

DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

***CANDIDA PARAPSILOSIS* SZEKRETÁLT
ASZPARTIL PROTEINÁZOK VIRULENCIÁBAN
BETÖLTÖTT SZEREPÉNEK VIZSGÁLATA**

Horváth Péter Ferenc

Témavezető:
Dr. Gácsér Attila
Tudományos főmunkatárs



Biológia Doktori Iskola
Szegedi Tudományegyetem
Természettudományi és Informatikai Kar
Mikrobiológiai Tanszék

Szeged

2014

Irodalmi áttekintés

A *Candida* fajok által kiváltott megbetegedések az elmúlt három évtized során egyre növekvő egészségügyi problémát jelentenek. Bár ezen élesztők többsége a normál, humán mikroflóra része, bizonyos körülmények között a bőrt, nyálkahártyát, vagy az egész szervezetet érintő, szisztémás fertőzés kiváltására képesek. Epidemiológiai vizsgálatok szerint, a felnőtt lakosság körében a kandidiázisos esetek legnagyobb hányadát a *C. albicans* okozza, azonban újszülöttek körében a kandidiázisos kórképek kialakulásáért felelős ágensek körében a *C. parapsilosis* sok esetben a *C. albicans* által kiváltott esetszámot is felülmúlja. Bár az ezredforduló óta a nem-*albicans* fajok (újszülöttek körében főként a *C. parapsilosis*) által okozott megbetegedések aránya növekvő tendenciát mutat, azok patomechanizmusáról, virulencia faktorairól kevés ismeret áll rendelkezésünkre. *C. parapsilosis* által kiváltott fertőzések esetén jelentős szerep jut a mikroba által szekretált hidrolitikus enzimeknek, főként a lipázoknak és szekretált aszpartil proteinázoknak.

Korábbi tanulmányok lipáz deficiens *C. parapsilosis* törzs esetén jelentős virulencia csökkenést mutattak ki.

Szekretált aszpartil proteinázok esetén a *C. parapsilosis* két fő proteinázának, a Sapp1 és Sapp2 fehérjék enzimológiai tisztítása és jellemzése történt meg, ám azok virulenciában betöltött szerepe eddig nem tisztázott. Továbbá, bár *C. parapsilosis* esetén napjainkra számos géndelécíós módszer elérhető, azonban *C. albicans*-al ellentétben overexpressziós módszer ezen mikroba esetén nem áll rendelkezésre.

Ezen ismeretek bővítése céljából munkánk kezdetén a következő célkitűzéseket tettük: célunk volt 1.: a *C. parapsilosis* fő szekretált aszpartil proteinázának, a Sapp1 fehérjének virulenciában betöltött szerepének tisztázása, 2.: a *C. parapsilosis* szekretált aszpartil proteinázainak virulenciában betöltött általános szerepének tisztázása egy Sapp negatív törzs létrehozásával, valamint 3.: egy *C. parapsilosis*-ra optimalizált overexpressziós rendszer alapjainak kidolgozása.

Alkalmazott módszerek

A kísérletekben használt törzsek előállítása, molekuláris technikák: kompetens *E. coli* és *C. parapsilosis* törzsek előállítása, kompetens sejtek transzformációja, PCR, deléciós konstrukciók előállítása, Gateway reakciók, DNS kivonás, Southern hibridizáció, RNS kivonás élesztőből, cDNS írás, qRT-PCR, HPLC analízis, áramlási citometria, ELISA vizsgálat

Az alkalmazott sejtek tenyésztése, *in vitro* fertőzéses kísérletek: primer sejtek izolálása, differenciáltatása, fenntartása, élesztő törzsek fenntartása és felszaporítása, fagociták *in vitro* fertőzése, fagociták ölési hatékonyságának vizsgálata, gazdasejt károsodás mértékének megállapítása, élesztő törzsek szérumérzékenységének vizsgálata

Mikroszkópos technikák: Calcofluor White festés, Konkavalin A festés, Wheat Germ Agglutinin festés, Calcofluor White/lysotracker Red festés, scanning elektronmikroszkópia

In vivo vizsgálat: *Galeria mellonella* lárvák fertőzése, *in vivo* túlélésük vizsgálata

Elért eredmények

A *C. parapsilosis* szekretált aszpartil proteináz 1 (Sapp1) virulenciában betöltött szerepének vizsgálata.

