

GAZDA - PATOGÉN KÖLCSÖNHATÁS VIZSGÁLATA CANDIDA FERTŐZÉSEK SORÁN

DOKTORI ÉRTEKEZÉS

NÉMETH TIBOR MIHÁLY

**TÉMAVEZETŐ:
DR. GÁCSER ATTILA
TUDOMÁNYOS FŐMUNKATÁRS**

BIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA



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

**SZEGED
2013**

TARTALOMJEGYZÉK

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	1
2. BEVEZETÉS	4
3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	6
3.1. Az immunrendszer eredete és feladata.....	6
3.2. A <i>Candida</i> nemzetség általános jellemzése.....	9
3.3. A <i>Candida</i> fajok egészségügyi jelentősége	10
3.4. A szisztémás candidiázis epidemiológiája és a nem- <i>albicans</i> fajok	11
3.5. A <i>C. parapsilosis</i> általános jellemzése	12
3.6. A gazda - <i>Candida</i> kölcsönhatás: a patogén oldal	15
3.6.1. Genom plaszticitás és virulencia	15
3.6.2. Morfológia és virulencia	18
3.7. A gazda - <i>Candida</i> kölcsönhatás: gazda oldal.....	20
3.8. A gazda - <i>Candida</i> kölcsönhatás: az interakció molekuláris szintű tanulmányozása	22
4. CÉLKITŰZÉSEK	25
5. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	26
5.1. A kísérletekben használt mikrobák	26
5.2. A kísérletekben használt sejtvonalak	27
5.3. Tenyésztéshez használt tápoldatok, táptalajok	27
5.4. Kísérleti módszerek.....	27
5.4.1. Sejtvonalak és élesztő törzsek fenntartása, tenyésztése, primer sejtek izolálása	27
5.4.2. Fertőzés, fagocitózis és ölési hatások meghatározása	28
5.4.3. Mikroszkópos vizsgálatok.....	29
5.4.4. Molekuláris technikák	30
5.4.5. Kariotipizálás.....	33
5.4.6. Genom és RNS szekvenálás, <i>in silico</i> - és statisztikai analízis	34
6. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELESÜK.....	37
6.1. A makrofág válasz vizsgálata <i>in vitro</i> <i>C. parapsilosis</i> fertőzőes modellben	37
6.1.1. A kölcsönhatás tanulmányozására kidolgozott <i>in vitro</i> modell.....	37
6.1.2. J774.2 egér makrofágok és <i>C. parapsilosis</i> kölcsönhatás kezdeti lépései.....	37

6.1.3. A lizoszómák és a fagoszómák kolokalizációjának vizsgálata a fagocitózist követően.....	39
6.1.4. A felvett élesztők életképességének nyomon követése.....	39
6.1.5. A kölcsönhatás nyomán megváltozott expressziót mutató gének azonosítása a makrofágokban RNS microarray analízis segítségével	40
6.1.6. A microarray adatok alátámasztása reverz transzkripció kapcsolt valós idejű PCR (qRT-PCR) technikával	42
6.1.7. A GA1 jelű törzs által indukált transzkripciós változások kinetikája	44
6.1.8. A klinikai szempontból fontos <i>Candida</i> fajok által indukált <i>TNFRSF9</i> expresszió vizsgálata	45
6.1.9. A sejtfelszíni Tnfrsf9 fehérje relatív mennyiségének vizsgálata	46
6.1.10. <i>C. parapsilosis</i> indukció hatása a <i>TNFRSF9</i> gén transzkripciójára primer egér és primer humán sejtekben	47
6.1.11. A makrofág válasz vizsgálata <i>in vitro C. parapsilosis</i> fertőzős modellben: összefoglalás/értékelés	48
6.2. Az <i>in vitro</i> makrofág - <i>Candida</i> kölcsönhatás komplex analízise	51
6.2.1. A fertőzős modellrendszer kiterjesztése: a teljes RNS populáció RNA-seq vizsgálata	51
6.2.2. Genetikai ismeretek bővítése a transzkriptóm adatok felhasználásával.....	53
6.2.3. A <i>C. parapsilosis sensu lato</i> csoport gégeinek rokonsági viszonya és eloszlása	54
6.2.4. A <i>C. parapsilosis sensu lato</i> csoport potenciális virulencia faktorai	55
6.2.5. <i>C. parapsilosis</i> törzsek transzkriptómjainak elemzése.....	57
6.2.6. A <i>C. parapsilosis</i> két környezeti és két klinikai izolátumának transzkripciós analízise	60
6.2.7. A fagociták transzkripciós válasának jellemzése a fertőzés során.....	62
6.2.8. Az <i>in vitro</i> makrofág - <i>Candida</i> kölcsönhatás rendszerelméletű, komplex analízise: összefoglalás/értékelés	64
6.3. <i>C. parapsilosis</i> izolátumok összehasonlító genomikai analízise.....	66
6.3.1. Különböző izolátumok virulenciájának összehasonlítása <i>in vitro</i> fertőzős modellekben	66
6.3.2 A különböző izolátumok molekuláris tulajdonságainak összehasonlítása...	69
6.3.3. A négy izolátum teljes genom szekvenciája és összehasonlító elemzése.....	70
6.3.4. SNP-k és eloszlásuk, a rekombinációs események nyomai	71

6.3.5. Kromoszóma mutációk: duplikációk	73
6.3.6. Kromoszóma mutációk: deléciók.....	74
6.3.7. A deléciók kísérletes igazolása: PCR stratégia	75
6.3.8. A deléciók kísérletes igazolása: Southern hibridizáció.....	76
6.3.9. PCR validálás során képződő aspecifikus termékek.....	78
6.3.10. A deléciók töréspontjainak pontos meghatározása.....	81
6.3.11. Az ALS gének <i>in silico</i> analízis és PCR alapján kapott eltérő eloszlásának magyarázata.....	82
6.3.12. <i>C. parapsilosis</i> izolátumok összehasonlító genomikai analízise: összefoglalás/értékelés	83
7. ÖSSZEFOGLALÁS	86
7.1. <i>In vitro</i> fertőzéses modell kidolgozása egér makrofágok és a <i>C. parapsilosis</i> kölcsönhatásának tanulmányozására	86
7.2. THP-1 humán monociták és a <i>C. parapsilosis sensu lato</i> csoport tagjainak <i>in vitro</i> kölcsönhatásából származó teljes RNS populáció transzkriptóm analízise.....	87
7.3. Klinikai és környezeti <i>C. parapsilosis</i> törzsek összehasonlító genomikai analízise... 89	
8. SUMMARY.....	91
8.1. Development of an <i>in vitro</i> model system to study the interaction between murine macrophages és <i>C. parapsilosis</i>	92
8.2. Whole transcriptome analysis of the host és the pathogen from <i>in vitro</i> interactions of THP-1 human monocytic cells with the members of the <i>C. parapsilosis sensu lato</i> group	93
8.3. Comparative genomic analysis of clinical és environmental isolates of <i>C. parapsilosis</i>	94
9. IRODALOMJEGYZÉK.....	96
10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	112
11. MELLÉKLETEK.....	114

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ACK	<u>A</u> mmonium- <u>c</u> hloride- <u>p</u> otassium
ALS	<u>A</u> gglutinin- <u>l</u> ike <u>s</u> equence
APC	<u>A</u> ntigen <u>p</u> resenting <u>c</u> ell
ARR	<u>A</u> rsenicals <u>r</u> esistance
ATCC	<u>A</u> merican type <u>c</u> ulture <u>c</u> ollection
BALB/C	<u>B</u> agg <u>a</u> lbino
BLAST	<u>B</u> asic <u>l</u> ocal <u>a</u> lignment <u>s</u> earch <u>t</u> ool
Bp	<u>B</u> ázispár
CBS	<u>C</u> entraal <u>b</u> ureau voor <u>S</u> chimmelcultures
CCL	<u>C</u> oncerted <u>c</u> hromosome <u>l</u> oss
CD	<u>C</u> luster of <u>d</u> ifferentiation
cDNS	<u>C</u> opy <u>D</u> NS
CHEF	<u>C</u> reate <u>h</u> omogeneous <u>e</u> lectrical <u>f</u> ields
CPH1	<u>C</u> andida <u>p</u> seudohyphal <u>r</u> egulator
CRG	<u>C</u> entre de <u>R</u> egulació <u>G</u> enòmica
cRNS	<u>C</u> opy <u>R</u> NS
CTL	<u>C</u> -type <u>l</u> ectin
CTLA-4	<u>C</u> ytotoxic <u>T</u> -lymphocyte <u>a</u> ntigen <u>4</u>
CUG	<u>C</u> itozin - <u>u</u> racil - <u>g</u> uanin triplet
Cy3	<u>C</u> yanine <u>3</u>
DAVID	<u>D</u> atabase for <u>a</u> nnotation, <u>v</u> isualization és <u>i</u> ntegrated <u>d</u> iscovery
DC-SIGN	<u>D</u> endritic <u>c</u> ell-specific <u>i</u> ntercellular adhesion molecule-3- <u>g</u> rabbing <u>n</u> on-integrin
DEL	<u>D</u> elécíó
DIG	<u>D</u> igoxigenin
DMEM	<u>D</u> ulbecco's <u>M</u> odified <u>E</u> agle <u>M</u> edium
DUP	<u>D</u> uplikáció
EDTA	<u>E</u> tilén- <u>d</u> iamin- <u>t</u> etra <u>a</u> cetát
EFG1	<u>E</u> nhanced <u>f</u> ilamentous <u>g</u> rowth
ELISA	<u>E</u> nzyme- <u>l</u> inked <u>i</u> mmunosorbent <u>a</u> ssay
FACS	<u>F</u> luorescence <u>a</u> ctivated <u>c</u> ell <u>s</u> orter
FBS	<u>F</u> etal <u>b</u> ovine <u>s</u> erum
FITC	<u>F</u> luorescein <u>i</u> sothiocyanate
FLP	<u>F</u> lippase
FRT	<u>F</u> LP <u>r</u> ecombination <u>t</u> arget
FW	<u>F</u> orward
GA1	<u>C</u> andida <u>p</u> arapsilosis törzs neve
GM-CSF	<u>G</u> ranulocyte- <u>m</u> acrophage <u>c</u> olony- <u>s</u> timulating <u>f</u> actor
HG	<u>H</u> uman <u>g</u> enome
HIV	<u>H</u> uman <u>i</u> mmunodeficiency <u>v</u> irus
HSP	<u>H</u> eat <u>s</u> hock <u>p</u> rotein
HUVEC	<u>H</u> uman <u>u</u> mbilical <u>v</u> ein <u>e</u> ndothelial <u>c</u> ell
ICOS	<u>I</u> nducible T-cell <u>c</u> ostimulator
ICOSL	<u>I</u> COS <u>l</u> igand
IFN	<u>I</u> nter <u>f</u> eron
IL	<u>I</u> nter <u>l</u> eukin

ILA	Induced by lymphocyte activation
J774.2	Egér makrofág sejtvonal neve
Kb	Kilobázis
LIP	Lipáz
LOH	Loss of heterozygosity
LPS	Lipopoliszacharid
LSM	Laser scanning microscope
MALDI-TOF	Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight
Mb	Megabázis
M-CSF	Macrophage colony-stimulating factor
MHC	Major histocompatibility complex
MIP	Macrophage inflammatory protein
MLST	Multilocus sequence typing
MR	Mannóz receptor
MRS	Major repeat sequence
MS	Mass spectrometer
NADPH	Nikotinamid adenin dinukleotid foszfát H^+
NET	Neutrophil extracellular traps
NGS	Next generation sequencing
NLR	NOD-like receptor
NOD	Nucleotide-binding oligomerization domain
PAMP	Pathogen associated molecular pattern
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells
PBMC-DM	Peripheral blood mononuclear cells - derived macrophages
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
Pfam	Protein families database
PFGE	Pulsed field gelelectrophoresis
PhzF	Phenazine biosynthesis protein
PRR	Pattern recognition receptors
PT	Proline-threonine
PTGS	Prostaglandin-endoperoxide synthase
qRT-PCR	Quantitative real-time polymerase chain reaction
REV	Reverse
RNA-seq	RNA sequencing
RNS	Reactive nitrogen species
ROS	Reactive oxygen species
RPKM	Reads per kilo base per million
RPM	Revolutions per minute
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethane
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SAP	Secreted aspartyl proteinase
SAPP	Secreted aspartyl proteinase in <i>parapsilosis</i>
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SNP	Single nucleotide polymorphism
SSA	Single-strand annealing
TCR	T-cell receptor
Th	T-helper
THP-1	Humán monocita sejtvonal neve
TLR	Toll-like receptor

TNF	<u>T</u> umor <u>n</u> ecrosis <u>f</u> actor
TNFRSF	<u>T</u> umor <u>n</u> ecrosis <u>f</u> actor <u>r</u> eceptor <u>s</u> uper <u>f</u> amily
UV	<u>U</u> ltrav <u>i</u> ola
WGS	<u>W</u> hole <u>g</u> enome <u>s</u> hotgun
YPD	<u>Y</u> east extract-peptone- <u>D</u> -glükóz
YPD-PS	<u>Y</u> east extract-peptone- <u>D</u> -glükóz - penicillin - sztreptomycin

2. BEVEZETÉS

Az elmúlt három évtizedben ugrásszerűen megemelkedett a *Candida* fajok által kiváltott megbetegedések száma. Bár ezek a mikrobák az egészséges normál humán mikrobióta tagjai, bizonyos körülmények között felszíni vagy gyakran halálos kimenetelű szisztémás fertőzéseket képesek kiváltani. Elsősorban az elégtelen immunrendszerrel rendelkezők, hosszantartó antibiotikumos kezelésben részesülők, szervátültetésen átesettek, HIV fertőzöttek, alacsony születési súllyal világra jött csecsemők és az elhúzódó kórházi kezelésben részesülő idősebb páciensek veszélyeztetettek. A felmérések szerint ezek az élesztők minden harmadik egészségügyi dolgozó kezén megtalálhatók, és a nozokomiális szisztémás fertőzések negyedik leggyakoribb okozói.

A candidiázis domináns okozója a *Candida albicans*, így kezdetben, hozzávetőlegesen 30 évvel ezelőtt, a molekuláris és genetikai vizsgálatok ezzel a fajjal kezdődtek meg. Ebből adódóan a *Candida* fajokról rendelkezésünkre álló ismereteink döntő hányada a fiziológia, rezisztencia, metabolizmus, gazda - patogén kölcsönhatás terén ezzel a fajjal kapcsolatosan halmozódott fel. Az adekvát antibiotikumos kezelésnek köszönhetően a *C. albicans* által kiváltott megbetegedések száma az ezredforduló óta csökkenő tendenciát mutat. Ezzel párhuzamosan azonban egyéb, korábban kisebb jelentőségűnek tekintett fajok napjainkban egyre gyakrabban váltanak ki megbetegedést. Ezen ún. nem-*albicans* fajok között találjuk a *C. glabrata*-t, *C. krusei*-t, *C. parapsilosis*-t és *C. tropicalis*-t. Közülük különösen a *C. parapsilosis* epidemiológiája mutat sajátos eloszlást. Szakirodalmi adatok szerint ez a faj kiemelkedően nagy arányban vált ki megbetegedést újszülöttek körében. Az érték az adott tanulmány elkészítésének ideje és a földrajzi hely függvényében még a *C. albicans* esetszámát is meghaladhatja. A veszélyeztetett célcsoport különbözősége a gazda-patogén kölcsönhatás eltérő mivoltára enged következtetni.

Korunkban elérhető technikai repertoár biztosítja a gazda – patogén kölcsönhatás részletes tanulmányozásának feltételeit. Az intracelluláris festékek, a fluoreszcens - és elektronmikroszkópia valamint az áramlási citométer alkalmazása lehetővé teszi a kölcsönhatás vizuális nyomon követését. A folyamat során megváltozó expressziós mintázat elemzésére qRT-PCR és RNS microarray analízisen kívül a XXI. században bemutatkozó RNA-seq eljárás is rendelkezésre áll, amely a transzkriptóm korábbiaknál jóval részletesebb vizsgálatát teszi lehetővé. A potenciális virulencia faktorok azonosításának kézenfekvő eszköze a patogén és nem patogén élesztők genomjának összehasonlítása. Az ehhez szükséges nagy kapacitású szekvenáló berendezések és az adatok kiértékeléséhez valamint

összehasonlításához használatos bioinformatikai eszközök szintén az elmúlt évtizedben láttak napvilágot.

Annak ellenére, hogy a *C. parapsilosis* által kiváltott megbetegedések száma az ezredforduló óta emelkedik, igen keveset tudni a gomba genetikai hátteréről, virulencia faktorairól, a gazdával való kölcsönhatás lépéseiről, továbbá a kórokozó felismerésében szerepet játszó molekulákról. A felmerült kérdések megválaszolására egy komplex modellt dolgoztunk ki, amely lehetőséget biztosít a kölcsönhatás részletes nyomon követésére (a fagocitózistól a tényleges patogén eliminációig) illetve a folyamat során a gazdában bekövetkező transzkripciós változások jellemzésére. A modell kiterjesztésével felállított rendszer alkalmasnak bizonyult mind a gazdában, mind a kórokozóban bekövetkező expressziós mintázat jellemzésére. *C. albicans*-szal folyó kutatások eredményei egyértelművé tették, hogy a különböző izolátumok virulenciája nagy mértékű eltérést mutathat, amely sok esetben kromoszómális eltérésekkel asszociált. Korábbi munkánk során tapasztaltak szerint virulenciabeli különbségek *C. parapsilosis* törzsek között is fennállnak. Annak vizsgálatára, hogy ez a jelenség társul-e genetikai különbségekkel, összesen négy *C. parapsilosis* izolátum részletes összehasonlító genomikai analízisét végeztük el. Az *in silico* eszközökkel feltárt különbségeket molekuláris módszerek segítségével (PCR, Sanger szekvenálás, Southern hibridizáció) kísérletesen is alátámasztottuk.

3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

3.1. Az immunrendszer eredete és feladata

Valamennyi élőlény alapvető célja saját homeosztázisának fenntartása. Az immunrendszer feladata az organizmus integritásának megőrzése, védelem a külső idegen (és tágabb értelemben a belső saját) ellenségekkel szemben. Egy magasabb rendű szervezet számára a külső idegen jelenthet vírust, baktériumot, gombát, vagy parazitát. A belső ellenség alatt a szeszencs, esetleg károsodást szenvedett vagy a megváltozott viselkedésű (rákos vagy vírusfertőzött) saját sejteket értjük. Általánosságban igaz, hogy evolúciósan minél fejlettebb egy organizmus, annál komplexebb védelmi mechanizmusokat kell működtetnie. Egyszerű védelmi rendszerrel már a prokarióták is rendelkeznek. A legismertebb a baktériumok restrikciós endonukleázokból és metiltranszferázokból álló enzimrendszere, amely a bakteriofágok elleni védekezés eszköze (Tock és Dryden, 2005). Bizonyos protozoák és gombák a vírusaikkal szembeni védekezésben hatékony RNS-csökkentő mechanizmusokat használnak (Dang és mtsi, 2011; Ullu és mtsi, 2004). Az RNS-interferencia ilyen jellegű hatása növény (Silhavy és Burgyn, 2004), féreg (Lu és mtsi, 2005), ízeltlábú, (Kemp és mtsi, 2013), sőt magasabb rendű gerinces modellekben is igazolást nyert (Giladi és mtsi, 2003). A kórokozókkal szembeni védelem részét képezhetik különböző szekretált fehérjék. Ezek között találunk enzimeket, például lizozim, amelyek elsősorban baktériumok eliminálásában játszanak szerepet (Ellison és Giehl, 1991). Más szekretált fehérjék nem rendelkeznek katalitikus aktivitással. Ilyenek többek között az amfipatikus tulajdonságú proteinek, amelyek a mikrobák membránjában képesek pórusokat formálni (Ganz, 2003). A humorális immunválasz rendkívül hatékony eszköze a testfolyadékban inaktív állapotban jelenlévő, egymást kaszkádszerűen aktiváló proteázok alkotta komplement rendszer. A folyamat mind fagociták közvetítette, mind azoktól független módon szerepet játszik a kórokozók eliminálásában. Előbbi esetben a kaszkád korai lépései során képződő fragmentumok az idegen felszínhez kapcsolódva fagocitózisa jelölik ki a mikrobákat. Fagociták hiányában a folyamat késői szakaszában formálódó ún. membrán károsító komplex a mikroba membránjában pórust képezve, az ionháztartás felborításával idézi elő annak pusztulását (Sarma és Ward, 2011).

A magasabb rendű élőlények sajátossága, hogy egyedfejlődésük során bizonyos sejteik apoptózison mennek keresztül, vagy kifejlett állapotukban sérülést szenvedhetnek, amelyek nyomán sejtörmelék halmozódhat fel, továbbá egyes sejtek működése (például

vírusfertőzés hatására) megváltozhat, kontrollálatlanná válhat, veszélyt jelentve ezzel az organizmus egészének további létére. Többsejtes állatokban a homeosztázis biztosítására specializált sejtek jelentek meg, amelyek feladata, a szükségtelenné vagy veszélyessé vált, a funkciójukat ellátni már képtelen, illetve a megváltozott viselkedésű sejtek eltávolítása. A fenti feladatokat többnyire fagocita sejtek látják el. Egyes szerzők ebből a rendszerből vezetik le az immunrendszer ősi, veleszületett (más néven természetes) ágának sejt alkotóit (Gordon, 2004; Rinkevich, 2004). A külső, idegen veszélyek ellen is védelmet nyújtó fagociták rendkívül fontos szerepet töltenek be a homeosztázis megőrzésében, hiszen ezek jelentik a testfolyadékba illetve szövetekbe jutott kórokozók elleni védekezés legfontosabb sejt elemét. Annak ellenére, hogy jelenlegi ismereteink alapján a Földünkön található prokarióták fajsámát a milliós, a gombák számát a százazres nagyságrendbe soroljuk (Mora és mtsi, 2011), az ezek elleni védelemben a fagociták mindössze néhány tucat receptora működik közre. Ez úgy lehetséges, hogy ezek a receptorok nem egyes mikroba fajokra jellemző molekulá(ka)t, hanem olyan mintázatokat ismernek fel, amelyek a vírusok, baktériumok illetve a gombák evolúciósan konzervált egységeit jelentik, például a sejtfa komponensei illetve a virális vagy bakteriális örökítőanyag. Ezeket a molekulákat patogénhez kötött molekuláris mintázatoknak (Pathogen Associated Molecular Pattern - PAMP) nevezzük. Ezeket a motívumokat a fagociták a csíravonalban kódolt és a PAMP-okhoz hasonlóan evolúciósan konzervált, mintázatafelismerő receptoraikkal (Pattern Recognition Receptors - PRR) ismerik fel. A receptor-ligand kötődését követően egyrészt megkezdődik a kórokozó bekebelezése, a fagocitózis, másrészt olyan szignáltranszdukciós utak aktiválódnak, amelyek végeredménye bizonyos gének illetve már jelenlévő fehérjék be- vagy kikapcsolása, citokinek szintézise és szekréciója (Netea és mtsi, 2008). A fagoszóma lizoszómával való fúzióját, a pH csökkenése kíséri, amellyel a mikroba elpusztítása veszi kezdetét (Haas, 2007). Erre a fagociták többféle mechanizmust is működtetnek. Ismeretesek például a multivalens kationokat kelátoló fehérjék vagy sejtfa bontó enzimek (Arnold és mtsi, 1977; Selsted és Martinez, 1978). A kórokozó eliminálásának hatékony módszere a NADPH-oxidáz enzimkomplex által katalizált folyamat során képződő nagy mennyiségű reaktív és toxikus oxigén gyök felhalmozódása a fagolizoszómában (Grimm és mtsi, 2011). A folyamat végén visszamaradó oligopeptidok az evolúciósan fejlettebb állatcsoportoknál egy transzmembrán fehérjéhez a fő hisztokompatibilitási komplex II-höz (Major Histocompatibility Complex - MHC) kötve bemutatásra kerülnek az adaptív immunrendszer felé (Swain, 1983).

Az immunrendszer adaptív ága az állkapcsos gerinceseknél jelent meg hozzávetőlegesen 450-500 millió évvel ezelőtt, amely a veleszületett immunitásra ráépülve,

azzal szoros összefüggésben látja el a feladatát. Az MHC II - peptid komplexet a CD4+ T helper sejt felszínén a T-sejt receptor (T-cell receptor - TCR) és a CD4 komplexe ismeri fel, amely a T helper sejt általi felismeréshez és aktiválódásához vezet (Germain, 1994; Germain és Margulies, 1993; Kaufman és mtsi, 1984). Ez a lépés esszenciális, de nem elégséges a T-sejt proliferációjához. Az aktiválódás mellett további két szignálra, differenciálódási és túlélési szignálra is szükség van. Előbbit az antigén prezentáló sejt (Antigen presenting cell - APC) által szekretált citokinek (IL-4, IL-6, IL-12) utóbbit a két sejt felszínén található receptor - ligand kapcsolódás váltja ki. Ezek közül az egyik leginkább tanulmányozott az APC-re jellemző B7.1(CD80)-B7.2(CD86) és a T-sejt felszínén található CD28 közötti kölcsönhatás (Harding és mtsi, 1992; Jenkins és mtsi, 1991). Az aktiválódás és az említett membránkött fehérjék kapcsolódása a T-sejtben az IL-2 citokin szekrécióját váltja ki, amely autokrin módon járul hozzá a T-sejt túléléséhez (Greene és Leonard, 1986; Smith, 1984). A prezentált epitóp valamint egyéb szolubilis és membránkött szignálok (citokinek és kostimulációs molekulák) függvényében a T-sejtek különböző típusú szubpopulációk (Th1, Th2, Th17) irányába differenciálódhatnak. A Th1-es és Th17-es irányok alapvetően a baktériumok és gombák elleni védekezés eszközei, amely rendre a makrofágok és neutrofil granulociták közreműködésére támaszkodik (Brereton és Blander, 2010; Damsker és mtsi, 2010). A Th2-es válasz antitesttermeléssel, mukózus felületek védelmével és eozinofilek mozgósításával jellemezhető (Romagnani, 2000). A citotoxikus T-sejtek a vírusfertőzött vagy megváltozott működésű saját sejtek eliminációjában játszanak szerepet (Andersen és mtsi, 2006). A B-sejtek részt vesznek az antigén prezentációban, aktiválódva plazmasejteké differenciálódnak és antitesteket termelnek (Batista és Harwood, 2009).

A T és B sejtek megjelenésével tehát egyrészt lehetővé vált az immunrendszer finomhangolása és központi szabályozása, másrészt megjelenhetett az immunológiai memória (Itano és Jenkins, 2003) (Moser és mtsi, 2006). A limfociták többsége a kórokozó eltávolítása után apoptózison megy keresztül, kisebb részük azonban a nyirokcsomókba vándorol és hosszú életű memóriasejtté alakul, lehetővé téve a hatékonyabb immunválaszt a kórokozó újbóli megjelenése esetén (McHeyzer-Williams és McHeyzer-Williams, 2005).

A két alrendszer egymással szorosan összefügg. Közöttük inkább mellé-, mintsem alá-fölérendelő viszony áll fenn. A két ág egymás működését kiegészítve, erősítve és szigorúan szabályozva látja el a feladatát, amelynek célja a szervezet integritásának fenntartása, a külső és belső parazitákkal szembeni védelem.

3.2. A *Candida* nemzetség általános jellemzése

A *Candida* fajok rendszertanilag az Ascomycota élesztők imperfekt csoportjába tartoznak, és döntő többségüket az ún. CUG klád foglalja magába (Butler és mtsi, 2009) (Fitzpatrick és mtsi, 2006). Ezek közös tulajdonsága, hogy a fehérjeszintézis során a CUG bázishármas az univerzális kódhasználattól eltérően nem leucin hanem szerin beépülését idézi elő. A hozzávetőlegesen 200 fajt magában foglaló nemzetség számos képviselője a környezetből izolálható (Pereira és mtsi, 2013), egyesek biotechnológiai jelentőséggel is bírnak (Dias és mtsi, 2000) (Miyazawa és mtsi, 2013), míg mások magasabb rendű gazdaszervezetekkel élnek kommenzalista kapcsolatban. Mikroszkópos morfológiájukra általánosságban a 3-6 μm -es átmérő és az enyhén vagy erőteljesen megnyúlt forma jellemző. Kettéosztódásuk a *Saccharomyces cerevisiae*-hoz hasonlóan sarjadzással történik. Laboratóriumi körülmények között, táptalajon nevelve az élesztő sejtek jellemzően világos, alapvetően fehér esetleg sárgás árnyalatú, ép vagy gyűrött felszínű telepeket formálnak. Bizonyos fajok jellemző tulajdonsága a dimorfizmus, amelynek hátterében a sejtfallal kapcsolatos szabályozó mechanizmusok működésének megváltozása áll. A sejtfal felépítéséről a legtöbb információt a *C. albicans*-szal kapcsolatos kutatások szolgáltattak. Ez esetben a sejtfal egy belső kompakt és egy külső lazább rétegre osztható. A belső réteget kitin- és egy erre ráépülő β -1,3-glükán váz jellemzi. A sejtfal külső része fehérjékkel asszociált O- és N-kötött mannóz polimerből épül fel. A két réteget kovalensen kötött β -1,6-glükán-glikofoszfatidilinozitol "kapocs" rögzíti egymáshoz (Netea és mtsi, 2008). A sejtfal ezen komponenseinek minősége és részaránya nem állandó az élesztő sejtciklusa alatt, hanem egy jól szabályozott komplex folyamat eredményeként dinamikusan változik (Gow és mtsi, 2012). Bizonyos körülmények között a citokinézis nem fejeződik be, és a lefűződő leánysejt nem hagyja el az anyasejtet, hanem erőteljesen megnyúlik, ezzel hifa vagy pseudohifa jöhet létre (Buffo és mtsi, 1984; Mardon és mtsi, 1969; Taschdjian és mtsi, 1960). A csoportban általános az ivartalan szaporodás, haploidok és diploidok egyaránt előfordulnak, néhány faj esetében az ivaros szaporodás is ismeretes (Bennett és Johnson, 2005). Köszönhetően a bioinformatika rohamos fejlődésének napjainkra több faj genomjának teljes nukleotidsorrendje elérhető. A *C. albicans* SC5314-es törzse volt az első, amelynek teljes genom szekvenciája, majd annotált genomja elérhetővé vált. Ezek alapján nyolc kromoszóma párt sikerült elkülöníteni, amelyek mérete 1.020-3.165 kb-ig terjed, a teljes haploid genom 14.855 kb-nak adódott (Jones és mtsi, 2004). A genom annotálása egy évvel később, 2005-ben történt meg, ennek során 6.354 gén került azonosításra (Braun és mtsi, 2005). Az elmúlt

években egyéb fajok (*C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*) teljes genom szekvenciája is ismertté vált, megkönnyítve ezzel a fenti fajokkal folyó vizsgálatokat.

3.3. A *Candida* fajok egészségügyi jelentősége

Ismeretes, hogy nem csak baktériumok, hanem bizonyos élesztők is a normál humán mikrobiotára részét képezik. Az újszülöttek a szülőcsatornán való keresztülhaladás alkalmával kerülhetnek először kontaktusba ezzel a mikrobacsoporttal (Filippidi és mtsi, 2013). Röviddel ezután kialakul a mikrobák természetes egyensúlya, amely bár alapvetően a baktériumok dominanciájával jellemezhető, mellettük bizonyos élesztők is előfordulhatnak. Ezek között azonosíthatók különböző *Candida* fajok, amelyek izolálhatók a szájüregből és a tápcsatornából éppúgy, mint a genitáliák környékéről vagy az egészséges bőrfelszínről anélkül, hogy a gazdában kóros folyamatot váltanának ki. Problémát akkor jelenthetnek, ha valamilyen oknál fogva az immunválasz sérül, és a gazdaszervezet képtelen a hatékony védekezésre. Bár a szakirodalom a nemzetség tekintélyes számú képviselője közül mindössze 15-20 fajt írt le humán patogénként (Pfaller és mtsi, 2007b), egészségügyi jelentőségüknél fogva a rendelkezésünkre álló ismeretanyag elsősorban ezekkel a fajokkal kapcsolatban halmozódott fel.

Az elmúlt harminc évben a *Candida* fajok egészségügyi jelentősége egyre növekvő tendenciát mutat. A mikrobacsoport fontosságát támasztja alá az a felmérés, amelynek szerzői az USA egészségügyi intézményeiben a vizsgált 21 hónapos időszak alatt a 33.848 nozokomiális fertőzés közül 3.628-at (10,7%) azonosítottak candidiázisként (Hidron és mtsi, 2008). Egy az ezredforduló epidemiológiáját feldolgozó tanulmány a felmérés 8,5 éve alatt a világ 134 kórházában ápolott betegek bevonásával összesen több mint 200.000 élesztő mintát összesített. Ezeknek túlnyomó többsége (>95%) bizonyult valamilyen *Candida* fajnak (Pfaller és mtsi, 2007a). Felszíni és invazív szisztémás fertőzéseket egyaránt kiválthatnak. Előbbi esetben többnyire a körmöket továbbá a száj- valamint a genitáliák nyálkahártyáját érintő problémáról van szó. Invazív fertőzésről akkor beszélünk, ha a kórokozó a véráramba kerül. Ismereteink szerint egyedül az Amerikai Egyesült Államokban 100.000 főre vetítve átlagosan 29 esetet regisztrálnak évente (Pfaller és Diekema, 2007). Több tanulmány egybehangzó eredménye szerint az invazív candidiázisban (candidemia) szenvedő felnőttekre meghatározott mortalitási ráta rendkívül magas, megközelítheti az 50%-ot (Casadevall és Pirofski, 1999; Moran és mtsi, 2009).

Kórházban ápolott betegek körében a candidemia különösen gyakori. Egy 7,5 éves periódust felölelő, az USA kórházainak invazív nozokomiális eseteit feldolgozó tanulmány

eredményei szerint a közel 21.000 monomikrobiális fertőzésből, 2002-t (9,5 %) azonosítottak candidiázisként (Wisplinghoff és mtsi, 2004). Más szerzők a *Candida* fajok még ennél is magasabb részarányát, 15%-ot állapítottak meg (Romani és mtsi, 2004). A keringésbe jutott mikroba számára a legtöbb szövet és szerv elérhetővé válik (szív, hashártya, központi idegrendszer, ízületek, kiválasztó szervrendszer), azokban megtelepedhet, súlyos esetben a szerv teljes működésképtelenségét okozhatja (Trofa és mtsi, 2008; Varghese és Sobel, 2008). Számos tanulmány született, amely a fertőzés rizikó faktorait összesíti. Ezek alapján az elhúzó kórházi kezelésben részesülő idős betegek (katéterek használata), szerv transzplantáción átesettek, újszülöttek, főleg az alacsony születési súllyal világra jött csecsemők, a gyomorszondás táplálásban részesülők, a HIV-fertőzöttek, a hosszan tartó antibiotikus terápiát folytató-, a kiterjedt bőrfelszíni sérüléseket, elsősorban égéseket, elszenvedő páciensek veszélyeztetettek (Branski és mtsi, 2009; Launay és mtsi, 1998; Lee és mtsi, 2013; Muskett és mtsi, 2011).

A mintagyűjtés szisztémás fertőzés esetén vérvétellel, bőrt vagy nyálkahártyát érintő candidiázis alkalmával felszíni mintavétellel történik. A klasszikus fajazonosítás morfológiai és fiziológiai tulajdonságok meghatározását jelenti, amely viszonylag alacsony költséggel kivitelezhető, de nagy hátránya, hogy a tesztek elvégzése akár több napot is igénybe vehet, valamint nem mindig szolgáltatnak pontos eredményt. Kiváltásukra különböző molekuláris módszerek láttak napvilágot. Ezek túlnyomó többsége PCR alapú technika, olvadási görbe analízis, de elérhetők szerológiai tesztek, MALDI-TOF és ELISA módszerek is (Decat és mtsi, 2013; Neppelenbroek és mtsi, 2013; Ruhnke és mtsi, 2011). A kórokozó azonosítását követően kezdődhet meg az empirikus úton körvonalazódott terápia. Ez a bőr vagy a nyálkahártya felszínét érintő fertőzés alkalmával különféle azol származékok (klotrimazol, itrakonazol, vorikonazol) illetve amfotericin B használatát jelenti, akár helyileg, akár szájon keresztül szedve (Pappas és mtsi, 2004). Invazív candidiázis esetén a kezelés gerincét intravénásan alkalmazott flukonazol jelenti, mely amfotericin B-vel esetleg echinokandinokkal (alapvetően kaszopofunginnal) egészíthető ki (Fluckiger és mtsi, 2006; Pappas és mtsi, 2004).

3.4. A szisztémás candidiázis epidemiológiája és a *nem-albicans* fajok

Bár a szisztémás candidiázist kiváltó fajok aránya egyértelműen függ a vizsgált időszakától és a földrajzi helyzettől, a 2000 előtti időszak adatait feldolgozó tanulmányok egybehangzóan a *C. albicans*-nak dominanciáját állapították meg, amely az összes candidemia-s eset 37-70%-áért tehető felelőssé (Pfaller és Diekema, 2007). Ugyanakkor

figyelemre méltó az a trend, miszerint az ezredforduló óta egyre kisebb arányban izolálható *C. albicans* ezekből a fertőzésekből, és helyét más, eddig kevésbé ismert és vizsgált fajok vették át. Újabb felmérések szerint Európa több országában és Észak-Amerika területén a *C. albicans* részaránya 50%-ra szorult vissza, ezzel párhuzamosan a *C. glabrata*, a *C. krusei*, a *C. parapsilosis* és a *C. tropicalis* egyre nagyobb arányban izolálható (Almirante és mtsi, 2006; Moran és mtsi, 2009; Nawrot és mtsi, 2013; Tortorano és mtsi, 2013).

Más földrajzi területeken (Latin-Amerika, Dél-Afrika, India) a nem-*albicans* fajok térnyerése még kifejezettebb. Az izolátumok kevesebb, mint fele bizonyult *C. albicans*-nak, míg a nem-*albicans* fajok közül elsősorban a *C. parapsilosis* emelkedik ki, amely a szisztémás fertőzések 20-26,5%-ában volt izolálható (Kreusch és Karstaedt, 2013; Nucci és mtsi, 2013; Xess és mtsi, 2007). Szélsőséges esetben az említett faj részaránya akár meg is haladhatja a *C. albicans*-ét (Medrano és mtsi, 2006).

Egyes tanulmányok felhívták a figyelmet arra a jelenségre, miszerint a különböző korcsoportokat nem azonos részarányban betegítik az említett fajok. Számos publikáció a *C. parapsilosis* dominanciáját emeli ki a fiatalabb korcsoport, elsősorban a csecsemők körében. A különböző geográfiai területekről származó beszámolók az újszülötteket érintő candidemiákat igen nagy arányban (33-67%) ezzel a fajjal hozzák összefüggésbe (Ballot és mtsi, 2013; Neu és mtsi, 2009; Pammi és mtsi, 2013; Rodriguez és mtsi, 2006). Moran és munkatársai 2009-ben megjelent felmérésükben 1.098 candidemia-ban szenvedő beteg adatainak felhasználásával a különböző *Candida* fajok korcsoportonkénti eloszlását vizsgálták. Eredményeik szerint a felnőttek körében 43%, a 2-18 évig terjedő korosztály esetében 38% a *C. albicans* részaránya. Ez utóbbi korcsoportban a nem-*albicans* fajok közül kiemelkedett a *C. parapsilosis* (26%) és a *C. tropicalis* (17%). A 2 évnél fiatalabb betegek körében a *C. parapsilosis* részaránya már 39,2%-nak adódott, amellyel a *C. albicans*-szal közösen az összes eset 90%-áért voltak felelősek (Moran és mtsi, 2009).

3.5. A *C. parapsilosis* általános jellemzése

A *C. parapsilosis* a korábban említetteknek megfelelően a nem-*albicans* fajok közötti növekvő dominanciája és különösen a gyermekek körében tapasztalt magas előfordulása miatt került az érdeklődés középpontjába. Fiziológiai és molekuláris jellegeit tekintve a korábban tett megállapítások általánosságban erre a fajra is igazak. YPD táptalajon nevelve világos színű kolóniákat formál, amelyek felszíne törzstől függően lehet sima vagy gyűrt, széle sima vagy karélyos. Bizonyos körülmények között pseudohifát képes fejleszteni, valódi hifa létrehozására azonban nem képes (Kim és mtsi, 2006). Az egészséges humán flóra tagjaként

ismert, de megtalálható a környezetben is, izolálható háziállatokról, növényekről, tengervízből és talajból (Fell és Meyer, 1967). Diploid organizmus, csak ivartalan ciklusa ismert, a CUG-klád tagja, a referencia CDC317 törzs alapján a haploid genommérete 13,1 Mb, génjeinek száma hozzávetőlegesen 5.700 (Butler és mtsi, 2009). Korábban a *C. parapsilosis*-ként ismert faj három alcsoportot foglalt össze (I, II és III csoport), amelyek bizonyos tulajdonságaikban, köztük a virulenciájukban és molekuláris markereikben, igen nagy eltérést mutattak, ezért 2005-ben az alcsoportok faj szintű besorolást kaptak. Ennek alapján napjainkban a korábbi I. csoport *C. parapsilosis*, a II. illetve III. csoport rendre *C. orthopsilosis* és *C. metapsilosis* néven ismeretes (Tavanti és mtsi, 2005).

A *C. parapsilosis* sajátos tulajdonsága, hogy a *C. albicans*-szal illetve a *C. tropicalis*-szal ellentétben előzetes kolonizáció nélkül is képes invazív fertőzést kiváltani. Míg az említett két faj elsősorban vertikálisan általában a születéskor kerül az anyáról az újszülöttre, addig a *C. parapsilosis* jellemzően horizontálisan, egészségügyi dolgozók kezéről, vagy nem steril klinikai eszközök közvetítésével juthat a kórházban tartózkodó betegekre. Fontos tulajdonságuk, hogy hatékonyan képesek megtapadni és biofilmet képezni nem csak természetes felszíneken, hanem klinikumban használatos eszközökön is (Trofa és mtsi, 2008). A megtapadás kezdeti szakaszában a hidrofób tulajdonságú sejtfelszín szerepét sikerült tisztázni (Panagoda és mtsi, 2001). Ugyanezen tanulmány szerzői megállapították, hogy *C. albicans*-szal összehasonlítva a *C. parapsilosis* adhéziós képessége akril anyagú felszínen közel két és félszer, orális epitél sejtek esetén 20%-kal magasabb (Panagoda és mtsi, 2001). Ez a jelenség lehet az oka annak, hogy egyes felmérések szerint a *C. parapsilosis* az ápolók kezéről a legnagyobb gyakorisággal izolálható élesztő (Bonassoli és mtsi, 2005; Saiman és mtsi, 2001) és sok esetben jelen vannak orvosi eszközökön, katétereken valamint protéziseken (Ramage és mtsi, 2006). A fentiek következményeként a kórházi dolgozók, mint vektorok, kitüntetett szerepet játszanak az intenzív osztályokon ápolott páciensek megfertőzésében (Hedderwick és mtsi, 2000). Rizikófaktoroként tartjuk számon a vénás katéterek alkalmazását, antibiotikus - vagy immunszuppresszív terápiát, mesterséges táplálást, sebészeti beavatkozásokat, rosszindulatú daganatokat, szervátültetést, neutropeniás állapotot és csecsemők esetén a szélsőségesen alacsony születési súlyt (Almirante és mtsi, 2006). A kiemelkedő adhéziós képesség genetikai háttere *C. parapsilosis*-ban kevésbé kutatott. Bár a referencia *C. parapsilosis* genomban a *C. albicans* ALS (Agglutinin-like sequences) génjeinek (amelyek termékei a felszínen való megtapadásban működnek közre) öt ortológja is megtalálható, ezek virulenciában betöltött szerepét eddig egyetlen kutatócsoport sem vizsgálta (Rossignol és mtsi, 2009).

A *C. albicans*-hoz hasonlóan a *C. parapsilosis* is mutat extracelluláris enzimaktivitást. A szekretált enzimek között savas proteinázokat, foszfolipázokat valamint lipázokat találunk. A szekretált savas proteinázok proteinázok (Secreted aspartyl proteinase - SAP) szerepére több kísérlet is felhívta a figyelmet. Ismeretes, hogy mukóza modellben az enzimek specifikus blokkolásával a kezdeti penetráció elmarad (Gacser és mtsi, 2007a; Schaller és mtsi, 2003b). *C. albicans*-ban a SAP géncsaládot összesen tíz (SAP1-10) (Naglik és mtsi, 2003), *C. parapsilosis*-ban három gén alkotja (SAPP1-3) (Hruskova-Heidingsfeldova és mtsi, 2009). *C. parapsilosis*-ban a SAPP1 gén duplikáción esett át, tehát összesen négy kópiában van jelen a diploid genomban (SAPP1a, SAPP1b). Horváth és munkatársai a Sapp1 fehérjét fontos virulencia faktorként azonosították, ugyanis *in vitro* fertőzés alkalmával primer humán PBMC-k (Peripheral blood mononuclear cells) és a belőlük differenciáltatott makrofágok a SAPP1 mutáns (Δ/Δ sapp1a- Δ/Δ sapp1b) élesztőket szignifikánsan nagyobb arányban károsították, mint a vad típusú szülő törzs sejtjeit. A különbség egyik oka a fagoszóma - lizoszóma fúzió gátlása lehet, ugyanis a két kompartment fúziója közel kétszer gyakoribb volt a Sapp1 fehérjét nem expresszáló törzzsel fertőzött PBMC-kben (Horvath és mtsi, 2012).

Bár a *C. albicans* szekretált foszfolipázainak virulenciában betöltött szerepét több kísérlet eredménye is megerősíti, például epitél sejtekhez való adhézióban (Barrett-Bee és mtsi, 1985), gazda sejt károsításban (Pugh és Cawson, 1977), a *C. parapsilosis*-szal kapcsolatos vizsgálatok nem teszik egyértelművé ezen enzimek fontosságát. Egyes szerzők beszámoltak foszfolipáz aktivitásról (Ghannoum, 2000), ugyanakkor mások nem tudták azt detektálni (Kantarcioglu és Yucel, 2002). Egy publikáció szerzői csak a szisztémás izolátumokban mutattak ki enzimműködést (Dagdeviren és mtsi, 2005), míg más szerzők a bőrfelszíni izolátumok emelkedett foszfolipáz aktivitását hangsúlyozták (Fernando és mtsi, 1999).

A szekretált lipázok szerepe a szénforrásként hasznosítható lipidek bontásán kívül megnyilvánulhat sejt - és szövet adhézióban, más enzimekkel való kölcsönhatás nyomán megváltozott szubsztrátspecifitásban, gyulladásos folyamatok kiváltásában és a környező mikrobióta gátlásában (Schaller és mtsi, 2005; Stehr és mtsi, 2004). *C. albicans*-ban összesen 10 szekretált lipáz gén van jelen. Ezek közül szisztémás egér modellben egyedül a LIP8 expressziója emelkedett meg (a fertőzést követő negyedik órában) (Stehr és mtsi, 2004). A Δ/Δ lip8 mutáns törzzsel megismételve a fertőzést csökkent virulencia volt tapasztalható (Gacser és mtsi, 2007b). A *C. parapsilosis*-ban két lipáz szekvencia azonosítható (CpLIP1 és CpLIP2), amelyek közül egyedül a CpLIP2 kódol fehérjét (Brunel és mtsi, 2004; Neugnot és mtsi, 2002). Virulenciában betöltött szerepét bizonyítja, hogy lipáz blokkolók alkalmazásával

rekonstituált humán szövetben bekövetkező károsodás szignifikánsan csökkenthető volt (Gacser és mtsi, 2007a). A lipáz gének elvesztése csökkent biofilm formáló képességet eredményezett. *In vitro* körülmények között a makrofágok hatékonyabban fagocitáltak és elimináltak a mutáns sejteket, amelyek kevésbé voltak virulensek *in vivo* egér peritoneális fertőzőes modellben (Gacser és mtsi, 2007c).

