mtsi., 2011).

A gazda által termelt ROS semlegesítéséhez, a legtöbb organizmushoz hasonlóan, a *C. albicans* sejtek is szuperoxid dizmutázokat (pl. Sod1) és katalázt alkalmaznak (Ctc1), míg a reaktív nitrogén gyökök detoxifikálásához egy flavohemoglobinszerű fehérjét (Yhb1) használnak (Wysong és mtsi., 1998; Hwang és mtsi., 2002; Hromatka és mtsi., 2005).

3.6.6.1. Fitnesszt befolyásoló főbb molekuláris szabályozó útvonalak

C. albicans-ban a mikrokörnyezetből érkező jelek érzékelése, valamint azok továbbítása a három fő mitogén aktivált protein kináz (MAPK) kaszkád útvonalon keresztül történik. Ezek az Mkc1 (**M**AP **k**inase from *C. albicans* – *C. albicans* MAP kináz), a Hog1 (**H**igh **o**smolarity **g**lycerol **r**esponse - magas ozmolaritás ellen fellépő glicerolos válasz) és a Cek1 (**C**andida **E**RK-like **k**inase - *Candida* ERK-szerű kináz) (Monge és mtsi., 2006). Az Mkc1 útvonal oxidatív és/vagy ozmotikus stressz hatására aktiválódik, és részt vesz a sejtek integritásának fenntartásában, a sejtfal képződésében, a biofilmképzésben és az invazív növekedésben is (Monge és mtsi., 2006). A Hog1 szignalizációs kaszkád főleg ozmotikus stressz hatására aktiválódik, de hő- és oxidatív stresszre is működésbe léphet. Ez a mechanizmus a másodlagos morfológia váltást és a sejtfal kialakulását szabályozza (Monge és mtsi., 2006). A Cek1 által szabályozott szignalizációs mechanizmus pedig a hőstresszre történő adaptációban, fonalszerű növekedésben és a párosodás (mating) szabályozásában vesz részt (Monge és mtsi., 2006). Érdeemes megemlíteni, hogy az egyes útvonalak között kommunikáció is megfigyelhető, illetve, hogy bizonyos jelek egyszerre

két vagy esetleg mindhárom rendszer által is feldolgozásra kerülhetnek (Monge és mtsi., 2006; Mayer és mtsi., 2013). Mindhárom mechanizmus esetén az egyes szignáltranszdukciós útvonalakban részt vevő szabályozó faktorok deléciójakor a gomba csökkent virulenciáját figyelték meg, ami megerősíti a stresszválaszt szabályozó rendszer jelentőségét a fertőzések során.

A KEOPS/EKC komplex és a *CGI121* szerepe a gomba életképességében

Mint azt eddig is láthattuk, egy patogén gomba fertőzőképességét befolyásoló szignalizációs mechanizmusok és azok tagjainak legfőbb jellemzője, hogy pleiotróp hatással rendelkeznek. Hasonló hatás figyelhető meg a gomba viabilitását szabályozó komplexek és azok tagjainak esetén is. A KEOPS/EKC komplex egy olyan konzervált komplex, amelynek – egy kivételével – minden tagja megtalálható *S. cerevisiae*-ben, *Drosophila melanogaster*-ben és az emberben is (Kisseleva-Romanova és mtsi., 2006). A komplex Gon7 alegységét azonban kifejezetten csak gombákban sikerült kimutatni. A ma rendelkezésünkre álló információk többsége az *S. cerevisiae* KEOPS/EKC komplex vizsgálataiból származik.

A KEOPS/EKC komplexet egymástól függetlenül két kutatócsoport fedezte fel. Downey és munkatársai a komplexet egy telomer homeosztázist szabályozó fehérje csoportként azonosította (KEOPS - kináz, endopeptidáz és más kis méretű fehérjék komplexe), míg Kisseleva-Romanova és munkatársai ugyanezt a komplexet transzkripció koaktivátor szereppel kötötte össze (EKC - transzkripciót szabályozó endopeptidáz-szerű fehérjékből és kinázokból álló komplex) (Downey és mtsi., 2006; Kisseleva-Romanova és mtsi., 2006). A komplex univerzális transzfer RNS (tRNS) módosító szereppel is rendelkezik (Srinivasan és mtsi., 2011). A konzervált fehérje csoport eddig ismert tagjai közé tartozik a Kae1, Pcc1, Bud32 és Cgi121 (utóbbi egy p53-függő protein kináz), illetve a Gon7 *S. cerevisiae*-ben (Downey és mtsi., 2006; Kisseleva-Romanova és mtsi., 2006).

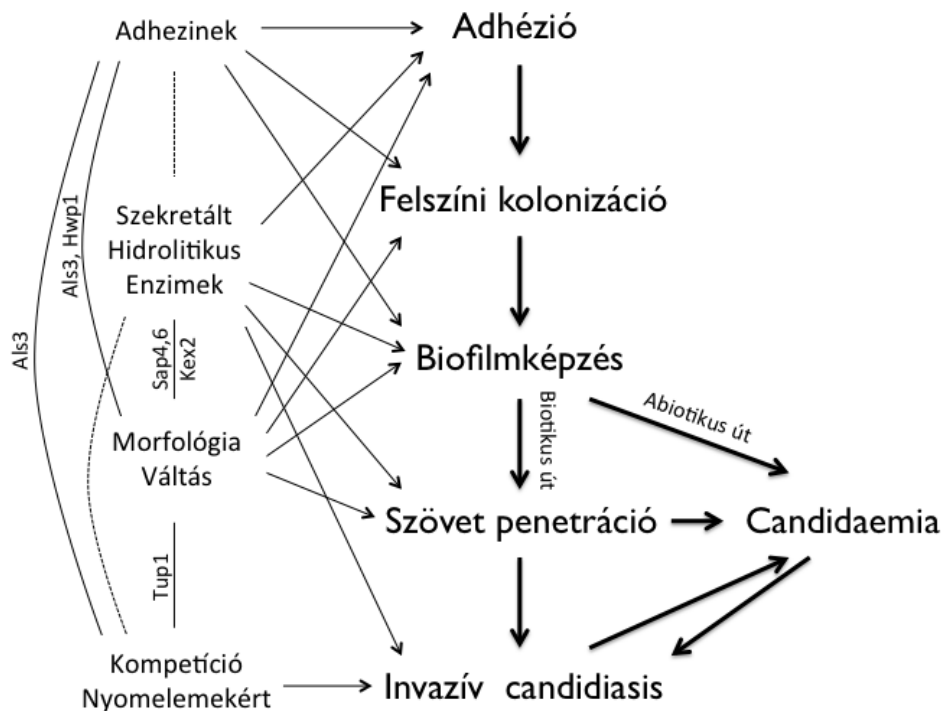
A tRNS t6A módosítása során a Kae1 mint katalitikus centrum funkcionál, a Pcc1 a komplex dimerizációjához szükséges, a Bud32 a tRNS disszociációjában játszik szerepet, a Cgi121 protein pedig a komplex allosztérikus regulátora (Perrochia és mtsi., 2013). A tRNS általuk történő módosítása esszenciális az antikodon hurok stabilizálásához, így a kodon-antikodon helyes párosításához, ami a transláció megfelelő működéséhez és így a normális sejtciklushoz szükséges (Perrochia és mtsi., 2013). Kisseleva-Romanova és munkatársai a KEOPS/EKC komplex bármelyik tagjának mutációja esetén súlyos növekedési rendellenességeket figyeltek meg (Kisseleva-Romanova és mtsi., 2006). Kivételt képezett a Cgi121, amelynek hiánya elhanyagolható volt (Kisseleva-Romanova és

mtsi., 2006). A komplex telomer fenntartásban vizsgált szerepe során hasonló jelenséget figyeltek meg, mivel a komplex 3 alegységének deléciójakor csökkent a telomerek hossza, így a sejtek generációs ideje is és hőérzékeny fenotípus jelent meg (Downey és mtsi., 2006). A Cgi121 deléciója ezzel szemben több termoszenzitív mutáns törzs fenotípusát menekítette (Downey és mtsi., 2006). Mindezek alapján a Cgi121 fehérje KEOPS/EKC komplexben betöltött valódi szerepe továbbra is kérdéses.

Egy napjainkban megjelent tanulmány szerint, az *Aspergillus nidulans* KEOPS/EKC komplex egyik faktorának (KaeA) mutációja esetén megváltozott számos metabolikus aktivitást szabályzó gén transzkripciója (Dzikowska és mtsi., 2015). Ezek a gének az aminosav és egyéb szénforrás metabolizmus, illetve a sziderofór képzés szabályozásában vesznek részt (Dzikowska és mtsi., 2015). A KaeA mutációja következtében a transzkripció regulátor *rcoA* expressziója is megváltozott, amelynek ortológja élesztőben a morfológia váltás egyik globális regulátora, a *TUPI* gén (Dzikowska és mtsi., 2015). Az előző fejezetekben tárgyaltak alapján, mindezen metabolikus folyamatok patogén *Candida* fajok esetében hozzájárulhatnak azok fertőzőképességének szabályozásához. Eddig a KEOPS/EKC komplex működését nem hozták összefüggésbe patomechanizmusok befolyásolásával, azonban az *A. nidulans*-ban megfigyeltek alapján feltételezhető, hogy a komplex egyes tagjai bizonyos fajok fertőzőképességét is befolyásolhatják.

3.7. Virulencia faktorok azonosítása és vizsgálata napjainkban

Az előző fejezetek alapján látható, hogy a patogén gombák által okozott szisztémás fertőzés kialakulásához számos virulencia faktor megléte szükséges, az ezeket szabályozó szignalizációs mechanizmusok pedig rendkívüli módon összetettek (3. ábra). Szisztémás kandidiázisok esetén egy-egy fertőzési stádium kialakulásához gyakran egyszerre több virulencia faktor megléte is szükséges. A rendszer komplexitását tovább növeli az, hogy a gomba egyes virulencia faktorai egymás kifejeződését is befolyásolhatják bizonyos szabályozó faktorokon - pl. transzkripció faktorokon, kinázokon - keresztül. Az így felépülő rendszer előnye, hogy egy szabályozó faktor kiesése esetén egy másik léphet annak helyére, amely végeredményeként ugyanúgy létrejöhet az invazív fertőzés. A rendszer hátránya lehet azonban, hogy bizonyos kulcsfontosságú regulátorok elvesztése esetén egyszerre több - esetenként létfontosságú - folyamat is sérülhet, ami könnyen vezethet a mikroorganizmus pusztulásához.



3. ábra. A szisztémás fertőzés kialakulásához vezető út és az azt elősegítő *C. albicans* virulencia faktorok sematikus ábrája. Forrás: a szerző ábrája.

Ezekből következően, intenzíven kutatott az olyan potenciális célpontok keresése, melyek későbbi támadása elegendő lenne hatékonyabb terápiás módszerek kifejlesztésére. Több, ilyen kutatással foglalkozó laboratórium úgynevezett high-throughput technológiát alkalmaz, amelynek segítségével lehetőség adódik egyszerre több gén patogenezisben játszott szerepének vizsgálatára (Delrue és mtsi., 2004; Noble és mtsi., 2010; Holland és mtsi., 2014; Ramo és mtsi., 2014). A virulencia faktorok vizsgálata során egy adott gén jellemzésére két fő lehetőség alkalmazható. Az egyik módszer a gén "elrontása", melyben a kódoló szekvencia eltávolításával létrehozott homozigóta deléciós törzsek vizsgálatával az adott gén funkciójára következtethetünk (Noble és Johnson 2005; Tang és mtsi., 2015). A másik lehetőség a gén által kódolt termék túltermeltetése, amely során a fenotípusban bekövetkező változások utalhatnak a kódoló régió szerepére (Cabral és mtsi., 2012; Prelich 2012). A létrehozott mutáns könyvtárak széles körű vizsgálatával olyan géneket tudunk beazonosítani, amelyek az adott organizmus fertőzőképességét befolyásolják.

Jelen tanulmány során egy olyan megközelítési módszert választottunk, amellyel célzottan olyan *C. parapsilosis* gének vizsgálhatóak, amelyek a gazda-patogén kölcsönhatásban nagy valószínűséggel részt vehetnek. Az interakciót követő teljes RNS szekvenálás ígéretes stratégia lehet a patogén gomba fertőzőképességében szerepet játszó gének beazonosításához.

4. Célkitűzések

Annak ellenére, hogy a *C. parapsilosis* kiváltotta gombafertőzések klinikai jelentősége egyre inkább nő, keveset tudunk a gomba fertőzőképességét meghatározó faktorokról és azok molekuláris szabályozottságáról. Ezen mechanizmusok meghatározása és alapos vizsgálata a jövőben új, hatékonyabb, célzott terápiás kezelések alapját képezheti.

Munkánk során célunk olyan *C. parapsilosis* gének vizsgálata, amelyek a faj fertőzőképességét feltételezhetően befolyásolják. Ennek érdekében a következő célok megvalósítását tűztük ki:

- 1) A *C. parapsilosis* fertőzőképességét feltételezhetően befolyásoló gének genomból történő eltávolítása, egy deléciós mutáns könyvtár létrehozása..
- 2) A létrehozott deléciós könyvtár tagjainak széles körű vizsgálata: a mutáns törzsek életképességének, morfogenezisének, stresszre adott válaszának, biofilmképzésének és antifungális szerekkel szembeni érzékenységének egyenkénti vizsgálata.
- 3) A *C. parapsilosis*-gazda kölcsönhatást követően beazonosított - a halmozott fenotípusos rendellenességekkel rendelkező - deléciós törzsek részletes vizsgálata, az eltávolított gének pontos funkciójának meghatározása.

5. Anyagok és módszerek

5.1. Alkalmazott törzsek

Alkalmazott *Escherichia coli* törzsek

E. coli 2T1

Alkalmazott *Candida* törzsek

CLIB214: *C. parapsilosis* vad típusú törzs, származási hely: Puerto Rico (PMID:15817776)

CLIB His-Leu- / CPL2H1: *C. parapsilosis* CLIB214 hisztidin, leucin deléciós mutáns (*leu2::FRT/leu2::FRT, his1::FRT/his1::FRT*). (PMID: 25233198)

Munkánk során előállított törzsek:

CPAR2_100540 Δ : *C. parapsilosis* CPL2H1-ből képzett CPAR2_100540 heterozigóta deléciós mutáns törzs (*CPAR2_100540 ::LEU2/CPAR2_100540*).

CPAR2_100540 Δ/Δ : *C. parapsilosis* Δ Cp100540 törzsből képzett CPAR2_100540 homozigóta deléciós mutáns törzs (*CPAR2_100540 ::LEU2/CPAR2_100540::HIS1*).

CPAR2_100540 Rek: *C. parapsilosis* Δ/Δ Cp100540 törzsből képzett CPAR2_100540 rekonstruált mutáns törzs (*rp10::CPAR2_100540:NAT/RP10*).

CPAR2_200390 Δ : *C. parapsilosis* CPL2H1-ből képzett CPAR2_200390 heterozigóta deléciós mutáns törzs (*CPAR2_200390 ::LEU2/CPAR2_200390*).

CPAR2_200390 Δ/Δ : *C. parapsilosis* Δ Cp200390 törzsből képzett CPAR2_200390 homozigóta deléciós mutáns törzs (*CPAR2_200390 ::LEU2/CPAR2_200390::HIS1*).

CPAR2_200390 Rek: *C. parapsilosis* Δ/Δ Cp200390 törzsből képzett CPAR2_200390 rekonstruált mutáns törzs (*rp10::CPAR2_200390:NAT/RP10*).

CPAR2_303700 Δ : *C. parapsilosis* CPL2H1-ből képzett CPAR2_303700 heterozigóta deléciós mutáns törzs (*CPAR2_303700 ::LEU2/CPAR2_303700*).

CPAR2_303700 Δ/Δ : *C. parapsilosis* Δ Cp303700 törzsből képzett CPAR2_303700 homozigóta deléciós mutáns törzs (*CPAR2_303700 ::LEU2/CPAR2_303700::HIS1*).

CPAR2_303700 Rek: *C. parapsilosis* Δ/Δ Cp303700 törzsből képzett CPAR2_303700 rekonstruált mutáns törzs (*rp10::CPAR2_303700:NAT/RP10*).

CPAR2_602840 Δ : *C. parapsilosis* CPL2H1-ből képzett CPAR2_602840 heterozigóta deléciós mutáns törzs (CPAR2_602840 ::LEU2/CPAR2_602840).

CPAR2_602840 Δ/Δ : *C. parapsilosis* Δ Cp602840 törzsből képzett CPAR2_602840 homozigóta deléciós mutáns törzs (CPAR2_602840 ::LEU2/CPAR2_602840::HIS1).

CPAR2_602840 Rek: *C. parapsilosis* Δ/Δ Cp602840 törzsből képzett CPAR2_602840 rekonstruált mutáns törzs (rp10::CPAR2_602840:NAT/RP10).

A jelen tanulmány során előállított további *C. parapsilosis* homozigóta deléciós mutáns törzsek listáját, azok genotípusát, valamint az ortológok alapján feltételezett funkcióját (felhasznált adatbázis: www.Candidagenome.org) az 1. számú melléklet tartalmazza.

5.2. Tenyésztéshez felhasznált oldatok, tápoldatok, táptalajok

E. coli sejtek alkalmazása esetén:

LB tápoldat és táptalaj: 0,5% élesztőkivonat, 1% tripton és 1% nátrium-klorid (NaCl) tartalmú tápoldat. Táptalaj esetén 2,5% agarral kiegészítve. *E. coli* törzsek transzformálását követően a transzformánsok szelekciójához 100 μ g/ml ampicillinnel (Sigma-Aldrich) (LB^{AMP}) vagy 50 μ g/ml kanamicinnel (Sigma-Aldrich) (LB^{KAN}) kiegészített LB táptalajok használata.

C. parapsilosis sejtek alkalmazása esetén:

YPD tápoldat és táptalaj: 0,5% élesztőkivonat, 1% pepton és 1% D-glükóz tartalmú tápoldat, 100 U/ml penicillin-sztreptomycin (PS) (Sigma-Aldrich) oldattal kiegészítve, *Candida* sejtek fenntartására. Szilárd táptalaj esetén kiegészítve további 2,5% agarral (VWR Chemicals).

10x PBS oldat (foszfát pufferelt sóoldat): 8% NaCl, 0,2% KCl, 1,44% Na₂HPO₄, 0,24% KH₂PO₄.

YNB tápoldat és táptalaj aminosavakkal kiegészítve: YNB (élesztő nitrogén alap) tápoldat a gyártó (Difco) utasításai alapján, kiegészítve 100 U/ml PS tápoldattal, továbbá hisztidin és leucin auxotrófia esetén 0,002% arginin, 0,003% izo-leucin, 0,003% lizin, 0,002% metionin, 0,005% fenil-alanin, 0,02% treonin, 0,003% tirozin, 0,002% uracil, 0,015% valin, 0,02% alanin és 0,02% triptofán hozzáadása. Leucin auxotrófia szűrése

során 0,001% hisztidinnel, míg hisztidin auxotrófia szűrésekor 0,005% leucinnal kiegészítve. Aminosavak egyedüli szénforrásként történő hasznosításának vizsgálatához leucinnal és hisztidinnel egyaránt kiegészítve. Táptalaj esetén az oldathoz további 2,5% agar hozzáadása.

YPD tápoldat és táptalaj nourseothricinnel kiegészítve: YPD tápoldat/táptalaj 100 µg/ml nourseothricin-nel (NTC) (WERNER BioAgents) kiegészítve. Táptalaj esetén további 2,5% agar hozzáadása.

YNB/glükóz tápoldat/táptalaj: YNB tápoldat a gyártó (Difco) utasításai alapján, 100 U/ml PS oldattal, 1% D-glükóz hozzáadásával és további 2,5% agarral kiegészítve.

YNB/glükóz/FBS táptalaj: YNB tápoldat a gyártó (Difco) utasításai alapján, 100 U/ml PS oldattal kiegészítve, 1% D-glükóz, 10% hőinaktivált magzati borjú szérum (fetal bovine serum, FBS) (EuroClone) és további 2,5% agar hozzáadásával.

YCB/BSA táptalaj: YCB (élesztő szén alap) a gyártó (Difco) utasításai alapján 100 U/ml PS oldattal, 2% szarvasmarha szérum albuminnal (bovine serum albumin, BSA) (Sigma-Aldrich) kiegészítve, továbbá 2,5% agar hozzáadásával.

Eltérő pH-val rendelkező YPD tápoldatok/táptalajok:

YPD táptalaj/tápoldat, amely a McIlvaine pufferek megfelelő arányú keverékével van kiegészítve. Táptalaj esetén 2,5% agar hozzáadása, kivéve pH4 táptalaj esetében, ahol 3% agar hozzáadása szükséges.

McIlvaine törzsoldatok:

0,2 M Na₂HPO₄ oldat

0,1 M C₆H₈O₇ (citromsav) oldat

Az 1. táblázat a törzsoldatok 40 ml végtérfogatra számolt arányát mutatja be.

1. táblázat. Különböző kémhatású tápközegek előállítása.

	pH4	pH5	pH6	pH7	pH8
Na ₂ HPO ₄	7,71 ml	10,30 ml	12,63 ml	16,47 ml	19,45 ml
C ₆ H ₈ O ₇	12,29 ml	9,70 ml	7,37 ml	3,53 ml	0,55ml

Stresszorral kiegészített YPD tápoldatok és táptalajok: YPD tápoldat, amely koffein (Koff), kongó vörös (KV), kalkofluor fehér (KF) sejtfal stresszorok, nátrium-lauril-szulfát (SDS) sejtmembrán detergens, hidrogén peroxid (H₂O₂) oxidatív stresszor vagy higromicin B (HigB) fehérjeszintézis gátló ellenanyag, hat lépcsőben felére hígított koncentrációinak egyikét tartalmazza. Az egyes tápoldatokban használt stresszorok kiindulási koncentrációit a 2. táblázat tartalmazza. Stresszor tartalmú táptalajok esetében az alkalmazott koncentrációk a 3. táblázatban találhatóak meg. Táptalaj esetén az adott stresszor tartalmú tápoldathoz további 2,5% agart adtunk.

2. táblázat. Alkalmazott stresszorok és koncentrációik tápoldatok esetében.

	Kalkofluor fehér	Kongó vörös	SDS	Koffein	Higromicin B	H₂O₂
Alkalmazott koncentrációk	3,125-100 µg/ml	3,125-100 µg/ml	0,003- 0,1 %	1,563-50 mM	0,488-15,6 µg/ml	0,234-7,5 mM

3. táblázat. Alkalmazott stresszorok és koncentrációik táptalajok esetében.

	Kalkofluor fehér	Kongó vörös	SDS	Koffein	Higromicin B	H₂O₂
Alkalmazott koncentrációk	10, 20, 30, 40, 50, 60 µg/ml	10, 20, 30, 40, 50, 60 µg/ml	0,25%; 0,125%; 0,06%	10 mM; 5 mM; 2,5 mM	6 µg/ml; 3 µg/ml; 1 µg/ml	10 mM; 5 mM

DMEM tápoldat (Dulbecco's Modified Eagle's Medium): DMEM tápoldat a gyártó (BioWhittaker) utasításai alapján 10% hőinaktivált FBS-sel és 100 U/ml PS oldattal kiegészítve.

RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute.): RPMI-1640 tápoldat a gyártó (Lonza) utasításai alapján L-glutaminnal, 2% glükózzal és 0,165 M 3-3-(N-morfolino)-propánszulfonsavval (MOPS) kiegészítve.

Tejsav táptalaj: YNB tápoldat a gyártó (Difco) utasításai alapján 100 U/ml PS oldattal, 2% tejsavval és 2,5% agarral kiegészítve.

BPS tápoldat/táptalaj: YPD tápoldat/táptalaj 150 mM batofenantrolin-diszulfonát (BPS, Sigma-Aldrich) vaskelátorral kiegészítve. Táptalaj esetén további 2,5% agar hozzáadása.

BPS/hemin táptalaj: YPD táptalaj 500 mM BPS vaskelátorral és 2 μ M hemin, vas tartalmú porfirinnel (Sigma-Aldrich) kiegészítve.

CdSO₄ táptalaj: YPD táptalaj 0,005 mM kadmium-szulfáttal kiegészítve.

5.3. Kísérleti módszerek

5.3.1. A THP-1 humán monocita sejtvonal fertőzése *C. parapsilosis* sejtekkel és gomba RNS izolálás

A THP-1 (Tamm-Horsfall fehérje 1) humán monocita sejtvonal *C. parapsilosis* sejtekkel történő fertőzését Dr. Németh Tibor Mihály végezte el. A kísérlet során 96 mintahelyű tenyésztőedényben $5 \times 10^4/100$ μ l THP-1 gazdasejtet fertőztünk ötszörös mennyiségű élesztővel, majd a sejteket 37 °C-on, 5% CO₂ jelenlétében inkubáltuk. 1 és 6 óra eltelte után a sejteket centrifugálással összegyűjtöttük (1000 rpm, 5 perc), jéghideg 1x PBS oldattal mostuk, majd 500 μ l RNáz-mentes desztillált vízben szuszpendáltuk. A gazdasejteket 27G jelű injekciós tű segítségével tártuk fel. A szuszpenziót centrifugáltuk, a felülúszó 475 μ l-ét eltávolítottuk. Ezt követően a sejtekből történő RNS izoláláshoz a Qiagen RNeasy Plant Mini Plus Kit-et használtuk a gyártó utasításai szerint.

5.3.2. Molekuláris technikák

5.3.2.1. RNS szekvenálás

A THP-1 humán monocita sejtvonal *C. parapsilosis* sejtekkel történő fertőzését követően a gomba transzkriptóm analízisét a Prof. Toni Gabaldon által vezetett kutatócsoport végezte el. Az RNS szekvenáláshoz Illumina platformot használtak kétoldali szekvenálással.

5.3.2.2. Deléciós konstrukciók létrehozásához szükséges technikák

Totál DNS kivonás élesztő sejtekből

A templátként használandó gomba törzseket egy éjszakán át, 2 ml YPD tápoldatban növesztettük. Ezt követően a sejteket centrifugálással összegyűjtöttük (5000 rpm, 5 perc). A sejtperlethez 500 μ l lízis puffert (1% SDS, 50 mM EDTA - etiléndiamin-tetraacetát -, 100 mM TRIS - Tris-(hidroximetil) aminometán -, pH8) mértünk és az Eppendorf csövet

üvegyönggyel (0,5 mm átmérő) 1 ml-ig töltöttük fel, majd vortexeltük (3 perc). A lizátumokra 275 µl 7 M-os ammónium-acetátot mértünk, majd 5 perc hősokk következett 65 °C-on, majd ezt követően a sejteket jégen inkubáltuk újabb 5 percen keresztül. Ezután 500 µl kloroform-izoamilalkoholt adtunk az elegyhez, vortexeltünk és centrifugálás (13000 rpm, 10 perc) után a DNS tartalmú felső vizes fázist új Eppendorf csőbe pipettáztuk. A vizes fázishoz 500 µl izopropanolt adtunk, így a DNS-t jégen tárolva kicsaptuk. Ezt követően a DNS-t centrifugálással (13000 rpm, 10 perc) kiülepítettük, majd a pelletet 70%-os etanollal mostuk. A pelletet beszáritás után 100 µl RNáz tartalmú desztillált vízben feloldottuk, és végül ellenőrzésként 1 µl térfogatnyi DNS oldatot 0,5µg/ml etidium-bromiddal kiegészített 0,8%-os agaróz gélen futtattunk.

Fúziós konstrukció létrehozása

A fúziós deléciós konstrukciók létrehozását a célzott gént körülhatároló upstream és downstream szomszédos régiók, valamint a szelekciós marker gének egyenkénti amplifikálása előzte meg. Ezt követően történt az egyes fragmentumok összekapcsolása fúziós polimeráz láncreakció (PCR) segítségével. Az egyes régiók felszaporításához szükséges primer párok a könnyebb nyomonkövethetőség miatt számozottak (ld. 6.2. fejezet, 5/A-B ábrák). Az egyes *C. parapsilosis* deléciós törzsek létrehozásához használt primereket a 2. számú melléklet tartalmazza.

Upstream és downstream körülhatároló régiók amplifikálása

A célzott gént körülhatároló régiók felszaporításához *DreamTaq* DNS polimeráz enzimet (Thermo Scientific) használtunk. Egy 50 µl végtérfogatú reakcióhoz a következő komponensek szükségesek: 1x *DreamTaq* puffer (20 mM MgCl₂-dal kiegészítve), 0,25-0,25 µM forward és reverz primer, 0,2-0,2 mM dNTP, 20-50 ng genomi DNS mint templát és 1,5 U *DreamTaq* DNS polimeráz. Alkalmazott reakciókörülmények: 95 °C, 30 másodperc elődenaturáció, majd 29 cikluson át 94 °C, 10 s DNS kettősszálú lánc denaturáció, 50 °C, 20 s hibridizáció (primer bekötés) és 72 °C, 20 s polimerizáció (lánc hosszabbítás), végül 72 °C 2 perc utópolimerizáció.

Az amplifikáláshoz szükséges primerek jelölése: Upstream régió esetén “primer 1” (forward primer) és “primer 3” (reverz primer); downstream régió esetén pedig “primer 4” (forward primer) és “primer 6” (reverz primer). A fúziós PCR-hez szükséges fúziós szekvenciákat 5' végükön a “primer 3” és a “primer 4” jelölésű primerek tartalmazzák.

Szelekciós marker gének amplifikálása

A szelekciós markerként szolgáló szekvenciák plazmidból történő kinyeréséhez és felszaporításához *Expand Long Templát* polimeráz (Roche) enzimet használtunk. Egy 50 µl végtérfogatú reakcióhoz a következő komponensek szükségesek: 1x *Expand Long Template* puffer (20 mM MgCl₂-dal kiegészítve), 0,25-0,25 µM forward és reverz primer, 0,2-0,2 mM dNTP, 20-50 ng plazmid DNS templát és 1 U *Expand Long Template* polimeráz. A *C. maltosa* leucin aminosav hasznosításáért felelős (*LEU2* - izocitrát/izopropil malát dehidrogenáz) kódoló régiót a *pSN40*, míg a *C. dubliniensis* hisztidin aminosav hasznosításához szükséges (*HIS1*- ATP foszforiboziltranszferáz) kódoló régiót a *pSN52* plazmidból nyertük (Holland és mtsi., 2014). Alkalmazott reakciókörülmények: 94 °C, 2 perc elődenaturáció, majd 34 cikluson át 94 °C, 10 s denaturáció, 45 °C, 30 s hibridizáció (primer bekötés) és 68 °C, 4 perc polimerizáció, továbbá 68 °C, 7 perc utópolimerizáció.

Az ehhez szükséges primerek jelölése: fúziós szekvenciát és egyedi TAG-jelölést hordozó primer **5** és fúziós szekvenciát hordozó univerzális primer **2**.

Univerzális reverz primer 2 és fúziós szekvencia az 5' végen:

Primer neve	Szekvencia (5'-3')
Univ_Primer_2	ccgctgctaggcgcgccgtgACCAGTGTGATGGATATCTGC

PCR termékek tisztítása

Az egyes fragmentumok felszaporítását követően azokat a Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (Geneaid) segítségével tisztítottuk a gyártó utasításainak megfelelően.

Fúziós PCR

A tisztított upstream és downstream, valamint marker géneket tartalmazó fragmentumok összekapcsolását fúziós PCR segítségével végeztük el, mely reakcióhoz *DreamTaq* DNS polimeráz enzimet (Thermo Scientific) használtunk. Egy 50 µl végtérfogatú reakcióhoz a következő komponensek szükségesek: 1x *DreamTaq* puffer (20 mM MgCl₂-dal kiegészítve), 0,25-0,25 µM forward és reverz primer, 0,2-0,2 mM dNTP, 0,75 µl upstream és 0,75 µl downstream tisztított PCR termék, valamint 1 µl tisztított marker (*LEU2/HIS1*) fragmentum mint templát és 1,5 U *DreamTaq* DNS polimeráz. Alkalmazott reakciókörülmények: 94 °C, 5 perc elődenaturáció, majd 34 cikluson át 94 °C, 30 s denaturáció, 50 °C, 45 s hibridizáció (primer bekötés) és 72 °C, 4,5 perc polimerizáció (lánc hosszabbítás), továbbá 72 °C, 10 perc utópolimerizáció.

Felhasznált primer pár: primer **1** és primer **6**. Szekvencia információ ld. fentebb.

Kolónia PCR a helyes beépülések ellenőrzésére

A *C. parapsilosis* transzformánsok ellenőrzésére használt kolónia PCR-hez *DreamTaq* DNS polimeráz enzimet (Thermo Scientific) használtunk. A deléciós kazetta helyes beépülését két oldalról ellenőriztük, melyhez *LEU2/HIS1* markerre specifikus és az adott gént körülhatároló genomi DNS szakaszokra specifikus primereket alkalmaztunk (ld. 5/E ábra). Egy 25 µl végtérfogatú reakcióhoz a következő komponensek szükségesek: 1x *DreamTaq* puffer (20 mM MgCl₂-dal kiegészítve), 0,25-0,25 µM forward és reverz primer, 0,2-0,2 mM dNTP, 20-50 ng genomi DNS templát és 1,5 U *DreamTaq* DNS polimeráz. Alkalmazott reakciókörülmények: 95 °C, 3 perc elődenaturáció, majd 35 cikluson át 95 °C, 30 s denaturáció, 53 °C, 30 s hibridizáció (primer bekötés) és 72 °C, 1 perc 15 s polimerizáció (lánc hosszabbítás), továbbá 72 °C, 6 perc utópolimerizáció.

Felhasznált primer pár: a célzott gén upstream régiójára tervezett **5'** Check primer és downstream régiójára tervezett **3'** Check primer, univerzális reverz LEU Check 1 / HIS Check 1 primer és univerzális forward LEU Check 2 / HIS Check 2 primerek.

RNS izolálás gombasejtekből

Gombasejtekből történő RNS izoláláshoz az Ambion RibopureTM-Yeast RNS izoláló kit-et (Thermo Scientific) használtuk a gyártó utasításainak megfelelően. Az izolált RNS mennyiségét NanoDrop spektrofotométer (ND-1000 Spectrophotometer, Thermo Scientific) segítségével határoztuk meg. A minta DNS szennyezettségét a *C. parapsilosis* γ -tubulin (*TUB4*) háztartási génre tervezett primerek segítségével, valós idejű PCR-rel ellenőriztük. Ezt követően a megfelelő mennyiségű és minőségű totál RNS izolátumokból cDNS-t szintetizáltunk.

cDNS szintézis

A cDNS szintézishez First strand cDNA synthesis kit-et (Thermo Scientific) használtunk a gyártó utasításai szerint. A szintézishez maximum 1 µg totál RNS-t használtunk. Egy reakció során 0,5 µl oligo(dT)₁₈ és 0,5 µl random primert használtunk fel. Alkalmazott reakciókörülmények: 25 °C / 5 perc, 42 °C / 60 perc és végül 70 °C / 5 perc.

Valós idejű (real time) PCR

Génexpresszió vizsgálatokhoz SYBR Green qPCR Master Mix kit-et (Thermo Scientific) alkalmaztunk a gyártó utasításai szerint. Egy 20 µl végtérfogatú reakcióhoz a következő

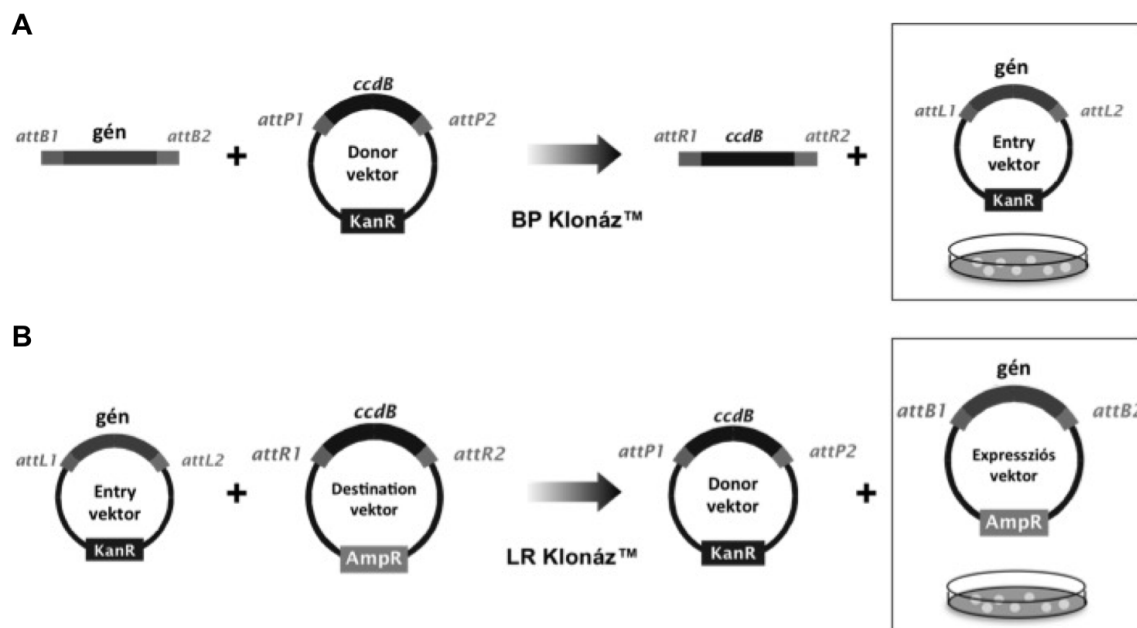
komponensek szükségesek: 10 µl SYBR Green Mix, 2 µl 3-3 µM forward és reverz primer, 1 µl 100 ng cDNS. Alkalmazott reakciókörülmények: 95 °C, 3 perc elődenaturáció, majd 50 cikluson át 95 °C, 10 s és 60 °C, 30 s. A termékek olvadási görbéit 65-95 °C-os tartományban (0,5 °C-os lépésekkel) rögzítettük. A relatív expressziós értékek kiszámítása a $2^{-\Delta(\Delta C_t)}$ eljárással történt (Livak és Schmittgen 2001) a gyártó által mellékelt szoftver segítségével. Belső kontrollként a *C. parapsilosis* α -tubulin (*TUB4*) gént használtuk.

5.3.2.3. Rekonstruált törzsek létrehozásához szükséges technikák

A jelen tanulmányban használt valamennyi rekonstruált törzsről elmondható, hogy az adott gén egy alléljének genomba történő visszahelyezése a *C. parapsilosis* *RP10* (riboszómális fehérje 10) lókuszbba történt. Eddigi ismereteink szerint, az *RP10*-es lókuszbba történő felhasználása önmagában nem befolyásolja a gomba életképességét és fertőzőképességét.

Klónozás GatewayTM (Invitrogen) rendszerrel

Az adott génre nézve egyik allél homozigóta deléciós törzsbbe juttatását az Invitrogen által forgalmazott GatewayTM rendszer segítségével végeztük el. A bejuttatni kívánt allélt a felszaporítást követően először a „donor” vektorba juttattuk (*BP* klónozási reakció), majd az így kapott „entry” vektorból az *RP10* (genomba történő beépülés helyét biztosító) szekvenciáját hordozó „destination” vektorba építettük (*LR* klónozási reakció) (4. ábra). Az így létrehozott expressziós vektorral végeztük el a homozigóta deléciós törzsek transzformálását. A reakciókhoz a gyártó (Invitrogen) által előállított „donor” és „destination” vektorokat használtuk. A „destination” vektort a *C. parapsilosis* genomba (*RP10* régió) történő beépülés és a gomba szelekciós marker (nourseothricin rezisztencia marker (NAT)) bevitele érdekében korábban módosítottuk (CIP10 vektor). A BP klónozási reakció során kanamicint, míg az LR klónozási reakciót követően ampicillint használtunk szelekciós ágensként. A rendszer sajátossága, hogy a transzformálás hatékonyságának növelése érdekében a két említett antibiotikumon kívül az *E.coli*-ből származó *ccdB* gént is tartalmazza szelekciós ágensként. A *ccdB* gén terméke (kolicin géntermék) gátolja a DNS replikáció során a DNS giráz működését, ami a sejtek pusztulásához vezet. Ehhez, a Gateway rendszer használata során, egy olyan *E. coli* törzs alkalmazása ajánlott (2T1), amely érzékeny a *ccdB* gén jelenlétére. Így a transzformálás hatékonysága tovább növelhető.



4. ábra. Gateway™ rendszer használata *C. parapsilosis* deléciós törzsek rekonstruálásához.

4/A: A BP klónozási reakcióhoz az *attB* (attachment „B”) régiókkal körülhatárolt, visszajuttatni kívánt gént tartalmazó PCR terméket és a kanamicin rezisztencia gént, a toxikus *ccdB* gént és *attP* régiókat hordozó „donor” vektort használtuk. A reakció eredményeként az *attL* régiókat tartalmazó „entry” vektort kaptuk.

4/B: Az LR klónozási reakcióhoz az *attL* régiókat tartalmazó „entry” vektort és az *attR* régiókat, ampicillin rezisztencia gént, valamint a toxikus *ccdB* gént tartalmazó „destination” vektort alkalmaztunk. Eredményként végső soron a visszajuttatni kívánt gént hordozó expressziós vektort kaptuk.

AmpR - ampicillin rezisztenciát kódoló gén, KanR - kanamicin rezisztenciát kódoló gén, *ccdB* - DNS girázt gátló aktivitású fehérjét kódoló gén.

Forrás: https://www.embl.de/pepcore/pepcore_services/cloning/cloning_methods/recombination/gateway/

Visszaépíteni kívánt gének amplifikálása

Az egyes gének deléciós törzsekbe történő visszaépítéséhez az 5.3.1.2. pontban leírtak alapján DNS-t vontunk ki a vad típusú *C. parapsilosis* törzsből, majd azt templátként használva felszaporítottuk az adott gén kódoló (ORF) szekvenciáját, valamint az ahhoz tartozó promóter (1 kb upstream régió) és terminátor régiót (500 nt downstream régió). A későbbi „donor” vektorba építés miatt a reakcióhoz alkalmazott primerek úgynevezett *attB1* (forward primerhez kapcsolt) és *attB2* (reverz primerhez kapcsolt) szekvenciákat is tartalmaztak.

Az amplifikáláshoz *Phusion Hot Start II* DNS polimeráz (Thermo Scientific) enzimet használtunk. Egy 50 µl végtérfogatú reakcióhoz a következő komponensek szükségesek: 1x *Phusion* GC puffer (1,5 mM MgCl₂-dal kiegészítve), 0,6 U *Phusion Hot Start II*

polimeráz, 0,2-0,2 mM dNTP, 0,25-0,25 μ M forward és reverz primer, továbbá 20-50 ng genomi DNS templát.

PCR termék tisztítása polietilén-glikollal (PEG)

Az előzőleg amplifikált PCR terméket polietilén-glikol segítségével tisztítottuk a „donor” vektorba történő építés előtt. Ehhez az 50 μ l végtérfogatú PCR termékhez 100 μ l 30% PEG és 30 mM MgCl₂ kombinációját, valamint 150 μ l 1x TE puffert (10x-es TE törzsoldatból hígítva, 10x TE puffer: 100 mM TRIS, 10 mM EDTA, pH7,5) adtunk. A kapott elegyet 5 percig vortexeltük, ezt követően centrifugáltuk (13000 rpm, 5 perc), majd a pelletet a klónozási reakció összeállítása előtt 1x TE pufferben oldottuk fel.

BP klónozási reakció

A rekombinációs klónozás első lépése során a kész, tisztított fragmentet építettük be az úgynevezett „donor” vektorba. A rekombináció az inszerten található *attB* régiók (B1 és B2) és a donor vektor *attP* régiói (P1 és P2) között ment végbe. Egy 8 μ l végtérfogatú reakcióhoz a következő komponensek szükségesek: 50 fmol donor vektor (pDONR221), 50 fmol tisztított inszert, 0,7 μ l BP klonáz enzim és 1x TE puffer. A reakciót 1 μ l proteináz K hozzáadásával állítottuk le, majd az elegyet *E. coli* 2T1 sejtek transzformálására használtuk.

LR klónozási reakció

A rekombinációs klónozás második lépése az inszertet tartalmazó „entry” és a „destination” vektor között történt. A rekombináció az „entry,, vektorban található, BP klónozás során létrejött *attL* régiók (L1 és L2) és a „destination” vektor *attR* régiói (R1 és R2) között ment végbe. Egy 8 μ l végtérfogatú reakcióhoz a következő komponensek szükségesek: 25 fmol inszertet tartalmazó donor vektor, 25 fmol módosított „destination” (CIP10) vektor, 0,7 μ l LR klonáz enzim és 1x TE puffer. A reakciót ismételtén 1 μ l proteináz K hozzáadásával állítottuk le, majd az eleggyel *E. coli* 2T1 sejteket transzformáltunk.