Munkánk kezdetén a *C. albicans* által szekretált aszpartil proteinázok (Sap) virulenciában betöltött szerepe régóta tanulmányozott volt (Hube és Naglik 2001). *C. albicans*-ban végzett vizsgálatok azt mutatták, hogy ezen fajban a szekretált aszpartil proteinázok virulenciában betöltött szerepe igen sokrétű, számos, a gazdaszervezetben megtalálható strukturális és antimikrobiális protein bontására képesek, ezáltal elősegítve a mikroba szervezeten belüli terjedését (Hube 1998, Naglik és mtsai. 2003).

Ezzel ellentétben, *C. parapsilosis* esetén a mikroorganizmus által szekretált két aszpartil proteináz (Sapp1, Sapp2) fehérje tisztítása és biokémiai jellemzése ugyan megtörtént (Hruskova-Heidingsfeldova és mtsai. 2009), ám azok virulenciában betöltött szerepéről ismeretek nem álltak rendelkezésre. Az enzimológiai vizsgálatok szerint a mikroba fő szekretált aszpartil proteináza a Sapp1 fehérje, amely induktív körülmények közt legalább egy nagyságrenddel nagyobb mértékben

termelődik, mint a Sapp2 fehérje, valamint szubsztrát specifitása is sokkal szélesebb (Hruskova-Heidingsfeldova és mtsai. 2009), így munkánk első részében a Sapp1 fehérje virulenciában betöltött szerepét vizsgáltuk.

A rendelkezésünkre álló szekvencia adatok felhasználásával elvégeztük a *SAPP1* lokusz *in silico* analízisét. Az analízis két identikus 2871bp méretű szekvenciát azonosított, egymástól 32kb távolságra, amely szakasz egy-egy kópiában tartalmazta a *SAPP1* gént, így a két kópiát *SAPP1a* és *SAPP1b* néven különítettünk el egymástól. Geraldine Butler és munkatársai 2009 végén publikálták a *C. parapsilosis* annotált genomszekvenciáját (Butler és mtsai. 2009), amely adatok megerősítették az *in silico* vizsgálat helyességét. A *caSAT1* flipper rendszer segítségével létrehoztuk a *C. parapsilosis* $\Delta/\Delta sapp1a$ deléciós törzset, valamint a *SAPP1b* gént tartalmazó duplikálódott régió deléciójával létrehoztuk a *C. parapsilosis* $\Delta/\Delta sapp1b$ deléciós törzset is. Ezen kívül sikerrel létrehoztunk egy $\Delta/\Delta sapp1a-\Delta/\Delta sapp1b$ dupla deléciós törzset is.

A *SAPP1* gének elvesztését RNS és enzim aktiviás szintjén egyaránt megerősítettük, qRT-PCR, valamint HPLC vizsgálatok során. A dupla deléciós törzs esetén sem RNS, sem enzim aktivitási szinten nem tudtunk kimutatni *SAPP1* génexpressziót, illetve Sapp1 fehérje aktivitást. Érdekes módon a dupla deléciós törzs esetén a vad típushoz képest emelkedett mértékű *SAPP2* génexpressziót, valamint enzim aktivitást tapasztaltunk. Ezen jelenség hátterében valószínűsíthetően egy visszacsatoló mechanizmus állhat, amely működésének eredményeként a Sapp2 fehérje emelkedett termelését vagy a már megtermelt enzim aktivitásának fokozódását eredményezte, amely mintegy kompenzációs mechanizmusként reagál a Sapp1 elvesztésére. Vizsgáltuk továbbá a putatív szekvenciaként számon tartott *SAPP3* gén transzkripció változását is. A vad típus esetén, induktív körülmények között tízszeres transzkripció növekedést tapasztaltunk, míg azon mutánsok esetén, melyek Δ/Δ sapp1b deléciót hordoztak, a *SAPP3* gén expressziója szignifikáns mértékben csökkent. További szekvencia analízis vizsgálatok kimutatták, hogy a *SAPP3* csupán minegy 500 bázispár

távolságban helyezkedik el a *SAPP1b* lokuszhoz tartozó duplikálódott régiótól. Mivel a *SAPP1b* lokusz deléciója csupán a duplikálódott régió deléciójával volt kivitelezhető, így ezen deléció érinthette a *SAPP3* gén szabályozó régióját is.