3.6. A gazda - *Candida* kölcsönhatás: a patogén oldal

3.6.1. Genom plaszticitás és virulencia

A genom analízisének mérföldkövét Frederick Sanger 1977-ben publikált felfedezése jelentette, amely lehetővé tette a néhány száz nukleotid hosszúságú DNS szakaszok pontos szekvenciájának meghatározását (Sanger és mtsi, 1977). Sanger módszere a teljes genom shotgun (Whole genome shotgun - WGS), a "pairwise end sequencing" technikákkal és az informatika eszközeivel kombinálva alkalmasnak bizonyult a prokarióták megabázisos nagyságrendbe eső, a *Drosophila melanogaster* 17 Mb, majd az ember 3 Gb nagyságú genomjának meghatározásában (Adams és mtsi, 2000; Fleischmann és mtsi, 1995; Staden, 1979; Venter és mtsi, 2001). Az eljárásnak azonban komoly hátránya volt, hogy a genom méretének növekedésével a teljes folyamat időigénye és költsége aránytalanul megnőtt. Ezeket a problémákat a hagyományos módszer finomításával már nem lehetett áthidalni, ezért újabb eljárások kerültek kidolgozásra. A századfordulót követő években láttak napvilágot az összefoglaló néven következő generációs szekvenálási eljárásokként (Next generation sequencing - NGS) emlegetett módszerek. A legismertebbek a Solexa Genome Analyzer (Illumina), a 454 GSFLX Titanium (Roche Molecular Systems) és a SOLiD (Applied Biosystems) rendszerek (Bennett, 2004; Mardis, 2008; Margulies és mtsi, 2005). Ezek a technikák mellőzik az *in vivo* klónozást, költséghatékonyabbak, nagyságrendekkel gyorsabbak, és robusztus paralel működés jellemzi őket. Ez utóbbi azt jelenti, hogy ezek a berendezések legfeljebb néhány tíz, esetleg száz nukleotid hosszúságú fragmentumokat képesek leolvasni (szemben a Sanger-szekvenálás 6-800 nukleotidjával), de ezekből egyetlen futás alkalmával több milliót is képesek kezelni (Liu és mtsi, 2012). Az ilyen nagy kapacitású rendszerek különösen hasznos szolgálatot tesznek, ha nagy mennyiségű izolátum genetikai kódját kell meghatározni és összehasonlítani. A technológia képességeit legjobban az a 2013-ban megjelent publikáció jelzi, amelynek szerzői mindössze egyetlen hét alatt közel 400 élesztő teljes genom könyvtárát készítették el (Wilkening és mtsi, 2013). A módszer az informatikai háttér segítségével a patogén élesztők egyszerűbb és gyorsabb összehasonlító genomikai analízisét is lehetővé tette. A különböző *C. albicans* törzsek vizsgálata során a

genom nagyfokú változatosságára (transzlokáció, deléció, duplikáció, inverzió, kromoszóma kontrakció/extrakció) derült fény, amely a gazda környezethez való alkalmazkodás eszköze is lehet (Forche és mtsi, 2009; Larriba és Calderone, 2008; Magee, 2007; Rustchenko, 2007). Igazolást nyert, hogy ezek a jelenségek nem csak a gazda jelenlétében, hanem egyéb stresszhatások alkalmával, antifungális szerek alkalmazásakor (Selmecki és mtsi, 2006), hősök hatására (Bouchonville és mtsi, 2009), laboratóriumi transzformálások mellékhatásaként (Selmecki és mtsi, 2005) is bekövetkezhetnek.

Bár a *C. albicans* genomban megtalálhatók a meiózisban szerepet játszó fehérjék génjeinek ortológjai (Tzung és mtsi, 2001), teljes szexuális ciklust ezidáig nem sikerült megfigyelni (Bennett és Johnson, 2005; Magee és Magee, 2004). Számos modellorganizmusban (*Escherichia coli*, *S. cerevisiae*, *D. melanogaster*) ismert, hogy a genomban jelenlevő ismétlődő szekvenciák gyakran szolgálnak kromoszóma átrendeződések helyszínéül (Bartsch és mtsi, 1997; Kowalczykowski, 2000; Szostak és Wu, 1980). *C. albicans*-ban a legnagyobb kiterjedésű ismétlődő szekvenciát tartalmazó nemtelomerikus régió az ún. MRS (Major repeat sequences). Mérete néhány 10 kb-tól akár 100 kb-ig is terjedhet (Magee, 2007; Magee és Chibana, 2002) a különbség oka a régió felépítésében részt vevő ismétlődő szekvenciák eltérő számában keresendő (Chibana és mtsi, 1994; Iwaguchi és mtsi, 1992). Tekintettel arra, hogy ezek a régiók egy kivételével valamennyi kromoszómán legalább egy kópiában jelen vannak, alapot jelentenek nem homológ kromoszómák közötti átrendeződésekhez (Chibana és mtsi, 1994; Chindamporn és mtsi, 1995; Chindamporn és mtsi, 1998; Iwaguchi és mtsi, 1992). A kiterjedt repetitív szakaszok között végbemenő rekombinációs események új kromoszómák megjelenését eredményezhetik, amelyek, ha rendelkeznek centromerrel, akkor az utódsejtekben fenn is maradhatnak. Dokumentált jelenség a teljes kromoszóma aneuploidia, amelynek oka egyrészt lehet a replikáció során bekövetkező hiba, de lehet a paraszexuális ciklus során végbemenő ún. irányított kromoszóma veszteség (Concerted chromosome loss - CCL) következménye is. Ennek során a két, ellentétes párosodási típusú diploid sejt fúziójával létrejövő tetraploid sejt nem meiózison megy keresztül, hanem az egyes kromoszómák random módon eliminálódnak, amíg vissza nem áll a közel diploid állapot (Forche és mtsi, 2008). A folyamat véletlenszerű volta miatt sok esetben fordul elő a diploidtól eltérő kromoszóma készlet, vagyis létrejöhetnek olyan utódsejtek, amelyekben bizonyos kromoszómák kettőtől eltérő kópiában (monoszómia, triszómia) vannak jelen. Ezek az eltérések új fenotipikus jegyeket kölcsönözhetnek az élesztőnek. Azon sejtek, amelyek csak egyetlen kópiában hordozzák az ötös kromoszómát rövidebb generációs idővel jellemezhetők, ha L-szorbóz a kizárólagos szénforrás (Janbon és mtsi, 1998). Az SGY-243

jelű flukonazol rezisztens izolátumban a négyes kromoszóma négyről kettőre redukálódása és a hármas kromoszóma triszómiája volt kimutatható (Perepnikhatka és mtsi, 1999).

A kromoszóma mutációk másik típusa a kromoszómák számát nem, csak méretüket és szerveződésüket érinti. Az MRS régiók ebben a folyamatban is kitüntetett szerepet játszanak (Chibana és mtsi, 1994; Chindamporn és mtsi, 1995; Chindamporn és mtsi, 1998; Iwaguchi és mtsi, 1992). Diploid organizmusról lévén szó a genetikai variabilitás egyik megjelenési formája a heterozigotizáció. Két eltérő allél restriktív körülmények között életképes organizmust eredményez, ugyanakkor szelektív nyomás alá helyezve az egyik allél elvesztése (Loss of heterozygosity - LOH) szelekciós előnyt jelenthet (Coste és mtsi, 2006). A homológ szakaszok génfüziót is eredményezhetnek. Az adhézióban szerepet játszó *ALS1* és *ALS5* gének 5' régiói közötti közel 90%-os homológia lehetett az oka a közöttük végbement rekombinációs eseménynek, amely a két gén fúziójához vezetett, létrehozva ezzel az *ALS1* gént (Zhao és mtsi, 2011). A teljes genom szekvenciák analízise számos géncsalád azonosítását tette lehetővé. A duplikálódott gének bizonyos körülmények között (például dózis hatás okán) előnyhöz juttathatják az organizmust. Két azonos gén meglétekor a szelekciós nyomás hatása is lecsökken. Az egyik gén módosulása (pl.: szubsztrát specificitás, expressziós mintázat, lokalizáció) következmények nélkül bekövetkezhet, hiszen a másik (változatlan) kópia biztosítja az eredeti funkciót. Egyes szerzők a heterozigotikus allélekhez funkcionális különbséget is rendeltek. Az *ALS3* gén két allélja (12, illetve 9 repetitív elemet tartalmaz a centrális domain-ben) közül csak a nagyobb deléciónak hat negatívan az adhézióra (Oh és mtsi, 2005).

Heterozigotizáció jelentkezik abban az esetben is, ha két allél között pusztán egyetlen nukleotid eltérés mutatkozik (Single nucleotide polymorphism - SNP). *C. albicans* SC5314 jelű törzsében átlagosan 390 nukleotidonként adódik egy nukleotid különbség (Butler és mtsi, 2009; Jones és mtsi, 2004). Az SNP-k eloszlása nem egyenletes a genomban, bizonyos régiókban az átlagnál gyakrabban, másutt ritkábban fordulnak elő. Az említett törzsben a hármas kromoszóma pár jobb karjai, a hetes kromoszómapár bal karjai és az R kromoszómapár teljes egésze majdnem tökéletesen megegyezik (Jones és mtsi, 2004). Az SNP-k eloszlása nem csak egy adott törzs genomjában, hanem populáció szinten különböző izolátumok között is variál. Erre két *C. albicans* törzs genomjának összehasonlító analízise derített fényt, amely több mint 80.000 SNP jelenlétét mutatta ki (Jones és mtsi, 2004). Több tanulmány állapította meg összefüggést antifungális szerekkel szembeni rezisztencia kialakulása és pontmutációk megjelenése között (Wang és mtsi, 2009a; Warilow és mtsi, 2012).

Annak ellenére, hogy a *C. albicans* részletes komparatív genomikai analízise a fenti érdekes összefüggések levonását tette lehetővé, más *Candida* fajok részletes összehasonlító vizsgálatát ezidáig egyetlen kutatócsoport sem végezte el.

3.6.2. Morfológia és virulencia

Bizonyos környezeti faktorok hatására az élesztő sejtek sejtfaelemeinek szerveződése megváltozik, amelynek következményeként hifa vagy pszeudohifa alakul ki (Berman és Sudbery, 2002; Gow és mtsi, 2012). A folyamat több transzkripciós faktor által szigorúan szabályozott folyamat (Davis és mtsi, 2000; Zheng és Wang, 2004). A sejtfa szintézise az élesztő sejt egy kitüntetett pontjára összpontosul, apikális növekedés indul meg. A hifa sejtfalet ugyanazok a makromolekulák építik fel, mint az élesztő sejtét, de a hifa sejtfaletben részarányuk eltér az élesztőre jellemzőtől. Lényeges hangsúlyozni, hogy a szakirodalomban elérhető információk szerint a hifaképzés jóval több, mint pusztán egy alternatív megjelenési forma. A hifa lehet a fagoszómából való menekülés eszköze is. J774.2 egér makrofág sejtvonallal folytatott kísérletek során megfigyelhető, hogy az élesztő formában fagocitált *C. albicans* röviddel a fagocitózist követően a makrofágon belül hifát képes fejleszteni. A növekvő hifa mechanikus nyomást gyakorol a makrofág sejtmembránjára, amely károsodást szenved, és a gazda sejt pusztulását okozza (McKenzie és mtsi, 2010). A hifának és méginkább a megjelenésével párhuzamosan végbemenő transzkripciós változások következményeként szintetizálódó fehérjéknek kitüntetett szerepe van a virulenciában. Lo és munkatársai véleménye szerint *C. albicans*-ban a hifa esszenciális virulencia faktor, miután a Cph1 és Efg1 transzkripciós faktorok génjeit nem tartalmazó mutáns törzs *in vitro* körülmények között képtelen volt hifát képezni, ezzel párhuzamosan avirulensnek bizonyult szisztémás egér fertőzési modellben (Lo és mtsi, 1997). Később ezt az állítást egyrészt Riggle és munkatársai cáfolták meg, akik bizonyos *in vitro* és *in vivo* körülmények között is képesek voltak hifaképzést indukálni a duplamutáns törzsben (Riggle és mtsi, 1999). Másrészt bebizonyosodott, hogy a szóban forgó transzkripciós faktorok nem kizárólagosan a hifaképzést, hanem egyéb potenciális virulencia faktorok szintézisét is szabályozzák, ezért az avirulencia nem rendelhető egyértelműen a hifa képzés elmaradásához (Doedt és mtsi, 2004; Nantel és mtsi, 2002). Napjainkban folyó számos vizsgálat alapját éppen ezek a hifa sejtfalet felszínéhez kötött, vagy egyéb, a hifa képződésével párhuzamosan szintetizálódó fehérjék jelentik. Epitél sejtekkel folyó kutatások eredményei szerint ezek jelentős hányada a gazda felületen való megtapadásban (adhézió), a felszínen való szaporodásban (kolonizáció), kiterjedésben (biofilm képzés) és a tényleges sejt/szövetkárosodásban (invázió) is szerepet

játszanak. Az említett sejtekkel való kölcsönhatás kezdeti szakaszában a megtapadásban szerepet játszó gének megemelkedett expressziója mutatható ki, amelyek döntő többsége glikozilfoszfatidil-inozitol horgonnyal rögzül a sejt felszínéhez. Ezek közül az egyik legintenzívebben kutatott csoport az *ALS* gének, amelyek sejt felszíni glikoproteineket kódolnak (Fu és mtsi, 1998; Gaur és Klotz, 1997; Hoyer és mtsi, 2008; Wilson és Hube, 2010). Napjainkig *C. albicans*-ban az *ALS* géncsalád összesen nyolc tagját azonosították (Hoyer és mtsi, 2001). Bár szerveződésük és szekvenciájuk is hasonló, bizonyos körülmények között (élesztő vagy hifa forma, tápanyag ellátottság, növekedési fázis) expressziós mintázatuk különbözik (Cheng és mtsi, 2005; Green és mtsi, 2005). A megtapadást követően a mikrobák a felszínhez rögzülten, vagy annak közelében osztódásnak indulhatnak, bekövetkezhet a kolonizáció. Ennek egyik megjelenési formája a mikrobiális biofilm, amely kialakulhat abiotikus (katéterek, implantátumok) (Andes és mtsi, 2004) és biotikus (orális -, vaginális -, gasztrointesztinális mukóza) felszíneken egyaránt (Kennedy és Volz, 1985; Rahman és mtsi, 2012). Az így létrejött mikroba réteg egy különleges, háromdimenziós képződmény, amely egyedi niche-t teremt az azt alkotó élesztő -, pseudohifa - és hifa elemeknek (Andes és mtsi, 2004; Ramage és mtsi, 2004). A *C. albicans* által kiváltott szöveti károsodás folyamatáról epitél sejteket alkalmazó modellek szolgáltatnak információt. A kölcsönhatás tanulmányozása során két mechanizmust sikerült elkülöníteni, amelynek segítségével a mikroba képes sejt vagy szöveti károsodást kiváltani: a passzív ún. indukált endocitózist és az aktív penetrációt (Dalle és mtsi, 2010; Park és mtsi, 2005; Zakikhany és mtsi, 2007; Zhu és Filler, 2010). Mindkét folyamat előfeltétele az élesztő - hifa átmenettel asszociált faktorok expressziója (Naglik és mtsi, 2011). *In vitro* epitél modellben az indukált endocitózis folyamatában a hifa képződésével párhuzamosan megjelenő Als3 és Ssa1 (HSP70 hősokk fehérjecsald tagja) fehérjék szerepét sikerült tisztázni (Phan és mtsi, 2005; Sun és mtsi, 2010). Az aktív penetráció során szekretált fehérjék, elsősorban szekretált savas proteázok fontosságára derült fény, miután pepstatin A (savas proteázok specifikus blokkolója) alkalmazásakor csökkent károsodás volt tapasztalható orális epitél modellben (Naglik és mtsi, 2008). *C. albicans*-ban a *SAP* géncsalád számos tagjának expressziója emelkedik meg különböző modellrendszerekben (Schaller és mtsi, 2003a). *In vivo* egér modellben a *SAP4* és *SAP5* gének megemelkedett expressziója nyert igazolást (Staib és mtsi, 2000).

3.7. A gazda - *Candida* kölcsönhatás: gazda oldal

A mikrobákkal való kölcsönhatásra leggyakrabban különböző intakt felszíneket borító epitél illetve ennek sérülése esetén a szövetekben és a vérben található fagociták között kerül sor. Tekintettel arra, hogy a klinikai szempontból releváns *Candida* fajok a legtöbb testfelszínen megtalálhatók, sejtjeink hosszú időn keresztül kölcsönhatásban vannak ezekkel az élesztőkkel. A patogén eliminálásának első lépése annak felismerése. Ez a gazda sejt mintázat felismerő receptora(i) és a mikroba PAMP elemeinek kapcsolódásával valósul meg. A legfontosabb ilyen struktúrákat élesztő esetén a sejtfalet alkotó makromolekulák, O- vagy N-kötött mannóz, mannopeptidek valamint β -glükán jelentik. Az eddigi kutatások *Candida* (elsősorban *C. albicans*) felismerésében a C-típusú lektinek, a Toll-like receptorok (TLR) valamint a NOD-like receptorok (NLR) fontosságára hívták fel a figyelmet (Netea és mtsi, 2008). Ezek egy része (például TLR2, TLR4 és TLR9) az általuk elindított szignáltranszdukciós útvonal eredményeként citokinek expresszióját és aktiválódását indukálják. Más receptorok (például: dectin-1, DC-SIGN és a mannóz receptor) fagocitózist is közvetítenek (Cambi és mtsi, 2003; Herre és mtsi, 2004; Romani és mtsi, 2004).

Epitél sejtek. Az epitél sejtek jelentik a mikrobákkal szembeni védekezés első vonalát. Passzív elhatároló szerepük régóta ismert, ugyanakkor újabb eredmények rámutattak arra, hogy emellett aktívan is közreműködnek az immunrendszer szabályozásában és a szervezet integritásának megőrzésében. Orális-, intesztinális- és vaginális epitél sejtekkel folytatott *in vitro* vizsgálatok eredményei szerint a különböző epitél sejtek eltérő módon reagálnak *C. albicans* jelenlétére. A *Candida* sejtek felismerését követően az epitél sejtek antimikrobiális peptidek (β -defenzin, LL-37) szekrécióján (Abiko és mtsi, 2002; Li és mtsi, 2011) kívül citokinek és kemokinek közreműködésével elsősorban neutrofilek kilépését és aktiválódását idézik elő. Ezek fontosságát Weindl és munkatársai rekonstituált humán epitél modell alkalmazásával igazolták (Weindl és mtsi, 2007).

Neutrofil granulociták. A neutrofil granulociták jelentősége nem merül ki az epitél integritásának megőrzésében, az invazív candidiázis esetén is lényeges szerephez jutnak (van 't Wout és mtsi, 1988). A neutrofilek aktiválásában és a fertőzés helyén való kilépésben IL6 (Romani és mtsi, 1996; van Enckevort és mtsi, 1999), IL8 (Balish és mtsi, 1999) és TNF α (Netea és mtsi, 1999) szerepe mellett egyes tanulmányok az IL17-nek is hasonló szerepet tulajdonítanak (Schwarzenberger és mtsi, 1998; Ye és mtsi, 2001). IL17 vagy IL17 receptor mutáns egerek *in vivo* kísérletekben mind szisztémás, mind felszíni candidiázissal szemben fogékonyabbnak bizonyultak, mint a vad típusú kontroll (Conti és mtsi, 2009; Huang és mtsi, 2004). Emberben a nyálkahártya felszíneket érintő candidiázis gyakran elégtelen Th17-

es válasszal asszociált (van de Veerdonk és mtsi, 2011). A fertőzés helyére érkezve a neutrofilek mind extra-, mind intracelluláris mechanizmusokkal képesek a patogén eliminálására. Előbbi folyamat az úgynevezett NET-képződést (Neutrophils extracellular traps - NET), utóbbi a fagoszóma lumenében hidrolitikus enzimek, antimikrobiális fehérjék, valamint a NADPH-oxidáz működésének eredményeként keletkező rendkívül reakcióképes reaktív oxigén (Reactive oxygen species - ROS) - és nitrogén gyökök (Reactive nitrogen species - RNS) felhalmozódását jelenti (Aratani és mtsi, 1999; Urban és mtsi, 2009; Vazquez-Torres és mtsi, 1996). Ezek együttesen a létfontosságú makromolekulák károsításával pusztítják el a mikrobát.

Dendritikus sejtek. A dendritikus sejtek professzionális antigén-prezentáló sejtek, felületükön megtalálható mannóz receptor és DC-SIGN közreműködésével képesek *Candida* sejteket fagocitálni (Cambi és mtsi, 2003; Cambi és mtsi, 2008), majd a *Candida*-specifikus antigéneket az MHC II molekulakomplexhez kötötten prezentálni. D'Ostiani és munkatársai úgy találták, hogy a *C. albicans* élesztő és hifa forma eltérő jellegű T-sejtes választ vált ki. Előbbi 1-es típusú, utóbbi 2-es típusú T-helper választ indukál (d'Ostiani és mtsi, 2000). A perifériás vérből differenciáltatott dendritikus sejtek hatékonyan képesek fagocitálni és eliminálni a *C. parapsilosis* sejteket. A kölcsönhatás során IL1 α , IL6, TNF α és IL8 szekréció mutatható ki (Nagy és mtsi, 2011).

Monociták/makrofágok. A vérben keringő monociták és a belőlük differenciálódó szöveti makrofágok a neutrofilekre jellemző robosztus fagocitikus képességgel rendelkeznek, és a dendritikus sejtekhez hasonlóan antigén prezentálására is képesek. Ennek köszönhetően a monociták/makrofágok kulcsszerepet játszanak a vérbe/szövetekbe került mikrobák számának kordában tartásában a fertőzés korai szakaszában, illetve hatékonyan képesek kommunikálni az immunrendszer adaptív ágával (Ashman és mtsi, 2004; Ashman és Papadimitriou, 1995). Szisztémás *C. albicans* fertőzésben betöltött szerepüket *in vivo* egér modellen Qian és munkatársai igazolták (Qian és mtsi, 1994). A kórokozók felismerésében a felületükön megtalálható C-típusú lektinek és TLR-ek széles skálája működik közre (Netea és mtsi, 2008). Az antitestekkel vagy a komplement elemeivel opszonizált élesztő felvételében az Fc és komplement receptorok játszanak szerepet. Humán perifériás vérből izolált mononukleáris sejtek *C. albicans*-ra, antigénjeire illetve mannosprotein struktúráira adott válasza IL1 β , TNF α , IL6, IL12, GM-CSF (Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor) IFN γ , kemokinek (IL8, MIP-1/2/4), kemokin receptorok (CCR1, 5, 7, CXCR5) megemelkedett expressziójával volt jellemezhető (Ausiello és mtsi, 1993; Gauchat és mtsi, 1989; Henderson és Rippin, 1995; Jeremias és mtsi, 1991; Kim és mtsi, 2005). Az említett folyamatokkal párhuzamosan

megkezdődik a patogén eliminálása, amelyben a neutrofileknél ismertetettekhez hasonlóan reaktív oxigén és nitrogén gyökök, enzimek valamint antimikrobiális fehérjék működnek közre (Bogdan és mtsi, 2000).

3.8. A gazda - *Candida* kölcsönhatás: az interakció molekuláris szintű tanulmányozása

Egy mikroba számára kulcsfontosságú az a képesség, hogy saját működését a folyton változó környezethez tudja igazítani. A kommenzalisták számára további nehézséget jelent, hogy nem csak a körülmények passzív megváltozásához kell alkalmazkodniuk, hanem a gazda aktív, célzott védekezési folyamatainak is ellen kell állniuk, hiszen a patogén megjelenésére a gazda fagocitózissal, citokinek szintézisével és szekréciójával reagálhat. Az állandó kitettség során ezek az élesztő sejtek folyamatosan, adaptációs lépések sorozatán mennek keresztül, amelynek következményeként még ugyanazon faj különböző sejtjei között is fiziológiai illetve virulenciabeli eltérések jelentkezhettek (Koga-Ito és mtsi, 2006; Mane és mtsi, 2012; O'Day és mtsi, 2000). Ez az adaptáció rövidtávon génexpressziós változásokkal, hosszútávon a genom megváltozásával valósulhat meg.

A génexpresszió vizsgálatának eszközei tradíció szerint a Northern-blot (Alwine és mtsi, 1977) illetve a később elérhetővé vált a (cDNS szintézist követően) kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakció (quantitative real-time polymerase chain reaction - qRT-PCR) (Chiang és mtsi, 1996) és az RNS microarray (Schena és mtsi, 1995). Utóbbi alkalmazásával egy reakcióban egyetlen organizmus teljes expressziós mintázatának megváltozásáról információ nyerhető. Megjelenését követően rövidesen széles körben elterjedt, és a gazda-patogén kölcsönhatás tanulmányozásának is fontos eszközévé vált. Technikai okok miatt, kezdetben csak a gazda sejtek válaszának jellemzésére volt használatos, ugyanis problémát jelentett, hogy a mikroba RNS izolálása után a minta sok esetben hordozott nagy mennyiségű gazda RNS szennyezést. Az eljárás segítségével kezdetben oldott molekulák (többnyire citokinek) hatásának vizsgálatára (Alizadeh és mtsi, 1998; Der és mtsi, 1998; Schena és mtsi, 1996), később tényleges gazda-patogén kölcsönhatás jellemzésére is lehetőség nyílt (Zhu és mtsi, 1998). A microarray technika *C. albicans*-szal indukált THP-1 humán monocitászzerű sejtvonal transzkripció mintázatának jellemzésére is sikerrel volt alkalmazható (Barker és mtsi, 2005). A THP-1 sejtek korábban már számos tanulmány alapjául szolgáltak, így a microarray adatok, a nagy mennyiségű új információ felül, ezen eredmények kiegészítéséül is szolgáltak (Ghoneum és mtsi, 2003; Jouault és mtsi, 1994; Suzuki és mtsi, 1998). Kim és munkatársai primer humán monociták *C. albicans*-ra adott válaszát vizsgálták microarray

segítségével a fagocitózis során regulálódó gének részletes időbeli expressziós mintázatának rögzítésével (Kim és mtsi, 2005).

Az *in vitro* fertőzésből izolált patogének, eleinte baktériumok, expressziós mintázatának microarray analízisére az ezredforduló környékén került sor (Belcher és mtsi, 2000; de Saizieu és mtsi, 2000; Ichikawa és mtsi, 2000; Schnappinger és mtsi, 2003). Röviddel ezután a legfontosabb humán patogén élesztők (*C. albicans*, *Cryptococcus neoformans*) vizsgálatára szolgáló chip-ek is elérhetővé váltak, így lehetőség nyílt a gazda hatására bekövetkező transzkripciós változások széleskörű jellemzésére (Fan és mtsi, 2005; Lorenz és mtsi, 2004).

A technikai háttér fejlődésének köszönhetően napjainkban már nem csak a genom, hanem a transzkriptóm szekvenálásának (RNA-seq) technikai eszközei is biztosítottak (Wang és mtsi, 2009b). Ennek előnye, hogy bármilyen fajról is legyen szó a teljes RNS populációról mennyiségi és minőségi információ nyerhető. A vizsgált gének számát nem limitálja a chip-en reprezentált génpopuláció, és a megannyi splice variáns valamint a rövid szabályozó RNS-ek expressziójáról is tájékozódhatunk, így a technika jóvoltából a kölcsönhatás során végbemenő változásokról minden eddigénél részletesebb adatok nyerhetők. Jó példa erre az egér mioblaszt sejtek RNA-seq analízise amely 4.000, korábban nem ismert transzkriptet azonosított (Trapnell és mtsi, 2010). Bebizonyosodott, hogy hatékonyan alkalmazhatók a kölcsönhatásban részt vevő gazda és patogén sejtek szignalizációs/transzkripciós útvonalainak és hálózatainak azonosítására (Amit és mtsi, 2011; Mandlik és mtsi, 2011; Sessions és mtsi, 2013). Szintén hatalmas előrelépés a microarray analízishez képest, hogy a rendelkezésünkre álló bioinformatikai eszközöknek köszönhetően a gazda és a patogén RNS elkülönítése megoldott (Amit és mtsi, 2011). A gyakorlatban ezt Tierney és munkatársai igazolták először, akik kísérletükben egér csontvelőből differenciáltatott dendritikus sejtek és *C. albicans in vitro* kölcsönhatását vizsgálták (Tierney és mtsi, 2012).

Az alkalmazkodás hosszú távú eszközét a genetikai variabilitás, a SNP-k és a kromoszómamutációk, jelentik. Ugyanazon *C. albicans* törzset *in vivo* (egérbe oltva) és *in vitro* (folyadék tenyészet) körülmények között növesztve a gazda stressznek kitett élesztők hosszabb generációs idővel és kromoszóma átrendeződéssel voltak jellemezhetők (Forche és mtsi, 2009). Marr és munkatársai egy csontvelő transzplantáción átesett páciensből izolált flukonazol rezisztens törzsben (FH8) egy hozzávetőlegesen 200 Kb méretű deléciót mutattak ki. A töréspont környezetében 3 gént azonosítottak, amelyek egymással homológ szekvencia részletet tartalmaztak (Marr és mtsi, 1998). A genetikai variabilitás szélsőséges esetekben ennél jóval komplexebb jelenségek forrása is lehet. Sampaio és munkatársai flukonazol

kezelésben részesülő, visszatérő candidiázisban szenvedő páciensből származó *C. albicans* izolátumok virulenciáját vizsgálták. A kezelés kezdetén, majd három hónappal később begyűjtött minták (rendre 124A és 140A) MLST (Multilocus sequentyping) analízise igazolta, hogy bár ezek egyetlen törzs izolátumainak tekinthetők, a két minta között kromoszómális különbségek mutathatók ki. A két izolátum virulenciájának összehasonlítása *in vivo* egér modell alkalmazásával történt. Eredményeik szerint a korábbi izolátum valamennyi vizsgált paraméter (túlélés, vese nekrosis, gyulladás időtartama) szempontjából virulensebbnek bizonyult a későbbi izolátumnál. Egér makrofágokkal való négy órás *in vitro* inkubálás során a 124A izolátum 50%-os makrofág pusztulást váltott ki, míg a 140A izolátum nem okozott szignifikáns károsodást. A 124A izolátum magasabb extracelluláris foszfolipáz aktivitással volt jellemezhető, és toleránsabbnak bizonyult H₂O₂-dal valamint ecetsavval szemben. A szerzők konklúziója szerint a genetikai variabilitás eszköze lehet egy folyamatosan változó immunkompetenciájú gazdához való alkalmazkodásnak (Sampaio és mtsi, 2010).

4. CÉLKITŰZÉSEK

Munkánk elsődleges célja az egyre növekvő egészségügyi problémát jelentő opportunistá humán patogén élesztő, a *C. parapsilosis* emlős fagocitákkal történő kölcsönhatásának jellemzése volt. Választ kerestünk arra, hogy az említett gazda sejtek fagocitálják-e az élesztőt, és ha igen, mi lesz annak további sorsa. Célunk volt továbbá a kölcsönhatás során az élesztőben és a fagocitákban bekövetkező transzkripciósváltozások nyomon követése, és a kiváltott immunválasz jellemzése. Meg kívántuk vizsgálni, hogy a két különböző niche, vagyis a környezeti és a gazda miliő milyen genomi szerveződéssel párosul *C. parapsilosis*-ban, és milyen genetikai elemek járulhatnak hozzá a kétféle környezethez való alkalmazkodáshoz.

Hogy a felmerült kérdésekre válaszokat adjunk, az alábbi célokat tűztük ki:

1. A gazda - *C. parapsilosis* kölcsönhatás jellemzésére alkalmas *in vitro* modellrendszer kidolgozása és alkalmazása.
2. A modell használata gazda-patogén interakció komplex tanulmányozására. Klinikai és környezeti *C. parapsilosis* izolátumok, mutáns törzsek *OLE2* ($\Delta/\Delta ole2::FRT$), *LIP* ($\Delta/\Delta lip1-\Delta/\Delta lip2::FRT$) valamint közel rokon fajok (*C. orthopsilosis* és *C. metapsilosis*) bevonásával a kiváltott gazda válasz esetlegesen eltérő jellegének, és a különböző törzsek fagociták jelenlétében potenciálisan megváltozott génexpressziós mintázatainak felderítése és összehasonlítása.
3. Klinikai és környezeti *C. parapsilosis* izolátumok genomi szintű részletes összehasonlító analízise. Az esetleges különbségek és az alkalmazkodás eszközeinek felderítése.

5. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

5.1. A kísérletekben használt mikrobák

Fajnév	Azonosító kód	Származási hely	Forrás	Hivatkozás
<i>Candida albicans</i>	ATCC 90028	Iowa, USA	Humán vér	(Espinell-Ingroff és mtsi, 1992)
<i>Candida glabrata</i>	CBS 138	n.a.	Humán széklet	(Sato és mtsi, 1994)
<i>Candida guilliermondii</i>	CBS 566	n.a.	Humán köpet	(Kurtzman és Suzuki, 2010)
<i>Candida krusei</i>	CBS 573	Sri Lanka	Humán köpet	(Rudek, 1978)
<i>Candida metapsilosis</i>	PL 429	Pozsony, Szlovákia	n.a.	(Lott és mtsi, 1993)
<i>Candida orhopsilosis</i>	MCO 456	Pozsony, Szlovákia	n.a.	(Lott és mtsi, 1993)
<i>Candida parapsilosis</i>	CDC 317	n.a.	Klinikum	(Kuhn és mtsi, 2004)
<i>Candida parapsilosis</i>	CBS 1954	Olaszország	Olajfa, termés	(van Rij és Verona, 1949)
<i>Candida parapsilosis</i>	CBS 6318	USA	Egészséges humán bőr	(Valach és mtsi, 2012)
<i>Candida parapsilosis</i>	GA1	Hamburg, Németország	Humán vér	(Gacser és mtsi, 2005)
<i>Candida parapsilosis</i>	LIP ⁻ *			(Gacser és mtsi, 2007c)
<i>Candida parapsilosis</i>	OLE2 ^{**}			
<i>Candida tropicalis</i>	CBS 94	n.a.	Hörghurutban szenvedő beteg	(Sato és mtsi, 1994)

*a GA1 jelű törzs szekretált lipázokra (lipáz-1 és lipáz-2) nézve deficiens, Δ/Δ *lip1*- Δ/Δ *lip2*::FRT genotípusú mutánsa

** a GA1 jelű törzs $\Delta 9$ sztearil koenzim A zsírsav deszaturáz 2 génre (*OLE2*) nézve deficiens, Δ/Δ *ole2*::FRT genotípusú mutánsa

5.2. A kísérletekben használt sejtvonalak

Sejtvonal neve	Organizmus	Forrás	Típusa	Hivatkozás
J774.2	<i>Mus musculus</i>	BALB/C egértörzs	Makrofágszerű	SIGMA-ALDRICH
THP-1	<i>Homo sapiens</i>	Akut mieloid leukémiás beteg	Monocitászű	SIGMA-ALDRICH

5.3. Tenyésztéshez használt tápoldatok, táptalajok

YPD-PS tápoldat/táptalaj: 0,5 m/V% élesztő kivonatot, 1 m/V% peptont és 1 m/V% D-glükózt tartalmazó tápoldat, 100 U/ml penicillin-sztreptomycin oldattal kiegészítve. Táptalaj esetén további 2,5 m/V% agarral kiegészítve.

J774.2 tápoldat: BioWhittaker DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) tápoldat, 10 V/V% hőinaktivált FBS-sel 100 U/ml penicillin-sztreptomycin oldattal kiegészítve.

THP-1 tápoldat: RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640 tápoldat, 10 V/V% hőinaktivált FBS-sel, 100 U/ml penicillin-sztreptomycin oldattal és 0,05 μ M β -Merkaptoetanollal kiegészítve.

PBMC/PBMC-DM tápoldat: RPMI 1640 tápoldat, 10 V/V% hőinaktivált humán szérummal, 100 U/ml penicillin-sztreptomycin oldattal kiegészítve.

5.4. Kísérleti módszerek

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

Candida törzsek fenntartása: Az élesztő törzseket YPD-PS táptalajon tartottuk fenn 4 °C-os hűtőben, kéthavonta frissítve a tenyészeteket.

Candida törzsek tenyésztése: Az élesztőket a felszaporításhoz szilárd táptalajról oltottuk kacsas 2 ml YPD-PS tápoldatba, majd 30 °C-on, rázatóban hozzávetőlegesen 200-as fordulatszámmal egy éjszakán át inkubáltuk.

J774.2 és THP-1 sejtek tenyésztése/fenntartása: A fagociták felnevelése a korábban leírt összetételű, a sejtípusnak megfelelő tápoldatban történt, 37 °C, 5% CO₂ tenzió és 100%-os relatív páratartalom mellett.

Egér hasüregi makrofágok izolálása: Az említett sejtípus izolálása vad típusú BALB/C egerekből történt. Az egerek hasüregét 10 ml jéghideg, steril PBS-sel (0,8 m/V% NaCl, 0,02 m/V% KCl, 0,144 m/V% Na₂HPO₄, 0,024 m/V% KH₂PO₄) mostuk át. Az így nyert makrofágokat centrifugálással (120 g, 10 min) gyűjtöttük össze. A vörösvértestek eltávolítása ACK lízis pufferrel (0,8 m/V% NH₄Cl, 0,1 m/V% KHCO₃) való kezeléssel történt (10 min, jégen). Ülepítést követően (120 g, 10 min) a sejteket 37 °C-ra melegített J774.2 tápoldatban szuszpendáltuk fel. A sejteket 12 mintahelyes tenyésztőedényben inkubáltuk a ”**J774.2 és THP-1 sejtek tenyésztése/fenntartása**” pontban leírt körülmények között, majd egy órával később a letapadt sejteket előmelegített PBS-sel mostuk, végül friss előmelegített J774.2 tápoldattal láttuk el, és azonnal fertőztük.

PBMC izolálás és PBMC-DM differenciáltatás: A perifériás vér mononukleáris sejtjeinek izolálása egészséges felnőtt donorok véréből előállított „buffy coat” vérkészítményből történt Ficoll Paque Plus (GE Healthcare) sűrűség grádiens centrifugálással (175 g, 30 min, 4 °C). A PBMC frakció összegyűjtését (220 g, 10 min) követően az ”**Egér hasüregi makrofágok izolálása**” pontban leírtak szerint a sejteket ACK lízis pufferrel kezeltük, PBMC tápoldatban vettük fel és 12 mintahelyes tenyésztőedénybe inkubáltuk őket két órán keresztül (37 °C, 100% relatív páratartalom, 5% CO₂ tenzió). A mintahelyeket 1-1 ml előmelegített PBS-sel mostuk, majd 1-1 ml PBMC tápoldatban 5 napon keresztül a fent említett körülmények között inkubáltuk a sejteket. Ez idő alatt a PBMC-k makrofágokká differenciálódtak.

5.4.2. Fertőzés, fagocitózis és ölési hatások meghatározása

In vitro fertőzés: Az *in vitro* fertőzésekhez tenyésztő csészéket vagy 6-, 12- 96 mintahelyes tenyésztőedényeket használtunk. Ezekben rendre 3x10⁶ (/8 ml), 5x10⁵ (/2 ml), 2x10⁵ (/1 ml) illetve 5x10⁴ (/100 µl) gazda sejtet fertőztünk ötszörös mennyiségű élesztővel. A PBMC-DM sejteken közvetlenül a fertőzést megelőzően tápoldatot cseréltünk. Az egér hasüregi makrofágokat közvetlenül izolálás után fertőztük. A gomba sejteket a korábban leírtak szerint szaporítottuk fel, majd PBS-sel (2500 g, 3 min) való kétszeri mosást követően steril PBS-ben állítottuk be a kívánt sejtkoncentrációt.

Fagocitózis vizsgálat: A J774.2 makrofágok fagocitáló képességének analizéséhez Alexa Fluor 647 karboxilsav szukcinimidil észter fluoreszcens festékkel jelölt élesztőket használtunk a korábban ismertetett protokoll szerint (Nemeth és mtsi, 2013). Ezeket J774.2 fagocitákkal inkubáltuk 12 mintahelyes tenyésztőedényben a kísérlettől függően 15, 30, 60, 120 és 180 percig. A sejteket PBS-sel való mosást követően 50 µl FACS pufferben (0,5% FBS PBS-ben oldva) szuszpendáltuk fel. Az így előkészített minták vizsgálata és elemzése Amnis FlowSight készülékkel és a mellékelt IDEAS kiértékelő szoftverrel történt.

Ölési hatások meghatározása: A THP-1 sejtek fertőzése az "*In vitro fertőzés*"-pontban ismertetett módon 96 mintahelyes tenyésztőedényben történt. Ezzel párhuzamosan a fagocitákat nem, kizárólag a THP-1 tápoldatot tartalmazó kontroll mintahelyekbe is élesztő szuszpenziót pipettáztunk a fertőzéshez használt mennyiségben és térfogatban. 3, 6 illetve 12 h inkubációt (37 °C, 100% relatív páratartalom, 5% CO₂ tenzió) követően a szuszpenziót mikrocentrifuga csövekbe gyűjtöttük, és fecskendőre illesztett 27G vagy 29G jelű injekciós tű segítségével feltártuk a sejteket. A hígított szuszpenzióból 100 µl-t szélesztettünk YPD-PS táptalajra, amelyeket két napon keresztül 30 °C-on inkubáltunk. A telepszámok ismeretében az ölési hatékonyság kiszámítása az alábbi képlet szerint történt:
$$\left[\left(\text{Átlag}_{\text{Kontroll}} - \text{Átlag}_{\text{Fertőzés}} \right) / \text{Átlag}_{\text{Kontroll}} \right] \times 100.$$

5.4.3. Mikroszkópos vizsgálatok

Scanning elektronmikroszkópia: A 24 mintahelyes tenyésztőedénybe helyezett korong alakú fedőlemezekre tenyésztett J774.2 sejteket az "*in vitro fertőzés*" pontban leírtak szerint *C. parapsilosis* GA1 törzsszel fertőztük. 1 órával később, PBS-es mosást követően a mintákat fixáltuk 2,5% glutáraldehidet tartalmazó Sorenson-pufferben (pH=7,5) egy éjszakán át 4 °C-on. A szárítást felszálló alkoholsorral végeztük: 50% etanol (2x15 min, jégen), 70% etanol (2x15 min, jégen), 80% etanol (2x15 min, jégen), 90% etanol (2x15 min, jégen), 95% etanol (2x15 min, jégen), abszolút etanol (2x15 min, jégen). A fedőlemezeket ezután terc-butil alkohol : abszolút etanol 1:2, 1:1, 2:1 arányú keverékébe, majd 100%-os terc-butil alkoholba helyeztük 1-1 órára szobahőmérsékleten. A mintákat végül tömény terc-butil alkoholban 4 °C-on fagyasztottuk, és egy éjszakán át liofilizáltuk. A mintákat rögzítettük, majd a szükséges aranyréteg felvitelét követően (Quorum Technologies SC 7620 'Mini') a mintákat Hitachi S-4700 scanning elektronmikroszkóp segítségével elemeztük.

Akridin narancs/kristály ibolya festés: A festés alapjául Miliotis által közölt módszer szolgált (Miliotis, 1991). A J774.2 makrofágokat a "**Scanning elektronmikroszkópia**" pontban ismertetett módon korong alakú fedőlemezekre tenyésztettük és fertőztük. 3 illetve 8 órával ezután a minták festéséhez 0,01 m/V%-os akridin narancs oldatot illetve 0,15 M-os kristály ibolya festéket alkalmaztunk fél-fél percre. Valamennyi lépést PBS-es mosás követett. A korongokat átlátszó körömlakkal rögzítettük tárgylemezen egy csepp PBS-ben. A festést szobahőmérsékleten, sötétben végeztük. A mintákat Olympus DP-72 fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk.

Lizoszóma - fagoszóma kolokalizációs vizsgálat: A lizoszómákat LysoTracker Red -, az élesztőket FITC (Fluorescein-izotiocianát) fluoreszcens festékekkel tettük láthatóvá. A gombákat egy éjszakán át tenyésztettük YPD-PS-ben, kétszer mostuk PBS-sel (2500 g, 3 min), majd FITC-pufferben (100 mM NaCl, 50 mM NaHCO₃) vettük fel, amelyhez 25 µg/ml végkoncentrációban FITC festéket adtunk. A szuszpenziót fénytől elzárva, rázatásban (~ 200 rpm) inkubáltuk egy éjszakán át 30 °C-on, majd 5x mostuk PBS-sel, és fertőztük a "**Scanning elektronmikroszkópia**" pontban említett, korongokon nevelt J774.2 makrofágokat. Az inkubációt követően a mintahelyekben lévő tápoldatot, PBS-ben oldott 50 nM koncentrációjú LysoTracker Red oldatra cseréltük. Két órával később az oldatot eltávolítottuk, a mintákat PBS-sel mostuk, majd PBS-ben, átlátszó körömlakk segítségével tárgylemezre rögzítettük. A felvételeket Olympus konfokális LSM mikroszkóppal készítettük.

5.4.4. Molekuláris technikák

DNS kivonás gombából: A törzseket a "**Candida törzsek tenyésztése**" pontban leírtak szerint neveltük fel. A sejtek feltárása 500 µl lízis pufferrel (1 m/V% SDS, 50 mM EDTA, 100 mM TRIS pH=8) és 500 µl üveggyönggyel, 3 perc vortex rázatással történt. A mintákhoz 275 µl 7 M-os ammónium-acetátot adtunk, és 5 percig 65 °C-on, majd 5 percig jégen inkubáltuk őket. 500 µl kloroform-izoamilalkohol (24:1) hozzáadását követően a mintákat centrifugáltuk (16000 g, 10 min). A felső fázist egy másik csőbe pipettáztuk, amelyhez 500 µl izopropanolt adtunk, és 5 percre -20 °C-ra helyeztük. Az oldatot centrifugáltuk (16000 g, 10 min) a felülúszót eltávolítottuk, a kiülepedett csapadékot 70%-os etanollal mostuk a fenti paraméterekkel. A felülúszó eltávolítása után a mintákat szárítottuk, és 100 µl RN-ázos bidesztillált vízben szuszpendáltuk fel.

RNS kivonás J774.2 sejtekből: Az RNS kivonáshoz Qiagen RNeasy Plant Mini Plus Kit-et használtunk a gyártó utasításai szerint. A folyamat során DN-áz kezelést végeztünk 20 percen keresztül, melyhez Qiagen RNase-Free DNase Set-et használtuk.

RNS kivonás THP-1 és gomba sejtekből: Az RNS kivonáshoz Qiagen RNeasy Plant Mini Plus Kit-et használtuk a gyártó utasításainak megfelelően, a következő módosításokkal. A gombákat illetve a fagocitákat 15 ml-es Falcon csőbe gyűjtöttük össze, majd ülepítettük ki (220 g, 5 min, 4 °C). A sejteket jéghideg PBS-sel mostuk azonos körülmények között. A szuszpenziót 500 µl steril RN-áz mentes desztillált vízben szuszpendáltuk fel, majd steril fecskendő (1ml) és injekciós tű (27G vagy 29G) segítségével feltártuk a fagocitákat. A szuszpenziót centrifugáltuk (2500 g, 3 min), és a felülúszó 475 µl-et eltávolítottuk. A kiülepedett sejteket 650 µl RLT feltáró pufferben szuszpendáltuk fel. Az RNS izolálás további lépései a gyártó, gomba sejtekhez javasolt protokollja szerint történtek.

RNS minőség/mennyiség ellenőrzés: Az izolált RNS mennyiségét NanoDrop ND-1000-es spektrofotométer, a minőségét Agilent 2100 Bioanalyzer készülék segítségével határoztuk meg.

Microarray analízis: Az analízishez Whole Mouse Genome 4x44K Oligo microarray-t használtunk a gyártó utasításainak megfelelően. A "RNS kivonás J774.2 sejtekből" pontban ismertetett módon izolált totál RNS minták 1-1 µg-jából Agilent QuickAmp Labeling Kit felhasználásával szintetizáltunk cDNS-t, majd ezt templátként felhasználva Cy3 jelölt cRNS-t szintetizáltunk a protokoll leírását követve. A jelölt cRNS-t tisztítottuk (Qiagen RNeasy kit) majd NanoDrop ND-1000 spektrofotométer segítségével meghatároztuk a festék mennyiségét (>9 pmol/µg cRNS) és a cRNS koncentrációját. Minden mintából 1,65 µg Cy3 jelölt cRNS-t alkalmaztunk a hibridizációs lépéshez, amelyet 65 °C-on végeztünk 17 órán át. A fluoreszcens szignálok dokumentálása Agilent Microarray Scanner segítségével történt, az adatok kiértékeléséhez a „Feature Extraction” program 10.5.1.1 verzióját és a GeneSpringGX szoftvert használtuk. A szignifikánsan megváltozott expressziót mutató gének azonosítására a Database for Annotation, Visualization és Integrated Discovery (DAVID) Bioinformatic Resources 2007 szoftvert (Huang da és mtsi, 2009) használtuk.

cDNS szintézis: A reverz transzkripcióhoz Fermentas RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit-et használtunk a gyártó utasításainak megfelelően. Minden reakció 0,5-0,5 µl

oligo (dT)18 és random hexamer primereket tartalmazott. A szintézis során maximum 1 µg, RNS templátot használtunk. A reakció lépései: 25 °C, 5 min majd 42 °C, 60 min és 70 °C, 5 min.