Bakteriális plazmid izolálása

Az *E. coli* sejtek transzformálását követően azokból plazmidot izoláltunk. A transzformáns telepeket megfelelő antibiotikummal ellátott 2 ml LB tápoldatba oltottuk és a sejteket egy éjszakán át, 37 °C-on, 200 rpm-mel rázatva növesztettük. Másnap a sejteket összegyűjtöttük (5000 rpm, 5 perc), a pelletet vortex segítségével fellazítottuk, majd a sejteket 100 μ l lízis pufferben (50 mM glükóz, 10 mM EDTA, 25 mM TRIS, pH7,5)

felszuszpendáltuk. Ezt követően 200 µl alkalikus-SDS oldatot (4,4 ml steril desztillált víz, 100 µl 10 M NaOH, 0,5 ml 20%-os SDS) és 150 µl 3 M kálium-acetát oldatot adtunk az elegyhez. A szuszpenziót óvatosan összekevertük, majd az így kicsapott kromoszómális DNS-t centrifugálással ülepítettük (13000 rpm, 10 perc). A felülúszót új Eppendorf csőbe pipettáztuk, majd ahhoz 0,5 ml kloroform-izoamilalkohol 24:1 arányú keverékét adtuk és újra centrifugáltuk (13000 rpm, 10 perc). A felső vizes fázist új mikrocentrifuga csőbe helyeztük és 1x térfogatú izopropanol hozzáadása után 20 percig -20 °C-on inkubáltuk. A plazmid DNS-t ezután centrifugálással ülepítettük (13000 rpm, 10 perc), majd 70% etanollal mostuk (13000 rpm, 10 perc). Szárítást követően 30 µl RNázt (250 µg/ml, Sigma) tartalmazó desztillált vízben oldottuk vissza a pelletet. Az így izolált plazmidok ellenőrzését minden esetben restrikciós emésztéssel végeztük el. Amennyiben nagy mennyiségű plazmidra volt szükség, a transzformáns telepekből oltókacsnyi sejtet megfelelő antibiotikummal ellátott, 100 ml térfogatú LB tápoldatba oltottunk, majd a plazmid izolálást a Plasmid Midi Kit (Geneaid) segítségével a gyártó utasításainak megfelelően végeztük el.

5.3.3. Bakteriális és élesztő sejtek fenntartása, kompetens sejtek készítése és transzformálása

5.3.3.1. Bakteriális és élesztő sejtek fenntartása

***E. coli* sejtek fenntartása és tenyésztése**

Az *E. coli* 2T1 sejteket LB táptalajon, 4 °C-os hűtőben tartottuk fenn. Transzformálás előtt a sejteket (amennyiben szükséges, a megfelelő antibiotikummal kiegészítve) 5 ml LB tápoldatba oltva egy éjszakán át inkubáltuk (37°C, 200 rpm). Ezt követően a sejteket 50 ml LB tápoldatba frissen átoltva 0,3-0,4 optikai denzitás (OD) eléréséig növesztettük.

***C. parapsilosis* sejtek fenntartása és tenyésztése**

Az élesztő törzseket hűtőben, 4 °C-on tárolva, YPD táptalajon tartottuk fenn és lehetőség szerint havonta frissítettük. Az élesztő sejtek előneveléséhez 2 ml YPD tápoldatot használtunk, majd azokat 30 °C-on, 200 rpm-mel rázatva, egy éjszakán át inkubáltuk. Rekonstruált törzsek esetén az YPD tápoldatot 50 µg/ml NTC-vel (Werner BioAgents) egészítettük ki. A továbbiakban az előnevelés körülményei indukciótól függően változtak.

5.3.3.2. Kompetens sejtek készítése

Kompetens *E. coli* sejtek előállítása

Friss *E. coli* kompetens sejtek előállításához *E. coli* 2T1 sejteket 5 ml LB tápoldatba oltottunk és egy éjszakán át 37 °C-on, 200 rpm-mel rázatva inkubáltunk, majd a sejteket 50 ml LB tápoldatba átolva 0,3-0,4 OD eléréséig növesztettük. A sejteket centrifugálással összegyűjtöttük (4000 rpm, 10 perc, 4 °C), majd előhűtött 1. mosó oldattal (80 mM MgCl₂, 20 mM CaCl₂) mostuk (4000 rpm, 10 perc, 4 °C). Mosást követően a pelletet jéghideg 100 mM CaCl₂ tartalmú oldatban vettük fel. A kapott kompetens sejteket jégen tároltuk, majd 1-2 órán belül felhasználtuk.

Kompetens *C. parapsilosis* sejtek előállítása

Kompetens *C. parapsilosis* sejtek készítéséhez az élesztő sejteket 2 ml YPD tápoldatba oltottuk, majd 200 rpm-mel rázatva, 30 °C-on, egy éjszakán át inkubáltuk. Másnap a kultúrát 0,2 OD értékre hígítottuk és 30 ml YPD tápoldatban a sejteket 1,0 OD érték eléréséig növesztettük. A sejteket centrifugálással összegyűjtöttük (3000 rpm, 5 perc, 4 °C), majd 3 ml jéghideg steril desztillált vízzel mostuk (3000 rpm, 5 perc, 4 °C). Ezután 1 ml előhűtött TELIOAC oldattal (100 µl 10x TE puffer, 100 µl 1M lítium-acetát, 800 µl desztillált víz) mostuk a sejteket, majd centrifugálás után (13000rpm, 30 s) a pelletet 200µl TELIOAC oldatban vettük fel. Az így kapott kompetens sejteket felhasználásig jégen tároltuk.

5.3.3.3. Bakteriális és élesztő sejtek transzformálása

E. coli sejtek transzformálása

A kompetens *E. coli* 2T1 sejtekhez hozzámértük a transzformálandó DNS-t, majd a sejteket 25 percen át jégen inkubáltuk. Ezt követően a sejteket hősokknak vetettük alá (42 °C, 2 perc), majd 800 µl LB tápoldat hozzáadása után 37 °C-on regeneráltattuk azokat. Ezután a transzformált sejteket szelektív táptalajra (LB^{KAN} / LB^{AMP}) szélesztettük és 37 °C-on, egy éjszakán át inkubáltuk.

C. parapsilosis sejtek transzformálása

A *C. parapsilosis* kompetens sejtek 100 µl-éhez hozzáadtunk 10 µl, a transzformálást megelőzően denaturált (100 °C, 10 perc) hering sperma DNS-t (Sigma), majd a transzformálni kívánt DNS fragmentumot (5 µg fúziós PCR termék). Az így kapott elegyet

30 °C-on, 30 percen át inkubáltuk, majd a sejtekhez 700 µl PLATE oldatot mértünk (800 µl 50% PEG 3350, 100 µl 1 M lítium-acetát, 100 µl 10x TE puffer). Ezt követően a sejteket egy éjszakán át, 30 °C-on inkubáltuk. Másnap a hősokkot követően (44 °C, 15 perc) a transzformált sejteket centrifugálással összegyűjtöttük (13000 rpm, 30 s) és 1 ml YPD oldattal a pellet felzavarása nélkül mostuk (13000 rpm, 30 s). Ezután a sejteket 2 órán át, 30 °C-on, 1 ml YPD tápoldatban tovább növesztettük. Végül a transzformált sejteket centrifugálással ismét összegyűjtöttük (13000 rpm, 30 s) és szelektív táptalajra (leucin mentes vagy hisztidin és leucin mentes minimál táptalaj) szélesztettük. A csészéket 30 °C-on, két napon keresztül inkubáltuk.

5.3.4. Deléciós és rekonstruált törzsek karakterizálása

5.3.4.1. Általános fenotipikus analízishez használt módszerek

***C. parapsilosis* deléciós törzsek növekedésének vizsgálata különböző táptalajokon és tápoldatban**

Az élesztő sejteket az 5.3.3.1. pontban leírtaknak megfelelően neveltük elő. Ezt követően a sejteket 1x PBS pufferrel háromszor mostuk (3000 rpm, 5 perc), majd ugyanezt a puffert alkalmazva beállítottuk a kívánt sejtkoncentrációkat (2×10^6 , 2×10^5 , 2×10^4 és 2×10^3 sejt/ml) és az egyes hígításokból 5-5 µl-t csepegtettünk YPD, 1% glükóz + YNB, YCB + 2% BSA, illetve 1% glükóz és 10% hőinaktivált (58 °C, 30 perc) FBS tartalmú YNB táptalajokra. Ezután a csészéket három különböző hőmérsékleten, 20, 30 és 37 °C hőmérsékleteken, 48 órán át inkubáltuk.

Az egyes törzsek különböző kémhatású közegekben (pH4-pH8) történő növekedési vizsgálatához, az 5.2. fejezetben leírtak alapján elkészítettük a táptalajokat, majd az előzőekhez hasonlóan beállítottuk a különböző sejtszámú hígításokat, amelyekből inokulumként 5-5 µl mennyiséget alkalmaztunk. A csészéket 30 és 37 °C-on 48 órán keresztül inkubáltuk.

Az egyes törzsek növekedési kinetikáját is meghatároztuk. YPD tápoldatot alkalmazva beállítottuk a kívánt sejtkoncentrációt (5×10^5 sejt/ml), majd a sejteket 24 vagy 48 mintahelyű tenyésztőedénybe pipettáztuk. A tenyészeteket 24 órán keresztül 30°C-on inkubáltuk, mely során óránként monitoroztuk a 600 nm hullámhosszon mérhető optikai densitás értéket (SPECTROstar nano microplate reader, BMG labtech). Minden abszorbancia mérést 200 rpm-en történő 5 perc folyamatos rázatás előzött meg.

***C. parapsilosis* deléciós törzsek növekedésének vizsgálata különböző stressz körülmények között**

Az élesztő sejteket az 5.3.3.1. pontban leírtaknak megfelelően készítettük elő, majd háromszor mostuk 1x PBS pufferrel (3000 rpm, 5 perc) és végül 1x PBS pufferben szuszpendáltuk fel. Ezt követően tápoldatos vizsgálat esetében YPD oldatot használva beállítottuk a kívánt sejtkoncentrációt (5×10^4 sejt/ml), majd az így kapott szuszpenziókból 95-95 μ -t pipettáztunk 96 lyukú tenyésztőedényekbe. Ezután hozzáadtuk az 5.2. fejezetben leírt, tápoldatban használatos sejtfal, oxidatív vagy egyéb stresszorokat, 6 lépcsős felező hígítási sort alkalmazva. A kísérletben stresszmentes sejtes kontrollt, illetve sejtmentes YPD kontrollokat használtunk. A tenyésztőedényeket 18 órán át 30 °C-on inkubáltuk, majd spektrofotométer (SPECTROstar) segítségével, 600 nm-en mértük a tenyészet optikai denzitását.

A stresszorok jelenlétére adott válasz táptalajon történő vizsgálatához az egyes táptalajokat az 5.3. fejezetben leírtak szerint állítottuk elő, majd a kívánt sejtkoncentrációk (2×10^6 , 2×10^5 , 2×10^4 és 2×10^3 sejt/ml) beállítása után az egyes hígításokból 5-5 μ -t csepegtettünk ki. A csészéket 48 órán át inkubáltuk. Mivel a gazdaszervezetben uralkodó hőmérsékleti viszonyokhoz a 37 °C áll közelebb, ezért az egyes törzseket a növekedésükhöz optimális 30 °C mellett 37 °C-on is elvégeztük. Abban az esetben, amikor a magasabb hőmérsékleten nem kaptunk kiértékelhető adatot ott a 30 °C-os adatokat mutatjuk be.

A létrehozott *C. parapsilosis* törzsek morfológia váltásának vizsgálata

A gombasejteket az 5.3.3.1. pontban leírtak szerint előneveltük, majd 1x PBS pufferrel mostuk háromszor (3000 rpm, 5 perc), ezt követően a sejteket 1x PBS pufferben vettük fel. Beállítottuk a kívánt sejtkoncentrációt (1×10^7 sejt/ml), amelyből 100 μ -t 10% hőinaktivált (58 °C, 30 perc) FBS-sel kiegészített DMEM tápoldathoz adtunk. Ezután a tenyésztőedényt 37 °C-on inkubáltuk, majd 1, 24 és 48 óra eltelte után a sejtek pszeudohifa képzését Leica fénymikroszkóp segítségével monitoroztuk.

A létrehozott *C. parapsilosis* törzsek biofilmképzésének vizsgálata

Az élesztő sejteket az 5.3.3.1. pontban leírtak szerint neveltük elő. Egy nappal a kísérlet megkezdése előtt 100-100 μ l 10% hőinaktivált FBS oldattal töltöttük fel a 96 lyukú tenyésztőedényt. Másnap a tenyésztőedényt és az előnevelt gombasejteket 1x PBS-sel háromszor mostuk. Ezt követően 1x YNB + 0,5% glükóz tápoldatot használva beállítottuk a kívánt sejtkoncentrációt (1×10^7 sejt/ml). A gomba sejtuszuszpenziókból 100-100 μ -t

pipettáztunk a 96 lyukú tenyésztőedény egy-egy mintahelyébe, majd további 100-100 µl 1x YNB + 0,5% glükóz oldatot adtunk a már kimért mennyiségekhez. A tenyésztőedényt 37 °C-on, 48 órán keresztül inkubáltuk, majd az edény sejteket tartalmazó mintahelyeit 1x PBS pufferrel kétszer óvatosan mostuk. Mosást követően a kitapadt sejtekre 100-100 µl 1x YNB + 0,5% glükóz tápoldatot mértünk, majd azokhoz 20-20 µl 5 mg/ml koncentrációjú MTT (3-(4,5-dimetiltiazolil-2)-2,5-difeniltetrazólium bromid, SERVA Electrophoresis) oldatot pipettáztunk. Ezt követően a sejteket 37 °C-on, 5 órán át inkubáltuk, majd a festék eltávolításához a sejteket 1x PBS pufferrel háromszor mostuk. Az utolsó mosást követően 1-1 mintahelyhez 200-200 µl DMSO (dimetil-szulfoxid, Sigma-Aldrich) oldatot adtunk, majd az elegyekből 10-15 percet követően 100-100 µl-t új tenyésztőedénybe mértünk és spektrofotométer (SPECTROstar nano microplate reader) segítségével OD mérést végeztünk 540 nm-en. A kísérletben legalább öt biológiai párhuzamot alkalmaztunk, valamint három festékmentes, DMSO-t tartalmazó kontrollt.

***C. parapsilosis* deléciós törzsek antifungális szerekkel szembeni érzékenységének vizsgálata**

Az egyes antifungális szerekhez tartozó minimális gátló koncentráció (MIC) értékeket mikrodilúciós teszt elvégzésével határoztuk meg, amelyet 96 mintahellyel rendelkező tenyésztőedényekben végeztünk el. Az egyes törzsek esetén, a flukonazol és kaszpopungin-diacetát MIC koncentrációk meghatározását a CLSI és az EUCAST által megadott módon végeztük el. A standard protokollok alapján a sejtek 50%-os növekedésének gátlása minimális gátló koncentrációnak számít (http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/, CLSI M27 - A3 protokoll). A sejtek előnevelését az 5.3.3.1. pontban leírtaknak megfelelően végeztük, majd azokat 1x PBS-sel háromszor mostuk és RPMI-MOPS (Lonza) tápoldatot használva állítottuk be a kívánt sejtkoncentrációt, amely flukonazol (Fluka) esetében 3×10^4 sejt/ml, kaszpopungin-diacetát (Sigma-Aldrich) esetében pedig 3×10^3 sejt/ml volt.

Flukonazol esetén a törzsoldat létrehozásához oldószerként DMSO-t használtunk, majd a 128 µg/ml legmagasabb alkalmazott koncentrációból kiindulva RPMI-MOPS segítségével 9 lépcsőből álló felező hígítási sort állítottunk elő. Kaszpopungin-diacetát esetén a törzsoldat előállításához oldószerként steril desztillált vizet alkalmaztunk, majd a 16 µg/ml kiindulási koncentrációból szintén 9 lépcsőből álló felező hígítási sort alkalmaztunk.

Az egyes koncentrációkból 100 µl-t adtunk a meghatározott koncentrációjú sejtek 100 µl-éhez. A mintákat 30 °C-on inkubáltuk, majd a sejtek növekedését OD mérést végeztünk 24, illetve 48 óra elteltét követően 620 nm-en.

A kísérletben a deléciós könyvtár tagjainak érzékenységét a *C. parapsilosis* CLIB 214 vad típusú törzs érzékenységéhez viszonyítottuk. Ezek alapján abban az esetben nyilvánítottunk szenzitívnek egy törzset, amennyiben az a vad típusú törzshöz képest az antifungális szerrel szemben szenzitívebbnek bizonyult, és rezisztensek ha az adott törzs a CLIB 214-hez képest kevésbé volt érzékeny a gombaellenes szerrel szemben. A kísérlet sikerességének megerősítéséhez a következő referencia törzseket használtuk: a *C. parapsilosis* ATCC (amerikai típusú sejt kultúra gyűjtemény) 22019, valamint a *C. krusei* ATCC 6258 törzseket, amelyek IC₅₀ értékei ismertek.

5.3.4.2. Funkció beazonosítás érdekében használt egyéb kísérleti módszerek

A deléciós törzsek növekedésének vizsgálata alternatív szénforrások jelenlétében, vashiányos közegben, egyéb oxidatív stresszor jelenlétében

Az élesztő sejteket az 5.3.3.1. pontban leírtaknak megfelelően neveltük elő, majd 1x PBS pufferrel háromszor mostuk (3000 rpm, 5 perc), végül 1x PBS-t alkalmazva beállítottuk a megfelelő sejt koncentrációkat (2×10^6 , 2×10^5 , 2×10^4 és 2×10^3 sejt/ml), amelyekből 5-5 µl-t csepegtettünk a táptalajok felszínére. Az 5.2. fejezetben leírtak alapján alternatív szénforrások hasznosításának vizsgálatára aminosavval kiegészített, valamint 2% tejsav tartalmú táptalajokat alkalmaztunk. Az oxidatív stresszorok hatásának vizsgálatára 0,005 mM CdSO₄ tartalmú táptalajt, a vas metabolizmus vizsgálatára pedig 150 mM BPS, illetve 2 µM heminnel kiegészített 500 mM BPS tartalmú tápközegeket készítettünk. Az egyes törzsek kicsepegtetését követően a csészéket 30, illetve 37 °C-on legalább 48 órán át inkubáltuk.

Deléciós törzsek sejtfal összetételének vizsgálata fluoreszcens festési eljárások alkalmazásával

CCW festék keverékkel történő festés menete: A gombasejteket az 5.3.3.1. fejezetben leírtak szerint készítettük elő, majd azokat 1x PBS pufferrel háromszor mostuk (3000 rpm, 5 perc). Ezt követően a sejteket 1 ml 4% paraformaldehid oldatban vettük fel és 30 percen keresztül, szobahőmérsékleten egyenletesen forgatva inkubáltuk, majd ismételtén mostuk 1x PBS pufferrel négyszer egymás után. Az így kapott pelletet 0,5 ml 1% BSA oldatban szuszpendáltuk és 30 percen át szobahőn egyenletesen forgatva inkubáltuk, majd a sejteket

1x PBS-sel háromszor mostuk, végül 400 µl 1x PBS-ben szuszpendáltuk fel. A kapott szuszpenzióból 100 µl-t új Eppendorf csőbe pipettáztunk, amelyhez 100 µl kalkofluor fehér (CW, Sigma-Aldrich), konkanavalin A kötött fluoreszcein izotiocianát (ConA-FITC, Sigma-Aldrich) és búzacsíra-agglutinin kapcsolt tetrametil-rodamin-izotiocianát (WGA-TRITC, Eylaboratories) festék keveréket adtunk és a kapott sejtes elegyet 30 percen keresztül folyamatos forgatás mellett, fénytől elzárva, szobahőn inkubáltuk (100 µl végtérfogatú oldat esetén: 8 µl 2,5 mg/ml ConA-FITC, 1 µl 1 mg/ml CW, 1 µl WGA-TRITC, 90 µl 1% BSA). Az inkubációs idő letelte után a festett sejteket 1x PBS-sel háromszor mostuk, majd 100 µl 1x PBS oldatban szuszpendáltuk és használatig azokat jégen tároltuk.

Funkció validálás érdekében elvégzett génexpressziós vizsgálatok

A génexpressziós vizsgálatokhoz az 5.3.2.2. fejezetben leírtaknak megfelelően elvégeztük a gomba törzsekből történő RNS izolálást és cDNS írást, a real-time PCR-hoz pedig az ugyanebben a fejezetben megadott paramétereket alkalmaztuk. Az egyes törzsek eseténa funkció validálás érdekében elvégzett génexpressziós vizsgálatokhoz használt indukciós közegeket, valamint az effektor géneket az alábbiakban tüntetjük fel. Az egyes génekhez tartozó primerek szekvenciáját a 2. számú melléklet tartalmazza.

A *CPAR2_100540* génre nézve mutáns törzsek vizsgálatához használt (indukciós) közegek, és potenciális effektor gének:

Alkalmazott tenyésztési körülmények	Vizsgált gén expressziója
YPD, 37 °C	<i>FRP1, CYC1, COX4</i>
YPD, pH8, 37 °C	<i>FRP1</i>
YPD, 150 mM BPS, 37 °C	<i>FRP1</i>
YNB + aminosavak, 37 °C	<i>CYC1, COX4</i>

A pH8 kémhatású tápközeggel, 150 mM BPS tartalmú tápoldattal, illetve aminosavakkal (mint egyedüli szénforrással) történő génexpresszió indukálás egy éjszakán át zajlott, ezt megelőzően a sejteket YPD tápoldatban frissen neveltük elő.

A *CPAR2_200390* génre nézve mutáns törzsek vizsgálatához használt (indukciós) közegek, és potenciális effektor gének:

Alkalmazott tenyésztési körülmények	Vizsgált gén expressziója
YPD, 37 °C	<i>CHT1-CHT4, CHS1-CHS3, CHS8</i>
DMEM, 10% FBS, 37 °C	<i>CHT1-CHT4, CHS1-CHS3, CHS8</i>

A *CPAR2_602840* génre nézve mutáns törzsek vizsgálatához használt (indukciós) közegek, és potenciális effektor gének:

Alkalmazott tenyésztési körülmények	Vizsgált gén expressziója
YPD, 37 °C	<i>ACE2, BCR1, EFG1, CPH2, CFZ1, GZF3, UME6</i>
1x YNB, 0,5% glükóz, 37 °C	<i>ACE2, BCR1, EFG1, CPH2, CFZ1, GZF3, UME6</i>

A YNB + glükózzal történő indukció két napon keresztül történt, hasonlóan a gomba törzsek biofilmképzéséhez használt MTT módszerhez történő előkészületekhez.

5.3.5. *In vivo* virulencia vizsgálatok

In vivo virulencia vizsgálatához a nagy viaszmosoly (*Galleria mellonella*) modellorganizmus lárváit alkalmaztuk. Az egyes deléciós törzsekkel történő fertőzést megelőzően beállítottuk az optimális gomba sejtszámot. Ehhez a CLIB 214 vad típusú törzset használtuk. Az élesztő sejteket az 5.3.3.1. pontban leírtak szerint előneveltük. A kísérletet megelőzően a *G. mellonella* lárvákat 30 °C-on egy éjszakán át inkubáltuk. Másnap a gombasejteket 1x PBS-sel háromszor mostuk (3000 rpm, 5 perc), majd 10^9 sejt/ml sejtuszpenziót állítottunk elő és abból 5 lépcsőben tízszeres hígítást készítettünk. A gombasejtek injektálásához Hamilton pipettát használtunk. Az injektált *G. mellonella* lárvákat 30 °C-on, 7 napig inkubáltuk, közben naponta monitoroztuk a lárvák túlélését. Az optimális sejtkoncentráció megállapítása után (5×10^6 /10 μ l) csoportonként 20 db egyed alkalmazva végeztük a lárvák fertőzését a vad típusú és a rendelkezésünkre álló *C. parapsilosis* deléciós és rekonstruált törzsekkel. A kísérlethez kontrollként nem-fertőzött és 1x PBS pufferrel injektált lárvákat egyaránt alkalmaztunk.

5.3.6. Statisztikai analízis

Statisztikai analízist a GraphPad PRISM szoftverrel végeztünk. A statisztikai szignifikanciát párosítatlan t-próba analízissel vagy Mantel-Cox (Log-rank) teszt segítségével (túlélési görbék esetén) állapítottuk meg. Statisztikailag szignifikánsnak ítéltünk meg egy különbséget, amennyiben a $p < 0,05$ volt.

6. Eredmények és értékelésük

6.1. A *C. parapsilosis* fertőzőképességét potenciálisan befolyásoló gének azonosítása

Számos patogén gombafaj rendelkezik úgynevezett virulencia faktorokkal, amelyek valamilyen módon hozzájárulnak a gomba fertőzőképességéhez, ezáltal szerepet játszanak a gazda kolonizációjában és adott esetben szisztémás fertőzés kialakításában (Casadevall 2007; Karkowska-Kuleta és mtsi., 2009).

Az opportunista humánpatogén *C. parapsilosis* virulenciájáért felelős gének azonosítása érdekében elvégeztük a humán eredetű monocita sejtvonal (THP-1) gombasejtekkel történő fertőzését az 5.3.1. fejezetben leírtak szerint. A fertőzés során THP-1 gazdasejteket fertőztünk ötszörös mennyiségű élesztővel. A sejteket 1 és 6 óra eltelte után összegyűjtöttük, a gombasejtekből RNS-t izoláltunk, majd ezt követően Prof. Toni Gabaldon és kutatócsoportja segítségével teljes transzkriptóm analízist végeztünk. Az így kapott adatok alapján olyan élesztő gének genomból történő eltávolítását tűztük ki célul, amelyek expressziója a gazda-patogén interakciót követően 1 és/vagy 6 óra múlva jelentős mértékben megnövekedett, utalva ezzel a virulenciában játszott szerepükre (4. táblázat). Az általunk kiválasztott gének többsége transzkripciós faktor, illetve protein kináz kódoló gén, amelyek különböző szignalizációs útvonalak szabályozásában vehetnek részt. A *Candida* adatbázis (www.Candidagenome.org) szerint ortológjaik ciklin-függő kinázokat, sejtmorfológiát, rezisztenciát és egyéb életképességet, valamint virulenciát meghatározó faktorokat kódolnak. A fentebb említett listát ezután olyan génekkel bővítettük ki, amelyekről előzetes kísérleteink alapján feltételeztük, hogy a gomba virulenciáját potenciálisan befolyásolhatják. Ezek a gomba virulenciáját különböző metabolikus útvonalak szabályozásán keresztül, illetőleg a gomba sejtfal összetételének feltételezett befolyásolása révén kerültek kiválasztásra (4. táblázat). A *CPAR2_100460*, *CPAR2_100470*, *CPAR2_204840* és *CPAR2_704330* gének ortológjai membrán transzporter fehérjéket kódolnak, amelyek feltehetőleg az MFS (fő membrántranszport elősegítő szupercsalád) csoportba tartoznak. Az MFS szupercsalád tagjai egyes baktériumokban és gombafajokban összefüggésbe hozhatóak drog rezisztencia kialakításával (Pasrija és mtsi., 2007; Reddy és mtsi., 2012; Shaheen és mtsi., 2015) biofilmképzéssel, illetve a virulencia szabályozásával (Shah és mtsi., 2014; Wu és mtsi., 2016). A *CPAR2_704370* gén ortológja a különböző típusú stressz kondíciókra adott válasz kialakításában szerepet játszó regulátor, míg a *CPAR2_500360*, *CPAR2_107240* és *CPAR2_501400* által kódolt fehérjék feltételezhetően a gomba sejtfal bioszintézisével és

regenerációjával hozhatóak összefüggésbe. A *CPAR2_501400* ORF 1 órával a gazda-patogén kölcsönhatást követően emelkedett expressziót mutatott, ezért a gént a gazda-patogén interakció során azonosított csoport tagjaihoz soroltuk. Az így összeállított lista alapján kezdtük meg az egyes gének genomból történő egyenkénti eltávolítását.

4. táblázat. A *C. parapsilosis* fertőzőképességét potenciálisan befolyásoló gének szelektált listája.

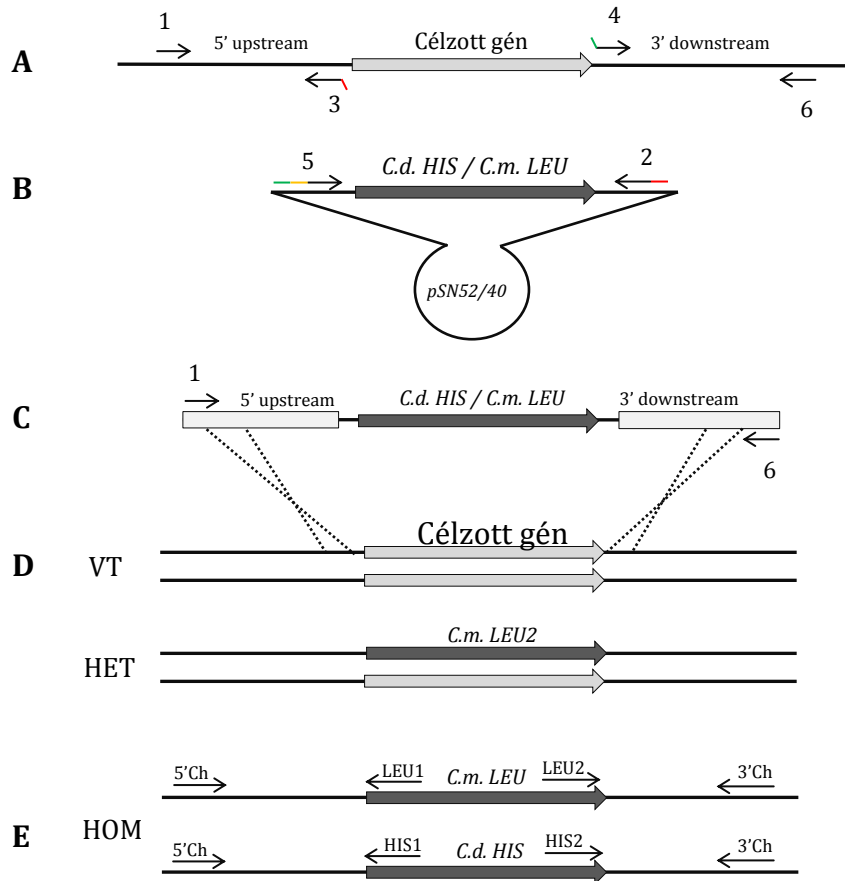
	Emelkedett expresszió gazda-patogén kölcsönhatás során		Egyéb virulenciát feltehetőleg befolyásoló gének
	1 óra inkubáció	6 óra inkubáció	-
Transzkripciós faktor + Cink ujj motívum	<i>CPAR2_200040</i> <i>CPAR2_802820</i> <i>CPAR2_400270</i> <i>CPAR2_108410</i>		<i>CPAR2_100460</i> <i>CPAR2_100470</i> <i>CPAR2_204840</i> <i>CPAR2_704330</i>
Transzkripciós faktor	<i>CPAR2_401150</i> <i>CPAR2_104420</i> <i>CPAR2_302400</i> <i>CPAR2_200390</i> <i>CPAR2_202040</i> <i>CPAR2_100540</i> <i>CPAR2_602840</i> <i>CPAR2_602430</i> <i>CPAR2_503760</i> <i>CPAR2_602370</i> <i>CPAR2_800040</i>	<i>CPAR2_200390</i> <i>CPAR2_202040</i> <i>CPAR2_100540</i> <i>CPAR2_602840</i> <i>CPAR2_602430</i>	<i>CPAR2_704370</i> <i>CPAR2_500360</i> <i>CPAR2_107240</i>
Kináz	<i>CPAR2_300080</i> <i>CPAR2_209520</i> <i>CPAR2_502720</i> <i>CPAR2_303700</i> <i>CPAR2_108840</i> <i>CPAR2_304080</i>	<i>CPAR2_500180</i>	
Egyéb	<i>CPAR2_501400</i>		

6.2. *C. parapsilosis* deléciós mutáns törzsek létrehozása

Az általunk azonosított, virulenciát feltételezhetően befolyásoló gének jellemzésére több különböző molekuláris biológiai stratégia is rendelkezésünkre áll. Ezek egyike az adott gén genomból történő célzott eltávolítása. Egy gén deléciójára különböző deléciós stratégiák alkalmazhatóak, amelyek közül az egyik a Dr. Suzanne Noble és munkatársai által *C. albicans* élesztőgombára kifejlesztett fúziós PCR technika (Noble és Johnson 2005). A módszert Prof. Geraldine Butler és munkatársai adaptálták *C. parapsilosis*-ra (Holland és mtsi., 2014), amelynek működési elvét az 5. ábra szemlélteti.

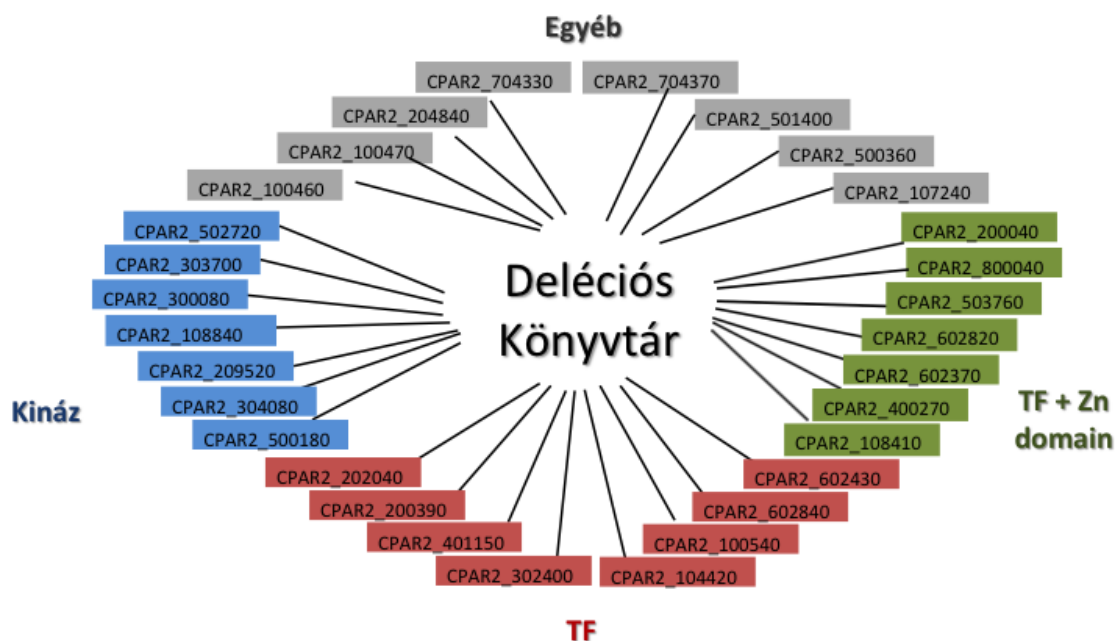
Munkánk során a *C. parapsilosis* CLIB 214 nevű referencia törzssel dolgoztunk, amelynek a hisztidin és leucin aminosavakra nézve kettős aminosav auxotróf (*leu2-/his1-* vagy CPL2H1) törzsét használtuk a transzformáláshoz. A CPL2H1 törzset egy olyan fúziós PCR termékkel transzformáltuk, ami tartalmazta a célzott génre nézve specifikus körülhatároló régiókat, valamint egy közrefogott szelekciós markert (*LEU/HIS*). A célzott gén upstream és downstream régiójának (5/A. ábra), valamint a szelekciós marker gén felszaporítását követően (5/B. ábra) végeztük el az egyes szakaszok összekapcsolását (5/C. ábra). Az így kapott fúziós PCR termékeket felhasználva transzformáltuk az auxotrófiát hordozó kompetens CPL2H1 sejteket. A kémiai transzformálás során a beépülés alapja a fúziós konstrukciókon található upstream és downstream régiók homológ rekombinációja a genomban található szakaszokkal (5/D. ábra). Ezt követően a transzformált sejteket hisztidinnel vagy leucinnal kiegészített szelekciós táptalajra szélesztettük a felhasznált fúziós deléciós konstrukció típusától függően. Mivel a *C. parapsilosis* genomját tekintve diploid, ezért a null mutáns törzsek létrehozásához a második allél eltávolítása is szükséges. Az így kapott heterozigóta és homozigóta deléciós törzsek ellenőrzését elsősorban kolónia PCR segítségével végeztük el (ld. 5.3.2.2. fejezet), amely során a deléciós konstrukció (*LEU / HIS* fúziós kazetta) genomba épülését mindkét irányból ellenőriztük (5/E. ábra). A kolónia PCR során pozitívnak minősített transzformáns törzseket valós idejű (real time) PCR segítségével is validáltuk.

A fúziós PCR módszer alkalmazását tekintve specifikus, gyorsan kivitelezhető és lehetővé teszi több gén egy időben történő egyenkénti delécióját, így egy deléciós könyvtár létrehozását. A módszert alkalmazva sikeresen előállítottunk 30 különböző génre nézve homozigóta deléciós mutáns törzset, génenként 2-2 független null mutáns törzssel. Az általunk így módon előállított mutáns könyvtár tagjait a 6. ábra szemlélteti. Mivel a későbbi kísérletek során az egyes génekhez tartozó párhuzamos mutáns törzsek hasonló fenotípust mutattak, így a továbbiakban, a könnyebb átláthatóság érdekében, ezek közül csak az egyiket tüntetjük fel.



5. ábra. *C. parapsilosis* deléciós törzsek létrehozása fúziós PCR-rel előállított deléciós konstrukciók segítségével.

A: A célzott gént körülhatároló upstream (1. és 3. primer) és downstream (4. és 6. primer) régiók amplifikálása. A deléciós konstrukció létrehozásához szükséges fúziós szekvenciákat a 3. és 4. primerek hordozzák. Piros jelölés - upstream régiót és szelekciós markert összekötő fúziós szekvencia, zöld jelölés - downstream régiót és markert összekötő fúziós szekvencia. **B:** Szelekciós marker gének (2. és 5. primer) amplifikálása. A primer pár mindkét tagja hordoz fúziós szekvenciát, illetve az 5. primer egyedi TAG-jelölést hordoz. **C:** Fúziós konstrukció előállítás (1. és 6. primer). **D:** Homológ rekombináció elvén történő gén eltávolítás folyamata (VT - Vad típusú törzs, HET - heterozigóta deléciós törzs) **E:** A konstrukció helyes beépülésének ellenőrzése kolónia PCR segítségével (HOM - homozigóta deléciós törzs). LEU1, LEU2 - primerek a *C. maltosa* LEU2 marker korrekt integrációjának vizsgálatához; HIS1, HIS2 - primerek a *C. dubliniensis* HIS1 marker helyes integrációjának ellenőrzésére. 5'Ch, 3'Ch - a célzott gént körülhatároló upstream és downstream genomi régiókra tervezett primerek.



6. ábra. A létrehozott *C. parapsilosis* deléciós könyvtár tagjai.

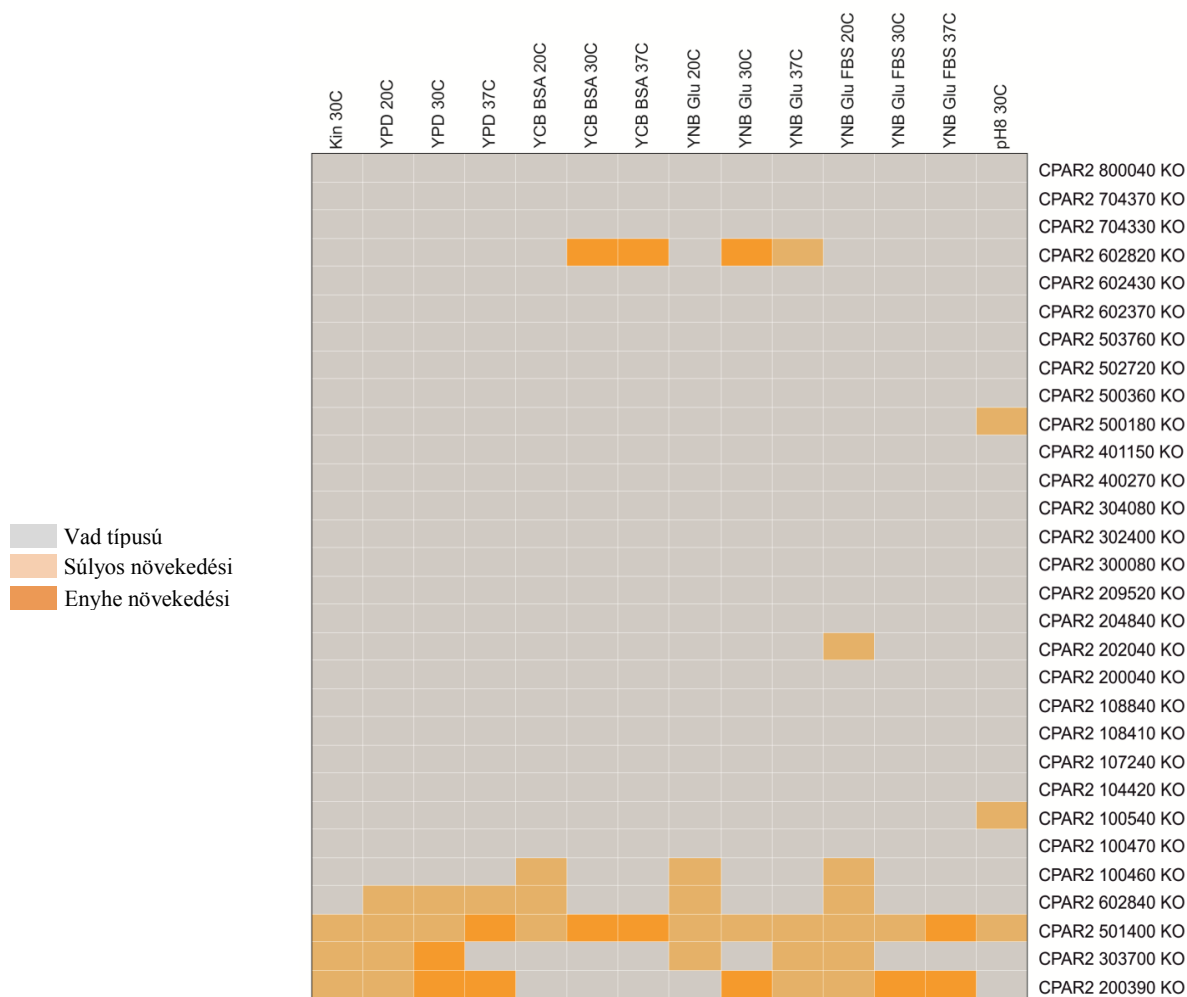
A deléciós könyvtár null mutáns törzseinek genotípusát az 1. számú melléklet táblázata tartalmazza.

6.3. A deléciós mutáns könyvtár tagjainak széles körű fenotípusos vizsgálata

A deléciós törzsek előállítását követően megkezdtuk azok jellemzését, amely során megvizsgáltuk az egyes törzsek növekedési képességét, bizonyos stressz körülmények hatására történő túlélését, másodlagos morfológia képzését, biofilmképzését, továbbá antifungális szerekkel szembeni érzékenységét.

6.3.1. A növekedés vizsgálata komplex tápközegben és minimál táptalajokon

A létrehozott deléciós mutáns könyvtár tagjainak kezdeti tesztelése során megvizsgáltuk az egyes törzsek életképességét esetlegesen érintő változásokat (pl. sejtlégzés vagy egyéb metabolikus defekt) érintő esetleges változásokat. Kísérleteinkben elsőként YPD komplex tápoldatban teszteltük a mutáns törzsek növekedését. A növekedési kinetikát 24 órán keresztül inkubálva, óránkénti optikai denzitás méréssel spektrofotometriásan határoztuk meg. A kapott adatok alapján négy különböző deléciós törzs esetében (*CPAR2_200390* Δ/Δ , *CPAR2_303700* Δ/Δ , *CPAR2_501400* Δ/Δ és *CPAR2_602840* Δ/Δ) tapasztaltunk növekedési rendellenességet (7. ábra). Ez arra enged következtetni, hogy ezek a gének eddig ismeretlen módon, közvetlen befolyással bírnak a gomba életképességére.



7. ábra. A hő térkép egy összegző ábra a *C. parapsilosis* deléciós törzsek eltérő közegekben történő növekedéséről.

A létrehozott *C. parapsilosis* deléciós mutáns törzsek növekedésének vizsgálata YPD komplex tápoldatos (Kin: növekedési kinetika meghatározása) és táptalajos közegekben, valamint különbözőképpen előállított minimál táptalajokon és FBS-sel kiegészített tápközegekben. Vizsgáltuk továbbá az egyes törzsek életképességét különböző kémhatású (pH 4-pH 8) táptalajokon is, melyek közül a pH 8 került feltüntetésre.

A *CPAR2_501400* gén funkcionális ortológja (*CaCWH41* – kalkofluor fehér hiperszenzitív fenotípust okozó gén) egyike azon *C. albicans* sejtfal bioszintézisben szerepet játszó géneknek, amelyek az életképességet is nagy mértékben befolyásolják (Mora-Montes és mtsi., 2007). Ez magyarázat lehet a *CPAR2_501400* Δ/Δ törzs esetén kapott növekedési rendellenességre. A növekedési defekttel rendelkező további 3 törzset a későbbiekben (6.4.2., 6.4.3. és 6.4.4. alfejezetek) részletesen tárgyaljuk.

Gombafertőzés során a gazdaszervezetbe jutott patogén gombasejtek képesek alkalmazkodni a gazdaszervezetben uralkodó restriktív körülményekhez, úgymint az

alternatív szén- és nitrogén források jelenlétéhez (Barelle és mtsi., 2006; Brown, A. J. és mtsi., 2014), a megváltozott hőmérsékleti viszonyokhoz (Biswas és mtsi., 2007), a kémhatás neutrálisból savas vagy lúgos irányban történő eltolódásához (Coutinho 2009; Vylkova és mtsi., 2011), illetve a szérumban keringő valamennyi antimikrobiális és egyéb fehérje jelenlétéhez (Gropp és mtsi., 2009; Horvath és mtsi., 2012). A túlélés és a sikeres kolonizáció érdekében a gazdaszervezetbe jutott patogénnek alkalmazkodnia kell a fenti tényezők változásához.

Ezen körülmények vizsgálatokor a törzsek életképességét - a komplex YPD tápközeg mellett - teszteltük minimál táptalajokon, valamint BSA-ból származó szén- és nitrogénforrás felhasználása szempontjából. Vizsgáltuk továbbá a mutáns törzsek FBS (komplex fehérje összetételű szérum) bontási képességét is. A törzsek növekedését eltérő hőmérsékleteken is megvizsgáltuk. A megváltozott kémhatásra adott válasz vizsgálatához öt különböző pH-ra (pH 4 – pH 8) beállított YPD táptalajt alkalmaztunk. A kapott eredményeket a 7. ábrán látható hőtérkép ábrázolja.