C. albicans esetén régóta tudott, hogy a szekretált aszpartil proteinázok képesek a szérumban található immunfehérjék bontására, ezáltal semlegesítve a gazda szervezet humorális védekezését (Gropp és mtsai. 2009). Annak kiderítésére, hogy a *Sapp1* fehérje rendelkezik-e hasonló szereppel elvégeztük a vad típusú és a különböző *Sapp1* mutáns törzsek szérumerzékenységének vizsgálatát. Intakt humán szérum jelenlétében a vad típusú, és a $\Delta/\Delta\text{sapp1a}$ és $\Delta/\Delta\text{sapp1b}$ törzsek növekedése között nem mutatkozott különbség, viszont a *SAPP1* deléciós mutáns törzs esetén a növekedés mértéke jelentős mértékben visszaesett. A kapott eredmény arra enged következtetni, hogy a *C. parapsilosis* *Sapp1* enzimnek, hasonlóan a *C. albicans* Sap proteinázokhoz szerepe lehet a szérumban megtalálható immunfehérjék bontásában.

Egy fertőzés folyamatában a szervezetbe kerülő patogénnel elsőként különböző fagocita sejtek kerülnek kapcsolatba. A szervezetbe jutott kórokozók felszínükön evolúciósan nagy mértékben konzervált motívumokat, patogén-asszociált molekuláris mintázatokat (PAMP) hordoznak, melyeket a makrofág sejtek mintázatfelismerő receptorokkal (PRR) ismernek fel. A felismerést követően lezajlik a mikroba fagocitózisa. A primer fagoszóma lizoszómával való fúziója pH csökkenéssel jár, melynek során megtörténik a patogén eliminációja (Netea és mtsai. 2008).

Hogy ezen folyamatokat tanulmányozzuk, primer humán monocita sejtek (PBMC), illetve humán makrofágok (PBMC-DM) felhasználásával *in vitro* fagocitózis vizsgálatokat végeztünk. A vizsgálathoz a vad típusú, valamint a deléciós törzseket használtuk fel. Áramlási citometriás méréseink szerint a vad típushoz képest a *SAPPI* deléciós törzsek fagocitózisa jóval eredményesebben valósult meg. A fagocitózis folyamatának részletesebb tanulmányozása érdekében fluoreszcens mikroszkópos vizsgálatokat végeztünk PBMC-DM sejtek és vad típusú, valamint deléciós *C.*

parapsilosis törzsek felhasználásával. A vad típussal fertőzött mintákhoz képest a Sapp1 fehérjét nem termelő mutáns törzssel fertőzött PBMC-DM sejtek esetén emelkedett mértékű fago-lizoszóma fúziót figyeltünk meg. Az általunk végzett megfigyelés felveti annak a lehetőségét, hogy a Sapp1 fehérjének szerepe van a mikroba, fagocita sejten belüli túlélésében is.

PBMC és PBMC-DM sejtek alkalmazásával vizsgáltuk a gazda sejtek vad típusú és deléciós mutánsokkal szembeni gombaölési képességét. Mind a PBMC, mind az ezekből differenciáltatott primer makrofágok esetén a dupla deléciós mutánsokkal szembeni gombaölési képesség szignifikáns emelkedést mutatott. Ezzel párhuzamosan a *SAPP1* deléciós törzs gazdasejtet károsító képessége csökkenést mutatott a vad típusú törzssel összevetve.

Mindezen eredményeket összegezve eredményeink azt mutatják, hogy a Sapp1 fehérje jelentős szereppel bír a mikroba virulenciájának kialakításában. Szerepe van a gazda antimikrobiális fehérjéinek semlegesítésében, a fagocitózis gátlásában,

valamint nagy mértékben hozzájárul a patogén fagocita sejten belüli túlélésében egyaránt.

A *C. parapsilosis* „Sapp negatív” szekretált aszpartil proteináz nem termelő mutáns törzsének virulencia vizsgálata.