Valós idejű kvantitatív PCR (qRT-PCR): A génexpressziós vizsgálathoz Fermentas Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (2x) Kit-et használtunk a gyártó utasításainak megfelelően. A reakció 20 µl végtérfogatban zajlott, a gyártó által mellékelt protokollban szereplő térfogatokat ennek megfelelően csökkentettük. A program lépései a következők voltak: 95 °C, 3 min, majd 50 cikluson keresztül 95 °C, 10 sec majd 60 °C, 30 sec. 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, a gyártó által mellékelt szoftverrel. Egér esetén β-aktin, humán esetén β-2 mikroglobulin szolgált belső kontrollként. A reakciókban használt primerek listáját az 1. számú melléklet tartalmazza.

Tnfrsf9 jelölés és áramlási citometria: a "*Candida* törzsek tenyésztése" pontban ismertetett módon felszaporított élesztőket 5x mostuk PBS-sel, majd 1:5 arányban fertőztük a 6 mintahelyes tenyésztőedényben nevelt J774.2 makrofágokat. A sejteket PBS-sel mostuk, majd 4%-os paraformaldehiddel fixáltuk, és PBS-ben 500x-osra hígított fikoeritrin konjugált anti-Tnfrsf9 antitesttel inkubáltuk 1 órán át, fénytől védve, szobahőmérsékleten. A sejteket PBS-sel mostuk és FACScan áramlási citométerrel analizáltuk.

Polimeráz láncreakció: Valamennyi PCR-t (ALS gének és deléció validáció) Fermentas DreamTaq DNA Polymerase Kit-tel végeztünk. Egyetlen 20 µl végtérfogatú reakció az alábbi komponenseket tartalmazta: 1x DreamTaq puffer (20 mM MgCl₂), 0,25-0,25 µM forward és reverse primer (Sigma), 0,2-0,2 mM dNTPs (Fermentas), 20-50 ng genomi DNS templát és 1 unit DreamTaq DNA polimeráz. A fenti reakcióelegyet az alábbi körülmények között inkubáltuk: 94 °C, 3 min elődenaturáció, majd 35 cikluson keresztül 94 °C, 15 sec, 56-60 °C, 15 sec és 0:15 - 1:40 min 72 °C végül 72 °C, 3 min utópolimerizáció. A nagy számú primerkombináció és a reakciók során képződő fragmentumok különböző méretei miatt az annealing hőmérsékleteket és a polimerizáció időtartamát minden egyes reakcióra optimalizálni kellett. Az ALS gének amplifikációjához és a deléciók igazolásához használt primereket rendre a 2. illetve a 3. számú melléklet, a PCR-ek körülményeit a 4. számú melléklet tartalmazza. A termékek minőségéről, méretüktől függően, 1%, 2% (DEL#16 és

DEL#17) vagy 3%-os (DEL#18, DEL#19 és DEL#20) agaróz gélen horizontális gélelektroforézis segítségével győződünk meg.

PCR amplikonok izolálása Sanger-szekvenáláshoz: PCR termékek izolálását Geneaid Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit-tel végeztük agaróz gélből a gyártó "Gel Extraction (Sequencing) Protocol" utasításainak megfelelően.

DIG-dUTP jelölt próbák előállítása: A DIG-jelölt próba elkészítéséhez Fermentas DreamTaq DNA Polymerase Kit-et használtunk a gyártó által javasolt protokoll szerint. A dNTP mix összeállítása Fermentas dNTP és Digoxigenin-11-dUTP (Roche) felhasználásával történt. A komponensek koncentrációja megegyezett a "**Polimeráz láncreakció**" pontban ismertetett körülményekkel. A PCR program az alábbi lépéseket tartalmazta: 3 min elődenaturáció 94 °C-on, majd 35 cikluson keresztül 15 sec, 94 °C, 15 sec, 52-57 °C, 1:20 min, 72 °C, végül utópolimerizáció 3 min, 72 °C-on. A felhasznált primerek szekvenciáit és a PCR-ek annealing hőmérsékleteit a pontos DIG-dUTP mennyiségek feltüntetésével rendre az 5. és 6. számú melléklet tartalmazza.

Southern hibridizáció: Munkánk alapjául Gácsér és munkatársai által publikált módszer szolgált (Gácsér és mtsi, 2007c). A genomi DNS-t a „**DNS kivonás gombából**” pontban leírtak alapján izoláltuk, és a következő restrikciós enzimekkel (Fermentas) egy éjszakán át emésztettük: *KpnI-SacI* (Deléció-3), *EcoRI* (Deléció-5), *HindIII* (Deléció-6) a gyártó utasításainak megfelelően. A DNS-t izopropanollal csaptuk ki és 70%-os etanollal mostuk (16000 g, 10 min). A mintákat 0,8% agaróz gélen futtattuk DIG-jelölt DNA Molecular Weight Marker VII (Roche) mellett. A fragmentumokat Amersham Hybond-N (GE Healthcare) filterre blottoltuk, és UV fénnel kovalensen rögzítettük. A hibridizáció egy éjszakán át zajlott 65 °C-on a „**DIG-dUTP jelölt próbák előállítása**” pontban leírt amplikonokkal. A DNS szakaszokat Antidigoxigenin-AP Fab fragmentumokkal (Roche) és NBT/BCIP (Roche) oldattal tettük láthatóvá

5.4.5. Kariotipizálás

Protoplasztálás: Az agaróz blokkok előállítását Schwartz és Cantor által kidolgozott módszer alapján végeztük (Schwartz és Cantor, 1984), a következő módosításokkal. A törzseket 5 ml YPD-PS tápoldatban neveltük (30 °C, ~ 200 rpm), oxigén dús környezetben egy napon keresztül, majd a teljes szuszpenziót friss 5 ml YPS-PS tápoldatra cseréltük, és egy

újabb éjszakán át inkubáltuk az említett körülmények között. Az élesztő szuszpenzió 1 ml-ét kétszer mostuk jéghideg 0,05 M EDTA-val (Sigma) (pH=7,5) (2000 g, 3 min), majd a kiüledett sejteket 1 ml frissen elkészített izotóniás pufferben (0,1 M foszfát-citrát pufferben oldott 0,7 M szorbitol, 0,3 M mannitol, 1 mM EDTA pH=5,8) oldott 1 M-os Natioglikolátban inkubáltuk (30 °C, 1 h, ~ 200 rpm). Izotóniás pufferrel való mosást követően (2000 g, 3 min), 5 ml izotóniás pufferben oldott 3 m/V% Helikáz és 0,5 m/V% NovoZym 234 (Novo BioLabs) enzimeket tartalmazó oldatban inkubáltuk (30 °C, ~ 200 rpm, egy éjszakán át).

Agarózba ágyazás: A szferoplasztokat izotóniás pufferrel való mosást (300 g, 5 min) követően 42 °C-ra melegített 0,125 M EDTA-ban szuszpendáltuk fel, majd 2%-os alacsony olvadáspontú agarózzal (Sigma) kevertünk össze, és pipettáztunk öntőformába. Az agaróz blokkokat 1 mg/ml Proteináz K-val (Sigma) kiegészített 2 ml NDS pufferben (1% N-laurylsarcosine 0,5M EDTA-ban oldva, pH=9,5) inkubáltuk (50 °C, két nap). Ez idő alatt az oldatot egyszer cseréltük. A blokkokat egy éjszakán keresztül 0,5 M EDTA-ban (pH=8) mostuk 4 °C-on, majd újra cserélve használatig ebben az oldatban tároltuk.

Futási paraméterek: Az élesztő kromoszómákat CHEF eljárással (Chu és mtsi, 1986) választottuk szét a következő beállításokkal: 0,9%-os agaróz gél, 60-450 sec switching time, 90 V feszültség, 168 h futási idő. Futtató közegként 0,5x TBE puffert alkalmaztunk (10 °C), amelyet hozzávetőlegesen 42 óránként cseréltünk le. A gél festése 0,1%-os etídium-bromid oldatban (30 min), defestése desztillált vízben (4 °C, egy éjszakán át) történt.

5.4.6. Genom és RNS szekvenálás, *in silico* - és statisztikai analízis

Az *in silico* vizsgálatok (mind a genom, mind az RNS szekvenálás) kollaborációban zajlottak Dr. Toni Gabaldón és Leszek Pryszcz közreműködésével (CRG, Barcelona, Spanyolország). A módszereket együttműködő partnerünk bocsátotta rendelkezésünkre, amelyek részletes leírását a 7. számú melléklet tartalmazza.

Genom szekvenálás: A három törzs (CBS 1954, CBS 6318 és GA1) szekvenciájának meghatározására a CRG genomikai központjában került sor Illumina GAIIx vagy HiSeq2000 szekvenáló berendezés segítségével.

Genom összeillesztés: A művelet során a leolvasások szuperkontigba illesztéséhez a SOAPdenovo program 1.05-ös verzióját (Li és mtsi, 2008) a „gap”-ek feltöltéséhez a SOAPdenovo szoftvercsomag GapCloser alkalmazását, a szuperkontigok "scaffolod"-okba rendezéséhez az Oslay szoftver 1.0-ás verzióját használtuk (Richter és mtsi, 2007).

Genom annotáció: A génpredikció során az Augustus szoftver 2.5.5-ös verziója volt segítségünkre (Stanke és mtsi, 2006). A gének annotálásához az alábbi adatbázisokat/szoftvereket használtuk: MetaPhORs webszerver (Pryszcz és mtsi, 2011), PFAM (Protein Families Database) adatbázis (Bateman és mtsi, 2004) és a HMMER szoftver 3.0.3-as verziója (Eddy, 2011).

SNP-k és rekombinációk detektálása: A leolvasások referencia genomra illesztését a Bowtie2 szoftverrel (Langmead és Salzberg, 2012), az SNP-k és INDEL-ek azonosítását a GATK program 2.1-13-a verziójával (McKenna és mtsi, 2010) a rekombináció nyomainak azonosítását a RDP3 szoftver segítségével végeztük (Martin és mtsi, 2010).

Strukturális variánsok detektálása: A strukturális variánsok vizsgálatát a Delly programcsomaggal végeztük (Rausch és mtsi, 2012). A duplikációk és deléciók azonosítása a gének RPKM értékeinek $\log_2$ számértéke alapján történt.

RNS szekvenálás – könyvtár összeállítás: A könyvtár létrehozását Parkhomchuk és munkatársainak illetve Weissenmayer és munkatársainak eredményei alapján végeztük (Parkhomchuk és mtsi, 2009) (Weissenmayer és mtsi, 2011). Az RNS szekvenálás hozzátétőlegesen 200 bp hosszúságú fragmentumok felhasználásával történt, a szálspecifikus könyvtár létrehozásához dTTP helyett dUTP tartalmú dNTP mixet alkalmaztunk. A szekvenálás során Illumina Genome Analyzer IIX platformot használtunk a gyártó utasításai szerint.

„Read-mapping” és expressziós analízis: A leolvasások minőségi analíziséhez az Illumina Genome Analysis szoftver 1.4-es verzióját, referencia genomra illesztéséhez a TopHat 2.0.6 programot használtuk (Trapnell és mtsi, 2009). Az RNS populáció mennyiségi meghatározása a Flux-capacitor szoftver 1.24-es verziójával, az eltérően regulálódó gének azonosítása a DESeq programmal történt.

Szekvenciák illesztése a töréspontok meghatározásához: A PCR3 fragmentek szekvenciájának a referencia CDC317 törzs genomi szekvenciájára való illesztése a BioEdit szoftver 7.0.9.0 verziójával (Hall, 1999) történt.

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

6. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

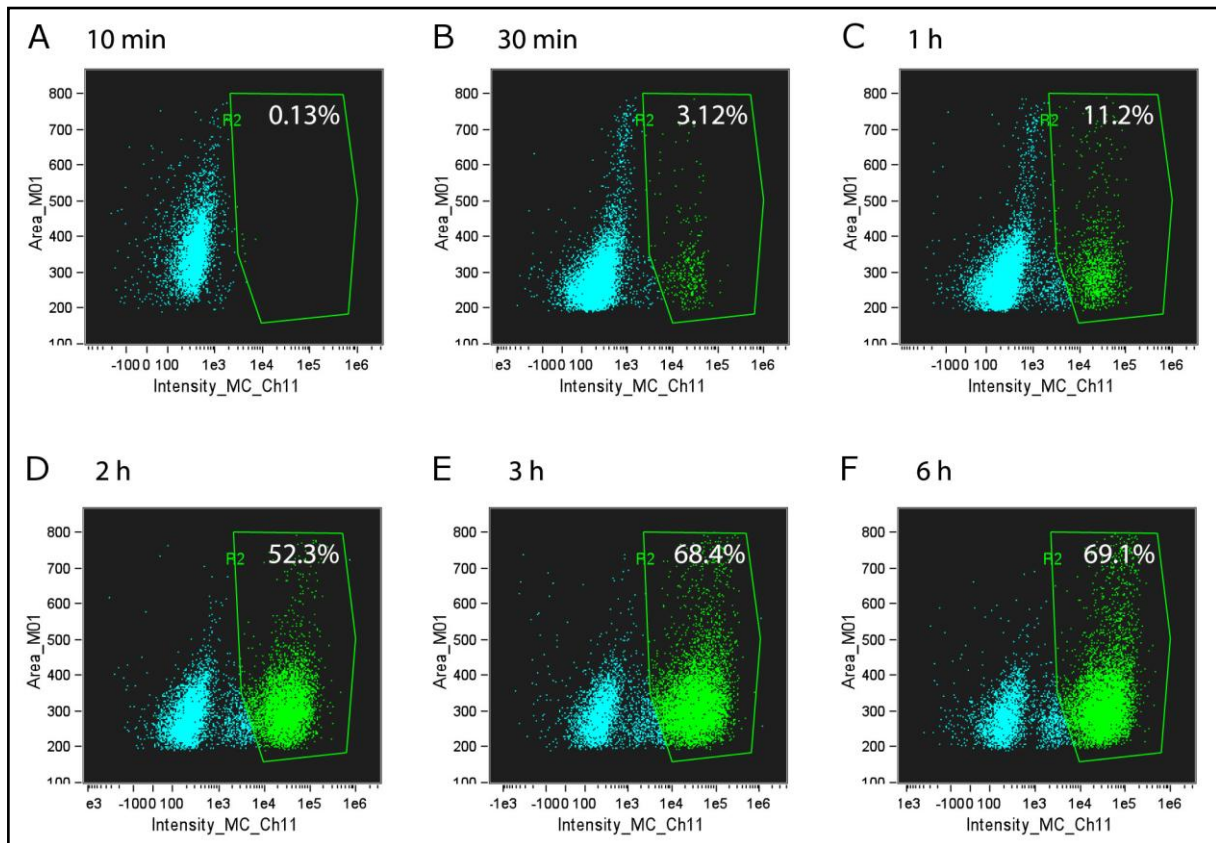
6.1. A makrofág válasz vizsgálata *in vitro* *C. parapsilosis* fertőzéses modellben

6.1.1. A kölcsönhatás tanulmányozására kidolgozott *in vitro* modell

Munkánk célja a gombák elleni védekezésben szerepet játszó fagociták, azon belül is a makrofágok *C. parapsilosis*-ra adott válaszának megismerése és jellemzése volt. Ennek érdekében egy egységesített *in vitro* fertőzéses modellt dolgoztunk ki, amelyben a makrofágok szerepét a szakirodalomban gyakran hivatkozott J774.2 egér makrofág sejtvonal sejtjei töltötték be. Ezeket a gazda sejteket a *C. parapsilosis* GA1 jelű klinikai izolátumával stimuláltuk (Gacser és mtsi, 2005). Korábbi tapasztalataink alapján valamennyi kísérletünkben egységnyi makrofágot ötszörös mennyiségű élesztővel fertőztünk.

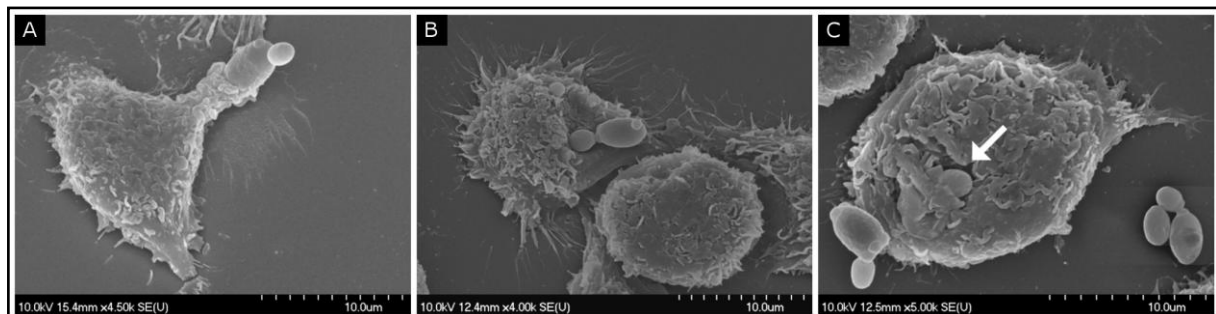
6.1.2. J774.2 egér makrofágok és *C. parapsilosis* kölcsönhatás kezdeti lépései

A fagocitózis kinetikáját áramlási citométer segítségével követtük nyomon. A fagocitáló sejtek elkülönítése érdekében, a gomba sejteket Alexa Fluor 647 fluoreszcens festékkel jelöltük meg. A fagocitózis kinetikájának jellemzése céljából a méréseket az indukció különböző időpontjaiban (10 min, 30 min, 1 h, 2 h, 3 h, 6 h) végeztük el. Az áramlási citometria mérések során a makrofágok mérettartományában a fluoreszcens fényt emittáló eseményeket tekintettük fagocitáló makrofágoknak. Mérésünk során minden időpontban ezen események számát viszonyítottuk a teljes makrofág populáció számához, ezzel meghatározva az élesztő sejtekkel asszociált makrofágok arányát. Megfigyeléseink szerint az élesztő sejtek felvétele már az inkubáció első 30 percében kimutatható. A fagocitáló makrofágok részaránya a fertőzést követő 2. óránál az 50%-ot is meghaladta és egészen az inkubáció harmadik órájáig emelkedett. Úgy találtuk, hogy ennél az időpontnál a folyamat telítési fázisba lépett, ugyanis 3 órát követően nem tapasztaltunk lényegi emelkedést a fagocitáló sejtek arányában (1. ábra).



1. ábra. A fagocitózis kinetikája J774.2 egér makrofág sejtek és Alexa Fluor 647 jelölt *C. parapsilosis* GA1 élesztők kölcsönhatásában. A zölddel jelölt területben foglalt eseménypontok az élesztővel asszociált makrofágokat jelentik. A százalékos értékek ezek arányát mutatják a teljes makrofág populációra vonatkoztatva.

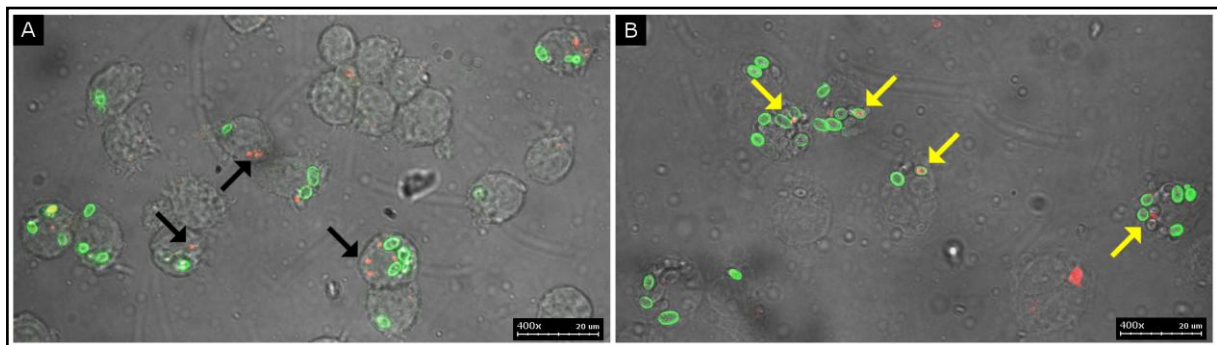
Az élesztő sejtek felvételének nagy felbontású, optikai vizsgálatát scanning elektronmikroszkóp segítségével végeztük el. Az inkubáció első órájában fixált mintákon jól elkülöníthetők a fagocitózis kezdeti lépései: a felismerés/kapcsolódás, az élesztő körül az álláb képződése, majd annak közel teljes záródása (2. ábra).



2. ábra. J774.2 egér makrofágok és *C. parapsilosis* GA1 izolátum kölcsönhatásának eseményei egy órával a fertőzést követően. Az ábrán a felismerés (A), álláb képződés (B) és a fagoszóma záródás (C) momentumai láthatók. A fehér nyíl egy, a záródó fagoszómaiban lévő élesztő sejtet jelöl.

6.1.3. A lizoszómák és a fagoszómák kolokalizációjának vizsgálata a fagocitózist követően

A makrofág sejteken belül lejátszódó folyamatok vizsgálatára egy kombinált fluoreszcens festési eljárást alkalmaztunk. Ennek egyik elemeként az élesztő sejteket FITC fluoreszcens festékkel jelöltük meg, amely a sejtfalhoz kötődik. Megfelelő gerjesztő fény alkalmazása esetén a gombák zöld fluoreszcens fényt emittálnak. A makrofágok fertőzését ezekkel a FITC-jelölt gomba sejtekkel végeztük el. Az inkubációs idő (3 h és 8 h) leteltét követően egy újabb fluoreszcens festéket (LysoTracker Red) alkalmaztunk, amely a sejtek savas kompartmentjeiben (lizoszóma) protonálódik és ebben a formájukban (a szükséges gerjesztő fénnel való megvilágítást követően) piros fluoreszcens fény kibocsátásával teszik láthatóvá a savas lumenű sejtalkotókat. A mintákat konfokális fluoreszcens mikroszkóp segítségével vizsgáltuk. Előzetes kísérleteink alapján megállapítottuk, hogy a makrofágokon kívül lévő gombák fluoreszcens szignáljának kioltása/elfedése egyrészt szükségtelen, másrészt interferál a FITC/LysoTracker Red festéssel így ennek alkalmazásától a későbbiekben eltekintettünk. A felvételeinken jól látható, hogy az élesztő sejtek felvételét követően a makrofágokat intenzív lizoszóma formálódás jellemzi. Az inkubáció harmadik órájában ezek a sejtalkotók alig vagy ritkán kolokalizálnak a gomba sejtekkel. Ezzel szemben a későbbi időpontban (8 h inkubációt követően) a lizoszómák többsége fagoszómával asszociált (3. ábra).

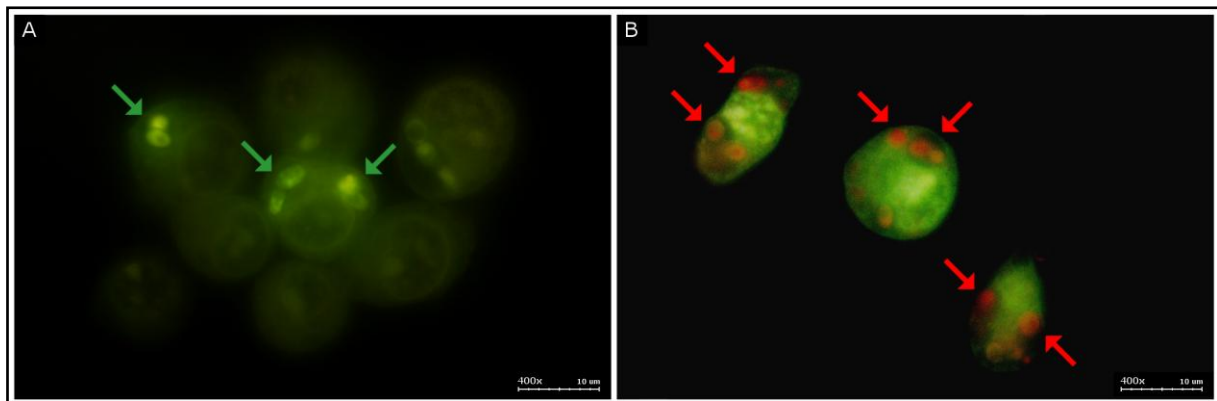


3. ábra. Konfokális fluoreszcens mikroszkópos felvétel a J774.2 - *C. parapsilosis* GA1 kölcsönhatásról FITC/LysoTracker Red festést követően. A fertőzés harmadik órájában (A) az élesztő sejtek fagocitózisa teljes, de ezek a LysoTracker Red festék révén pirosra festődő lizoszómákkal (fekete nyilak) nem mutatnak kolokalizációt. A fertőzést követő nyolcadik órában (B) ugyanakkor az élesztők és a lizoszómák szorosan asszociáltak egymással (sárga nyilak).

6.1.4. A felvett élesztők életképességének nyomon követése

Miután megállapítottuk, hogy a J774.2 sejtek képesek felvenni az élesztőket, és a folyamatot követően a lizoszómák és a fagoszómák kolokalizációja is bekövetkezik,

megvizsgáltuk, hogy a makrofágok képesek-e elpusztítani is az élesztőket. A kérdés megválaszolására az ún. akridin narancs/kristály ibolya festés alkalmazása mellett döntöttünk. Ez egy könnyen és gyorsan kivitelezhető módszer, amelynek segítségével egyértelműen eldönthető, hogy élő vagy elpusztult sejtről van-e szó. Lényege, hogy a membrán permeábilis akridin narancs fluoreszcens festék, mind az egyes (ssDNS), mind a kettős szálú DNS-hez (dsDNS) képes kötődni. Egy adott gerjesztő fényt használva az élő sejtek dsDNS-éhez kapcsolódó festék zöld, míg az elpusztult sejtekre utaló ssDNS-sel asszociált molekula piros színű fluoreszcens fényt emittál. A kristály ibolya festék membrán impermeábilis, és a makrofágokon kívül rekedt akridin narancs festett gombáktól származó emittált fény kioltására szolgál. Ennek megfelelően a mikroszkóp látómezőjében észlelt fluoreszcens fény csak olyan gombából származhat, amely gazda sejteken belül található. A szín alapján eldönthető, hogy élő vagy elpusztult sejtet látunk. A felvételeket az előző kísérletnek megfelelően 3 és 8 h inkubációt követően készítettük. Azt tapasztaltuk, hogy az inkubáció korai szakaszában (3 h) az élesztő sejtek felvétele megtörténik, a *C. parapsilosis* sejtek mindegyike zöldre festődik, vagyis élő gombákról beszélhetünk. Ezzel szemben a fertőzés nyolcadik órájában készített felvételen dominálnak a pirosra festődött, tehát elpusztult élesztő sejtek (4. ábra).



4. ábra. Fluoreszcens mikroszkópos felvétel a J774.2 - *C. parapsilosis* GA1 kölcsönhatásról akridin narancs/kristály ibolya festést követően. Az inkubációt követő harmadik órában (A) csak zöldre festődő (élő) gomba sejtek (zöld nyilak) láthatók a makrofágokban, míg az inkubáció nyolcadik órájában (B) dominálnak a piros színű (elpusztult) élesztők (piros nyilak).

6.1.5. A kölcsönhatás nyomán megváltozott expressziót mutató gének azonosítása a makrofágokban RNS microarray analízis segítségével

Mivel mikroszkópos megfigyeléseink alapján úgy találtuk, hogy a fertőzést követő harmadik és nyolcadik órában következnek be a kölcsönhatás kritikus eseményei, a

fagocitózis telítődése valamint a fagoszómákkal szorosan kolokalizálódó lizoszómák és az ezzel párosuló ölés, ezért úgy döntöttünk, hogy az említett időpontokban feltérképezzük a kórokozóval szembeni védekezés hátterében álló transzkripciós változásokat. Ennek érdekében RNS-t izoláltunk a nem fertőzött kontroll és az élesztővel indukált J774.2 sejtekből a fertőzés harmadik és nyolcadik órájában, három-három technikai párhuzamosban. A technikai párhuzamos mintákat egyenlő arányban összekevertük, amelyekkel RNS microarray analízist végeztünk. Az adatok elemzése alapján úgy találtuk, hogy a korábbi időpontban a nem fertőzött kontrollhoz képest 117 gén mutatott szignifikánsan emelkedett és 38 csökkent expressziót. Nyolc órával a fertőzést követően ezek a számok rendre 273-nak illetve 239-nek adódtak. Az upregulálódott gének között immunfolyamatok regulátorait, gyulladásban/stresszválaszban szerepet játszó komponenseket, sérülés hatására indukálódó molekulákat, citokineket, kemokineket azonosítottunk. Ezek azonosítóját a funkció -, az analízis szignifikanciájának - és az adott folyamatban szerepet játszó, a kontrollhoz képest szignifikánsan megemelkedett expressziót mutató gének számának feltüntetésével az 1. táblázat mutatja be.

1. táblázat. Kivonat a J774.2 makrofágok *C. parapsilosis*-szal történő 3 és 8 órás indukció után megváltozott expressziót mutató génjeinek gén ontológia analízisének eredményéből.

Fertőzést követő harmadik órában			
Gén ontológia azonosító	Terminológia	<i>p</i>	Szám
GO:0002376	immunfolyamat	< 0,001	17
GO:0016265	sejthalál	0,001	12
GO:0050896	stimulusra adott válasz	0,01	28
GO:0065007	biológiai folyamat szabályozása	0,04	61
GO:0009987	sejtes folyamat	0,04	76
GO:0032502	fejlődési folyamat	0,04	27

Fertőzést követő nyolcadik órában			
Gén ontológia azonosító	Terminológia	<i>p</i>	Szám
GO:0006950	stresszválasz	< 0,001	19
GO:0009611	sérülésre adott válasz	< 0,001	14
GO:0006954	gyulladásos válasz	< 0,001	14
GO:0042379	kemokin receptor kötés	0,001	9
GO:0008009	kemokin aktivitás	0,001	9
GO:0007049	sejtciklus	0,001	24
GO:0009605	külső stimulusra adott válasz	0,003	14
GO:0005125	citokin aktivitás	0,006	16
GO:0001664	G-protein-kapcsolt receptor kötés	0,01	9
GO:0006952	védelemben betöltött szerep	0,02	18
GO:0048583	stimulusra adott válasz szabályozása	0,04	2
GO:0002376	immunfolyamat	0,04	19
GO:0050776	immunválasz szabályozása	0,06	2
GO:0006955	immunválasz	0,06	19

Az analízis során két gén mRNS-ének kirívóan magas relatív mennyiségét állapítottuk meg. Ezek közül az egyik a *PTGS-2* (Prostaglandin-endoperoxide synthase 2) egy citoplazmatikus enzim, amely a gazda prosztaglandin bioszintézis útvonalának indukálható enzime (Smith és mtsi, 2000). A prosztaglandinoknak fontos szerepük van az immunválasz modulálásában. A molekulacsoport tagjai ugyanis kis módosításokon átesve inflammatorikus és antiinflammatorikus válasz indukálására egyaránt képesek (Goodwin, 1991). A kiemelkedően magas relatív expressziót mutató másik gén egy sejtmembránnal asszociált fehérjét kódol. Ezt a gént a szakirodalom számos néven említi: *TNFRSF9* (Tumor necrosis factor receptor superfamily 9), *ILA* (Induced by lymphocyte activation), *CD137* és *4-1BB*, és az általa kódolt fehérje T-sejt kostimulációval hozható összefüggésbe (Lee és mtsi, 2002).

6.1.6. A microarray adatok alátámasztása reverz transzkripció kapcsolt valós idejű PCR (qRT-PCR) technikával

Az analízis nyomán szerzett expressziós adatokat qRT-PCR segítségével támasztottuk alá. Ehhez a hibridizációhoz használt RNS mintákból írt cDNS-t használtuk. Ebben az esetben minden egyes technikai párhuzamosból külön-külön írtunk cDNS-t, tehát a microarray analízissel ellentétben itt minden kondíciót három-három technikai párhuzamos minta reprezentált. Összesen hat olyan gazda gént vizsgáltunk, amelyek transzkripciója a microarray eredményei alapján mindkét vizsgált időpontban upregulációt mutatott. Méréseinkbe bevontuk a jelentősen megemelkedett expressziót mutató *PTGS-2* és *TNFRSF9* gének mellett a *CD83*-at, amelyet bár tradicionálisan a dendritikus sejtek markerének tekintünk, ennek ellenére újabb kutatások eredményei szerint expressziója aktivált makrofágokban is megemelkedik (Breloer és Fleischer, 2008). Vizsgáltuk az *IL15* expresszióját, amely *in vitro* körülmények között az IL2-höz hasonlóan T-sejtek valamint természetes ölüsejtek aktivációját és proliferációját idézi elő (Bamford és mtsi, 1994) (Carson és mtsi, 1994), továbbá a klasszikus gyulladásos (Th1-es) citokinekként ismert Tnf α és az IL1 β fehérjék génjeinek (Bradley, 2008) (Dinarello, 1997) regulációját. Az RNS microarray analízis eredményeit illetve a qRT-PCR során vizsgált gének relatív expresszióinak átlagait, szórásait, és a mindenkori kontrolltól való eltérés szignifikanciáját a 2. táblázat foglalja össze.

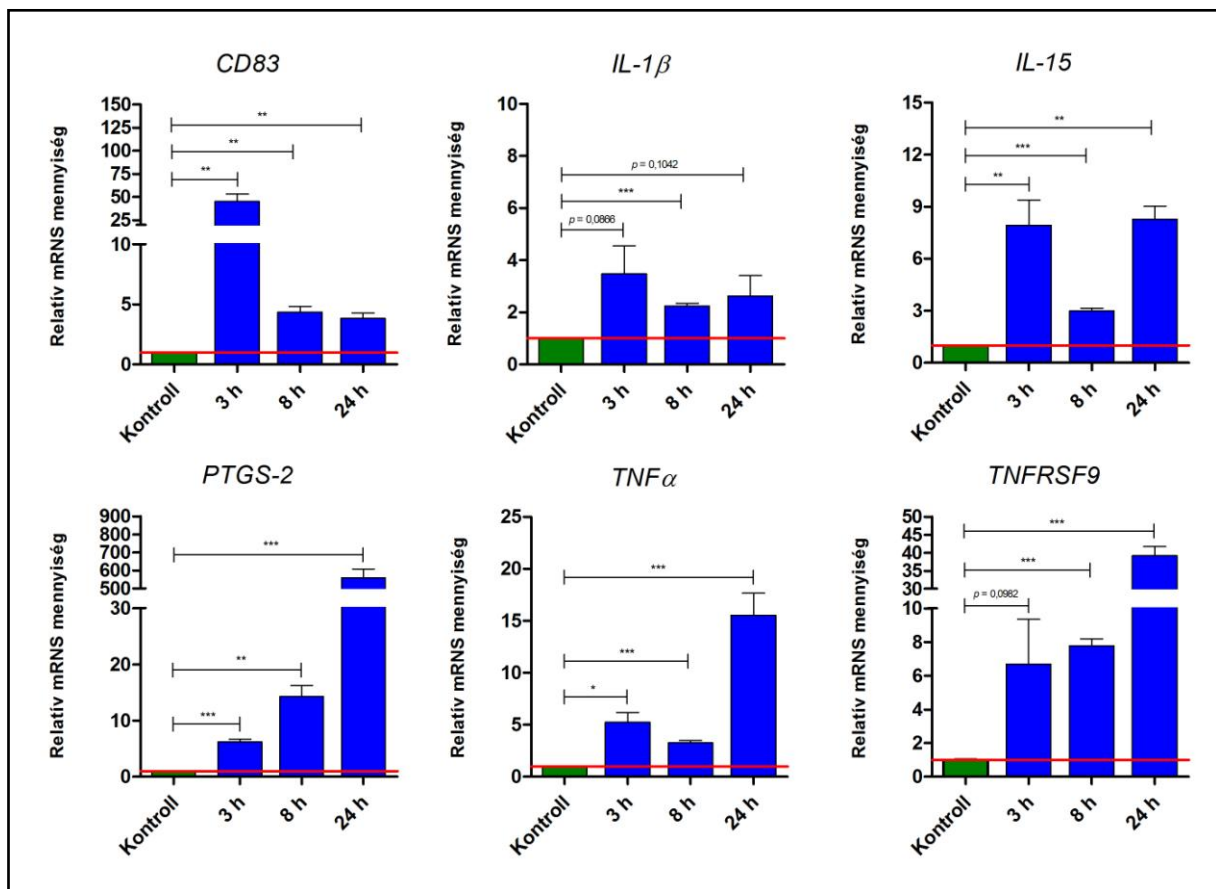
2. táblázat. A *CD83*, *IL1 β* , *IL15*, *PTGS-2*, *TNF α* , *TNFRSF9* gazda gének relatív transzkripció intenzitása a GA1 jelű *C. parapsilosis*-szal történő indukció harmadik és nyolcadik órájában microarray analízis és qRT-PCR technika segítségével.

GÉN	MICROARRAY 3 h	qRT-PCR 3 h (ÁTLAG)	qRT-PCR SZÓRÁS	MICROARRAY 8 h	qRT-PCR 8 h (ÁTLAG)	qRT-PCR SZÓRÁS
<i>CD83</i>	8,2	45,24	$\pm 13,76^{**}$	2,8	4,35	$\pm 0,831^{**}$
<i>IL1β</i>	2<	3,467	$\pm 1,890^{ns}$	2,29	2,243	$\pm 0,179^{***}$
<i>IL15</i>	2,31	7,947	$\pm 2,501^{**}$	2,59	2,99	$\pm 0,294^{***}$
<i>PTGS-2</i>	3,04	6,180	$\pm 0,869^{***}$	7,4	14,26	$\pm 3,431^{**}$
<i>TNFα</i>	2<	5,26	$\pm 1,642^{*}$	2,9	3,28	$\pm 0,409^{***}$
<i>TNFRSF9</i>	8,98	6,697	$\pm 4,593^{ns}$	39,34	7,777	$\pm 0,71^{***}$

A qRT-PCR analízis eredményei alapján két kivételtől eltekintve (*IL1 β* - 3 h, *TNFRSF9* - 3h) valamennyi vizsgált gén relatív expressziója szignifikánsan eltért a nem fertőzött kontrollétól. A kétféle módszerrel meghatározott abszolút overexpressziós értékek között egyes esetekben lényeges eltéréseket tapasztaltunk. Bár a jelenség a *CD83* gén kapcsán különösen szembeötlő, a két metódus alapján az expresszió kinetikájában különbség nem adódik, ugyanis mindkét esetben a *CD83* erőteljes korai upregulációja, majd ezt követően csökkenő expressziója állapítható meg. A metódusok összehasonlításában azonos jelenségre lettünk figyelmesek a *PTGS-2* gén vizsgálatakor is. Ez esetben az érintett gén magasabb transzkripció intenzitása a későbbi időpontban volt jellemző. A kiválasztott Th1-es citokin gének (*IL1 β* és *TNF α*) kapcsán a két módszer eredményeinek összehasonlításának gátat szabott az, hogy a microarray analízis a 3 h-ás mintában egyik gén esetében sem volt képes pontos értékek meghatározására. Mindössze azt tudtuk megállapítani segítségével, hogy az említett gének mRNS-einek kontrollhoz viszonyított relatív mennyiségei 2-nél nagyobbak. Expressziójuk a qRT-PCR eredmények szerint az indukció korai időpontjában (3 h) magasabb, a későbbi időpontban (8 h) alacsonyabb értéket képviselt. Az *IL15* és *TNFRSF9* gének relatív expresszióinak mértéke előbbi esetében csak a 8 h-ás, utóbbi esetében csak a 3 h-ás mintában mutatott hasonlóságot a két módszer eredményei szerint. *IL15* kapcsán a microarray analízis, *TNFRSF9* vonatkozásában a qRT-PCR eredményei alapján tapasztaltunk stagnálást a két gén expressziójában.

6.1.7. A GA1 jelű törzs által indukált transzkripció változások kinetikája

Tekintettel arra, hogy a kostimuláció, az immunrendszer adaptív ágával történő kommunikáció a kölcsönhatás késői időpontjára jellemző, a gazda sejtek transzkripció mintázatát az interakció 24. órájában is megvizsgáltuk. Az említett időpontban nyert RNS-ből cDNS-t szintetizáltunk, majd ezeknek a mindenkor nem fertőzött kontrollhoz viszonyított mennyiségét qRT-PCR eljárás segítségével határoztuk meg a már korábban említett gének vonatkozásában. Ennek eredményét valamint a kontrolltól való eltérés szignifikanciáját a kölcsönhatás különböző időpontjaiban az 5. ábra foglalja össze.



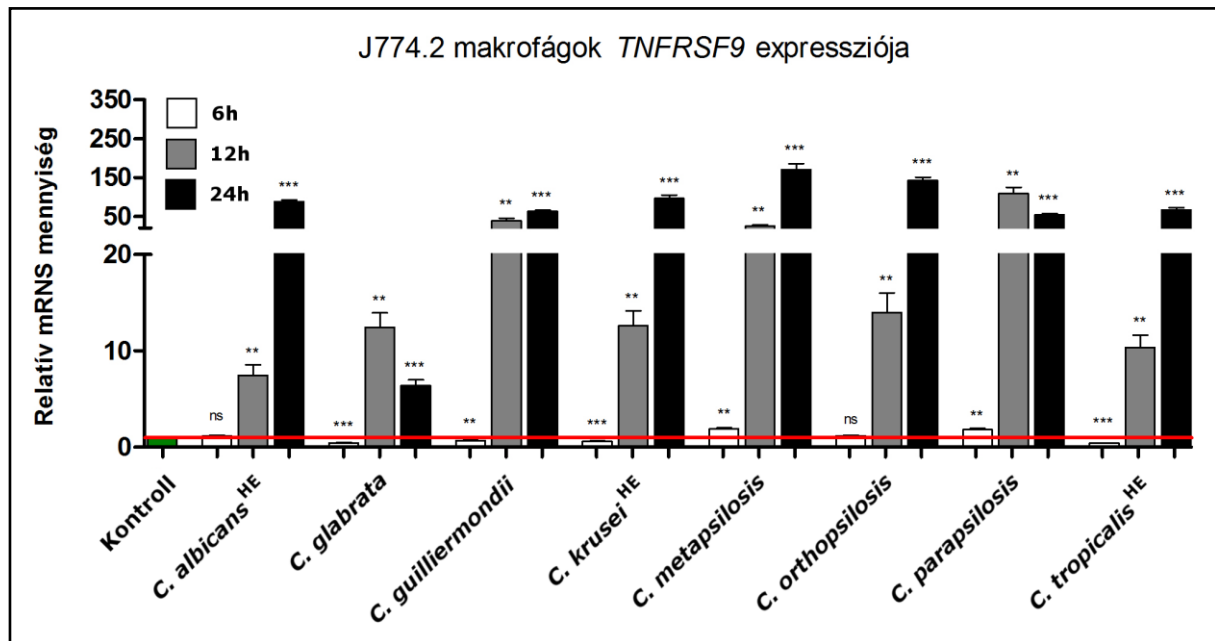
5. ábra. J774.2 makrofágok *CD83*, *IL1 β* , *IL15*, *PTGS-2*, *TNF α* és *TNFRSF9* génjeinek regulációja *C. parapsilosis* GA1 (kék oszlopok) törzsszel történő kölcsönhatás eredményeként a fertőzés 3., 8. és 24. órájában az aktuális időpont nem fertőzött kontrolljához (zöld oszlop) viszonyítva. A grafikonokon a nem fertőzött kontrollra vonatkoztatott szignifikancia értékek kerültek feltüntetésre.

A *PTGS-2*, *TNF α* és *TNFRSF9* gének mRNS-einek relatív mennyiségei lényegesen magasabbnak bizonyultak a kölcsönhatás 24. órájában a korábbi időpontok eredményeinél. Ezek közül különösen a *PTGS-2* mutatott kirívóan magas értékeket, amely az 500x-os relatív expressziót is meghaladta. Az enzim működése során képződő bioaktív molekulák vizsgálata, illetve a *C. parapsilosis*-nak ezen molekulák módosítására gyakorolt hatásának vizsgálata

laboratóriumunkban egy másik PhD értekezés alapjául szolgált. A *CD83* mRNS-ének mennyisége az indukció 24. órájában is a 8. óránál tapasztalt szinttel (5x-ös upreguláció) volt jellemezhető. Az *IL1 β* relatív expressziója a vizsgált időpontokban stagnálást mutatott 2,2 - 3,5x-ös értékek között. Az *IL15* regulációjára egy korai (3 h) és késői (24 h) időpontban tapasztalt erőteljesebb (~ 8x-os) és egy 8 h-nál megfigyelt kevésbé kifejezett (~ 3x-os) upreguláció volt jellemző.

6.1.8. A klinikai szempontból fontos *Candida* fajok által indukált *TNFRSF9* expresszió vizsgálata

Miután qRT-PCR segítségével igazoltuk a microarray adatok *TNFRSF9*-re vonatkozó eredményeit, megvizsgáltuk, hogy az említett gén megemelkedett expressziója *C. parapsilosis* specifikus vagy a nemzetség bármely másik tagja képes azt kiváltani. Ennek eldöntésére további hét *Candida* törzset vontunk be fertőzéses vizsgálatainkba, köztük az egészségügyi szempontból legnagyobb jelentőséggel bíró fajokkal, úgymint *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. metapsilosis*, *C. orthopsilosis*, *C. tropicalis*. Hogy a génexpresszió időbeli változásáról is információhoz jussunk, az RNS izolálást 6, 12 és 24 órás indukció után is elvégeztük. Mivel az előkísérleteink alapján úgy találtuk, hogy a *C. albicans*, *C. krusei* és a *C. tropicalis* a kölcsönhatás 24. órájára jelentősen károsítják a makrofágokat, ezért úgy határoztunk, hogy az említett törzsek esetében az indukciót hővel előlt (HE) gombákkal hajtjuk végre. A *TNFRSF9* transzkripció intenzitásának elemzésére qRT-PCR technikát alkalmaztunk. A nem fertőzött kontrollhoz viszonyított relatív expressziós értékek átlagát, szórását, és a kontrolltól való eltérés szignifikanciáját a 6. ábra mutatja be.



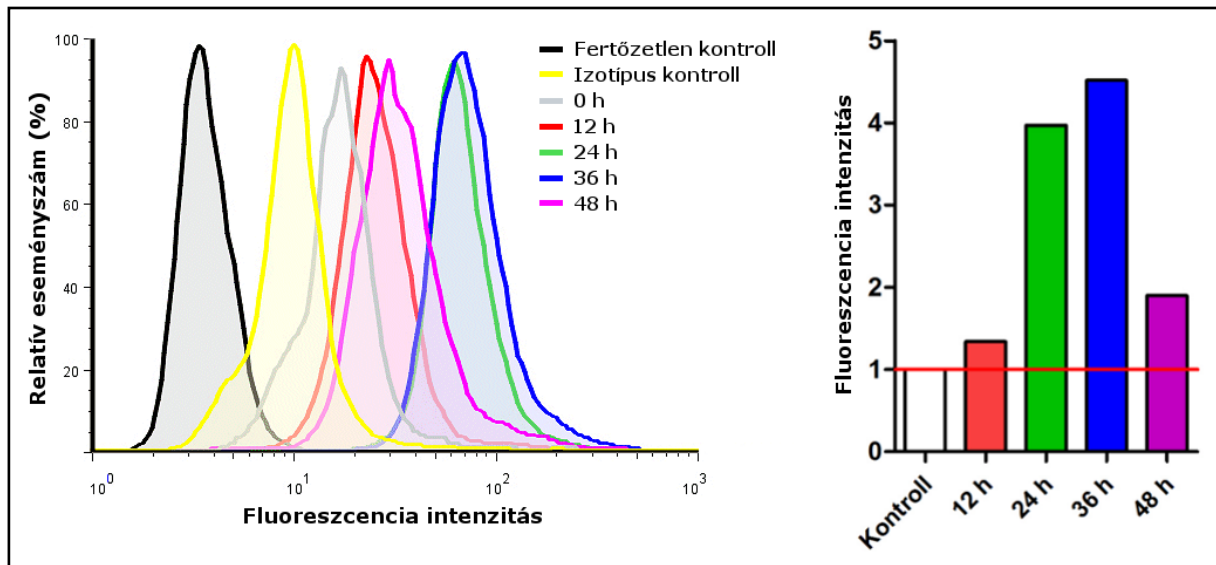
6. ábra. J774.2 makrofágok *TNFRSF9* expressziójának kinetikája különböző *Candida* törzsekkel való fertőzést követően az indukció 6., 12., és 24. órájában a nem fertőzött kontrollra (zöld oszlop) normálva. HE: hővel elölt

Megállapítottuk, hogy valamennyi alkalmazott *Candida* törzs képes volt szignifikánsan megemelni a *TNFRSF9* gén expresszióját az indukció 12. és 24. órájában. Az előbbi időpontban a *C. parapsilosis* bizonyult a legmarkánsabb inducernek, míg a gén transzkripciójában a legkisebb emelkedést a *C. albicans* okozta. 24 h-ás interakciót követően a legmagasabb *TNFRSF9* expressziót a *C. metapsilosis* jelenléte váltotta ki, míg a legkisebb mértékben a *C. glabrata* fokozta. Az indukció hatodik órájában *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. krusei* és *C. tropicalis* esetében a nem fertőzött kontrollhoz képest szignifikánsan csökkent -, *C. metapsilosis* és *C. parapsilosis* esetében szignifikánsan emelkedett expressziót állapítottunk meg. Megfigyelésünk szerint ebben az időpontban két törzs (*C. albicans* és *C. orthopsilosis*) nem indukált a kontrolltól szignifikánsan eltérő *TNFRSF9* expressziót.