Kísérleteink során az egyes törzsekből négy különböző hígítási koncentrációt csepegtettünk az egyes csészékre, majd azokat 48 órán át, meghatározott hőmérsékleteken inkubáltuk. Ezt követően az egyes törzsek növekedését a referenciaként használt vad típusú (CLIB 214) törzshöz hasonlítottuk. A táptalajokon történő növekedést dokumentáltuk, amelyre példa a 3. számú melléklet.

Kísérleteinkben 5 deléciós törzs esetén figyeltünk meg növekedési rendellenességet a BSA-ból származó tápanyagforrás hasznosítása során, további 7 deléciós törzs esetében dokumentáltunk lassú növekedést YNB + glükóz tartalmú táptalajos közegben, illetve 6 törzs esetében tapasztaltunk növekedési rendellenességet FBS szérumból származó fehérjékkel kiegészített tápközegben. Lúgos kémhatású táptalaj használata során további 3 deléciós törzsnél tapasztaltunk jelentős mértékben lelassult növekedést (7. ábra). Megjegyzendő, hogy az egyes törzsek telepmorfológiájának megváltozását ráncosból sima átmenet esetén 3 (*CPAR2_100540 Δ/Δ*, *CPAR2_303700 Δ/Δ* és *CPAR2_501400 Δ/Δ*), míg ráncosból gyűrött irányba 2 törzs (*CPAR2_200390 Δ/Δ* és *CPAR2_500180 Δ/Δ*) esetében detektáltuk.

Összefoglalva, az egyes törzsek növekedési vizsgálatait követően mindösszesen 9 törzsnél (a deléciós könyvtár 30%-a) tapasztaltunk változást a vad típusú törzshöz képest. Mindezek alapján elmondható, hogy az általunk létrehozott deléciós könyvtár előzetes vizsgálatait során számos olyan gént sikerült azonosítanunk, amelyek valamilyen módon befolyásolják a gazdaszervezetben uralkodó körülményekhez történő alkalmazkodást.

6.3.2. A deléciós mutáns törzsek válaszánaK vizsgálata különböző típusú stressz körülmények között

A továbbiakban a létrehozott deléciós törzsek olyan egyéb stressz körülményekre adott válaszait vizsgáltuk, amelyek a gazda-patogén kölcsönhatás kezdetén a gazdaszervezetben is fennállnak. Bizonyos stresszorok alkalmazása információval szolgálhat a géndeléciót követően megváltozott egyéb tulajdonságokról is, mint például a sejtfaI összetételének megváltozásáról, ami szintén befolyásolhatja a gomba virulenciáját.

A gomba gazdaszervezetbe kerülését követően először 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 (Jimenez-Lopez és Lorenz 2013). Kísérleteink során az oxidatív stressz jelenlétére adott válasz vizsgálatára elsősorban hidrogén-peroxidot alkalmaztunk, majd később, a részletesen jellemzett törzseknél menadiont és kadmium-szulfátot használtunk. az intracelluláris oxidatív stresszkörülmények modellezésére (Jamieson és mtsi., 1996; Olarewaju és mtsi., 2004).

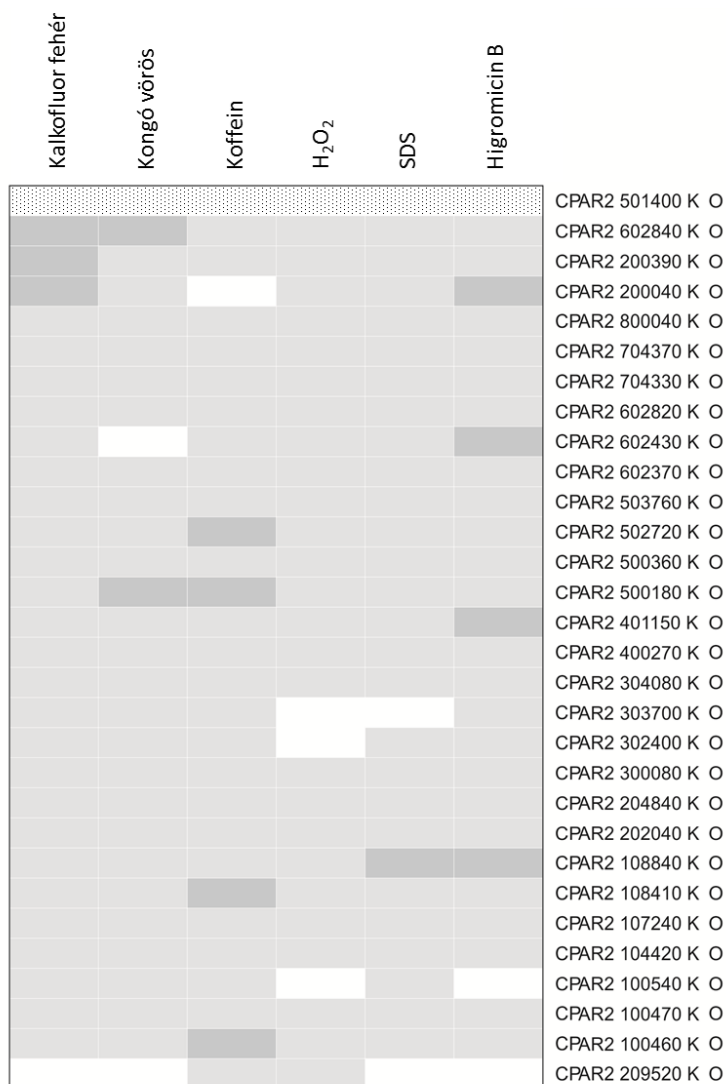
A létrehozott deléciós törzsek sejtfaIának vizsgálatára koffeint (Fuchs és Mylonakis 2009), és két sejtfaI kitinhez kötődő anionos festéket, a kalkofluor fehér és a kongó vörös festékeket alkalmaztuk (Ram és Klis 2006). Használtuk továbbá a higromicin B transzláció gátló antibiotikumot, amely a többi aminoglikozid típusú antimikrobiális szerrel szemben önmagában is alkalmazható különféle sejtfaI rendellenességgel (pl. O-mannozilációs, N-glikozilációs vagy β -1,6-glükán szintézist érintő defekt) rendelkező mutáns törzsek azonosítására (Lussier és mtsi., 1997). Az oxidatív és sejtfaI stresszorokon kívül sejtmembrán károsító nátrium-lauril-szulfát (SDS) stresszort is alkalmaztunk (Plaine és mtsi., 2008).

A vizsgálat során 96 mintahelyű tenyésztőedényeket használtunk. Az egyes lyukakba YPD tápoldatot mértünk, amihez különböző koncentrációkban adtuk hozzá a stresszorokat. Az egyes törzsek túlélését 16 óra elteltével vizsgáltuk spektrofotométer segítségével, a tenyészet optikai denzitásának mérésén keresztül (OD_{600}). Minden törzsnél a saját stresszor mentes sejtes kontrollhoz (=100% túlélés) viszonyítottuk az egyes stresszorok jelenlétében történő túlélést, majd a kísérlet végén a referencia CLIB 214 vad típusú törzshöz hasonlítva határoztuk meg az egyes deléciós mutánsok válaszában bekövetkező változást (8. ábra). Az így létrehozott, százalékos arányokat ábrázoló túlélési görbékről található egy kiragadott példa a 4. számú mellékletben.

Eredményeink alapján 9 törzs túlélésében detektáltunk eltérést a sejtfal stresszorok legalább egyikének jelenlétében, 3 törzs esetében H₂O₂, további 3 törzs esetében SDS, 6 törzs esetében pedig higromicin B jelenlétében tapasztaltunk változást a vad típusú törzshöz viszonyítva (8. ábra).

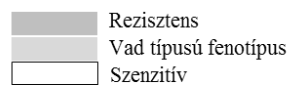
Tehát a deléciós könyvtár eltérő típusú stresszorok jelenlétére adott válaszát vizsgálva összesen 14 (a deléciós könyvtár 47%-a) különböző gént találtunk, amelyek összefüggésbe hozhatóak oxidatív, valamint sejtfalat és sejtmembránt károsító stresszel szembeni tűrőképesség kialakításával.

A *CPAR2_501400 Δ/Δ* deléciós törzs jelentős mértékű, eredendő növekedési rendellenességének köszönhetően a törzsre vonatkozó itt kapott eredmények nem voltak kiértékelhetőek.



8. ábra. A hőtérkép a létrehozott *C. parapsilosis* deléciós mutáns törzsek túlélési képességét összegzi.

Az törzsek vizsgálata során különböző sejtfal stresszorokat (kalkofluor fehér, kongó vörös, koffein), az oxidatív stresszor hidrogén-peroxidot (H₂O₂), és a sejtmembrán detergens nátrium-lauril-szulfátot (SDS) alkalmaztuk. Szenzitív törzs: a vad típusú törzshöz képest kevésbé érzékeny egy stresszor jelenlétére, rezisztens törzs: a vad típusú törzshöz képest érzékenyebb egy adott stresszor jelenlétében.



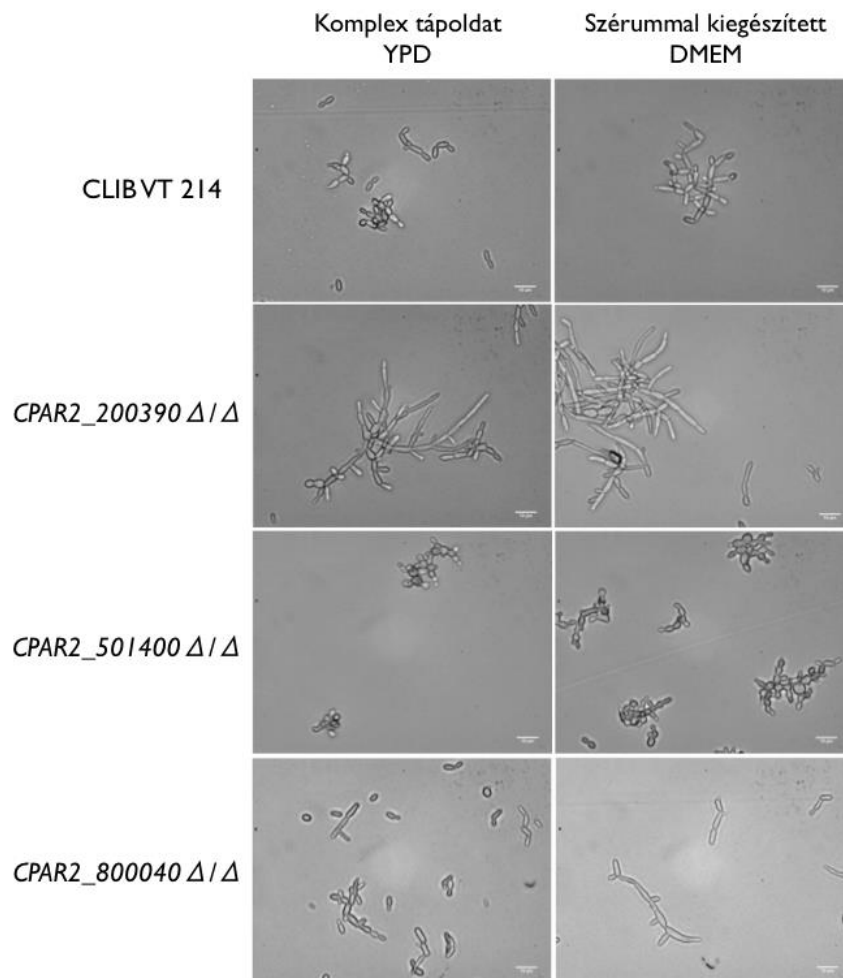
6.3.3. A deléciós mutáns törzsek pszeudohifa képzésének vizsgálata

A morfológia váltás számos patogén gombafajnál tekinthető fontos virulencia faktornak. A *Candida* nemzetségben az élesztő megjelenési formán kívül gyakori a valódi hifa, illetve a lazán összekapcsolódó, megnyúlt élesztősejtek láncolata, azaz pszeudohifa képzés jelensége (Thompson és mtsi., 2011). A *C. parapsilosis* nem képez valódi hifákat, csupán pszeudohifa képzésre képes, azonban ez a forma is hozzájárul a gomba mesterséges felületeken történő kitapadásához, biofilmképzéséhez, a szövetkárosításhoz és a gazda kolonizációjához (Trofa és mtsi., 2008). A morfológia váltáshoz szükséges gének aktivációját számos tényező indukálja, amelyek közül *C. albicans* esetében az egyik legfontosabb tényező a szérum jelenléte (Ene és mtsi., 2012).

Kísérleteinkben az egyes deléciós mutáns törzsek pszeudohifa képző képességét szérummal kiegészített DMEM tápoldatos közegben 24 és 48 óra elteltét követően vizsgáltuk (9. ábra). Referencia törzsként a vad típusú CLIB 214 törzset használtuk. Megállapítottuk, hogy egy törzs esetében (*CPAR2_501400 Δ/Δ*) nem volt detektálható pszeudohifa képzés az alkalmazott közegben, egy másik törzs esetében (*CPAR2_800040 Δ/Δ*) a vad típusú törzshöz képest hosszú pszeudohifákat detektáltunk, míg egy harmadik törzs esetében (*CPAR2_200390 Δ/Δ*) extrém hosszú morfológiát figyeltünk meg, ahol a létrejött pszeudohifák úgynevezett pehelyszerű struktúrákat képezve aggregálódtak (ld. 6.4.2.1. fejezet, 18/A. ábra).

A *CPAR2_501400* gén *C. albicans*-ban megtalálható ortológjának (*CaCWH41*) deléciója esetén ugyancsak filamentációt érintő rendellenességeket figyeltek meg (Mora-Montes és mtsi., 2007). Ez arra utalhat, hogy az általunk azonosított ORF hasonló funkcióval rendelkező fehérjét kódol, azonban ennek bizonyításához a jövőben további kísérletek szükségesek. A *CPAR2_800040* ORF egyik ortológjának jellemzése során sem figyeltek meg másodlagos morfológiát érintő elváltozásokat, ami a gén egy olyan tulajdonságára utalhat, ami csak *C. parapsilosis*-ban érvényesül. A *CPAR2_200390 Δ/Δ* deléciós törzs esetén kapott fenotípust a későbbiekben a 6.4.2. alfejezetben részletesen tárgyaljuk.

Összegzésként, a deléciós könyvtár pszeudohifa képzésének tesztelése során összesen 3 olyan gént (a deléciós könyvtár 10%-a) azonosítottunk be, amelyek befolyásolják a másodlagos morfológia kialakítását.



9. ábra. A *C. parapsilosis* vad típusú és deléciós mutáns törzsek pszeudohifa képzése.
Az ábrán a *CPAR2_200390* Δ/Δ , *CPAR2_501400* Δ/Δ és a *CPAR2_800040* Δ/Δ deléciós törzsek megváltozott másodlagos morfológiája látható a CLIB 214 vad típusú törzshöz viszonyítva. Méretskála: 10 μ m.

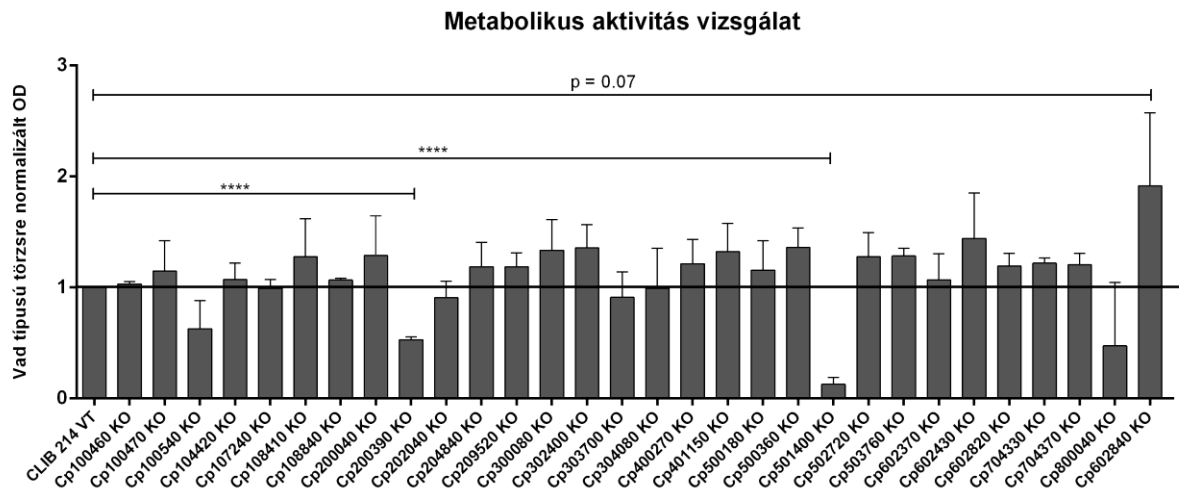
6.3.4. A deléciós mutáns törzsek biofilmképzésének vizsgálata

Bizonyos patogén gombafajok biofilm létrehozására is képesek. Ez a virulencia szempontjából kiemelt jelentőséggel bír, ugyanis a biofilmbe ágyazott gombasejtek ellenállóbbakká válhatnak bizonyos antifungális szerekkel szemben (pl. flukonazol), valamint az immunrendszer általi felismerésük is akadályozott lehet. Emellett a *C. parapsilosis* képes orvosi eszközökön és implantátumokon (pl. katétereken, beültetett szívbillentyűkön, protéziseken) biofilmet képezni, ami ugyancsak potenciális veszélyforrásként kezelendő (O'Toole és mtsi., 2000; Kuhn és mtsi., 2002; Trofa és mtsi., 2008). Jelen kísérleteinkben a biofilm-mátrix kialakítását befolyásoló regulátorok után kutatva vizsgáltuk a rendelkezésünkre álló deléciós törzsek biofilm képzését.

Kísérleteink során a képzett biofilm metabolikus aktivitását, ezzel együtt annak összetettségét/kompaktságát vizsgáltuk MTT metabolikus teszt alkalmazásával (Pires és mtsi., 2011; Rene és mtsi., 2014). A vizsgálat során az aktív metabolizmussal rendelkező, letapadt (élő) sejtek saját oxido-reduktáz enzimeik segítségével bontják az MTT tetrazólium festéket, amely során formazán keletkezik. Az így kapott terméket DMSO-ban oldva kék színű oldatot kaptunk, amelynek optikai denzitását spektrofotométerrel 570 nm-en mértük. A kísérletekben a CLIB 214 vad típusú törzset használtuk referencia törzsként.

A metabolikus aktivitás mérése alapján, a vizsgált deléciós törzsek közül a *CPAR2_602840 Δ/Δ* törzs hatékonyabb biofilmképzést mutatott a vad típusú törzssel összehasonlítva ($p=0,07$), míg a *CPAR2_200390 Δ/Δ* (*Cp200390KO*) és a *CPAR2_100540 Δ/Δ* (*Cp100540KO*) mutáns törzsek a legkevésbé voltak képesek biofilmképzésre (10. ábra). Tehát a deléciós könyvtár átfogó jellemzése során 3 olyan gént (a deléciós könyvtár 10%-a) azonosítottunk, amelyek közvetlenül összefüggésbe hozhatóak a gomba biofilmképzésével.

A *CPAR2_100540 Δ/Δ* deléciós törzs csökkent biofilmképzésében szerepet játszhat a törzs nagymértékű növekedési rendellenessége, valamint a pszeudohifák hiánya is. A *CPAR2_200390 Δ/Δ* és *CPAR2_602840 Δ/Δ* törzseket a továbbiakban részletesen a 6.4.2. és 6.4.3. alfejezetekben jellemezzük.



10. ábra. A deléciós könyvtár MTT metabolikus aktivitásának vizsgálata.

Az ábra a rendelkezésünkre álló valamennyi deléciós törzs metabolikus aktivitását mutatja, ami egyenesen arányos az egyes törzsek biofilmképző képességével. A kísérletben alkalmazott MTT (3-(4,5-dimetiltiazolil-2)-2,5-difeniltetrazólium bromid) koncentrációja 1 mg/ml. Szignifikancia mértéke: **** $p < 0,0001$.

6.3.5. A deléciós mutáns törzsek érzékenységének vizsgálata különböző típusú antifungális szerek jelenlétében

Invazív és felszíni gombafertőzések kezelésére két különböző típusú antifungális család tagjait alkalmazzák széles körben, az azol típusú antimikrobiális szereket, illetve az echinocandin származékokat (Pfaller és mtsi., 2013). Az azol típusú antifungális hatóanyagok közül a leggyakrabban alkalmazott szer a triazolok közé tartozó flukonazol, amely a lanosterol ergoszterollá átalakulását katalizáló 14- α -demetiláz enzimet gátolja. Az ergoszterol a gomba sejtmembrán esszenciális részét képezi, így flukonazol kezelés hatására megváltozik a sejtmembrán áteresztőképessége, ami végül a gombasejtek pusztulását eredményezi. A flukonazol használata széles körben elterjedt, mivel a korábban alkalmazott polién típusú amphotericin B antimikotikumnál biztonságosabb. Bár a *C. parapsilosis* által okozott fertőzések többnyire jól kezelhetők flukonazzal, előfordulnak olyan klinikai izolátumok is, amelyek nem reagálnak az ilyen jellegű antimikrobiális terápiára (Sarvikivi és mtsi., 2005; Souza és mtsi., 2015). Az echinocandin típusú antifungális szer, a kaszporfungin, a β -1,3-glükán szintézisének gátlásán keresztül fejt ki hatását. Ennek következtében a gomba sejtfallal homeosztázisa felborul, ami a gombasejtek sebezhetőségéhez, majd végül azok pusztulásához vezet.

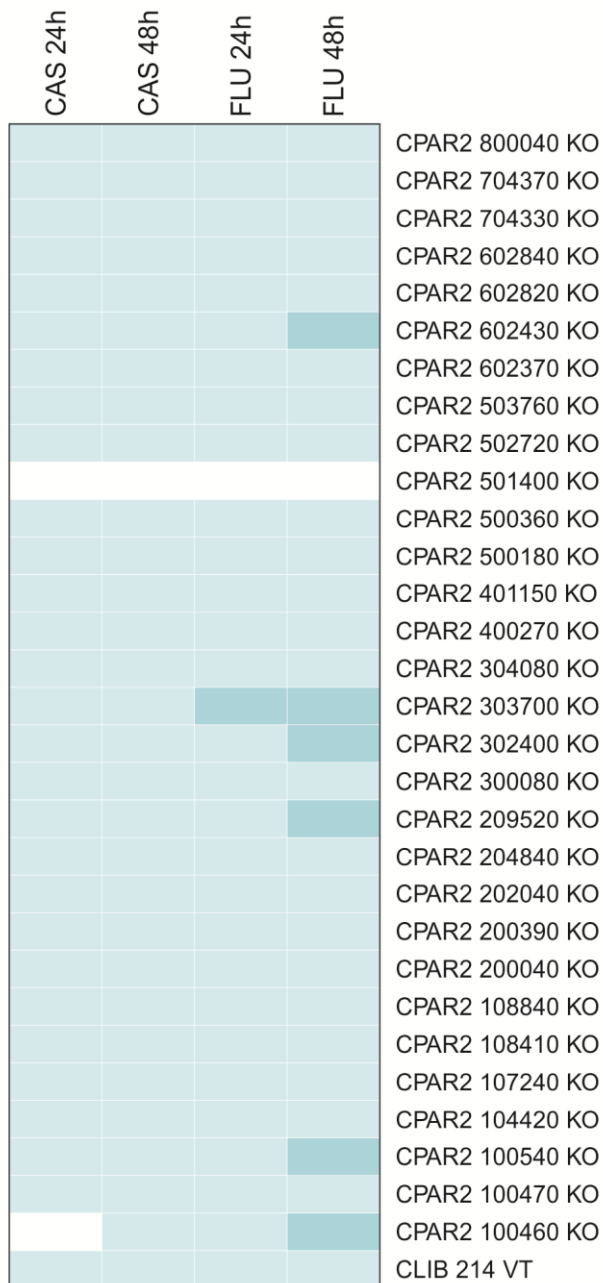
C. parapsilosis esetén kifejezetten jelentős azon kórházi izolátumok száma, amelyek rezisztensnek bizonyulnak az echinocandin típusú antifungális szerekkel szemben ((Perlin 2007; Walker és mtsi., 2010). A továbbiakban olyan gének azonosítását tűztük ki célul, amelyek valamilyen módon részt vehetnek az ilyen típusú antimikrobiális szerekkel szembeni rezisztencia vagy érzékenység kialakításában.

Kísérleteink során mikrodilúciós módszerrel vizsgáltuk az egyes deléciós törzsek flukonazzal és kaszporfunginnal szemben mutatott érzékenységét. Ezt a sejtek antibiotikummal történő 24 és 48 órás inkubációját követően, a minimális gátló koncentráció meghatározásával végeztük el (OD mérés 600nm-en). Ezt követően, az egyes törzsek esetében kapott értékeket a referenciaként szolgáló CLIB 214 vad típusú törzs adataival hasonlítottuk össze (11. ábra).

Kísérleteinkben, 24 óra elteltével 2, míg 48 óra elteltével 1 törzsnél figyeltünk meg eltérést a kaszporfungin jelenlétére adott válaszban a vad típusú törzshöz képest. Ezzel szemben 24 óra után 2 törzs, míg 48 órát követően 7 törzs esetén detektáltunk eltérést a flukonazol jelenlétére adott válaszban a vad típusú törzssel összehasonlítva.

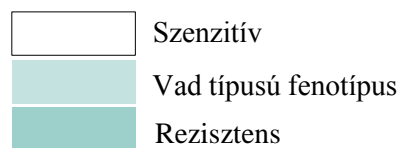
Összegezve, a deléciós könyvtár tagjai közül mindösszesen 7 olyan gént (a deléciós könyvtár 23%-a) sikerült azonosítanunk, amelyek az antifungális szerekkel szemben

kialakított válasz létrehozásában játszanak szerepet. Mindezen gének a későbbiekben további kutatások tárgyát képezhetik.



11. ábra. A deléciós könyvtár tagjainak a vad típusú törzshöz viszonyított antifungális szerekekkel szembeni érzékenysége.

Az antifungális teszteléshez az azol típusú flukonazol, és az echinokandin típusú kaszopofungin drogokat alkalmaztuk. A teszt során 24 és 48 óra elteltével MIC értékeket határoztunk meg. A kapott adatokat minden deléciós törzs esetében a vad típusú törzs MIC értékeihez viszonyítottuk. Abban az esetben nyilvánítottunk szenzitívnek egy törzset, amennyiben az a vad típusú törzshöz képest az antifungális szerrel szemben szenzitívebbnek bizonyult, és rezisztensek ha az adott törzs a CLIB 214-hez képest kevésbé volt érzékeny a gombaellenes szerrel szemben.



6.4. A deléciós mutáns könyvtár átfogó jellemzését követően kiemelt *C. parapsilosis* mutáns törzsek és azok további vizsgálatai

A deléciós mutáns könyvtár széles körű jellemzését követően a továbbiakban olyan mutáns törzsek részletes vizsgálatával foglalkoztunk, amelyeknél egyszerre több fenotípusos rendellenességet találtunk. Ezek közé tartoznak a *CPAR2_100540*, *CPAR2_200390*, *CPAR2_602840* és *CPAR2_303700* génekre nézve deléciós törzsek. Hangsúlyozzuk, hogy ezen gének mindegyike a gazda-patogén interakciót követően emelkedett expressziót mutatott (ld. 6.1. fejezet). Így a továbbiakban bemutatott fenotípusok háttérben álló folyamatok közvetlenül köthetők a gazdaszervezetben uralkodó körülményekhez történő adaptációhoz. A következő fejezetekben ezen mutáns törzsek részletes fenotipikus analízisének eredményeit tárgyaljuk az őket meghatározó gének funkciójának pontos azonosítása érdekében.

6.4.1. A vashélt szabályozó és az alternatív szénforrás hasznosításában szerepet játszó *Cpar2_100540* transzkripciós faktor jellemzése

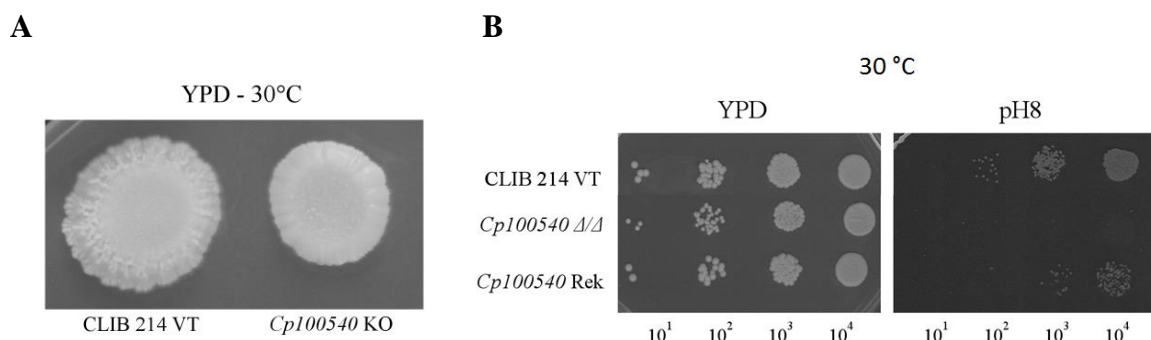
6.4.1.1. A *CPAR2_100540* Δ/Δ deléciós törzs sajátosságai az előzetes vizsgálatok alapján

A deléciós könyvtár jellemzése során a *CPAR2_100540 Δ/Δ* volt az egyik törzs, amelyet a részletes vizsgálatokba vontunk be. Az előzetes kísérletek során a törzs megváltozott telepmorfológiát (12/A. ábra), alkalikus közegben fellépő szenzitivitást (12/B. ábra), valamint higromicin B tartalmú tápközegben és oxidatív stresszor jelenlétében csökkent növekedési képességet mutatott (12/C. és 12/D. ábrák).

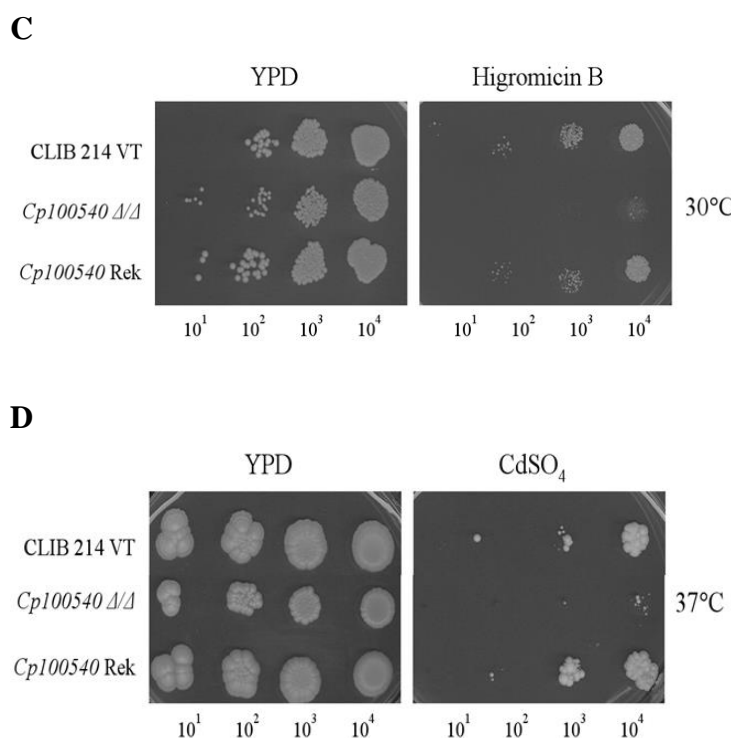
A *CPAR2_100540* funkcionális ortológja *C. albicans* esetében a *HAP5* gén, amely a CCAAT motívum kötő (CBF) komplex tagja. A CBF komplex a légzési lánc bizonyos elemeinek, illetve a vashéltartásban szerepet játszó egyes gének szabályozásában egyaránt részt vesz (Johnson és mtsi., 2005; Baek és mtsi., 2008). *In silico* elemzések alapján meghatároztuk, hogy a *CPAR2_100540* és a *C. albicans HAP5* által kódolt fehérje primer szerkezetét tekintve jelentős mértékű azonosságot mutat (NCBI, Protein Blast - nemzetközi biológiai adatbázis, fehérjeszekvencia-hasonlóság kereső programcsomag).

A *CPAR2_100540* Δ/Δ deléciós törzs esetében tapasztalt megváltozott telepmorfológia egyik oka lehet a kolóniát alkotó gombasejtek másodlagos morfológiájának megváltozása. A ráncos és gyűrött telepmorfológiák általában több fonalasan növekvő sejt jelenlétével köthetők össze, míg a sima telepmorfológia az élesztőszerű forma dominanciáját jelentheti (Laffey és Butler 2005). Mivel a másodlagos morfológia váltás

vizsgálata során nem tapasztaltunk eltérést a vad típusú és homozigóta deléciós törzsek pszeudohifa képzésében (6.3.3. alfejezet), ezért feltételezhető, hogy egyéb tényezők állhatnak a jelenség hátterében. A New York-i Albert Einstein Egyetemenél dolgozó kollaborátor csoport kísérletei szerint, több különböző körülmény (komplex és minimál tápoldatok, valamint eltérő inkubációs hőmérséklet) vizsgálata során is kisebb és keskenyebb sejtek voltak megfigyelhetők a mutáns törzs populációban, mint a vad típusú csoportosulásban (nem mutatott adat). Ez oka lehet a megváltozott telepmorfológiának.



12. ábra. A *CPAR2_100540* mutáns törzsek fiziológiai vizsgálatai.



Az ábrákon a vad típusú, *CPAR2_100540* homozigóta deléciós (Δ/Δ) és a *CPAR2_100540* reintegrált (Rek) törzsek növekedései láthatóak. **A:** Megváltozott telepmorfológia YPD táptalajon, 4 napos inkubációt követően. **B:** Alkalikus pH hatása az egyes törzsek növekedésére 2 nap inkubáció elteltével. **C:** 3 $\mu\text{g/ml}$ higromicin B-vel kiegészített YPD táptalaj hatása a gomba törzsek növekedésére, 2 napos inkubációt követően. **D:** 5 μM CdSO₄ oxidatív stresszor hatása 11 nap elteltével.

Korábban a *C. albicans* *HAP5* deléciós mutáns törzs (*Cahap5Δ/Δ*) esetében növekedési rendellenességet figyeltek meg (Johnson és mtsi., 2005). A *CPAR2_100540 Δ/Δ* törzs fiziológiai vizsgálata során azonban ezt nem tapasztaltuk, így elképzelhető, hogy *C.*

parapsilosis-ban a gén deléciója a növekedési rendellenesség helyett csupán a sejtméret és alak megváltozására van hatással.

Az aminoglikozid típusú higromicin B jelenlétében bekövetkező csökkent növekedési képesség utalhat a sejtfal összetételének megváltozására (Lussier és mtsi., 1997), ugyanakkor a mutáns törzs a többi sejtfal stresszor jelenlétére nem reagált. Ezért úgy gondoljuk, hogy a higromicin B által okozott fenotípus változást feltehetőleg egyéb meghibásodás okozhatta. A jelenség részletes elemzése további kísérleteket igényel.

Az oxidatív stressz jelenlétében fellépő csökkent ellenállóképeség a légzési lánc sérülésének egyik jele lehet (Grant és mtsi., 1997). Ebből következően, a mutáns törzs oxidatív stresszorok (H_2O_2 és $CdSO_4$) jelenlétében mutatott szenzitivitása utalhat a géndeléció következtében sérült mitokondriális működésre.

Egy korábbi tanulmányból tudjuk, hogy alkalikus közegben bizonyos nyomelemek, így a vas felvétele is korlátozott (Almeida és mtsi., 2009). Ismert az is, hogy *C. albicans*-ban a környezet kémhatásának alkalikus irányba történő megváltozása indukálja a vasfelvételben szerepet játszó gének átíródását (Bensen és mtsi., 2004). Emellett a *CaHAP5* vasfelvételben játszott szerepe is igazolt (Baek és mtsi., 2008). Ezek alapján, a *CPAR2_100540 Δ/Δ* mutáns sejtek pH 8 kémhatású közegre történő érzékenységéből arra következtethetünk, hogy a *CPAR2_100540* gén is befolyásolhatja a gombasejtek vas asszimiláló képességét.

A továbbiakban megkezdjük a *CPAR2_100540* gén sejtlegzésben, illetve a környezetből történő vasfelvételben történő szerepének vizsgálatát.

6.4.1.2. A *CPAR2_100540 Δ/Δ* mutáns törzs növekedése vashiányos közegekben

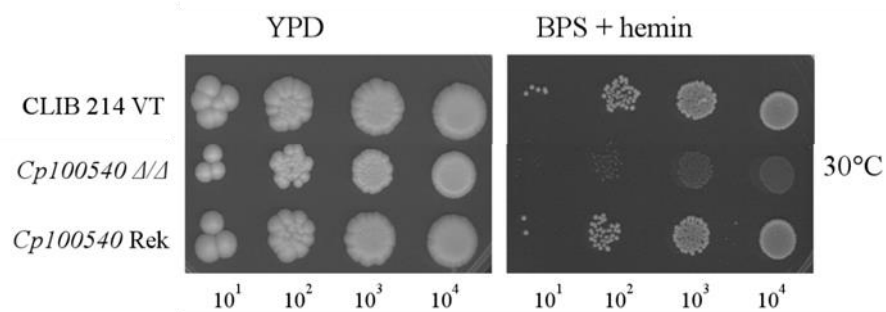
Mivel a gazda-patogén kölcsönhatás során folyamatos a gazdaszervezet és a patogén organizmus közötti kompetíció a rendelkezésre álló vasforrások felvételéért és hasznosításáért, ezért a patogén mikroba vasfelvételi képességét virulencia faktorként tartják számon (Almeida és mtsi., 2009). A gazdaszervezet mobilizálható vasforrásai ezáltal befolyásolják a gombafertőzésekkel szembeni érzékenységet és annak kimenetelét. Egy korábbi tanulmányban a gombasejtekkel történő infekciót megelőzően a gazdasejtek vaskelátorokkal, (pl. BPS) történő kezelése jelentős mértékben csökkentette a kolonizáció mértékét (Fratti és mtsi., 1998; Almeida és mtsi., 2008), míg a gazdasejtek meglévő vasforrásainak kibővítése hatékonyabb gazda károsítást tett lehetővé.

Mint már említettük, *C. albicans* esetében a *HAP5* gén által kódolt protein a CBF komplex tagjaként bizonyítottan szerepet játszik a gomba vas homeosztázisának szabályozásában (Baek és mtsi., 2008). Ezen információ, valamint a deléciós törzs lúgos

kémhatás jelenlétében mutatott érzékenysége miatt megvizsgáltuk a *CPAR2_100540* Δ/Δ törzs vaslimitált környezeti körülményekre adott választát.

Kísérleteinkben vaskelátorral (BPS), illetve vaskelátorral és kötött Fe^{3+} -vel kiegészített (BPS + hemin protoporfirin) táptalajokat készítettünk, melyeken vizsgáltuk a *CPAR2_100540* mutáns törzsek növekedési képességét. Mivel a sejtek teljes vashiányos táptalajon (BPS) történő tenyésztésekor nagymértékben lecsökkent valamennyi törzs életképessége, a továbbiakban a vashiányos közeg szemléltetésére heminnel kiegészített BPS tartalmú táptalajokat alkalmaztunk.

Az 13. ábrán jól látható, hogy a *CPAR2_100540* Δ/Δ deléciós törzs növekedési képessége vaslimitált körülmény esetén jelentős mértékben csökkent a vad típusú, illetve reintegrált törzsekhez viszonyítva. A kapott fenotípus megegyezik a *Cahap5* Δ/Δ deléciós törzs esetében korábban tapasztaltakkal, miszerint a deléciós törzs nem képes korlátozott vastartalmú közegben fennmaradni (Baek és mtsi., 2008). Elmondható tehát, hogy a *CPAR2_100540* gén, a *C. albicans*-ban megtalálható ortológjához hasonlóan, befolyással rendelkezik a gomba vasháztartásának szabályozásában.



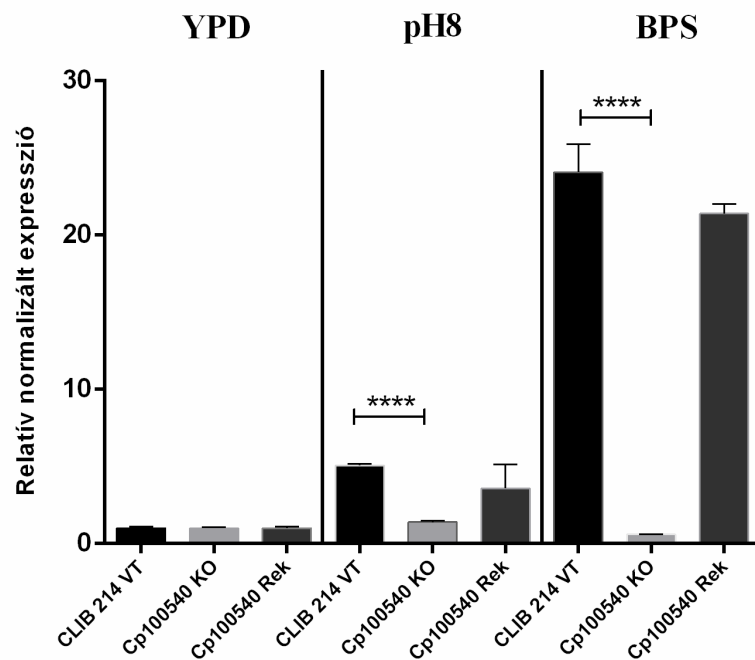
13. ábra. A *CPAR2_100540* mutáns törzsek növekedése vaslimitált környezetben.

Az ábrákon a vad típusú, *CPAR2_100540* homozigóta (Δ/Δ) és reintegrált (Rek) törzsek növekedése látható YPD komplex, valamint 500 mM BPS + 2 μM heminnel kiegészített YPD táptalajokon. A törzseket 6 napon keresztül, 30 °C-on inkubáltuk.

6.4.1.3. A vas metabolizmust befolyásoló *FRP1* gén expressziójának vizsgálata induktív közegben

A *CPAR2_100540* deléciós törzs vaslimitált környezeti körülmények között fellépő növekedési rendellenessége miatt megvizsgáltuk a háttérben álló lehetséges szabályozó mechanizmust. A környezetben található, rendszerint kötött állapotban lévő Fe^{3+} ionok, biológiailag könnyen felvehető Fe^{2+} ionokká történő átalakításában számos vasreduktáz enzim vesz részt, amelyek egyike az *FRP1* gén által kódolt fehérje is. Egy korábbi

tanulmány szerint, *C. albicans*-ban az Frp1 egyike a legfontosabb vasreduktázoknak (Liang és mtsi., 2009a). A *CaFRP1* expressziója alkalikus kémhatás következtében, illetve vashiányos környezetben is megemelkedik. Egy másik tanulmány alapján a CBF komplex jelenléte korlátozott vastartalmú környezeti körülmények között esszenciális a *CaFRP1* expressziójához. A komplex Hap5 alegységének hiányában vashiányos közegben lecsökken az *FRP1* expressziója (Baek és mtsi., 2008). Kísérleteinkben a *CPAR2_100540 Δ/Δ* deléciós mutáns törzsben fellépő *FRP1* expressziós változásokat vizsgáltuk, alkalikus kémhatású (pH 8), illetve vashiányos (BPS) indukciós közegek alkalmazásával. Az eredmények azt mutatták, hogy alkalikus pH-n és vaslimitált környezetben is jelentős mértékben csökkent az *FRP1* expresszió szintje a deléciós törzsben (14. ábra). Tehát a *CPAR2_100540* által kódolt fehérje, a *CaHap5*-höz hasonlóan, részt vesz a vasreduktáz *FRP1* szabályozásában, ezáltal az alkalikus kémhatáshoz és a limitált vastartalmú környezethez történő alkalmazkodásban.



14. ábra. *FRP1* vasreduktáz expresszió indukciós közegekben.