C. albicans esetén tíz *SAP* gént azonosítottak (*SAP1-SAP10*), melyek egy géncsaládot alkotnak (Hube és Naglik 2001). Bár ezen organizmusban a *SAP* gének szerepe jól tanulmányozott, mégis egy teljes mértékben *SAP* deficiens törzs előállítása a gének nagy számából adódóan nem lehetséges. A *C. parapsilosis* genomjában mindösszesen két *SAPP* gén van jelen, amelyekről bizonyítottan aktív szekretált proteináz képződik, illetve egy feltételezhetően szekretált Sapp fehérjét kódoló gént azonosítottak, így ebben a fajban egy *SAPP* deficiens törzs előállítása, ezáltal egy olyan modellrendszer kialakítása, melyben a szekretált aszpartil proteinázok virulenciában betöltött általános szerepe tanulmányozható, jóval eredményesebben megvalósítható feladat.

Ezen cél elérése érdekében a $\Delta\Delta sapp1a$ - $\Delta\Delta sapp1b$ törzset kiindulási törzsként alkalmazva, a

caSAT1 flipper rendszer segítségével elvégeztük a *SAPP2* gén delécióját. A *SAPP2* gén delécióját Southern hibridizáción kívül ebben az esetben is megerősítettük mind transzkripciós szinten, mind enzim aktivitási szinten.

A Δ/Δ *sapp1a*- Δ/Δ *sapp1b*- Δ/Δ *sapp2* törzs esetén sem *SAPP1*, sem *SAPP2* transzkripció nem volt detektálható, valamint a *SAPP3* gén transzkripciós szintje szignifikáns csökkenést mutatott. Ezen kívül a Δ/Δ *sapp1a*- Δ/Δ *sapp1b*- Δ/Δ *sapp2* törzs esetén nem detektáltuk sem a *Sapp1*, sem a *Sapp2* fehérjékre jellemző enzimaktivitást. A létrehozott mutáns tehát mind expressziós mind enzimaktivitás tekintetében „*Sapp* negatív”-nak nevezhető.

Bár előző munkánk során létrehoztunk egy *Sapp1* hiányos *C. parapsilosis* törzset, vizsgálni kívántuk ezen munka keretében, hogy a további szekretált aszpartil proteináz fehérjék elvesztésének van-e további hatása a mikroba humán szérumban mért növekedésére. Intakt humán szérum esetén a Δ/Δ *sapp1a*- Δ/Δ *sapp1b*- Δ/Δ *sapp2* mutáns törzs növekedése bár a vad típusú törzshöz képest szignifikáns csökkenést mutatott, összevetve az előző

munkánk során mért *SAPP1* deléciós törzs szérumban mutatott növekedéssel, különbség nem volt megállapítható. Ez az eredmény azt sugallja, hogy a Sapp1 fehérje az, amely hatékonyan képes semlegesíteni a gazda szervezet immválaszban fontos peptidjeit.

A fagocitózis folyamatának tanulmányozásához áramlási citometriás módszert alkalmaztunk. Eredményeink azt mutatják, hogy a Sapp negatív $\Delta/\Delta\text{sapp1a}$ - $\Delta/\Delta\text{sapp1b}$ - $\Delta/\Delta\text{sapp2}$ törzset jóval nagyobb mértékben fagocitálják a gazda sejtek, mint a vad típusú törzset, ám összevetve ezen deléciós mutánst az előző munkánkban létrehozott *SAPP1* deléciós $\Delta/\Delta\text{sapp1a}$ - $\Delta/\Delta\text{sapp1b}$ törzssel a fagocitózis százalékában nem mutatkozik különbség, amely szintén arra utal, hogy a *C. parapsilosis* virulenciájában a szekretált aszpartil proteinázok közül a Sapp1 tölti be a legnagyobb szerepet.

C. albicans esetén a Sap1, Sap2 és Sap6 megnöveli a primer monociták által termelt IL-1 β , TNF- α és IL-6 mennyiségét, továbbá a Sap3 szintén indukálja az IL-1 β és TNF- α termelését (Pietrella és mtsai. 2010) Hogy kiderítsük, vajon *C. parapsilosis* esetén a Sapp fehérjéknek van-e hasonló szerepe, vizsgáltuk a fertőzés

során termelődő proinflammatorikus citokinek (IL-1 β , TNF- α és IL-6) mennyiségét. A vad típushoz képest szignifikáns különbséget nem tapasztaltunk a Sapp negatív mutáns törzzsel fertőzött mintában, ám a Sapp fehérjék citokin válaszban betöltött szerepének tanulmányozásában ez csupán mint egy előzetes vizsgálat játszott szerepet.