6.1.9. A sejtfelszíni Tnfrsf9 fehérje relatív mennyiségének vizsgálata

Annak eldöntésére, hogy a transzkripció intenzitásának emelkedése párosul-e a funkcionális fehérje mennyiségének a sejt felszínén történő megemelkedésével áramlási citometriás vizsgálatot végeztünk, amelyhez fluorofórral konjugált anti-Tnfrsf9 antitestet használtunk. A jelölést és a méréseket az inkubáció 0., 12., 24., 36. és 48. órájában végeztük el. Úgy találtuk, hogy a fehérje mennyisége már az indukció korai időszakában (12 óránál)

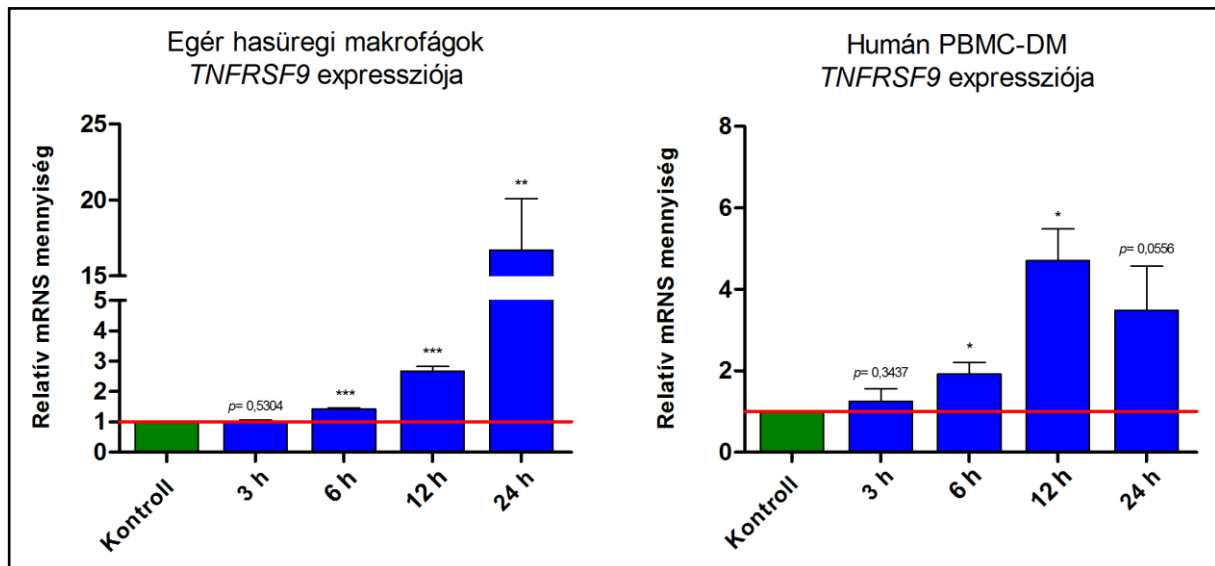
megemelkedik a 0 órás kontrollhoz képest. A fluoreszcencia intenzitása ezt követően tovább emelkedik és a fertőzés 36. órájában éri el a maximumát (7. ábra).



7. ábra. *C. parapsilosis* GA1 törzzsel indukált J774.2 makrofágok áramlási citometria analízise fikoeritrinnel konjugált anti-Tnfrsf9 antitesttel való jelölést követően. A bal oldalsó panel a hisztogramokat a jobb oldalsó az ezen adatokból számított relatív fluoreszcencia intenzitásokat ábrázolja az interakció különböző időpontjaiban a 0 órás kontrollra normalizálva.

6.1.10. *C. parapsilosis* indukció hatása a *TNFRSF9* gén transzkripciójára primer egér és primer humán sejtekben

A J774.2 sejt vonal válaszában ismeretében megvizsgáltuk, hogy vajon primer sejtek is hasonlóképpen viselkednek-e. Ennek eldöntésére egyrészt vad típusú BALB/C egerek hasüregi makrofágjait, másrészt egészséges felnőtt emberek vérből izolált PBMC-kből differenciált makrofágokat indukáltuk a *C. parapsilosis* GA1 törzsével, majd a fertőzést követően 3, 6, 12 és 24 órával RNS-t izoláltunk, amelyet cDNS írást követően qRT-PCR analízisnek vetettünk alá. A nem fertőzött kontrollra vonatkoztatott relatív expressziós értékeket a szórásokkal és a kontrolltól való eltérés szignifikanciájának feltüntetésével a 8. ábra foglalja össze. Megfigyeléseink korreláltak a korábban tapasztaltakkal, ugyanis a vizsgált gén expressziója primer sejtekben is az inkubáció későbbi időpontjaiban emelkedett meg a legnagyobb mértékben.



8. ábra. Egér hasüregi - és humán PBMC-kből differenciáltatott makrofágok transzkripciós változásainak összehasonlítása *C. parapsilosis* GA1 törzsszel (kék oszlopok) történő indukciót követően, annak 3., 6., 12. és 24. órájában. A relatív expressziók és a szignifikancia értékek az aktuális időpont nem fertőzött kontrolljára (zöld oszlop) vonatkoztatva értendők.

6.1.11. A makrofág válasz vizsgálata *in vitro* *C. parapsilosis* fertőzéses modellben: összefoglalás/értékelés

A makrofág - *C. parapsilosis* interakció tanulmányozásához egy *in vitro* fertőzési modellt hoztunk létre. A kölcsönhatás kezdeti lépéseit áramlási citométerrel és különböző mikroszkópos technikákkal követtük nyomon. Megállapítottuk, hogy a modellben alkalmazott J774.2 egér makrofág sejtvonal sejtei röviddel a fertőzést követően (30 perc) megkezdik az élesztő sejtek felvételét, amely folyamat a fertőzés harmadik órájára éri el a maximumát. Kimutattuk, hogy a kölcsönhatás nyolcadik órájában a fagoszómák és a lizoszómák erőteljes kolokalizációt mutatnak, amellyel párhuzamosan megfigyelhető az élesztő sejtek pusztulása is. Ezen események hátterében húzódó molekuláris változásokról az említett időpontokban izolált RNS microarray analízisével tájékozódunk. Immunfolyamatok regulátorainak, gyulladásban/stresszválaszban szerepet játszó komponensek, citokinek, kemokinek, sérülés hatására indukálódó molekulák megemelkedett expresszióját állapítottuk meg. Ezek alátámasztását qRT-PCR eljárás segítségével végeztük el. Ennek során összesen hat gén aktinra (*ACT*) normalizált relatív expressziós értékét határoztuk meg. Az analízisbe bevontuk a *CD83*, *IL1 β* , *IL15*, *TNF α* illetve további két, a microarray alapján kiemelkedően magas expressziót mutató gént, a sejtmembránnal asszociált fehérjét kódoló *TNFRSF9*-et és a citoplazmatikus enzimet kódoló *PTGS-2*-t. Az említett gének mRNS-ének relatív mennyiségét a kölcsönhatás 24. órájában is megvizsgáltuk. Eredményeink szerint a qRT-PCR-rel

meghatározott értékek korrelálnak a microarray által szolgáltatott adatokkal. A CD83 fehérje génjének transzkripciója erőteljesen megemelkedik az indukció korai szakaszában, majd az idő előrehaladtával a transzkript relatív mennyisége folyamatosan csökken. Ezen észrevételünk egybevág Barker és munkatársainak eredményeivel, akik *C. albicans*-szal fertőzött THP-1 humán fagociták transzkripcióját vizsgálták (Barker és mtsi, 2005). Igazoltuk, hogy a J774.2 makrofágokban az IL2-re hasonló hatással rendelkező IL15 citokin génjének expressziója is többszörösére emelkedik az élesztő sejtek jelenlétében. Ennek jelentősége *C. albicans* fertőzésekben a monociták szuperoxid gyök képződésének indukálásában nyilvánul meg (Vazquez és mtsi, 1998). Szerepét más mikrobák jelenlétében a természetes ölüsejtek és a T-sejtek proliferációjával kapcsolatosan tisztázták (Yoshikai és Nishimura, 2000). Úgy találtuk, hogy a modellünkben vizsgált makrofágokat a Th1-es citokinek (*IL1 β* , *TNF α*) megemelkedett expressziója jellemzi. Más *Candida* fajokkal folytatott kutatásokból ismeretes, hogy ezek a fehérjék fontos szerepet játszanak a candidiázis során kialakuló immunválaszban (Netea és mtsi, 2006). Az *IL1 β* relatív mennyiségében stagnálás állapítottunk meg, míg a *TNF α* expressziójának intenzitása egyértelműen a vizsgált időtartam végén dominált. Ehhez hasonló kinetikával jellemezhető a makrofágok *TNFRSF9* és *PTGS-2* válasza. A *Tnfrsf9* fehérjét először T-sejtek felszínén azonosították. A receptor a ligandjával történő kapcsolódás nyomán közvetve antiapoptotikus gének expresszióját indukálja (Lee és mtsi, 2002). Ugyanez a receptor azonban nem csak T-sejtek, hanem monociták felszínén is megtalálható (Vinay és Kwon, 2011). Ezekben a sejtekben a *TNFRSF9* indukálása különböző citokinek expressziós mintázatának megváltozása (*IL6*, *IL8*, *TNF α* megemelkedett, *IL10* lecsökkent expressziója) mellett (Langstein és mtsi, 1998), M-CSF (Macrophage colony stimulating factor) szekréciójával a monociták túlélését és proliferációját is kiváltja (Langstein és Schwarz, 1999). A receptor expressziójának megemelkedése szakirodalmi adatok szerint virális - vagy bakteriális fertőzések alkalmával mutatható ki (Kassu és mtsi, 2009; Lee és mtsi, 2005; Zhou és mtsi, 2012), *Candida* fertőzésekkel eddig nem hozták összefüggébe. A transzkript relatív mennyiségének növekedése a funkcionális fehérje sejtfelszíni mennyiségének növekedésével párosul, amely a maximumát az indukció 36. órájában éri el. Igazoltuk, hogy a *TNFRSF9* megemelkedett expresszióját nem csak a *C. parapsilosis*, hanem a makrofágok indukciójára használt további hét *Candida* törzs is kiváltja. Az említett génről képződő mRNS-ek relatív mennyisége nem csak a modellünkben alkalmazott makrofág sejtvonal sejtjeiben, hanem primer hasüregi egér - és humán PBMC-ből differenciáltatott makrofágokban is egyaránt megemelkedik. A relatív overexpresszió mértéke elmarad ugyan a J774.2 makrofágokétól, de

egér makrofágok esetén a fertőzés 6., 12. és 24. -, PBMC-DM-ek esetén 6. és 12. órájában a mindenkori kontrolltól szignifikánsan eltérő értékeket állapítottunk meg.

Az egér makrofágokat alkalmazó modellünk alkalmasnak bizonyult az interakció lényegi eseményeinek azonosítására és az ezek háttérében lejátszódó génexpressziós változások jellemzésére. Hátránya azonban, hogy egyrészt (elsősorban a transzkriptóm vizsgálatának módszere miatt) alkalmatlan a gomba és az emlős RNS populáció szimultán analízisére. Másrészt kísérleteinkben opportunistá humán patogén gombák hatását vizsgáltuk egér modellben, amely ugyan gyakran használt eszköze a humánban kiváltott lehetséges válasz jellemzésének, mégis egyre több szerző hívja fel a figyelmet arra, hogy ugyanarra a stimulusra a két organizmus viselkedése bizonyos esetekben eltérő lehet (Mestas és Hughes, 2004; Seok és mtsi, 2013; Shanks és mtsi, 2009). Ez a felismerés jelenlegi modellrendszerünk koncepciójának újragondolását és finomítását tette szükségessé.

6.2. Az *in vitro* makrofág - *Candida* kölcsönhatás komplex analízise

6.2.1. A fertőzéses modellrendszer kiterjesztése: a teljes RNS populáció RNA-seq vizsgálata

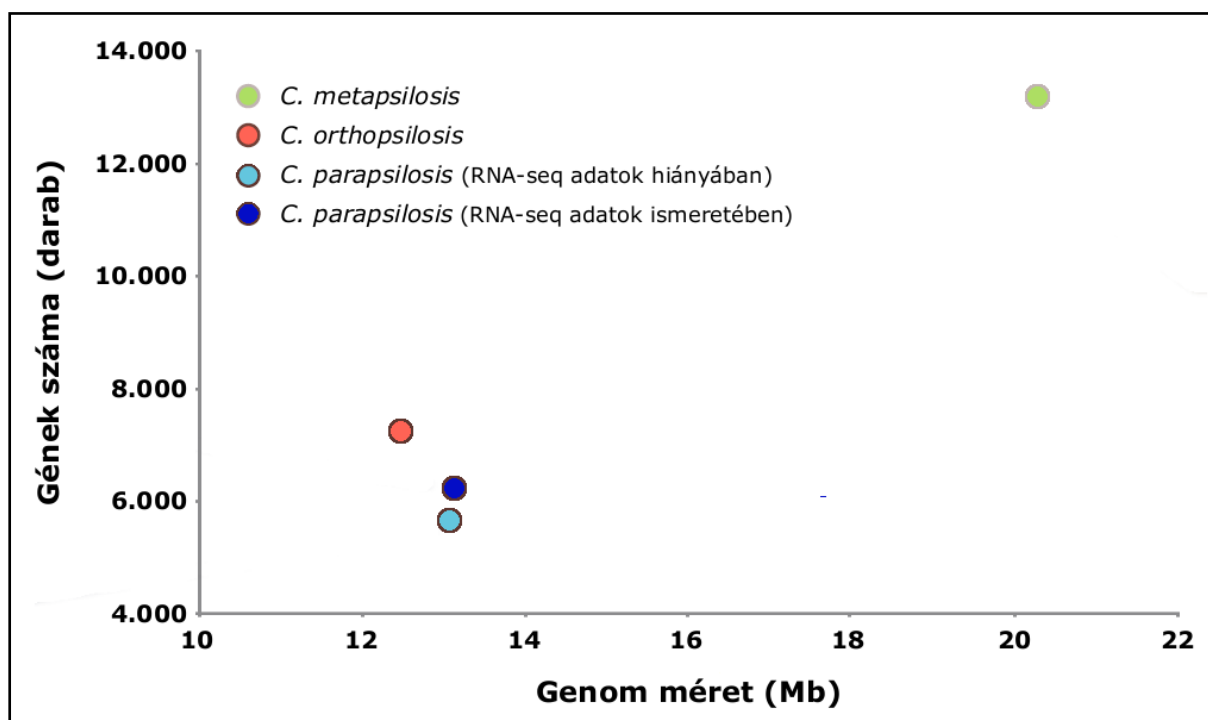
Eddigi munkánk során csupán a gazda oldal transzkripció szintű analízisét végeztük el, amely értékes információk levonását tette lehetővé, de a tényleges gazda - patogén interakciónak csupán az egyik oldalára fókuszált. A kölcsönhatás során ugyanis nem csak a fagociták expressziója mutat eltérést, hanem a felismerésre, a fagocitózisra és a fagoszómában uralkodó viszonyokra válaszul a patogén bizonyos génjeinek regulációja is megváltozik. Ezek az újonnan megjelent géntermékek kölcsönhathatnak a gazda komponenseivel, amelyek újabb változásokat idézhetnek elő a fagocitában. Belátható tehát, hogy egy fertőzés transzkripció szintű analízise során kizárólag az egyik oldal vizsgálata nem minden esetben teszi lehetővé az interakció végkifejletének hátterében húzódó dinamikus kölcsönhatások részletes felderítését. Ezeknek a jelenségeknek, fehérje - fehérje kölcsönhatásoknak, szignáltranszdukciós eseményeknek, effektor funkcióknak, szigorúan szervezett folyamata nem merül ki pusztán az egyik oldal másakra adott válaszában, sokkal inkább tekinthető a fagocita és az élesztő között lejátszódó, az újonnan megjelenő faktorok révén időben változó, molekuláris párbeszédnek. Ez a fajta megközelítés, vagyis a kölcsönhatás különböző időpontjaiban analizált transzkriptóm adatok alapján azonosított változások összefüggő/kölcsönható hálózatokba történő rendezése újszerű szemléletet és a microarray analízisnél nagyobb kapacitású, korszerűbb technika alkalmazását tette szükségessé. A bioinformatikai eszköztár fejlődésének köszönhetően az RNA-seq eljárás és az általa generált adatok kiértékeléséhez szükséges szoftveres és hardveres feltételek napjainkra elérhetővé váltak. A technika alkalmas a gazda – patogén kölcsönhatásból izolált RNS minták szimultán analízisére, tehát egyetlen minta tartalmazza mindkét organizmus transzkriptómját. A kétféle RNS populáció különválasztása a genomok ismeretében szoftveresen megoldható.

A módszerben rejlő potenciál okán a makrofág – *Candida* kölcsönhatás *in vitro* modelljének kiterjesztése mellett döntöttünk. Ennek megfelelően az alkalmazott módszeren kívül kísérleti elrendezésünk is módosult, a J774.2 egér makrofágok helyét a THP-1 humán monocitaszerű sejtek vették át. Ezzel korábbi modellünk mindkét hátrányát kiküszöböltük, és közelebb kerültünk ahhoz, hogy megismerjük az élesztők és a humán fagociták kölcsönhatása során megváltozott expressziót mutató géneket. Munkánk kezdetén több kérdésre is választ kerestünk. Egyrészt meg kívántuk határozni, hogy a fagociták illetve a *C. parapsilosis sensu lato* csoportba tartozó három faj egy-egy reprezentatív képviselőjének (*C. parapsilosis* (CDC317), *C. orthopsilosis* (MCO 456), *C. metapsilosis* (PL 429)) kölcsönhatása során

milyen gének és hogyan regulálódnak a gazdában és az élesztőkben. Az említett fajok bevonását az indokolta, hogy bár filogenetikailag nagyon közel állnak egymáshoz, mégis egészségügyi jelentőségük között szélsőséges különbségek mutatkoznak. Úgy gondoltuk, hogy ez a sajátos jelenség hozzásegíthet bennünket virulencia faktorok és/vagy felismerési útvonalak/effektor funkciók közötti különbségek hatékonyabb felderítéséhez. Érdekesnek találtuk a makrofágok a *C. parapsilosis* különböző izolátumaira adott válaszában és a *C. parapsilosis* különböző izolátumainak a fagociták jelenlétében megnyilvánuló transzkripciós változások összehasonlításának kérdéskörét. Ez utóbbi kísérletünkben a genom szekvenálási projektünk keretein belül vizsgált törzseket, a két környezeti izolátumot (CBS 1954 és CBS 6318) továbbá a két klinikai törzset (CDC317 és GA1) alkalmaztuk. A fentiekén kívül két deléciós törzset is bevontunk kísérleteinkbe, amelyek szülő törzse a GA1 klinikai izolátum. Ezek a laboratóriumunkban már korábban előállított, mindkét szekretált lipáz génre (*LIP1* és *LIP2*) nézve deléciós *LIP*⁻ (Gacser és mtsi, 2007c), illetve egy zsírsav deszaturáz génre (*OLE2*) nézve deléciós mutáns törzs (*OLE2*⁻), amely utóbbi génről génről bebizonyosodott, hogy *C. albicans*-ban a prosztaglandin E2 szintézisben játszik szerepet (Erb-Downward és Noverr, 2007). Döntésünkkel egyrészt közelebb léptünk ahhoz, hogy választ találjunk a fertőzés során humán fagocitákban végbemenő eseményekre, másrészt az eltérő klinikai relevanciával rendelkező, de filogenetikailag egymáshoz nagyon közel álló fajok illetve egyazon faj különböző (környezeti és klinikai) izolátumainak és a mutáns törzsek alkalmazásával lehetőségünk nyílik nem csak virulencia faktorok, de a patogénnel szembeni védekezésben szerepet játszó felismerési útvonalak, szignáltranszdukciós hálózatok, effektor funkciók, az élesztőben az eliminációs folyamatokkal szembeni védekezési mechanizmusok és a patogén evolúció lépéseinek illetve molekuláris eszközeinek azonosítására is. A vizsgált események időben változó jellege miatt, a transzkriptóm analízist a fertőzés összesen négy időpontjában (1 h, 3 h, 6 h, 12 h) végeztük el. Az RNS minták szekvenciájának meghatározását és az így nyert adatok kiértékelését szoros kollaborációban végeztük a Centre for Genomic Regulation (CRG, Barcelona, Spanyolország) intézet Komparatív genomikai csoportjának vezetőjével Dr. Toni Gabaldón-nal és munkatársával Leszek Pryszcz-cel. A generált hatalmas mennyiségű információ értelmezését és elemzését egyelőre csak bizonyos körülmények összehasonlításában végeztük el, a további részletesebb vizsgálatok jelenleg is zajlanak.

6.2.2. Genetikai ismeretek bővítése a transzkriptóm adatok felhasználásával

A transzkriptóm analízis nem csak bizonyos faktorok hatására megváltozott expressziót mutató gének azonosítására, hanem a genomi szekvencia alapján meghatározott gének körének kiegészítésére is alkalmas. Ez az ismert nukleotidsorrendű RNS-ek genomra történő illesztésével lehetséges. A fertőzésből izolált, kevert RNS populációt tartalmazó mintákban azonosított egyedi transzkriptek gazdához vagy patogénhez történő rendelése is ezzel a módszerrel valósítható meg. Hogy ez kivitelezhető legyen természetesen a kölcsönhatásban alkalmazott valamennyi organizmus genomjának rendelkezésünkre kell állnia. Emiatt a *C. orthopsilosis* és *C. metapsilosis* esetében először ezek teljes genom szekvenciáját kellett meghatároznunk. A transzkriptek genomra történő illesztése során *C. parapsilosis*-ban több mint 300, eddig le nem írt gént azonosítottunk. A *C. metapsilosis*, a *parapsilosis sensu lato* csoport másik két tagjához képest, kétszeres genommérete egy közelmúltban lejátszódó teljes genom duplikációra enged következtetni (9. ábra).



9. ábra. A grafikon a *C. parapsilosis sensu lato* csoportot alkotó három faj genom méretét és pediktált génjeinek számát ábrázolja. A világos kék jelölés az RNA-seq előtti, a sötét kék az az utáni állapotokat tükrözi *C. parapsilosis*-ban. A *C. metapsilosis*-szal kapcsolatos eredmények teljes genom duplikációra utalnak.

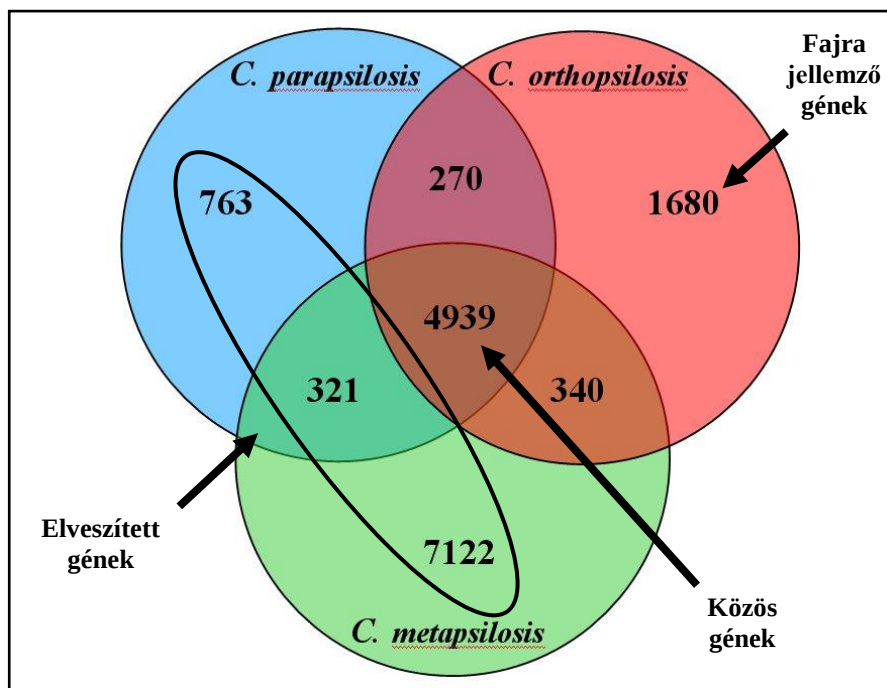
Ez a felismerés patogén evolúciós szempontból különösen érdekessé teszi ezt a fajt. A genom egészének megkétszereződése mindennek előtt kétszeres mennyiségű géntermék képződését feltételezi. Ennek gyakorlati előnyeit pl.: *S. cerevisiae* kapcsán alapvetően az ipar

használja ki, hiszen a fermentálás során a potenciálisan kétszeres mennyiségű enzim mennyiség hatékonyabbá tehet egyes folyamatokat (Querol és Bond, 2009). Az enzimek megnövekedett mennyisége egy patogén esetében ugyanakkor új niche-ek elfoglalásának feltételeit teremtheti meg. Az egyes géntermékek funkciója, szubsztrátspecifitása, expressziós mintázata megváltozhat, amelyek a gazda környezethez való alkalmazkodás eszközeinek tekinthetők. A továbbiakban összesen 11 *C. metapsilosis* izolátum teljes genom szekvenciáját határoztuk meg, és valamennyi esetben négyszeres kromoszómaszerelvény jelenlétét állapítottuk meg, amely arra utal, hogy a megfigyelt teljes genom duplikáció nem egyedi eset.

6.2.3. A *C. parapsilosis sensu lato* csoport génjeinek rokonsági viszonya

A közös őssel rendelkező homológ szekvenciák további két csoportra, paralóg és ortológ szekvenciákra oszthatók az alapján, hogy a közös őstől hogyan divergáltak. A paralóg szekvenciák egyetlen fajon belüli duplikációs eseményt követően divergálnak egymástól, míg az ortológ régiókat fajsztérválást követően a különböző fajok között értelmezzük (Fitch, 1970). Az élőlények és génjeik evolúciós kapcsolatának meghatározásával a filogenetika foglalkozik. A meghatározott organizmusok teljes génkészletére kiterjedő filogenetikai analízisek összességét filomnak nevezzük.

Együtműködésünk eredményeként a rendelkezésünkre álló információk (genom, RNA-seq, domain analízis) alapján annotált kódoló szekvenciák ismeretében meghatároztuk a *C. parapsilosis sensu lato* csoport ortológ génjeinek filomját. Az ehhez szükséges számítástechnikai háttér a CRG intézetben biztosított, így az elemzéseket kollaborációs partnerünk végezte. Ennek nyomán több mint 36.000 filogramot generáltunk, amelyeket egy központi adatbázisban helyeztünk el (www.phylomeDB.org). *C. parapsilosis*-ban 6.293, *C. orthopsilosis*-ban 7.229, *C. metapsilosis*-ban 12.722 gént azonosítottunk (10. ábra). A géneket a fajok közötti eloszlásuk alapján csoportosítottuk. Az egyes fajokra jellemző gének száma *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis*, *C. metapsilosis* sorrendben 763-nak, 1.680-nak és 7.122-nek adódott. Úgy találtuk, hogy összesen 4.939 gén van jelen mind a három élesztő genomjában. A kizárólag *C. parapsilosis*-ra és *C. orthopsilosis*-ra jellemző gének száma 270. Az összehasonlítás során ezen értékeket *C. parapsilosis* – *C. metapsilosis* és *C. orthopsilosis* – *C. metapsilosis* vonatkozásában rendre 321-nek és 340-nek határoztuk meg. Az elvesztett gének száma *C. metapsilosis*-ban 2.713-nek, *C. orthopsilosis*-ban és *C. parapsilosis*-ban (a *C. metapsilosis* teljes genom duplikációjának figyelembe vételével) rendre 8.206-nak, és 9.142-nek bizonyult.

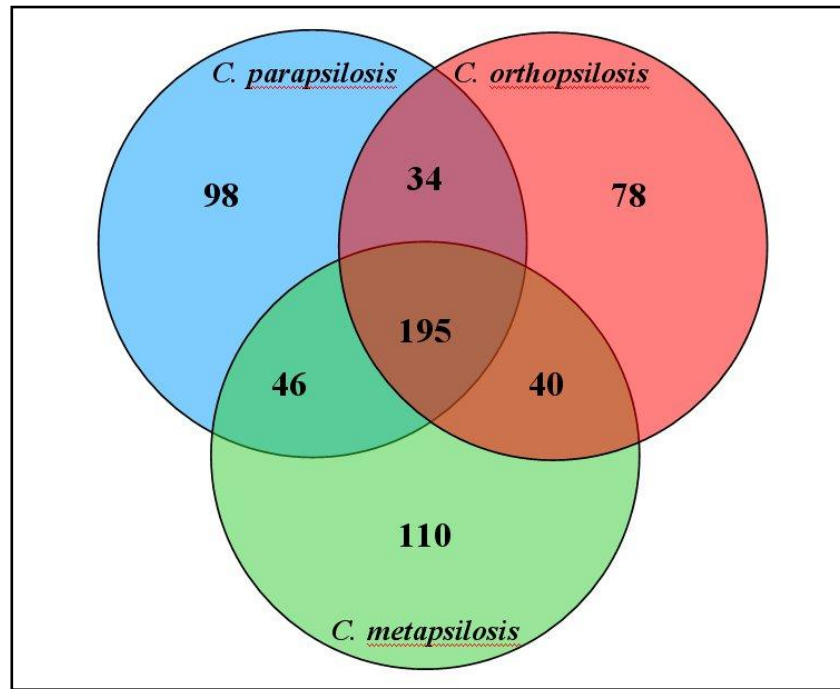


10. ábra. A *C. parapsilosis sensu lato* csoport génjeinek fajok közötti eloszlása a közös, fajra jellemző, és az elveszített gének számainak feltüntetésével a *C. orthopsilosis* példáján.

6.2.4. A *C. parapsilosis sensu lato* csoport potenciális virulencia faktorai

A lehetséges virulencia faktorokat elsősorban a nem fertőzött állapothoz képest megemelkedett expressziót mutató gének között azonosíthatjuk. Az RNA-seq adatok részletes analízisével megállapítottuk, hogy a fertőzés első órájában *C. parapsilosis*-ban 373, *C. orthopsilosis*-ban 347, *C. metapsilosis*-ban 391, a három fajban együttesen összesen 601 gén mutat a nem fertőzött kontrollhoz képest szignifikánsan magasabb expressziót (11. ábra). Az egyedül *C. parapsilosis*-ban, *C. orthopsilosis*-ban és *C. metapsilosis*-ban upregulálódott gének számát rendre 98-nak, 78-nak és 110-nek határoztuk meg. 195 transzkript relatív mennyisége emelkedett meg valamennyi vizsgált élesztőben. A tapasztalt különbségek oka lehet egyrészt értelemszerűen az adott transzkriptet kódoló gén hiánya vagy az aktiváció elmaradása.

Abból, hogy a *C. parapsilosis sensu lato* csoport tagjai által kiváltott megbetegedések esetszáma alapján (növekvő → csökkenő sorrendben) a *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis*, *C. metapsilosis* sorrendet állathatjuk fel, feltételezhetjük, hogy a legfontosabb virulencia faktorokat a *C. parapsilosis*-ban (és *C. orthopsilosis*-ban) upregulálódott gének között kell keresnünk. Ez a megközelítés az előzetesen meghatározott 601 potenciális virulencia faktor számát 98-ra (illetve a *C. orthopsilosis*-szal együtt harmadára, 210-re) redukálta.

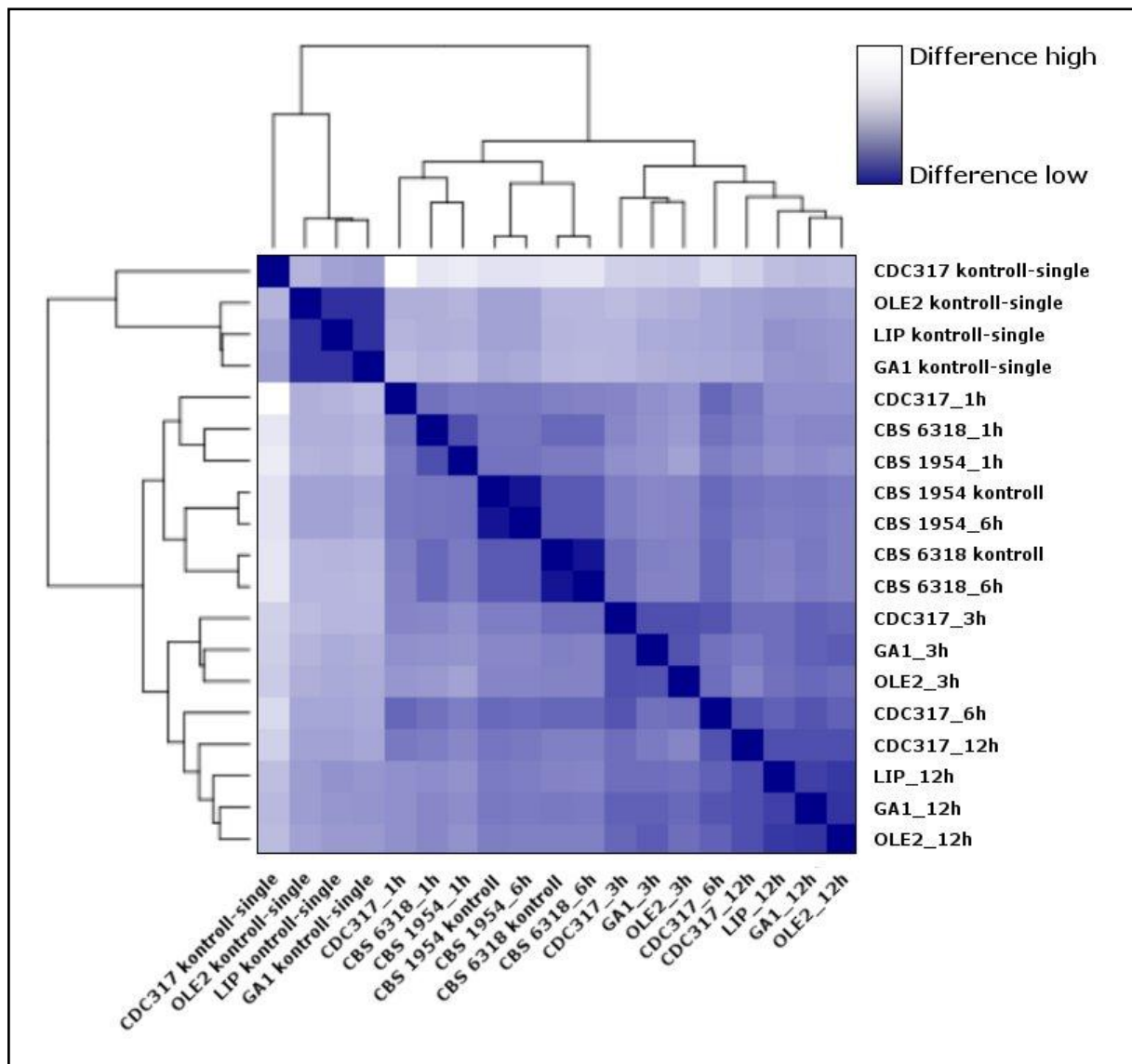


11. ábra. A *C. parapsilosis sensu lato* csoport tagjainak THP-1 humán monocitákkal való 1 órás kölcsönhatása eredményeként szignifikánsan megemelkedett expressziót mutató génjeinek száma és fajonkénti eloszlása.

A specifikusan *C. parapsilosis*-ban valamint kizárólag a *C. parapsilosis*-ban és *C. orthopsilosis*-ban upregulálódó gének metszetébe tartozó 132 gén között 75 kináz és transzkripció faktor transzkriptjét azonosítottuk. Laboratóriumunkban ezen gének egy deléciós és overexpressziós mutáns könyvtár létrehozásának alapjául szolgáltak, amely egy PhD értekezés témáját képezi. Jelenleg 22 deléciós mutáns áll rendelkezésünkre, amelyek közül három a vad típustól eltérő fenotípussal jellemezhető. A makrofágok *C. metapsilosis*-ra és *C. orthopsilosis*-ra adott válaszána vizsgálatára nehézségekbe ütközött. Úgy tapasztaltuk, hogy a nagy mennyiségű gomba RNS "elfedi" a humán transzkriptómot, így a fagociták expressziós mintázatának a *C. parapsilosis sensu lato* csoporton belüli megváltozásának összehasonlítását egyelőre nem tudtuk elvégezni. Ez a jelenség az RNS kivonási protokoll további optimalizálását tette szükségessé.

6.2.5. *C. parapsilosis* törzsek transzkriptómjainak elemzése

Az adatok kiértékelése során a meghatározott transzkript szekvenciákat a CDC317 referencia genomhoz illesztettük. Bizonyos minták esetében felmerült a korábban tapasztalt probléma, a gazda és az élesztő RNS populáció arányának szélsőséges eltolódása, emiatt számos mintát ki kellett hagynunk a kiértékelésből. Első lépésként a rendelkezésünkre álló teljes élesztő transzkriptómok összehasonlítását végeztük el. Ennek során minden mintát minden mintával összevetettünk, és a köztük lévő különbségeket egy "heatmap" ábrán foglaltuk össze (12. ábra).



12. ábra. Az élesztő transzkriptómok euklidészi-távolságok alapján számított "Heatmap"-je".

Az egyes mintapárok közötti hasonlóság annál nagyobb minél sötétebb árnyalatú a metszéspontjukban található négyzet. A világosabb árnyalat a két tetszőleges transzkriptóm

közötti különbségre utal. Az egyes mintapárok egyezőségének és különbözőségének ismeretében azok euklidészi távolságait is meghatároztuk, amely alapján valamennyi mintát csoportokba rendeztünk. Az ágrajz ábrázolás lényege, hogy minél inkább korrelálnak a különböző minták expressziós mintázatai annál közelebbi csoportba tartoznak. Az ághosszak a hasonlóság mértékére engednek következtetni. A transzkriptóm minták nukleotid sorrendjét a „pair-end” vagy „single-end” eljárással határoztuk meg. Egyes minták nevében szereplő „-single” elnevezés ez utóbbira utal.

Úgy találtuk, hogy a fertőzésből izolált és a monocitákkal nem indukált klinikai *C. parapsilosis* törzsek transzkriptómjai határozottan elkülönülnek mind egymástól, mind a környezeti izolátumok RNS populációjától. Ez alól mindössze a „CDC317_1h” minta jelentett kivételt, amely elsődleges analízisünk szerint érdekes módon a környezeti izolátumokkal mutat nagyfokú hasonlóságot. Kontroll körülmények között a klinikai izolátumok transzkriptjei közül a GA1, *LIP*⁻ és *OLE2*⁻ minták szorosan egymás mellé térképeződnek, amelynek nyilvánvaló oka, hogy a GA1 az említett két mutáns törzs szülőtörzse. Az ághosszak alapján a CDC317 klinikai izolátum transzkriptómja fagociták nélküli környezetben a GA1-*LIP*⁻-*OLE2*⁻ csoporttól lényegesen eltér. A fertőzésből származó klinikai RNS populációk a monocitákkal való interakció időtartamának megfelelően rendeződtek különböző csoportokba. A legkésőbbi időpontban (12 h) mind a négy klinikai törzs összehasonlítását el tudtuk végezni, ezek együttesen egyetlen önálló csoportot alkotnak. Legnagyobb hasonlóságot a „GA1_12h” és „OLE2_12h” minták között tapasztaltuk, míg az említett négy minta vonatkozásában ismét a „CDC317_12h” tér el leginkább a többitől. Megfigyelésünk szerint az alap expresszió összehasonlításában a GA1 mintához a *LIP*⁻, míg a monocitákkal való 12 órás indukció hatására az *OLE2*⁻ törzs transzkriptómja áll közelebb. A klinikai törzsek az interakció 1., 3. és 6 órájában izolált RNS mintái, a már említett okok miatt, hiányosak, a rendelkezésünkre álló adatok alapján a 3 darab 3 h-ás minta (CDC317, GA1, *OLE2*⁻) a 6 és 12 h-ás mintáktól eltérő, közös csoportba illeszkedik. Teljes kinetika vizsgálatára egyedül a CDC317 törzs esetében nyílt lehetőségünk. Ez alapján úgy találtuk, hogy a kontroll minta esik legtávolabb a monocitákkal indukált élesztők transzkriptómjától, amely arra utal, hogy a fagociták jelenléte az alap expressziótól lényegesen eltérő transzkriptációs mintázatot eredményez. A különböző időpontokban izolált RNS populációk ágrajzon való eloszlása arra enged következtetni, hogy a transzkriptációs változások többsége az interakció első órájában következik be, hiszen ez a minta mind a kontroll, mind a később izolált transzkriptómtól jelentősen eltér. A 3, 6 és 12 h-ás minta, az 1 h-ás mintától elkülönülve, közös csoportban foglal helyet. Ezek közül a két későbbi időpont (6 és 12 h)

között, a korábbi összehasonlításhoz (1 ↔ 3, 6, 12 h) képest, jóval kisebb különbséget állapítottunk meg.

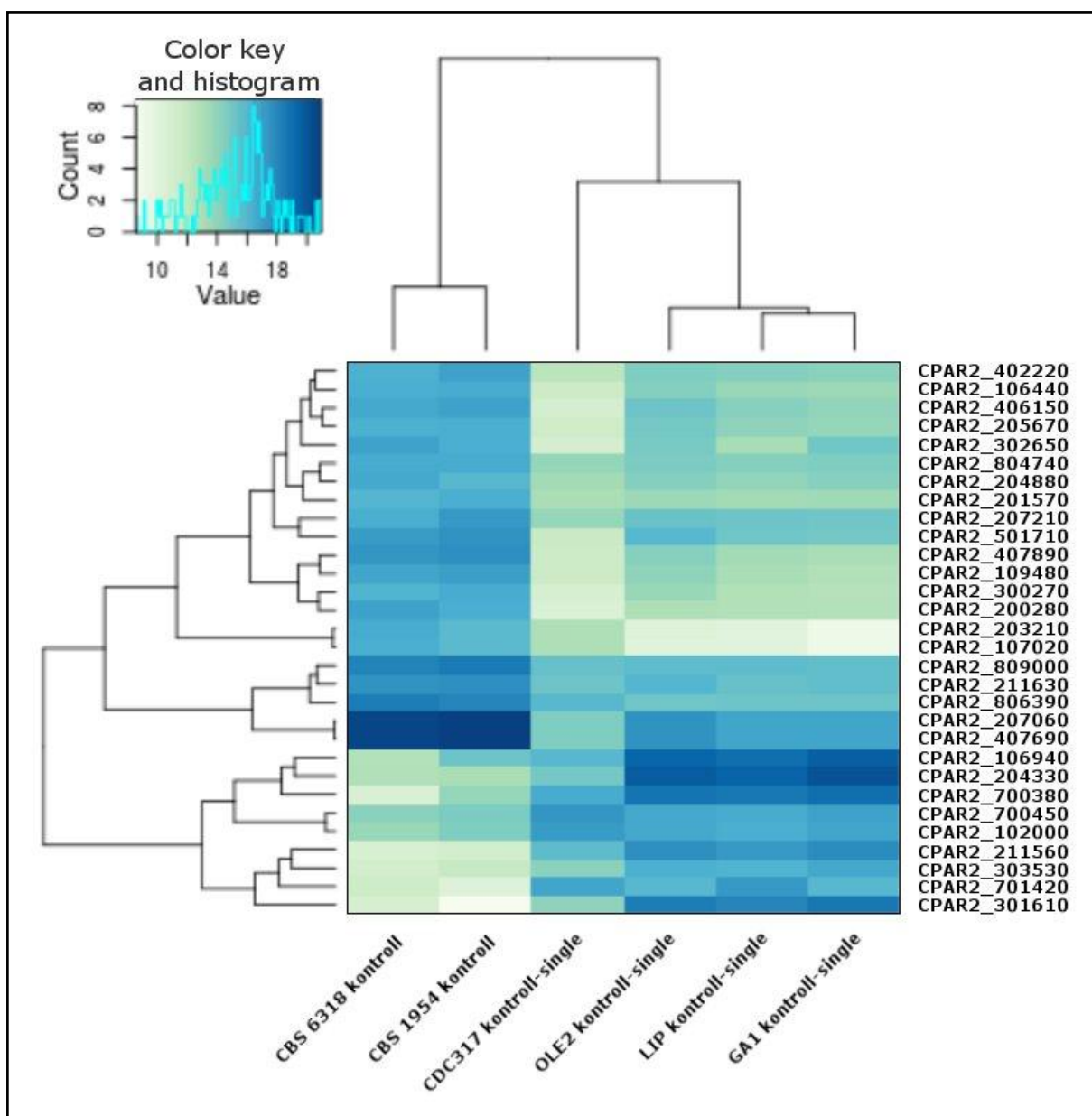
A környezeti izolátumok vizsgálatát csak a kontroll, valamint az 1 és 6 h-ás indukciónak kitett élesztők esetében tudtuk elvégezni. Ezek közösen a „CDC317_1h” mintával együtt egy a többi mintától különálló csoportot alkotnak. A környezeti izolátumok esetében a kontroll és indukált minták éles elkülönülése nem volt megfigyelhető. Sőt az ágrajz topológiája éppen arra enged következtetni, hogy a klinikai és környezeti izolátumok (monocita indukció nélküli) alap expressziója között nagyobb az eltérés, mint a környezeti izolátumok RNS populációi között induktív és kontroll körülmények összehasonlításában. Ez mindeképpen érdekes különbség a kétféle forrásból származó élesztők között, hiszen a klinikai izolátumok esetében a monociták jelenléte igen szembeötlő hatást gyakorolt az expressziós mintázatra. A két környezeti izolátum az indukció első órájában vizsgált transzkriptóm alapján azonos csoportba illeszkedik, amely hasonló transzkripciósváltozásokra utal. Hozzájuk legközelebb a „CDC317_1h” minta helyezkedik el, amely azt sejteti, hogy az indukció időtartama nagyobb befolyással van a minták ágrajzon való elhelyezkedésére (transzkripciósváltozásokra), mint az élesztő klinikai vagy környezeti eredete. Bár tény, hogy ezt a felismerést a „GA1_1h”-ás minta hiányában nem tudtuk megerősíteni. Érdekes, hogy a klinikai mintákkal ellentétben az interakció későbbi szakaszában (6 h) a környezeti izolátumok expressziós mintázata nem mutat lényeges különbséget az 1 h-nál tapasztalt állapotól. Sőt úgy tűnik, hogy 6 h indukciót követően a környezeti izolátumok transzkriptómja nagyobb hasonlóságot mutat az alap expresszióval, mint az 1 h interakció után szintetizálódó RNS populációval.

Az adatok elsődleges összehasonlításával kapott eredmények jól tükrözik az RNA-seq eljárásban rejlő potenciált. Bár ezidáig csak előzetes vizsgálatokat végeztünk, egyértelmű, hogy a módszer alkalmas nagyszámú, fertőzésből izolált RNS minta kiértékelésére és analízisére. A továbbiakban a megfigyelt különbségek részletesebb elemzéséhez a mintaszámot lecsökkentettük, és adataink értelmezését logikai egységet alkotó mintacsoportokban overexpresszálódó gének vizsgálatával folytattuk.