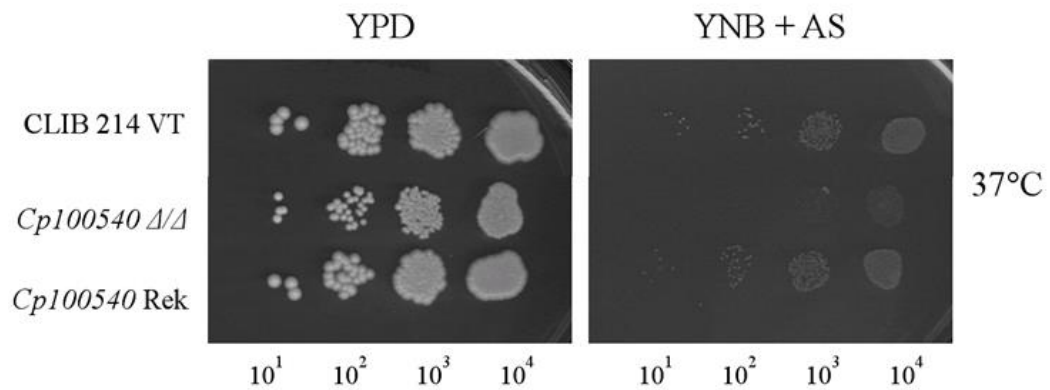
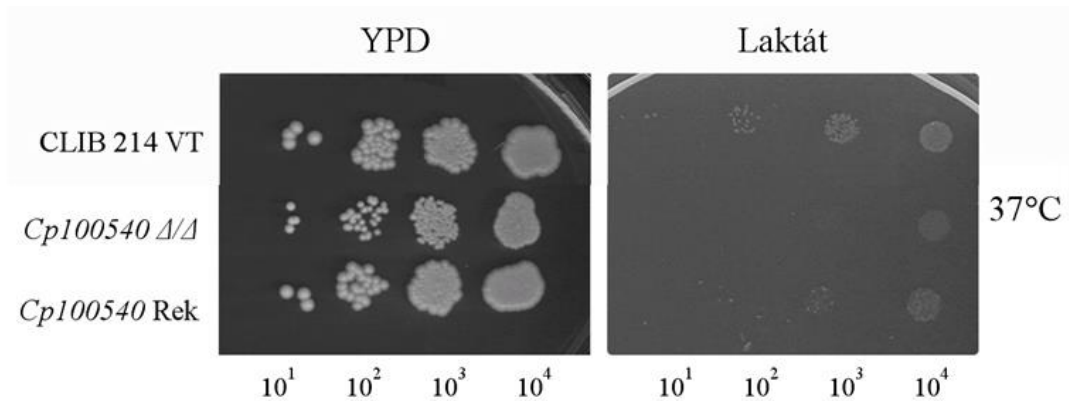
Az ábrán a vad típusú, *CPAR2_100540Δ/Δ* deléciós (KO), valamint *CPAR2_100540* reintegrált (Rek) törzsek indukciós közegekben mért *FRP1* relatív génexpresszió szintje látható. Az alkalikus közegben, illetve a 150 mM BPS-sel történő génexpresszió indukálás egy éjszakán át zajlott. Szignifikancia mértéke: **** $p < 0,0001$.

6.4.1.4. A *CPAR2_100540* Δ/Δ mutáns törzs növekedésének vizsgálata alternatív szénforrás jelenlétében

A *CPAR2_100540* Δ/Δ deléciós törzs érzékenyen reagált az oxidatív stresszre, amely alapján arra következtettünk, hogy a deléció mitokondriális rendellenességet eredményezett (ld. 6.4.1.1. fejezet).

A légzési láncban bekövetkező rendellenességek során az egyik leggyakrabban előforduló fenotípus az, hogy a mutáns sejtek nem képesek az alternatív szénforrások hasznosítására (McNabb és mtsi., 1995; Johnson és mtsi., 2005). Mivel a CBF komplex a vas homeosztázis szabályozásán kívül *C. albicans* esetében bizonyítottan szerepet játszik az alternatív szénforrások, mint például a tejsav (laktát) és különböző aminosavak hasznosításában is (Johnson és mtsi., 2005), ezért a továbbiakban megvizsgáltuk a *CPAR2_100540* Δ/Δ mutáns törzs növekedési képességét ezen szénforrások jelenlétében (15/A. és 15/B. ábrák). Kísérleteinkben a *CPAR2_100540* Δ/Δ deléciós törzs csökkent növekedési képességet mutatott mindkét típusú táptalaj használatakor. Ez alapján arra következtettünk, hogy a *Cpar2_100540* transzkripciós faktor a vas homeosztázisban játszott szerepén kívül eddig ismeretlen módon részt vesz az alternatív szénforrások hasznosításban is, hasonlóan a *CaHap5* fehérjéhez.

A továbbiakban arra kerestük a választ, hogy az alternatív szénforrások jelenlétében bekövetkező növekedési rendellenesség hátterében milyen mechanizmus állhat.

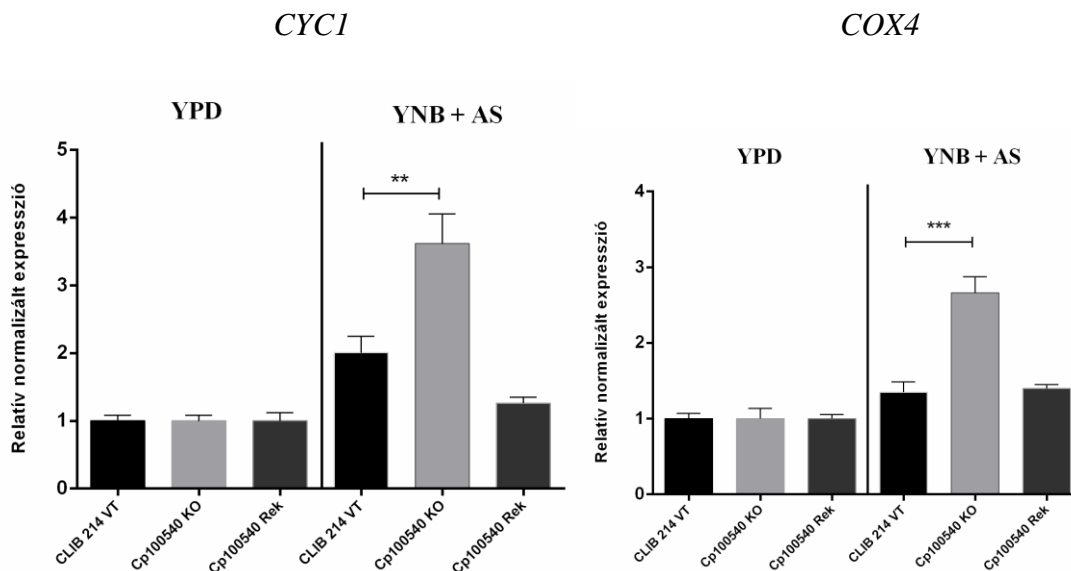
A**B****15. ábra. A *CPAR2_100540* mutáns törzsek növekedése alternatív szénforrások jelenlétében.**

Az ábrákon a vad típusú, *CPAR2_100540* homozigóta deléció (Δ/Δ) és reintegrált (Rek) törzsek növekedése látható aminosavakkal, mint egyedüli szénforrás tartalmú (A) és 2% tejsav tartalmú (B) YNB minimál táptalajokon. A törzseket 3 napon keresztül, 37 °C-on inkubáltuk.

6.4.1.5. A légzési láncban szerepet játszó *CYCI* és *COX4* gének expressziójának vizsgálata induktív körülmények között

S. cerevisiae és *C. albicans* esetében egyaránt bizonyított, hogy a CBF faktor befolyással rendelkezik több, a légzési láncban megtalálható citokróm fehérjét kódoló gén expressziója felett (Olesen és Guarente 1990; Johnson és mtsi., 2005). Ezen gének expressziójában bekövetkező változások összefüggésbe hozhatóak az alternatív szénforrásokon történő növekedés intenzitásával. Ezért a *CPAR2_100540 Δ/Δ* mutáns törzsben megvizsgáltuk a citokróm c1 alegységet kódoló *CYCI* és a citokróm oxidáz fehérje 4-es alegységét kódoló *COX4* gének expresszióját az egyedüli szénforrásként szolgáló aminosavakkal kiegészített

indukciós tápközegben (16. ábra). Kísérleteinkben a *CYCI* és a *COX4* expressziója megemelkedett indukciós körülmények között, tehát a *CPAR2_100540* által kódolt fehérje a gomba mitokondriális légzési láncában részt vevő gének expresszióját is befolyásolja.



16. ábra. A légzési láncban szerepet játszó *CYCI* és *COX4* gének expressziója indukciós közegben.

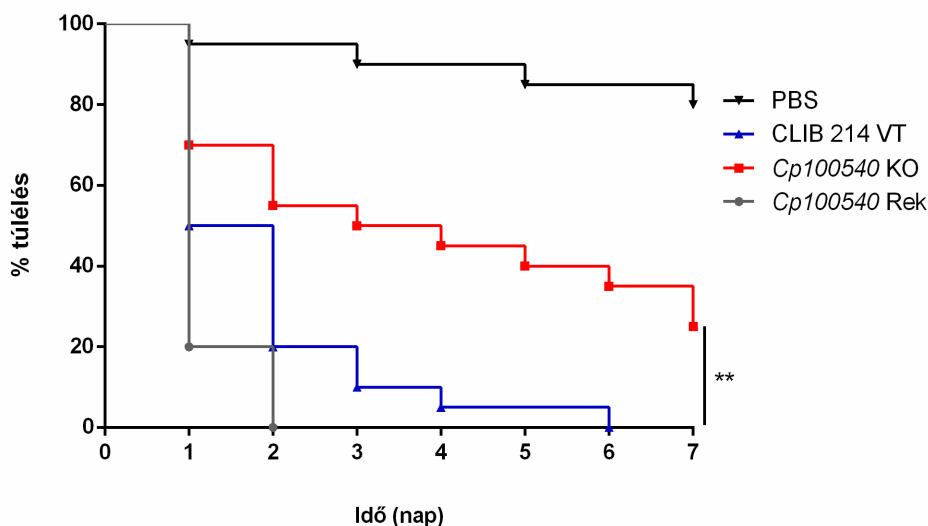
Az ábra a vad típusú, *CPAR2_100540* Δ/Δ deléció (KO), valamint *CPAR2_100540* reintegrált (Rek) törzsek indukciós közegekben mért *CYCI* és *COX4* relatív génexpressziós szintjét mutatja. A YNB + AS-val történő génexpresszió indukálás egy éjszakán át zajlott, ezt megelőzően a sejteket YPD tápoldatban frissen neveltük elő. Szignifikancia mértéke: ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

6.4.1.6. A *CPAR2_100540* Δ/Δ mutáns törzs *in vivo* virulencia vizsgálata

Vizsgálataink során igazoltuk a *CPAR2_100540* gén által kódolt transzkripciós faktor vas homeosztázisban és alternatív szénforrások hasznosításában betöltött szerepét. Ezt követően megvizsgáltuk, hogy a transzkripciós faktor mindezen folyamatok által befolyással bír-e a gomba virulenciájára. Ehhez *G. mellonella* lárvákat használtunk mint *in vivo* fertőzési modellrendszert. A lárvák immunrendszere strukturális és funkcionális hasonlóságot mutat az emlős természetes immunrendszerrel, éppen ezért a modell kiválóan alkalmas a gomba törzsekre adott immunválasz vizsgálatára (Jacobsen 2014).

A kísérlet során csoportonként 20-20 egyedet használtunk a gomba szuszpenzióval, és a kontrollként használt PBS pufferrel történő infekciókhoz. Fertőzetlen kontrollként 20 további lárvát alkalmaztunk. Ezt követően a csoportok tagjainak túlélését 7 napon keresztül, napi rendszerességgel monitoroztuk. A *G. mellonella* lárvák túlélése alapján a

CPAR2_100540 Δ/Δ deléciós mutáns törzs virulenciájában jelentős mértékű csökkenést tapasztaltunk a vad típusú és rekonstruált törzsekhez viszonyítva (17. ábra). Tehát ebben a modellorganizmusban a *CPAR2_100540* által kódolt transzkripciós faktor szerepet játszik a gomba fertőzőképességében is.



17. ábra. *Galleria mellonella* lárva túlélési görbe *C. parapsilosis* törzsekkel történő fertőzést követően.

Az ábra *G. mellonella* lárvák vad típusú, *CPAR2_100540* Δ/Δ deléciós (KO), *CPAR2_100540* reintegrált (Rek) törzsekkel, valamint PBS-sel történő infekciójából származó túlélését ábrázolja százalékos arányban megadva. A lárvákat fertőzést követően napi rendszerességgel, 7 napon keresztül monitoroztuk. Szignifikancia mértéke: $**p < 0,01$.

6.4.1.7. A *C. parapsilosis* *Cpar2_100540* transzkripciós faktor vizsgálatából származó eredmények összefoglalása

A *C. parapsilosis* *CPAR2_100540* génről elmondhatjuk, hogy az közvetlenül a gazdapatogén kölcsönhatást követően került azonosításra. A gén a THP-1 sejtek *C. parapsilosis*-szal történő fertőzését követő 1 és 6 óra után is emelkedett expressziót mutatott. Ez arra utalt, hogy a *CPAR2_100540* részt vehet a gomba virulenciájának szabályozásában. A gén legközelebbi ortológja *S. cerevisiae*-ben és *C. albicans*-ban is az ún. *HAP5* ORF, az általa kódolt fehérje pedig az evolúciósan konzervált CBF komplex egyik esszenciális DNS kötő alegysége. A CBF komplex jellegzetessége, hogy bizonyos gének promóter régiójában található CCAAT régióhoz kötődik (Coustry és mtsai. 1996; Thon és mtsai. 2010) (18/A. ábra). Korábbi tanulmányok szerint, a Hap5, a légzési lánc szabályozásán keresztül, mindkét

organizmusban részt vesz az alternatív szénforrások hasznosításában, illetve *C. albicans*-ban a vasfelvétel regulációjában is (McNabb és mtsi., 1995; Johnson és mtsi., 2005; Baek és mtsi., 2008). *C. parapsilosis*-ban a *CPAR2_100540* delécióját követően kapott fenotípus profil (oxidatív stresszel szembeni érzékenység, növekedési rendellenesség alkalikus közegben) arra utalt, hogy az általunk azonosított gén és a *HAP5* között funkcionális hasonlóság lehet. Ennek alátámasztása érdekében további kísérleteket is elvégeztünk. Ezek során megvizsgáltuk a *CPAR2_100540* gén alternatív szénforrás hasznosításban és a vasfelvételben betöltött szerepét.

A mitokondriális légzési lánc sérülésekor bekövetkező egyik jellegzetes fenotípus az, hogy a sejtek nem képesek alternatív szénforrásokat hasznosítani (McNabb és mtsi., 1995; Johnson és mtsi., 2005). Kísérleteink során megvizsgáltuk tehát a *CPAR2_100540* Δ/Δ mutáns sejtek életképességét tejsav és aminosav egyedüli szénforrást tartalmazó táptalajokon. A vizsgálatok során a mutáns törzs növekedési rendellenességet mutatott mindkét közegben, így a *Cpar2_100540* feltehetően részt vesz az alternatív szénforrások hasznosításában. A kapott fenotípus, valamint a már korábban tapasztalt oxidatív stresszel szembeni érzékenység is a légzési lánc sérülésére utaltak. Korábbi tanulmányok bebizonyították, hogy *S. cerevisiae*-ben és *C. albicans*-ban a CBF komplex sérülése esetén megváltozik a légzési láncot alkotó citokróom fehérjék (*Cyc* és *Cox*) szabályozottsága (Olesen és Guarente 1990; Johnson és mtsi., 2005). Ezt leginkább a glükóztól eltérő egyéb szénforrások jelenlétében tapasztalták. Azonban míg *S. cerevisiae* esetén a *Hap5* pozitívan, addig az *C. albicans*-ban negatívan szabályozza a *CYC* és *COX* gének kifejeződését (18/C. ábra) (McNabb és mtsi., 1995; Johnson és mtsi., 2005). Kísérleteink során megvizsgáltuk, hogy alternatív szénforrások jelenlétében a *CPAR2_100540* gén szerepe *C. parapsilosis* esetében hogyan hozható összefüggésbe ezen gének expressziójának szabályozásával. Eredményként elmondhatjuk, hogy a vizsgált *CYCI* és *COX4* gének expressziója a *Cpar2_100540* hiányában megemelkedett, ami alapján negatív szabályozást feltételezhetünk. Tehát *C. parapsilosis*-ban a *Cpar2_100540*, a *C. albicans*-ban és *S. cerevisiae*-ben megfigyeltékhez hasonlóan, az alternatív szénforrások hasznosításban vesz részt, mely feltehetőleg a légzési lánc szabályozásán keresztül valósul meg.

C. albicans-ban a *Hap5* emellett bizonyítottan szerepet játszik a gomba vasfelvételében (Baek és mtsi., 2008). A vas nyomelemek felvétele függ a környezet kémhatásától (savas közegben könnyebb). Ennek következtében alkalikus közegben olyan gének expressziója – például vas reduktázok (*FRP1*) – emelkedik meg, melyek ilyen környezeti körülmények között esszenciálisak a vas asszimilációjához (Almeida és mtsi., 2009). A *C. albicans* *HAP5*, a CBF komplex jóvoltából, közvetlenül befolyásolja az egyik

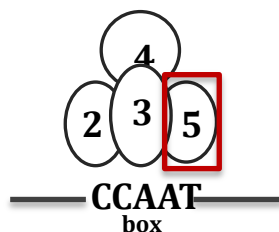
ilyen vasreduktáz, az *FRP1* expresszióját (pozitív szabályozás) lúgos kémhatású és korlátozott vastartalmú közegben is (18/B. ábra) (Baek és mtsi., 2008). Hap5 hiányában az említett környezeti körülmények között súlyos növekedési rendellenesség jön létre (Baek és mtsi., 2008). *C. parapsilosis* esetében a *CPAR2_100540* gén elvesztésekor hasonló fenotípust figyeltünk meg, mivel a mutáns sejtek vashiányos és lúgos kémhatású közegben is növekedési rendellenességet mutattak. Továbbá, az indukciós kezeléseket követően a deléciós törzsben csökkent *FRP1* expresszió volt megfigyelhető. Ebből arra következtethetünk, hogy *C. parapsilosis*-ban a *CPAR2_100540* gén valószínűleg részt vesz a vas homeosztázis befolyásolásában is.

Mivel az alternatív szénforrás hasznosítás és a vas nyomelemek (gazda)környezetből történő felvétele is bizonyítottan befolyásolja a gomba fertőzőképességét, így a továbbiakban megvizsgáltuk a *CPAR2_100540* Δ/Δ deléciós törzs virulenciáját. A kísérlethez *G. mellonella* modellorganizmust alkalmaztunk, amelynek eredményeként elmondható, hogy a mutáns törzs esetében csökkent virulenciát tapasztaltunk.

A

CBF - CCAAT-kötő faktor

Hap fehérjék: Hap2-Hap5



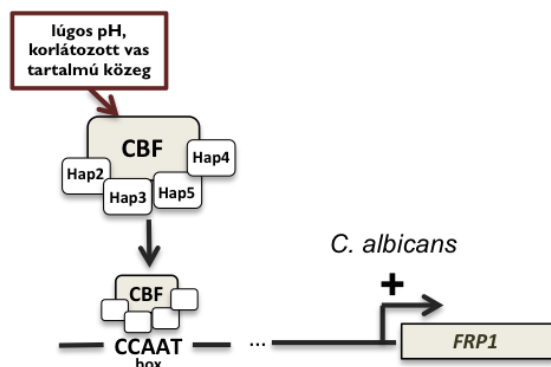
18. ábra. A CBF komplex és a Hap5 alegység által szabályozott mechanizmusok.

A: A CBF komplex sematikus ábrája alapján módosítva (Hsu és mtsi., 2011).

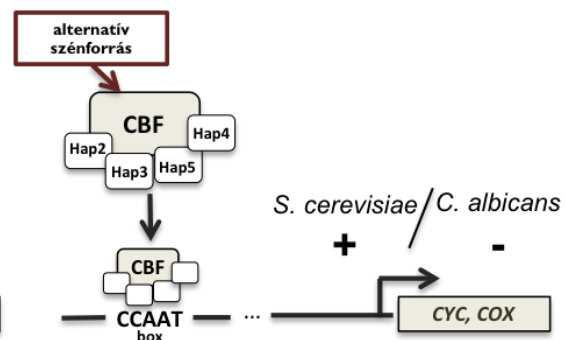
B: A CBF komplex vasfelvételben játszott szerepe *C. albicans*-ban.

C: A CBF komplex szerepe a légzési lánc szabályozásában *S. cerevisiae* és *C. albicans* esetén.

B



C



Konklúzióként tehát elmondható, hogy az általunk azonosított *C. parapsilosis* CPAR2_100540 az alternatív szénforrások hasznosításán, valamint a vasfelvétel szabályozásán keresztül befolyásolhatja a gomba virulenciáját. Mindezek alapján feltételezhető, hogy a *C. parapsilosis*-ban azonosított CPAR2_100540 a *C. albicans*-ban már korábban azonosított HAP5 gén funkcionális ortológja lehet.

6.4.2. A másodlagos morfológia váltás szabályozását befolyásoló Cpar2_200390 transzkripciós faktor jellemzése

6.4.2.1. A CPAR2_200390 Δ/Δ deléciós törzs sajátosságai az előzetes vizsgálatok alapján

A deléciós mutáns könyvtár jellemzését követően a CPAR2_200390 Δ/Δ deléciós törzs részletesebb jellemzését is célul tűztük ki. Ez a törzs a másodlagos morfológia váltást érintő vizsgálat során a vad típushoz képest rendkívüli módon megnyúlt pszeudohifákat hozott létre, amelyek aggregálódva pehelyszerű struktúrát képeztek (20/A. ábra). A korábbi eredményeinkben kiemelt jellegzetességek közé tartozik a deléciós mutáns sejtek különböző közegekben és hőmérsékleteken történő mérsékelt életképessége is (20 /B és C ábrák), a telepmorfológia megváltozása (20 /D ábra), illetve a sejtfal stresszor kalkofluor fehér (KF) jelenlétében mutatkozott rezisztencia (19. ábra).

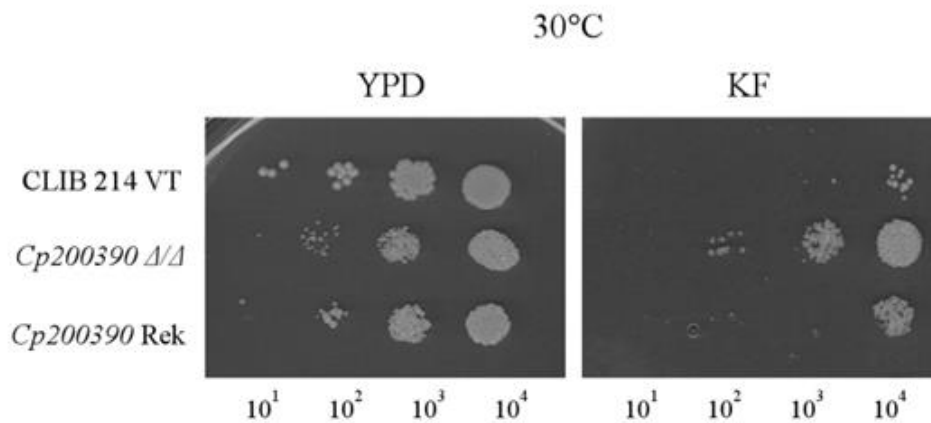
A CPAR2_200390 funkcionális ortológja *C. albicans*-ban az SPT3 gén, amely a SAGA transzkripciós faktor komplex részét képezi. A komplex többek között a gomba morfológia váltásának szabályozásában is részt vesz (Laprade és mtsi., 2002). *In silico* elemzések alapján meghatároztuk, hogy a CPAR2_200390 és a *C. albicans* SPT3 által kódolt fehérje primer szerkezetét tekintve nagymértékű hasonlóságot mutat (NCBI protein Blast).

C. albicans esetén az SPT3 deléciós törzs (*Caspt3 Δ/Δ*) vizsgálatokor hiperfilamentáló növekedést, jellegzetesen aggregálódó filamentumokat és növekedési rendellenességet is megfigyeltek (Laprade és mtsi., 2002; Koutelou és mtsi., 2010). Emellett a *Caspt3 Δ/Δ* mutáns törzs gyűrött telepmorfológiát mutatott, ami a hiperfilamentáló fenotípussal hozható összefüggésbe.

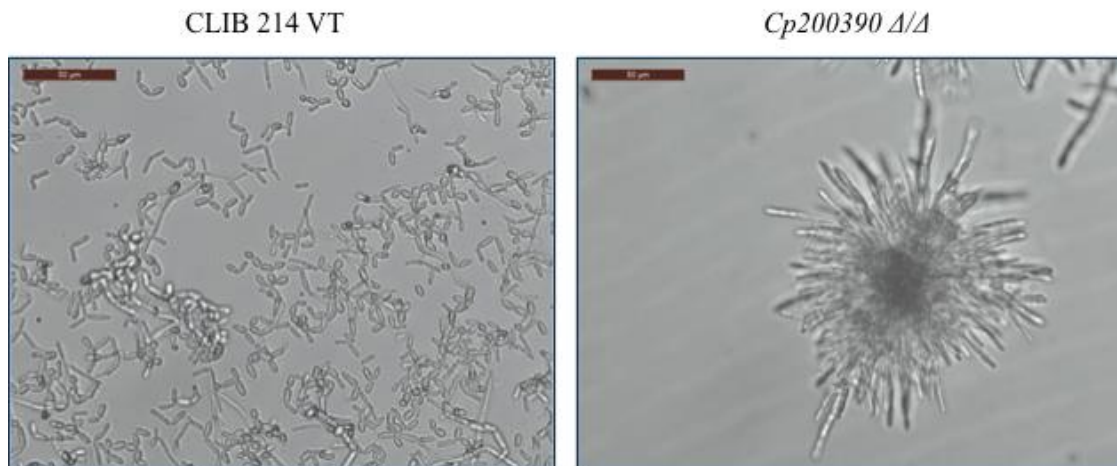
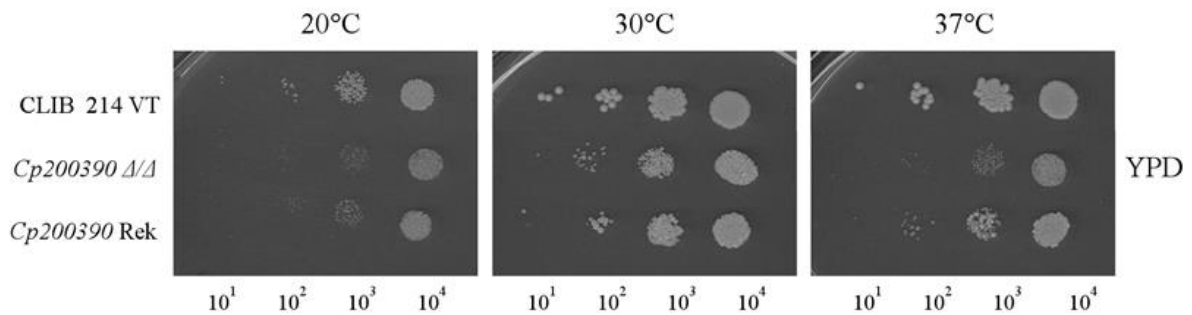
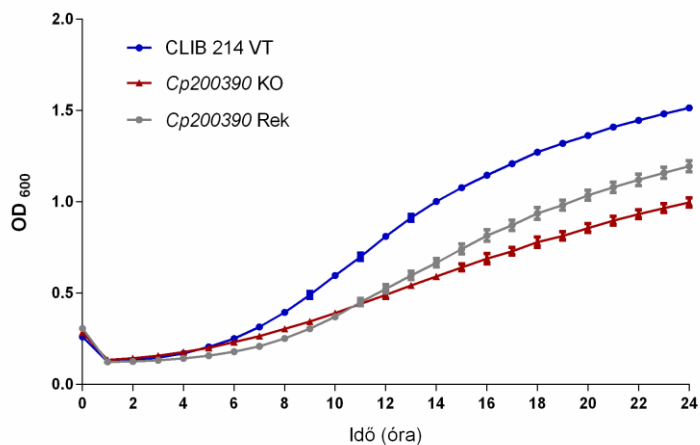
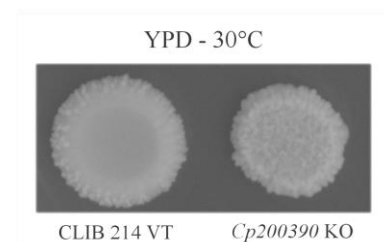
A CPAR2_200390 Δ/Δ deléciós törzs vizsgálata során kapott fenotípusok többsége megegyezik a *Caspt3 Δ/Δ* mutáns törzs fenotipizálása során leírt tulajdonságokkal. Ebből arra következtethetünk, hogy a CPAR2_200390 által kódolt transzkripciós faktor szerepe megegyezik a *C. albicans*-ban leírtakkal. A mutáns törzs csökkent mértékű

biofilmképzésének (ld. 6.3.4. fejezet) oka a nagymértékben aggregálódott pszeudohifa plakkok jelenléte lehet, melyek akadályozhatják az intakt biofilm képzését. Érdeemes megemlíteni, hogy egy újabb tanulmány szerint, a SAGA komplex egy másik tagjának (*SPT20*) deléciója esetén is biofilmképzési rendellenesség volt megfigyelhető (Tan és mtsi., 2014). Ez arra utalhat, hogy az általunk azonosított *CPAR2_200390* gén *C. parapsilosis* genomból történő eltávolítása esetleg befolyásolhatta a komplex egyéb tagjainak működését is, ami további magyarázat lehet a deléciós törzs csökkent mértékű biofilmképzésére.

A másodlagos morfológia váltást számos tényező, közöttük a sejtfal homeosztázist befolyásoló faktorok megváltozott expressziója is befolyásolhatja. Ez magyarázatot adhat a sejtfal stresszor kalkofluor fehérrel szemben mutatott rezisztenciára is. A továbbiakban a gén eltávolítása utáni, a sejtfalat potenciálisan érintő változásokat vizsgáltuk meg.



19. ábra. A *CPAR2_200390* mutáns törzsek növekedési képessége sejtfal stresszor jelenlétében. Az ábrán a vad típusú, *CPAR2_200390* homozigóta deléciós (Δ/Δ) és a reintegrált (Rek) törzsek növekedése látható YPD és 60 $\mu\text{g/ml}$ kalkofluor fehér (KF) stresszorral kiegészített táptalajon, 30 °C-on történő 2 napos inkubációt követően.

A**B****C****D**

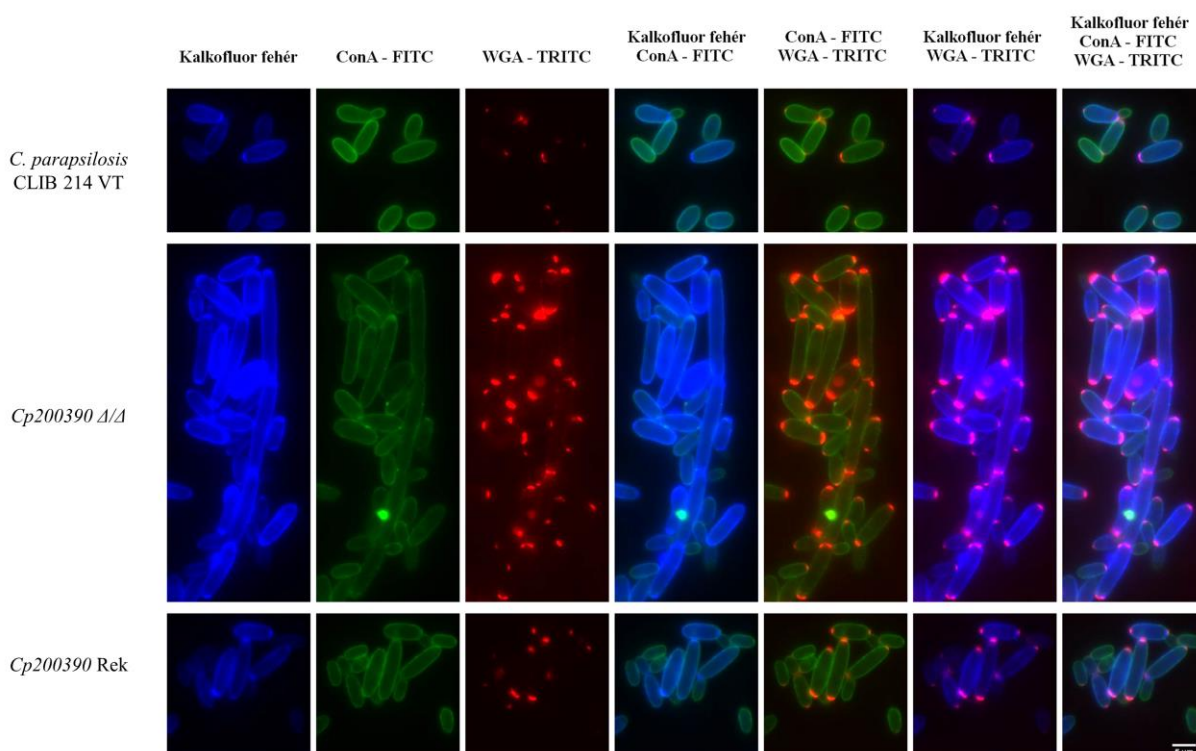
20. ábra. A *CPAR2_200390* mutáns törzsek előzetes fiziológiai vizsgálatai.

Az ábrákon a vad típusú, *CPAR2_200390* homozigóta deléciós (Δ/Δ) és a *CPAR2_200390* reintegrált (Rek) törzsek láthatóak. **A:** pseudohifa képzés FBS-sel kiegészített DMEM tápoldatos közegben, 24 órát követően. Méretskála: 50 μ m. **B:** Növekedési képesség vizsgálata YPD táptalajon, 2 napot követően. **C:** Növekedési kinetika vizsgálata 24 órán keresztül YPD tápoldatban. **D:** Megváltozott telepmorfológia YPD táptalajon, 2 napos inkubációt követően.

6.4.2.2. A *CPAR2_200390* Δ/Δ mutáns törzs sejtfal összetételének vizsgálata

Az előzetes vizsgálatainknál tapasztalt sejtfal stresszrel szembeni rezisztencia okát elsősorban a sejtfal összetételének vizsgálatán keresztül kerestük. A gomba sejtfal összetétele jól monitorozható az egyes sejtfal komponensekhez kötődő különböző fluoreszcens festékek alkalmazásával (Tkacz és mtsi., 1971; Rasconi és mtsi., 2009; Rodrigues és mtsi., 2015).

A sejtfal egyes komponenseinek egymáshoz viszonyított arányát a Prof. Leonardo Nimrichter (Federal University of Rio de Janeiro) által vezetett csoport segítségével vizsgáltuk meg. Ehhez a sejtfal felszínén található mannoпротеinekhez kötődni képes ConA-FITC-t (zöld), a kitinhez kapcsolódó kalkofluor fehér festéket (kék), illetve a sejtfalban elszórtan található kitin oligomerjeihez kötődő WGA-TRITC (piros) fluoreszcens festékeket használtuk (21. ábra). Eredményeink alapján a *CPAR2_200390* Δ/Δ deléciós törzs magasabb össz-kitin és kitin oligomer tartalommal rendelkezik, mint a vad típusú és a rekonstruált törzs. Tehát a *CPAR2_200390* gén által kódolt transzkripciós faktor befolyásolja a gomba sejtfal összetételét. A továbbiakban a sejtfal kitin összetételének megváltozásának hátterében álló lehetséges génextpressziós mechanizmusokat vizsgáltuk.



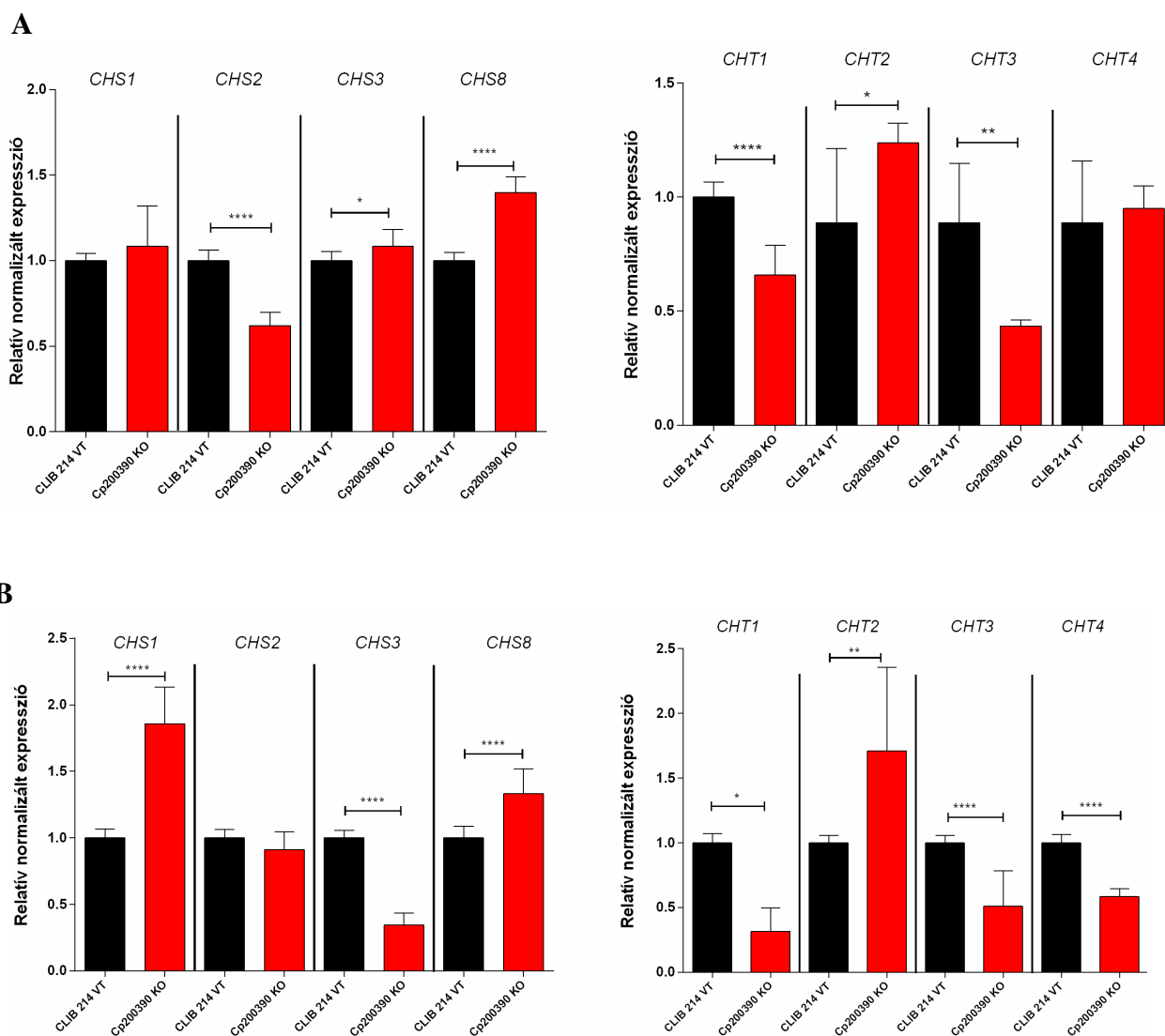
21. ábra. A *CPAR2_200390* mutáns törzsek sejtfal összetételének vizsgálata.

A vad típusú, *CPAR2_200390* homozigóta deléciós (KO) és reintegrált (RI) törzsek eltérő fluoreszcens festékekkel történő sejtfal festése. Méretarány jelzésére szolgáló vonal mérete: 5 μ m.

6.4.2.3. A *CPAR2_200390 Δ/Δ* mutáns törzs kitináz és kitin szintáz expressziójának vizsgálata

A *Cpar2_200390* transzkripciós faktor sejtfal homeosztázisban játszott szerepének igazolását követően arra a kérdésre kerestük a választ, hogy milyen folyamat állhat a sejtfal kitin tartalmának megemelkedése mögött. Ismert, hogy a sejtfal kitin tartalmának megváltozását kitin szintázok és kitinázok egyaránt befolyásolják (Selvaggini és mtsi., 2004). *C. albicans* esetében e folyamathoz 4-4 különböző kitináz (*CHT1*, *CHT2*, *CHT3* és *CHT4*) és kitin szintáz (*CHS1*, *CHS2*, *CHS3* és *CHS8*) gén szerepe köthető, amelyek a gombasejt életciklusa során aktívan befolyásolják annak sejtfal összetételét (Gow és mtsi., 1994; McCreath és mtsi., 1995; Mio és mtsi., 1996; Munro és mtsi., 2001; Munro és mtsi., 2003; Selvaggini és mtsi., 2004). *C. albicans*-ban a fonalas növekedés során kiemelten fontos a *Cht3* kitináz aktív szerepe, míg kitin szintázok esetén a *Chs2* létfontosságú (Selvaggini és mtsi., 2004).

Kísérletünk során megvizsgáltuk, hogy a *CPAR2_200390 Δ/Δ* mutáns törzs sejtfal összetételének elváltozása a gomba kitináz, illetve kitin szintáz kódoló gének expressziójának megváltozásán keresztül történik-e. Ehhez komplex YPD, illetve szérummal kiegészített DMEM tápközegeket használtunk. Kísérleteinkben mindkét tápközegben jelentős mértékben változott az egyes kitinázok, illetve kitin szintázok expressziója (22/A. és 22/B. ábrák). Érdeemes megjegyezni, hogy a filamentális formában legaktívabb szerepű kitin szintázt és kitinázt kódoló gének (*CHS2* és *CHT3*) expressziója mindkét tápközegben lecsökkent. Tehát a *CPAR2_200390* által kódolt transzkripciós faktor a sejtfal kitin összetételének szabályozását feltehetőleg a kitináz és kitin szintáz gének expressziójának módosításán keresztül fejtheti ki.



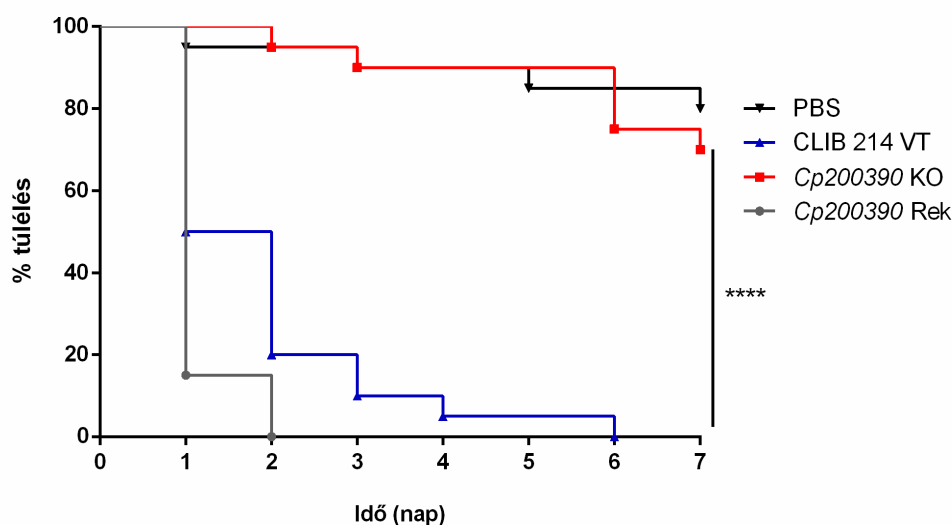
22. ábra. A *CPAR2_200390* deléciós mutáns törzs kitináz és kitin szintáz expressziójának vizsgálata.

A *CPAR2_200390* Δ/Δ deléciós mutáns törzs kitinázainak (*CHT1-CHT4*) és kitin szintázainak (*CHS1-CHS3* és *CHS8*) relatív expressziós adatai, a vad típusú törzs adataihoz normalizálva. A sejteket YPD tápközegben (A), illetve FBS + DMEM tápoldatban (B) egy éjszakán át, 37 °C-on tenyésztettük. Szignifikancia mértéke: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,0001$.

6.4.2.4. A *CPAR2_200390* Δ/Δ mutáns törzs *in vivo* virulencia vizsgálata

A *CPAR2_200390* által kódolt transzkripciós faktor a gomba életképességében, morfológia váltásában és a sejtfal összetétel szabályozásában betöltött szerepének igazolása után elvégeztük a deléciós törzs virulencia vizsgálatát is.

Virulencia vizsgálatainkhoz jelen esetben is *G. mellonella* lárva modellt alkalmaztunk. A kísérlet során csoportonként 20-20 egyedét használtunk az egyes törzsekkel és PBS pufferrel (kontroll) történő infekciókhoz. Az egyes csoportok tagjainak túlélését 7 napon keresztül követtük nyomon. A fertőzött *G. mellonella* lárvák túlélése alapján a *CPAR2_200390* Δ/Δ deléciós törzs jelentős mértékben csökkent virulenciát mutatott (23. ábra). Tehát a *CaSpt3* transzkripciós faktorhoz hasonlóan - ebben a modellrendszerben -, a *Cpar2_200390* is részt vesz a gomba fertőzőképességének szabályozásában.



23. ábra. *Galleria mellonella* lárva túlélési görbe *C. parapsilosis* törzsekkel történő fertőzést követően.

Az ábra *G. mellonella* lárvák vad típusú, *CPAR2_200390* Δ/Δ deléciós (KO), *CPAR2_200390* reintegrált (Rek) törzsekkel, valamint PBS-sel történő infekciójából származó túlélését ábrázolja százalékos arányban megadva. Szignifikancia mértéke: **** $p < 0,0001$.

6.4.2.5. A *C. parapsilosis* *Cpar2_200390* transzkripciós faktor vizsgálatából származó eredmények összefoglalása

A *CPAR2_200390* gén szintén a gazda-patogén kölcsönhatást követően került azonosításra, melynek expressziója emelkedett az interakciót követően vizsgált 1 és 6 óra után is. A *CPAR2_200390* Δ/Δ deléciós törzs jellemzése során kapott fenotípus profil (aggregálódó hiperfilamentáló sejtek, gyűrött telepmorfológia és növekedési rendellenesség) megegyezik a legközelebbi ortológ, az *SPT3* *C. albicans*-ból történő deléciója során kapott fenotípusokkal (Laprade és mtsi., 2002).