Vizsgáltuk továbbá a vad típusú és deléciós mutáns törzsek PBMC-DM sejtek általi ölési hatékonyságát. A Sapp negatív halmozottan deléciós mutáns törzs esetén a gazdasejtek általi gombaölési hatékonyság szignifikáns emelkedést mutatott. Összevetve az előző munkánkban tapasztalt *Δ/Δ sapp1a- Δ/Δ sapp1b* törzzsel szembeni ölési hatékonysággal, ebben az esetben a Sapp negatív törzzsel szembeni eliminációs hatékonyság további növekedést mutatott, amely azt bizonyítja, hogy a Sapp1 mellett további szekretált proteinázok is szereppel bírnak a mikroba makrofágon belüli túlélésében. Vizsgáltuk ezen felül a deléciós törzs gazdasejt károsító képességét is. A Sapp negatív törzs gazdasejtet károsító képessége a vad típuséhoz képest szignifikáns csökkenést mutatott, ám

összevetve az előző tanulmányban vizsgált Sap1 deléciós mutáns törzssel, a két deléciós törzs gazdasejt károsító képessége eltérést nem mutatott.

Galleria mellonella (Nagy viaszmony) lárvák felhasználásával *in vivo* túlélési vizsgálatot végeztünk, ám a vad típusú törzssel fertőzött és a deléciós törzssel fertőzött egyedek túlélése között szignifikáns eltérést nem tapasztaltunk.

C. albicans esetén a Sap9 és Sap10 fehérjékről ismert, hogy glikozil-foszfatidil-inozitol oldalláncot hordoznak, ezáltal a sejtfalba beépülni és a sejtfal integritását fenntartani képesek (Schild és mtsai. 2011). Ezen adatokból kiindulva elemeztük a vad típusú, a $\Delta/\Delta\text{sap1a}-\Delta/\Delta\text{sap1b}$ valamint a $\Delta/\Delta\text{sap1a}-\Delta/\Delta\text{sap1b}-\Delta/\Delta\text{sap2}$ deléciós törzsek sejtfalösszetételét. A vad típusú törzshöz képest a két deléciós mutáns törzs sejtfalösszetétele jelentős különbségeket mutatott. Mindkét deléciós törzs esetén a sejtfalban található kitin tartalom jelentősen lecsökkent, míg a glükán tartalom a $\Delta/\Delta\text{sap1a}-\Delta/\Delta\text{sap1b}-\Delta/\Delta\text{sap2}$ törzs esetén többszöröse volt a vad típusú törzsének. Pásztázó elektronmikroszkópos vizsgálataink szerint ugyanezen

deléciós törzs sejtfalának felszíne jóval kevesebb sejtalkitüremkedést mutat, mint a vad típusú törzs.

Mindezen adatok alátámasztják a *C. parapsilosis* szekretált aszpartil proteinázok sokrétű szerepét. Bár alapvető szerepük a peptidkötések hidrolízise, mégis vizsgálataink szerint ezen aszpartil proteinázok jelentős szereppel bírnak a mikroba virulenciájának kialakításában. Szerepük van a gazda szervezet szérumfehérjéinek bontásában, a fagocitózis gátlásában, valamint a mikroba fagocita sejten belüli bontásában egyaránt. Másik fontos szerepük, amelyre vizsgálataink fényt derítettek a mikroba sejtfal összetételének szabályozásában áll. A sejtfal összetétel szekretált aszpartil proteinázok általi szabályozásának pontos mechanizmusa ezidáig nem ismert, így ezek további vizsgálatok tárgyát képezhetik a jövőben.