6.2.6. A *C. parapsilosis* két környezeti és két klinikai izolátumának transzkripció analízise

Az említett nézőpontból az alábbi kérdésekre kerestünk választ. Egyrészt az összes *C. parapsilosis* törzs alap expressziójának összehasonlításával informálódni kívántunk arról, hogy makrofágok nélküli környezetben a különböző törzsek transzkripció mintázata mutat-e különbséget. Másrészt természetesen szándékunkban állt megvizsgálni, hogy a fagociták jelenléte mely gének transzkripcióját és milyen mértékben befolyásolja, illetve, hogy az inkubáció előrehaladtával ez az expressziós mintázat hogyan változik, különös tekintettel a környezeti és a klinikai izolátumok viselkedésére. Az RNS minták analízise során a vizsgált élesztő törzsekben a referencia CDC317 törzsben leírt 5.836 gén 5.832 transzkriptjének szekvenciáit kerestük. Az elemzés 5.167 féle RNS jelenlétét mutatta ki. Ezek közül szignifikánsan 729 transzkript mennyiségében tapasztaltunk legalább kétszeres különbséget a monociták induktív hatására.

A környezeti és klinikai izolátumok valamint mutáns törzsek alap expressziójának összehasonlítását értelemszerűen a monocitát nem tartalmazó kontroll minták analízisével végeztük el. Az eredményeket a 13. ábrán bemutatott „heatmap” foglalja össze. Az elemzés első lépéseként a bevont hat mintát az összes lehetséges (összesen 15) kombinációban párba állítottuk, és minden pár esetében meghatározzuk azokat a géneket, amelyek expressziójában eltérés mutatkozik. Miután ezek valamennyi mintapár kapcsán rendelkezésünkre álltak, a géneket összesítettük, és expressziójuk eltérésének nagysága alapján csökkenő sorrendbe állítottuk. Ebből kiválasztottuk az első harminc gént, amellyel az alap expressziós mintázat összehasonlítását végeztük. Ezek a gének a „heatmap” jobb oldalán kerültek feltüntetésre. A színárnyalatok az adott RNS mennyiségét szimbolizálják. A világosabb árnyalat kisebb, a sötétebb nagyobb mennyiségű transzkriptre utal. A bal oldalon található ágrajz a szóban forgó gének regulációjának hasonlóságáról és eltéréséről hordoz információt. Az elemzés alapján a törzsek az izolálás forrása szerint (klinikai vagy környezeti) rendeződnek különálló csoportokba. A klinikai izolátumok és a mutáns törzsek ágrajzának topológiája a korábban elvégzett analízis (12. ábra) eredményeit tükrözik. A mutáns törzsek alap expressziója közel azonos a szülőtörzsével, amelyektől azonban a CDC317 transzkriptómja lényegesen eltér. A két környezeti izolátum alap expressziójában, ez utóbbinál kisebb eltérést állapítottunk meg.



13. ábra. A CBS 1954 és CBS 6318 környezeti valamint a CDC317 és GA1 klinikai izolátumok és a két mutáns törzs alap expressziójának összehasonlítása a bármely két minta között legnagyobb expresszióbeli különbséget mutató harminc gén euklidészi-távolságainak meghatározásával.

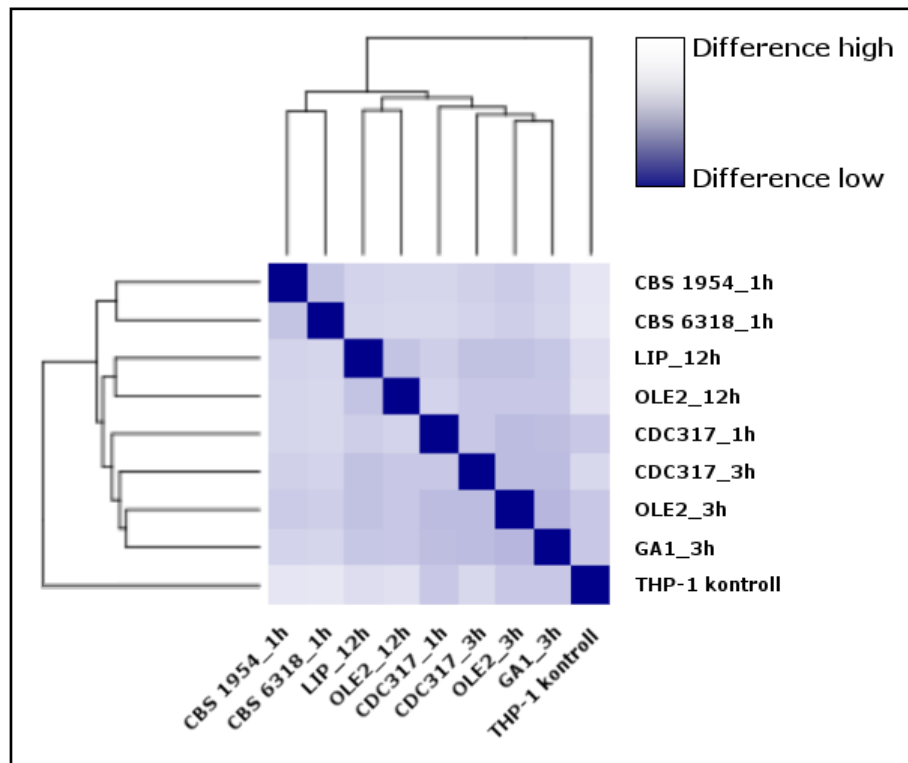
A környezeti izolátumok monocitákra adott válaszát ezidáig a fertőzés első órájában izolált RNS populációkon (8. számú melléklet) elemeztük az említett stratégiával. Természetesen ennek alapjául az aktuális minták között eltérő expressziót mutató gének szolgáltak. Az analízis a teljes transzkriptóm populáció bevonásával elvégzett számítással megegyező eredményre vezetett. A két kontroll - és a két indukált minta egymástól elkülönülő csoportokat alkotott. A klinikai izolátumok analízisét a fertőzés harmadik (9. számú melléklet) és tizenkettedik órájában (10. számú melléklet) végeztük el a monociták nélküli

kontrollal összehasonlítva. Érdekes módon ezekben az esetekben a két különböző adat felhasználásával végzett analízis eltérő topológiájú ágrajzokat eredményezett. Ezt a jelenséget az említett időpontokban mind a kontroll, mind az indukált minták kapcsán megfigyeltük. A 3 órás minták 30 gén alapján számított ágrajza szerint a „CDC317_3h” - „OLE2_3h” mintapár alkot egy csoportot, amelyektől a „GA1_3h” minta külön el. Ezzel szemben a teljes transzkriptóm analízis alapján a GA1 - OLE2⁻ mintapár mutat nagyobb fokú hasonlóságot, amely csoport mellé a „CDC317_3h” minta térképeződik. A négy kontroll esetében mindkét analízis szerint a „CDC317 kontroll-single” minta tér el leginkább a többi háromtól. Ez utóbbiak között a teljes transzkriptóm elemzés szerint a GA1 – LIP⁻ pár mutatja a legnagyobb hasonlóságot (ezek mellé illeszkedik az „OLE2 kontroll-single” minta), ugyanakkor a legnagyobb expresszióbeli eltérést mutató 30 gén szempontjából a két mutáns törzs alkot egy csoportot, amelyek mellé a szülőtörzs térképeződik. A 12 órás minták esetében a 30 legnagyobb expresszióbeli különbséget mutató gén alapján elvégzett vizsgálat a kontroll minták korábban nem tapasztalt eloszlását eredményezte. A „CDC317 kontroll-single” ez esetben is elkülönül a többi három mintától, amely egybevágh az összes korábbi analízis eredményével. Jelen vizsgálat azonban a GA1 - OLE2⁻ mintapár között állapította meg a legnagyobb hasonlóságot. A monocitákkal indukált minták kapcsán is a teljes transzkriptómtól eltérő topológiát állapítottunk meg. A 30 gén alapján az „OLE2_12h” - „GA1_12h” valamint a „LIP_12h” - „CDC317_12h” mintapárok egymástól elkülönülő csoportokat alkotnak. Megfigyeltük, hogy a két különböző időpontban (3, és 12 h) izolált transzkriptómok 30 legnagyobb expresszióbeli különbséget mutató gének alapján elvégzett analízise nem csak az indukált, hanem a kontroll minták időpontokként eltérő topológiáját is eredményezte. A 3 és 12 h indukciót követően izolált RNS populációban 18 transzkript mindkét elemzésben szerepel, tehát ezek expressziója tartósan magas értéket képvisel (a vizsgált időpontokban) 12-12 RNS ugyanakkor az adott időpontra jellemző. Ez a különbség szolgálhat a legvalószínűbb magyarázattal a kontroll minták két ágrajzon tapasztalt eltérő elhelyezkedésére. A vizsgálatok alapjául szolgáló géneket és feltételezett funkciójukat a 11. számú melléklet tartalmazza.

6.2.7. A fagociták transzkripció válaszának jellemzése a fertőzés során

A gazda sejtek esetében összesen 118.641 transzkriptet azonosítottunk a különböző mintákban, ezeket a humán genomhoz (hg19) illesztettük. Nagyon sok esetben a gomba RNS elfedte a humán RNS populációt, emiatt ezeket a mintákat ki kellett hagynunk a vizsgálatból. Az eddigieknek megfelelően az elemzést a rendelkezésünkre álló transzkriptómok euklidészi-

távolságának meghatározásával és ábrázolásával kezdtük, amelynek eredményét a 14. ábra foglalja össze.



14. ábra. Az monocita transzkriptómok euklidészi-távolságok alapján számított "Heatmap"-je".

Bár, fontos szem előtt tartani, hogy a vizsgálatot csak kevés számú minta bevonásával állt módunkban elvégezni, ezek alapján mégis igen szembeötlő, hogy az élesztővel fertőzött és nem fertőzött THP-1 sejtek transzkriptómja egymástól határozottan elkülönülő csoportokba illeszkedik. Az ágrajz értelmében a fertőzésből izolált monocita RNS populációk között a legnagyobb különbség az alkalmazott élesztők klinikai vagy környezeti mivolta alapján adódik. Úgy tűnik, hogy a klinikai törzsek (és a mutánsok) jelenlétében megnyilvánuló transzkripciós változások az indukció időtartama alapján rendeződnek csoportokba. Ezt természetesen a vizsgálatban használt kevés minta miatt egyértelműen nem jelenthetjük ki. Érdekes módon a(z) általunk vizsgált kis számú) fertőző mintákban mindösszesen 29 gén mutatott szignifikánsan eltérő expressziót a nem fertőzött kontrollhoz képest. Az említett transzkriptek exonjainak számát, tényleges vagy feltételezett funkciójukat a 12. számú melléklet tartalmazza. Az internetes adatbázis tanúbizonysága szerint a 29 transzkriptből csak 21 transzlálódik, a többi 8 RNS-ről viszont nem képződik fehérje.

6.2.8. Az *in vitro* makrofág - *Candida* kölcsönhatás rendszerelméletű, komplex analízise: összefoglalás/értékelés

Az expressziós mintázat analízisének újkori eszköze, az RNA-seq eljárás, alkalmas módszernek bizonyult a gazda - patogén kölcsönhatás, minden eddigénél részletesebb elemzésére. Az RNS izolálási protokoll megfelelő optimalizálásával elérhető, hogy mind a gazda, mind pedig a patogén transzkriptóm értelmezhető legyen a mindkét oldal RNS-ét tartalmazó egyetlen mintában. Korábbi modellünket módosítottuk, a fagocitákat THP-1 humán monocita sejtekre cseréltük, és kísérleteinkbe bevontuk a *C. parapsilosis sensu lato* csoport valamennyi képviselőjét annak érdekében, hogy választ kapjunk arra, hogy mi okozhatja ezeknek a filogenetikailag nagyon közeli három fajnak az egymástól gyökeresen eltérő klinikai jelentőségét. A *C. parapsilosis* fajt összesen négy vad típusú (két környezeti és két klinikai) izolátum és két mutáns (*LIP⁻* és *OLE2⁻*) törzs képviselte. Ezzel a kísérleti elrendezéssel arra a kérdésre kerestük a választ, hogy vajon van-e és ha igen, milyen jellegű különbség a környezeti és a klinikai izolátumok valamint a mutáns törzsek alap expressziója, és a fagociták jelenlétére adott válasza között. A molekuláris események időben változó jellege miatt az RNS mintázatot a fertőzés több időpontjában is meg kívántuk határozni. Ezzel egyrészt felderíthetjük a fertőzés során a humán monocitákban végbemenő eseményeket, a különböző fajokra/izolátumokra/törzsekre adott gazda válasz esetleges különbözőségét, másrészt az eltérő izolátumok és a mutáns törzsek alkalmazásával virulencia faktorok, a patogénnel szembeni védekezésben szerepet játszó felismerési útvonalak, szignáltranszdukciós hálózatok, effektor funkciók és a patogénben az eliminációs folyamatokkal szembeni védekezési mechanizmusok is azonosíthatók. A minták analízisét és kiértékelését kollaborációban végeztük a CRG (Barcelona, Spanyolország) Komparatív genomikai csoportjával közösen Dr. Toni Gabaldón és Leszek Pryszcz közreműködésével.

Az RNA-seq technika az expressziós mintázat pontos meghatározásával lehetővé teszi az *in silico* génjölés pontosítását. Ezt kihasználva elemzésünk során *C. parapsilosis*-ban több mint 300 eddig nem ismert transzkriptet és ezek génjeit azonosítottuk. A *C. metapsilosis* genom és transzkriptóm elemzésével fény derítettünk arra, hogy a faj, evolúciós léptékben, a közelmúltban teljes genom duplikációs eseményen esett keresztül, amely a patogénné válás folyamatának fontos lépése lehet.

A *C. parapsilosis sensu lato* csoport egy-egy képviselőjének *in silico* összehasonlító genomikai analízisével meghatároztuk a potenciális génjeinek számát és azok eloszlását, azonosítva a fajra jellemző -, közös - és elvesztett géneket.

Ezt a jellegű összehasonlítást elvégeztük az említett három faj transzkriptóm adataival is. Ennek segítségével 601 olyan transzkriptet azonosítottunk, amelyek mennyisége a monocitákkal indukált állapotban legalább kétszeresére emelkedik a humán sejtet nem tartalmazó kontrollhoz képest. A fajok klinikai relevanciájának ismeretében a virulencia faktorok elsősorban a csak *C. parapsilosis*-ra és *C. orthopsilosis*-ra jellemző 210 gén között azonosíthatók. A fagocita válasz összehasonlítása nehézségekbe ütközött, ugyanis a nagy mennyiségű gomba RNS elfedte a humán transzkriptómot, így a gazda RNS szekvenálása meghiúsult.

A monocita - *C. parapsilosis sensu stricto* transzkriptómok elemzése során összesen 5.127 féle transzkriptet azonosítottunk. Ezek közül 729 expressziója mutatott szignifikáns eltérést a monocitát nem tartalmazó körülményekhez képest. Az adatok kiértékelését a teljes transzkriptóm adatok euklidészi-távolságainak meghatározásával kezdtük. Az analízis szerint a klinikai törzsek és az előállított mutánsok, továbbá a klinikai és a környezeti minták egymástól független csoportokba rendeződtek. Tetszőleges két minta közötti legnagyobb expresszióbeli különbséget mutató 30 *Candida* gén felhasználásával elvégzett analízis alapján, mind a "környezeti - klinikai izolátum alap expresszió", mind a "környezeti izolátum fertőzés (1h) - kontroll", mind pedig a "klinikai izolátum fertőzés (3h, 12h) - kontroll" egyértelműen elkülöníthető egymástól az euklidészi-távolságok "heatmap" elemzése szerint. A további összehasonlító elemzések (vad típus - mutánsok, a klinikai és környezeti izolátumok egyéb időpontokban) jelenleg is folyamatban vannak.

A RNS mintákban összesen 118.641 humán transzkriptet azonosítottunk. A transzkriptómok euklidészi távolságainak elemzése megállapította, hogy a környezeti és klinikai izolátumok eltérő transzkripcióos változásokat idéznek elő a fagocitákban. Úgy találtuk, hogy mindösszesen 29 transzkript mennyisége tér el szignifikánsan a monociták alap expressziójához képest, amelyek között feltűnően nagy a pszeudogének aránya. A különböző időpontokban különböző törzsek által indukált transzkripcióos változások összehasonlító analízise folyamatban van.

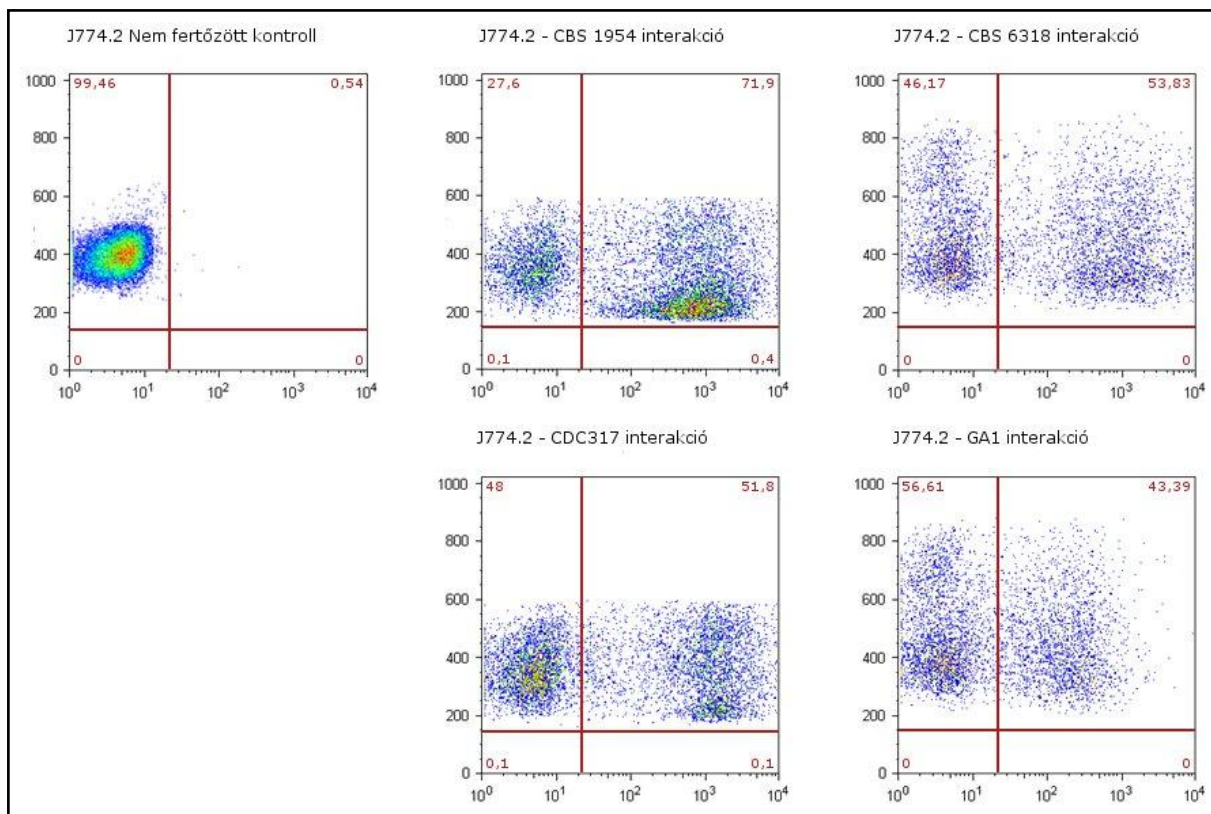
Úgy tapasztaltuk, hogy az RNA-seq eljárással valóban lehetséges a humán és a gomba RNS szimultán elemzése, de nagy hangsúlyt kell fektetni a megfelelő arányokra. Bizonyos minták ugyanis az eltolódott gazda - patogén transzkriptóm arány miatt nem szolgáltatott értelmezhető adatot, így ezekben az esetekben ismétlésre, illetve az RNS izolálási protokoll finomítására, optimalizálására van szükség.

6.3. *C. parapsilosis* izolátumok összehasonlító genomikai analízise

C. albicans-szal kapcsolatos kutatások rávilágítottak arra, hogy a különböző izolátumok virulenciája között sokszor lényeges eltérések mutatkoznak. Ez megnyilvánulhat például *in vivo* kísérletekben a mortalitási görbe eltérő lefutásában, *in vitro* fertőzésekben a fagocitákkal szembeni ellenálló képesség különbözőségében és az egyes virulencia faktorok expressziójának eltérő intenzitásában (Odds és mtsi, 2000). A tapasztalt virulenciabeli eltérések sok esetben genetikai különbségekkel hozhatók összefüggésbe (Sampaio és mtsi, 2010). Annak ellenére, hogy a különböző *C. albicans* izolátumok genomja és virulenciája közötti korreláció vizsgálata számos értékes konklúzió levonását tette lehetővé, a nemzetség egyéb képviselői körében hasonló összehasonlítás még nem látott napvilágot. Munkám harmadik fő témaköréként a kérdéskör részletes vizsgálatának céljából négy *C. parapsilosis* izolátum összehasonlító genomikai analízisét végeztük el. A vizsgálatba két környezeti és két klinikai törzset vontunk be. Ezek egy olajfa termésről izolált (CBS 1954), egészséges bőrfelszínről származó (CBS 6318), a laborunkban általánosan vad típusként használt, vérmintából azonosított izolátumot (GA1) és egy kórházi dolgozó kezéről izolált törzset (CDC317) jelentettek. Ez utóbbit egy mississippi-i kórházban számos candidiázis-ban szenvedő páciensből is kimutatható volt. A kórházi dolgozó az élesztő vektoraként működhetett közre (Kuhn és mtsi, 2004).

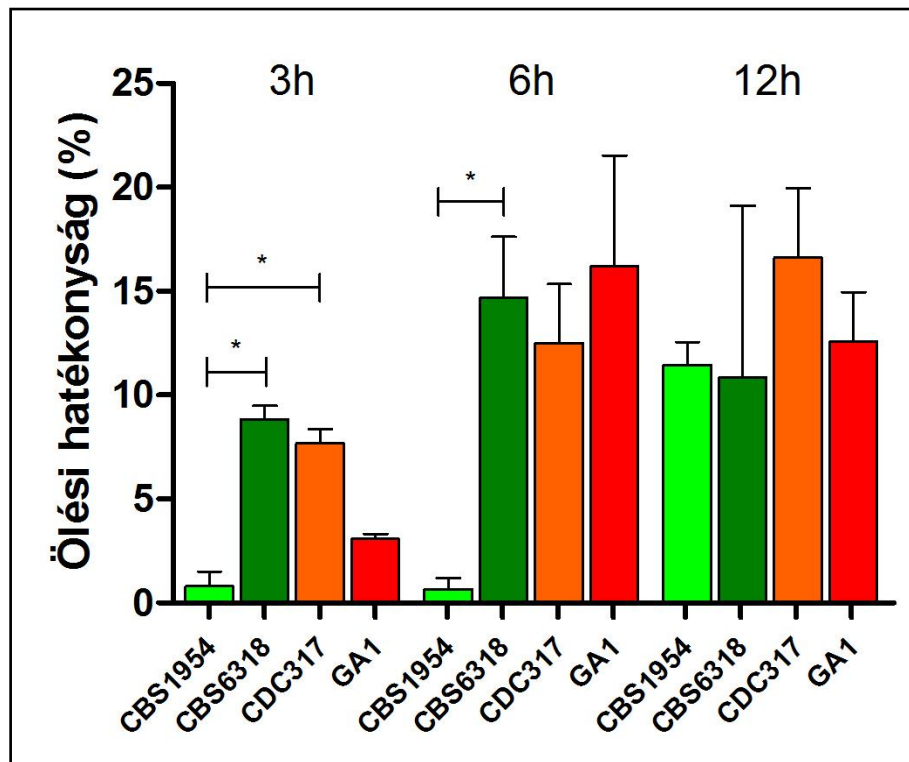
6.3.1. Különböző izolátumok virulenciájának összehasonlítása *in vitro* fertőzéses modellekben

Korábbi munkánk során megfigyeltük, hogy a fent említett négy izolátum a makrofágok gomba eliminációs folyamataival szemben különbözőképpen viselkednek. Alexa Fluor 647 jelölt élesztők és J774.2 makrofágok három órás inkubációja után elvégzett áramlási citometriás analízis eredményei szerint a teljes makrofág populációra vonatkoztatva a fagocitáló makrofágok aránya széles határok között variál a négy izolátum esetében. Az értékek 71,9%-nak (CBS 1954), 53,83%-nak (CBS 6318), 51,8%-nak (CSC317) és 43,39%-nak (GA1) adódtak (15. ábra.).



15. ábra. A J774.2 makrofágok és Alexa Fluor 647 jelölt CDC317, CBS 1954, CBS 6318 és GA1 *C. parapsilosis* izolátumok kölcsönhatásának áramlási citometriás analízise a fertőzés harmadik órájában. A jobb felső kvadráns a legalább egy élesztőt fagocitált makrofágokat összesíti. A mező jobb felső sarkában a fagocitáló makrofágok teljes makrofág populációra vonatkoztatott százalékos értéke van feltüntetve.

A négy törzs sejtjei a THP-1 fagociták eliminációs mechanizmusainak is eltérő módon voltak képesek ellenállni. Az élő csíraszámot a fertőzés 3., 6. és 12. órájában határoztuk meg és a relatív értéküket a makrofágokat nem tartalmazó kísérleti elrendezések kontroll értékeihez viszonyítva állapítottuk meg. Az inkubáció korai időpontjában (3 h) a gazda sejtek a CBS 6318 és CDC317 izolátumokat hatékonyabban voltak képesek eliminálni, mint a CBS 1954 és GA1 jelű törzseket. A kölcsönhatás 6. órájában az ölés hatékonysága három izolátum (CBS 6318, CDC317, GA1) esetében emelkedik, közöttük szignifikáns különbség nem mutatható ki, ugyanakkor érdekes, hogy a CBS 1954-es izolátumra a három óránál tapasztalt alacsony értéket állapítottuk meg. Ez a különbség csak a fertőzés 12. órájában tűnt el, amely időpontnál a fagociták valamennyi élesztő törzs sejtjeit átlagosan 10% feletti mértékben voltak képesek eliminálni. Ennél az időpontnál a négy törzset jellemző ölési hatékonyságok között egyetlen adatsor pár kombinációban sem volt szignifikáns a különbség (16. ábra)

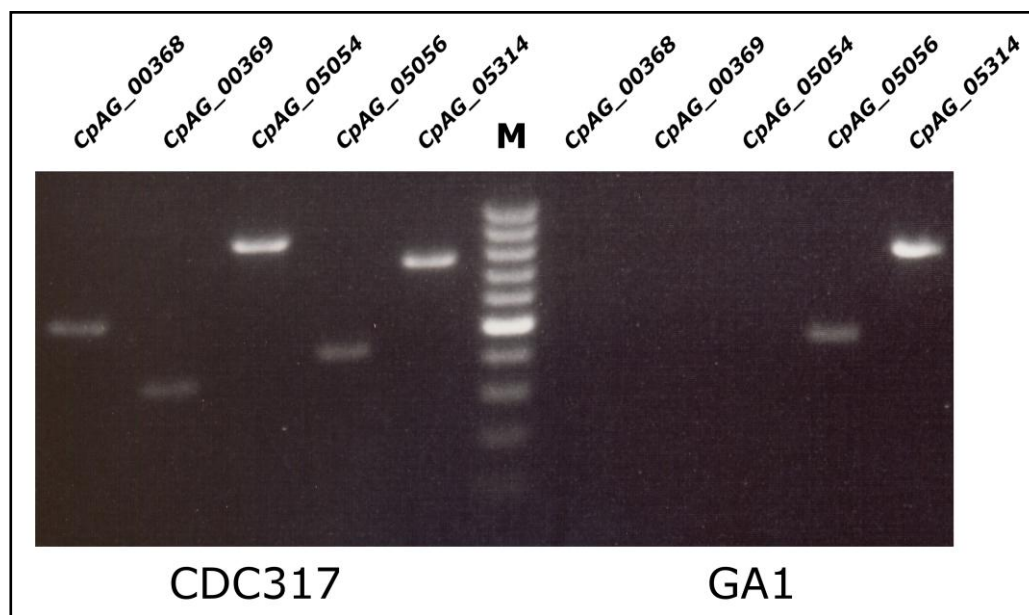


16. ábra. A THP-1 sejtek eltérő mértékben képesek eliminálni a *C. parapsilosis* CBS 1954, CBS 6318, CDC317 és GA1 izolátumait. Az ábra a fagociták által elpusztított élesztő sejtek arányát mutatja be a makrofágot nem tartalmazó körülményekhez képest a kölcsönhatás harmadik, hatodik és tizenkettedik órájában. * $p < 0,05$.

Érdekes, hogy míg a J774.2 makrofágok a CBS 1954 jelű törzset fagocitálják a legnagyobb mértékben az áramlási citométer eredményei alapján, addig a THP-1 fagociták éppen ezt az izolátumot eliminálják a legkevésbé. A jelenség legkézenfekvőbb magyarázata, hogy a két kísérletben két különböző típusú sejtvonal választát vizsgáltuk. Elképzelhető, hogy a különböző forrásból származó sejtek eltérő módon viselkednek ugyanazon törzsszel való fertőzés során. Az ellentmondás másik magyarázatául egy technikai anomália szolgálhat. Az áramlási citométer ugyanis, ebben a festési eljárásban, nem képes különbséget tenni a fagocitált és a még csak a makrofág felszínéhez tapadt élesztők között. Lehetséges, hogy a jobb felső kvadránsban szereplő J774.2 fagociták asszociáltak ugyan az élesztő sejtekkel, de még nem vették fel azokat. Harmadrészt a négy vizsgált *C. parapsilosis* törzs közül éppen a CBS 1954 jellemezhető a legagresszívebb pseudohifa képzéssel, amely az adhéziót nem, de a hatékony fagocitózist/eliminálást akadályozhatja.

6.3.2 A különböző izolátumok molekuláris tulajdonságainak összehasonlítása

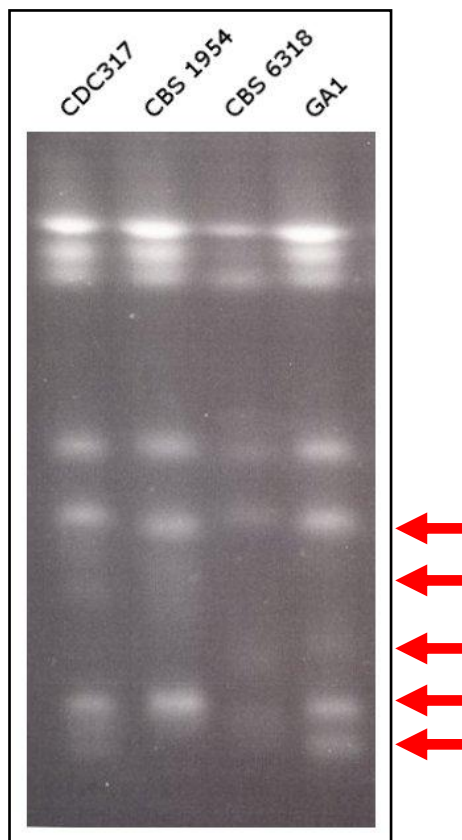
Külföldi kutatócsoportokkal folytatott konzultációk alkalmával információt szereztünk arról, hogy bizonyos esetekben az általunk referencia vad típusként használt *C. parapsilosis* GA1 jelű törzsben problémákat jelent az adhézióban *C. albicans*-ban bizonyítottan szerepet játszó (Hoyer és mtsi, 2008) *ALS* gének deletálása. Ennek a géncsaládnak az adatbázisban elérhető CDC317 referencia genomban összesen öt tagja (CpAG_00368, CpAG_00369, CpAG_05054, CpAG_05056, CpAG_05314) azonosítható (Rossignol és mtsi, 2009), ugyanakkor a mutánsok előállításakor használt homológ szakaszok bizonyos *ALS* gének esetében, a GA1 genomból való célzott génkiütéskor nem bizonyultak hatásosnak. Annak eldöntésére, hogy a *C. parapsilosis* törzsekben az *ALS* géncsaládnak mely tagjai vannak jelen, valamennyi *ALS* génre primerpárt terveztünk, amelyek segítségével megállapítható, hogy az adott *ALS* gén megtalálható-e a genomban vagy sem. A primerpárok a PCR során 570 bp-os (CpAG_00368) 374 bp-os (CpAG_00369), 865 bp-os (CpAG_05054), 439 bp-os (CpAG_05056), 762 bp-os (CpAG_05314) termékeket eredményeznek. Az általunk vizsgált két törzs (CDC317 és GA1) az említett szempont alapján történő összehasonlítását a 17. ábra mutatja be.



17. ábra. Az *ALS* gének eloszlása a CDC317 és GA1 izolátumokban. A referencia törzsben öt, a GA1 ben két *ALS* gén van jelen. M: MassRuler DNA Ladder Mix 80-10.000 bp (Fermentas).

A négy izolátum kariotipizálását PFGE (Pulsed field gelelectrophoresis) segítségével végeztük el. Erre a *C. metapsilosis*-ra általunk már korábban kidolgozott és optimalizált protoplaszt képzési - és agarózba ágyazási protokollt illetve futtatási paramétereket

alkalmaztuk. Úgy találtuk, hogy a törzsek között a közepes és rövidebb méretű kromoszómák mérettartományában különbségek mutatkoznak (18. ábra).



18. ábra. A CBS 1954, CBS 6318, CDC317 és GA1 törzsek kariotípus analízise pulzáltatott terű gélelektroforézis technika segítségével. Az izolátumok kromoszómái között a nyilakkal jelölt mérettartományokban figyelhetők meg különbségek.

6.3.3. A négy izolátum teljes genom szekvenciája és összehasonlító elemzése

A rendelkezésünkre álló virulenciabeli és genetikai különbségek ismeretében a CBS 1954, CBS 6318 és GA1 izolátumok teljes genom szekvenciájának meghatározása és a referencia CDC317 genomhoz történő részletes összehasonlítása mellett döntöttünk. A transzkriptóm vizsgálathoz hasonlóan az említett törzsek genom szekvenálását és kiértékelését is a CRG Komparatív genomika csoportjával közösen végeztük el. Az élesztőkből izolált genomi DNS-t Spanyolországba, a szekvenálást végző partnerünknek továbbítottunk. A szekvenciák meghatározásán kívül, azok elemzése és a referencia CDC317 genomhoz történő hasonlítása is az ő bioinformatikai kapacitásukat igényelte. Az *in silico* analízis nyomán azonosított deléciók kísérletes igazolására egy molekuláris módszerekre (PCR, Southern hibridizáció, Sanger-szekvenálás) támaszkodó validációs stratégiát dolgoztunk ki és alkalmaztunk.

A leolvasások száma a három törzs esetében ~ 36 – 87 millióig terjedt, a szekvenálás mélysége (vagyis azon leolvasások átlagos száma, amely egy adott bázist reprezentál) 248 és 510 között változott. Az adatokat 50 – 61 "scaffold"-ba tudtunk rendezni. A haploid genom méret mindhárom izolátum esetében nagyobbnak bizonyult a 13,030 megabázis kiterjedésű CDC317 referencia genoménál, amelyek eredményeink szerint törzstől függően 5665 – 6293 gént kódolnak (3. táblázat).

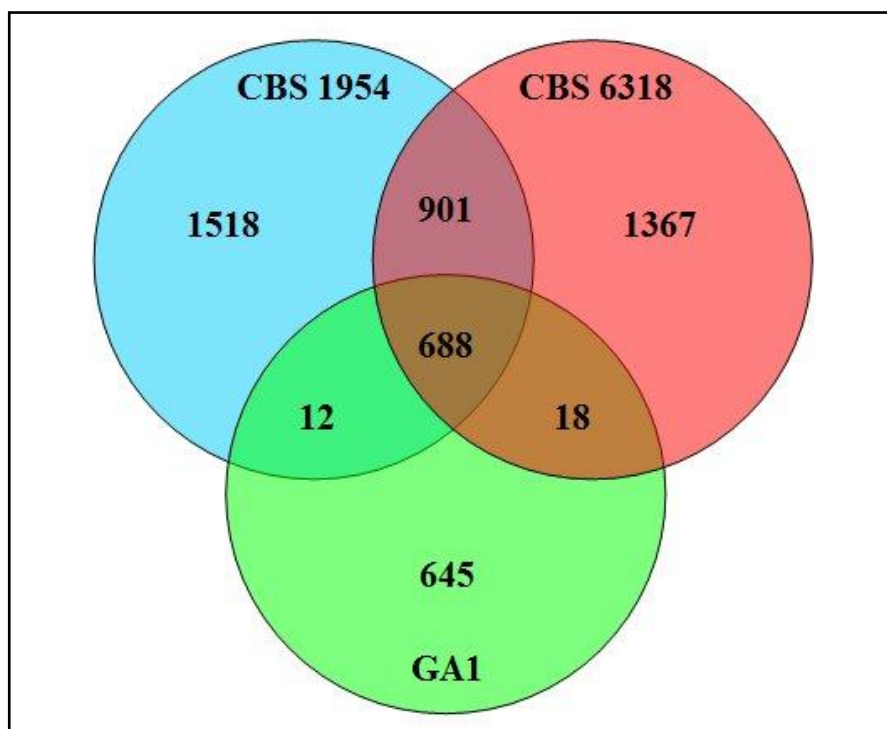
3. táblázat. A CBS 1954, CBS 6318, CDC317 és GA1 *C. parapsilosis* izolátumok teljes genom szekvenálásának és szekvenciájának statisztikai adatainak összehasonlítása a szekvenálás módszere, a leolvasások száma, a genom szekvenálás mélysége, az összeillesztett "scaffold"-ok, a genomméret, a heterozigotikus régiók valamint a meghatározott gének számának szempontjából.

Törzs	Módszer	Read-ek száma (millió)	Mélység (x)	Scaffold	Haploid genomméret	Heterozigotikus Régiók (%)	Gének száma
CBS 1954	76bp; GAIIX; paired @ 300bp	87,51	510	61	13,107 Mb	0,00637	5665
CBS 6318	76bp; GAIIX; paired @ 300bp	42,45	248	50	13,138 Mb	0,00457	6293
GA1	96bp; HiSeq; paired @ 600bp	36,51	269	55	13,089 Mb	0,00717	6227
CDC317	Sanger	0,23	12	8	13,030 Mb	0,01576	5836

Mind a négy genomban megtalálható a két baktérium eredetű gén a prolin racemáz és a fenazin bioszintézisben szerepet játszó *PhzF* gén. Ez arra enged következtetni, hogy ezek az összehasonlításunkba bevont törzsek elkülönülése előtt váltak az élesztő genom részévé. Az említett gének erőteljesen konzerváltak, csupán egyetlen nukleotid eltérést (szinoním mutációt) sikerült azonosítanunk a GA1 törzsben. A négy izolátum között azonosított genomi eltérések SNP-ken kívül, kromoszóma mutációkban és ennek folyományaként génkópiaszám különbségekben mutatkoznak meg.

6.3.4. SNP-k és eloszlásuk, a rekombinációs események nyomai

Az összehasonlító analízis első lépéseként SNP-k azonosítását tűztük ki célul. Ezek megbízható detektálásához az ún. „read mapping” stratégiát alkalmaztuk. Ennek nyomán összesen 5.147, magas támogatottsági értékű pontmutációt definiáltunk a referencia CDC317 törzshöz képest. Ezekből a CBS 1954, CBS 6318 és GA1 izolátumokban rendre 3.119, 2.972 és 1.361 SNP-t találtunk, amelyek eloszlását a 19. ábra szemlélteti.



19. ábra. A „read mapping” stratégiával azonosított pontmutációk eloszlása a CBS 1954, CBS 6318 és CDC317 izolátumokban a referencia CDC317 genomhoz képest.

A pontmutációk sűrűsége törzsenként változó, $\sim 0,1 - 0,25/\text{Kb}$ tartományban helyezkedik el. Ez a GA1 jelű törzsben adódott a legkisebbnek $0,095/\text{Kb}$ értékkel, ami átlagosan 10.517 nukleotidonként jelent egy eltérést. A CBS 1954 és CBS 6318 törzsekben ezek hozzávetőlegesen kétszer gyakrabban, rendre átlagosan $4,024 (0,248/\text{Kb})$ és $4,306 (0,232/\text{Kb})$ nukleotidonként fordulnak elő. A pontmutációk eloszlása a genomokban nem homogén. Összesen 176 darab olyan 200 bp-os régiót (variációs forrópontot) azonosítottunk, amelyeken belül legalább három pontmutáció közvetlenül egymás mellett helyezkedik el. Az értékeket izolátumonként külön-külön megvizsgálva azt tapasztaltuk, hogy CBS 1954 esetében 341 SNP 88 régión, CBS 6318 esetében 341 SNP 78 régión és GA1 esetében 34 SNP 10 régión oszlik meg. Egy három SNP-t hordozó 200 bp-os szakasz előfordulási valószínűsége még a legnagyobb mutációs gyakorisággal jellemzett CBS 1954 jelű törzsben is csupán 2×10^{-5} -nek adódik (Poisson-eloszlás alapján kalkulálva). Kiindulva abból, hogy az SNP-k kialakulása véletlenszerű esemény, akkor ebben a törzsben mindössze egyetlen olyan 200 bp kiterjedésű régiót feltételeznénk, amelyet legalább három egymást követő SNP jellemez. Ennek ellenére az *in silico* vizsgálatok során összesen 88 ilyen tulajdonságú mutációs forrópontot azonosítottunk. Ez a felismerés valószínűsíti, hogy a szóban forgó régiók az általunk vizsgált törzsekben tapasztalt nagy arányú előfordulása nem véletlenszerű esemény következménye.

Az anomália egyik lehetséges magyarázataként rekombinációs folyamatok szolgálhatnak. A hipotézis igazolására bioinformatikai eszközök segítségével a jelenség nyomai után kutatva elvégeztük az összeillesztett teljes genom szekvenciák analízisét. Ennek során a mutációs forrópontok alapján összesen 20 lehetséges rekombinációs eseményt azonosítottunk, amelyek 5 kromoszómára terjedtek ki. Ezek közül rendre 3, 5, 3, 2 és 7 esemény a HE605203, HE605204, HE605206, HE605207 és HE605209 kromoszómákhoz köthető. Az elemzés során fény derült arra, hogy a 20 rekombinációs eseményből 12 esetben az érintett DNS szakasz a 176 variációs forrópontból 51-gyel átfedést mutat. Ez arra enged következtetni, hogy ha nem is kizárólagosan, de részben rekombinációs események működhetnek közre az említett mintázat kialakulásában.

6.3.5. Kromoszóma mutációk: duplikációk

A kromoszóma mutációk azonosításához az általunk vizsgált három törzs szekvenálása során meghatározott leolvasásokat térképeztük a referencia törzs szekvenciájára. Az elemzés során szignifikánsan alacsony ($\log_2 < -0,75$) vagy magas ($\log_2 > 0,75$) átfedések és nem konzisztens leolvasás párok után kutatva összesen 40 potenciális kromoszóma mutációt írtunk le. Ezek jósolt méretét, eloszlását, jellemzőit továbbá a molekuláris validációra kiválasztott régiókat (lásd később) a 13. számú melléklet összesíti.

A kromoszóma mutációk kisebb hányada duplikációs eseményeket takar. Ezekből ötöt azonosítottunk, amelyek mindegyike fehérje kódoló régiót érint. Ezek közül a DUP#4 csak az európai törzsekre (CBS 1954 és GA1) jellemző, és érdekessége, hogy az érintett DNS szakasz határoló régiói is identikusak, ami arra utal, hogy a mutáció létrejötté megelőzte a két törzs szétválásának időpontját. Egnél több törzsre jellemző duplikációk ezen kívül is előfordultak, de úgy tűnik, hogy azok független események következményei. Ezek közül az *ARR3* gént érintő DUP#5 pusztán az *in silico* eredményeink alapján különösen érdekes okfejtéshez vezetett. Az *ARR3* gén egy *S. cerevisiae*-ben azonosított, sejtmembránhoz kötött arzenit transzportert kódol, amely ebben a fajban az arzenit ionnal szembeni rezisztenciáért felel (Maciaszczyk-Dziubinska és mtsi, 2010). Figyelembe véve, hogy az említett ion toxikus így feltételezhető, hogy mennyisége a természetben magasabb, az emberi szervezetben alacsonyabb. Ebből adódik, hogy az *ARR3*-ra ható szelekciós nyomás alapvetően a természetben és nem a gazdában jelentkezik. A gazda által biztosított környezethez szélsőségesen alkalmazkodott *C. albicans* genomjában, 52 teljes genom elemzése alapján, három *ARR3* gén azonosítható (Dr. Toni Gabaldón, személyes konzultáció). Ezzel szemben az általunk vizsgált *C. parapsilosis* izolátumokban az említett gén 6-10 kópiában van jelen. A *C.*

parapsilosis tehát, annak ellenére, hogy a *C. albicans* után a szisztémás candidiázis második leggyakoribb kiváltója, még a természetben való fennmaradáshoz szükséges genetikai mintázatot is hordozza. A CDC317 és GA1 izolátumokban az említett gének kópiaszáma és a gének környező szekvenciáinak *in silico* vizsgálata arra enged következtetni, hogy a két klinikai törzsben különböző gének duplikációja vezetett a géncsalád expanziójához.

6.3.6. Kromoszóma mutációk: deléciók

A kromoszóma mutációk döntő hányadát (35-öt) deléciók teszik ki, amelyek mérete 17 bp – 23,5 kb-os méretek között változik, többségük a ~ 2 kb-os tartományba esik. Néhányuk több törzsre is jellemző, a nagy részük azonban egy adott izolátumra specifikus. Bioinformatikai módszerekkel öt deléciót heterozigotikusként határoztunk meg. A deléciók többsége (31) fehérje kódoló gént érint, és közülük 18 valószínűsíthetően génfüzióhoz vezetett. Ezek között azonosítottuk azokat, amelyek az *ALS* gének törzsenként eltérő eloszlásáért tehetők felelőssé. Az *in silico* vizsgálatok a korábban PCR eljárással meghatározott állapottól eltérő eloszlást tártak fel. Ennek értelmében a referencia genomot az *ALS* géncsalád öt (CpAG_00368, CpAG_00369, CpAG_05054, CpAG_05056, CpAG_05314), a CBS 1954-at egy (CpAG_00368), a CBS 6318-at három (CpAG_00368, CpAG_05054, CpAG_05314), a GA1-et szintén egy (CpAG_05314) tagja jellemez.

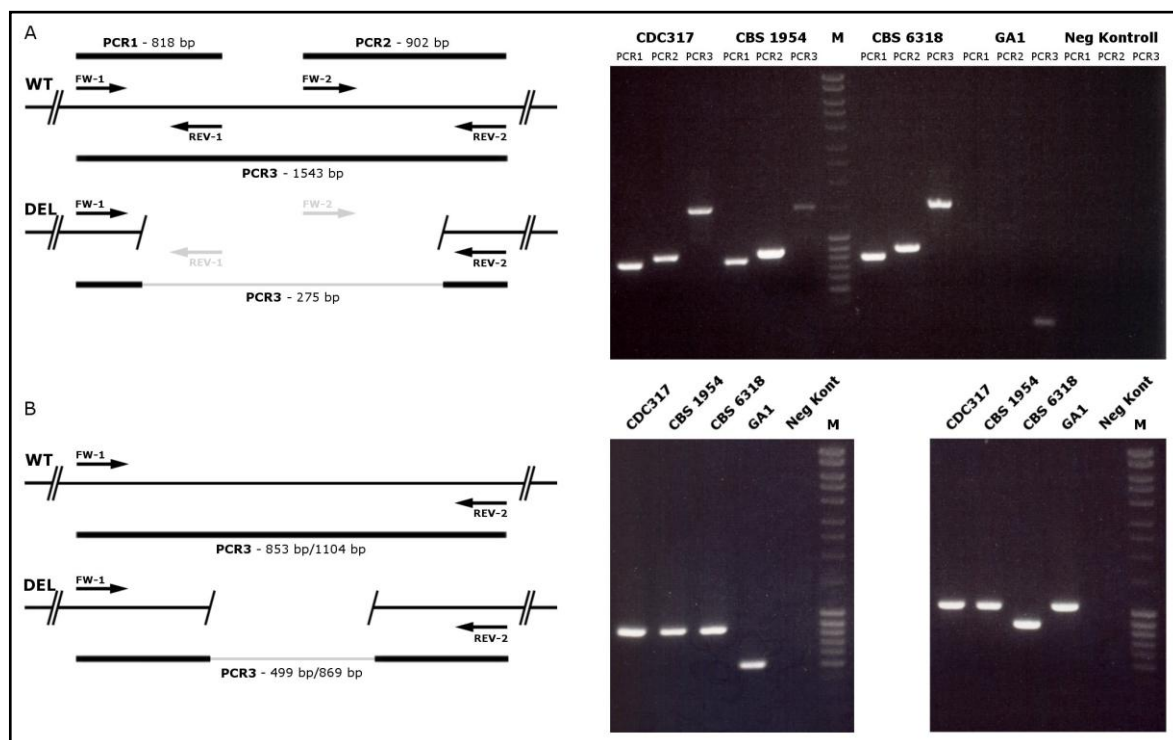
Az *ALS* gének és környező régiók részletes *in silico* összehasonlítása során a közelmúltban végbemenő génkonverzióra utaló mintázatokra derült fény. Hogy a feltételezést bizonyítani tudjuk, összesen kilenc bioinformatikai eljárással vizsgáltuk meg az *ALS* gének és a környező szekvenciáik szerveződését rekombinációs események nyomai után kutatva. Ennek eredményeként két olyan régiót is azonosítottunk, amelyek létrejöttében nagy valószínűséggel rekombinációs folyamatok játszottak szerepet (a kilencből hét módszer támasztotta alá). Ez 760 bp kiterjedésben a CpAG_05056 és 280 bp-os szakaszon a CpAG_00369 géneket érintették. A módszerek további öt további rekombinációs eseményt is valószínűsítettek, de ezek támogatottsága alacsonyabb (a kilencből 4-6 módszer támasztotta alá). Mindezek ismeretében az *ALS* géncsalád tagjainak törzsenkénti eloszlására tehát nagyfokú változatosság jellemző, továbbá újabb bizonyítékaul szolgálnak a *C. parapsilosis*-ban végbemenő rekombinációs eseményeknek.