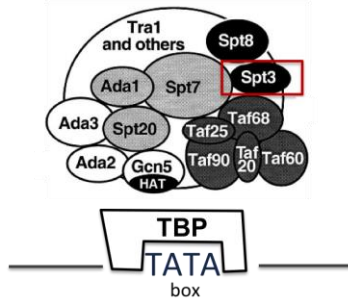
Az *SPT3* az evolúciósan konzervált SAGA komplex egyik alegysége, amely a komplex tagjaként számos gén expresszióját szabályozza (Bhaumik és Green 2002). A

fehérje komplex az élesztő genom génjeinek megközelítőleg 10%-át szabályozza, amely gének közül sok a stresszre adott válasz kialakításában vesz részt (Huisinga és Pugh 2004). A komplex TBP proteinek toborzását végzi bizonyos promóter régiók TATA-elemeihez (TATA-box) (Huisinga és Pugh 2004) (24/A. ábra). Az *SPT3* továbbá a fonalas növekedés egy konzervált regulátora (Laprade és mtsi., 2002). A gén deléciója *S. cerevisiae* esetén a fonalszerű növekedés hiányát, míg *C. albicans*-ban hiperfilamentáló fenotípust eredményezett (Laprade és mtsi., 2002). Tehát az *SPT3* *S. cerevisiae*-ben a fonalas növekedés pozitív, míg *C. albicans*-ban annak negatív regulátoraként ismert (24/B. ábra). A *CPAR2_200390 Δ/Δ* deléciós törzs által mutatott fenotípus a *C. albicans*-ban megfigyeltékhez hasonló, melyből arra következtethetünk, hogy a gén *C. parapsilosis*-ban is represszálhatja a másodlagos morfológia kialakulását.

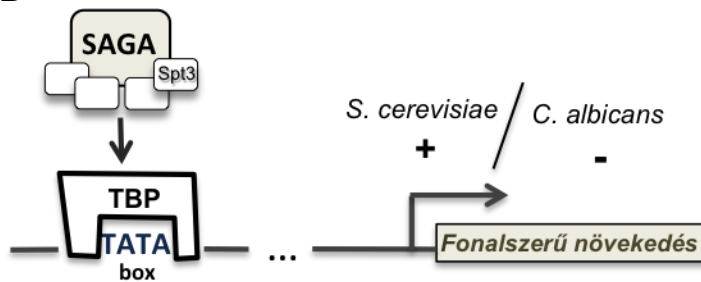
A *CPAR2_200390*-hez köthető egy további, eddig nem azonosított fenotípus, amely a sejtfal stresszor kalkofluor fehérrel szembeni rezisztencia. A sejtfal stresszorzal szembeni ellenállóképesség megjelenése megváltozott sejtfal szerkezetre utalhat. Ezért megvizsgáltuk a mutáns törzs sejtfalának összetételét, ami a vad típusú sejtekkel szemben rendkívül gazdag volt kitinben és kitin oligomerekben. A sejtfal kitin összetételét különböző kitinázok és kitin szintázok egyaránt befolyásolhatják (Selvaggini és mtsi., 2004). Ezért a *CPAR2_200390 Δ/Δ* deléciós mutáns törzsben megvizsgáltuk az egyes kitináz (*CHT1-CHT4*) és kitin szintáz (*CHS1-CHS3*, *CHS8*) kódoló gének expresszióját is. Vizsgálatainkban valamennyi bevont gén expressziós profilja megváltozott a vad típusú törzshöz képest, mind szérummal kiegészített, mind pedig YPD tápközeg használata esetén, ami oka lehet a mutáns sejtek felborult kitin bioszintézisének. A patogén gomba sejtfalában történő kitin átrendeződések, nemcsak a stresszválasz kialakítása miatt fontosak, hanem a gazdaszervezetet érintő, immunmoduláló hatásai miatt is fontosak lehetnek. Így megvizsgáltuk a *CPAR2_200390 Δ/Δ* deléciós törzs virulenciáját. A *G. mellonella* modellorgazmummal elvégzett kísérletek során elmondhatjuk, hogy a mutáns törzs esetében csökkent virulenciát tapasztaltunk. Ez a megfigyelés megegyezik a *C. albicans*-ban korábban tapasztaltakkal, miszerint a *spt3Δ/Δ* deléciós törzs szintén csökkent virulenciát mutatott (Laprade és mtsi., 2002).

A

SAGA - Spt-Ada-Gcn-Acetiltranszferáz - komplex



B



24. ábra. A SAGA komplex és az Spt3 általi szabályozás.

A: A SAGA komplex felépítése. A komplex TBP fehérjék toborzását végzi számos promóter régió TATA-box elemeihez. Forrás: (Sterner és Berger 2000) alapján módosítva.

B: A SAGA komplex alegysége, az Spt3 fonal növekedésben játszott szerepe *S. cerevisiae*-ben és *C. albicans*-ban.

Konklúzióként tehát elmondható, hogy az általunk azonosított *C. parapsilosis* CPAR2_200390 feltehetőleg a gomba morfogenezisének és a sejtfal kitin összetételének szabályozásán keresztül részt vesz a gomba virulenciájának szabályozásában is. Mindezek alapján feltételezhető, hogy a *C. parapsilosis*-ban azonosított CPAR2_200390 a *C. albicans*-ban korábban azonosított SPT3 gén funkcionális ortológja lehet. Továbbá a fenti eredmények arra engednek következtetni, hogy ez a gén feltehetően a pszeudohifa növekedés regulátora lehet és nem a valódi hifás növekedésé, mint ahogyan ezt eddig gondolták. Ennek alátámasztására további vizsgálatokat tervezünk, fontos azonban megjegyezni, hogy ez lenne az elsőként azonosított pszeudohifa átalakulást reguláló faktor.

6.4.3. A biofilmképzés szabályozásában résztvevő Cpar2_602840 transzkripciós faktor jellemzése

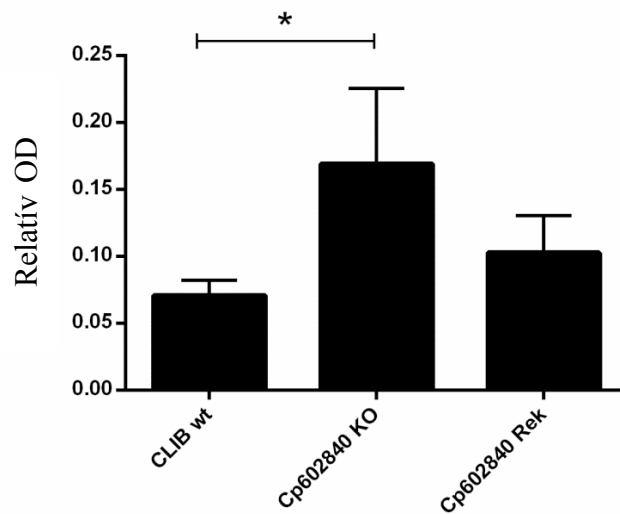
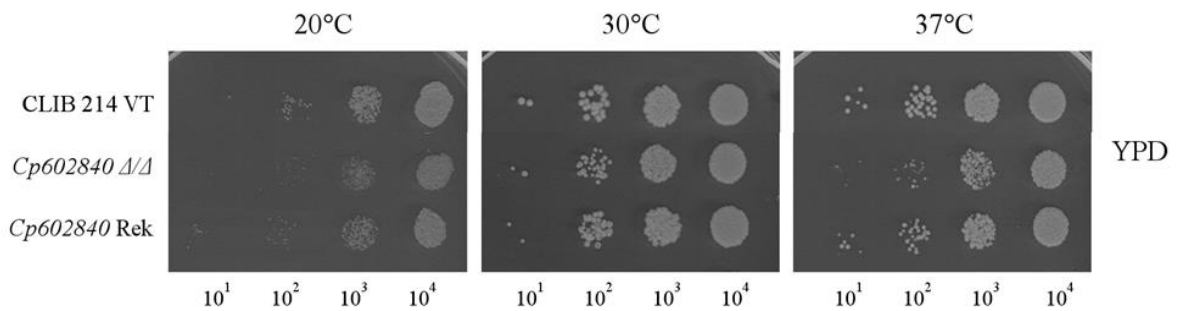
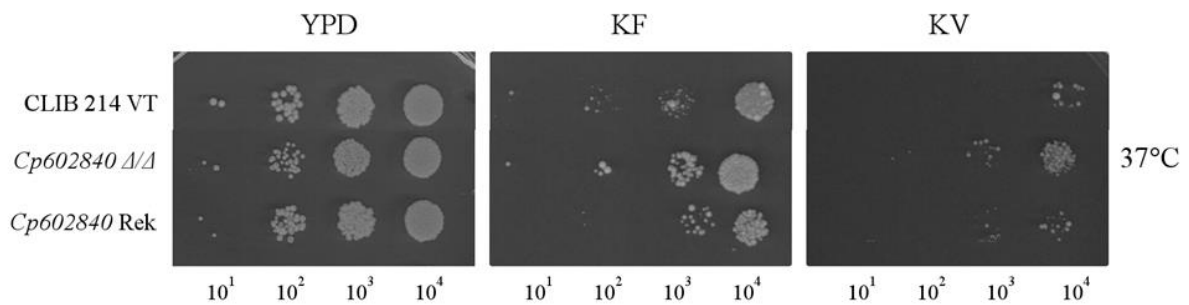
6.4.3.1. A CPAR2_602840 Δ/Δ deléciós törzs sajátosságai az előzetes vizsgálatok alapján

A deléciós könyvtár jellemzése során a *CPAR2_602840 Δ/Δ* törzs a többi mutáns törzshöz viszonyítva hatékonyabb biofilm-képzőnek bizonyult (25/A. ábra). Emellett a *CPAR2_602840 Δ/Δ* mutáns sejtek különböző közegekben és hőmérsékleteken csökkent növekedési képességet mutattak (25 /B ábra), valamint rezisztensnek bizonyultak a sejtfal stresszor kalkofluor fehérrel és kongó vörössel szemben (25 /C ábra).

In silico elemzések alapján a *CPAR2_602840* gén legközelebbi funkcionális ortológja a *S. cerevisiae* *TFB4* (NCBI Protein Blast), ami a TFIIH (transzkripciós faktor II H) komplex esszenciális tagjaként számos gén transzkripciójának szabályozásában vesz részt (Warfield és mtsi., 2016). A komplex a nukleotid excíziós javítási folyamatok irányításán keresztül DNS hibajavító funkcióval is rendelkezik (Compe és Egly 2012).

Egy friss tanulmány szerint, *S. cerevisiae*-ben a *TFB4* esszenciális, mivel annak hiánya a TFIIH komplex alegységeinek disszociációjához vezet (Warfield és mtsi., 2016). Mivel a TFIIH transzkripciós faktor komplex DNS javítási mechanizmusokban vesz részt, ez magyarázatként szolgálhat a *CPAR2_602840 Δ/Δ* deléciós törzs növekedési rendellenességére. A mutáns törzs sejtfal stresszorokkal szembeni ellenálló képességére, illetve a hatékonyabb biofilmképzésre azonban nem ad választ.

A továbbiakban az utóbbi tulajdonságok háttérben álló mechanizmusok felderítését tűztük ki célul. Mivel a mutáns törzs és a vad típusú törzs pszeudohifa képzése között nem tapasztaltunk különbséget, arra következtettünk, hogy a hatékonyabb biofilmképzés és a sejtfal stresszorok jelenlétére adott válasz háttérben a sejtfal összetételének megváltozása állhat.

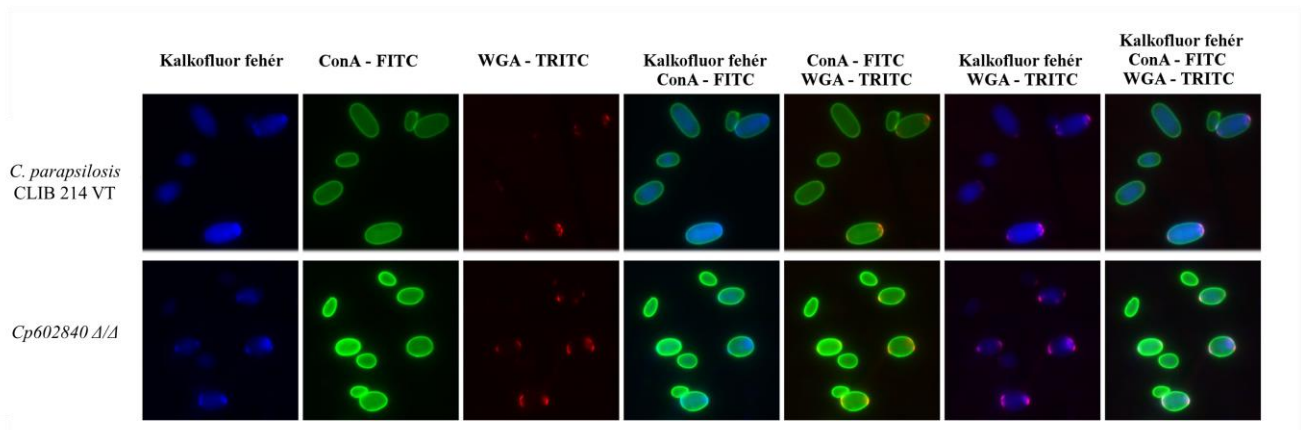
A**Metabolikus aktivitás vizsgálat****B****C****25. ábra. A *CPAR2_602840* mutáns törzsek előzetes fiziológiai vizsgálatai.**

Az ábrákon a vad típusú, *CPAR2_602840* homozigóta deléció (Δ/Δ) és reintegrált (Rek) törzsek láthatóak. **A:** MTT metabolikus esszé a törzsek biofilmképzésének vizsgálatára. *Szignifikancia mértéke: $*p < 0,05$. **B:** Növekedési képesség vizsgálata YPD táptalajon, különböző hőmérsékleten, 2 napot követően. **C:** Növekedési képesség vizsgálata 40 $\mu\text{g/ml}$ kalkofluor fehér (KF) és 20 $\mu\text{g/ml}$ kongó vörös (KV) sejtfallal stresszorzóval kiegészített YPD táptalajokon, 2 napot követően.

6.4.3.2. A *CPAR2_602840* Δ/Δ mutáns törzs sejtfal összetételének vizsgálata különböző sejtfal festékek alkalmazásával

A kalkofluor fehér és kongó vörös sejtfal stresszorokkal szembeni rezisztencia okát – a *CPAR2_200390* Δ/Δ deléciós törzshöz hasonlóan – elsősorban a sejtfal összetételének megváltozásában kerestük. Ehhez jelen esetben is a sejtfal felszínén található mannoпротеinekhez kötődő ConA-FITC-t, a kitinhez kapcsolódó kalkofluor fehér, illetve a sejtfalban elszórtan található kitin oligomerekhez kötődő WGA-TRITC fluoreszcens festékeket alkalmaztuk (26. ábra). A fluoreszcens mikroszkópos képek kiértékelése után a *CPAR2_602840* Δ/Δ mutáns törzs esetében nem tapasztaltunk eltérést a sejtfal kitin összetételében, a vad típusú törzshöz képest. Azonban érdekes módon, a mutáns sejtek falában megemelkedett a mannoпротеinek mennyisége a vad típusú törzs sejtfalához viszonyítva (26. ábra).

Ez alapján a *Cpar2_602840* transzkripciós faktor befolyással bírhat a gomba sejtfal összetételére.

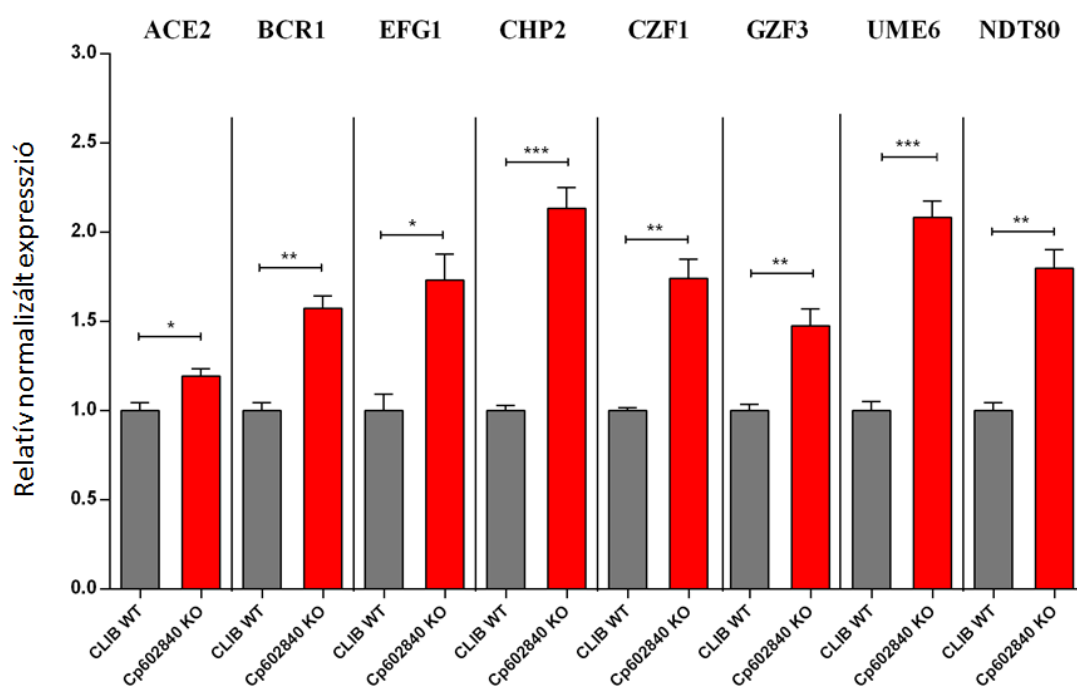


26. ábra. A *CPAR2_602840* mutáns törzsek sejtfal összetételének vizsgálata.

Az ábrán a vad típusú és *CPAR2_602840* homozigóta (KO) deléciós törzs eltérő fluoreszcens festékekkel történő sejtfal festése látható. Méretarány jelzésére szolgáló vonal mérete: 5 µm.

6.4.3.3. A biofilmképzést meghatározó transzkripciós regulátorok expressziójának vizsgálata a *CPAR2_602840Δ/Δ* törzsben

Candida fajoknál már számos biofilmképzésben szerepet játszó faktort azonosítottak. *C. parapsilosis* esetében nyolc ilyen transzkripciós faktort írtak le. Ezek a *C. albicans*-ban is megtalálható Ace2, Bcr1, Ndt80 és Efg1, valamint az egyedül *C. parapsilosis*-ban funkcionáló Cph2, Czf1, Gzf3 és Ume6 faktorok (Holland és mtsi., 2014). A továbbiakban e faktorok expressziójának szabályozódását vizsgáltuk a hiper-biofilm képző fenotípust mutató *CPAR2_602840Δ/Δ* deléciós törzsben. Kísérleteinkben a mutáns törzsnél mind a nyolc vizsgált gén expressziója megemelkedett (27. ábra), ami arra enged következtetni, hogy a *Cpar2_602840* transzkripciós faktor kulcsfontosságú szabályozó molekulaként funkcionálhat a vizsgált biofilm képzést befolyásoló gének expressziója felett.

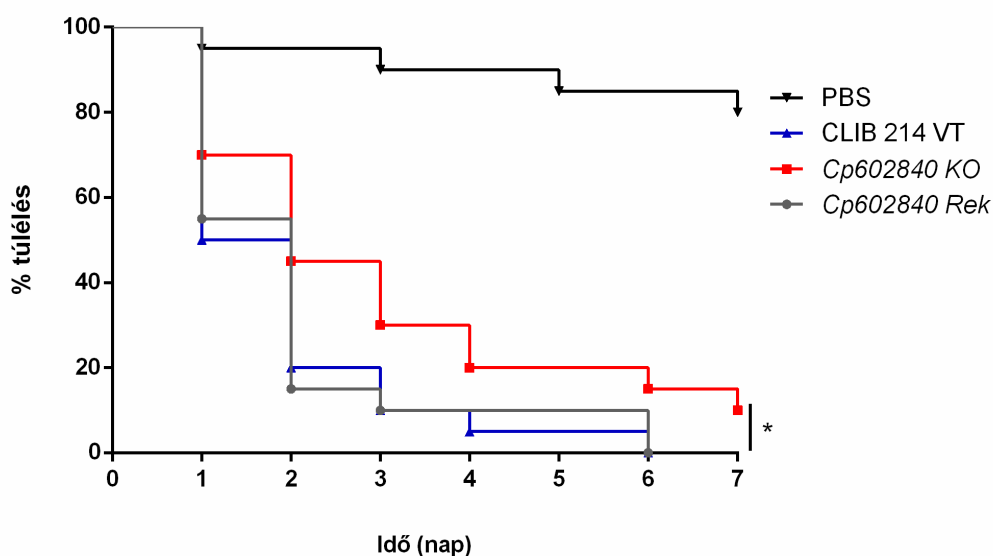


27. ábra. A biofilmképzést szabályozó gének expressziója.

Az ábrán relatív expressziós értékek láthatóak, a vad típusú törzs adataihoz normalizálva, a törzsek 2 napon keresztül YNB + glükóz tápközegben történő, 37 °C-os inkubációját követően. Szignifikancia mértéke: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

6.4.3.4. A *CPAR2_602840* Δ/Δ mutáns törzs *in vivo* virulencia vizsgálata

A biofilmképzést befolyásoló faktorok bizonyítottan részt vesznek a gomba virulenciájának szabályozásában is (Connolly és mtsi., 2013). A *CPAR2_602840* gén biofilmképzésben játszott szerepének igazolását követően megvizsgáltuk hogy a *CPAR2_602840* Δ/Δ mutáns törzsben létrejött fenotípus hogyan befolyásolja a gomba fertőzőképességét. Virulencia vizsgálatunkhoz jelen esetben is a *G. mellonella* lárva modellt alkalmaztuk. Fertőzést követően a beoltott lárvák túlélését 7 napon keresztül napi rendszerességgel ellenőriztük. A túlélési görbe adatai alapján a *CPAR2_602840 Δ/Δ törzs mérsékelten csökkent virulenciával rendelkezik (28. ábra), tehát *G. mellonella* modellorganizmusban a *CPAR2_602840* által kódolt transzkripciós faktor részt vesz a gomba fertőzőképességének szabályozásában is.*



28. ábra. *Galleria mellonella* lárva túlélési görbe *C. parapsilosis* törzsekkel történő fertőzést követően.

Az ábra *G. mellonella* lárvák vad típusú, *CPAR2_602840* Δ/Δ deléciós (KO), reintegrált (Rek) törzsekkel, valamint PBS-sel történő infekciójából származó túlélését ábrázolja százalékos arányban megadva. Szignifikancia mértéke: * $p < 0,05$.

6.4.3.5. A *C. parapsilosis* Cpar2_602840 transzkripció faktor vizsgálatából származó eredmények összefoglalása

A *CPAR2_602840* gén szintén a gazda-patogén kölcsönhatást követően került azonosításra, melynek expressziója a kölcsönhatást követően vizsgált 1 és 6 óra után is emelkedett szintet mutatott. A létrehozott *CPAR2_602840 Δ/Δ* deléciós törzs jellemzését követően azonosított fenotípusok a következők voltak: növekedési rendellenesség az optimálistól eltérő hőmérsékleteken és minimál tápközegekben, rezisztencia a sejtfal stresszor kalkofluor fehérrel és kongó vörössel szemben és hatékonyabb biofilm képző képesség megjelenése a vad típusú törzssel összehasonlítva.

A *CPAR2_602840* legközelebbi ortológja az általános transzkripció faktor komplex II H (TFIIH) egyik esszenciális alegységét kódoló *TFB4* gén (29/A. ábra). *S. cerevisiae* esetén a sejtek Tfb4 hiányában életképtelenek (Warfield és mtsi., 2016). A komplex számos génről történő transzkripció elindításához szükséges és DNS hibajavító folyamatokban is részt vesz (Compe és Egly 2012; Warfield és mtsi., 2016). Ez magyarázatként szolgálhat a *CPAR2_602840* hiányában, bizonyos körülmények között bekövetkező, növekedési rendellenességre.

Jelen kísérleteinkben a mutáns törzs sejtfal stresszre adott válasza és hatékonyabb biofilm képző képessége mögötti mechanizmusokat vizsgáltuk. Elemeztük a mutáns sejtek sejtfalának összetételét, melynek megváltozása magyarázhatja a sejtfal stresszorok jelenlétére adott választ. Ehhez a sejtfal különböző komponenseihez kötődő fluoreszcens festékeket alkalmaztunk. A kísérlet eredményeként a *CPAR2_602840 Δ/Δ* mutáns sejtek sejtfalában lényegesen megemelkedett mannóz tartalmat detektáltunk a vad típusú sejtekkel szemben. Elképzelhető, hogy a sejtfal összetételének ily módon történő megváltozása befolyásolhatta bizonyos sejtfal stresszorok, valamint a további, kitinhez / kitin oligomerekhez kötődő fluoreszcens festékek szubsztrát affinitását. A sejtfal stresszorokkal szembeni rezisztencia oka lehet maga a biofilmképzés is, mely szintén befolyásolhatta az egyes sejtek sejtfalának hozzáférhetőségét.

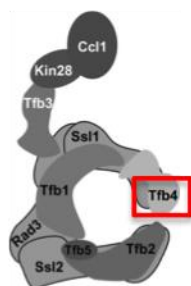
Annak érdekében, hogy meghatározzuk, hogy milyen mechanizmus állhat a *CPAR2_602840 Δ/Δ* mutáns törzs hiper-biofilmképző tulajdonsága hátterében, megvizsgáltuk azon gének expresszióját (*ACE2*, *EFG1*, *BCR1*, *CPH2*, *CZF1*, *GZF3*, *UME6*, *NDT80*), melyek a *C. parapsilosis* biofilmképzésében bizonyítottan részt vesznek (Ding és Butler 2007; Connolly és mtsi., 2013; Holland és mtsi., 2014). A génexpressziós vizsgálatokat követően azt tapasztaltuk, hogy a mutáns törzsben minden eddig ismert biofilmképzést befolyásoló gén átíródása megemelkedett. Ebből tehát arra

következtethetünk, hogy a Cpar2_602840 egy kulcsfontosságú regulátora a *C. parapsilosis* biofilmképzésének (29/B. ábra).

Mivel a biofilmképzést befolyásoló faktorok bizonyítottan befolyásolják a gomba virulenciáját (Connolly és mtsi., 2013) és a patogén gombák sejtfal összetételének megváltozása is kihatással lehet a gazda immunválaszára, megvizsgáltuk a *CPAR2_602840* Δ/Δ deléciós törzs fertőzőképességét is, amelyhez *G. mellonella* modellorganizmust alkalmaztunk. Kísérleteink eredményeként elmondhatjuk, hogy az itt alkalmazott modellrendszerben a törzs virulenciája mérsékelten csökkent. Ennek magyarázata lehet, hogy a biofilmképzés mint virulencia faktor inkább a gombafertőzés korai stádiumában játszhat fontosabb szerepet. Ezért a későbbiekben olyan modellrendszer használatát tervezzük, ami a fertőzés korai szakaszának vizsgálatára alkalmasabb lehet (pl. patkány katéter modell).

A

TFIIH - Transzkripció Faktor II H - komplex

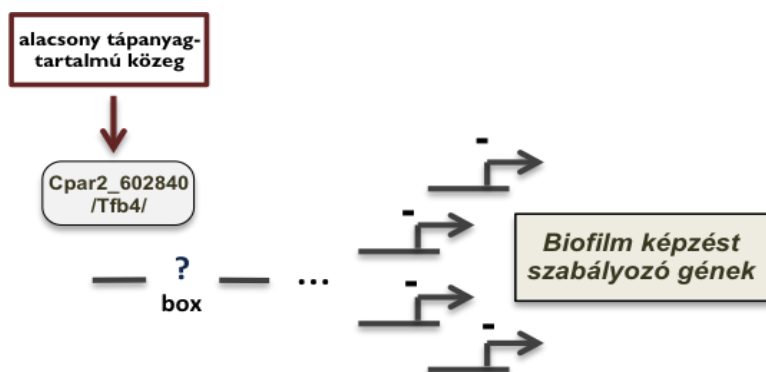


29. ábra. A TFIIH komplex és a Cpar2_602840 feltételezett szerepe.

A: A TFIIH komplex sematikus ábrája (Zhou és mtsi., 2007)

B: Alacsony tápanyag tartalmú közegben a Cpar2_602840 transzkripció faktor biofilmképzésben játszott feltételezett szerepe.

B



Konklúzióként tehát elmondható, hogy a *C. parapsilosis*-ban általunk azonosításra került *CPAR2_602840* gén a gomba sejtfal összetételének és biofilmképzésének szabályozásán keresztül befolyásolja annak virulenciáját. A *CPAR2_602840* esetében itt meghatározott funkciók egyedülállóak, mivel más fajokban ezek egyike sem köthető az eddig ismert ortológok funkciójához.

6.4.4. A hőszenszitivitást befolyásoló Cpar2_303700 kináz azonosítása

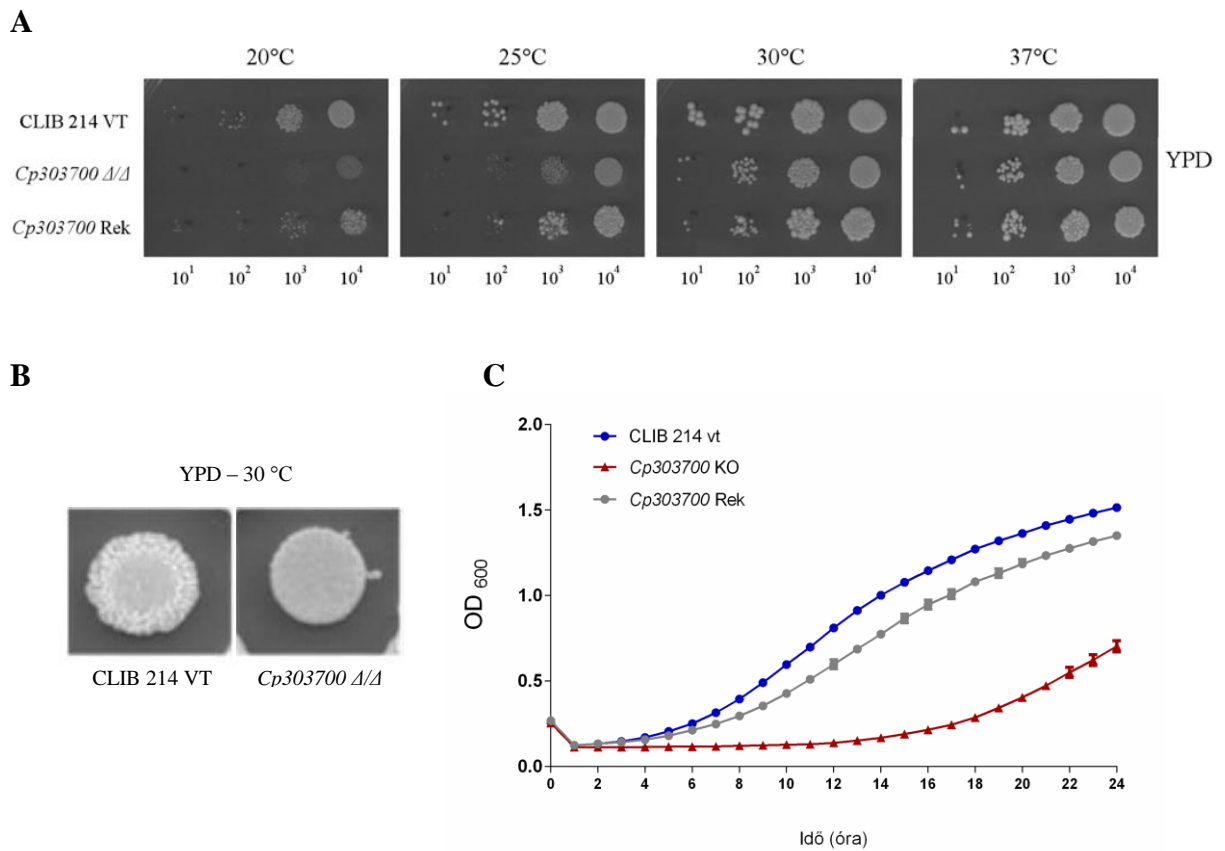
6.4.4.1. A CPAR2_303700 Δ/Δ deléciós törzs sajátosságai az előzetes vizsgálatok alapján

A CPAR2_303700 Δ/Δ törzs vizsgálatainkban jelentős mértékű szenzitivitást mutatott alacsony hőmérséklet (20 °C, 25 °C) jelenlétére (30/A. ábra). A törzs további jellegzetességei közé tartozik annak megváltozott telepmorfológiája (30/B. ábra), lassú növekedése (30/C. ábra), illetve a sejtmembrán károsító SDS-sel (31/A. ábra) és az oxidatív stresszor H₂O₂-vel szemben fellépő nagyfokú érzékenysége (31/B. ábra).

A *Candida* genom adatbázis alapján a CPAR2_303700 által meghatározott ORF legközelebbi, már azonosított ortológja, a *S. cerevisiae*-ben és számos más eukarióta organizmusban jelen lévő *CGI121*. A Cgi121 fehérje az evolúciósan konzervált KEOPS/EKC komplex allosztérikus regulátora (Perrochia és mtsi., 2013), amely fehérje csoportosulás transzkripció koaktivátor funkcióval rendelkezik (Kisseleva-Romanova és mtsi., 2006), de részt vesz a telomer fenntartásban (Downey és mtsi., 2006) és a tRNS módosításban is (Srinivasan és mtsi., 2011).

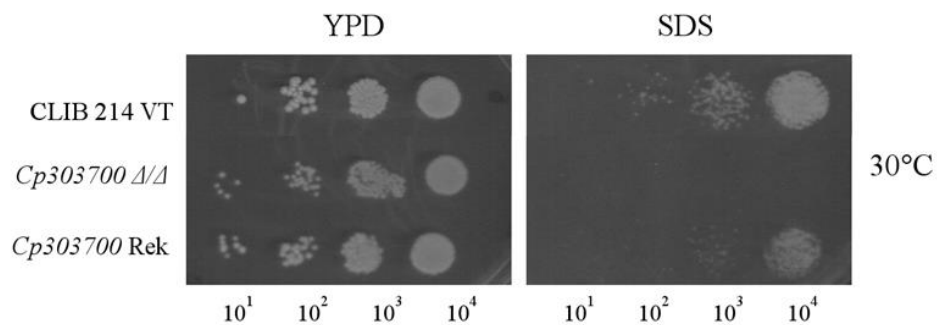
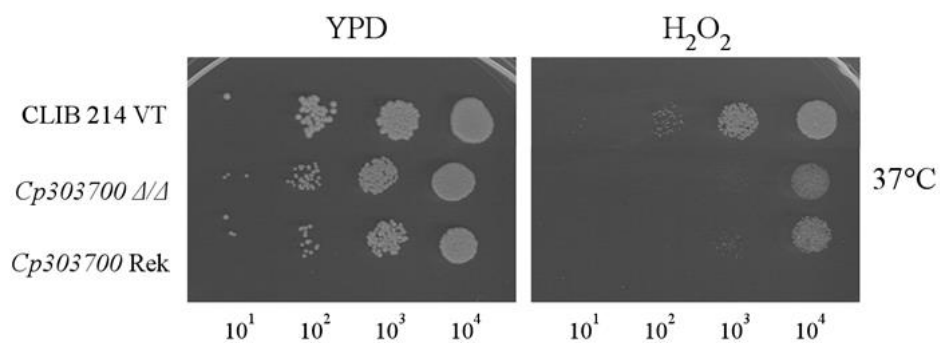
Korábbi tanulmányok alapján a KEOPS/EKC komplex számos alegységének meghibásodása növekedési rendellenességhez vezetett, mely esetenként letális volt (Kisseleva-Romanova és mtsi., 2006; Srinivasan és mtsi., 2011). Megjegyzendő, hogy a Cgi121 fehérje funkciójának elvesztése esetén nem volt megfigyelhető defektes fenotípus (Srinivasan és mtsi., 2011), tehát a *CGI121* hiánya számottevően nem befolyásolta a komplex működését. Más tanulmányokban leírták, hogy az élesztő telomer meghosszabbításában a *CDC1-13* gén bizonyítottan részt vesz. A gén deléciója esetén kapott fenotípus jellegzetessége a hőérzékenység, növekedési rendellenesség és az oxidatív stressz-szel szembeni nagyfokú érzékenység. Ezt a fenotípust, és emellett egyéb termoszenzitív fenotípusokat is, a *CGI121* génben bekövetkező mutáció menekíti (Downey és mtsi., 2006). Esetünkben a CPAR2_303700 Δ/Δ mutáns törzsből létrejött fenotípusok a *S. cerevisiae cdc1-13* Δ/Δ mutáns törzsnél megfigyeltekhez hasonlóak. Tehát míg *S. cerevisiae*-ben a gén deléciója a hőszenszitiv fenotípust menekíti, addig *C. parapsilosis*-ban a gén elvesztése hőérzékenységhez vezet. Ez arra utalhat, hogy a Cpar2_303700 a *S. cerevisiae* Cgi121 fehérje szerepével ellentétesen funkcionálhat.

A továbbiakban a CPAR2_303700 által kódolt fehérje *in silico* analízisét végeztük el annak érdekében, hogy megvizsgáljuk, az mennyiben hasonló a *CGI121* által kódolt fehérjével.



30. ábra. A *CPAR2_303700* mutáns törzsek előzetes fiziológiai vizsgálatai.

Az ábrákon a vad típusú, *CPAR2_303700* homozigóta deléciós (Δ/Δ) és a reintegrált (Rek) törzsek láthatóak. **A:** Növekedési képesség vizsgálata YPD táptalajon, különböző hőmérsékleteken, 2 napot követően, a gomba törzseket jelzett koncentrációkban kihígítva. **B:** Telepmorfológia vizsgálata YPD táptalajon, 2 napon át történő 30 °C-os inkubációt követően. **C:** Növekedési kinetika ábrázolása a sejtek YPD tápoldatban, 30 °C-on történő 24 órás tenyésztésével.

A**B****31. ábra. A *CPAR2_303700* mutáns törzsek előzetes fiziológiai vizsgálatai.**

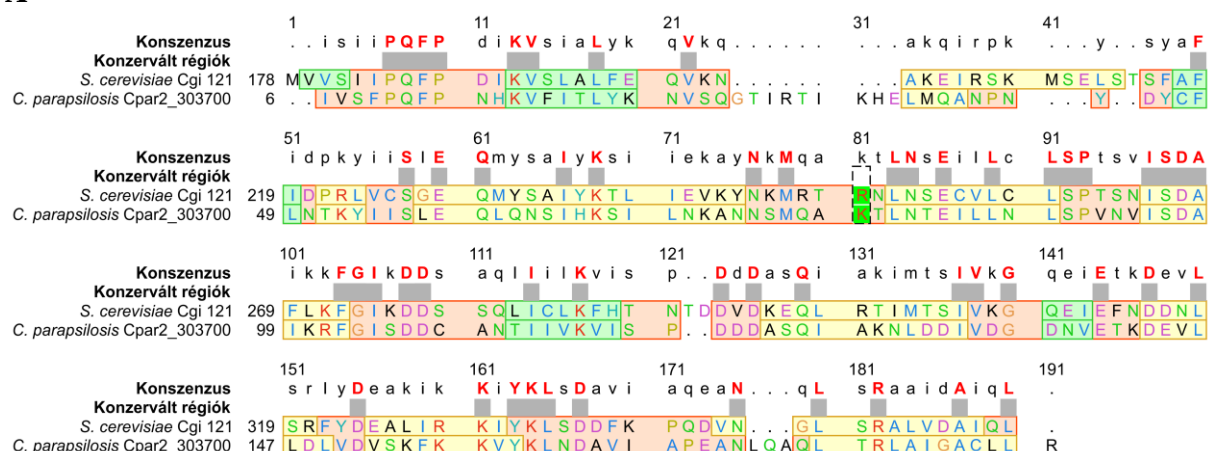
A ábrán a vad típusú, *CPAR2_303700* homozigóta deléció (Δ/Δ) és reintegrált (Rek) törzsek láthatóak. **A:** Növekedési képesség vizsgálata 0,06% SDS-sel kiegészített YPD táptalajokon, a törzseket 30 °C-on, 4 napon át növesztve. **B:** Növekedési képesség vizsgálata 10 mM H₂O₂-vel kiegészített YPD táptalajokon, 37 °C-on, 2 napon át inkubálva, a gomba törzseket jelzett koncentrációkban kihígítva.

6.4.4.2. *CPAR2_303700* ORF által meghatározott fehérje *in silico* analízise

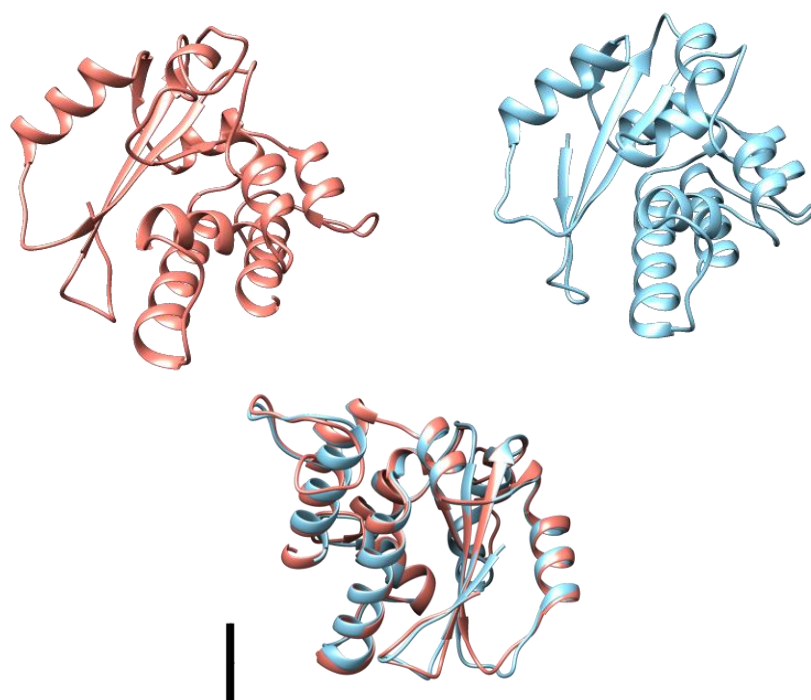
A jelen fejezetben tárgyalt *in silico* adatelemzéseket Chetna Tyagi, bioinformatikus PhD hallgató segítségével végeztük el. A *S. cerevisiae* *CGI121* és a *CPAR2_303700* génekről levezethető aminosav szekvencia összehasonlításakor 34% azonosságot találtunk (NCBI Protein Blast). Két fehérje esetén akkor következtethetünk funkció azonosságra, amikor azok elsődleges szekvenciája legalább 30%-ban teljesen megegyezik, illetve ugyanazon konzervált doménekkel rendelkeznek (Krieger és mtsi., 2003; Raghava és Barton 2006). A *Cpar2_303700* a *CGI121* szupercsalád konzervált doménjeit tartalmazza az elsődleges szekvencia adatok alapján (NCBI konzervált domén kereső). Mivel az általunk vizsgált szekvenciák közötti azonosság közel áll a 30%-os határértékhez, ezért további *in silico* adatelemzéseket végeztünk. Elsőként összehasonlítottuk a két fehérje primer szerkezeti segítségével prediktálható harmadlagos szerkezeteket. Ehhez a ModBase adatbázist (Pieper és mtsi., 2006) használtuk. A rendszer az újonnan feltöltött fehérjék térszerkezetét az azokat alkotó aminosavak fizikai-kémiai tulajdonságai alapján képes megjósolni, melyet az adatbázisában már jelen levő fehérjék harmadlagos szerkezetéhez hasonlít. Ezt követően kiválasztja a legnagyobb valószínűséggel felvett térszerkezetet. A kapott *Cpar2_303700* protein harmadlagos szerkezetet ezt követően összehasonlítottuk a *S. cerevisiae* *Cgi121* térszerkezetével, ami egyben az adatbázis által ajánlott legjobb találatot adó fehérje is volt. A térszerkezetek egymásra illesztéséhez az UCSF Chimera nevű szoftvert (Pettersen és mtsi., 2004) alkalmaztuk. Az illesztés alapján a két aminosav szekvenciát tekintve ismételen 30% körüli (30,34%) teljes azonosságot kaptunk (32/A. ábra). A kapott vizualizált térszerkezetek egymásra illesztését követően arra a következtetésre jutottunk, hogy a *Cpar2_303700* és a *S. cerevisiae* *Cgi121* fehérjék bár nem mutatnak 100%-os átfedettséget, térszerkezetük nagymértékben hasonlít (32/B. ábra). A különbségek a másodlagos szerkezeti elemek mennyiségében történő eltérésekből adódnak, ami alapján elmondható, hogy a *CPAR2_303700* által kódolt fehérje 1 béta-lemezzel, illetve 2 hurok régióval kevesebbel rendelkezik, mint a *S. cerevisiae* *Cgi121* protein (5. táblázat). Különböző fehérjék térszerkezetének összehasonlításakor gyakran használják az ún. RMSD (root mean square deviation - atomok közötti távolságok négyzetes közepe) értéket, ami a fehérjék azonos elhelyezkedésű egyes atomjai (leggyakrabban a vázat alkotó alfa szénatomok) közötti távolságot jelzi (Carugo és Pongor 2001). Minél kisebb az RMSD értéke (általában <2 Å (angström)), annál nagyobb a két fehérje szerkezete közötti hasonlóság. Amennyiben ez az érték a nullával egyenlő teljes azonosságot feltételezhetünk (Carugo és Pongor 2001). A *Cpar2_303700* és a *Cgi121* összehasonlítása során a két fehérje azonos értékű szénatomjai

között $0,61 \pm 0,04$ Å RMSD értéket (távolságot) kaptunk, ami további bizonyítékként szolgál az azok közötti hasonlóságra.

A



B



32. ábra. A Cpar2_303700 és a *S. cerevisiae* Cgi121 fehérjék szekvencia illesztése és térszerkezete.

A: Szekvencia illesztés a Cpar2_303700 és a ScCgi121 fehérjék aminosav szekvenciáit használva. Jelölések: Pirossal kiemelt aminosavak - szekvencia azonosság a két elsődleges szekvencia között. Zöld háttér: β -lemez konformáció, sárga háttér: α -hélix szerkezet, piros háttér: hurok régió.