C. parapsilosis overexpressziós rendszer alapjainak kidolgozása.

A CUG kládba tartozó *Candida* fajok többsége diploid organizmus, melyek szexuális ciklussal nem rendelkeznek. Egy adott gén deléciója sok esetben (pl. több kópiában jelen lévő gének esetén) hosszú időt vehet igénybe. Ezen problémára megoldást jelenthet a célzott gének túlműködtetése. *C. parapsilosis* esetén gén overexpressziós rendszer ezidáig nem áll rendelkezésre, ezért célunk volt egy *C. parapsilosis*-ra optimalizált overexpressziós rendszer kidolgozása. Előzőleg Chauvel és munkatársai *C. albicans*-ban kidolgoztak egy jól működő rendszert, melynek segítségével rövid időn belül nagy számú gén túlműködtetése vált lehetségessé (Chauvel és mtsai. 2012). Ezen rendszer esetén a túlműködtetni kívánt gént, amely egy erős, konstitutív promoter szabályozása alatt áll, a *C. albicans* *RP10* régiójába juttatják be.

C. parapsilosis-on végzett munkánk első lépéseként a *C. albicans* *RP10* régióját, a pSFS2 vektor segítségével a *C. parapsilosis* CLIB 214 leucin auxotróf törzsének *RP10* régiójába integráltuk, melynek

eredményeként a létrehozott törzsben lehetőség nyílik az előzőleg leírt overexpressziós rendszer adaptációjára.

Ahhoz, hogy megbizonyosodjunk arról, hogy az így létrehozott törzs képes a majdani overexpressziós vektorok működtetésére, a Clp10-caTDH3-GFP vektor leucin auxotrófia markert hordozó változatát a létrehozott fogadó törzs *C. albicans* RP10 régiójába integráltuk. Fluoreszcens mikroszkópiás vizsgálataink azt mutatták, hogy a transzformáns telepek minden sejtje GFP pozitív, így a konstitutív TDH3 promoter által működtetett gén ezen organizmus esetén is kifejeződik. Ezzel megbizonyosodhattunk arról, hogy a *C. parapsilosis*, hasonlóan a *C. albicans*-hoz képes a TDH3 promoter működtetésére, ezáltal a bejuttatott gén kifejeződése lehetségessé válik ezen fajban is.

Az overexpressziós vektorok rövid időn belüli létrehozásához a gateway klónozási rendszert alkalmaztuk. Az első, gateway klónozással előállított overexpressziós vektorunk a *WOR1* gént hordozó pTDH3-GTW-LEU2 destination vektor. A *WOR1* gén *C. albicans* béli ortológjáról kimutatták, hogy a white-opaque átmenetben játszik fontos szerepet (Huang és

mtsai. 2006). Az elkészített destination vektor *C. albicans* *RP10* régióját hordozó *C. parapsilosis* törzsbe történő transzformációját követően, a transzformánsok qRT-PCR vizsgálata a *WOR1* gén expressziójában bekövetkezett mintegy tízszeres overexpressziót mutattak.

Ez az eredmény jól mutatja, hogy az alkalmazott rendszer eredményesen használható *C. parapsilosis* génektúlműködtetésére, ezáltal új utat nyit meg a mikroba génjeinek tanulmányozására. A rendszer előnye, hogy a deléciós módszerekkel összevetve jóval rövidebb idő alatt létrehozhatók az overexpressziós mutáns törzsek, így rövid időn belül nagy számú gén vizsgálata (akár a *C. parapsilosis* teljes ORF-om) válik lehetségessé.

Összefoglalás

- Munkánk során előállítottunk a *C. parapsilosis* *SAPP* génjeire heterozigóta és homozigóta deléciós mutánsokat
- Munkánk során megerősítettük a *SAPP* gének elvesztését mind transzkripciós, mind fehérje szinten
- Munkánk során bebizonyítottuk, hogy a Sapp1 fehérjének szerepe van a szérumban való túlélésben
- Munkánk során megállapítottuk, hogy a Sapp fehérjének szerepük van a fagocitózis gátlásában és a gazdasejteken belüli túlélésében
- Munkánk során vizsgáltuk a gazdasejtek által termelt proinflammatorikus citokinek mennyiségét *in vitro* fertőzési rendszerben
- Munkánk során *in vivo* fertőzési rendszerben vizsgáltuk a *G. mellonella* lárvák túlélését
- Munkánk során előállítottunk egy overexpresszióra alkalmas *C. parapsilosis* fogadó törzset
- Munkánk során elvégeztük az előállított fogadó törzs GFP konstrukcióval való transzformációját
- Munkánk során létrehoztunk egy *C. parapsilosis* gén overexpresszióra alkalmas vektort