Az általunk vizsgált izolátumok *in silico* analízise során egy deléciós esemény következtében kialakult génfüzió nyomait is azonosítottuk a CBS 1954 jelű törzsben. A ~ 6,8 kb kiterjedésű régió eltűnése (DEL#31) a CpAG_01377 és CpAG_01379 gének "in-frame" fúzióját eredményezte. Az upstream szakasz egy hifa-regulált sejtfal fehérje N-terminális

domain-jét valamint PT (Prolin-Treonin) ismétlődéseket kódol. A downstream régió szekvenciája azonban egyetlen annotált domain-nel sem mutat hasonlóságot.

6.3.7. A deléciók kísérletes igazolása: PCR stratégia

Az *in silico* eljárásokkal meghatározott kromoszómális eltéréseket különböző molekuláris technikák segítségével szándékoztunk igazolni. A 35 delécióból összesen 20-at választottunk ki kísérletes igazolásra. Ezeket először méretük szerint két csoportra osztottuk az alapján, hogy nagyobbak vagy kisebbek, mint 1 kb. A nagy méretű régiók (8 darab) teljes validálása 4 primert igényelt, amelyeket párokba rendezve 3 PCR-ben alkalmaztunk, míg a rövidebb deléciókhoz (12 darab) egyetlen primerpárt használtunk. Az *in silico* módszerekkel azonosított deléciók határoló szekvenciáit a referencia genomra (CDC317) illesztve kijelöltük a deléciók upstream és downstream töréspontjait. Mivel az alkalmazott NGS eljárások (jelenleg még) nem teszik lehetővé a töréspontok nukleotid pontosságú azonosítását, a primereket a töréspontoktól legalább 50-50 bp távolságra kellett terveznünk. Stratégiánk pozitív és negatív igazoló PCR-eket alkalmazott. A FW-1 és REV-1 primerekkel összemért PCR1 reakció a deléció upstream töréspontja körüli régiót amplifikálja. A FW-1 primer a törésponttól upstream, a REV-1 primer attól downstream irányban helyezkedik el. Mivel a REV-1 primer a két töréspont közötti régióra specifikus (deléció területe), ezért ennek komplementer régiója a deléciós törzsből hiányzik, emiatt a PCR1 során csak a vad típusú templát DNS-ről képződhet fragmentum. A PCR1 tehát a deléció upstream régióját validálja, pozitívan a vad típus, negatívan a mutáns törzs esetén. A PCR2 elve teljesen analóg a PCR1-gyel, azzal a különbséggel, hogy a PCR-2 a deléció downstream régióját validálja, emiatt a primerek szerepe fordított. Ez esetben ugyanis a FOR-2 primer a downstream törésponttól upstream - (deléció helye), a REV-2 primer pedig a törésponttól downstream régióval komplementer. A PCR1-hez hasonlóan ez a reakció is csak vad típusú templátról képes terméket amplifikálni. A PCR3-ban a FW-1 és REV-2 primereket alkalmaztuk. Ez az elrendezés biztosan ad fragmentumot egy a deléciós törzs templát DNS-ét tartalmazó reakcióban, hiszen mindkét primer a töréspontokon kívül elhelyezkedő szakaszra specifikus. A vad típusú templátról vagy nem képződik fragmentum (ha túlságosan nagy kiterjedésű a deléció) vagy ha mégis, akkor az bizonyosan nagyobb, mint a deléciós törzs PCR3 amplikonja, és a kettő mérete közötti különbség a deléció méretével egyenlő. A kisebb méretű deléciók igazolása során PCR1 és PCR2 körülményeket nem, kizárólag a PCR3 konfigurációt alkalmaztuk. A négy törzs 3-3 (1-1) reakciójából származó fragmentumokat egyetlen agaróz gélen ellenőrizve, a mintázat alapján az *in silico* eredmények igazolhatók (20. ábra).

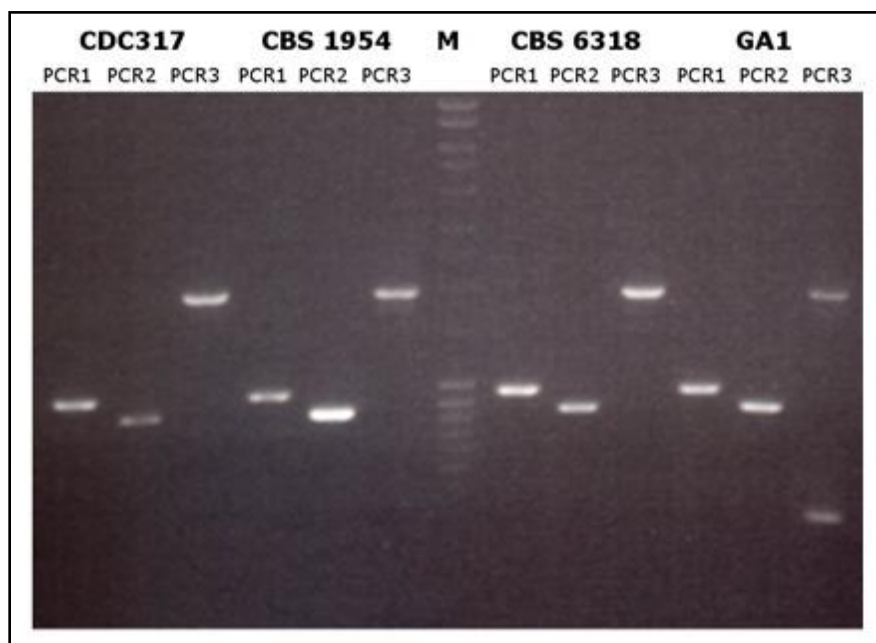


20. ábra. Az ábra egy 1 kb-nál nagyobb (A) és egy annál kisebb (B) deléció kísérletes igazolását mutatja be. Bal oldalon az *in silico* azonosított deléciók igazolására kidolgozott PCR stratégia vázlata, jobb oldalon az ennek alkalmazásával kapott fragmentum mintázat látható. Részletes magyarázat a szövegben. M: MassRuler DNA Ladder Mix 80-10.000 bp (Fermentas).

A további régiók kísérletes bizonyításáról készült gélképeket a 14. számú melléklet tartalmazza. A bioinformatikai vizsgálatok a DEL#18, DEL#19 és DEL#20 régiókat is heterozigotikusként azonosították a CDC317-ben. Ezt a PCR alapú validáció azonban csak a DEL#19 és DEL#20 esetében támasztotta alá. A 34 bp kiterjedésű deléció (DEL#18) valószínűleg a referencia genom összeillesztése során vétett hibának köszönhető. A DEL#20 esetében igazoltuk a heterozigotizást a referencia törzsben, továbbá egy a kizárólag környezeti izolátumokra jellemző kis méretű deléciót is azonosítottunk.

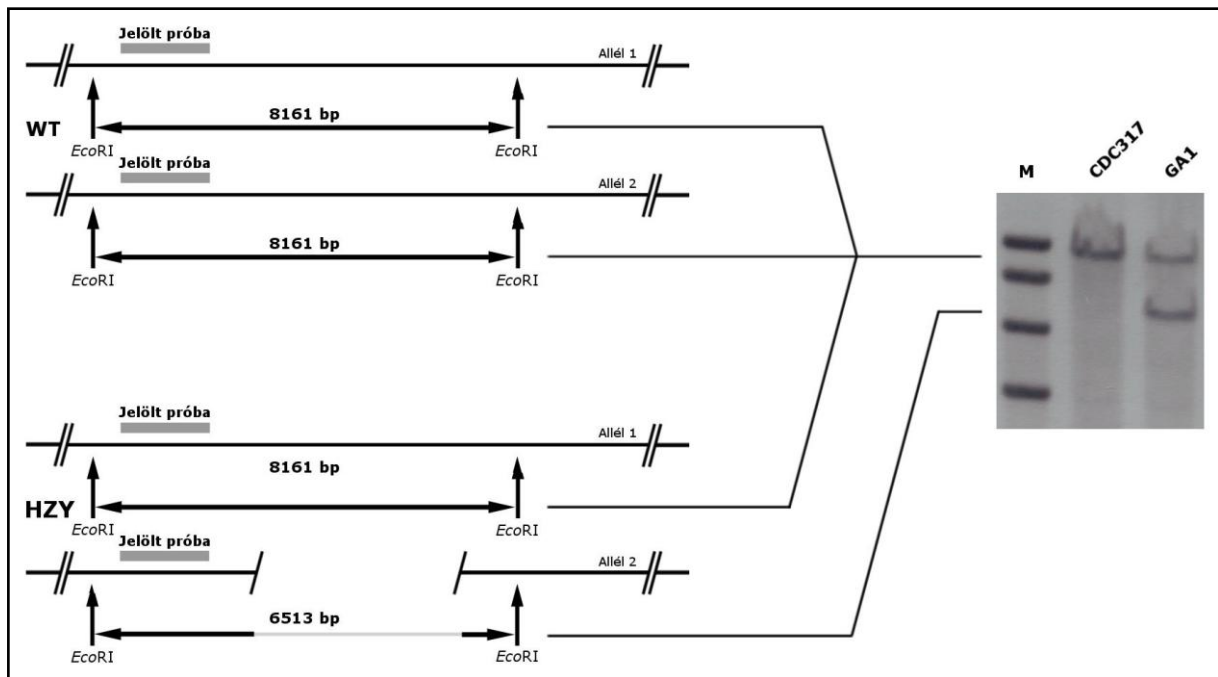
6.3.8. A deléciók kísérletes igazolása: Southern hibridizáció

A heterozigotikus régiók egyértelmű bizonyítása pusztán ezzel a stratégiával nem volt lehetséges, ugyanis ez esetben egyetlen genom hordozza a vad típusú és a mutáns DNS szakaszt is, így a PCR3 során két fragmentum amplifikálódik (21. ábra).



21. ábra. A gélfoto a GA1-re jellemző DEL#5 PCR validációjáról készült. A GA1 templátról a PCR1 és PCR2 során egy-egy a PCR3 alkalmával két amplikon szintetizálódik. Ennek oka, hogy ebben a törzsben az érintett régió heterozigotikus, vagyis a vad típusú és a deléció allél is jelen van a genomban. M: MassRuler DNA Ladder Mix 80-10.000 bp (Fermentas).

Hogy az *in silico* eredményeket a kiterjedt heterozigotikus régiók (DEL#3 – GA1, és DEL#5 – GA1) esetében is kísérletesen alá tudjuk támasztani Southern hibridizációs stratégiát dolgoztunk ki, amelynek logikáját a GA1 törzsben azonosított 1640 bp kiterjedésű DEL#5 példája szemlélteti. Az eljárás lényege, hogy a genomi DNS emésztésére használt restrikciós endonukleáz olyan fragmentumokat eredményezzen, amelyekkel differenciálni lehet a két allél között, és kellőképpen elkülönülnek egymástól a gélelektroforézis során. A fenti szempontokat figyelembe véve a DEL#5 heterozigotikus régió esetében az *EcoRI* enzim bizonyult a legmegfelelőbbnek. Mivel a CDC317 referencia genom homológ kromoszómái az adott régió vonatkozásában azonosak, ezért ekkor csak egyféle méretű fragmentum keletkezhet. Ezzel szemben a GA1 törzs esetében az egyik allél a vad típusú a másik azonban a rövidebb allélt hordozza, tehát az emésztés eredményeként két eltérő méretű fragmentumnak kell létrejönnie. Ezek mérete közötti különbség értelemszerűen megegyezik a deléció méretével. A stratégia elvét és a kapott eredményeket a 22. ábra mutatja be. A Southern hibridizáció eredményéről készült teljes méretű felvételt a 15. számú melléklet tartalmazza.

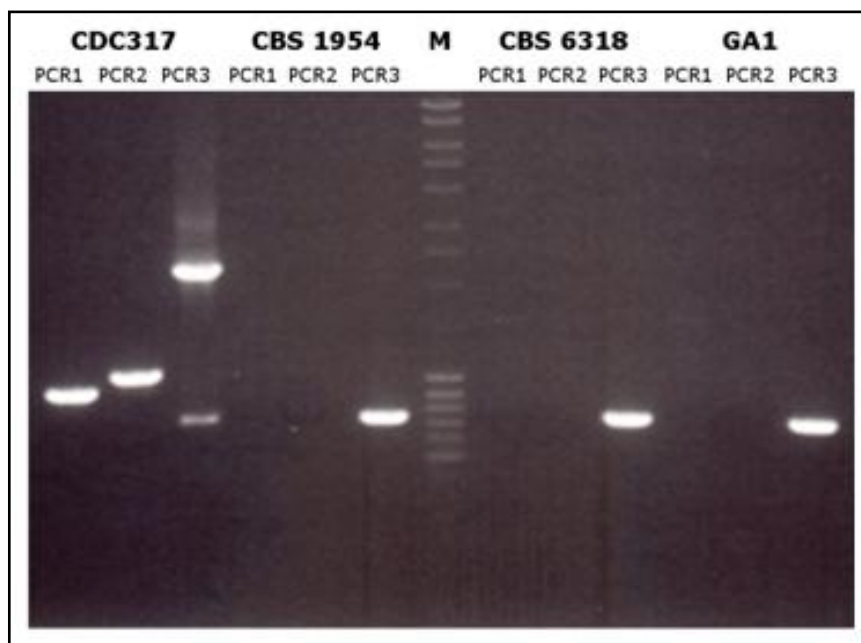


22. ábra. A DEL#5 heterozigotikus régió kísérletes igazolása Southern hibridizációval. Bal oldalon a stratégia vázlata látható a vad típus (WT) és a heterozigotikus törzs (HZY) vonatkozásában. A jobb oldali fotó a heterozigotikus régiót bizonyító Southern hibridizáció eredményét ábrázolja. M: Roche DIG-labeled DNA Molecular Weight Marker VII.

A DEL#5 heterozigotikus régió validálása az alkalmazott Southern hibridizáció révén sikerrel járt. A szintén heterozigotikus, GA1-ben detektált DEL#3 régió azonban pontosan a vad típusú fragmentum mintázatot eredményezte, amely téves *in silico* meghatározást valószínűsít (15. számú melléklet).

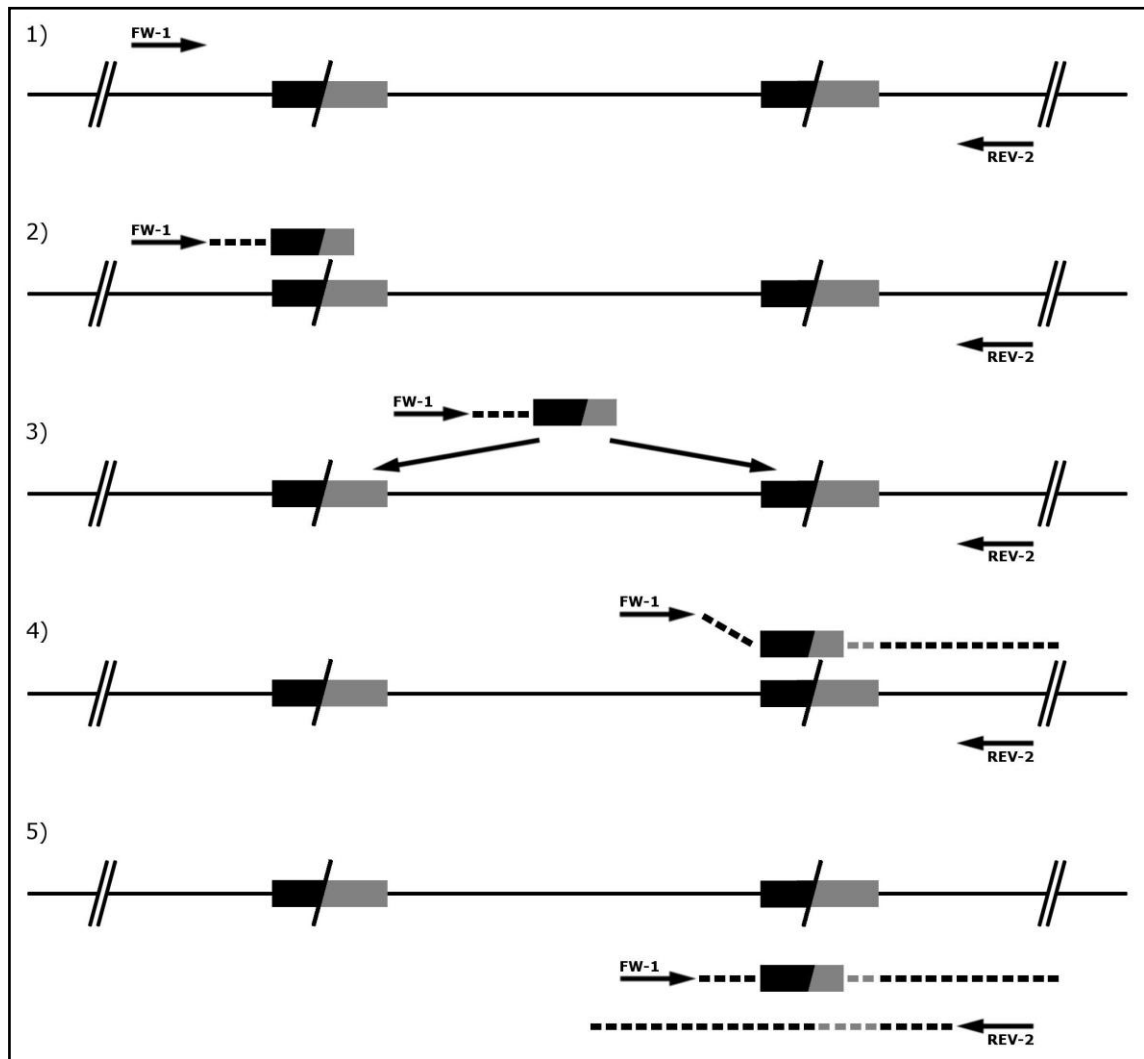
6.3.9. PCR validálás során képződő aspecifikus termékek

Két esetben (DEL#1 és DEL#6) a gélfotók a vad típusú mintákban heterozigotikus állapotot tükröztek, ugyanakkor ezt az *in silico* vizsgálatok nem jelezték. A DEL#1 a GA1 törzsre, a DEL#6 a CBS 1954, CBS 6318 és GA1 törzsekre jellemző. Mivel a DEL#1 túl nagy kiterjedésű (~ 23,5 kb) ezért a vad típusokra kalkulált ~ 24,1 kb méretű PCR3 fragmentum egyetlen törzsnél sem jelent meg, azonban valamennyiükénél amplifikálódott egy, a deléciós törzsre jellemző méretű termék. Ugyanezt a jelenséget tapasztaltuk a DEL#6 esetében, ahol mind a 2.308 bp-os vad típusú, mind pedig a 713 bp-os deléciós ampikon azonosítható volt (23. ábra).



23. ábra. DEL#6 igazolása PCR-rel, majd az azt követő gélelektroforézissel. Az említett régiót három törzsben azonosítottuk, a CBS 1954-ben, CBS 6318-ben és a GA1-ben. Annak ellenére, hogy ez a deléció nem heterozigotikus a CDC317-ben, a PCR3 során mégis két fragmentum amplifikálódik. A nagyobbik a vad típusra -, a rövidebb a deléciós törzsre jellemző mérettartományba esik. M: MassRuler DNA Ladder Mix 80-10.000 bp (Fermentas).

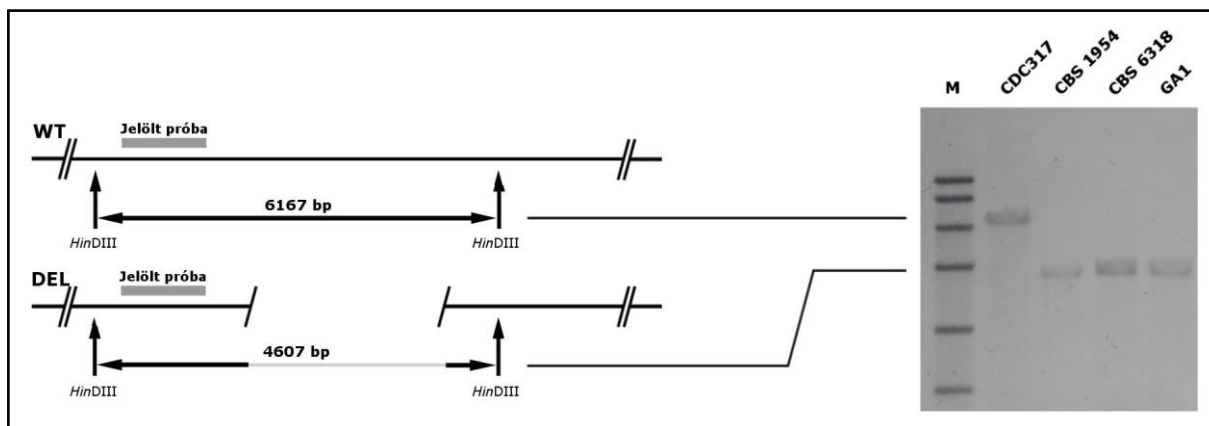
Ezt biztosan nem aspecifikus primer kötődés okozta, hiszen ezek szekvenciája a BLAST analízis szerint egyedi. A probléma magyarázatát az említett szakaszok töréspont körüli sajátos régiójának elemzése adta meg. DEL#1 esetében a két töréspont körüli régió egy 188 nukleotidos szakaszon közel 100%-osan identikus, közöttük mindössze 3 nukleotid eltérés mutatkozik. Ezt a közel 200 bp-os régiót a töréspontok egy 79 nukleotid hosszúságú az aktuális törésponttól upstream, és egy 109 nukleotid méretű downstream részre bontják. A rendelkezésünkre álló információk alapján a jelenség magyarázatára a 24. ábrán bemutatott hipotézist állítottuk fel. A PCR3-ban használt FW-1 és REV-2 primerek kötődési helyei az említett régió kívül helyezkednek el (1). A PCR során valamelyik primerről elinduló reakció nem jut el a szemben lévő primer kötődési helyéig, hanem megakad a duplikálódott régió területén (2). Ez a csonka fragmentum a következő ciklusban a két, közel azonos DNS szakasz bármelyikéhez kötődhet, hiszen a szekvenciájuk közötti eltérés mindössze 3 nukleotid (3). Statisztikusan az esetek 50%-ban a fragmentum a nem megfelelő régióhoz kötődik. A ciklus végére a polimerizáció befejeződik, és kiterjed a szemben lévő primer kötőhelyének területére (4). A következő ciklusban ez a termék templátként szolgálhat az összes további ciklus során, feldúsítva a deléciós fragmentummal megegyező méretű amplikont a vad típusú templát ellenére (5).



24. ábra. A DEL#1 és DEL#6 esetében a vad típusú templátról képződő, de a deléciós törzsre jellemző méretben (is) megjelenő PCR3 amplikon magyarázatának vázlata. Részletes magyarázat a szövegben.

A DEL#6-ra is igazak a DEL#1-gyel kapcsolatos megállapítások, azzal a különbséggel, hogy a homológ szakasz még kiterjedtebb (288 bp) mindössze 4 nukleotid különbséggel, amelyet a töréspontok egy 259 nukleotidos upstream és egy 29 nukleotidos downstream szakaszra bontanak.

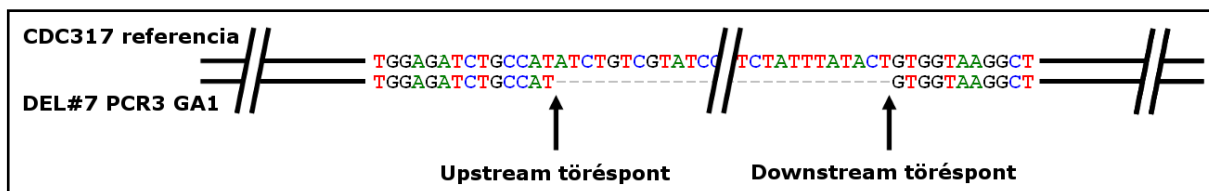
Az *in silico* adatok egyértelmű bizonyítására, és hogy igazoljuk, hogy valóban nem heterozigotizás jelensége áll fenn, ismételten Southern hibridizációs kísérletet végeztünk. A korábban vázolt szempontoknak a DEL#6 esetében a *Hind*III felelt meg a legjobban. A stratégia szerint a vad típust (CDC317) egyetlen 6.167, míg a többi három törzset egy-egy 4.607 bp-os fragmentum reprezentálja (25. ábra). Eredményeink cáfolták a heterozigotikus régió teóriáját, és az *in silico* eredményeket támasztották alá (15. számú melléklet).



25. ábra. A DEL#6 kísérletes igazolása Southern hibridizációval. Bal oldalon a hibridizációs stratégia vázlatos magyarázata látható a vad típus (WT) és a deléciós törzs(ek) (DEL) feltüntetésével. A jobb oldalon az *in silico* eredményeket alátámasztó Southern hibridizáció eredménye került feltüntetésre. M: Roche DIG-labeled DNA Molecular Weight Marker VII.

6.3.10. A deléciók töréspontjainak pontos meghatározása

A PCR technika és gélelektroforézis alkalmazásán kívül a deléciós törzsek PCR3 amplikonjainak pontos nukleotidsorrendjét is meghatároztuk Sanger eljárás segítségével. Az így kapott szekvenciákat a referencia CDC317 genomra illesztettük. A deléciók töréspontjait így nukleotid pontossággal meg tudtuk határozni, kiegészítve ezzel az *in silico* analízis és a PCR alapú validáció eredményeit (26. ábra).

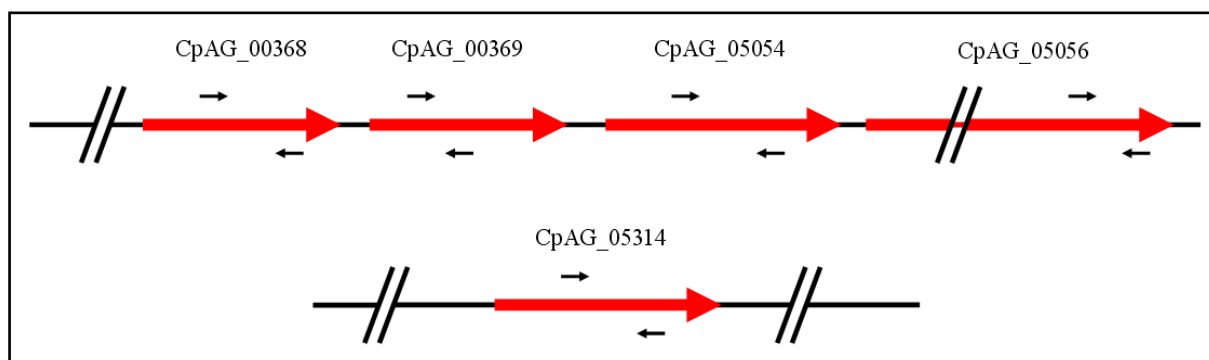


26. ábra. A deléciók töréspontjainak nukleotid pontosságú meghatározása a PCR3 fragmentumok szekvenciáinak ismeretében. Az ábra a GA1-ben azonosított DEL#7 példáját mutatja be.

A húsz, molekuláris eszközökkel vizsgált deléció közül tíz esetben tudtunk a töréspontokat lefedő méretű szekvenciához jutni. A további tíz régió Sanger szekvenálása technikai problémákba ütközött, valószínűleg az amplikonok másodlagos struktúrája okozott problémát. Az elégséges hosszúságú szekvenciák analízise során valamennyi deléció esetében a töréspontok körül 8-835 bp kiterjedésű „direct repeat”-eket azonosítottunk. Ezek a molekuláris nyomok „single-strand annealing” (SSA) DNS javító mechanizmusra utalnak, amely a DNS mindkét szálának törését követően aktiválódik.

6.3.11. Az ALS gének *in silico* analízis és PCR alapján kapott eltérő eloszlásának magyarázata

Az ALS gének törzsenkénti eloszlásának vizsgálatakor PCR segítségével kettő (CpAG_05056 és CpAG_05314), az *in silico* analízis során viszont csak egy (CpAG_05314) gént mutattunk ki a GA1 jelű törzsben. Az ellentét feloldására a következő magyarázatot találtuk. Az ALS gének a referencia genomban a CpAG_05314 kivételével egyetlen kromoszómaszakaszon helyezkednek el, tandem egymást követően. Ezek sorrendiségét és a kimutatásukra tervezett primerpárok hozzávetőleges kötődési helyét a 27. ábra mutatja be.



27. ábra. A *C. parapsilosis* jelenleg ismert öt ALS génjének eloszlásának, méretének és a primerek kötőhelyének sematikus vázlata a CDC317 referencia genomban. A CpAG_00368, CpAG_00369, CpAG_05054 és CpAG_05056 gének tandem egymás után helyezkednek el. A CpAG_05314 egy ezekről különböző régióra illeszkedik.

A GA1 törzsben tandem elhelyezkedő négy ALS gén a legnagyobb (23.475 bp kiterjedésű régiót érintő) deléciós esemény (DEL#1) révén tűnt el a GA1 genomból. Az upstream töréspont a CpAG_00368 géntől upstream helyezkedik el. A downstream töréspont ugyanakkor két (391 bp-os és 3.761 bp-os) részre hasítja a CpAG_05056 gént. A delécióval tehát a teljes CpAG_00368, a teljes CpAG_00369, a teljes CpAG_05054 és a CpAG_05056 gén upstream régiója eltűnt. Mivel a gén a start kodont és a cisz-szabályozó elemeit veszítette el, ezért bizonyos, hogy a CpAG_05056 génről transzkript nem képződik, emiatt az *in silico* elemzés alapján tett megállapítás, miszerint mind a négy gén, legalábbis funkcionális értelemben, hiányzik a GA1 genomból, helytálló. Tekintettel arra, hogy a CpAG_05056-re tervezett primerpár, a gén upstream régiójára jellemző repetitív szekvenciák miatt, a gén downstream területére specifikus, (ami a deléción kívül helyezkedik el,) magyarázatot kapunk arra, hogy a PCR technikával végzett analízis során miért jelenik meg a CpAG_05056 jelenlétére utaló fragmentum is a deléciós GA1 templát ellenére (26. ábra).

6.3.12. *C. parapsilosis* izolátumok összehasonlító genomikai analízise: összefoglalás/értékelés

Projektünk keretein belül négy, különböző forrásból származó *C. parapsilosis* törzs összehasonlító genomikai analízisét végeztük el. A szükséges technikai háttér hiányában a bioinformatikai műveleteket a CRG Komparatív genomikai csoportjával szoros kollaborációban, közösen végeztük. A vizsgált törzsek közül kettő (CBS 1954 és CBS 6318) „környezeti”, kettő (a referencia törzs CDC317 és GA1) pedig klinikai izolátum. Ezek között a törzsek között korábbi vizsgálataink során virulenciabeli és genetikai különbségeket figyeltünk meg. Hogy a tapasztalt eltérések részletes molekuláris hátterét feltárjuk a CBS 1954, CBS 6318 és GA1 törzsek teljes genom szekvenciájának meghatározása és a CDC317 referencia törzshöz való hasonlítása mellett döntöttünk.

Az elemzések alapján 5.147 pontmutációt, 35 deléciót és 5 duplikációs eseményt azonosítottunk. A pontmutációk száma és eloszlása nem egységes a négy törzs között, továbbá a genomokban olyan régiókat azonosítottunk, ahol kiemelten magas arányban fordulnak elő. Az *in silico* analízis szerint ennek egyik oka a múltban végbement rekombinációs események lehetnek. Hasonló megállapításra vezetett az *ALS* gének környező régióinak analízise, ezzel két bizonyítékot is szolgáltatva az említett folyamatra. Ez a felismerés példaértékű, ugyanis ebben a fajban rekombinációra utaló mintázatot korábban egyetlen kutatócsoport sem azonosított.

Megállapítottuk, hogy a harmincöt, bioinformatikai módszerekkel meghatározott deléció mérete 17-23.475 bp-ig terjed. Ezek legtöbbje egyetlen törzsre jellemző. Közöttük azonosítottuk azokat, amelyek az *ALS* géncsalád tagjainak eltérő eloszlásáért felelnek a különböző izolátumokban. 31 deléció fehérje kódoló régiót érint, 18 deléció génfúziót eredményezett. A harmincöt deléció közül húszat kísérletes validációra választottunk ki, amelyet molekuláris technikákkal (PCR, gélelektroforézis, Sanger szekvenálás és Southern hibridizáció) hajtottunk végre. A kidolgozott stratégiák segítségével a 20 régióból 19-et egyértelműen alátámasztottunk PCR-rel, Sanger szekvenálással, Southern hibridizációval vagy ezek kombinációjával. Az alkalmazott módszerek az öt heterozigotikusként meghatározott régió (DEL#3, DEL#5, DEL#18, DEL#19 és DEL#20) közül három (DEL#5, DEL#19 és DEL#20) esetében igazolták az *in silico* eredményeket. A referencia törzsben heterozigotikusként azonosított DEL#18 a genom összeillesztése során vétett hibának köszönhető. A GA1-re jellemző heterozigotikus DEL#3 bizonyítása egyik módszerrel sem járt sikerrel. Bár a PCR termékek eloszlásában van különbség, a reakciók során több aspecifikus fragmentum is képződik. A DEL#17 a CBS 1954 izolátumra jellemző, amelynek PCR alapú

igazolása sikerrel járt ugyan, de az érintett régióra tervezett primerpár a CBS 6318 esetében a várt vad típusú amplikon ellenére, semmilyen terméket nem eredményezett. Ennek oka, hogy ebben a törzsben egy a DEL#17-tel átfedő nagyobb kiterjedésű deléció található. Annak ellenére, hogy a PCR-ek fragmentum mintázata egy kivétellel egyértelműen alátámasztotta az *in silico* eredményeket, a deléciós törzsek PCR3 fragmentumainak Sanger szekvenálása a 20-ból csupán 10 esetben szolgáltatott elégséges adatot, valószínűleg a fragmentumok bonyolult másodlagos struktúrája miatt. Ezek elemzése során a töréspontok körül azonosított repetitív szakaszok megléte „single-stranded annealing” DNS javító mechanizmusra utalnak.

Az *in silico* adatok ilyen jellegű ellenőrzése újkeletű, korábban ilyen részletesen senki sem támasztotta alá a bioinformatikai módszerek helyességét. Hogy ennek mégis van létjogosultsága, azt a DEL#20 esete igazolja. Ennek kapcsán ugyanis egy kizárólag a környezeti izolátumokra jellemző kisméretű deléciót azonosítottunk. Ez a felismerés nyomatékosítja az *in silico* eredmények kísérletes bizonyításának fontosságát, továbbá ez a régió a közeljövőben indikátoraként szolgálhat a hasonló analízisek paramétereinek optimalizálásában. A DEL#20 a CPAR2_503240 (CPAG_03508) és CPAR2_503250 (CPAG_03509) gének között helyezkedik el. A gének orientációja ellentétes, és 386 bp távolságra vannak egymástól. A deléció tehát kódoló szekvenciát nem érint, de a gének működésére, a promóter szekvenciák módosítása miatt, lehet hatása. *S. cerevisiae*-ben a CPAR2_503240 és CPAR2_503250 gének ortológjai rendre a foszfolipáz D regulációjában szerepet játszó fehérjét (Kennedy és mtsi, 2011), illetve egy mitokondriális elhelyezkedésű K^+/H^+ antiportert kódolnak (Zotova és mtsi, 2010).

A két klinikai izolátumban az *ARR3* gének illetve környező régióik kiterjedése, a határoló régiók felépítésének, szerveződésének, szekvenciájának és orientációjának *in silico* analízise alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy az *ARR3* géncsalád expanszióját izolátumonként eltérő gének duplikációja eredményezte. Ez a felismerés felveti annak a lehetőségét, hogy a gének jelen eloszlásának hátterében álló kromoszóma átrendeződések még a humán gazdára kerülés előtt végbemehettek, hiszen a gazdában megszűnik (jóval kisebb) az arzenit transzportot érintő szelekciós nyomás. Ha ez így van, akkor ebből következhet, hogy a *C. parapsilosis* az evolúció során egynél többször kerülhetett a természetes környezetből a gazdaszervezetre, amely ellentétes a jelenleg uralkodó nézettel, miszerint a kórokozó *C. parapsilosis* törzsek klonális eredetűek.

Az általunk elvégzett struktúrális genomikai analízis eredményei egybevágóan azokkal a szakirodalmi adatokkal, amelyek alapján jelenleg a *C. parapsilosis* a *C. albicans*-hoz képest elhelyezhető a természetes környezetből a emberi gazdához való adaptáció útján.

A *C. albicans* szélsőségesen alkalmazkodott az emberi szervezet által biztosított környezethez. Ennek a gének szintjén megnyilvánuló bizonyítéka a *SAP*, a *LIP* és az *ALS* gének expanziója, amelyekből *C. albicans*-ban rendre 10, 10 és 8 kópia van jelen. Ezek közül több virulencia faktorként került azonosításra (Hoyer és mtsi, 2008; Naglik és mtsi, 2003; Schaller és mtsi, 2005). A számos tagot számláló géncsaládok mellett az alkalmazkodás eszközei többek között a sejtfal β -glükán elemeinek mannánnal való elrejtése (McKenzie és mtsi, 2010), a komplement negatív regulátoraként ismert H-faktor kötése (Meri és mtsi, 2002), a fagoszóma-lizoszóma fúzió gátlása (Fernandez-Arenas és mtsi, 2009) és az élesztő-hifa átmenet jelensége (Lo és mtsi, 1997). A *C. parapsilosis*-ban az említett géncsaládok jelen vannak, de alacsonyabb kópiaszámban. Szekretált lipázokból kettő (Gacser és mtsi, 2007c), szekretált savas proteínázokból három található a genomban (Hruskova-Heidingsfeldova és mtsi, 2009), amely közül az egyik (*SAP1*) duplikáción esett át (Horvath és mtsi, 2012). A két gén nukleotid sorrendje teljesen azonos, amely arra utal, hogy a duplikációs esemény a közelmúltban mehetett végbe. Az *ALS* gének kópiaszáma az általunk vizsgált törzsekben izolátumonként eltér, egy és öt között változik. Munkánk során *C. parapsilosis*-ban az arzenit transzporter gének nagyfokú expanzióját (6-10) állapítottuk meg, amelyről feltételezhetjük, hogy az arzénben gazdagabb környezetben jelent szelekciós előnyt. Az említett géncsalád *C. albicans*-ban is jelen van, de mindössze három kópiában (Dr. Toni Gabaldón, személyes konzultáció). Erre a jelenségre magyarázatot adhat az, hogy mivel az arzenit ion toxikus, ezért az emberi szervezetben nagyon alacsony koncentrációban fordul elő, így az arzenit transzporter génekre ható szelekciós nyomás nem (vagy csak nagyon kis mértékben) érvényesül. Az emberi szervezet által biztosított környezethez szélsőségesen alkalmazkodott *C. albicans* genomja, a virulenciában szerepet játszó gének (*SAP*, *LIP*, *ALS*) expanziójával, és a magas arzenit tartalmú környezethez való alkalmazkodást biztosító *ARR3* gének alacsonyabb kópiaszámával párosul. Ezzel szemben a *C. parapsilosis* genomban (még) nagy kópiaszámban megtalálható az arzenit transzporter génje, de ezzel párhuzamosan azt látjuk, hogy megkezdődött a *SAPP* és *LIP* gének expanziója. Ez a jövőben folytatódhat, megteremtve ezzel a szubsztrátspecifitást, az időbeli kifejeződés, és ezzel a funkció megváltozásának lehetőségét, vagyis azt, hogy ezek az enzimek nem csak a tápanyagok felvételére, hanem az immunrendszer modulálására, és a szövetek, sejtek károsítására is képesek legyenek. A szakirodalmi adatok és a saját munkánk eredményei tehát kiegészítik egymást, és ezek alapján a *C. parapsilosis* genom feldúsulni látszik azokban a faktorokban, amelyek a gazdához való alkalmazkodás eszközeként szolgálhatnak.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

A *Candida* fajok által kiváltott megbetegedések az elmúlt három évtizedben egyre növekvő egészségügyi problémát jelentenek. Bár ezen élesztők többsége az egészséges normál emberi mikrobióta tagja, bizonyos körülmények között a bőrt, nyálkahártyát vagy akár az egész szervezetet érintő szisztémás fertőzéseket képesek kiváltani. A szervtranszplantáción átesettek, elhúzódó szteroid kezelésben részesülők és a HIV fertőzöttek jelentik a legveszélyeztetettebb csoportokat. Az elhúzódó kórházi tartózkodás, nyílt/égési sérülések valamint koraszülött csecsemők körében az alacsony születési súly szintén a rizikófaktorok között szerepel. Gyakran hozhatók összefüggésbe nozokomiális fertőzésekkel. Kiváló adhéziós tulajdonsággal jellemezhetők. Átlagosan minden harmadik egészségügyi dolgozó kezén megtalálhatók, és a vérmintákból negyedik legnagyobb gyakorisággal izolált mikrobaként tartják őket számon. Bár az esetszámok alapján a legnagyobb jelentőségű faj jelenleg még mindig a *C. albicans* (~50%), egyéb, ún. nem-*albicans* fajok (*C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei*) térnyerése napjainkban egyre inkább dominál. Ezek közül különösen a *C. parapsilosis* emelkedik ki, amely érdekes módon elsősorban újszülötteket fertőz. Némely tanulmány szerint a *C. parapsilosis* bizonyos területeken és vizsgált intervallumokban még a *C. albicans* esetszámát is meghaladja. A fajt 2005-ben molekuláris különbségek alapján három csoportra osztották, amely a klinikai relevanciájukat is tükrözi (csökkenő sorrendben): *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis* és *C. metapsilosis*. A három faj közösen a *C. parapsilosis sensu lato* csoportot alkotja. Növekvő egészségügyi jelentősége ellenére igen keveset tudni a *C. parapsilosis* patogenezisééről, virulencia faktorairól, genetikai háttéréről a fertőzés során mutatott viselkedéséről és a kiváltott gazda válasz jellegéről. Ennek okán munkánk kezdetén az alábbi célkitűzéseket tettük: 1.) A gazda - *C. parapsilosis* kölcsönhatás jellemzésére alkalmas *in vitro* modellrendszer kidolgozása és alkalmazása. 2.) az ennek során a gazdában és a gombában bekövetkező transzkripciós változások tanulmányozása, végül 3.) négy *C. parapsilosis* izolátum összehasonlító genomikai analízise. Az említett kérdéskörök vizsgálatának eredményei a következők.

7.1. *In vitro* fertőzések modell kidolgozása egér makrofágok és *C. parapsilosis* kölcsönhatásának tanulmányozására

A J774.2 makrofágok és a *C. parapsilosis* GA1 jelű klinikai izolátum kölcsönhatását áramlási citométer és különböző mikroszkópos technikák segítségével (fluoreszcens,

konfokális fluoreszcens, SEM) követtük nyomon. Megállapítottuk, hogy a fagocitózis a fertőzés 30. percében megkezdődik, és hozzávetőlegesen a harmadik órájában telítési fázist ér el. A fagoszóma-lizoszóma kolokalizáció és ezzel párhuzamosan az élesztők eliminációja a nyolcadik órában következik be.

Tekintettel arra, hogy megfigyelésünk szerint az inkubáció harmadik és nyolcadik órájában történnek a kölcsönhatás sarkalatos eseményei, ezért a fenti időpontokban izolált gazda RNS mintákkal microarray analízist végeztünk. A két időpontban 115 (3 h) és 511 (8 h) gén expressziója tért el szignifikánsan a nem fertőzött kontrollétől. Elsősorban sérülésre adott -, stressz - illetve immunválaszban szerepet játszó gének transzkripció intenzitása emelkedett meg. Az eredmények alátámasztásához hat gén (*CD83*, *IL1 β* , *IL15*, *TNF α* , *TNFRSF9* (transzmembrán fehérje, kostimulációs molekula) és *PTGS-2* (prostaglandin bioszintézisben szerepet játszó citoplazmatikus enzim)) expresszióját vizsgáltuk qRT-PCR-rel. A méréseket az inkubáció 3., 8. és 24. órájában izolált mintákon végeztük el. A relatív expressziókat aktin belső kontrollra normalizáltuk és a nem fertőzött kontrollhoz viszonyítottuk $2^{-\Delta(\Delta Ct)}$ módszerrel. A qRT-PCR eredmények korreláltak a microarray analízis adataival.

TNFRSF9 megemelkedett expressziója egyéb *Candida* törzsekkel (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. metapsilosis*, *C. orthopsilosis*, *C. tropicalis*) történő indukció után is kimutatható volt.

Áramlási citometriás mérések igazolták, hogy *C. parapsilosis* stimulálás hatására nem csak RNS szinten történik indukció, hanem a funkcionális fehérje mennyisége is megemelkedik a makrofágok felszínén.

Az említett gén relatív mennyiségét primer fagocitákban (egér hasüregi - és humán PBMC-kből differenciáltatott makrofágokon) is megvizsgáltuk a GA1 törzs jelenlétében a kölcsönhatás 3., 6., 12. és 24. órájában. Úgy tapasztaltuk, hogy a *TNFRSF9* génről képződő transzkript mennyisége szignifikánsan megemelkedik a nem fertőzött kontrollhoz képest.

7.2. THP-1 humán monociták és a *C. parapsilosis sensu lato* csoport tagjainak *in vitro* kölcsönhatásából származó teljes RNS populáció transzkriptóm analízise

Kísérleteinkben a THP-1 humán monocitákat különböző *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis* és *C. metapsilosis* törzsekkel inkubáltuk, majd meghatároztuk mind a humán, mind az élesztő RNS populációt. Az RNA-seq eljárás alkalmasnak bizonyult a gazda és az élesztő transzkriptómot is tartalmazó RNS minták szimultán analízisére. A szekvenálás során generált nagy mennyiségű adat kiértékelése folyamatban van. A rendelkezésünkre álló információk a következők.

A THP-1 és *C. parapsilosis* CDC317, *C. orthopsilosis* MCO 456 és *C. metapsilosis* PL 429 (három filogenetikailag nagyon közeli mégis egészségügyi vonatkozásukban lényegesen eltérő faj) kölcsönhatásának vonatkozásában meghatároztuk a három élesztő fajban a monociták jelenlétére megemelkedett expressziót mutató géneket és fajonkénti eloszlásukat. Meghatároztuk az ortológ gének eloszlását a három rokon fajban. Az RNA-seq adatok alapján több mint 300 eddig nem ismert transzkriptet azonosítottunk *C. parapsilosis*-ban. Úgy találtuk, hogy a *C. metapsilosis* (evolúciós léptékben) a közelmúltban teljes genom duplikáción ment keresztül. Technikai problémák miatt (a gomba transzkriptóm elfedte a humán RNS populációt) a fagocitákban bekövetkező változásokról jelenleg nincsen információnk.