B: Az ábrán a CPAR2_303700 által kódolt hipotetikus fehérje prediktált szerkezete (piros modell), valamint a *S. cerevisiae* CGI121 által meghatározott protein ismert térszerkezete (kék modell) látható

egyenként, illetve a fehérjék egymásra illesztését követően (UCSF Chimera szoftver). Méretskála: 10 angström.

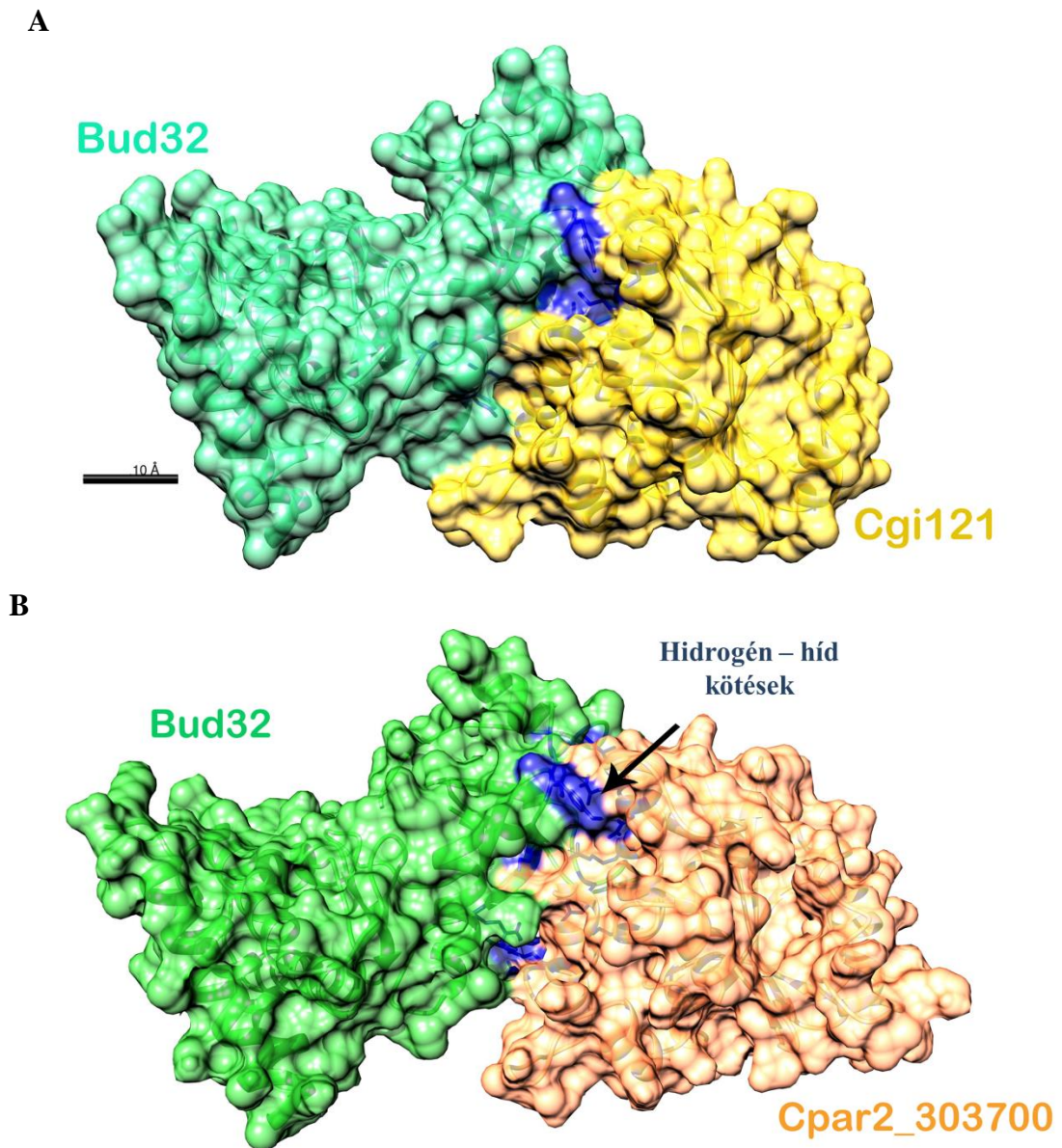
5. táblázat. A *S. cerevisiae* Cgi121 és a *C. parapsilosis* Cpar2_303700 fehérjék másodlagos szerkezeti elemei.

	<i>S. cerevisiae</i> Cgi121	<i>C. parapsilosis</i> Cpar2_303700
α-hélix	9 db	9 db
β-lemez	5 db	4 db
hurok	15 db	13 db

S. cerevisiae-ben korábban megfigyelték, hogy a Cgi121 a SAGA komplex egy másik alegységével, a Bud32 fehérjével szoros kölcsönhatásban áll (Ho és mtsi., 2002; Downey és mtsi., 2006) (33/A. ábra).

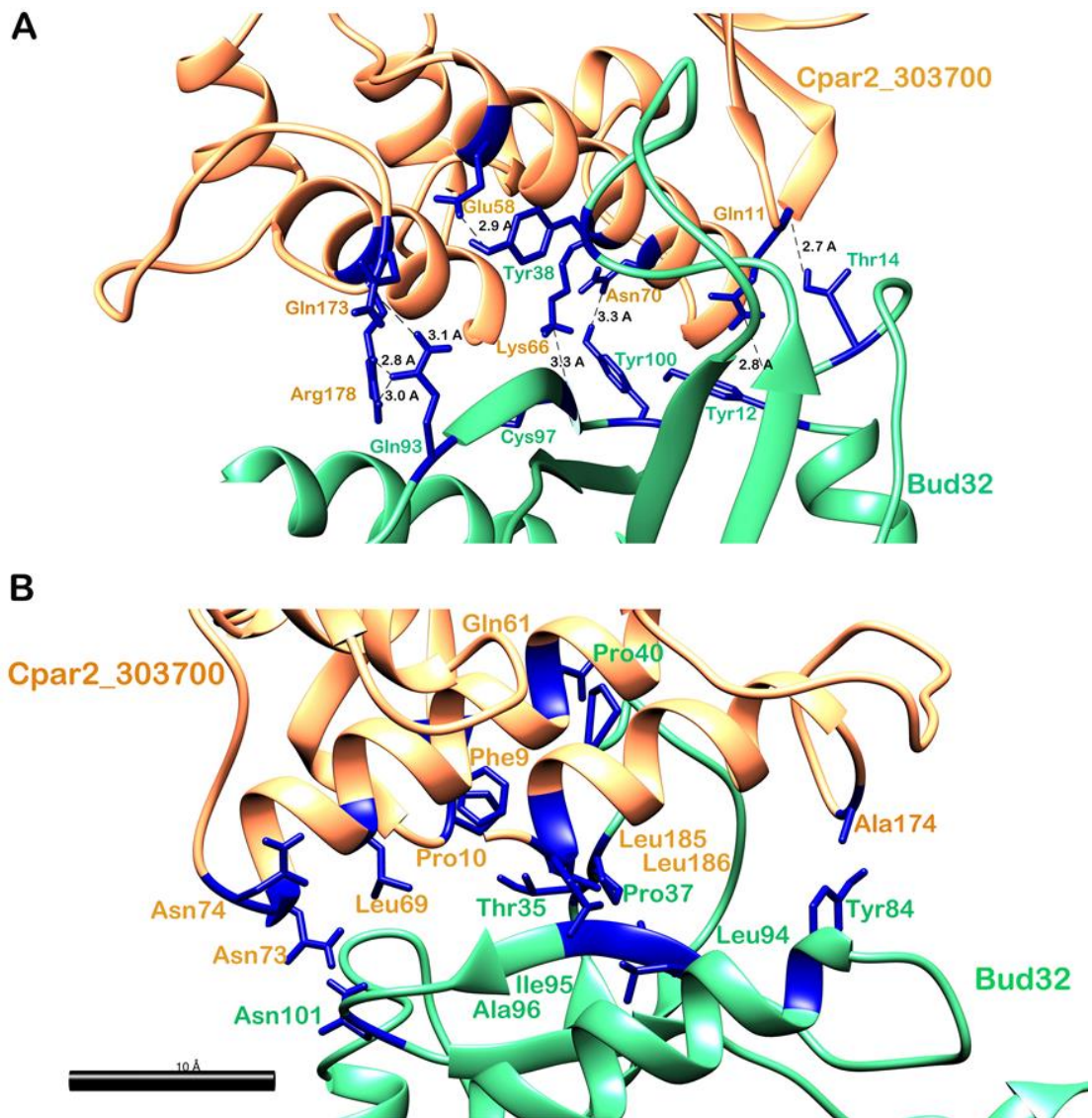
A továbbiakban azt vizsgáltuk, hogy az általunk azonosított Cpar2_303700 a Cgi121-hez hasonlóan képes-e a Bud32 alegységgel kölcsönhatásba kerülni (33. ábra). Ehhez a HADDOCK szervert (de Vries és mtsi., 2010) használtuk, ami különböző molekulák (fehérje-ligand, fehérje-fehérje) egymással történő potenciális érintkezéseinek modellezését végzi (de Vries és mtsi., 2010). A szerver maximum 200 felvehető konformáció vizsgálatát végzi és megjósolja a lehetséges kölcsönhatásokat. Az *in silico* adatelemzéseket követően két fő paramétert emeltünk ki, amelyek a különböző fehérjék közötti kölcsönhatás leírására alkalmasak. Ezek közé tartozik a már korábban említett RMSD érték, illetve a komplex stabilitásához szükséges kötődési energia. Fehérje-fehérje kölcsönhatás vizsgálata során minél kisebb az RMSD értéke, annál nagyobb valószínűséggel valósul meg interakció (Carugo és Pongor 2001). Két különböző fehérje közötti kölcsönhatás abban az esetben stabil, ha annak fenntartásához minimális energia szükséges. Ezt az energiát kötődési energiának nevezzük, amely egymással stabilan kötődő molekulák esetén negatív értékkel jellemezhető (Bronowska 2011). A HADDOCK által elvégzett *in silico* adatelemzések alapján a Cpar2_303700 és a Bud32 fehérjék vizsgálata során – a legnagyobb valószínűséggel felvett konformáció esetén – számított RMSD értéke $0,4 \pm 0,2$ Å, míg a fehérjék között kötődési energia értéke $-7597,67$ kcal/mol volt, amely adatok szoros interakcióra utalnak. A Cpar2_303700 és Bud32 alegységek közötti kölcsönhatást a 33/B. és a 34. ábrák szemléltetik. A két molekula közötti szoros kapcsolatot a 7 hidrogénhid kötés jelenléte is alátámasztja (az atomok közötti távolság $<3,5$ Å, 34/A. ábra), amelyet számos hidrofób alegység (8 a Bud32 molekula esetén és további 9 a Cpar_303700 esetén, 34/B. ábra) jelenléte is stabilizál.

Az így kapott *in silico* adatok alapján azt feltételezhetjük, hogy a Cpar2_303700 a *S. cerevisiae*-ben azonosított Cgi121 fehérje *C. parapsilosis* megfelelője lehet.



33. ábra. A *C. parapsilosis* Cpar2_303700, *S. cerevisiae* Cgi121 és a *S. cerevisiae* Bud32 fehérjék közötti kölcsönhatás.

Az ábrán (A) a *S. cerevisiae* Cgi121 (sárga) és Bud32 (zöld) fehérjék, illetve (B) a HADDOCK szerver által jósolt *C. parapsilosis* Cpar2_303700 (piros) és *S. cerevisiae* Bud32 (zöld) fehérjék közötti kölcsönhatások láthatóak. A kölcsönhatás kialakításában szerepet játszó hidrogénhid kötések kék színnel ábrázoltuk. Méretskála: 10 angström.



34. ábra. A *C. parapsilosis* Cpar2_303700 és a *S. cerevisiae* Bud32 fehérjék közötti hidrogénhíd és hidrofób kölcsönhatások.

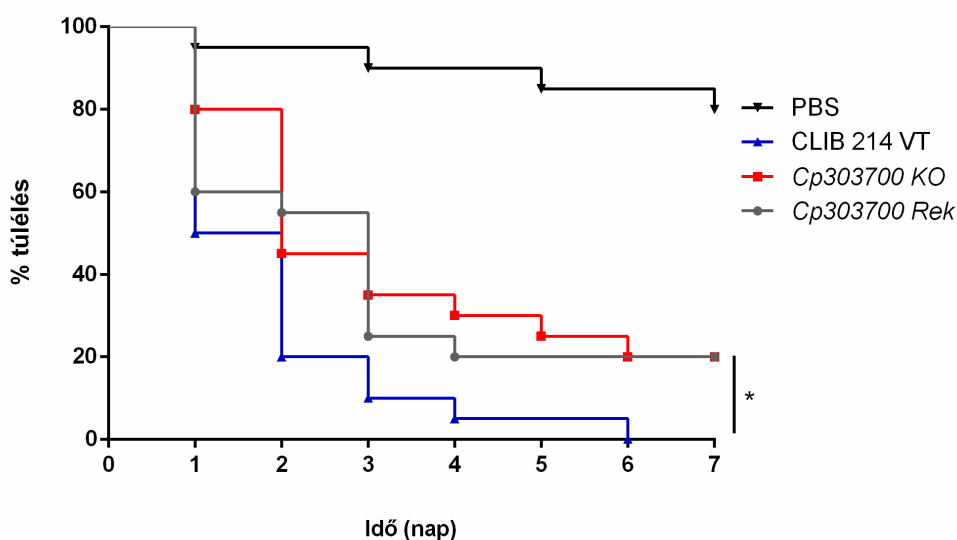
A: Az ábrán a Cpar2_303700 (piros) és Bud32 (zöld) proteinek aminosavai között kialakult hidrogénhidak (kék) és az azok közötti távolságok láthatóak. **B:** A képen a hidrogénhíd kötések közelében kialakult stabilizáló hidrofób alegységek láthatóak (kék). Méretskála: 10 angström.

6.4.4.3. A *CPAR2_303700* Δ/Δ mutáns törzs *in vivo* virulencia vizsgálata

Bár a *Cpar2_303700* fehérje szerkezeti analízisének eredménye önmagában nem ad információt a protein funkciójáról, az feltételezhető, hogy a fehérje a *S. cerevisiae* Cgi121-hez hasonló protein, így szintén a KEOPS/EKC komplex tagja lehet.

Egy új tanulmány szerint, *A. nidulans*-ban a KEOPS/EKC komplex egyik tagja több olyan különböző metabolikus útvonal szabályozásában is részt vesz (Dzikowska és mtsi., 2015), amely útvonalak *Candida* fajokban összefüggésbe hozhatóak a patogenitás kialakulásával. Ezért a komplex egyes tagjai bizonyos fajok fertőzőképességét is befolyásolhatják.

Jelen kísérletünkben arra a kérdésre kerestük a választ, hogy a *CPAR2_303700* gén elvesztése önmagában befolyásolja-e a gomba fertőzőképességét. Ehhez, az eddigiekhez hasonlóan, *G. mellonella* fertőzési modellorganizmust használtunk, csoportonként 20-20 egyedeket alkalmazva. A sejtuszpenziókkal, és PBS-sel beoltott lárvák túlélését hét napon keresztül napi rendszerességgel monitoroztuk. A túlélési görbék alapján a *CPAR2_303700* Δ/Δ törzs jelentős mértékben csökkent virulenciával rendelkezett (35. ábra), tehát a *CPAR2_303700* által kódolt kináz ebben a modellrendszerben, bár ismeretlen módon, de befolyásolja a *C. parapsilosis* fertőzőképességét.



35. ábra. *Galleria mellonella* lárva túlélési görbe.

G. mellonella lárvák vad típusú, *CPAR2_303700* Δ/Δ deléciós (KO) és reintegrált (Rek) törzsekkel, valamint PBS-sel történő infekciójából származó túlélésének százalékban megadott mértéke. Szignifikancia mértéke: * $p < 0,05$.

6.4.4.4. A *C. parapsilosis* CPAR2_303700 által kódolt kináz vizsgálatából származó eredmények összefoglalása

A *C. parapsilosis* deléciós könyvtár létrehozását követően kiemelt negyedik gén a CPAR2_303700, amelyet szintén a gazda-patogén kölcsönhatást követően azonosítottunk. A THP-1-gomba interakciót követő 1 óra elteltével ezen gén esetében is emelkedett expressziót detektálunk. A CPAR2_303700 gén *C. parapsilosis* genomból történő eltávolítása a következő főbb fenotípusbeli elváltozásokat eredményezte: érzékenység az optimálistól eltérő alacsonyabb hőmérsékletekre, lassú növekedés, sima telepmorfológia és oxidatív stressz-szel szembeni szenzitivitás.

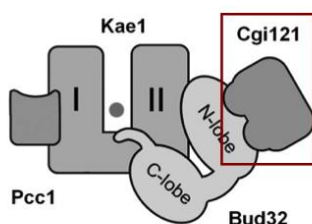
A CPAR2_303700 legközelebbi azonosított és jellemzett ortológja a *S. cerevisiae*-ben megtalálható CGI121 ORF. A Cgi121 fehérje az evolúciósan szintén konzervált KEOPS/EKC komplex egyik alegysége, amely feltehetőleg a komplex allosztérikus regulátoraként részt vesz transzkripció koaktivátor funkciókban, a telomer fenntartásban és a tRNS módosításban is (Downey és mtsi., 2006; Kisseleva-Romanova és mtsi., 2006; Srinivasan és mtsi., 2011; Perrochia és mtsi., 2013) (36. ábra). A Cgi121 KEOPS/EKC komplex által szabályozott folyamatokban betöltött pontos funkciója továbbra is kérdéses, mivel a fehérje deléciója/mutációja a többi alegységgel szemben nem befolyásolta jelentős mértékben a gombasejtek életképességét (Srinivasan és mtsi., 2011). A KEOPS/EKC komplex telomer fenntartásban játszott szerepének vizsgálata során arra a következtetésre jutottak, hogy a Cgi121 mutációja a telomer képzés rendellenességéből eredő fenotípusokat menekíti (Downey és mtsi., 2006). Ezen fenotípusok közül kiemelendő a hőszenzitivitás és a növekedési rendellenesség, de oxidatív stressz-szel szembeni érzékenységet is megfigyeltek már (Downey és mtsi., 2006; Perez-Rivero és mtsi., 2008). Esetünkben, *C. parapsilosis*-ban a CPAR2_303700 deléciója mindezen fenotípusok megjelenését okozta, ami arra utalhat, hogy a Cpar2_303700 a *S. cerevisiae* Cgi121 fehérje szerepével ellentétesen funkcionálhat.

Mivel a Cgi121 és Cpar2_303700 közötti szekvencia azonosság csupán 30% körüli, ezért további *in silico* vizsgálatokat is elvégeztünk, mely során összehasonlítottuk a két fehérje harmadlagos szerkezetét. Eredményként elmondhatjuk, hogy a fehérjék egymásra illesztését követően azok térszerkezete között nagyfokú hasonlóságot tapasztaltunk, amelyet a kapott alacsony RMSD érték is alátámasztott. *S. cerevisiae*-ben a KEOPS/EKC komplex Cgi121 és a Bud32 alegységei egymással szoros kölcsönhatásban állnak (Ho és mtsi., 2002; Downey és mtsi., 2006). Annak érdekében, hogy a Cpar2_303700 és Cgi121 fehérjék közötti azonosságot további bizonyítékokkal is alátámasszuk, *in silico* megvizsgáltuk, hogy a Cpar2_303700 képes-e a Bud32 alegységgel kölcsönhatásba kerülni. Eredményként

elmondhatjuk, hogy az általunk vizsgált fehérjék között nagy valószínűséggel létrejöhet az interakció, amelyre az alacsony RMSD érték, illetve a kötődési energia értéke egyaránt utal. Elmondható továbbá az is, hogy a struktúrák egymásra illesztése során számos hidrogénhid kötést és hidrofób kölcsönhatást is detektáltunk, amelyek jelenléte szintén alátámasztja a két szerkezet közötti interakciót. Mindezen *in silico* adatelemzések alapján azt feltételezhetjük, hogy a *C. parapsilosis*-ban azonosított Cpar2_303700 a *S. cerevisiae* Cgi121 fehérje funkcionális ortológja lehet. Azonban ennek alátámasztása érdekében a jövőben további kísérletek elvégzésére van szükség, például élesztő kéthibrid rendszer alkalmazásával vagy immunprecipitáció használatával.

Egy korábbi tanulmány alapján, *A. nidulans*-ban a KEOPS/EKC komplex összefüggésbe hozható számos metabolikus útvonal szabályozásával, például az aminosav anyagcserével és egyéb szénforrások hasznosításával, továbbá a sziderofór képzéssel és az *rcoA* (*C. albicans*-ban Tup1) globális transzkripciós regulátor szabályozásával is (Dzikowska és mtsi., 2015). Mindezen útvonalak és a Tup1 szabályozása *C. albicans*-ban összefüggésbe hozható a patogenitás szabályozásával (Lorenz és Fink 2001; Knight és mtsi., 2002; Almeida és mtsi., 2009), így feltételeztük, hogy a komplex egyes tagjai – jelen esetben a Cgi121 ortológja – bizonyos *Candida* fajok, mint például a *C. parapsilosis* fertőzőképességét is befolyásolhatják. A *CPAR2_303700* Δ/Δ deléciós mutáns törzs *G. mellonella* modellorganizmussal elvégzett virulencia vizsgálatait követően kapott csökkent virulencia adatai alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy a gén a *C. parapsilosis* fertőzőképességét jelentős mértékben befolyásolja.

KEOPS/EKC - komplex
Cgi121: allosztérikus szabályozó elem



36. ábra. A KEOPS/EKC komplex és alegységei.

A KEOPS/EKC komplex sematikus ábrája. *S. cerevisiae*-ben a Cgi121 a KEOPS/EKC komplex allosztérikus regulátora (Perrochia és mtsai. 2013).

Konklúzióként tehát elmondható, hogy az általunk azonosításra került *CPAR2_303700* gén feltehetőleg a KEOPS/EKC komplex tagjaként befolyásolja a gomba virulenciáját. Az általa kódolt protein kináz pontos funkciójának meghatározásához azonban további kísérletek elvégzésére van szükség. Tudomásunk szerint, ez az első alkalom, hogy a KEOPS/EKC komplex összefüggésbe hozható egy patogén faj fertőzőképességével.

7. Összefoglalás

Világszerte jelentős problémát jelentenek az invazív gombafertőzések okozta szisztémás megbetegedések, amelyek kezelés nélkül halállal is végződhetnek. Az invazív fertőzést kiváltó fajok közül kiemelték a *Candida* nemzetség tagjai, amelyek az opportunisták mikózisok legnagyobb hányadát okozzák. A legtöbb megbetegedést a *C. albicans* okozza, azonban más, a nemzetségbe tartozó, úgynevezett nem-*albicans Candida* fajok előfordulása is egyre gyakoribb. Ezek közül az egyik leggyakrabban előforduló faj a *C. parapsilosis*, amely a 18 év alatti gyermekek, illetve újszülöttek körében fordul elő leginkább, azonban gyakran kimutatható az intenzív osztályokon kezelt idősebb betegeknél is. Ezek fő oka, hogy a *C. parapsilosis*, a *C. albicans*-szal összehasonlítva, jobban képes szaporodni az újszülötteknek szánt magas glükóz és lipid tartalmú tápoldatokban, továbbá gyakran képez biofilmet nem megfelelően sterilizált orvosi eszközökön. Mindezen tényezők és a faj echinocandin típusú antifungális szerekkel szembeni rezisztenciája indokolják a *C. parapsilosis* fertőzőképességének megértéséhez szükséges alapkutatásokat.

Egy patogén organizmus virulenciáját elősegítő faktorainak vizsgálatára különböző molekuláris módszerek állnak rendelkezésünkre. A patogenitást befolyásoló gének azonosítása érdekében az egyik leggyakrabban használt stratégia az adott gén genomból történő eltávolítása. Ezt követően a kapott fenotípus alapján következtethetünk a kódoló régió funkciójára. Napjainkban számos laboratórium használ olyan molekuláris eszközrendszert és high-throughput technológiát, amelynek segítségével egyszerre több gén patogenezisben játszott szerepe vizsgálható.

Doktori munkám célja egy olyan deléciós mutáns könyvtár létrehozása volt, amely célzottan csak olyan géneket tartalmaz, amelyek közvetlenül összefüggésbe hozhatóak a gomba fertőzőképességének kialakításával. Korábban laboratóriumunkban azonosításra kerültek olyan gének, melyek emelkedett expressziót mutattak gazda-patogén kölcsönhatást követően. Ezen kódoló régiók mellett kiválasztásra kerültek olyan további gének is, amelyek összefüggésbe hozhatóak a gomba virulenciájával.

Az így létrehozott lista alapján - génenként 2 párhuzamossal - létrehoztunk egy 30 génre nézve homozigóta deléciós mutáns kollekción, melyet többféle szempont alapján elemeztünk. Vizsgáltuk a törzsek biofilm képző képességét, bizonyos antifungális szerekkel szembeni érzékenységét, morfológiaváltását, valamint növekedési és túlélési képességeit. Ez utóbbiak esetében a szempontok alapját olyan környezeti körülmények képezték, amelyek a gazdaszervezetben is megtalálhatóak. Többek között ilyen az alternatív energiaforrás, megváltozott kémhatású közeg, megváltozott hőmérséklet, valamint a különböző oxidatív és

egyéb stressz kondíciók jelenléte. A deléciós könyvtár széles körű jellemzését követően számos olyan gént sikerült azonosítanunk, amelyek a vizsgált kondíciók legalább egyikéhez történő adaptációban részt vehetnek. A törzsek különböző közegekben történő növekedésének vizsgálata során a mutáns kollekció közel egyharmadánál (30%), míg a stresszre adott válasz vizsgálatakor a mutáns törzsek közel felénél (47%) találtunk eltérést a referenciaként használt vad típusú törzshöz képest. Emellett az antifungális szerekkel szembeni érzékenység a vizsgált mutáns törzsek 23%-ánál változott meg, míg a pseudohifa és biofilmképzés során a törzsek 10-10%-a esetén figyeltünk meg elváltozást a vad típusú törzshöz képest.

Számos azonosított génről beigazolódott, hogy pleiotróp hatással rendelkezik, mivel azok deléciója egyszerre több különböző, egymástól független fenotípus létrejöttét eredményezte. Ezek közül a legtöbb fenotípus változással rendelkező mutáns törzset, az adott gének funkciójának pontos meghatározása érdekében, további vizsgálatoknak vetettük alá. Megjegyzendő, hogy a következő 4 kiemelt gén mindegyike közvetlenül gazda-patogén kölcsönhatást követően került azonosításra. Az interakciót követően mindegyik esetében emelkedett expressziót tapasztaltunk, amely a *CPAR2_303700* kivételével a fertőzést követő 1 és 6 óra után is fennállt.

Az invazív gombafertőzés egyik legfőbb útja a nem megfelelően sterilizált, legtöbbször invazív beavatkozásokhoz alkalmazott orvosi eszközökkel történő érintkezés. Ezek az eszközökön a gomba biofilmet képez, ami a fertőzés leggyakoribb forrása. Így a biofilmképzés főleg a fertőzés kezdeti stádiumában fontos. Ezt követően történik a gazda kolonizációja, amelyben szintén fontos szerepet játszanak a biofilmképzést szabályozó gének. *C. parapsilosis*-ban már számos ilyen gén azonosításra került, azonban a teljes folyamat még mindig nem ismert. A munkánk során azonosított *CPAR2_602840* ORF a gomba biofilmképzését szintén szabályozhatja, mivel hiányában a deléciós törzs esetén hatékonyabb biofilmképzést figyelhettünk meg, mint a vad típusú törzs esetében. További vizsgálataink alapján kiderült, hogy valamennyi eddig ismert biofilmképzést szabályozó gén expressziója is megváltozott, ami arra utalt, hogy a *CPAR2_602840* a biofilmképzés egy globális szabályozó eleme lehet. A gomba biofilmképzésében szerepet játszik továbbá a *CPAR2_200390* által kódolt transzkripciós faktor is.

Egy gombafertőzés során a gazda szövetein történő áthatolásban jelentős szerepet játszik a gombasejtek morfológia váltása. A fonalszerű növekedési forma jelentős mértékben hozzájárul a gazda szöveteinek károsításához és a mélyre hatoló szöveti fertőzések kialakulásához. A morfológia váltás továbbá elősegíti a gombasejtek fagocita sejtekből történő kiszabadulását is. A munkánk során azonosított *CPAR2_200390* ORF a fonalszerű

növekedés egyik fontos meghatározója lehet, mivel hiányában hiperfilamentáló fenotípus jött létre.

Kórházi közegben, a fertőzött katéterekkel érintkező betegek esetében a gomba a véráramba kerül. A patogén a vérben szabadon hozzáférhető glükóz molekulák hasznosítására képes. Azonban a vérből szöveti környezetbe kerülve csupán alternatív energiaforrások állnak a rendelkezésére. Ezek közé tartoznak például az aminosavak, proteinek és a lipidek. Ilyen környezetben fontos az alternatív energiaforrások hasznosítására specializálódott metabolikus útvonalak aktivációja. A legtöbb ilyen folyamat energiaigényes, amelyben a mitokondriális légzési láncnak fontos szerepe lehet. Ezen útvonalak megváltoztatásán keresztül képes a gomba alkalmazkodni a glükóztól eltérő szénforrások hasznosítására. Az általunk azonosított *CPAR2_100540* feltehetőleg ezen folyamatok egyikében vehet részt, mivel a létrehozott deléciós törzs alternatív szénforrások hasznosítására képtelen és bizonyos citokróm fehérjék (*CYCI* és *COX4*) expresszióját is szabályozza.

Bizonyos nyomelemek, mivel számos fehérje és enzim megfelelő működését biztosítják, kis mennyiségben ugyan, de esszenciálisak minden élő organizmus túléléséhez. Mivel a gazdaszervezetben kevés nyomelem található és azok elérhetősége is korlátozott, ezért a fertőzés során folyamatos a patogén és a gazdaszervezet ezekért folytatott kompetíciója. A gazdában található vas nyomelemek általában nagy affinitású fehérjékhez kötött állapotban találhatóak meg. Ennek megszerzése érdekében a patogén gomba sejt felszíni vasreduktázait használja. Az általunk azonosított *CPAR2_100540* nem csupán a *C. parapsilosis* alternatív szénforrás hasznosításában vesz részt, hanem ezen vasreduktázok egyikét (*FRP1*) is aktívan szabályozza, mivel a gén hiányában, korlátozott vastartalmú közegekben, a deléciós törzs életképtelen.

Gombafertőzések esetén a gazdaszervezet fagocitáló sejtjei receptoraik segítségével (mintázatfelismerő receptorok) ismerik fel a patogén gomba sejt falának bizonyos elemeit (patogén asszociálta molekuláris mintázatokat). Ez a kölcsönhatás nagymértékben meghatározza a patogén felismerését és a továbbiakban az eltávolítás hatékonyságát is. A gomba sejt fal összetétele tehát fontos meghatározó tényező a gazda-patogén interakciók során. Munkánk során bizonyítottuk, hogy a *C. parapsilosis* sejt fal összetételének meghatározásában a *CPAR2_200390* és a *CPAR2_602840* ORF is fontos szereppel rendelkezik, mivel hiányuk esetén megváltozik a sejt fal kitin (*CPAR2_200390*) és mannóz tartalma (*CPAR2_602840*) is.

Fagocitózist követően a gazda elsősorban reaktív oxigén gyökökkel védekezik a gombasejtek ellen. Az ezzel szembeni adaptáció elengedhetetlen ahhoz, hogy tartós fertőzés

jöjjön létre. Eredményeink szerint, az oxidatív stressz-szel szembeni védekezésben a *CPAR2_303700* és a *CPAR2_100540* gének is részt vehetnek.

A patogén *Candida* fajok életképességét és szaporodását nagymértékben befolyásolja az, hogy milyen gyorsan képesek alkalmazkodni a gazdaszervezetben uralkodó környezeti körülményekhez, például a megváltozott hőmérséklethez. A munkánk során azonosított gének egyike, a *CPAR2_303700* ORF feltehetőleg a megváltozott hőmérséklethez történő alkalmazkodás révén is befolyásolhatja a *C. parapsilosis* virulenciáját.

Az egyes törzsek *G. mellonella* alkalmazásával elvégzett *in vivo* virulencia vizsgálatait követően bebizonyítottuk, hogy a *CPAR2_100540*, *CPAR2_200390*, *CPAR2_303700* és *CPAR2_602840* gének mindegyike szerepet játszik a gomba fertőzőképességében.

Megjegyzendő, hogy a jelen dolgozatban kiemelt törzsek esetében további virulencia vizsgálatok elvégzésére is sor került, amelyekről elmondható, hogy a *CPAR2_100540 Δ/Δ*, *CPAR2_200390 Δ/Δ*, *CPAR2_303700 Δ/Δ* és *CPAR2_602840 Δ/Δ* deléciós törzsek esetén 8 hetes nőstény BALB/c egerek használata során is csökkent fertőzőképességet tapasztaltunk. Mivel azonban ezeket az *in vivo* kísérleteket Dr. Vitor Cabral végezte, az adatok nem képezik jelen dolgozat tárgyát.

Összegzésként a következő eredmények eléréséről számolhatunk be:

Jelen tanulmány során sikeresen létrehoztunk egy 30 génre nézve deléciós mutáns könyvtárat. Ezt követően, a kollekció különböző szempontok szerinti elemzése után, számos olyan *C. parapsilosis* gént sikerült azonosítanunk, amely a gomba biofilmképzését, antifungális szerekkel szembeni érzékenységet, életképességét és a gazdaszervezet niche-jét reprezentáló környezethez történő adaptációját valamilyen módon befolyásolhatja. A kollekció széles körű vizsgálatát követően meghatározásra került 4 olyan gén pontos funkciója is, amelyek kifejezetten a gazda-patogén kölcsönhatást követően aktiválódtak. Ezek közé tartozik egy vasháztartást és alternatív szénforrás hasznosítást szabályozó gén (*CPAR2_100540*), egy morfológia váltást és sejtfal homeosztázist fenntartó gén (*CPAR2_200390*), egy további kódoló régió, amely a gomba biofilmképzését és szintén a sejtfal összetételt szabályozza (*CPAR2_602840*), illetve egy legfőképpen hőérzékenységet szabályozó ORF (*CPAR2_303700*) is. Mindezek virulenciában betöltött szerepét is igazoltuk *G. mellonella* modellorganizmus alkalmazásával. A jövőben az általunk azonosított faktorok újabb, célzott antifungális terápiás hatóanyagok alapját képezhetik.

8. Summary

Since the end of the last century, the frequency of human disease caused by fungi species is emerging. Individuals at risk include immunocompromised patients, for example those having AIDS, malignant tumor or undergone surgical procedures and are under constant medical care. Fungal infections caused by *Candida* species are of increasing concern, as the members of this genus are among the leading causes of opportunistic systemic mycoses.

Invasive candidiasis caused by non-*albicans* *Candida* species such as *Candida parapsilosis* is of rising concern. Prevalence of this NAC species is dependent on age, geographical area, and patient history. Horizontal transmission and biofilm formation on medical devices are the major characteristics of *C. parapsilosis* that is also frequently associated with invasive bloodstream infection of children and low birth-weight neonates. Another unique property of *C. parapsilosis* clinical isolates is their resistance to echinocandin-class antifungal drugs. Notable, mortality rate is associated with cases when patients with invasive candidiasis fail to respond to such antifungal therapeutics. All of these features increase the urge to investigate the underlying mechanisms and key regulatory factors that contribute to the virulence of this species.

In order to examine the virulence promoting factors of pathogenic species, a wide range of molecular tools can be applied. One such strategy is targeted gene deletion from the genome of fungi. In our previous work, several fungal genes were identified using RNA-Seq data, that were overexpressed during host-pathogen interaction. Using these genes we created a list, that we later expanded with additional, previously uncharacterized, but possibly also virulence related *C. parapsilosis* ORFs. To investigate their functions, we generated a knock-out library of 30 members, including genes mainly involved in regulatory mechanisms, such as kinases and transcriptional factors. Fusion PCR method was applied to generate gene specific deletion constructions and auxotrophy complementation was used for the null mutant preparation. All homozygous deletion mutant strains were tested under a variety of conditions such as growth abilities on different temperatures and media, along with survival in the presence of various stressors. Biofilm formation of each of the strains and resistance to antifungal drugs was also examined.

During the characterization process, approximately one-third of the total mutant strains showed mild or severe growth defect when grown on different media, and almost half of the tested strains displayed an altered phenotype under oxidative, cell wall or other

stress conditions when compared to the wild type. Furthermore, 10% of the collection showed filamentous growth defect and another 10% displayed a defective biofilm forming phenotype. Deletion of several of the identified genes lead to multiple disfunctions, referring to their pleiotropic effect.

Among the tested mutant strains we highlighted four that showed an alarmingly altered phenotype. It is noteworthy to mention that, in the case of all four genes, we detected elevated expression directly following host-pathogen interaction.

Null mutant strain of the 'CPAR2_100540' ORF (functional ortholog of *HAP5* in *C. albicans*) displayed smooth colony morphology and sensitivity to oxidative stress, furthermore, growth deficiency on alcalic medium (pH8), under iron limited conditions, and also in the presence of aminoacids or lactate as alternative carbon sources. Further examinations lead us to the conclusion, that the Cpar2_100540 transcription factor is involved in two major procedures. Firstly, the iron uptake mechanism of the fungus, via the regulation of the ferric reductase gene *FRP1*, both under iron limited and in alkaline environmental conditions. Secondly, the alternative carbon source utilization, via the regulation of the *CYC1* and *COX4* cytochrome protein encoding genes in the respiratory chain. Using the *Galleria mellonella* larvae infection model, the *CPAR2_100540* Δ/Δ mutant strain also showed decreased virulence.

Homozygous deletion strain of 'CPAR2_200390' ORF (functional ortholog of *SPT3* in *C. albicans*) appeared to form long, aggregating pseudohyphae rapidly regardless of the conditions used, displayed crepe colony morphology, growth defect, and also resistance to the cell wall stressor calcofluor white. Further examinations revealed elevated chitin content of the cell wall, possibly as the result of altered chitinase (*CHT1-4*) and chitin synthase (*CHS1-3*, *CHS8*) activities. All of our obtained results suggested that *CPAR2_200390* is involved in the regulation of morphogenesis and is required for the cell wall homeostasis of *C. parapsilosis*. According to the *G. mellonella* infection results, Cpar2_200390 is also required for virulence.

Deletion of the 'CPAR2_602840' ORF (closest characterized ortholog of *S. cerevisiae* *TFB4*) resulted in a hyper-biofilm forming phenotype, growth defect, increased mannose levels in the cell wall and resistance to the cell wall stressor calcofluor white and congo red. Later examinations revealed that 8 different *C. parapsilosis* biofilm promoting factors are upregulated in the *CPAR2_602840* Δ/Δ deletion mutant strain. These observations lead us to the conclusion that Cpar2_602840 acts as a master regulator of biofilm formation in this species, and similarly to Cpar2_200390, also contributes to the

cell wall assembly. Furthermore, infection studies with *G. mellonella* also suggested the involvement of Cpar2_602840 in *C. parapsilosis* virulence.

Elimination of *CPAR2_303700* (closest characterized ortholog of *S. cerevisiae* *CGI121*) from the genome of *C. parapsilosis* lead to temperature and oxidative stress sensitivity, smooth colony morphology and growth defect. Using *G. mellonella* larvae, the null mutant strain also showed attenuated virulence. *S. cerevisiae* *CGI121*, as part of the highly conserved KEOPS/EKC complex, is involved in telomer maintenance, tRNA modification, and also has transcriptional co-activator functions. When studying telomer maintenance, strains of *S. cerevisiae* lacking *CGI121* were reported to rescue defective phenotypes including termosensitivity, oxidative stress sensitivity and growth defects, thus the opposite of our observations. Our further examinations revealed that Cpar2_303700 and Cgi121 show high resemblance in configuration, suggesting functional similarity between the two proteins. This may lead us to the conclusion that, either the function of Cgi121 in *C. parapsilosis* had a different way of evolution, or its expression is regulated in a different manner. In order to reveal the exact function of Cpar2_303700 in *C. parapsilosis* and its virulence, further investigations are required.

Taken together, in this study, we have successfully established a knock-out library for 30 previously selected, potentially virulence related *C. parapsilosis* genes. During the general characterization of the generated null mutant strains, we have identified several ORFs that are involved in the morphogenesis, biofilm forming ability and antifungal susceptibility of the fungus. Furthermore, several genes are also suggested to play a role in adaption to a wide range of host niche representative environmental conditions. Following the large-scale screen, we have revealed the exact function of four different genes, that showed elevated expression, shortly following host-pathogen interaction, thus referring to their direct role in *C. parapsilosis* pathogenesis. We have identified an iron acquisition regulatory and alternative carbon source utilization related transcriptional factor encoding gene (*CPAR2_100540*), a morphogenesis and cell wall homeostasis regulatory ORF (*CPAR2_200390*), a key biofilm regulatory factor coding ORF, that is also required for cell wall homeostasis (*CPAR2_602840*) and another gene mainly involved in temperature sensory mechanisms (*CPAR2_303700*). We also confirmed their roles in the virulence of *C. parapsilosis* using *G. mellonella* model organism.

In the future, the above identified genes may be potential new targets for a novel class of drugs during development.

9. Köszönetnyilvánítás

Elsősorban köszönettel tartozom **Prof. Dr. Vágvölgyi Csabának**, a Szegedi Tudományegyetem, Természettudományi és Informatikai Kar, Mikrobiológiai Tanszék vezetőjének, amiért lehetővé tette, hogy szakdolgozói éveim után PhD munkámat is a tanszéken végezzem.

Kifejezhetetlen mértékű hálával tartozom témavezetőmnek, **Dr. Gácsér Attilának** útmutatásaiért, tanácsaiért és támogatásáért, de legfőképpen azért, hogy az elmúlt években az általa létrehozott, nemzetközileg is elismert, magas színvonalú kutatócsoport tagja lehettem.

Külön köszönöm Dr. **Grózer Zsuzsannának**, aki a kezdetektől fogva mellettem állt és akinek a laboratóriumi alapismereteimet is köszönhetem, **Dr. Németh Tibornak**, akihez bármikor segítségért fordulhattam, továbbá **Dr. Tóth Adélnak** és **Dr. Horváth Péternek**, a kezdetekben nyújtott segítségükért.

Hálás köszönet továbbá valamennyi szakdolgozónak, akik hozzájárultak a projekt elvégzéséhez, külön kiemelve **Bohner Flórát** és **Homolya Mónikát**. Hálásan köszönöm **Papp Csaba** PhD hallgatónak a mikroszkópozásban és antifungális tesztelésekben nyújtott segítségét.

Köszönöm továbbá **Szenzenstein Juditnak**, **Zajta Eriknek**, **Csonka Katalinnak**, **Luis Antonio Pérez García-nak**, **Papp Henriettának**, **Molnár Gergőnek**, **Kocsis Katicának**, **Drabbant Gergőnek**, **Bernátsky Reginának**, **Balla Benediktának**, **Takács Tamásnak**, **Pintér Lillának**, **Ébert Attilának**, **Tóth Alexandrának**, **Tanmoy Chakraborty-nak**, és **Dhirendra K. Singh-nak** a csapatmunkát, továbbá **Dr. Hamari Zsuzsannának**, **Bokor Eszternek** és **Ámon Juditnak** is a labor kellemes légkörét. Köszönetet szeretnék mondani továbbá **Dr. Kocsubé Sándornak** a hőterképek megszerkesztésében és **Chetna Tyagi-nak** az *in silico* adatelemzésekben nyújtott segítségéért.

Habár az együtt végzett kollaboráció eredményei nem szerepelnek jelen kutatási projektben, mégis szeretném megköszönni **Prof. Lars Peter Erwig-nek**, amiért PhD éveim alatt négy hónapot tölthettem el az Aberdeen Fungal Group egyik kutatócsoportjában. Az itt szerzett tapasztalatok is jelentős mértékben hozzájárultak szakmai tudásom gyarapításához.

Köszönetet szeretnék mondani továbbá **Lele Máriának** és **Deákné Kulcsár Melindának** a sok technikai segítségért; **Dr. Palágyi Andrásnének**, **Kreisch**

Istvánnénak, Szőnyi Jánosnénak és Lengyel Boglárkának a munkámmal kapcsolatos gazdasági ügyek intézéséért; valamint a Mikrobiológiai Tanszék valamennyi dolgozójának segítőkészségükért.

A legtöbb köszönet azonban a **Szüleimet** és a **Családomat** illeti, akik mindvégig szeretetteljesen támogattak, bíztattak és egész életemben önzetlenül mellettem álltak. Szívből remélem, hogy az ilyen jellegű, visszafizethetetlen mennyiségű törődéssel a világon minden ember legalább egyszer szembesül. Köszönöm **Nagyszüleimnek**, hogy bár ezt a pillanatot nem élhették meg, életük során sosem kételkedtek bennem és mindig támogattak.

Köszönöm továbbá barátaimnak és azoknak, akik a végsőkig kitartottak mellettem és megtalálták a módját annak, hogy támogassanak az időnként rögös úton.

Jelene kutatás megvalósítása a GINOP-2.3.2.-15-2016-00015 és a GINOP-2.3.3-15-2016-00006 azonosító számú kiemelt projektek keretében zajlott.

10. Irodalomjegyzék

Almeida, R. S., Brunke, S., Albrecht, A., Thewes, S., Laue, M. és mtsi. (2008). "The hyphal-associated adhesin and invasin Als3 of *Candida albicans* mediates iron acquisition from host ferritin." *PLoS Pathog* **4**(11): e1000217.