-Munkánk során túlműködtettük a *WOR1* gént a *C. parapsilosis* fogadó törzsében

A tézisfüzetben szereplő hivatkozások jegyzéke

Butler, G., Rasmussen MD, Lin MF, Santos MA, Sakthikumar S, Munro CA, Rheinbay E, Grabherr M, Forche A, Reedy JL, Agrafioti I, Arnaud MB, Bates S, Brown AJ, Brunke S, Costanzo MC, Fitzpatrick DA, de Groot PW, Harris D, Hoyer LL, Hube B, Klis FM, Kodira C, Lennard N, Logue ME, Martin R, Neiman AM, Nikolaou E, Quail MA, Quinn J, Santos MC, Schmitzberger FF, Sherlock G, Shah P, Silverstein KA, Skrzypek MS, Soll D, Staggs R, Stansfield I, Stumpf MP, Sudbery PE, Srikantha T, Zeng Q, Berman J, Berriman M, Heitman J, Gow NA, Lorenz MC, Birren BW, Kellis M, Cuomo CA. (2009) Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight *Candida* genomes. *Nature* 459(7247):657-62.

Gropp, K., Schild L, Schindler S, Hube B, Zipfel PF, Skerka C. (2009) The yeast *Candida albicans* evades human complement attack by secretion of aspartic proteases. *Mol Immunol* 47(2-3):465-75.

Hruskova-Heidingsfeldova, O., Dostál J, Majer F, Havlikova J, Hradilek M, Pichová I. (2009) Two aspartic proteinases secreted by the pathogenic yeast *Candida parapsilosis* differ in expression pattern and catalytic properties. *Biol Chem* 390(3):259-68.

Huang, G., Wang H, Chou S, Nie X, Chen J, Liu H. (2006) Bistable expression of WOR1, a master regulator of white-opaque switching in *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(34):12813-8.

Hube, B. (1998) Possible role of secreted proteinases in *Candida albicans* infections. *Rev Iberoam Micol* 15(2):65-8.

Hube, B., J. Naglik (2001) *Candida albicans* proteinases: resolving the mystery of a gene family. *Microbiology* 147(Pt 8):1997-2005.

Naglik, J. R., S. J. Challacombe, B. Hube (2003) *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev* 67(3):400-28.

Netea, M. G., Brown GD, Kullberg BJ, Gow NA.(2008) An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system. *Nat Rev Microbiol* 6(1):67-78.

Pietrella, D., Rachini A, Pandey N, Schild L, Netea M, Bistoni F, Hube B, Vecchiarelli A. (2010) The inflammatory response induced by aspartic proteases of *Candida albicans* is independent of proteolytic activity. *Infect Immun* 78(11):4754-62.

Schild, L., Heyken A, de Groot PW, Hiller E, Mock M, de Koster C, Horn U, Rupp S, Hube B. (2011) Proteolytic cleavage of covalently linked cell wall proteins by *Candida albicans* Sap9 and Sap10. *Eukaryot Cell* 10(1):98-109.

Publikáció referált folyóiratokban

Horváth P, Nosanchuk JD, Hamari Z, Vágvölgyi C, Gácsér A. (2012). The identification of gene duplication and the role of secreted aspartyl proteinase 1 in *Candida parapsilosis* virulence. J Infect Dis. 205 (6): 923-33.

IF: 5,848

Németh T, Tóth A, Szenzenstein J, Horváth P, Nosanchuk JD, Grózer Z, Tóth R, Papp C, Hamari Z, Vágvölgyi C, Gácsér A. (2013). Characterization of virulence properties in the *C. parapsilosis sensu lato* species. PLoS One 8, e68704. **IF: 3,73**

Tóth A, Németh T, Csonka K, Horváth P, Vágvölgyi C, Vizler C, Nosanchuk JD, Gácsér A. (2014). Secreted *Candida parapsilosis* lipase modulates the immune response of primary human macrophages. Virulence. 5(4).

IF: 2,787

Összesített impakt faktor: 12,365