A két klinikai (CDC317 és GA1) és két környezeti (CBS 1954 és CBS 6318) *C. parapsilosis* izolátum THP-1 sejtekkel való kölcsönhatásának vizsgálatát a teljes élesztő transzkriptómok euklidészi távolságának meghatározásával és az eredmények "heatmap" ábrázolásával kezdtük meg. Ez alapján a két különböző forrásból származó izolátumok egyértelműen elkülönülnek egymástól, amely a kiváltott válasz eltérő jellegére utal. A négy törzsben összesen 5.167 transzkriptet azonosítottunk, amelyek közül 729 expressziója tért el szignifikánsan a monociták jelenlétében a kontroll állapothoz viszonyítva. Ezek közül minden időpontban meghatároztuk azt a harminc gént, amely bármely két minta összehasonlításában a legnagyobb mennyiségbeli eltérést mutatja, és ezen gének alapján elvégeztük a különböző RNS minták euklidészi távolságainak meghatározását. A számítások többsége folyamatban van, eredmények az alábbi összehasonlításokban állnak rendelkezésünkre: 1.) monociták nélküli alap expresszió a két klinikai és két környezeti izolátum esetében, 2.) két környezeti izolátum expressziója a monocita nélküli kontroll és az egy órás fertőzés vonatkozásában és 3.), 4.) a monocita nélküli kontroll és a 3 illetve 12 órás fertőzésből izolált két klinikai izolátum összehasonlításában. A vizsgált minták valamennyi esetben eltérő csoportokba illeszkedtek, amely az expressziós mintázat eltérésére utal.

A rendelkezésünkre álló valamennyi mintákban összesen 118.641 transzkriptet azonosítottunk, amelyek közül mindössze 29 mutatott szignifikáns eltérést a nem fertőzött kontrollhoz képest. Ezek közül, az elérhető adatbázis szerint, 21 kódol fehérjét. A 29 transzkript alapján elkészítettük a minták euklidészi távolságainak "heatmap"-jét. A csoportok mintázata szerint a monociták környezeti és klinikai izolátumokra adott válaszában különbség mutatkozik.

7.3. Klinikai és környezeti *C. parapsilosis* törzsek összehasonlító genomikai analízise

Korábbi munkánk során különböző *C. parapsilosis* törzsek eltérő virulenciájára és molekuláris tulajdonságaira lettünk figyelmesek. Hogy az izolátumok közötti genomi különbségeket feltérképezzük két környezeti (CBS 1954 és CBS 6318) és egy klinikai izolátum (GA1) teljes genom szekvenciáját határoztuk meg, és hasonlítottuk össze a CDC317, szintén klinikai, referencia genommal. Vizsgálatainkat a CRG Komparatív genomikai csoportjával (Dr. Toni Gabaldón és Leszek Pryszcz) közösen végeztük.

Az *in silico* analízis során 5.147 SNP-t azonosítottunk a referencia genomhoz viszonyítva, amelyeket a három törzsben tapasztalt eloszlásuk szerint csoportosítottunk. Bár ebben a fajban rekombinációra utaló nyomok ezidáig ismeretlenek voltak, az SNP-k gyakorisága és előfordulása erre az eseményre utal.

Az összehasonlítás során 5 duplikációt (DUP) és 35 deléciót (DEL) azonosítottunk. A DUP#5 egy a *S. cerevisiae*-ben azonosított *ARR3* (arzenit transzporter) gén ortológját érinti. A két klinikai izolátumban kópiaszámuk eltérő mivolta (8 és 10) és a géneket övező régiók analízisének eredménye arra enged következtetni, hogy a két izolátumban a géncsalád expanszióját eltérő gének duplikációja okozta. Ennek ismeretében feltételezhető, hogy a környezet → gazda átmenet a faj törzsfjlődése során egynél többször következhetett be. Ez ellentétes a jelenleg uralkodó nézettel, miszerint a klinikai *C. parapsilosis* izolátumok klonális eredetűek.

A 35 deléció mérete 17-től 23.475 bázispárig terjed. Ezek közül 31 fehérje kódoló régiót érint, és 18 valószínűsíthetően génfüzéhoz vezetett. A 35-ből húsz deléciót kísérletes validálásra választottunk ki, amelyek során PCR és Southern hibridizációs stratégiát alkalmaztunk Sanger szekvenálással kiegészítve. Ez utóbbi révén definiált nukleotidsorrend segítségével a deléciók pontos töréspontjait egyértelműen meg tudtuk határozni. A húszból tíz esetben a szekvenálás sikertelen volt, valószínűleg a fragmentumok bonyolult másodlagos struktúrái miatt. Az *ALS* gének elvesztését okozó deléciókat övező régiók elemzése, az SNP-khez hasonlóan, szintén rekombinációs eseményekre utaló mintázatot azonosított. A molekuláris technikák húszból 19 esetben igazolták és pontosították az *in silico* eredményeket. Az öt, bioinformatikai módszerekkel meghatározott heterozigotikus régió közül csak három jelenlétét tudtuk stratégiáinkkal alátámasztani. A DEL#18 területén molekuláris módszerekkel azonosítottunk egy kizárólag a két környezeti izolátumra jellemző deléciót, amelyet az *in silico* analízis nem mutatott ki. Ez a jövőben indikátor szekvenciaként szolgálhat az *in silico* keresési paraméterek optimalizálásához, egyúttal nyomatékosítja az *in silico* adatok molekuláris eszközökkel történő igazolásának fontosságát.

Munkánk eredményei új ismeretekkel bővítették a *C. parapsilosis* genom szerveződését illető, valamint az emlős fagociták és a *C. parapsilosis sensu lato* csoport tagjainak *in vitro* kölcsönhatásával kapcsolatos eddigi tudásunkat. A felállított rendszerben nyomon követtük a kölcsönhatás lépéseit és jellemeztük az egér makrofágok transzkripciós változásait. Elsőként mutattuk ki, hogy a kostimulációs folyamatokkal összefüggésbe hozott *TNFRSF9* gén termékének mennyisége mind RNS, mind fehérje szinten megemelkedik *Candida* fertőzések során. RNA-seq eljárás segítségével egyidejűleg vizsgáltuk a humán monociták és az említett élesztők transzkriptómjában a fertőzés során bekövetkező változásokat. Megállapítottuk, hogy a *C. metapsilosis* teljes genom duplikáción esett át. *C. parapsilosis*-ban több mint 300, eddig ismeretlen gént jelenlétét mutattuk ki, és a fajban először rekombinációs események nyomait azonosítottuk. Elvégeztük két-két klinikai és környezeti *C. parapsilosis* izolátum összehasonlító genomikai analízisét. Tudomásunk szerint elsőként az *in silico* eredményeket molekuláris eljárásokkal támasztottuk alá.

8. SUMMARY

During the last three decades candidiasis has become the most commonly diagnosed yeast related infection worldwide. Although *Candida* species are members of the normal human flora, they have the ability to turn into pathogenic state causing superficial, cutaneous or systemic infections under specific circumstances. Several studies draw attention to the increasement of the incidence caused by these yeasts among immunocompromised or HIV infected patients or individuals undergone organ transplantation. Many species of the *Candida* genus are reported to cause nosocomial infections, underlining that hospitalized patients, elderly population getting prolonged medical attendance, infants with low birth weight, patients with superficial injuries or with antimicrobial or steroid treatment are particularly endangered. These fungi are known as the fourth most commonly isolated microorganisms from nosocomial blood infections and it is also established that *Candida* species can be found on the hands of every third healthcare workers on average. The annual update of the National Healthcare Safety Network mentioned 33848 cases of healthcare-associated infections of which 3628 (10,7%) were *Candida* species during the examined 21-month period. However *C. albicans* is still the major cause of *Candidiasis*, the relevance of other *Candida* species like *C. glabrata*, *C. parapsilosis* and *C. tropicalis* have significantly emerged in this century. Out of these, the epidemiology of *C. parapsilosis* shows remarkable differences compared to the one of *C. albicans*. *C. parapsilosis* has a unique biological properties, which makes this yeast capable of infecting neonates in large numbers. Depending on the geographic area and the time period of the studies the incidence of *C. parapsilosis* involving neonates outranks even *C. albicans* in some cases. Based on molecular properties the yeast known as *C. parapsilosis* got separated into three species called *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis* and *C. metapsilosis* in 2005. Altogether they are known as *C. parapsilosis sensu lato* group. Although these species are closely related, they show remarkable differences in their pathogenicity and virulence. Out of these *C. parapsilosis* seems to have the highest clinical relevance followed by *C. orthopsilosis* and *C. metapsilosis*. Despite of the emerging clinical relevance of *C. parapsilosis* very little is known about its pathogenicity, virulence factors, genetic background and behaviour during infection. To fill this gap we decided to 1.) create an *in vitro* model system to investigate the process of the interaction of *C. parapsilosis* with mammalian phagocytes and 2.) examine the transcriptional profile of the host and the pathogen during infection and finally 3.) reveal genomic differences between various isolates of *C. parapsilosis*.

8.1. Development of an *in vitro* model system to study the interaction between murine macrophages and *C. parapsilosis*

The response of J774.2 murine macrophages given to *C. parapsilosis* clinical isolate was observed by flow cytometer, scanning electron microscope, fluorescent microscope and confocal fluorescent microscope. It was established that J774.2 macrophages start to uptake *C. parapsilosis* wild-type cells after 30 minutes of incubation. The uptake reaches a plateau-phase by the third hour. Phagosome-lysosome colocalisation and elimination of the yeasts occurs by the eighth hour.

Since three and eight hours seemed to be important milestones of the interaction microarray analysis of the host transcriptome was performed with RNA samples isolated at these timepoints. Respectively 115 and 511 genes were found to be differently expressed compared to the non-infected control. Genes taking part mostly in wound healing, stress or immune response were upregulated. Six genes were chosen to validate the microarray results by qRT-PCR. The relative expressions of *CD83*, *IL1 β* , *IL15*, *TNF α* , *TNFRSF9* (a gene of transmembrane protein, a costimulatory molecule) and *PTGS-2* (gene of a cytoplasmic enzyme responsible for prostaglandin biosynthesis) genes were examined in samples from three different timepoints, 3, 8 and 24 hour. Overexpression data were normalised to the non-infected controls by using $2^{-\Delta(\Delta C_t)}$ method, actin was used as an internal control. QRT-PCR validated the microarray results.

The overexpression of the *TNFRSF9* gene was examined after stimulation by other *Candida* spp (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. metapsilosis*, *C. orthopsilosis*, *C. tropicalis*) and both of them were able to induce the upregulation of *TNFRSF9*.

Flow cytometry analysis established that *C. parapsilosis* GA1 wild-type was able to increase the level of the functional protein on the surface of the phagocytes compared to the control (0 h).

The expression of this specific molecule was also examined *in vitro* in a model using mouse peritoneal macrophages and human PMBC derived macrophages after 3, 6, 12 and 24 hours of coincubation with wild-type *C. parapsilosis* GA1 strain. Both induced the overexpression of *TNFRSF9* in these cells. In mouse macrophages the longer the incubation time was, the higher the expression occurred. In primary human cells however the highest expression was observed at twelve hours post-infection.

8.2. Whole transcriptome analysis of the host and the pathogen from *in vitro* interactions of THP-1 human monocytic cells with the members of the *C. parapsilosis sensu lato* group

Complete transcriptional profiles of samples originated from incubation of THP-1 monocytes with the members of *C. parapsilosis sensu lato* group (involving clinical, environmental and mutant strains of *C. parapsilosis*) in different timepoints were determined by RNA-seq. This technique seemed to be capable of managing the transcriptome profile of the host and the yeast simultaneously in a single RNA sample. Applying this novel method not only the response of phagocytes but the one of the pathogens could also be examined. The evaluation of the huge data generated is still in progress. Our current results are as follows.

Experiments involving *C. parapsilosis* CDC317, *C. orthopsilosis* MCO 456 and *C. metapsilosis* PL 429 (three closely related species having highly different clinical relevance) made possible to analyse the changes of the yeast transcriptome in the response to the monocytes. Unfortunately the phagocyte transcriptome was hardly detectable therefore the changes caused by the fungi in the monocyte could not be examined yet. *In silico* analysis determined the distribution of ortholog genes in the three species and the differentially expressed genes during infection. RNA-seq identified more than 300 previously unknown genes in *C. parapsilosis*. It was also established that *C. metapsilosis* underwent a whole genome duplication recently.

The interaction of THP-1 with two environmental (CBS 1954 and CBS 6318) and two clinical (CDC317 and GA1) strains was also examined. Based on the heatmap of the Euclidean-distances of the samples from this arrangement the clinical and environmental *C. parapsilosis* isolates were classified in completely different clusters suggesting notable differences in the transcriptomes. In the four strains a total of 5.167 transcripts were identified. Out of these 729 transcripts were found to be differentially expressed in the presence of monocytes. The thirty genes with the highest expression difference were chosen at any given timepoints to calculate the Euclidean-distances of the samples. This analysis included the following four layout: 1.) basic expression (without monocytes) of the two clinical versus the two environmental isolates, 2.) the two environmental strains uninduced versus induced at 1h, and 3.), 4.) the two clinical isolates uninduced versus induced at 3 h and 12 h. Each two groups of the four comparison aligned into separate clusters, that means differences in the expression between the examined groups.

In monocytes 118.641 transcripts were identified, but surprisingly only 29 of them showed significantly different expression compared to the non-infected control. Out of these

21 encode protein. The 29 transcripts were used to calculate the Euclidean-distances between the samples. This analysis revealed differences in the monocyte response given to clinical and environmental strains.

8.3. Comparative genomic analysis of clinical and environmental isolates of *C. parapsilosis*

Our earlier results revealed notable differences between clinical and environmental isolates of *C. parapsilosis* regarding to their resistance to phagocytosis and monocyte elimination mechanisms, the distribution of the members of the *ALS* (Agglutinin-like sequences) genefamily, and chromosome arrangements. To map the genomic variation of *C. parapsilosis* isolates originated from different sources whole genom sequencing was carried out involving two environmental (CBS 1954 and CBS 6318) and GA1 clinical isolates, then comparative genomic analysis was performed including CDC317 strain as a reference. The project was managed in tight collaboration with Toni Gabaldón PhD and Leszek Pryszcz from the Comparative Genomics group of CRG (Barcelona, Spain).

In silico analysis identified a total of 5.147 SNPs and determined the distribution of these in CBS 1954, CBS 6318 and GA1 compared to the CDC317. Although evidence of recombination has never been described in this species, the frequency and distribution of the SNPs refers to this molecular event.

The comparison predicted forty chromosomal mutations: five duplications (DUP) and 35 deletions (DEL). The DUP#5 causes the copy number variation of a physiologically important gene named *ARR3*, that is an ortholog of the *S. cerevisiae* *ARR3* (arsenite transporter). This was found to be responsible for arsenite resistance in baker's yeast. The copy number variation and the flanking sequences of the copies of this gene in clinical isolates supports the idea that the "environment to host" transition occurred more than once during the phylogeny of this species. This recognition contradicts the present point of view that considers all clinical *C. parapsilosis* isolates being clonal.

The 35 deletions range from 17 to 23.475 bps. Out of these 31 affected protein coding regions and 18 seem to lead gene fusions. Most of them are specific to one single strain. Five deletions were found to be heterozygous. Twenty out of the 35 deletions were chosen for experimental validation. PCR and Southern hybridisation strategies were designed and applied together with Sanger sequencing. The nucleotide order determined by Sangerseq made possible to identify the breakpoints of the deletions precisely. In ten out of twenty cases Sangerseq failed possibly due to secondary structures of the fragments. The analysis of the

flanking sites of deletions affecting the *ALS* genes revealed nucleotide patterns referring to recombination events. Results of molecular techniques verified the *in silico* findings in 19 cases out of 20 the deletions chosen for experimental validation. Out of the five heterozygous region only three were confirmed. Molecular techniques identified a deletion specific for environmental strains, that was not predicted by *in silico* data. This result underline the importance of validation and suggests that this region can be used as indicator sequence to optimize searching algorithms in the future.

Our work provided new data regarding to the genome organisation of the pathogenic yeast *C. parapsilosis sensu lato* group and to their *in vitro* interaction with mammalian phagocytes. The process of the phagocytosis and the molecular changes of murine macrophages were examined in response to *C. parapsilosis*. A costimulatory molecule (Tnfrsf9) was identified for the first time to be related to *Candida* infections. RNA-seq technique was carried out to reveal the transcriptional changes in both the human monocytes and the pathogens during infection. Genome duplication of *C. metapsilosis* was identified. More than 300 new genes were found in *C. parapsilosis*. Comparative genomic analysis was performed involving two clinical and two environmental isolates of *C. parapsilosis*. Evidences of recombination events were found first ever in this species. Copy number variation of arsenite transporter challenges the present dogma considering clinical *C. parapsilosis* strains being clonal. Molecular techniques were applied to support the *in silico* results, that, to our knowledge, was the first effort has ever been made to validate *in silico* predictions.

9. IRODALOMJEGYZÉK

- Abiko, Y., Jinbu, Y., Noguchi, T., Nishimura, M., Kusano, K., Amaratunga, P., Shibata, T., and Kaku, T. (2002). Upregulation of human beta-defensin 2 peptide expression in oral lichen planus, leukoplakia and candidiasis. an immunohistochemical study. *Pathol Res Pract* 198, 537-542.
- Adams, M.D., Celniker, S.E., Holt, R.A., Evans, C.A., Gocayne, J.D., Amanatides, P.G., Scherer, S.E., Li, P.W., Hoskins, R.A., Galle, R.F., *et al.* (2000). The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287, 2185-2195.
- Alizadeh, A., Eisen, M., Botstein, D., Brown, P.O., and Staudt, L.M. (1998). Probing lymphocyte biology by genomic-scale gene expression analysis. *J Clin Immunol* 18, 373-379.
- Almirante, B., Rodriguez, D., Cuenca-Estrella, M., Almela, M., Sanchez, F., Ayats, J., Alonso-Tarres, C., Rodriguez-Tudela, J.L., and Pahissa, A. (2006). Epidemiology, risk factors, and prognosis of *Candida parapsilosis* bloodstream infections: case-control population-based surveillance study of patients in Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. *J Clin Microbiol* 44, 1681-1685.
- Alwine, J.C., Kemp, D.J., and Stark, G.R. (1977). Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 5350-5354.
- Amit, I., Regev, A., and Hacohen, N. (2011). Strategies to discover regulatory circuits of the mammalian immune system. *Nat Rev Immunol* 11, 873-880.
- Andersen, M.H., Schrama, D., Thor Straten, P., and Becker, J.C. (2006). Cytotoxic T cells. *J Invest Dermatol* 126, 32-41.
- Andes, D., Nett, J., Oschel, P., Albrecht, R., Marchillo, K., and Pitula, A. (2004). Development and characterization of an *in vivo* central venous catheter *Candida albicans* biofilm model. *Infect Immun* 72, 6023-6031.
- Aratani, Y., Koyama, H., Nyui, S., Suzuki, K., Kura, F., and Maeda, N. (1999). Severe impairment in early host defense against *Candida albicans* in mice deficient in myeloperoxidase. *Infect Immun* 67, 1828-1836.
- Arnold, R.R., Cole, M.F., and McGhee, J.R. (1977). A bactericidal effect for human lactoferrin. *Science* 197, 263-265.
- Ashman, R.B., Farah, C.S., Wanasaengsakul, S., Hu, Y., Pang, G., and Clancy, R.L. (2004). Innate versus adaptive immunity in *Candida albicans* infection. *Immunol Cell Biol* 82, 196-204.
- Ashman, R.B., and Papadimitriou, J.M. (1995). Production and function of cytokines in natural and acquired immunity to *Candida albicans* infection. *Microbiol Rev* 59, 646-672.
- Ausiello, C.M., Urbani, F., Gessani, S., Spagnoli, G.C., Gomez, M.J., and Cassone, A. (1993). Cytokine gene expression in human peripheral blood mononuclear cells stimulated by mannoprotein constituents from *Candida albicans*. *Infect Immun* 61, 4105-4111.
- Balish, E., Wagner, R.D., Vazquez-Torres, A., Jones-Carson, J., Pierson, C., and Warner, T. (1999). Mucosal and systemic candidiasis in IL-8Rh^{-/-} BALB/c mice. *J Leukoc Biol* 66, 144-150.
- Ballot, D.E., Bosman, N., Nana, T., Ramdin, T., and Cooper, P.A. (2013). Background changing patterns of neonatal fungal sepsis in a developing country. *J Trop Pediatr*.
- Bamford, R.N., Grant, A.J., Burton, J.D., Peters, C., Kurys, G., Goldman, C.K., Brennan, J., Roessler, E., and Waldmann, T.A. (1994). The interleukin (IL) 2 receptor beta chain is shared by IL-2 and a cytokine, provisionally designated IL-T, that stimulates T-cell proliferation and the induction of lymphokine-activated killer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 4940-4944.

- Barker, K.S., Liu, T., and Rogers, P.D. (2005). Coculture of THP-1 human mononuclear cells with *Candida albicans* results in pronounced changes in host gene expression. *J Infect Dis* 192, 901-912.
- Barrett-Bee, K., Hayes, Y., Wilson, R.G., and Ryley, J.F. (1985). A comparison of phospholipase activity, cellular adherence and pathogenicity of yeasts. *J Gen Microbiol* 131, 1217-1221.
- Bartsch, S., Wurgler, F.E., and Sengstag, C. (1997). A genetic system to detect mitotic recombination between repeated chromosomal sequences in *Drosophila* Schneider line 2 cells. *Mutat Res* 395, 9-27.
- Bateman, A., Coin, L., Durbin, R., Finn, R.D., Hollich, V., Griffiths-Jones, S., Khanna, A., Marshall, M., Moxon, S., Sonnhammer, E.L., *et al.* (2004). The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res* 32, D138-141.
- Batista, F.D., and Harwood, N.E. (2009). The who, how and where of antigen presentation to B cells. *Nat Rev Immunol* 9, 15-27.
- Belcher, C.E., Drenkow, J., Kehoe, B., Gingeras, T.R., McNamara, N., Lemjabbar, H., Basbaum, C., and Relman, D.A. (2000). The transcriptional responses of respiratory epithelial cells to *Bordetella pertussis* reveal host defensive and pathogen counter-defensive strategies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 13847-13852.
- Bennett, R.J., and Johnson, A.D. (2005). Mating in *Candida albicans* and the search for a sexual cycle. *Annu Rev Microbiol* 59, 233-255.
- Bennett, S. (2004). Solexa Ltd. *Pharmacogenomics* 5, 433-438.
- Berman, J., and Sudbery, P.E. (2002). *Candida albicans*: a molecular revolution built on lessons from budding yeast. *Nat Rev Genet* 3, 918-930.
- Bogdan, C., Rollinghoff, M., and Diefenbach, A. (2000). Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. *Curr Opin Immunol* 12, 64-76.
- Bonassoli, L.A., Bertoli, M., and Svidzinski, T.I. (2005). High frequency of *Candida parapsilosis* on the hands of healthy hosts. *J Hosp Infect* 59, 159-162.
- Bouchonville, K., Forche, A., Tang, K.E., Selmecki, A., and Berman, J. (2009). Aneuploid chromosomes are highly unstable during DNA transformation of *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* 8, 1554-1566.
- Bradley, J.R. (2008). TNF-mediated inflammatory disease. *J Pathol* 214, 149-160.
- Branski, L.K., Al-Mousawi, A., Rivero, H., Jeschke, M.G., Sanford, A.P., and Herndon, D.N. (2009). Emerging infections in burns. *Surg Infect (Larchmt)* 10, 389-397.
- Braun, B.R., van Het Hoog, M., d'Enfert, C., Martchenko, M., Dungan, J., Kuo, A., Inglis, D.O., Uhl, M.A., Hogues, H., Berriman, M., *et al.* (2005). A human-curated annotation of the *Candida albicans* genome. *PLoS Genet* 1, 36-57.
- Breloer, M., and Fleischer, B. (2008). CD83 regulates lymphocyte maturation, activation and homeostasis. *Trends Immunol* 29, 186-194.
- Brereton, C.F., and Blander, J.M. (2010). Responding to infection and apoptosis--a task for TH17 cells. *Ann N Y Acad Sci* 1209, 56-67.
- Brunel, L., Neugnot, V., Landucci, L., Boze, H., Moulin, G., Bigey, F., and Dubreucq, E. (2004). High-level expression of *Candida parapsilosis* lipase/acyltransferase in *Pichia pastoris*. *J Biotechnol* 111, 41-50.
- Buffo, J., Herman, M.A., and Soll, D.R. (1984). A characterization of pH-regulated dimorphism in *Candida albicans*. *Mycopathologia* 85, 21-30.
- Butler, G., Rasmussen, M.D., Lin, M.F., Santos, M.A., Sakthikumar, S., Munro, C.A., Rheinbay, E., Grabherr, M., Forche, A., Reedy, J.L., *et al.* (2009). Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight *Candida* genomes. *Nature* 459, 657-662.
- Cambi, A., Gijzen, K., de Vries I, J., Torensma, R., Joosten, B., Adema, G.J., Netea, M.G., Kullberg, B.J., Romani, L., and Figdor, C.G. (2003). The C-type lectin DC-SIGN (CD209)

- is an antigen-uptake receptor for *Candida albicans* on dendritic cells. *Eur J Immunol* 33, 532-538.
- Cambi, A., Netea, M.G., Mora-Montes, H.M., Gow, N.A., Hato, S.V., Lowman, D.W., Kullberg, B.J., Torensma, R., Williams, D.L., and Figdor, C.G. (2008). Dendritic cell interaction with *Candida albicans* critically depends on N-linked mannan. *J Biol Chem* 283, 20590-20599.
- Carson, W.E., Giri, J.G., Lindemann, M.J., Linett, M.L., Ahdieh, M., Paxton, R., Anderson, D., Eisenmann, J., Grabstein, K., and Caligiuri, M.A. (1994). Interleukin (IL) 15 is a novel cytokine that activates human natural killer cells via components of the IL-2 receptor. *J Exp Med* 180, 1395-1403.
- Casadevall, A., and Pirofski, L.A. (1999). Host-pathogen interactions: redefining the basic concepts of virulence and pathogenicity. *Infect Immun* 67, 3703-3713.
- Cheng, G., Wozniak, K., Wallig, M.A., Fidel, P.L., Jr., Trupin, S.R., and Hoyer, L.L. (2005). Comparison between *Candida albicans* agglutinin-like sequence gene expression patterns in human clinical specimens and models of vaginal candidiasis. *Infect Immun* 73, 1656-1663.
- Chiang, P.W., Song, W.J., Wu, K.Y., Korenberg, J.R., Fogel, E.J., Van Keuren, M.L., Lashkari, D., and Kurnit, D.M. (1996). Use of a fluorescent-PCR reaction to detect genomic sequence copy number and transcriptional abundance. *Genome Res* 6, 1013-1026.
- Chibana, H., Iwaguchi, S., Homma, M., Chindamporn, A., Nakagawa, Y., and Tanaka, K. (1994). Diversity of tandemly repetitive sequences due to short periodic repetitions in the chromosomes of *Candida albicans*. *J Bacteriol* 176, 3851-3858.
- Chindamporn, A., Nakagawa, Y., Homma, M., Chibana, H., Doi, M., and Tanaka, K. (1995). Analysis of the chromosomal localization of the repetitive sequences (RPSs) in *Candida albicans*. *Microbiology* 141 (Pt 2), 469-476.
- Chindamporn, A., Nakagawa, Y., Mizuguchi, I., Chibana, H., Doi, M., and Tanaka, K. (1998). Repetitive sequences (RPSs) in the chromosomes of *Candida albicans* are sandwiched between two novel stretches, HOK and RB2, common to each chromosome. *Microbiology* 144 (Pt 4), 849-857.
- Chu, G., Vollrath, D., and Davis, R.W. (1986). Separation of large DNA molecules by contour-clamped homogeneous electric fields. *Science* 234, 1582-1585.
- Conti, H.R., Shen, F., Nayyar, N., Stocum, E., Sun, J.N., Lindemann, M.J., Ho, A.W., Hai, J.H., Yu, J.J., Jung, J.W., *et al.* (2009). Th17 cells and IL-17 receptor signaling are essential for mucosal host defense against oral candidiasis. *J Exp Med* 206, 299-311.
- Coste, A., Turner, V., Ischer, F., Morschhauser, J., Forche, A., Selmecki, A., Berman, J., Bille, J., and Sanglard, D. (2006). A mutation in Tac1p, a transcription factor regulating *CDR1* and *CDR2*, is coupled with loss of heterozygosity at chromosome 5 to mediate antifungal resistance in *Candida albicans*. *Genetics* 172, 2139-2156.
- d'Ostiani, C.F., Del Sero, G., Bacci, A., Montagnoli, C., Spreca, A., Mencacci, A., Ricciardi-Castagnoli, P., and Romani, L. (2000). Dendritic cells discriminate between yeasts and hyphae of the fungus *Candida albicans*. Implications for initiation of T helper cell immunity *in vitro* and *in vivo*. *J Exp Med* 191, 1661-1674.
- Dagdeviren, M., Cerikcioglu, N., and Karavus, M. (2005). Acid proteinase, phospholipase and adherence properties of *Candida parapsilosis* strains isolated from clinical specimens of hospitalised patients. *Mycoses* 48, 321-326.
- Dalle, F., Wachtler, B., L'Ollivier, C., Holland, G., Bannert, N., Wilson, D., Labruere, C., Bonnin, A., and Hube, B. (2010). Cellular interactions of *Candida albicans* with human oral epithelial cells and enterocytes. *Cell Microbiol* 12, 248-271.
- Damsker, J.M., Hansen, A.M., and Caspi, R.R. (2010). Th1 and Th17 cells: adversaries and collaborators. *Ann N Y Acad Sci* 1183, 211-221.

- Dang, Y., Yang, Q., Xue, Z., and Liu, Y. (2011). RNA interference in fungi: pathways, functions, and applications. *Eukaryot Cell* 10, 1148-1155.
- Davis, D., Edwards, J.E., Jr., Mitchell, A.P., and Ibrahim, A.S. (2000). *Candida albicans* RIM101 pH response pathway is required for host-pathogen interactions. *Infect Immun* 68, 5953-5959.
- de Saizieu, A., Gardes, C., Flint, N., Wagner, C., Kamber, M., Mitchell, T.J., Keck, W., Amrein, K.E., and Lange, R. (2000). Microarray-based identification of a novel *Streptococcus pneumoniae* regulon controlled by an autoinduced peptide. *J Bacteriol* 182, 4696-4703.
- Decat, E., Van Mechelen, E., Saerens, B., Vermeulen, S.J., Boekhout, T., De Blaiser, S., Vaneechoutte, M., and Deschaght, P. (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, 110-117.
- Der, S.D., Zhou, A., Williams, B.R., and Silverman, R.H. (1998). Identification of genes differentially regulated by interferon alpha, beta, or gamma using oligonucleotide arrays. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 15623-15628.
- Dias, J.C., Rezende, R.P., Rosa, C.A., Lachance, M.A., and Linardi, V.R. (2000). Enzymatic degradation of nitriles by a *Candida guilliermondii* UFMG-Y65. *Can J Microbiol* 46, 525-531.
- Dinarello, C.A. (1997). Interleukin-1. *Cytokine Growth Factor Rev* 8, 253-265.
- Doedt, T., Krishnamurthy, S., Bockmuhl, D.P., Tebarth, B., Stempel, C., Russell, C.L., Brown, A.J., and Ernst, J.F. (2004). APSES proteins regulate morphogenesis and metabolism in *Candida albicans*. *Mol Biol Cell* 15, 3167-3180.
- Eddy, S.R. (2011). Accelerated Profile HMM Searches. *PLoS Comput Biol* 7, e1002195.
- Ellison, R.T., 3rd, and Giehl, T.J. (1991). Killing of gram-negative bacteria by lactoferrin and lysozyme. *J Clin Invest* 88, 1080-1091.
- Erb-Downward, J.R., and Noverr, M.C. (2007). Characterization of prostaglandin E2 production by *Candida albicans*. *Infect Immun* 75, 3498-3505.
- Espinel-Ingroff, A., Kish, C.W., Jr., Kerkering, T.M., Fromtling, R.A., Bartizal, K., Galgiani, J.N., Villareal, K., Pfaller, M.A., Gerarden, T., Rinaldi, M.G., and et al. (1992). Collaborative comparison of broth microdilution and microdilution antifungal susceptibility tests. *J Clin Microbiol* 30, 3138-3145.
- Fan, W., Kraus, P.R., Boily, M.J., and Heitman, J. (2005). *Cryptococcus neoformans* gene expression during murine macrophage infection. *Eukaryot Cell* 4, 1420-1433.
- Fell, J.W., and Meyer, S.A. (1967). Systematics of yeast species in the *Candida parapsilosis* group. *Mycopathol Mycol Appl* 32, 177-193.
- Fernando, P.H., Panagoda, G.J., and Samaranayake, L.P. (1999). The relationship between the acid and alkaline phosphatase activity and the adherence of clinical isolates of *Candida parapsilosis* to human buccal epithelial cells. *APMIS* 107, 1034-1042.
- Fernandez-Arenas, E., Bleck, C.K., Nombela, C., Gil, C., Griffiths, G., and Diez-Orejas, R. (2009). *Candida albicans* actively modulates intracellular membrane trafficking in mouse macrophage phagosomes. *Cell Microbiol* 11, 560-589.
- Filippidi, A., Galanakis, E., Maraki, S., Galani, I., Drogari-Apiranthitou, M., Kalmanti, M., Mantadakis, E., and Samonis, G. (2013). The effect of maternal flora on *Candida* colonisation in the neonate. *Mycoses*.
- Fitch, W.M. (1970). Distinguishing homologous from analogous proteins. *Syst Zool* 19, 99-113.
- Fitzpatrick, D.A., Logue, M.E., Stajich, J.E., and Butler, G. (2006). A fungal phylogeny based on 42 complete genomes derived from supertree and combined gene analysis. *BMC Evol Biol* 6, 99.

- Fleischmann, R.D., Adams, M.D., White, O., Clayton, R.A., Kirkness, E.F., Kerlavage, A.R., Bult, C.J., Tomb, J.F., Dougherty, B.A., Merrick, J.M., and et al. (1995). Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science* 269, 496-512.
- Fluckiger, U., Marchetti, O., Bille, J., Eggimann, P., Zimmerli, S., Imhof, A., Garbino, J., Ruef, C., Pittet, D., Tauber, M., et al. (2006). Treatment options of invasive fungal infections in adults. *Swiss Med Wkly* 136, 447-463.
- Forche, A., Alby, K., Schaefer, D., Johnson, A.D., Berman, J., and Bennett, R.J. (2008). The parasexual cycle in *Candida albicans* provides an alternative pathway to meiosis for the formation of recombinant strains. *PLoS Biol* 6, e110.
- Forche, A., Magee, P.T., Selmecki, A., Berman, J., and May, G. (2009). Evolution in *Candida albicans* populations during a single passage through a mouse host. *Genetics* 182, 799-811.
- Fu, Y., Rieg, G., Fonzi, W.A., Belanger, P.H., Edwards, J.E., Jr., and Filler, S.G. (1998). Expression of the *Candida albicans* gene *ALS1* in *Saccharomyces cerevisiae* induces adherence to endothelial and epithelial cells. *Infect Immun* 66, 1783-1786.
- Gacser, A., Salomon, S., and Schafer, W. (2005). Direct transformation of a clinical isolate of *Candida parapsilosis* using a dominant selection marker. *FEMS Microbiol Lett* 245, 117-121.
- Gacser, A., Schafer, W., Nosanchuk, J.S., Salomon, S., and Nosanchuk, J.D. (2007a). Virulence of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* in reconstituted human tissue models. *Fungal Genet Biol* 44, 1336-1341.
- Gacser, A., Stehr, F., Kroger, C., Kredics, L., Schafer, W., and Nosanchuk, J.D. (2007b). Lipase 8 affects the pathogenesis of *Candida albicans*. *Infect Immun* 75, 4710-4718.
- Gacser, A., Trofa, D., Schafer, W., and Nosanchuk, J.D. (2007c). Targeted gene deletion in *Candida parapsilosis* demonstrates the role of secreted lipase in virulence. *J Clin Invest* 117, 3049-3058.
- Ganz, T. (2003). Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat Rev Immunol* 3, 710-720.
- Gauchat, J.F., Gauchat, D., De Weck, A.L., and Stadler, B.M. (1989). Cytokine mRNA levels in antigen-stimulated peripheral blood mononuclear cells. *Eur J Immunol* 19, 1079-1085.
- Gaur, N.K., and Klotz, S.A. (1997). Expression, cloning, and characterization of a *Candida albicans* gene, *ALA1*, that confers adherence properties upon *Saccharomyces cerevisiae* for extracellular matrix proteins. *Infect Immun* 65, 5289-5294.
- Germain, R.N. (1994). MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation. *Cell* 76, 287-299.
- Germain, R.N., and Margulies, D.H. (1993). The biochemistry and cell biology of antigen processing and presentation. *Annu Rev Immunol* 11, 403-450.
- Ghannoum, M.A. (2000). Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin Microbiol Rev* 13, 122-143, table of contents.
- Ghoneum, M., Grewal, I., Brown, J., Osborne, R., Elembabi, H., and Gill, G. (2003). Phagocytosis of *Candida albicans* by lymphatic tumour cells *in vitro*. *Acta Histochem* 105, 127-133.
- Giladi, H., Ketzin-Gilad, M., Rivkin, L., Felig, Y., Nussbaum, O., and Galun, E. (2003). Small interfering RNA inhibits hepatitis B virus replication in mice. *Mol Ther* 8, 769-776.
- Goodwin, J.S. (1991). Are prostaglandins proinflammatory, antiinflammatory, both or neither? *J Rheumatol Suppl* 28, 26-29.
- Gordon, S. (2004). Pathogen recognition or homeostasis? APC receptor functions in innate immunity. *C R Biol* 327, 603-607.
- Gow, N.A., van de Veerdonk, F.L., Brown, A.J., and Netea, M.G. (2012). *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. *Nat Rev Microbiol* 10, 112-122.

- Green, C.B., Zhao, X., Yeater, K.M., and Hoyer, L.L. (2005). Construction and real-time RT-PCR validation of *Candida albicans* PALS-GFP reporter strains and their use in flow cytometry analysis of ALS gene expression in budding and filamenting cells. *Microbiology* 151, 1051-1060.
- Greene, W.C., and Leonard, W.J. (1986). The human interleukin-2 receptor. *Annu Rev Immunol* 4, 69-95.
- Grimm, M.J., Vethanayagam, R.R., Almyroudis, N.G., Lewandowski, D., Rall, N., Blackwell, T.S., and Segal, B.H. (2011). Role of NADPH oxidase in host defense against aspergillosis. *Med Mycol* 49 Suppl 1, S144-149.
- Haas, A. (2007). The phagosome: compartment with a license to kill. *Traffic* 8, 311-330.
- Hall, T.A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41, 95-98.
- Harding, F.A., McArthur, J.G., Gross, J.A., Raulet, D.H., and Allison, J.P. (1992). CD28-mediated signalling co-stimulates murine T cells and prevents induction of anergy in T-cell clones. *Nature* 356, 607-609.
- Hedderwick, S.A., Lyons, M.J., Liu, M., Vazquez, J.A., and Kauffman, C.A. (2000). Epidemiology of yeast colonization in the intensive care unit. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 19, 663-670.
- Henderson, D.C., and Rippin, J.J. (1995). Stimulus-dependent production of cytokines and pterins by peripheral blood mononuclear cells. *Immunol Lett* 45, 29-34.
- Herre, J., Marshall, A.S., Caron, E., Edwards, A.D., Williams, D.L., Schweighoffer, E., Tybulewicz, V., Reis e Sousa, C., Gordon, S., and Brown, G.D. (2004). Dectin-1 uses novel mechanisms for yeast phagocytosis in macrophages. *Blood* 104, 4038-4045.
- Hidron, A.I., Edwards, J.R., Patel, J., Horan, T.C., Sievert, D.M., Pollock, D.A., and Fridkin, S.K. (2008). NHSN annual update: antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006-2007. *Infect Control Hosp Epidemiol* 29, 996-1011.
- Horvath, P., Nosanchuk, J.D., Hamari, Z., Vagvolgyi, C., and Gacser, A. (2012). The identification of gene duplication and the role of secreted aspartyl proteinase 1 in *Candida parapsilosis* virulence. *J Infect Dis* 205, 923-933.
- Hoyer, L.L., Fundyga, R., Hecht, J.E., Kapteyn, J.C., Klis, F.M., and Arnold, J. (2001). Characterization of agglutinin-like sequence genes from non-albicans *Candida* and phylogenetic analysis of the ALS family. *Genetics* 157, 1555-1567.
- Hoyer, L.L., Green, C.B., Oh, S.H., and Zhao, X. (2008). Discovering the secrets of the *Candida albicans* agglutinin-like sequence (ALS) gene family--a sticky pursuit. *Med Mycol* 46, 1-15.
- Hruskova-Heidingsfeldova, O., Dostal, J., Majer, F., Havlikova, J., Hradilek, M., and Pichova, I. (2009). Two aspartic proteinases secreted by the pathogenic yeast *Candida parapsilosis* differ in expression pattern and catalytic properties. *Biol Chem* 390, 259-268.
- Huang da, W., Sherman, B.T., and Lempicki, R.A. (2009). Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc* 4, 44-57.
- Huang, W., Na, L., Fidel, P.L., and Schwarzenberger, P. (2004). Requirement of interleukin-17A for systemic anti-*Candida albicans* host defense in mice. *J Infect Dis* 190, 624-631.
- Ichikawa, J.K., Norris, A., Bangera, M.G., Geiss, G.K., van 't Wout, A.B., Bumgarner, R.E., and Lory, S. (2000). Interaction of *Pseudomonas aeruginosa* with epithelial cells: identification of differentially regulated genes by expression microarray analysis of human cDNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 9659-9664.
- Itano, A.A., and Jenkins, M.K. (2003). Antigen presentation to naive CD4 T cells in the lymph node. *Nat Immunol* 4, 733-739.

- Iwaguchi, S., Homma, M., Chibana, H., and Tanaka, K. (1992). Isolation and characterization of a repeated sequence (RPS1) of *Candida albicans*. *J Gen Microbiol* 138, 1893-1900.
- Janbon, G., Sherman, F., and Rustchenko, E. (1998). Monosomy of a specific chromosome determines L-sorbose utilization: a novel regulatory mechanism in *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 5150-5155.
- Jenkins, M.K., Taylor, P.S., Norton, S.D., and Urdahl, K.B. (1991). CD28 delivers a costimulatory signal involved in antigen-specific IL-2 production by human T cells. *J Immunol* 147, 2461-2466.
- Jeremias, J., Kalo-Klein, A., and Witkin, S.S. (1991). Individual differences in tumour necrosis factor and interleukin-1 production induced by viable and heat-killed *Candida albicans*. *J Med Vet Mycol* 29, 157-163.
- Jones, T., Federspiel, N.A., Chibana, H., Dungan, J., Kalman, S., Magee, B.B., Newport, G., Thorstenson, Y.R., Agabian, N., Magee, P.T., *et al.* (2004). The diploid genome sequence of *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 7329-7334.
- Jouault, T., Bernigaud, A., Lepage, G., Trinel, P.A., and Poulain, D. (1994). The *Candida albicans* phospholipomannan induces *in vitro* production of tumour necrosis factor-alpha from human and murine macrophages. *Immunology* 83, 268-273.
- Kantarcioglu, A.S., and Yucel, A. (2002). Phospholipase and protease activities in clinical *Candida* isolates with reference to the sources of strains. *Mycoses* 45, 160-165.
- Kassu, A., D'Souza, M., O'Connor, B.P., Kelly-McKnight, E., Akkina, R., Fontenot, A.P., and Palmer, B.E. (2009). Decreased 4-1BB expression on HIV-specific CD4+ T cells is associated with sustained viral replication and reduced IL-2 production. *Clin Immunol* 132, 234-245.
- Kaufman, J.F., Auffray, C., Korman, A.J., Shackelford, D.A., and Strominger, J. (1984). The class II molecules of the human and murine major histocompatibility complex. *Cell* 36, 1-13.
- Kemp, C., Mueller, S., Goto, A., Barbier, V., Paro, S., Bonnay, F., Dostert, C., Troxler, L., Hetru, C., Meignin, C., *et al.* (2013). Broad RNA interference-mediated antiviral immunity and virus-specific inducible responses in *Drosophila*. *J Immunol* 190, 650-658.
- Kennedy, M.A., Kabbani, N., Lambert, J.P., Swayne, L.A., Ahmed, F., Figeys, D., Bennett, S.A., Bryan, J., and Baetz, K. (2011). *Srf1* is a novel regulator of phospholipase D activity and is essential to buffer the toxic effects of C16:0 platelet activating factor. *PLoS Genet* 7, e1001299.
- Kennedy, M.J., and Volz, P.A. (1985). Ecology of *Candida albicans* gut colonization: inhibition of *Candida* adhesion, colonization, and dissemination from the gastrointestinal tract by bacterial antagonism. *Infect Immun* 49, 654-663.
- Kim, H.S., Choi, E.H., Khan, J., Roilides, E., Francesconi, A., Kasai, M., Sein, T., Schaufele, R.L., Sakurai, K., Son, C.G., *et al.* (2005). Expression of genes encoding innate host defense molecules in normal human monocytes in response to *Candida albicans*. *Infect Immun* 73, 3714-3724.
- Kim, S.K., El Bissati, K., and Ben Mamoun, C. (2006). Amino acids mediate colony and cell differentiation in the fungal pathogen *Candida parapsilosis*. *Microbiology* 152, 2885-2894.
- Koga-Ito, C.Y., Lyon, J.P., Vidotto, V., and de Resende, M.A. (2006). Virulence factors and antifungal susceptibility of *Candida albicans* isolates from oral candidosis patients and control individuals. *Mycopathologia* 161, 219-223.
- Kowalczykowski, S.C. (2000). Initiation of genetic recombination and recombination-dependent replication. *Trends Biochem Sci* 25, 156-165.
- Kreusch, A., and Karstaedt, A.S. (2013). Candidemia among adults in Soweto, South Africa, 1990-2007. *Int J Infect Dis* 17, e621-623.

- Kuhn, D.M., Mikherjee, P.K., Clark, T.A., Pujol, C., Chandra, J., Hajjeh, R.A., Warnock, D.W., Soil, D.R., and Ghannoum, M.A. (2004). *Candida parapsilosis* characterization in an outbreak setting. *Emerg Infect Dis* 10, 1074-1081.
- Kurtzman, C., and Suzuki, M. (2010). Phylogenetic analysis of ascomycete yeasts that form coenzyme Q-9 and the proposal of the new genera *Babjeviella*, *Meyerozyma*, *Millerozyma*, *Priceomyces*, and *Scheffersomyces*. *Mycoscience* 51, 2-14.
- Langmead, B., and Salzberg, S.L. (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods* 9, 357-359.
- Langstein, J., Michel, J., Fritsche, J., Kreutz, M., Andreesen, R., and Schwarz, H. (1998). CD137 (ILA/4-1BB), a member of the TNF receptor family, induces monocyte activation via bidirectional signaling. *J Immunol* 160, 2488-2494.
- Langstein, J., and Schwarz, H. (1999). Identification of CD137 as a potent monocyte survival factor. *J Leukoc Biol* 65, 829-833.
- Larriba, G., and Calderone, R.A. (2008). Heterozygosity and loss of heterozygosity in *Candida albicans*. In *Pathogenic fungi: insights in molecular biology*, G. San-Blas, and R.A. Calderone, eds. (Norfolk, United Kingdom, Caister Academic Press), pp. 35-68.
- Launay, O., Lortholary, O., Bouges-Michel, C., Jarrousse, B., Bentata, M., and Guillemin, L. (1998). Candidemia: a nosocomial complication in adults with late-stage AIDS. *Clin Infect Dis* 26, 1134-1141.
- Lee, H.W., Park, S.J., Choi, B.K., Kim, H.H., Nam, K.O., and Kwon, B.S. (2002). 4-1BB promotes the survival of CD8⁺ T lymphocytes by increasing expression of Bcl-xL and Bfl-1. *J Immunol* 169, 4882-4888.
- Lee, J.H., Hornik, C.P., Benjamin, D.K., Jr., Herring, A.H., Clark, R.H., Cohen-Wolkowicz, M., and Smith, P.B. (2013). Risk factors for invasive candidiasis in infants >1500 g birth weight. *Pediatr Infect Dis J* 32, 222-226.
- Lee, S.C., Ju, S.A., Pack, H.N., Heo, S.K., Suh, J.H., Park, S.M., Choi, B.K., Kwon, B.S., and Kim, B.S. (2005). 4-1BB (CD137) is required for rapid clearance of *Listeria monocytogenes* infection. *Infect Immun* 73, 5144-5151.
- Li, M., Chen, Q., Tang, R., Shen, Y., and Liu, W.D. (2011). The expression of beta-defensin-2, 3 and LL-37 induced by *Candida albicans* phospholipomannan in human keratinocytes. *J Dermatol Sci* 61, 72-75.
- Li, R., Li, Y., Kristiansen, K., and Wang, J. (2008). SOAP: short oligonucleotide alignment program. *Bioinformatics* 24, 713-714.
- Liu, L., Li, Y., Li, S., Hu, N., He, Y., Pong, R., Lin, D., Lu, L., and Law, M. (2012). Comparison of next-generation sequencing systems. *J Biomed Biotechnol* 2012, 251364.
- Lo, H.J., Kohler, J.R., DiDomenico, B., Loebenberg, D., Cacciapuoti, A., and Fink, G.R. (1997). Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. *Cell* 90, 939-949.
- Lorenz, M.C., Bender, J.A., and Fink, G.R. (2004). Transcriptional response of *Candida albicans* upon internalization by macrophages. *Eukaryot Cell* 3, 1076-1087.
- Lott, T.J., Kuykendall, R.J., Welbel, S.F., Pramanik, A., and Lasker, B.A. (1993). Genomic heterogeneity in the yeast *Candida parapsilosis*. *Curr Genet* 23, 463-467.
- Lu, R., Maduro, M., Li, F., Li, H.W., Broitman-Maduro, G., Li, W.X., and Ding, S.W. (2005). Animal virus replication and RNAi-mediated antiviral silencing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 436, 1040-1043.
- Maciaszczyk-Dziubinska, E., Wawrzycka, D., Sloma, E., Migocka, M., and Wysocki, R. (2010). The yeast permease Acr3p is a dual arsenite and antimonite plasma membrane transporter. *Biochim Biophys Acta* 1798, 2170-2175.
- Magee, P.T. (2007). Genome structure and dynamics in *Candida albicans*. In *Candida: comparative and functional genomics.*, C. d'Enfert, and B. Hube, eds. (Norfolk, United Kingdom: Caister Academic Press), pp. 7-26.