Almeida, R. S., Wilson, D. és Hube, B. (2009). "*Candida albicans* iron acquisition within the host." *FEMS Yeast Res* **9**(7): 1000-1012.

Amici, G., Grandesso, S., Mottola, A., Virga, G., Calconi, G. és mtsi. (1994). "Fungal peritonitis in peritoneal dialysis: critical review of six cases." *Adv Perit Dial* **10**: 169-173.

Atanassov, B. S., Evrard, Y. A., Multani, A. S., Zhang, Z., Tora, L. és mtsi. (2009). "Gcn5 and SAGA regulate shelterin protein turnover and telomere maintenance." *Mol Cell* **35**(3): 352-364.

Baek, Y. U., Li, M. és Davis, D. A. (2008). "*Candida albicans* ferric reductases are differentially regulated in response to distinct forms of iron limitation by the Rim101 and CBF transcription factors." *Eukaryot Cell* **7**(7): 1168-1179.

Bain, J. M., Lewis, L. E., Okai, B., Quinn, J., Gow, N. A. és mtsi. (2012). "Non-lytic expulsion/exocytosis of *Candida albicans* from macrophages." *Fungal Genet Biol* **49**(9): 677-678.

Ballot, D. E., Bosman, N., Nana, T., Ramdin, T. és Cooper, P. A. (2013). "Background changing patterns of neonatal fungal sepsis in a developing country." *J Trop Pediatr* **59**(6): 460-464.

Barelle, C. J., Priest, C. L., Maccallum, D. M., Gow, N. A., Odds, F. C. és mtsi. (2006). "Niche-specific regulation of central metabolic pathways in a fungal pathogen." *Cell Microbiol* **8**(6): 961-971.

Barrales, R. R., Jimenez, J. és Ibeas, J. I. (2008). "Identification of novel activation mechanisms for FLO11 regulation in *Saccharomyces cerevisiae*." *Genetics* **178**(1): 145-156.

Barrett-Bee, K., Hayes, Y., Wilson, R. G. és Ryley, J. F. (1985). "A comparison of phospholipase activity, cellular adherence and pathogenicity of yeasts." *J Gen Microbiol* **131**(5): 1217-1221.

Barwell, K. J., Boysen, J. H., Xu, W. és Mitchell, A. P. (2005). "Relationship of DFG16 to the Rim101p pH response pathway in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*." *Eukaryot Cell* **4**(5): 890-899.

Bennett, R. J. és Johnson, A. D. (2005). "Mating in *Candida albicans* and the search for a sexual cycle." *Annu Rev Microbiol* **59**: 233-255.

Bensen, E. S., Martin, S. J., Li, M., Berman, J. és Davis, D. A. (2004). "Transcriptional profiling in *Candida albicans* reveals new adaptive responses to extracellular pH and functions for Rim101p." *Mol Microbiol* **54**(5): 1335-1351.

Bertini, A., De Bernardis, F., Hensgens, L. A., Sandini, S., Senesi, S. és mtsi. (2013). "Comparison of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* adhesive properties and pathogenicity." *Int J Med Microbiol* **303**(2): 98-103.

Bertini, A., Zoppo, M., Lombardi, L., Rizzato, C., De Carolis, E. és mtsi. (2016). "Targeted gene disruption in *Candida parapsilosis* demonstrates a role for CPAR2_404800 in adhesion to a biotic surface and in a murine model of ascending urinary tract infection." *Virulence* **7**(2): 85-97.

Bhaumik, S. R. és Green, M. R. (2002). "Differential requirement of SAGA components for recruitment of TATA-box-binding protein to promoters in vivo." *Mol Cell Biol* **22**(21): 7365-7371.

Biswas, S., Van Dijck, P. és Datta, A. (2007). "Environmental sensing and signal transduction pathways regulating morphopathogenic determinants of *Candida albicans*." *Microbiol Mol Biol Rev* **71**(2): 348-376.

Boisnard, S., Ruprich-Robert, G., Florent, M., Da Silva, B., Chapeland-Leclerc, F. és mtsi. (2008). "Role of Sho1p adaptor in the pseudohyphal development, drugs sensitivity, osmotolerance and oxidant stress adaptation in the opportunistic yeast *Candida lusitanae*." *Yeast* **25**(11): 849-859.

Braun, B. R. és Johnson, A. D. (1997). "Control of filament formation in *Candida albicans* by the transcriptional repressor TUP1." *Science* **277**(5322): 105-109.

Braun, B. R., Kadosh, D. és Johnson, A. D. (2001). "NRG1, a repressor of filamentous growth in *C. albicans*, is down-regulated during filament induction." *EMBO J* **20**(17): 4753-4761.

Bronowska, A. K. (2011). "Thermodynamics of Ligand-Protein Interactions: Implications for Molecular Design, Thermodynamics - Interaction Studies - Solids, Liquids and Gases." InTech, Science, Technology and Medicine open access publisher.

Brown, A. J., Brown, G. D., Netea, M. G. és Gow, N. A. (2014). "Metabolism impacts upon *Candida* immunogenicity and pathogenicity at multiple levels." *Trends Microbiol* **22**(11): 614-622.

Brown, A. J. és Gow, N. A. (1999). "Regulatory networks controlling *Candida albicans* morphogenesis." *Trends Microbiol* **7**(8): 333-338.

Brown, G. D., Denning, D. W., Gow, N. A., Levitz, S. M., Netea, M. G. és mtsi. (2012). "Hidden killers: human fungal infections." *Sci Transl Med* **4**(165): 165rv113.

Brownell, J. E., Zhou, J., Ranalli, T., Kobayashi, R., Edmondson, D. G. és mtsi. (1996). "Tetrahymena histone acetyltransferase A: a homolog to yeast Gcn5p linking histone acetylation to gene activation." *Cell* **84**(6): 843-851.

Brunel, L., Neugnot, V., Landucci, L., Boze, H., Moulin, G. és mtsi. (2004). "High-level expression of *Candida parapsilosis* lipase/acyltransferase in *Pichia pastoris*." *J Biotechnol* **111**(1): 41-50.

Buschlen, S., Amillet, J. M., Guiard, B., Fournier, A., Marcireau, C. és mtsi. (2003). "The *S. Cerevisiae* HAP complex, a key regulator of mitochondrial function, coordinates nuclear and mitochondrial gene expression." *Comp Funct Genomics* **4**(1): 37-46.

Butler, G., Rasmussen, M. D., Lin, M. F., Santos, M. A., Sakthikumar, S. és mtsi. (2009). "Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight *Candida* genomes." *Nature* **459**(7247): 657-662.

Buu, L. M. és Chen, Y. C. (2013). "Sap6, a secreted aspartyl proteinase, participates in maintenance the cell surface integrity of *Candida albicans*." *J Biomed Sci* **20**: 101.

Cabral, V., Chauvel, M., Firon, A., Legrand, M., Neseir, A. és mtsi. (2012). "Modular gene over-expression strategies for *Candida albicans*." *Methods Mol Biol* **845**: 227-244.

Carlisle, P. L., Banerjee, M., Lazzell, A., Monteagudo, C., Lopez-Ribot, J. L. és mtsi. (2009). "Expression levels of a filament-specific transcriptional regulator are sufficient to determine *Candida albicans* morphology and virulence." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(2): 599-604.

Carr, P. L., Felsenstein, D. és Friedman, R. H. (1998). "Evaluation and management of vaginitis." *J Gen Intern Med* **13**(5): 335-346.

Carugo, O. és Pongor, S. (2001). "A normalized root-mean-square distance for comparing protein three-dimensional structures." *Protein Sci* **10**(7): 1470-1473.

Casadevall, A. (2007). "Determinants of virulence in the pathogenic fungi." *Fungal Biol Rev* **21**(4): 130-132.

- Citiulo, F., Jacobsen, I. D., Miramon, P., Schild, L., Brunke, S. és mtsi. (2012). "*Candida albicans* scavenges host zinc via Pra1 during endothelial invasion." *PLoS Pathog* **8**(6): e1002777.
- Compe, E. és Egly, J. M. (2012). "TFIIH: when transcription met DNA repair." *Nat Rev Mol Cell Biol* **13**(6): 343-354.
- Connolly, L. A., Riccombeni, A., Grozer, Z., Holland, L. M., Lynch, D. B. és mtsi. (2013). "The APSES transcription factor Efg1 is a global regulator that controls morphogenesis and biofilm formation in *Candida parapsilosis*." *Mol Microbiol* **90**(1): 36-53.
- Coustry, F., Maity, S. N., Sinha, S. és De Crombrughe, B. (1996). "The transcriptional activity of the CCAAT-binding factor CBF is mediated by two distinct activation domains, one in the CBF-B subunit and the other in the CBF-C subunit." *J Biol Chem* **271**(24): 14485-14491.
- Coutinho, H. D. (2009). "Factors influencing the virulence of *Candida* spp." *West Indian Med J* **58**(2): 160-163.
- Davis, D., Edwards, J. E., Jr., Mitchell, A. P. és Ibrahim, A. S. (2000). "*Candida albicans* RIM101 pH response pathway is required for host-pathogen interactions." *Infect Immun* **68**(10): 5953-5959.
- De Bernardis, F., Muhlschlegel, F. A., Cassone, A. és Fonzi, W. A. (1998). "The pH of the host niche controls gene expression in and virulence of *Candida albicans*." *Infect Immun* **66**(7): 3317-3325.
- De Vries, S. J., Van Dijk, M. és Bonvin, A. M. (2010). "The HADDOCK web server for data-driven biomolecular docking." *Nat Protoc* **5**(5): 883-897.
- Decat, E., Van Mechelen, E., Saerens, B., Vermeulen, S. J., Boekhout, T. és mtsi. (2013). "Rapid and accurate identification of isolates of *Candida* species by melting peak and melting curve analysis of the internally transcribed spacer region 2 fragment (ITS2-MCA)." *Res Microbiol* **164**(2): 110-117.
- Delrue, R. M., Lestrade, P., Tibor, A., Letesson, J. J. és De Bolle, X. (2004). "Brucella pathogenesis, genes identified from random large-scale screens." *FEMS Microbiol Lett* **231**(1): 1-12.
- Ding, C. és Butler, G. (2007). "Development of a gene knockout system in *Candida parapsilosis* reveals a conserved role for BCR1 in biofilm formation." *Eukaryot Cell* **6**(8): 1310-1319.
- Dóczi, I., Peto, Z., Fodor, E., Bereczki, L., Nagy, E. és mtsi. (2012). "Evaluation of fungaemia infections in a Hungarian university hospital between 1996 and 2009." *Acta Microbiol Immunol Hung* **59**(1): 29-41.
- Downey, M., Houlsworth, R., Maringe, L., Rollie, A., Brehme, M. és mtsi. (2006). "A genome-wide screen identifies the evolutionarily conserved KEOPS complex as a telomere regulator." *Cell* **124**(6): 1155-1168.
- Dudley, A. M., Rougeulle, C. és Winston, F. (1999). "The Spt components of SAGA facilitate TBP binding to a promoter at a post-activator-binding step in vivo." *Genes Dev* **13**(22): 2940-2945.
- Dutton, L. C., Jenkinson, H. F., Lamont, R. J. és Nobbs, A. H. (2016). "Role of *Candida albicans* secreted aspartyl protease Sap9 in interkingdom biofilm formation." *Pathog Dis* **74**(3).
- Dzikowska, A., Grzelak, A., Gawlik, J., Szewczyk, E., Mrozek, P. és mtsi. (2015). "KAEA (SUDPRO), a member of the ubiquitous KEOPS/EKC protein complex, regulates the arginine catabolic pathway and the expression of several other genes in *Aspergillus nidulans*." *Gene* **573**(2): 310-320.

- Ene, I. V., Adya, A. K., Wehmeier, S., Brand, A. C., Maccallum, D. M. és mtsi. (2012). "Host carbon sources modulate cell wall architecture, drug resistance and virulence in a fungal pathogen." *Cell Microbiol* **14**(9): 1319-1335.
- Ene, I. V. és Bennett, R. J. (2014). "The cryptic sexual strategies of human fungal pathogens." *Nat Rev Microbiol* **12**(4): 239-251.
- Fanning, S. és Mitchell, A. P. (2012). "Fungal biofilms." *PLoS Pathog* **8**(4): e1002585.
- Finkel, J. S., Xu, W., Huang, D., Hill, E. M., Desai, J. V. és mtsi. (2012). "Portrait of *Candida albicans* adherence regulators." *PLoS Pathog* **8**(2): e1002525.
- Foster, N., Symes, C., Barton, R. és Hobson, R. (2007). "Rapid identification of *Candida glabrata* in *Candida* bloodstream infections." *J Med Microbiol* **56**(Pt 12): 1639-1643.
- Fratti, R. A., Belanger, P. H., Ghannoum, M. A., Edwards, J. E., Jr. és Filler, S. G. (1998). "Endothelial cell injury caused by *Candida albicans* is dependent on iron." *Infect Immun* **66**(1): 191-196.
- Fuchs, B. B. és Mylonakis, E. (2009). "Our paths might cross: the role of the fungal cell wall integrity pathway in stress response and cross talk with other stress response pathways." *Eukaryot Cell* **8**(11): 1616-1625.
- Gácsér, A., Schafer, W., Nosanchuk, J. S., Salomon, S. és Nosanchuk, J. D. (2007a). "Virulence of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* in reconstituted human tissue models." *Fungal Genet Biol* **44**(12): 1336-1341.
- Gácsér, A., Stehr, F., Kroger, C., Kredics, L., Schafer, W. és mtsi. (2007b). "Lipase 8 affects the pathogenesis of *Candida albicans*." *Infect Immun* **75**(10): 4710-4718.
- Gácsér, A., Trofa, D., Schafer, W. és Nosanchuk, J. D. (2007c). "Targeted gene deletion in *Candida parapsilosis* demonstrates the role of secreted lipase in virulence." *J Clin Invest* **117**(10): 3049-3058.
- Garcia-Sanchez, S., Aubert, S., Iraqui, I., Janbon, G., Ghigo, J. M. és mtsi. (2004). "*Candida albicans* biofilms: a developmental state associated with specific and stable gene expression patterns." *Eukaryot Cell* **3**(2): 536-545.
- Ghannoum, M. A. (2000). "Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis." *Clin Microbiol Rev* **13**(1): 122-143, table of contents.
- Gow, N. A., Robbins, P. W., Lester, J. W., Brown, A. J., Fonzi, W. A. és mtsi. (1994). "A hyphal-specific chitin synthase gene (CHS2) is not essential for growth, dimorphism, or virulence of *Candida albicans*." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(13): 6216-6220.
- Gow, N. A., Van De Veerdonk, F. L., Brown, A. J. és Netea, M. G. (2012). "*Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization." *Nat Rev Microbiol* **10**(2): 112-122.
- Grant, C. M., Maciver, F. H. és Dawes, I. W. (1997). "Mitochondrial function is required for resistance to oxidative stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." *FEBS Lett* **410**(2-3): 219-222.
- Gropp, K., Schild, L., Schindler, S., Hube, B., Zipfel, P. F. és mtsi. (2009). "The yeast *Candida albicans* evades human complement attack by secretion of aspartic proteases." *Mol Immunol* **47**(2-3): 465-475.
- Guinea, J. (2014). "Global trends in the distribution of *Candida* species causing candidemia." *Clin Microbiol Infect* **20 Suppl 6**: 5-10.
- Hachem, R., Hanna, H., Kontoyiannis, D., Jiang, Y. és Raad, I. (2008). "The changing epidemiology of invasive candidiasis: *Candida glabrata* and *Candida krusei* as the leading causes of candidemia in hematologic malignancy." *Cancer* **112**(11): 2493-2499.
- Hammacott, J. E., Williams, P. H. és Cashmore, A. M. (2000). "*Candida albicans* CFL1 encodes a functional ferric reductase activity that can rescue a *Saccharomyces cerevisiae* fre1 mutant." *Microbiology* **146** (Pt 4): 869-876.

- Hays, C., Duhamel, C., Cattoir, V. és Bonhomme, J. (2011). "Rapid and accurate identification of species belonging to the *Candida parapsilosis* complex by real-time PCR and melting curve analysis." *J Med Microbiol* **60**(Pt 4): 477-480.
- Heymann, P., Gerads, M., Schaller, M., Dromer, F., Winkelmann, G. és mtsi. (2002). "The siderophore iron transporter of *Candida albicans* (Sit1p/Arn1p) mediates uptake of ferrichrome-type siderophores and is required for epithelial invasion." *Infect Immun* **70**(9): 5246-5255.
- Hiraishi, H., Terano, A., Ota, S., Mutoh, H., Razandi, M. és mtsi. (1991). "Role for iron in reactive oxygen species-mediated cytotoxicity to cultured rat gastric mucosal cells." *Am J Physiol* **260**(4 Pt 1): G556-563.
- Hirschhorn, J. N. és Winston, F. (1988). "SPT3 is required for normal levels of a-factor and alpha-factor expression in *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol Cell Biol* **8**(2): 822-827.
- Ho, Y., Gruhler, A., Heilbut, A., Bader, G. D., Moore, L. és mtsi. (2002). "Systematic identification of protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae* by mass spectrometry." *Nature* **415**(6868): 180-183.
- Holland, L. M., Schroder, M. S., Turner, S. A., Taff, H., Andes, D. és mtsi. (2014). "Comparative phenotypic analysis of the major fungal pathogens *Candida parapsilosis* and *Candida albicans*." *PLoS Pathog* **10**(9): e1004365.
- Horvath, P., Nosanchuk, J. D., Hamari, Z., Vagvolgyi, C. és Gacser, A. (2012). "The identification of gene duplication and the role of secreted aspartyl proteinase 1 in *Candida parapsilosis* virulence." *J Infect Dis* **205**(6): 923-933.
- Hoyer, L. L. (2001). "The ALS gene family of *Candida albicans*." *Trends Microbiol* **9**(4): 176-180.
- Hromatka, B. S., Noble, S. M. és Johnson, A. D. (2005). "Transcriptional response of *Candida albicans* to nitric oxide and the role of the YHB1 gene in nitrosative stress and virulence." *Mol Biol Cell* **16**(10): 4814-4826.
- Hsu, P. C., Yang, C. Y. és Lan, C. Y. (2011). "*Candida albicans* Hap43 is a repressor induced under low-iron conditions and is essential for iron-responsive transcriptional regulation and virulence." *Eukaryot Cell* **10**(2): 207-225.
- Hube, B. (2004). "From commensal to pathogen: stage- and tissue-specific gene expression of *Candida albicans*." *Curr Opin Microbiol* **7**(4): 336-341.
- Hube, B., Stehr, F., Bossenz, M., Mazur, A., Kretschmar, M. és mtsi. (2000). "Secreted lipases of *Candida albicans*: cloning, characterisation and expression analysis of a new gene family with at least ten members." *Arch Microbiol* **174**(5): 362-374.
- Huisinga, K. L. és Pugh, B. F. (2004). "A genome-wide housekeeping role for TFIID and a highly regulated stress-related role for SAGA in *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol Cell* **13**(4): 573-585.
- Hwang, C. S., Rhie, G. E., Oh, J. H., Huh, W. K., Yim, H. S. és mtsi. (2002). "Copper- and zinc-containing superoxide dismutase (Cu/ZnSOD) is required for the protection of *Candida albicans* against oxidative stresses and the expression of its full virulence." *Microbiology* **148**(Pt 11): 3705-3713.
- Jacobsen, I. D. (2014). "Galleria mellonella as a model host to study virulence of *Candida*." *Virulence* **5**(2): 237-239.
- Jamieson, D. J., Stephen, D. W. és Terriere, E. C. (1996). "Analysis of the adaptive oxidative stress response of *Candida albicans*." *FEMS Microbiol Lett* **138**(1): 83-88.
- Jimenez-Lopez, C. és Lorenz, M. C. (2013). "Fungal immune evasion in a model host-pathogen interaction: *Candida albicans* versus macrophages." *PLoS Pathog* **9**(11): e1003741.

- Johnson, D. C., Cano, K. E., Kroger, E. C. és McNabb, D. S. (2005). "Novel regulatory function for the CCAAT-binding factor in *Candida albicans*." *Eukaryot Cell* **4**(10): 1662-1676.
- Jones, T., Federspiel, N. A., Chibana, H., Dungan, J., Kalman, S. és mtsi. (2004). "The diploid genome sequence of *Candida albicans*." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(19): 7329-7334.
- Kadosh, D. és Johnson, A. D. (2001). "Rfg1, a protein related to the *Saccharomyces cerevisiae* hypoxic regulator Rox1, controls filamentous growth and virulence in *Candida albicans*." *Mol Cell Biol* **21**(7): 2496-2505.
- Kadosh, D. és Johnson, A. D. (2005). "Induction of the *Candida albicans* filamentous growth program by relief of transcriptional repression: a genome-wide analysis." *Mol Biol Cell* **16**(6): 2903-2912.
- Kantarcioglu, A. S. és Yucel, A. (2002). "Phospholipase and protease activities in clinical *Candida* isolates with reference to the sources of strains." *Mycoses* **45**(5-6): 160-165.
- Karkowska-Kuleta, J., Rapala-Kozik, M. és Kozik, A. (2009). "Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*." *Acta Biochim Pol* **56**(2): 211-224.
- Kelly, M. T., Maccallum, D. M., Clancy, S. D., Odds, F. C., Brown, A. J. és mtsi. (2004). "The *Candida albicans* CaACE2 gene affects morphogenesis, adherence and virulence." *Mol Microbiol* **53**(3): 969-983.
- Kisseleva-Romanova, E., Lopreiato, R., Baudin-Baillieu, A., Rousselle, J. C., Ilan, L. és mtsi. (2006). "Yeast homolog of a cancer-testis antigen defines a new transcription complex." *EMBO J* **25**(15): 3576-3585.
- Knight, S. A., Lesuisse, E., Stearman, R., Klausner, R. D. és Dancis, A. (2002). "Reductive iron uptake by *Candida albicans*: role of copper, iron and the TUP1 regulator." *Microbiology* **148**(Pt 1): 29-40.
- Kojic, E. M. és Darouiche, R. O. (2004). "*Candida* infections of medical devices." *Clin Microbiol Rev* **17**(2): 255-267.
- Kothavade, R. J., Kura, M. M., Valand, A. G. és Panthaki, M. H. (2010). "*Candida tropicalis*: its prevalence, pathogenicity and increasing resistance to fluconazole." *J Med Microbiol* **59**(Pt 8): 873-880.
- Koutelou, E., Hirsch, C. L. és Dent, S. Y. (2010). "Multiple faces of the SAGA complex." *Curr Opin Cell Biol* **22**(3): 374-382.
- Kozik, A., Karkowska-Kuleta, J., Zajac, D., Bochenska, O., Kedracka-Krok, S. és mtsi. (2015). "Fibronectin-, vitronectin- and laminin-binding proteins at the cell walls of *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis* pathogenic yeasts." *BMC Microbiol* **15**: 197.
- Krieger, E., Nabuurs, S. B. és Vriend, G. (2003). "Homology modeling." *Methods Biochem Anal* **44**: 509-523.
- Kuhn, D. M., Chandra, J., Mukherjee, P. K. és Ghannoum, M. A. (2002). "Comparison of biofilms formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic surfaces." *Infect Immun* **70**(2): 878-888.
- Laffey, S. F. és Butler, G. (2005). "Phenotype switching affects biofilm formation by *Candida parapsilosis*." *Microbiology* **151**(Pt 4): 1073-1081.
- Laprade, L., Boyartchuk, V. L., Dietrich, W. F. és Winston, F. (2002). "Spt3 plays opposite roles in filamentous growth in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans* and is required for *C. albicans* virulence." *Genetics* **161**(2): 509-519.
- Lastauskiene, E., Cepulyte, J., Girkontaite, I. és Zinkeviciene, A. (2015). "Phenotypic switching of *Candida guilliermondii* is associated with pseudohyphae formation and antifungal resistance." *Mycopathologia* **179**(3-4): 205-211.

- Lee, T. I., Causton, H. C., Holstege, F. C., Shen, W. C., Hannett, N. és mtsi. (2000). "Redundant roles for the TFIID and SAGA complexes in global transcription." *Nature* **405**(6787): 701-704.
- Lewis, L. E., Bain, J. M., Lowes, C., Gillespie, C., Rudkin, F. M. és mtsi. (2012). "Stage specific assessment of *Candida albicans* phagocytosis by macrophages identifies cell wall composition and morphogenesis as key determinants." *PLoS Pathog* **8**(3): e1002578.
- Liang, Y., Gui, L., Wei, D. S., Zheng, W., Xing, L. J. és mtsi. (2009a). "*Candida albicans* ferric reductase FRP1 is regulated by direct interaction with Rim101p transcription factor." *FEMS Yeast Res* **9**(2): 270-277.
- Liang, Y., Zheng, W., Wei, D., Xing, L. és Li, M. (2009b). "[Function of ferric reductase FRP1 gene in *Candida albicans*]." *Wei Sheng Wu Xue Bao* **49**(3): 337-342.
- Lin, D., Wu, L. C., Rinaldi, M. G. és Lehmann, P. F. (1995). "Three distinct genotypes within *Candida parapsilosis* from clinical sources." *J Clin Microbiol* **33**(7): 1815-1821.
- Lindquist, S. (1992). "Heat-shock proteins and stress tolerance in microorganisms." *Curr Opin Genet Dev* **2**(5): 748-755.
- Liu, Y. és Filler, S. G. (2011). "*Candida albicans* Als3, a multifunctional adhesin and invasin." *Eukaryot Cell* **10**(2): 168-173.
- Livak, K. J. és 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.
- Lo, H. J., Kohler, J. R., Didomenico, B., Loebenberg, D., Cacciapuoti, A. és mtsi. (1997). "Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent." *Cell* **90**(5): 939-949.
- Lo, W. S. és Dranginis, A. M. (1996). "FLO11, a yeast gene related to the STA genes, encodes a novel cell surface flocculin." *J Bacteriol* **178**(24): 7144-7151.
- Lorenz, M. C. és Fink, G. R. (2001). "The glyoxylate cycle is required for fungal virulence." *Nature* **412**(6842): 83-86.
- Lupetti, A., Tavanti, A., Davini, P., Ghelardi, E., Corsini, V. és mtsi. (2002). "Horizontal transmission of *Candida parapsilosis* candidemia in a neonatal intensive care unit." *J Clin Microbiol* **40**(7): 2363-2369.
- Lussier, M., White, A. M., Sheraton, J., Di Paolo, T., Treadwell, J. és mtsi. (1997). "Large scale identification of genes involved in cell surface biosynthesis and architecture in *Saccharomyces cerevisiae*." *Genetics* **147**(2): 435-450.
- Madhani, H. D. és Fink, G. R. (1997). "Combinatorial control required for the specificity of yeast MAPK signaling." *Science* **275**(5304): 1314-1317.
- Madhani, H. D., Styles, C. A. és Fink, G. R. (1997). "MAP kinases with distinct inhibitory functions impart signaling specificity during yeast differentiation." *Cell* **91**(5): 673-684.
- Maertens, J., Vreboos, M. és Boogaerts, M. (2001). "Assessing risk factors for systemic fungal infections." *Eur J Cancer Care (Engl)* **10**(1): 56-62.
- Malani, A., Hmoud, J., Chiu, L., Carver, P. L., Bielaczyc, A. és mtsi. (2005). "*Candida glabrata* fungemia: experience in a tertiary care center." *Clin Infect Dis* **41**(7): 975-981.
- Massey, S. E., Moura, G., Beltrao, P., Almeida, R., Garey, J. R. és mtsi. (2003). "Comparative evolutionary genomics unveils the molecular mechanism of reassignment of the CTG codon in *Candida* spp." *Genome Res* **13**(4): 544-557.
- Matee, M. I., Scheutz, F. és Moshy, J. (2000). "Occurrence of oral lesions in relation to clinical and immunological status among HIV-infected adult Tanzanians." *Oral Dis* **6**(2): 106-111.
- Mathe, L. és Van Dijck, P. (2013). "Recent insights into *Candida albicans* biofilm resistance mechanisms." *Curr Genet* **59**(4): 251-264.

Mayer, F. L., Wilson, D. és Hube, B. (2013). "*Candida albicans* pathogenicity mechanisms." *Virulence* **4**(2): 119-128.

Mccreath, K. J., Specht, C. A. és Robbins, P. W. (1995). "Molecular cloning and characterization of chitinase genes from *Candida albicans*." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(7): 2544-2548.

McNabb, D. S., Xing, Y. és Guarente, L. (1995). "Cloning of yeast HAP5: a novel subunit of a heterotrimeric complex required for CCAAT binding." *Genes Dev* **9**(1): 47-58.

Mio, T., Yabe, T., Sudoh, M., Satoh, Y., Nakajima, T. és mtsi. (1996). "Role of three chitin synthase genes in the growth of *Candida albicans*." *J Bacteriol* **178**(8): 2416-2419.

Monge, R. A., Roman, E., Nombela, C. és Pla, J. (2006). "The MAP kinase signal transduction network in *Candida albicans*." *Microbiology* **152**(Pt 4): 905-912.

Moors, M. A., Stull, T. L., Blank, K. J., Buckley, H. R. és Mosser, D. M. (1992). "A role for complement receptor-like molecules in iron acquisition by *Candida albicans*." *J Exp Med* **175**(6): 1643-1651.

Mora-Montes, H. M., Bates, S., Netea, M. G., Diaz-Jimenez, D. F., Lopez-Romero, E. és mtsi. (2007). "Endoplasmic reticulum alpha-glycosidases of *Candida albicans* are required for N glycosylation, cell wall integrity, and normal host-fungus interaction." *Eukaryot Cell* **6**(12): 2184-2193.

Muhlschlegel, F. A. és Fonzi, W. A. (1997). "PHR2 of *Candida albicans* encodes a functional homolog of the pH-regulated gene PHR1 with an inverted pattern of pH-dependent expression." *Mol Cell Biol* **17**(10): 5960-5967.

Mukherjee, P. K., Chandra, J., Kuhn, D. M. és Ghannoum, M. A. (2003). "Mechanism of fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilms: phase-specific role of efflux pumps and membrane sterols." *Infect Immun* **71**(8): 4333-4340.

Munoz, M., Villar, I. és Garcia-Erce, J. A. (2009). "An update on iron physiology." *World J Gastroenterol* **15**(37): 4617-4626.

Munro, C. A., Whitton, R. K., Hughes, H. B., Rella, M., Selvaggini, S. és mtsi. (2003). "CHS8-a fourth chitin synthase gene of *Candida albicans* contributes to in vitro chitin synthase activity, but is dispensable for growth." *Fungal Genet Biol* **40**(2): 146-158.

Munro, C. A., Winter, K., Buchan, A., Henry, K., Becker, J. M. és mtsi. (2001). "Chs1 of *Candida albicans* is an essential chitin synthase required for synthesis of the septum and for cell integrity." *Mol Microbiol* **39**(5): 1414-1426.

Muskett, H., Shahin, J., Eyres, G., Harvey, S., Rowan, K. és mtsi. (2011). "Risk factors for invasive fungal disease in critically ill adult patients: a systematic review." *Crit Care* **15**(6): R287.

Naglik, J. R., Challacombe, S. J. és Hube, B. (2003). "*Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis." *Microbiol Mol Biol Rev* **67**(3): 400-428, table of contents.

Naglik, J. R., Moyes, D. L., Wachtler, B. és Hube, B. (2011). "*Candida albicans* interactions with epithelial cells and mucosal immunity." *Microbes Infect* **13**(12-13): 963-976.

Nagy, I., Filkor, K., Nemeth, T., Hamari, Z., Vagvolgyi, C. és mtsi. (2011). "In vitro interactions of *Candida parapsilosis* wild type and lipase deficient mutants with human monocyte derived dendritic cells." *BMC Microbiol* **11**: 122.

Németh, T., Toth, A., Szenzenstein, J., Horvath, P., Nosanchuk, J. D. és mtsi. (2013). "Characterization of virulence properties in the *C. parapsilosis* sensu lato species." *PLoS One* **8**(7): e68704.

Neppelenbroek, K. H., Seo, R. S., Urban, V. M., Silva, S., Dovigo, L. N. és mtsi. (2014). "Identification of *Candida* species in the clinical laboratory: a review of conventional, commercial, and molecular techniques." *Oral Dis* **20**(4): 329-344.

Netea, M. G., Brown, G. D., Kullberg, B. J. és Gow, N. A. (2008). "An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system." *Nat Rev Microbiol* **6**(1): 67-78.

Neugnot, V., Moulin, G., Dubreucq, E. és Bigey, F. (2002). "The lipase/acyltransferase from *Candida parapsilosis*: molecular cloning and characterization of purified recombinant enzymes." *Eur J Biochem* **269**(6): 1734-1745.

Nguyen, N. H., Suh, S. O. és Blackwell, M. (2007). "Five novel *Candida* species in insect-associated yeast clades isolated from Neuroptera and other insects." *Mycologia* **99**(6): 842-858.

Nobile, C. J., Fox, E. P., Nett, J. E., Sorrells, T. R., Mitrovich, Q. M. és mtsi. (2012). "A recently evolved transcriptional network controls biofilm development in *Candida albicans*." *Cell* **148**(1-2): 126-138.

Nobile, C. J. és Mitchell, A. P. (2005). "Regulation of cell-surface genes and biofilm formation by the *C. albicans* transcription factor Bcr1p." *Curr Biol* **15**(12): 1150-1155.

Nobile, C. J. és Mitchell, A. P. (2006). "Genetics and genomics of *Candida albicans* biofilm formation." *Cell Microbiol* **8**(9): 1382-1391.

Nobile, C. J., Schneider, H. A., Nett, J. E., Sheppard, D. C., Filler, S. G. és mtsi. (2008). "Complementary adhesin function in *C. albicans* biofilm formation." *Curr Biol* **18**(14): 1017-1024.

Noble, S. M., French, S., Kohn, L. A., Chen, V. és Johnson, A. D. (2010). "Systematic screens of a *Candida albicans* homozygous deletion library decouple morphogenetic switching and pathogenicity." *Nat Genet* **42**(7): 590-598.

Noble, S. M. és Johnson, A. D. (2005). "Strains and strategies for large-scale gene deletion studies of the diploid human fungal pathogen *Candida albicans*." *Eukaryot Cell* **4**(2): 298-309.

Nosek, J., Holesova, Z., Kosa, P., Gacser, A. és Tomaska, L. (2009). "Biology and genetics of the pathogenic yeast *Candida parapsilosis*." *Curr Genet* **55**(5): 497-509.

O'toole, G., Kaplan, H. B. és Kolter, R. (2000). "Biofilm formation as microbial development." *Annu Rev Microbiol* **54**: 49-79.

Olarewaju, O., Ortiz, P. A., Chowdhury, W. Q., Chatterjee, I. és Kinzy, T. G. (2004). "The translation elongation factor eEF1B plays a role in the oxidative stress response pathway." *RNA Biol* **1**(2): 89-94.

Olesen, J. T. és Guarente, L. (1990). "The HAP2 subunit of yeast CCAAT transcriptional activator contains adjacent domains for subunit association and DNA recognition: model for the HAP2/3/4 complex." *Genes Dev* **4**(10): 1714-1729.

Pammi, M., Holland, L., Butler, G., Gacser, A. és Bliss, J. M. (2013). "*Candida parapsilosis* is a significant neonatal pathogen: a systematic review and meta-analysis." *Pediatr Infect Dis J* **32**(5): e206-216.

Pan, X. és Heitman, J. (2002). "Protein kinase A operates a molecular switch that governs yeast pseudohyphal differentiation." *Mol Cell Biol* **22**(12): 3981-3993.

Panagoda, G. J., Ellepola, A. N. és Samaranayake, L. P. (2001). "Adhesion of *Candida parapsilosis* to epithelial and acrylic surfaces correlates with cell surface hydrophobicity." *Mycoses* **44**(1-2): 29-35.

Pasrija, R., Banerjee, D. és Prasad, R. (2007). "Structure and function analysis of CaMdr1p, a major facilitator superfamily antifungal efflux transporter protein of *Candida albicans*: identification of amino acid residues critical for drug/H⁺ transport." *Eukaryot Cell* **6**(3): 443-453.

Peman, J., Canton, E., Linares-Sicilia, M. J., Rosello, E. M., Borrell, N. és mtsi. (2011). "Epidemiology and antifungal susceptibility of bloodstream fungal isolates in pediatric patients: a Spanish multicenter prospective survey." *J Clin Microbiol* **49**(12): 4158-4163.

- Pereira, E., Figueira, C., Aguiar, N., Vasconcelos, R., Vasconcelos, S. és mtsi. (2013). "Microbiological and mycological beach sand quality in a volcanic environment: Madeira archipelago, Portugal." *Sci Total Environ* **461-462**: 469-479.
- Perez-Rivero, G., Ruiz-Torres, M. P., Diez-Marques, M. L., Canela, A., Lopez-Novoa, J. M. és mtsi. (2008). "Telomerase deficiency promotes oxidative stress by reducing catalase activity." *Free Radic Biol Med* **45**(9): 1243-1251.
- Perlin, D. S. (2007). "Resistance to echinocandin-class antifungal drugs." *Drug Resist Updat* **10**(3): 121-130.
- Perrochia, L., Guetta, D., Hecker, A., Forterre, P. és Basta, T. (2013). "Functional assignment of KEOPS/EKC complex subunits in the biosynthesis of the universal t6A tRNA modification." *Nucleic Acids Res* **41**(20): 9484-9499.
- Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M. és mtsi. (2004). "UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis." *J Comput Chem* **25**(13): 1605-1612.
- Pfaller, M. A., Castanheira, M., Messer, S. A., Moet, G. J. és Jones, R. N. (2010). "Variation in *Candida* spp. distribution and antifungal resistance rates among bloodstream infection isolates by patient age: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2008-2009)." *Diagn Microbiol Infect Dis* **68**(3): 278-283.
- Pfaller, M. A. és Diekema, D. J. (2007). "Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem." *Clin Microbiol Rev* **20**(1): 133-163.
- Pfaller, M. A., Diekema, D. J., Gibbs, D. L., Newell, V. A., Nagy, E. és mtsi. (2008). "*Candida* krusei, a multidrug-resistant opportunistic fungal pathogen: geographic and temporal trends from the ARTEMIS DISK Antifungal Surveillance Program, 2001 to 2005." *J Clin Microbiol* **46**(2): 515-521.
- Pfaller, M. A., Messer, S. A., Woosley, L. N., Jones, R. N. és Castanheira, M. (2013). "Echinocandin and triazole antifungal susceptibility profiles for clinical opportunistic yeast and mold isolates collected from 2010 to 2011: application of new CLSI clinical breakpoints and epidemiological cutoff values for characterization of geographic and temporal trends of antifungal resistance." *J Clin Microbiol* **51**(8): 2571-2581.
- Phan, Q. T., Myers, C. L., Fu, Y., Sheppard, D. C., Yeaman, M. R. és mtsi. (2007). "Als3 is a *Candida albicans* invasin that binds to cadherins and induces endocytosis by host cells." *PLoS Biol* **5**(3): e64.
- Pieper, U., Eswar, N., Davis, F. P., Braberg, H., Madhusudhan, M. S. és mtsi. (2006). "MODBASE: a database of annotated comparative protein structure models and associated resources." *Nucleic Acids Res* **34**(Database issue): D291-295.
- Pires, R. H., Santos, J. M., Zaia, J. E., Martins, C. H. és Mendes-Giannini, M. J. (2011). "*Candida parapsilosis* complex water isolates from a haemodialysis unit: biofilm production and in vitro evaluation of the use of clinical antifungals." *Mem Inst Oswaldo Cruz* **106**(6): 646-654.
- 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.
- Pongrácz, J., Juhasz, E., Ivan, M. és Kristof, K. (2015). "Significance of yeasts in bloodstream infection: Epidemiology and predisposing factors of *Candidaemia* in adult patients at a university hospital (2010-2014)." *Acta Microbiol Immunol Hung* **62**(3): 317-329.
- Pray-Grant, M. G., Schieltz, D., McMahon, S. J., Wood, J. M., Kennedy, E. L. és mtsi. (2002). "The novel SLIK histone acetyltransferase complex functions in the yeast retrograde response pathway." *Mol Cell Biol* **22**(24): 8774-8786.

Prelich, G. (2012). "Gene overexpression: uses, mechanisms, and interpretation." *Genetics* **190**(3): 841-854.

Pryszcz, L. P., Nemeth, T., Gacser, A. és Gabaldon, T. (2013). "Unexpected genomic variability in clinical and environmental strains of the pathogenic yeast *Candida parapsilosis*." *Genome Biol Evol* **5**(12): 2382-2392.

Pugh, D. és Cawson, R. A. (1977). "The cytochemical localization of phospholipase in *Candida albicans* infecting the chick chorio-allantoic membrane." *Sabouraudia* **15**(1): 29-35.

Quindos, G. (2014). "Epidemiology of *Candidaemia* and invasive candidiasis. A changing face." *Rev Iberoam Micol* **31**(1): 42-48.

Raghava, G. P. és Barton, G. J. (2006). "Quantification of the variation in percentage identity for protein sequence alignments." *BMC Bioinformatics* **7**: 415.

Ram, A. F. és 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.

Ramage, G., Vandewalle, K., Lopez-Ribot, J. L. és Wickes, B. L. (2002). "The filamentation pathway controlled by the Efg1 regulator protein is required for normal biofilm formation and development in *Candida albicans*." *FEMS Microbiol Lett* **214**(1): 95-100.

Ramanan, N. és Wang, Y. (2000). "A high-affinity iron permease essential for *Candida albicans* virulence." *Science* **288**(5468): 1062-1064.

Ramo, P., Drewek, A., Arrieumerlou, C., Beerenwinkel, N., Ben-Tekaya, H. és mtsi. (2014). "Simultaneous analysis of large-scale RNAi screens for pathogen entry." *BMC Genomics* **15**: 1162.

Rasconi, S., Jobard, M., Jouve, L. és Sime-Ngando, T. (2009). "Use of calcofluor white for detection, identification, and quantification of phytoplanktonic fungal parasites." *Appl Environ Microbiol* **75**(8): 2545-2553.

Raut, J., Rathod, V. és Karuppayil, S. M. (2010). "Cell surface hydrophobicity and adhesion: a study on fifty clinical isolates of *Candida albicans*." *Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi* **51**(3): 131-136.

Ravinder, M. S. D., Ritu Goyal, Rakesh Kumar (2015). "Emergence of non-*albicans* *Candida* species and antifungal resistance in intensive care unit patients " *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* **6**(5): 455-460.

Reddy, V. S., Shlykov, M. A., Castillo, R., Sun, E. I. és Saier, M. H., Jr. (2012). "The major facilitator superfamily (MFS) revisited." *FEBS J* **279**(11): 2022-2035.

Rene, H. D., Jose, M. S., Isela, S. N. és Claudio, C. R. (2014). "Effects of ambroxol on *Candida albicans* growth and biofilm formation." *Mycoses* **57**(4): 228-232.

Robbins, N., Uppuluri, P., Nett, J., Rajendran, R., Ramage, G. és mtsi. (2011). "Hsp90 governs dispersion and drug resistance of fungal biofilms." *PLoS Pathog* **7**(9): e1002257.

Rodrigues, J., Fonseca, F. L., Schneider, R. O., Godinho, R. M., Firacative, C. és mtsi. (2015). "Pathogenic diversity amongst serotype C VGIII and VGIV *Cryptococcus gattii* isolates." *Sci Rep* **5**: 11717.

Rodriguez, D., Almirante, B., Park, B. J., Cuenca-Estrella, M., Planes, A. M. és mtsi. (2006). "Candidemia in neonatal intensive care units: Barcelona, Spain." *Pediatr Infect Dis J* **25**(3): 224-229.

Rosignol, T., Ding, C., Guida, A., D'enfert, C., Higgins, D. G. és mtsi. (2009). "Correlation between biofilm formation and the hypoxic response in *Candida parapsilosis*." *Eukaryot Cell* **8**(4): 550-559.

- Rupp, S., Summers, E., Lo, H. J., Madhani, H. és Fink, G. (1999). "MAP kinase and cAMP filamentation signaling pathways converge on the unusually large promoter of the yeast FLO11 gene." *EMBO J* **18**(5): 1257-1269.
- Ryan, O., Shapiro, R. S., Kurat, C. F., Mayhew, D., Baryshnikova, A. és mtsi. (2012). "Global gene deletion analysis exploring yeast filamentous growth." *Science* **337**(6100): 1353-1356.
- Santos, R., Buisson, N., Knight, S., Dancis, A., Camadro, J. M. és mtsi. (2003). "Haemin uptake and use as an iron source by *Candida albicans*: role of CaHMX1-encoded haem oxygenase." *Microbiology* **149**(Pt 3): 579-588.
- Saporito-Irwin, S. M., Birse, C. E., Sypherd, P. S. és Fonzi, W. A. (1995). "PHR1, a pH-regulated gene of *Candida albicans*, is required for morphogenesis." *Mol Cell Biol* **15**(2): 601-613.
- Sarvikivi, E., Lyytikäinen, O., Soll, D. R., Pujol, C., Pfaller, M. A. és mtsi. (2005). "Emergence of fluconazole resistance in a *Candida parapsilosis* strain that caused infections in a neonatal intensive care unit." *J Clin Microbiol* **43**(6): 2729-2735.
- Saville, S. P., Lazzell, A. L., Monteagudo, C. és Lopez-Ribot, J. L. (2003). "Engineered control of cell morphology in vivo reveals distinct roles for yeast and filamentous forms of *Candida albicans* during infection." *Eukaryot Cell* **2**(5): 1053-1060.
- Sellam, A., Askew, C., Epp, E., Tebbji, F., Mullick, A. és mtsi. (2010). "Role of transcription factor CaNdt80p in cell separation, hyphal growth, and virulence in *Candida albicans*." *Eukaryot Cell* **9**(4): 634-644.
- Selvaggi, S., Munro, C. A., Paschoud, S., Sanglard, D. és Gow, N. A. (2004). "Independent regulation of chitin synthase and chitinase activity in *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae*." *Microbiology* **150**(Pt 4): 921-928.
- Shah, A. H., Singh, A., Dhamgaye, S., Chauhan, N., Vandeputte, P. és mtsi. (2014). "Novel role of a family of major facilitator transporters in biofilm development and virulence of *Candida albicans*." *Biochem J* **460**(2): 223-235.
- Shaheen, A., Ismat, F., Iqbal, M., Haque, A., De Zorzi, R. és mtsi. (2015). "Characterization of putative multidrug resistance transporters of the major facilitator-superfamily expressed in *Salmonella Typhi*." *J Infect Chemother* **21**(5): 357-362.
- Shimizu, M. T., Almeida, N. Q., Fantinato, V. és Unterkircher, C. S. (1996). "Studies on hyaluronidase, chondroitin sulphatase, proteinase and phospholipase secreted by *Candida* species." *Mycoses* **39**(5-6): 161-167.
- Silva, R. F. (2010). "Chapter 8: Fungal infections in immunocompromised patients." *J Bras Pneumol* **36**(1): 142-147.
- Singh, A., Kaur, N. és Kosman, D. J. (2007). "The metallo-reductase Fre6p in Fe-efflux from the yeast vacuole." *J Biol Chem* **282**(39): 28619-28626.
- Sobel, J. D. (2007). "Vulvovaginal candidosis." *Lancet* **369**(9577): 1961-1971.
- Solomon, S. L., Khabbaz, R. F., Parker, R. H., Anderson, R. L., Geraghty, M. A. és mtsi. (1984). "An outbreak of *Candida parapsilosis* bloodstream infections in patients receiving parenteral nutrition." *J Infect Dis* **149**(1): 98-102.
- Souza, A. C., Fuchs, B. B., Pinhati, H. M., Siqueira, R. A., Hagen, F. és mtsi. (2015). "*Candida parapsilosis* Resistance to Fluconazole: Molecular Mechanisms and In Vivo Impact in Infected *Galleria mellonella* Larvae." *Antimicrob Agents Chemother* **59**(10): 6581-6587.
- Srinivasan, M., Mehta, P., Yu, Y., Prugar, E., Koonin, E. V. és mtsi. (2011). "The highly conserved KEOPS/EKC complex is essential for a universal tRNA modification, t6A." *EMBO J* **30**(5): 873-881.

- Staab, J. F., Bradway, S. D., Fidel, P. L. és Sundstrom, P. (1999). "Adhesive and mammalian transglutaminase substrate properties of *Candida albicans* Hwp1." *Science* **283**(5407): 1535-1538.
- Stehr, F., Felk, A., Gacser, A., Kretschmar, M., Mahnss, B. és mtsi. (2004). "Expression analysis of the *Candida albicans* lipase gene family during experimental infections and in patient samples." *FEMS Yeast Res* **4**(4-5): 401-408.
- Sterner, D. E., Belotserkovskaya, R. és Berger, S. L. (2002). "SALSA, a variant of yeast SAGA, contains truncated Spt7, which correlates with activated transcription." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(18): 11622-11627.
- Sterner, D. E. és Berger, S. L. (2000). "Acetylation of histones and transcription-related factors." *Microbiol Mol Biol Rev* **64**(2): 435-459.
- Tan, X., Fuchs, B. B., Wang, Y., Chen, W., Yuen, G. J. és mtsi. (2014). "The role of *Candida albicans* SPT20 in filamentation, biofilm formation and pathogenesis." *PLoS One* **9**(4): e94468.
- Tang, P. W., Chua, P. S., Chong, S. K., Mohamad, M. S., Choon, Y. W. és mtsi. (2015). "A Review of Gene Knockout Strategies for Microbial Cells." *Recent Pat Biotechnol* **9**(3): 176-197.
- Tavanti, A., Davidson, A. D., Gow, N. A., Maiden, M. C. és Odds, F. C. (2005). "*Candida* orthopsilosis and *Candida* metapsilosis spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* groups II and III." *J Clin Microbiol* **43**(1): 284-292.
- Thompson, D. S., Carlisle, P. L. és Kadosh, D. (2011). "Coevolution of morphology and virulence in *Candida* species." *Eukaryot Cell* **10**(9): 1173-1182.
- Thon, M., Al Abdallah, Q., Hortschansky, P., Scharf, D. H., Eisendle, M. és mtsi. (2010). "The CCAAT-binding complex coordinates the oxidative stress response in eukaryotes." *Nucleic Acids Res* **38**(4): 1098-1113.
- Tkacz, J. S., Cybulska, E. B. és Lampen, J. O. (1971). "Specific staining of wall mannan in yeast cells with fluorescein-conjugated concanavalin A." *J Bacteriol* **105**(1): 1-5.
- Tóth, A., Nemeth, T., Csonka, K., Horvath, P., Vagvolgyi, C. és mtsi. (2014a). "Secreted *Candida parapsilosis* lipase modulates the immune response of primary human macrophages." *Virulence* **5**(4): 555-562.
- Tóth, R., Alonso, M. F., Bain, J. M., Vagvolgyi, C., Erwig, L. P. és mtsi. (2015). "Different *Candida parapsilosis* clinical isolates and lipase deficient strain trigger an altered cellular immune response." *Front Microbiol* **6**: 1102.
- Tóth, R., Toth, A., Papp, C., Jankovics, F., Vagvolgyi, C. és mtsi. (2014b). "Kinetic studies of *Candida parapsilosis* phagocytosis by macrophages and detection of intracellular survival mechanisms." *Front Microbiol* **5**: 633.
- Tóth, R., Toth, A., Vagvolgyi, C. és Gacser, A. (2016). "*Candida parapsilosis* secreted lipase as an important virulence factor." *Curr Protein Pept Sci*.
- Trofa, D., Gacser, A. és Nosanchuk, J. D. (2008). "*Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen." *Clin Microbiol Rev* **21**(4): 606-625.
- Trofa, D., Soghier, L., Long, C., Nosanchuk, J. D., Gacser, A. és mtsi. (2011). "A rat model of neonatal candidiasis demonstrates the importance of lipases as virulence factors for *Candida albicans* and *Candida parapsilosis*." *Mycopathologia* **172**(3): 169-178.
- Van Asbeck, E. C., Clemons, K. V. és Stevens, D. A. (2009). "*Candida parapsilosis*: a review of its epidemiology, pathogenesis, clinical aspects, typing and antimicrobial susceptibility." *Crit Rev Microbiol* **35**(4): 283-309.
- Van Dyk, D., Pretorius, I. S. és Bauer, F. F. (2005). "Mss11p is a central element of the regulatory network that controls FLO11 expression and invasive growth in *Saccharomyces cerevisiae*." *Genetics* **169**(1): 91-106.

- Vylkova, S., Carman, A. J., Danhof, H. A., Collette, J. R., Zhou, H. és mtsi. (2011). "The fungal pathogen *Candida albicans* autoinduces hyphal morphogenesis by raising extracellular pH." *MBio* **2**(3): e00055-00011.
- Wachtler, B., Wilson, D., Haedicke, K., Dalle, F. és Hube, B. (2011). "From attachment to damage: defined genes of *Candida albicans* mediate adhesion, invasion and damage during interaction with oral epithelial cells." *PLoS One* **6**(2): e17046.
- Walker, L. A., Gow, N. A. és Munro, C. A. (2010). "Fungal echinocandin resistance." *Fungal Genet Biol* **47**(2): 117-126.
- Warfield, L., Luo, J., Ranish, J. és Hahn, S. (2016). "Function of conserved topological regions within the *S. cerevisiae* basal transcription factor TFIID." *Mol Cell Biol*.
- Watanabe, T., Takano, M., Murakami, M., Tanaka, H., Matsuhisa, A. és mtsi. (1999). "Characterization of a haemolytic factor from *Candida albicans*." *Microbiology* **145** (Pt **3**): 689-694.
- Weems, J. J., Jr., Chamberland, M. E., Ward, J., Willy, M., Padhye, A. A. és mtsi. (1987). "*Candida parapsilosis* fungemia associated with parenteral nutrition and contaminated blood pressure transducers." *J Clin Microbiol* **25**(6): 1029-1032.
- Weissman, Z. és Kornitzer, D. (2004). "A family of *Candida* cell surface haem-binding proteins involved in haemin and haemoglobin-iron utilization." *Mol Microbiol* **53**(4): 1209-1220.
- Winston, F. és Sudarsanam, P. (1998). "The SAGA of Spt proteins and transcriptional analysis in yeast: past, present, and future." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **63**: 553-561.
- Wu, Z., Wang, S., Yuan, Y., Zhang, T., Liu, J. és mtsi. (2016). "A novel major facilitator superfamily transporter in *Penicillium digitatum* (PdMFS2) is required for prochloraz resistance, conidiation and full virulence." *Biotechnol Lett* **38**(8): 1349-1357.
- Wysong, D. R., Christin, L., Sugar, A. M., Robbins, P. W. és Diamond, R. D. (1998). "Cloning and sequencing of a *Candida albicans* catalase gene and effects of disruption of this gene." *Infect Immun* **66**(5): 1953-1961.
- Yapar, N. (2014). "Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis." *Ther Clin Risk Manag* **10**: 95-105.
- Yun, C. W., Bauler, M., Moore, R. E., Klebba, P. E. és Philpott, C. C. (2001). "The role of the FRE family of plasma membrane reductases in the uptake of siderophore-iron in *Saccharomyces cerevisiae*." *J Biol Chem* **276**(13): 10218-10223.
- Zhou, Y., Kou, H. és Wang, Z. (2007). "Tfb5 interacts with Tfb2 and facilitates nucleotide excision repair in yeast." *Nucleic Acids Res* **35**(3): 861-871.
- Zhu, W. és Filler, S. G. (2010). "Interactions of *Candida albicans* with epithelial cells." *Cell Microbiol* **12**(3): 273-282.
- Zordan, R. E., Miller, M. G., Galgoczy, D. J., Tuch, B. B. és Johnson, A. D. (2007). "Interlocking transcriptional feedback loops control white-opaque switching in *Candida albicans*." *PLoS Biol* **5**(10): e256.

11. Mellékletek

1. számú melléklet: A tanulmány során előállított *C. parapsilosis* homozigóta deléció törzsek.

Törzs név	Genotípus	Funkció
CPAR2_100460 Δ/Δ	<i>leu2::FRT/leu2::FRT, his1::FRT/his1::FRT, CPAR2_100460::LEU2/CPAR2_100460::HIS1</i>	Putatív polifenol-oxidáz
CPAR2_100470 Δ/Δ	<i>leu2::FRT/leu2::FRT, his1::FRT/his1::FRT, CPAR2_100470::LEU2/CPAR2_100470::HIS1</i>	Putatív polifenol-oxidáz
CPAR2_100540 Δ/Δ	<i>leu2::FRT/leu2::FRT, his1::FRT/his1::FRT, CPAR2_100540::LEU2/CPAR2_100540::HIS1</i>	TF
CPAR2_104420 Δ/Δ	<i>leu2::FRT/leu2::FRT, his1::FRT/his1::FRT, CPAR2_104420::LEU2/CPAR2_104420::HIS1</i>	TF
CPAR2_107240 Δ/Δ	<i>leu2::FRT/leu2::FRT, his1::FRT/his1::FRT, CPAR2_107240::LEU2/CPAR2_107240::HIS1</i>	Glikolipid 2-alfa-mannoziltranszferáz
CPAR2_108410 Δ/Δ	<i>leu2::FRT/leu2::FRT, his1::FRT/his1::FRT, CPAR2_108410::LEU2/CPAR2_108410::HIS1</i>	TF
CPAR2_108840 Δ/Δ	<i>leu2::FRT/leu2::FRT, his1::FRT/his1::FRT, CPAR2_108840::LEU2/CPAR2_108840::HIS1</i>	Kinááz
CPAR2_200040 Δ/Δ	<i>leu2::FRT/leu2::FRT, his1::FRT/his1::FRT, CPAR2_200040::LEU2/CPAR2_200040::HIS1</i>	TF + Zn domén
CPAR2_200390 Δ/Δ	<i>leu2::FRT/leu2::FRT, his1::FRT/his1::FRT, CPAR2_200390::LEU2/CPAR2_200390::HIS1</i>	TF
CPAR2_202040 Δ/Δ	<i>leu2::FRT/leu2::FRT, his1::FRT/his1::FRT, CPAR2_202040::LEU2/CPAR2_202040::HIS1</i>	TF
CPAR2_204840 Δ/Δ	<i>leu2::FRT/leu2::FRT, his1::FRT/his1::FRT, CPAR2_204840::LEU2/CPAR2_204840::HIS1</i>	Putatív polifenol-oxidáz
CPAR2_209520 Δ/Δ	<i>leu2::FRT/leu2::FRT, his1::FRT/his1::FRT, CPAR2_209520::LEU2/CPAR2_209520::HIS1</i>	Kinááz
CPAR2_300080 Δ/Δ	<i>leu2::FRT/leu2::FRT, his1::FRT/his1::FRT, CPAR2_300080::LEU2/CPAR2_300080::HIS1</i>	Kinááz
CPAR2_302400 Δ/Δ	<i>leu2::FRT/leu2::FRT, his1::FRT/his1::FRT, CPAR2_302400::LEU2/CPAR2_302400::HIS1</i>	TF
CPAR2_303700 Δ/Δ	<i>leu2::FRT/leu2::FRT, his1::FRT/his1::FRT, CPAR2_303700::LEU2/CPAR2_303700::HIS1</i>	Kinááz
CPAR2_304080 Δ/Δ	<i>leu2::FRT/leu2::FRT, his1::FRT/his1::FRT, CPAR2_304080::LEU2/CPAR2_304080::HIS1</i>	Kinááz
CPAR2_400270 Δ/Δ	<i>leu2::FRT/leu2::FRT, his1::FRT/his1::FRT, CPAR2_400270::LEU2/CPAR2_400270::HIS1</i>	TF + Zn domén
CPAR2_401150 Δ/Δ	<i>leu2::FRT/leu2::FRT, his1::FRT/his1::FRT, CPAR2_401150::LEU2/CPAR2_401150::HIS1</i>	TF

Törzs név	Genotípus	Funkció
<i>CPAR2_500180 Δ/Δ</i>	<i>leu2::FRT/leu2::FRT, his1::FRT/his1::FRT, CPAR2_500180::LEU2/CPAR2_500180::HIS1</i>	Kináz
<i>CPAR2_500360 Δ/Δ</i>	<i>leu2::FRT/leu2::FRT, his1::FRT/his1::FRT, CPAR2_500360::LEU2/CPAR2_500360::HIS1</i>	Alfa mannozidáz
<i>CPAR2_501400 Δ/Δ</i>	<i>leu2::FRT/leu2::FRT, his1::FRT/his1::FRT, CPAR2_501400::LEU2/CPAR2_501400::HIS1</i>	Mannozil oligoszacharid glükozidáz
<i>CPAR2_502720 Δ/Δ</i>	<i>leu2::FRT/leu2::FRT, his1::FRT/his1::FRT, CPAR2_502720::LEU2/CPAR2_502720::HIS1</i>	Kináz
<i>CPAR2_602370 Δ/Δ</i>	<i>leu2::FRT/leu2::FRT, his1::FRT/his1::FRT, CPAR2_602370::LEU2/CPAR2_602370::HIS1</i>	TF + Zn domén
<i>CPAR2_602430 Δ/Δ</i>	<i>leu2::FRT/leu2::FRT, his1::FRT/his1::FRT, CPAR2_602430::LEU2/CPAR2_602430::HIS1</i>	TF
<i>CPAR2_602820 Δ/Δ</i>	<i>leu2::FRT/leu2::FRT, his1::FRT/his1::FRT, CPAR2_602820::LEU2/CPAR2_602820::HIS1</i>	TF + Zn domén
<i>CPAR2_602840 Δ/Δ</i>	<i>leu2::FRT/leu2::FRT, his1::FRT/his1::FRT, CPAR2_602840::LEU2/CPAR2_602840::HIS1</i>	TF
<i>CPAR2_704330 Δ/Δ</i>	<i>leu2::FRT/leu2::FRT, his1::FRT/his1::FRT, CPAR2_704330::LEU2/CPAR2_704330::HIS1</i>	Putatív polifenol-oxidáz
<i>CPAR2_704370 Δ/Δ</i>	<i>leu2::FRT/leu2::FRT, his1::FRT/his1::FRT, CPAR2_704370::LEU2/CPAR2_704370::HIS1</i>	Putatív polifenol-oxidáz
<i>CPAR2_800040 Δ/Δ</i>	<i>leu2::FRT/leu2::FRT, his1::FRT/his1::FRT, CPAR2_800040::LEU2/CPAR2_800040::HIS1</i>	TF + Zn domén

2. számú melléklet: A tanulmányban felhasznált primerek listája.

A szövegben feltüntetett, további *C. parapsilosis* deléciós törzsek előállításához felhasznált primerek listája:

Marker gének szekvenciájára tervezett univerzális primerek:

Primer neve	Szekvencia (5'-3')
Reverz LEU_Check_1	GAAGTTGGTGACGCGATTGT
Forward LEU_Check_2	TCCCCTCAATGTATGCAA
Reverz HIS_Check_1	AAAATCAATGGGCATTCTCG
Forward HIS_Check_2	TGGGAAGCAGACATTCAACA

Forward primer 1

Primer neve	Szekvencia (5'-3')
CPAR2_100540_1	GAATTGACCACAACATATGT
CPAR2_200390_1	TTTGACATCCCCATCCATTC
CPAR2_303700_1	CATGCCTGAATTTTGTGCTA
CPAR2_602840_1	TGGTAACAAGATTTTAAGAA
CPAR2_100460_1	GCTTCTTGGCCTTGTAATCC
CPAR2_100470_1	GTAACATTCACTAAATCTAC
CPAR2_104420_1	ACACAACATATTCGATTGTG
CPAR2_107240_1	TGGTGTATGGATCGTTATAT
CPAR2_108410_1	GTAAGTGGTTACAGCAGTGGA
CPAR2_108840_1	ATAAAAGCAATTTTATGTGG
CPAR2_200040_1	TCCTCTTCTTTCTGTGAAT
CPAR2_202040_1	TCGTGATTTTTCCATTATCT
CPAR2_204840_1	TCCACTAAAAAGTTTAATTT
CPAR2_209520_1	CTAGAAAGAAACAATAAAAA
CPAR2_300080_1	AAGAGACAATTGGAGAGTAG
CPAR2_302400_1	CTTACCCAGCATGTTGTTGT
CPAR2_304080_1	AATTTACACATATATATCCT
CPAR2_400270_1	CACTTTCGACACAGATGAGA
CPAR2_401150_1	GATGAATCTTTGTGTCTCGC
CPAR2_500180_1	TTGGTATTGGTACACTTCAC
CPAR2_500360_1	ACTTCAGATAAGGAAGCTGA
CPAR2_501400_1	CCCATATGAGGAAAGTATCT
CPAR2_502720_1	CTTGGAATGTCTACCCCAAT
CPAR2_503760_1	TTGGCAAAAACGAGAGAAAG
CPAR2_602370_1	GATGATGCCAAGTTCTCTTT
CPAR2_602430_1	CCTAGATCTCTGTTGACGTA
CPAR2_602820_1	AGGAAGTTGGCCATCTTTTA
CPAR2_704330_1	GGAGGGGGGGTTCTCATAAG
CPAR2_704370_1	TTTTGAGGGGGTTTTTTTTA
CPAR2_800040_1	TCGCTGGCATGATTGTAATG

Reverz primer 3

Primer neve

CPAR2_100540_3
 CPAR2_200390_3
 CPAR2_303700_3
 CPAR2_602840_3
 CPAR2_100460_3
 CPAR2_100470_3
 CPAR2_104420_3
 CPAR2_107240_3
 CPAR2_108410_3
 CPAR2_108840_3
 CPAR2_200040_3
 CPAR2_202040_3
 CPAR2_204840_3
 CPAR2_209520_3
 CPAR2_300080_3
 CPAR2_302400_3
 CPAR2_304080_3
 CPAR2_400270_3
 CPAR2_401150_3
 CPAR2_500180_3
 CPAR2_500360_3
 CPAR2_501400_3
 CPAR2_502720_3
 CPAR2_503760_3
 CPAR2_602370_3
 CPAR2_602430_3
 CPAR2_602820_3
 CPAR2_704330_3
 CPAR2_704370_3
 CPAR2_800040_3

Szekvencia (5'-3')

cacggcgcgcctagcagcggATTCAAATCAAAGTGTTTA
 cacggcgcgcctagcagcggGTCTTTTGGGGTGTGTGATG
 cacggcgcgcctagcagcggTTTCAAATGAGGTTATAGCT
 cacggcgcgcctagcagcggTTGTGGGGTGGACGTCGTAG
 cacggcgcgcctagcagcggCGCTACTTGTGATACTGTCA
 cacggcgcgcctagcagcggTACTATTTATATCAGCTAAT
 cacggcgcgcctagcagcggCTCTTTGATGGTAATTGGTT
 cacggcgcgcctagcagcggGACTACAAGGGTATAAATCG
 cacggcgcgcctagcagcggACTTTGTAGTCTGTTTCAA
 cacggcgcgcctagcagcggGTAACCAACCATTTGATGAG
 cacggcgcgcctagcagcggCGTTTGGTTCAAAGGTGAG
 cacggcgcgcctagcagcggAATGTGGTGTATTATATACG
 cacggcgcgcctagcagcggTGAATGTTGAGTTGATAAAA
 cacggcgcgcctagcagcggGACTATTGTGATGCAGGAAG
 cacggcgcgcctagcagcggTCTTTTTTTTTTTTTTGC
 cacggcgcgcctagcagcggTGTGAGAAAGAGAAATTTGG
 cacggcgcgcctagcagcggTGTAGTGTGTAGATGATGGT
 cacggcgcgcctagcagcggGGAGATGGGAAGAGGAGATG
 cacggcgcgcctagcagcggCTTCGGTTGGTGGTGTGTG
 cacggcgcgcctagcagcggGATTACTGTGGTAATGGTCA
 cacggcgcgcctagcagcggTGATTATTGTTGGCTGGTTG
 cacggcgcgcctagcagcggGGTCAATGTACTATTTTGG
 cacggcgcgcctagcagcggAGTGGACTGAAACAAAAAAG
 cacggcgcgcctagcagcggGATGTCTCGTACTCTTGTGG
 cacggcgcgcctagcagcggGGTGTATGTGATGGCGTTT
 cacggcgcgcctagcagcggTGTGCCGTTGAGGTTTCCT
 cacggcgcgcctagcagcggCTTTGTTGGAAGGTGTGAGT
 cacggcgcgcctagcagcggAGTTAGTTGTGTTTGGTTGA
 cacggcgcgcctagcagcggTACAGTTGATGTGACTGCAT
 cacggcgcgcctagcagcggCACTGTCGATGCTTGTGAT

Forward primer 4

Primer neve:

CPAR2_100540_4
 CPAR2_200390_4
 CPAR2_303700_4
 CPAR2_602840_4
 CPAR2_100460_4
 CPAR2_100470_4
 CPAR2_104420_4
 CPAR2_107240_4
 CPAR2_108410_4
 CPAR2_108840_4
 CPAR2_200040_4
 CPAR2_202040_4
 CPAR2_204840_4
 CPAR2_209520_4

Szekvencia (5'-3')

gtcagcggccgcatccctgcGGGAAGTCAGCTGGGAGCGT
 gtcagcggccgcatccctgcATGCTCTATCTTTTCTATCC
 gtcagcggccgcatccctgcTATAGAATAGTGACATAAA
 gtcagcggccgcatccctgcGGGAGATATTCCTTGAGATG
 gtcagcggccgcatccctgcCAAGTGAGAGGAAAGGTTGT
 gtcagcggccgcatccctgcCAGTACTGCTTGAAAGAGTG
 gtcagcggccgcatccctgcTTCTTAATAACTACAAATTT
 gtcagcggccgcatccctgcTTCAAAAAGAAAAAATAAA
 gtcagcggccgcatccctgcAGGTGTATATGTACCTGTTG
 gtcagcggccgcatccctgcGACGTTATTGCTAGTTATTG
 gtcagcggccgcatccctgcTTTACTTGTTTATATACTTG
 gtcagcggccgcatccctgcGTTTGGATAGTTTTCTTCAA
 gtcagcggccgcatccctgcAATTTGTATAGTGAAATTTG
 gtcagcggccgcatccctgcATAGATTATTGTATAAAGAA

CPAR2_300080_4
CPAR2_302400_4
CPAR2_304080_4
CPAR2_400270_4
CPAR2_401150_4
CPAR2_500180_4
CPAR2_500360_4
CPAR2_501400_4
CPAR2_502720_4
CPAR2_503760_4
CPAR2_602370_4
CPAR2_602430_4
CPAR2_602820_4
CPAR2_704330_4
CPAR2_704370_4
CPAR2_800040_4

gtcagcggccgcatccctgcAGAGTTGTGGGCGCTACCTC
gtcagcggccgcatccctgcTGCTGACATAGTAAGTAGAA
gtcagcggccgcatccctgcGAACAAACCCCTACACCACC
gtcagcggccgcatccctgcACCCGTTGTGTTTCACTATA
gtcagcggccgcatccctgcTTGTTGGAGGTGTATGCATA
gtcagcggccgcatccctgcTCCGTTCGTAACCACTCATT
gtcagcggccgcatccctgcATGAAAACCTTGTGGATTT
gtcagcggccgcatccctgcAGAATGAAAAAGCTAGACA
gtcagcggccgcatccctgcGGAAGCCAAGAGATAAGAGC
gtcagcggccgcatccctgcTTATATAGATACTACTTAAC
gtcagcggccgcatccctgcTGTATATGGCATAACGGGGTA
gtcagcggccgcatccctgcAGGGCCTTAGGTGTAATTAT
gtcagcggccgcatccctgcAGTAGGAGAAGGGTTTGTAT
gtcagcggccgcatccctgcGTGTCTAGATTTATAGTATA
gtcagcggccgcatccctgcCGGATGTGTATATCCACATT
gtcagcggccgcatccctgcATGAAAAAGAGTATAGAAAT

Reverz primer 6

Primer neve:

CPAR2_100540_6
CPAR2_200390_6
CPAR2_303700_6
CPAR2_602840_6
CPAR2_100460_6
CPAR2_100470_6
CPAR2_104420_6
CPAR2_107240_6
CPAR2_108410_6
CPAR2_108840_6
CPAR2_200040_6
CPAR2_202040_6
CPAR2_204840_6
CPAR2_209520_6
CPAR2_300080_6
CPAR2_302400_6
CPAR2_304080_6
CPAR2_400270_6
CPAR2_401150_6
CPAR2_500180_6
CPAR2_500360_6
CPAR2_501400_6
CPAR2_502720_6
CPAR2_503760_6
CPAR2_602370_6
CPAR2_602430_6
CPAR2_602820_6
CPAR2_704330_6
CPAR2_704370_6
CPAR2_800040_6

Szekvencia (5'-3')

GCTTTTGTGTGGTGGCACTA
GCGACAATGAGTTGATTGAT
TTTGACATTTTCATCAAAGA
TGAATGTGTTTGGAAAATGT
ATATCTCGAGGCGATGTAAT
GAAGACTCATTAGTATGTT
TGGGTCACTAAATACCGCGA
GGAGGAGGATCGTCTATTTT
CACGAGATCCAGATGACTCA
CCGTTGTTCCAGGACCGCGA
ATAGTTGATCTCATTAAATCA
TAAGGTGTAGACCCTTAAC
CGACATATCGCAAACGATG
CCCTTTGCATCATCTTGTGA
ACATTTTCATCAACAACGTTA
AAATTACATATTGGTTCTGC
TCAATGAGGGATGCGACTAG
CAATGGTATGGCTTTTAATG
ACAATGGAATCTCTCGGGAC
ATTGGTGGAATCACAAGAGT
AATGTTGGTTTATTTTGAAT
ATTGCAAGATGATGATGGAC
TATTGCATTAAGTACTGACTTGG
AGAAGAAACCCCAATGAAA
GGGACCTTTTTCCGTGCAAT
TTGAGATCACAAGGCTTTAA
GATGAAGCAAACATTGTTTT
GCTATCGAGGAAGACAATGG
GCAATAGCAAACAATGAGC
TGCCGGAACAGTACATGGAG

Forward primer 5

Primer neve:

CPAR2_100540_5
CPAR2_200390_5
CPAR2_303700_5
CPAR2_602840_5
CPAR2_100460_5
CPAR2_100470_5
CPAR2_104420_5
CPAR2_107240_5
CPAR2_108410_5
CPAR2_108840_5
CPAR2_200040_5
CPAR2_202040_5
CPAR2_204840_5
CPAR2_209520_5
CPAR2_300080_5
CPAR2_302400_5
CPAR2_304080_5
CPAR2_400270_5
CPAR2_401150_5
CPAR2_500180_5
CPAR2_500360_5
CPAR2_501400_5
CPAR2_502720_5
CPAR2_503760_5
CPAR2_602370_5
CPAR2_602430_5
CPAR2_602820_5
CPAR2_704330_5
CPAR2_704370_5
CPAR2_800040_5

Szekvencia (5'-3')

gcagggatgcgccgctgacACAGCCGTTTAAAGTAGATGGagctcggatccactagtaacg
gcagggatgcgccgctgacCCTTTATGTTAAGTAGGCCGgagctcggatccactagtaacg
gcagggatgcgccgctgacCAATACGTGGTAAAGGTGCAgctcggatccactagtaacg
gcagggatgcgccgctgacAATCGCAGCCAAGTGAGTGAagctcggatccactagtaacg
gcagggatgcgccgctgacACAGACTCCCTAAGATGCAGagctcggatccactagtaacg
gcagggatgcgccgctgacACAGAGCTACAAGTTTTGGAagctcggatccactagtaacg
gcagggatgcgccgctgacAGACTATCTCTAATGACCCGagctcggatccactagtaacg
gcagggatgcgccgctgacAGGGTCTACCGACTTCGACTagctcggatccactagtaacg
gcagggatgcgccgctgacATACTCAGGCTGGACAGTCGagctcggatccactagtaacg
gcagggatgcgccgctgacATAGCGAGCTTGAACACCGCagctcggatccactagtaacg
gcagggatgcgccgctgacCCTGGCAGCGAAGAGATAACagctcggatccactagtaacg
gcagggatgcgccgctgacCGTTACTTACATACCGTAGagctcggatccactagtaacg
gcagggatgcgccgctgacCTGTCTCCAGTAGGTCAGATagctcggatccactagtaacg
gcagggatgcgccgctgacGATTAGCATCGACCACTACGagctcggatccactagtaacg
gcagggatgcgccgctgacATCCCATAGGCACTGGCATGagctcggatccactagtaacg
gcagggatgcgccgctgacATTCGACTACGACCTGGCATagctcggatccactagtaacg
gcagggatgcgccgctgacCACAGTCACTCATTAGTCGgagctcggatccactagtaacg
gcagggatgcgccgctgacTAGAGTACGCACAGCGCATCagctcggatccactagtaacg
gcagggatgcgccgctgacTAGTGATTACCACCAGCGGCagctcggatccactagtaacg
gcagggatgcgccgctgacGGGTAGCACACAATCAGCCAagctcggatccactagtaacg
gcagggatgcgccgctgacGGTAACAGTCGAGACATATCagctcggatccactagtaacg
gcagggatgcgccgctgacGTACTTAGTCAATTCGTCCagctcggatccactagtaacg
gcagggatgcgccgctgacTAAGAGTGGACAACCTGCTGAagctcggatccactagtaacg
gcagggatgcgccgctgacTACGTCTGACCATGCGTCTGagctcggatccactagtaacg
gcagggatgcgccgctgacAATACTCCTTAACTGCGGCCgagctcggatccactagtaacg
gcagggatgcgccgctgacAATAGCGTGAAACCGTGCAagctcggatccactagtaacg
gcagggatgcgccgctgacAATCGACCGGAACCGTAAGCagctcggatccactagtaacg
gcagggatgcgccgctgacGGGCCAGCAATAAAGCTCCAagctcggatccactagtaacg
gcagggatgcgccgctgacGGGCCTCATTCCGTAACATagctcggatccactagtaacg
gcagggatgcgccgctgacCACGAGGCATAGACGCTAAGagctcggatccactagtaacg

Forward 5' Check primer

Primer neve:

CPAR2_100540_5'Ch
CPAR2_200390_5'Ch
CPAR2_303700_5'Ch
CPAR2_602840_5'Ch
CPAR2_100460_5'Ch
CPAR2_100470_5'Ch
CPAR2_104420_5'Ch
CPAR2_107240_5'Ch
CPAR2_108410_5'Ch
CPAR2_108840_5'Ch
CPAR2_200040_5'Ch

Szekvencia (5'-3')

GTATGAAAAGTTTCTCCGTG
TTCTACTGGTGGTTGGAAGT
AGAAGTTTGCATCGGTTTCA
CTCTGCGGGATCATGAATTA
CTACCCAGCCCCACAAATAA
TTCCCAATTGATCTATCTG
TGCCAGAAAGTGATTTGGC
AGAGTTGTTGAAGTTGCAA
AAAGTTTACAAGCCGATGC
AAAGGAGACGGAGATGTTAT
TGAATTCAAAAAGCTGTAAC

CPAR2_202040_5'Ch
CPAR2_204840_5'Ch
CPAR2_209520_5'Ch
CPAR2_300080_5'Ch
CPAR2_302400_5'Ch
CPAR2_304080_5'Ch
CPAR2_400270_5'Ch
CPAR2_401150_5'Ch
CPAR2_500180_5'Ch
CPAR2_500360_5'Ch
CPAR2_501400_5'Ch
CPAR2_502720_5'Ch
CPAR2_503760_5'Ch
CPAR2_602370_5'Ch
CPAR2_602430_5'Ch
CPAR2_602820_5'Ch
CPAR2_704330_5'Ch
CPAR2_704370_5'Ch
CPAR2_800040_5'Ch

ACTCTCTACTGATGAATAAA
AGATGATGAAACTCCTGCCA
ACAGTTATTTACAAAACAGG
GGTGAAATCGTACAAGACCG
GTAATTCCGATCACTGACAT
TATACCTCTATTGTTAATA
ATGACACCAATTCTGTTACC
TCGTCGTCGCCATCATCTCT
ATTCTTGAAGCAGGTATCGT
GACCAAAAAAATTCACAAT
TCTGATCTAGAAAATCCACT
TTAATTAATCGTTGTGATTA
AATTAGCTACCAATTGAAG
AACCAAACTATCTCTACTCA
AAATTGACACTCTATGCCAA
ACAAAGCTATGGATTTGTAG
GCCATTCATTGCAAGGAGGA
TTGAGGTTCCGCGTTAATAG
TTCTTTTTCAAAGCTAAATA

Reverz 3' Check primer

Primer neve:

CPAR2_100540_3'Ch
CPAR2_200390_3'Ch
CPAR2_303700_3'Ch
CPAR2_602840_3'Ch
CPAR2_100460_3'Ch
CPAR2_100470_3'Ch
CPAR2_104420_3'Ch
CPAR2_107240_3'Ch
CPAR2_108410_3'Ch
CPAR2_108840_3'Ch
CPAR2_200040_3'Ch
CPAR2_202040_3'Ch
CPAR2_204840_3'Ch
CPAR2_209520_3'Ch
CPAR2_300080_3'Ch
CPAR2_302400_3'Ch
CPAR2_304080_3'Ch
CPAR2_400270_3'Ch
CPAR2_401150_3'Ch
CPAR2_500180_3'Ch
CPAR2_500360_3'Ch
CPAR2_501400_3'Ch
CPAR2_502720_3'Ch
CPAR2_503760_3'Ch
CPAR2_602370_3'Ch
CPAR2_602430_3'Ch
CPAR2_602820_3'Ch

3' Check

TAGCAATCAAAAAGGAACAT
GAGATGTGGAATGGTCACAA
ACCGGATGAATCACCAATAA
TTCATGGGTGGTGAAGCATT
CTACCCAGCCCCACAAATAA
TTTGTGTCTAACATCTCCAT
CATTGGATTCGTTACCGACC
AACACACGATGGTACTTTGT
ACAGTGGTATTCAACTGCTC
CACTAGGAGTATTGAAGTTG
GTCCTGGGTTTCATTGATAT
AAGTTTATGTACTTGATTGC
GTTGCTCATACTTTTTTCAGG
TCAAATAAATATACAAAAA
CGCGCAGTAAAGTACGGACA
TTGGGCGAGGAATGGCGAGG
ACTTACACGAGAAGTGACGA
AGGGTACATTAACGTACTTT
CATCACATACTTATGTAAGT
TTGATTTTTTACCCATTGAA
GATCGAGGATTGAAATCAC
AACAATTTGCTGAATTAAC
TGACACAATTGAAACATCCT
CGATACGTCGAGAATTCGTT
GTGAACTAAAAAAAAGAA
TCATAACTCAGAATAGGTAA
TGTTCCAGTGATTTTGATAA

CPAR2_704330_3'Ch
CPAR2_704370_3'Ch
CPAR2_800040_3'Ch

TGCTGAATCTAACATCAAGT
ATTGTCTAATCATACTGACT
CAATTCTACAACAACACTATTG

Felhasznált real time primerek listája:

Primer neve	Szekvencia (5'-3')
CP_TUB4 ReTi frw	GAACACTTATGCCGAGGACAAC
CP_TUB4 ReTi rev	ACTCTCACCCTGACTCCTTGC
CPAR2_100540 ReTi frw	TGATGCAATACTGGCAAGAGAC
CPAR2_100540 ReTi rev	TTTGATTCTAGCCAATGGTAGCTG
CPAR2_200390 ReTi frw	AGAAAGCAGCCACTATTGCTTC
CPAR2_200390 ReTi rev	CCAATGAACGTACTCCTCCCTTG
CPAR2_303700 ReTi frw	CCTGATGATGATGCTTCCAG
CPAR2_303700 ReTi rev	GATCCAACAAGACCTCATCTTTCG
CPAR2_602840 ReTi frw	ACCGGTGCCATTAGTATGGC
CPAR2_602840 ReTi rev	ACTGCTTAGCGCTACTCATGG
CPAR2_402880 -FRP1-RT-Fw	AGTTCATACAAGTCGTTGGCGG
CPAR2_402880 -FRP1-RT-Rev	CCGTCTAGCCACTTGACACTG
CPAR2_407500-CYC1- RT-Fw	GTACTAAGATGGCTTTCGGTGGT
CPAR2_407500-CYC1-RT-Rev	AAGTTGCTTTGTGCAAGTAGGT
CPAR2_207710 -COX4- RT-Fw	CCGAGGGTAAAGGTACCATGG
CPAR2_207710 -COX4- RT-Rev	GGCTTGTGGTCAAGTTCAGC
CPAR2_805640-RT-Fw (CHS1)	TGGTGCAAGTGTATGAGCCT
CPAR2_805640-RT-Rev (CHS1)	GAGCGATAATGCAGCCACAG
CPAR2_701490-RT-Fw (CHS2)	TGGCATTGTTTAGGTTCTTGG
CPAR2_701490-RT-Rev (CHS2)	AGTTGCATGTTCACTGCGTCT
CPAR2_801800-RT-Fw (CHS3)	GAGGGAACGTAGAAGTGCTGA
CPAR2_801800-RT-Rev (CHS3)	CTTCTGCCATAGGGACTGGC
CPAR2_502940-RT-Fw (CHS8)	GACAAACCCAGACGGGTCTA
CPAR2_502940-RT-Rev (CHS8)	TGCCATTCCAGCAACAATCC
CPAR2_800050-RT-Fw (CHT1)	GTGGCCACTTCAGCAGTAGC
CPAR2_800050-RT-Rev (CHT1)	AGAGACCACCAAGCCAGTTG
CPAR2_502140-RT-Fw (CHT2)	GCTGAAACTCTCACCACCAC
CPAR2_502140-RT-Rev (CHT2)	GATTTCAAGGAGCAGCAGCTG
CPAR2_200660-RT-Fw (CHT3)	CCGGTTCACAACCTCAACT
CPAR2_200660-RT-Rev (CHT3)	TGACGCGTTGTGCTTTGTTG
CPAR2_211950-RT-Fw (CHT4)	CTCATCGGGGGACAAGCTT
CPAR2_211950-RT-Rev (CHT4)	TCTAATTGACGAACACCGCC
CPAR2_603440 -CPH2- RT-Fw	AGCTTGAACCTGGTGTCAACAAG
CPAR2_603440 -CPH2- RT-Rev	CGGCCTCTTTATCGCTATCGT
CPAR2_501290 -CZF1- RT -Fw	GCACCGAGTGTGGTTCGATTA
CPAR2_501290 -CZF1- RT-Rev	CCTTGGGTTTGTCTTGTGCTC
CPAR2_800210 -GZF3- RT -Fw	CAAATGGCACAAGCTCAACGT
CPAR2_800210 -GZF3- RT-Rev	TCGATTCCCAACATCTCGC

CPAR2_803820 -UME6- RT -Fw	ACGAGAAGAAGGTTGCTTCCT
CPAR2_803820 -UME6- RT-Rev	CCCGCACGAAGGTCTAACTT
CPAR2_701620-EFG1-RT-Fw	CCAATTCAGAACCCGGCAG
CPAR2_701620-EFG1-RT-Rev	ACATGTACTCCTCCAACACTAGC
CPAR2_205990-BCR1-RT-Fw	GCATAGGTAGTGTGGGGAGC
CPAR2_205990-BCR1-RT-Rev	GTGCTCGCAGTAACATTAGCG
CPAR2_204370-ACE2-RT-Fw	GAGTAAATGTGCTTGTGGGAAGG
CPAR2_204370-ACE2-RT-Rev	ACCATGCCCTTTACCCAC

Rekonstruált törzsek előállításához felhasznált primerek:

attB1 szekvencia + forward primer

Primer név	Szekvencia (5'-3')
------------	--------------------

CPAR2_100540FP *attB1*

GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGTATTTAACCCCAACTCAAAG

CPAR2_200390FP *attB1*

GGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGTTGTCACTTCTGGCCCCCAAG

CPAR2_303700FP *attB1*

GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCAAGGTTTCAAAAAAGTTCAG

CPAR2_602840FP *attB1*

GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTTGCCCAAAGTAAACGATTTCGC

attB2 szekvencia + reverz primer

Primer név	Szekvencia (5'-3')
------------	--------------------

CPAR2_100540RP *attB2*

GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGTGTTTGCTTTTGTGTGGTG

CPAR2_200390RP *attB2*

GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCAAGCTGCAGGCGACAATGAG

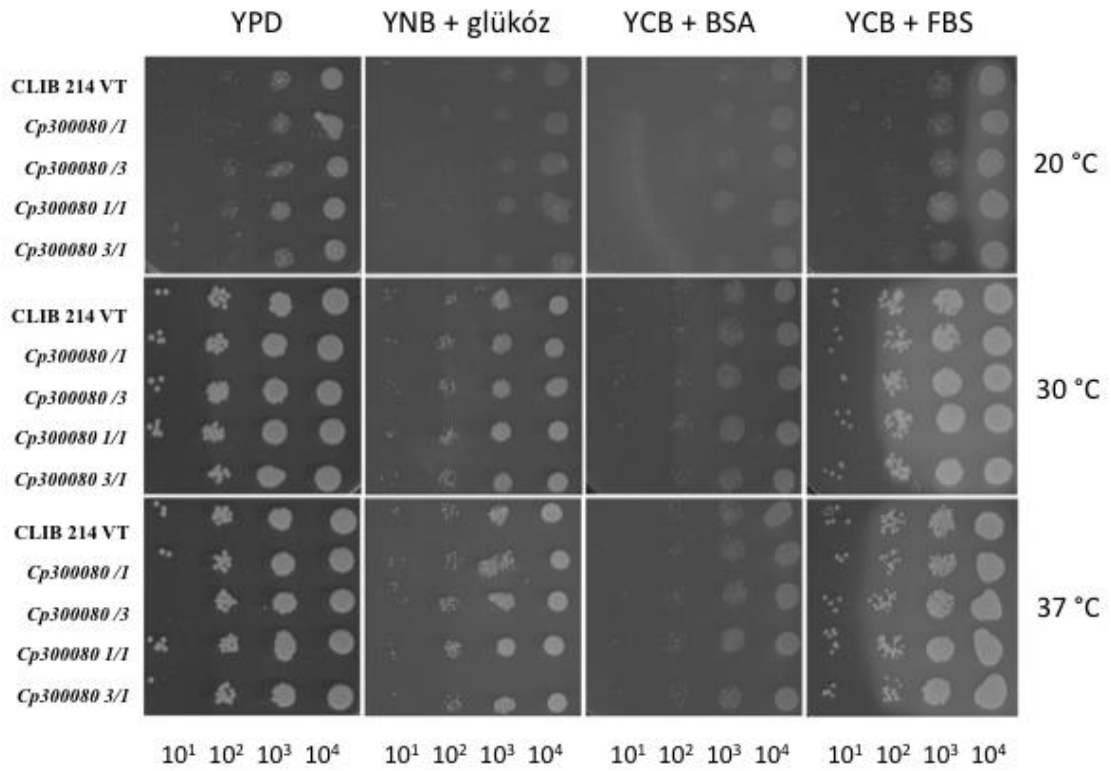
CPAR2_303700RP *attB2*

GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGGATGCTAAGTTTGACATTTC

CPAR2_602840RP *attB2*

GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTCGCTAAATTTGAATGTGTTTGG

3. számú melléklet: Példa a különböző típusú táptalajokon történő növekedési vizsgálatokra.



4. számú melléklet: Példa a különböző stresszorok jelenlétére adott válaszra - túlélési görbék.