- Magee, P.T., and Chibana, H. (2002). The genomes of *Candida albicans* and other *Candida* species. In *Candida and candidiasis.*, R.A. Calderone, ed. (Washington DC, USA: ASM Press), pp. 293-304.
- Magee, P.T., and Magee, B.B. (2004). Through a glass opaquely: the biological significance of mating in *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol* 7, 661-665.
- Mandlik, A., Livny, J., Robins, W.P., Ritchie, J.M., Mekalanos, J.J., and Waldor, M.K. (2011). RNA-Seq-based monitoring of infection-linked changes in *Vibrio cholerae* gene expression. *Cell Host Microbe* 10, 165-174.
- Mane, A., Gaikwad, S., Bembalkar, S., and Risbud, A. (2012). Increased expression of virulence attributes in oral *Candida albicans* isolates from human immunodeficiency virus-positive individuals. *J Med Microbiol* 61, 285-290.
- Mardis, E.R. (2008). The impact of next-generation sequencing technology on genetics. *Trends Genet* 24, 133-141.
- Mardon, D., Balish, E., and Phillips, A.W. (1969). Control of dimorphism in a biochemical variant of *Candida albicans*. *J Bacteriol* 100, 701-707.
- Margulies, M., Egholm, M., Altman, W.E., Attiya, S., Bader, J.S., Bemben, L.A., Berka, J., Braverman, M.S., Chen, Y.J., Chen, Z., *et al.* (2005). Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature* 437, 376-380.
- Marr, K.A., Lyons, C.N., Rustad, T.R., Bowden, R.A., and White, T.C. (1998). Rapid, transient fluconazole resistance in *Candida albicans* is associated with increased mRNA levels of *CDR*. *Antimicrob Agents Chemother* 42, 2584-2589.
- Martin, D.P., Lemey, P., Lott, M., Moulton, V., Posada, D., and Lefeuve, P. (2010). RDP3: a flexible and fast computer program for analyzing recombination. *Bioinformatics* 26, 2462-2463.
- McHeyzer-Williams, L.J., and McHeyzer-Williams, M.G. (2005). Antigen-specific memory B cell development. *Annu Rev Immunol* 23, 487-513.
- McKenna, A., Hanna, M., Banks, E., Sivachenko, A., Cibulskis, K., Kernytsky, A., Garimella, K., Altshuler, D., Gabriel, S., Daly, M., and DePristo, M.A. (2010). The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res* 20, 1297-1303.
- McKenzie, C.G., Koser, U., Lewis, L.E., Bain, J.M., Mora-Montes, H.M., Barker, R.N., Gow, N.A., and Erwig, L.P. (2010). Contribution of *Candida albicans* cell wall components to recognition by and escape from murine macrophages. *Infect Immun* 78, 1650-1658.
- Medrano, D.J., Brilhante, R.S., Cordeiro Rde, A., Rocha, M.F., Rabenhorst, S.H., and Sidrim, J.J. (2006). Candidemia in a Brazilian hospital: the importance of *Candida parapsilosis*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 48, 17-20.
- Meri, T., Hartmann, A., Lenk, D., Eck, R., Wurzner, R., Hellwage, J., Meri, S., and Zipfel, P.F. (2002). The yeast *Candida albicans* binds complement regulators factor H and FHL-1. *Infect Immun* 70, 5185-5192.
- Mestas, J., and Hughes, C.C. (2004). Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *J Immunol* 172, 2731-2738.
- Miliotis, M.D. (1991). Acridine orange stain for determining intracellular enteropathogens in HeLa cells. *J Clin Microbiol* 29, 830-831.
- Miyazawa, T., Yamamoto, M., and Danjo, H. (2013). Chemoselective acylation of (hydroxyalkyl)phenols catalyzed by *Candida antarctica* lipase B. *Biotechnol Lett* 35, 625-630.
- Mora, C., Tittensor, D.P., Adl, S., Simpson, A.G., and Worm, B. (2011). How many species are there on Earth and in the ocean? *PLoS Biol* 9, e1001127.

- Moran, C., Grussemeyer, C.A., Spalding, J.R., Benjamin, D.K., Jr., and Reed, S.D. (2009). *Candida albicans* and non-*albicans* bloodstream infections in adult and pediatric patients: comparison of mortality and costs. *Pediatr Infect Dis J* 28, 433-435.
- Moser, K., Tokoyoda, K., Radbruch, A., MacLennan, I., and Manz, R.A. (2006). Stromal niches, plasma cell differentiation and survival. *Curr Opin Immunol* 18, 265-270.
- Muskett, H., Shahin, J., Eyres, G., Harvey, S., Rowan, K., and Harrison, D. (2011). Risk factors for invasive fungal disease in critically ill adult patients: a systematic review. *Crit Care* 15, R287.
- Naglik, J.R., Challacombe, S.J., and Hube, B. (2003). *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev* 67, 400-428, table of contents.
- Naglik, J.R., Moyes, D., Makwana, J., Kanzaria, P., Tsihlaki, E., Weindl, G., Tappuni, A.R., Rodgers, C.A., Woodman, A.J., Challacombe, S.J., *et al.* (2008). Quantitative expression of the *Candida albicans* secreted aspartyl proteinase gene family in human oral and vaginal candidiasis. *Microbiology* 154, 3266-3280.
- Naglik, J.R., Moyes, D.L., Wachtler, B., and Hube, B. (2011). *Candida albicans* interactions with epithelial cells and mucosal immunity. *Microbes Infect* 13, 963-976.
- Nagy, I., Filkor, K., Nemeth, T., Hamari, Z., Vagvolgyi, C., and Gacser, A. (2011). *In vitro* interactions of *Candida parapsilosis* wild type and lipase deficient mutants with human monocyte derived dendritic cells. *BMC Microbiol* 11, 122.
- Nantel, A., Dignard, D., Bachewich, C., Harcus, D., Marcil, A., Bouin, A.P., Sensen, C.W., Hogues, H., van het Hoog, M., Gordon, P., *et al.* (2002). Transcription profiling of *Candida albicans* cells undergoing the yeast-to-hyphal transition. *Mol Biol Cell* 13, 3452-3465.
- Nawrot, U., Pajackowska, M., Fleischer, M., Przondo-Mordarska, H., Samet, A., Piasecka-Pazik, D., Komarnicka, J., Sulik-Tyszka, B., Swoboda-Kopiec, E., Cieslik, J., *et al.* (2013). Candidaemia in polish hospitals - a multicentre survey. *Mycoses*.
- Nemeth, T., Toth, A., Szenzenstein, J., Horvath, P., Nosanchuk, J.D., Grozer, Z., Toth, R., Papp, C., Hamari, Z., Vagvolgyi, C., and Gacser, A. (2013). Characterization of virulence properties in the *C. parapsilosis sensu lato* species. *PLoS One* 8, e68704.
- Neppelenbroek, K., Seo, R., Urban, V., Silva, S., Dovigo, L., Jorge, J., and Campanha, N. (2013). Identification of *Candida* species in the clinical laboratory: a review of conventional, commercial, and molecular techniques. *Oral Dis*.
- Netea, M.G., Brown, G.D., Kullberg, B.J., and Gow, N.A. (2008). An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system. *Nat Rev Microbiol* 6, 67-78.
- Netea, M.G., Gow, N.A., Munro, C.A., Bates, S., Collins, C., Ferwerda, G., Hobson, R.P., Bertram, G., Hughes, H.B., Jansen, T., *et al.* (2006). Immune sensing of *Candida albicans* requires cooperative recognition of mannans and glucans by lectin and Toll-like receptors. *J Clin Invest* 116, 1642-1650.
- Netea, M.G., van Tits, L.J., Curfs, J.H., Amiot, F., Meis, J.F., van der Meer, J.W., and Kullberg, B.J. (1999). Increased susceptibility of TNF-alpha lymphotoxin-alpha double knockout mice to systemic candidiasis through impaired recruitment of neutrophils and phagocytosis of *Candida albicans*. *J Immunol* 163, 1498-1505.
- Neu, N., Malik, M., Lunding, A., Whittier, S., Alba, L., Kubin, C., and Saiman, L. (2009). Epidemiology of candidemia at a Children's hospital, 2002 to 2006. *Pediatr Infect Dis J* 28, 806-809.
- Neugnot, V., Moulin, G., Dubreucq, E., and Bigey, F. (2002). The lipase/acyltransferase from *Candida parapsilosis*: molecular cloning and characterization of purified recombinant enzymes. *Eur J Biochem* 269, 1734-1745.
- Nucci, M., Queiroz-Telles, F., Alvarado-Matute, T., Tiraboschi, I.N., Cortes, J., Zurita, J., Guzman-Blanco, M., Santolaya, M.E., Thompson, L., Sifuentes-Osornio, J., *et al.* (2013).

- Epidemiology of candidemia in Latin America: a laboratory-based survey. *PLoS One* 8, e59373.
- O'Day, D.M., Head, W.S., Csank, C., Shetlar, D.J., Robinson, R.D., McCollum, G.W., Yang, R., Zhu, T.L., and Wang, M.X. (2000). Differences in virulence between two *Candida albicans* strains in experimental keratitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41, 1116-1121.
- Odds, F.C., Van Nuffel, L., and Gow, N.A. (2000). Survival in experimental *Candida albicans* infections depends on inoculum growth conditions as well as animal host. *Microbiology* 146 (Pt 8), 1881-1889.
- Oh, S.H., Cheng, G., Nuessen, J.A., Jajko, R., Yeater, K.M., Zhao, X., Pujol, C., Soll, D.R., and Hoyer, L.L. (2005). Functional specificity of *Candida albicans* Als3p proteins and clade specificity of ALS3 alleles discriminated by the number of copies of the tandem repeat sequence in the central domain. *Microbiology* 151, 673-681.
- Pammi, M., Holland, L., Butler, G., Gacser, A., and Bliss, J.M. (2013). *Candida parapsilosis* Is a Significant Neonatal Pathogen: A Systematic Review and Meta-analysis. *Pediatr Infect Dis J* 32, e206-216.
- Panagoda, G.J., Ellepola, A.N., and Samaranayake, L.P. (2001). Adhesion of *Candida parapsilosis* to epithelial and acrylic surfaces correlates with cell surface hydrophobicity. *Mycoses* 44, 29-35.
- Pappas, P.G., Rex, J.H., Sobel, J.D., Filler, S.G., Dismukes, W.E., Walsh, T.J., and Edwards, J.E. (2004). Guidelines for treatment of candidiasis. *Clin Infect Dis* 38, 161-189.
- Park, H., Myers, C.L., Sheppard, D.C., Phan, Q.T., Sanchez, A.A., J, E.E., and Filler, S.G. (2005). Role of the fungal Ras-protein kinase A pathway in governing epithelial cell interactions during oropharyngeal candidiasis. *Cell Microbiol* 7, 499-510.
- Parkhomchuk, D., Borodina, T., Amstislavskiy, V., Banaru, M., Hallen, L., Krobisch, S., Lehrach, H., and Soldatov, A. (2009). Transcriptome analysis by strand-specific sequencing of complementary DNA. *Nucleic Acids Res* 37, e123.
- Pereira, E., Figueira, C., Aguiar, N., Vasconcelos, R., Vasconcelos, S., Calado, G., Brandao, J., and Prada, S. (2013). Microbiological and mycological beach sand quality in a volcanic environment: Madeira archipelago, Portugal. *Sci Total Environ* 461-462C, 469-479.
- Perepnikhatka, V., Fischer, F.J., Niimi, M., Baker, R.A., Cannon, R.D., Wang, Y.K., Sherman, F., and Rustchenko, E. (1999). Specific chromosome alterations in fluconazole-resistant mutants of *Candida albicans*. *J Bacteriol* 181, 4041-4049.
- Pfaller, M.A., and Diekema, D.J. (2007). Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev* 20, 133-163.
- Pfaller, M.A., Diekema, D.J., Gibbs, D.L., Newell, V.A., Meis, J.F., Gould, I.M., Fu, W., Colombo, A.L., and Rodriguez-Noriega, E. (2007a). Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance study, 1997 to 2005: an 8.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* species and other yeast species to fluconazole and voriconazole determined by CLSI standardized disk diffusion testing. *J Clin Microbiol* 45, 1735-1745.
- Pfaller, M.A., Diekema, D.J., Procop, G.W., and Rinaldi, M.G. (2007b). Multicenter comparison of the VITEK 2 antifungal susceptibility test with the CLSI broth microdilution reference method for testing amphotericin B, flucytosine, and voriconazole against *Candida* spp. *J Clin Microbiol* 45, 3522-3528.
- Phan, Q.T., Fratti, R.A., Prasadara, N.V., Edwards, J.E., Jr., and Filler, S.G. (2005). N-cadherin mediates endocytosis of *Candida albicans* by endothelial cells. *J Biol Chem* 280, 10455-10461.
- Pryszcz, L.P., Huerta-Cepas, J., and Gabaldon, T. (2011). MetaPhOrs: orthology and paralogy predictions from multiple phylogenetic evidence using a consistency-based confidence score. *Nucleic Acids Res* 39, e32.

- Pugh, D., and Cawson, R.A. (1977). The cytochemical localization of phospholipase in *Candida albicans* infecting the chick chorio-allantoic membrane. *Sabouraudia* 15, 29-35.
- Qian, Q., Jutila, M.A., Van Rooijen, N., and Cutler, J.E. (1994). Elimination of mouse splenic macrophages correlates with increased susceptibility to experimental disseminated candidiasis. *J Immunol* 152, 5000-5008.
- Querol, A., and Bond, U. (2009). The complex and dynamic genomes of industrial yeasts. *FEMS Microbiol Lett* 293, 1-10.
- Rahman, D., Mistry, M., Thavaraj, S., Naglik, J.R., and Challacombe, S.J. (2012). Murine model of concurrent oral and vaginal *Candida albicans* colonisation. *Methods Mol Biol* 845, 527-535.
- Ramage, G., Martinez, J.P., and Lopez-Ribot, J.L. (2006). *Candida* biofilms on implanted biomaterials: a clinically significant problem. *FEMS Yeast Res* 6, 979-986.
- Ramage, G., Tomsett, K., Wickes, B.L., Lopez-Ribot, J.L., and Redding, S.W. (2004). Denture stomatitis: a role for *Candida* biofilms. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 98, 53-59.
- Rausch, T., Zichner, T., Schlattl, A., Stutz, A.M., Benes, V., and Korbel, J.O. (2012). DELLY: structural variant discovery by integrated paired-end and split-read analysis. *Bioinformatics* 28, i333-i339.
- Richter, D.C., Schuster, S.C., and Huson, D.H. (2007). OSLay: optimal syntenic layout of unfinished assemblies. *Bioinformatics* 23, 1573-1579.
- Riggle, P.J., Andrutis, K.A., Chen, X., Tzipori, S.R., and Kumamoto, C.A. (1999). Invasive lesions containing filamentous forms produced by a *Candida albicans* mutant that is defective in filamentous growth in culture. *Infect Immun* 67, 3649-3652.
- Rinkevich, B. (2004). Primitive immune systems: are your ways my ways? *Immunol Rev* 198, 25-35.
- Rodriguez, D., Almirante, B., Park, B.J., Cuenca-Estrella, M., Planes, A.M., Sanchez, F., Gene, A., Xercavins, M., Fontanals, D., Rodriguez-Tudela, J.L., *et al.* (2006). Candidemia in neonatal intensive care units: Barcelona, Spain. *Pediatr Infect Dis J* 25, 224-229.
- Romagnani, S. (2000). T-cell subsets (Th1 versus Th2). *Ann Allergy Asthma Immunol* 85, 9-18; quiz 18, 21.
- Romani, L., Mencacci, A., Cenci, E., Spaccapelo, R., Toniatti, C., Puccetti, P., Bistoni, F., and Poli, V. (1996). Impaired neutrophil response and CD4⁺ T helper cell 1 development in interleukin 6-deficient mice infected with *Candida albicans*. *J Exp Med* 183, 1345-1355.
- Romani, L., Montagnoli, C., Bozza, S., Perruccio, K., Spreca, A., Allavena, P., Verbeek, S., Calderone, R.A., Bistoni, F., and Puccetti, P. (2004). The exploitation of distinct recognition receptors in dendritic cells determines the full range of host immune relationships with *Candida albicans*. *Int Immunol* 16, 149-161.
- Rossignol, T., Ding, C., Guida, A., d'Enfert, C., Higgins, D.G., and Butler, G. (2009). Correlation between biofilm formation and the hypoxic response in *Candida parapsilosis*. *Eukaryot Cell* 8, 550-559.
- Rudek, W. (1978). Esterase activity in *Candida* species. *J Clin Microbiol* 8, 756-759.
- Ruhnke, M., Rickerts, V., Cornely, O.A., Buchheidt, D., Glockner, A., Heinz, W., Hohl, R., Horre, R., Karthaus, M., Kujath, P., *et al.* (2011). Diagnosis and therapy of *Candida* infections: joint recommendations of the German Speaking Mycological Society and the Paul-Ehrlich-Society for Chemotherapy. *Mycoses* 54, 279-310.
- Rustchenko, E. (2007). Chromosome instability in *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res* 7, 2-11.
- Saiman, L., Ludington, E., Dawson, J.D., Patterson, J.E., Rangel-Frausto, S., Wiblin, R.T., Blumberg, H.M., Pfaller, M., Rinaldi, M., Edwards, J.E., *et al.* (2001). Risk factors for

- Candida* species colonization of neonatal intensive care unit patients. *Pediatr Infect Dis J* 20, 1119-1124.
- Sampaio, P., Santos, M., Correia, A., Amaral, F.E., Chavez-Galarza, J., Costa-de-Oliveira, S., Castro, A.G., Pedrosa, J., and Pais, C. (2010). Virulence attenuation of *Candida albicans* genetic variants isolated from a patient with a recurrent bloodstream infection. *PLoS One* 5, e10155.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 5463-5467.
- Sarma, J.V., and Ward, P.A. (2011). The complement system. *Cell Tissue Res* 343, 227-235.
- Sato, M., Tsuchiya, H., Akagiri, M., Fujiwara, S., Fujii, T., Takagi, N., Matsuura, N., and Iinuma, M. (1994). Growth inhibitory properties of chalcones to *Candida*. *Letters in Applied Microbiology* 18, 53-55.
- Schaller, M., Bein, M., Korting, H.C., Baur, S., Hamm, G., Monod, M., Beinhauer, S., and Hube, B. (2003a). The secreted aspartyl proteinases Sap1 and Sap2 cause tissue damage in an *in vitro* model of vaginal candidiasis based on reconstituted human vaginal epithelium. *Infect Immun* 71, 3227-3234.
- Schaller, M., Borelli, C., Korting, H.C., and Hube, B. (2005). Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. *Mycoses* 48, 365-377.
- Schaller, M., Krnjaic, N., Niewerth, M., Hamm, G., Hube, B., and Korting, H.C. (2003b). Effect of antimycotic agents on the activity of aspartyl proteinases secreted by *Candida albicans*. *J Med Microbiol* 52, 247-249.
- Schena, M., Shalon, D., Davis, R.W., and Brown, P.O. (1995). Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 270, 467-470.
- Schena, M., Shalon, D., Heller, R., Chai, A., Brown, P.O., and Davis, R.W. (1996). Parallel human genome analysis: microarray-based expression monitoring of 1000 genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 10614-10619.
- Schnappinger, D., Ehrt, S., Voskuil, M.I., Liu, Y., Mangan, J.A., Monahan, I.M., Dolganov, G., Efron, B., Butcher, P.D., Nathan, C., and Schoolnik, G.K. (2003). Transcriptional Adaptation of *Mycobacterium tuberculosis* within Macrophages: Insights into the Phagosomal Environment. *J Exp Med* 198, 693-704.
- Schwartz, D.C., and Cantor, C.R. (1984). Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell* 37, 67-75.
- Schwarzenberger, P., La Russa, V., Miller, A., Ye, P., Huang, W., Zieske, A., Nelson, S., Bagby, G.J., Stoltz, D., Mynatt, R.L., *et al.* (1998). IL-17 stimulates granulopoiesis in mice: use of an alternate, novel gene therapy-derived method for *in vivo* evaluation of cytokines. *J Immunol* 161, 6383-6389.
- Selmecki, A., Bergmann, S., and Berman, J. (2005). Comparative genome hybridization reveals widespread aneuploidy in *Candida albicans* laboratory strains. *Mol Microbiol* 55, 1553-1565.
- Selmecki, A., Forche, A., and Berman, J. (2006). Aneuploidy and isochromosome formation in drug-resistant *Candida albicans*. *Science* 313, 367-370.
- Selsted, M.E., and Martinez, R.J. (1978). Lysozyme: primary bactericidin in human plasma serum active against *Bacillus subtilis*. *Infect Immun* 20, 782-791.
- Seok, J., Warren, H.S., Cuenca, A.G., Mindrinos, M.N., Baker, H.V., Xu, W., Richards, D.R., McDonald-Smith, G.P., Gao, H., Hennessy, L., *et al.* (2013). Genomic responses in mouse models poorly mimic human inflammatory diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 3507-3512.
- Sessions, O.M., Tan, Y., Goh, K.C., Liu, Y., Tan, P., Rozen, S., and Ooi, E.E. (2013). Host cell transcriptome profile during wild-type and attenuated dengue virus infection. *PLoS Negl Trop Dis* 7, e2107.

- Shanks, N., Greek, R., and Greek, J. (2009). Are animal models predictive for humans? *Philos Ethics Humanit Med* 4, 2.
- Silhavy, D., and Burgyan, J. (2004). Effects and side-effects of viral RNA silencing suppressors on short RNAs. *Trends Plant Sci* 9, 76-83.
- Smith, K.A. (1984). Interleukin 2. *Annu Rev Immunol* 2, 319-333.
- Smith, W.L., DeWitt, D.L., and Garavito, R.M. (2000). Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annu Rev Biochem* 69, 145-182.
- Staden, R. (1979). A strategy of DNA sequencing employing computer programs. *Nucleic Acids Res* 6, 2601-2610.
- Staib, P., Kretschmar, M., Nichterlein, T., Hof, H., and Morschhauser, J. (2000). Differential activation of a *Candida albicans* virulence gene family during infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 6102-6107.
- Stanke, M., Keller, O., Gunduz, I., Hayes, A., Waack, S., and Morgenstern, B. (2006). AUGUSTUS: *ab initio* prediction of alternative transcripts. *Nucleic Acids Res* 34, W435-439.
- Stehr, F., Felk, A., Gacser, A., Kretschmar, M., Mahnss, B., Neuber, K., Hube, B., and Schafer, W. (2004). Expression analysis of the *Candida albicans* lipase gene family during experimental infections and in patient samples. *FEMS Yeast Res* 4, 401-408.
- Sun, J.N., Solis, N.V., Phan, Q.T., Bajwa, J.S., Kashleva, H., Thompson, A., Liu, Y., Dongari-Bagtzoglou, A., Edgerton, M., and Filler, S.G. (2010). Host cell invasion and virulence mediated by *Candida albicans* Ssa1. *PLoS Pathog* 6, e1001181.
- Suzuki, T., Ohno, N., Ohshima, Y., and Yadomae, T. (1998). Soluble mannan and beta-glucan inhibit the uptake of *Malassezia furfur* by human monocytic cell line, THP-1. *FEMS Immunol Med Microbiol* 21, 223-230.
- Swain, S.L. (1983). T cell subsets and the recognition of MHC class. *Immunol Rev* 74, 129-142.
- Szostak, J.W., and Wu, R. (1980). Unequal crossing over in the ribosomal DNA of *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 284, 426-430.
- Taschdjian, C.L., Burchall, J.J., and Kozinn, P.J. (1960). Rapid identification of *Candida albicans* by filamentation on serum and serum substitutes. *AMA J Dis Child* 99, 212-215.
- Tavanti, A., Davidson, A.D., Gow, N.A., Maiden, M.C., and Odds, F.C. (2005). *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* groups II and III. *J Clin Microbiol* 43, 284-292.
- Tierney, L., Linde, J., Muller, S., Brunke, S., Molina, J.C., Hube, B., Schock, U., Guthke, R., and Kuchler, K. (2012). An Interspecies Regulatory Network Inferred from Simultaneous RNA-seq of *Candida albicans* Invading Innate Immune Cells. *Front Microbiol* 3, 85.
- Tock, M.R., and Dryden, D.T. (2005). The biology of restriction and anti-restriction. *Curr Opin Microbiol* 8, 466-472.
- Tortorano, A.M., Prigitano, A., Lazzarini, C., Passera, M., Deiana, M.L., Cavinato, S., De Luca, C., Grancini, A., Lo Cascio, G., Ossi, C., *et al.* (2013). A 1-year prospective survey of candidemia in Italy and changing epidemiology over one decade. *Infection* 41, 655-662.
- Trapnell, C., Pachter, L., and Salzberg, S.L. (2009). TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq. *Bioinformatics* 25, 1105-1111.
- Trapnell, C., Williams, B.A., Pertea, G., Mortazavi, A., Kwan, G., van Baren, M.J., Salzberg, S.L., Wold, B.J., and Pachter, L. (2010). Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. *Nat Biotechnol* 28, 511-515.
- Trofa, D., Gacser, A., and Nosanchuk, J.D. (2008). *Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen. *Clin Microbiol Rev* 21, 606-625.

- Tzung, K.W., Williams, R.M., Scherer, S., Federspiel, N., Jones, T., Hansen, N., Bivolarevic, V., Huizar, L., Komp, C., Surzycki, R., *et al.* (2001). Genomic evidence for a complete sexual cycle in *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 3249-3253.
- Ullu, E., Tschudi, C., and Chakraborty, T. (2004). RNA interference in protozoan parasites. *Cell Microbiol* 6, 509-519.
- Urban, C.F., Ermert, D., Schmid, M., Abu-Abed, U., Goosmann, C., Nacken, W., Brinkmann, V., Jungblut, P.R., and Zychlinsky, A. (2009). Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*. *PLoS Pathog* 5, e1000639.
- Valach, M., Prysycz, L.P., Tomaska, L., Gacser, A., Gabaldon, T., and Nosek, J. (2012). Mitochondrial genome variability within the *Candida parapsilosis* species complex. *Mitochondrion* 12, 514-519.
- van 't Wout, J.W., Linde, I., Leijh, P.C., and van Furth, R. (1988). Contribution of granulocytes and monocytes to resistance against experimental disseminated *Candida albicans* infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 7, 736-741.
- van de Veerdonk, F.L., Plantinga, T.S., Hoischen, A., Smeekens, S.P., Joosten, L.A., Gilissen, C., Arts, P., Rosentul, D.C., Carmichael, A.J., Smits-van der Graaf, C.A., *et al.* (2011). *STAT1* mutations in autosomal dominant chronic mucocutaneous candidiasis. *N Engl J Med* 365, 54-61.
- van Enckevort, F.H., Netea, M.G., Hermus, A.R., Sweep, C.G., Meis, J.F., Van der Meer, J.W., and Kullberg, B.J. (1999). Increased susceptibility to systemic candidiasis in interleukin-6 deficient mice. *Med Mycol* 37, 419-426.
- van Rij, N.J., and Verona, O. (1949). Sopra alcuni lieviti delle olive. *Atti Accad Naz Lincei* 7, 249-253.
- Varghese, G.M., and Sobel, J.D. (2008). Fungal endocarditis. *Curr Infect Dis Rep* 10, 275-279.
- Vazquez-Torres, A., Jones-Carson, J., and Balish, E. (1996). Peroxynitrite contributes to the candidacidal activity of nitric oxide-producing macrophages. *Infect Immun* 64, 3127-3133.
- Vazquez, N., Walsh, T.J., Friedman, D., Chanock, S.J., and Lyman, C.A. (1998). Interleukin-15 augments superoxide production and microbicidal activity of human monocytes against *Candida albicans*. *Infect Immun* 66, 145-150.
- Venter, J.C., Adams, M.D., Myers, E.W., Li, P.W., Mural, R.J., Sutton, G.G., Smith, H.O., Yandell, M., Evans, C.A., Holt, R.A., *et al.* (2001). The sequence of the human genome. *Science* 291, 1304-1351.
- Vinay, D.S., and Kwon, B.S. (2011). 4-1BB signaling beyond T cells. *Cell Mol Immunol* 8, 281-284.
- Wang, H., Kong, F., Sorrell, T.C., Wang, B., McNicholas, P., Pantarat, N., Ellis, D., Xiao, M., Widmer, F., and Chen, S.C. (2009a). Rapid detection of *ERG11* gene mutations in clinical *Candida albicans* isolates with reduced susceptibility to fluconazole by rolling circle amplification and DNA sequencing. *BMC Microbiol* 9, 167.
- Wang, Z., Gerstein, M., and Snyder, M. (2009b). RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet* 10, 57-63.
- Warrilow, A.G., Mullins, J.G., Hull, C.M., Parker, J.E., Lamb, D.C., Kelly, D.E., and Kelly, S.L. (2012). S279 point mutations in *Candida albicans* Sterol 14-alpha demethylase (CYP51) reduce *in vitro* inhibition by fluconazole. *Antimicrob Agents Chemother* 56, 2099-2107.
- Weindl, G., Naglik, J.R., Kaesler, S., Biedermann, T., Hube, B., Korting, H.C., and Schaller, M. (2007). Human epithelial cells establish direct antifungal defense through TLR4-mediated signaling. *J Clin Invest* 117, 3664-3672.

- Weissenmayer, B.A., Prendergast, J.G., Lohan, A.J., and Loftus, B.J. (2011). Sequencing illustrates the transcriptional response of *Legionella pneumophila* during infection and identifies seventy novel small non-coding RNAs. PLoS One 6, e17570.
- Wilkening, S., Tekkedil, M.M., Lin, G., Fritsch, E.S., Wei, W., Gagneur, J., Lazinski, D.W., Camilli, A., and Steinmetz, L.M. (2013). Genotyping 1000 yeast strains by next-generation sequencing. BMC Genomics 14, 90.
- Wilson, D., and Hube, B. (2010). Hgc1 mediates dynamic *Candida albicans*-endothelium adhesion events during circulation. Eukaryot Cell 9, 278-287.
- Wisplinghoff, H., Bischoff, T., Tallent, S.M., Seifert, H., Wenzel, R.P., and Edmond, M.B. (2004). Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. Clin Infect Dis 39, 309-317.
- Xess, I., Jain, N., Hasan, F., Mandal, P., and Banerjee, U. (2007). Epidemiology of candidemia in a tertiary care centre of north India: 5-year study. Infection 35, 256-259.
- Ye, P., Rodriguez, F.H., Kanaly, S., Stocking, K.L., Schurr, J., Schwarzenberger, P., Oliver, P., Huang, W., Zhang, P., Zhang, J., et al. (2001). Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXCL chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense. J Exp Med 194, 519-527.
- Yoshikai, Y., and Nishimura, H. (2000). The role of interleukin 15 in mounting an immune response against microbial infections. Microbes Infect 2, 381-389.
- Zakikhany, K., Naglik, J.R., Schmidt-Westhausen, A., Holland, G., Schaller, M., and Hube, B. (2007). In vivo transcript profiling of *Candida albicans* identifies a gene essential for interepithelial dissemination. Cell Microbiol 9, 2938-2954.
- Zhao, X., Oh, S.H., Coleman, D.A., and Hoyer, L.L. (2011). ALS51, a newly discovered gene in the *Candida albicans* ALS family, created by intergenic recombination: analysis of the gene and protein, and implications for evolution of microbial gene families. FEMS Immunol Med Microbiol 61, 245-257.
- Zheng, X., and Wang, Y. (2004). Hgc1, a novel hypha-specific G1 cyclin-related protein regulates *Candida albicans* hyphal morphogenesis. EMBO J 23, 1845-1856.
- Zhou, H., DeLoid, G., Browning, E., Gregory, D.J., Tan, F., Bedugnis, A.S., Imrich, A., Koziel, H., Kramnik, I., Lu, Q., and Kobzik, L. (2012). Genome-wide RNAi screen in IFN-gamma-treated human macrophages identifies genes mediating resistance to the intracellular pathogen *Francisella tularensis*. PLoS One 7, e31752.
- Zhu, H., Cong, J.P., Mamtora, G., Gingeras, T., and Shenk, T. (1998). Cellular gene expression altered by human cytomegalovirus: global monitoring with oligonucleotide arrays. Proc Natl Acad Sci U S A 95, 14470-14475.
- Zhu, W., and Filler, S.G. (2010). Interactions of *Candida albicans* with epithelial cells. Cell Microbiol 12, 273-282.
- Zotova, L., Aleschko, M., Sponder, G., Baumgartner, R., Reipert, S., Prinz, M., Schweyen, R.J., and Nowikovsky, K. (2010). Novel components of an active mitochondrial K(+)/H(+) exchange. J Biol Chem 285, 14399-14414.

10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

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

Hálásan köszönöm témavezetőmnek Dr. Gácsér Attila tudományos főmunkatársnak, hogy a csoportja része lehettem, és ezzel magas színvonalú kutatómunkában vehettem részt. Köszönöm továbbá irányadó tanácsait, segítségét és hogy a változatos kutatási témák révén számos gyakorlati technikával és eljárással gazdagodhatott a tudásom.

Köszönettel tartozom Dr. Hamari Zsuzsannának, Dr. Pfeiffer Ilonának, Dr. Galgóczy Lászlónak és Dr. Kocsubé Sándornak, a pulzáltatott terű gélelektroforézis, a Southern hibridizáció és a polimeráz láncreakciók optimalizálásával kapcsolatos tanácsaikért.

Köszönöm Dr. Sinka Ritának a fluoreszcens mikroszkópos, Petkovits Tamás kollégámnak a scanning elektronmikroszkópos, Csordás Gábor barátomnak a konfokális fluoreszcens mikroszkópos felvételek elkészítéséhez nyújtott segítségüket.

Köszönet illeti valamennyi kollaborációs partnerünket, így Prof. Dr. Falus András és Éder Katalin tudományos munkatársat az RNS microarray elvégzésében nyújtott segítségükért, Joshua D. Nosanchuk-ot értékes tanácsaiért és a publikációink előzetes minősítéséért, Oscar Zaragoza-t a fagoszóma – lizoszóma kolokalizációs vizsgálatban nyújtott segítségével, Dr. Toni Gabaldón-t és Leszek P. Pryszcz-et a genom szekvenálásban és az RNAseq vizsgálatban való közreműködésükért.

Hálával tartozom Lele Máriának és Deákné Kulcsár Melindának a sok technikai segítségért, Dr. Palágyi Andrásnénak, Kreisch Istvánnának, Szőnyi Jánosnének és Lengyel Boglárkának a munkámmal kapcsolatos gazdasági ügyek intézéséért.

Köszönöm minden jelenlegi és egykori kollégámnak: technikusunknak Dávid Edinának, PhD hallgató kollégáimnak: Csonka Katalinnak, Grózer Zsuzsannának, Szenzenstein Juditnak, Tóth Adélnek, Tóth Renátának, Horváth Péternek, Papp Csabának, Luis Antonio Pérez García-nak, MSC hallgatóinknak: Papp Henriettának, Riba Adriennek, BSC hallgatóinknak: Bernátsky Reginának, Berta Bálintnak, Molnár Gergőnek segítségüket és a labor kellemes légkörét.

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

Szeretném megköszönni családomnak: Édesanyámnak és Édesapámnak, Testvéremnek, Zsuzsikának, Nagymamámnak valamint Nagybátyáimnak, Ottónak és Dezsinek, továbbá családjaiknak és minden rokonomnak a támogatást és a biztatást.

Köszönet illeti valamennyi középiskolai tanáromat, elsősorban Dr. Mező Tamást (fizika), Prókai Szilvesztert (kémia), hogy megszerettették velem a természettudományokat. Hálásan köszönöm Dr. Kiss Istvánnénak (biokémia) és főleg Gál Béla Tanár Úrnak (biológia-biokémia), hogy az országban talán a legmagasabb szinten Tőlük tanulhattam a biológia alaptörvényeiről, összefüggéseiről, szépségéről. Ők azok a kiváló oktatók, akik megszerették velem ezt a tudományt, és akik nélkül jelen értekezésben szereplő eredmények valószínűleg valaki más nevéhez fűződnének.

Köszönöm Csordás Gábor PhD hallgatónak immáron 15 évet átívelő barátságát, a biológiáról, tudományról és egyéb témákról folytatott beszélgetéseinket, és hogy szakértelmével Ő is hozzájárult dolgozatom elkészültéhez.

Végezetül szeretnék köszönetet mondani a Sportnak, amely mindannapjaim részévé vált. A Sportnak, amely fizikai és szellemi kitartásra nevel, aminek nagy hasznát vettem/veszem nem csak a munka, hanem az élet egyéb területein is.

11. MELLÉKLETEK

1. számú melléklet. A valós idejű PCR során használt primerek.

Primer neve	Szekvenciája (5'→3')
HsB2Mgβ_ReTi_FOR	CCGTGTGAACCATGTGACTTTGTC
HsB2Mgβ_ReTi_REV	GCTGCTTACATGTCTCGATCCC
HsTnfrsf-9_ReTi_FOR	TCTGTGCGACCCTGGACAAACTG
HsTnfrsf-9_ReTi_REV	CTCCTTCGTCCCATTACACAAGC
MmActβ_ReTi_FOR	ACAGCTTCTTTGCAGCTCCTTCG
MmActβ_ReTi_REV	ATCGTCATCCATGGCGAACTGGTG
MmCD-83_ReTi_FOR	TGGCAACTCTACTGGGCTGTTAC
MmCD-83_ReTi_REV	ATGACAGGCATTCGCTCAGCTC
MmIL1β_ReTi_FOR	CCTGTGTAATGAAAGACGGCACAC
MmIL1β_ReTi_REV	ATTGCTTGGGATCCACACTCTCC
MmIL15_ReTi_FOR	ATAACCAGCCTACAGGAGGCCAAG
MmIL15_ReTi_REV	AGATGAGCTGGCTATGGCGATG
MmPTGS-2_ReTi_FOR	AGCCAGGCAGCAAATCCTTG
MmPTGS-2_ReTi_REV	ACTGGTCAAATCCTGTGCTCATAC
MmTNFα_ReTi_FOR	AAGATGCTGGGACAGTGACCTG
MmTNFα_ReTi_REV	AGGCTCCAGTGAATTCGGAAAGC
MmTnfrsf-9_ReTi_FOR	CGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTG
MmTnfrsf-9_ReTi_REV	ACCAACCCTTTCTCTTCTGACCTC

2. számú melléklet. Az *ALS* génekre tervezett primerek nevei és szekvenciái.

Primer neve	Szekvenciája (5'→3')
CpAG_00368_FOR	AGAACAGGAATCTAGTTCGG
CpAG_00368_REV	TCACTACTTGACGCTGTC
CpAG_00369_FOR	TTCAACAATCGTGTTGTTCC
CpAG_00369_REV	ATTGATTGTGAGTTGTCACG
CpAG_05054_FOR	ACAGGAAGTTACACTACTACG
CpAG_05054_REV	GTGCTAGTTTCACTTGATGG
CpAG_05056_FOR	TCGAAGATCGACTCATGC
CpAG_05056_REV	TGAGTCTGAGTGTGAAGC
CpAG_05314_FOR	CCAAGTTGGATTGCAACC
CpAG_05314_REV	GTATGTGTTGGTGTAAGCAG

3a. számú melléklet. A deléciók PCR alapú validálásához használt primerek nevei és szekvenciái.

Primer neve	Szekvenciája (5'→3')
CpDelReg-1_FOR-1	CTTACAACCTTCGTTCAAGC
CpDelReg-1_REV-1	GTAACCATTTGGACACGTG
CpDelReg-1_FOR-2	GAACCCCTTTAACTCCTAG
CpDelReg-1_REV-2	GTAATAGCTGAGTGAAGAGC
CpDelReg-2_FOR-1	TAGCTATCGGAGAACTCAC
CpDelReg-2_REV-1	CATACGTTTGAGGTTAGTGG
CpDelReg-2_FOR-2	ACACTTTGTGCGATATGGTG
CpDelReg-2_REV-2	ATGTGCTGTTTGCCAGCATC
CpDelReg-3_FOR-1	CCAAGCACTACTACAACTGC
CpDelReg-3_REV-1	ACATGTTGTGTATGTATGTG
CpDelReg-3_FOR-2	CATGATAGAGACTGCAACC
CpDelReg-3_REV-2	ATTGTTGGTTGTACGTCTCG
CpDelReg-4_FOR-1	ATCATTGGCGTCTGAGCAG
CpDelReg-4_REV-1	TGCTGGATGGAGATGGTTG
CpDelReg-4_FOR-2	TGGCTGTGAGAGGATGATCG
CpDelReg-4_REV-2	ATGGTGTTGATGATGCCTAC
CpDelReg-5_FOR-1	TCGCAATCCGGTGTACCTG
CpDelReg-5_REV-1	ATCTGCTGTTGCCTCTGC
CpDelReg-5_FOR-2	ACAACAAGTCTGTAGATGTAC
CpDelReg-5_REV-2	ACAAACGAATCATTTCATCG
CpDelReg-6_FOR-1	ATGGGGTATCCAGACATCC
CpDelReg-6_REV-1	GTTGAAGCAATATCCGATTAGG
CpDelReg-6_FOR-2	TCCGAAGTCTTCGTAGCAC
CpDelReg-6_REV-2	ATCCCATAACTTACGAGGTC
CpDelReg-7_FOR-1	GAACCATCGTTGGAAGCATC
CpDelReg-7_REV-1	AACAAGCATGATGACACGATG
CpDelReg-7_FOR-2	AGGTATCTCCGTGAAGTGTC
CpDelReg-7_REV-2	TGCATGCAACTCTTCTTGC
CpDelReg-8_FOR-1	TGTAAGAGTGCAATAGTTGG
CpDelReg-8_REV-1	TTCAAATCCACACCCAGGTC
CpDelReg-8_FOR-2	GAAGTATCGAAGGCCAACTG
CpDelReg-8_REV-2	GCTTGAAGTCAATGCTCAACC
CpDelReg-9_FOR-1	AAGAATACAAGTATTTGCCTTGC
CpDelReg-9_REV-2	ACTGTACTGATTGAGAAGGAC
CpDelReg-10_FOR-1	TGTTGTAGAGGTACCAGATAC
CpDelReg-10_REV-2	ACAACATCTGCACCTGCAG

3b. számú melléklet. A deléciók PCR alapú validálásához használt primerek nevei és szekvenciái.

Primer neve	Szekvenciája (5'→3')
CpDelReg-11_FOR-1 CpDelReg-11_REV-2	GACGACGATGAAGAGTGTG CTTGAACCACTGGATCCAC
CpDelReg-12_FOR-1 CpDelReg-12_REV-2	CAATGTAGGTGCAATTGTAGG GCAAGATCTAAACGAGATTCG
CpDelReg-13_FOR-1 CpDelReg-13_REV-2	TGCCAACTACTTCAATTCGAC GCAAGCACCTAACAACAGC
CpDelReg-14_FOR-1 CpDelReg-14_REV-2	CCAGCAAGCACAGGTGC ATGGAGAACCATGATACGATG
CpDelReg-15_FOR-1 CpDelReg-15_REV-2	GTTGATTGAGTTGAGCTTCAG GATGGTTAGTGATTACTCTTCG
CpDelReg-16_FOR-1 CpDelReg-16_REV-2	AAGCCTATCACTGCCAAGCAG AAGTAACTAAAGACATGTGC
CpDelReg-17_FOR-1 CpDelReg-17_REV-2	CATGGAAGAATACACTACCAG CATCTTGAAACACGATTGATGG
CpDelReg-18_FOR-1 CpDelReg-18_REV-2	CTTGAAGACCCAGTTGAGG CTACCACCACTTCATCAGG
CpDelReg-19_FOR-1 CpDelReg-19_REV-2	TGGAATACACTCAGCAACC TGAGTCCACCAGAGCTTG
CpDelReg-20_FOR-1 CpDelReg-20_REV-2	TGTTATCCGAGTCAGTCATG TCCAAGCTCTTCCTTCAC

4a. számú melléklet. A validációs PCR-ek reakciókörülményei. A PCR1 és PCR2 amplikonok csak vad típusú templát esetén értelmezhetők.

Régió/ Reakciók	Termék méret (bázispár)	Annealing hőmérséklet (°C)	Elongációs idő (sec)
DEL#1			
PCR1	609	56	80
PCR2	595	56	80
PCR3 (WT/Δ)	24161/686	58	80
DEL#2			
PCR1	1250	56	80
PCR2	1045	56	80
PCR3 (WT/Δ)	12247/674	56	80
DEL#3			
PCR1	875	57	80
PCR2	811	57	80
PCR3 (WT/Δ)	10717/909	57	80
DEL#4			
PCR1	1089	56	80
PCR2	516	56	80
PCR3 (WT/Δ)	3425/578	56	100
DEL#5			
PCR1	986	56	80
PCR2	858	56	80
PCR3 (WT/Δ)	1931/291	56	80
DEL#6			
PCR1	965	56	80
PCR2	1090	56	80
PCR3 (WT/Δ)	2308/713	56	100
DEL#7			
PCR1	1020	60	80
PCR2	787	57	80
PCR3 (WT/Δ)	1932/435	57	80
DEL#8			
PCR1	818	60	80
PCR2	902	60	80
PCR3 (WT/Δ)	1543/275	58	80/30
DEL#9			
PCR3 (WT/Δ)	853/499	58	80
DEL#10			
PCR3 (WT/Δ)	1104/869	58	80
DEL#11			
PCR3 (WT/Δ)	1118/977	58	80
DEL#12			
PCR3 (WT/Δ)	1092/960	58	80

4b. számú melléklet. A validációs PCR-ek reakciókörülményei. A PCR1 és PCR2 amplikonok csak vad típusú templát esetén értelmezhetők.

Régió/ Reakciók	Termék méret (bázispár)	Annealing hőmérséklet (°C)	Elongációs idő (sec)
DEL#13			
PCR3 (WT/Δ)	1220/1115	58	80
DEL#14			
PCR3 (WT/Δ)	1298/1203	58	80
DEL#15			
PCR3 (WT/Δ)	1258/1199	58	80
DEL#16			
PCR3 (WT/Δ)	394/351	58	80
DEL#17			
PCR3 (WT/Δ)	1430/1391	58	80
DEL#18			
PCR3 (WT/Δ)	149/115	58	15
DEL#19			
PCR3 (WT/Δ)	140/122	58	15
DEL#20			
PCR3 (WT/Δ)	118/101	58	15

5. számú melléklet. A DIG-dUTP jelölt Southern hibridizációs próbák előállításához használt primerek nevei és szekvenciái.

Primer neve	Szekvenciája (5'→3')
CpDR3SouDwn_FOR	GGACACAACCTTCCTCAAGC
CpDR3SouDwn_REV	ATGCTTGGATGGATGAGAC
CpDR5SouUp_FOR	CATGAATGAGCGTGTTCTGC
CpDR5SouUp_REV	GTTGGCTCACACTCAGGTG
CpDR6SouUp_FOR	CATTGATTGCGTTAGTGACC
CpDR6SouUp_REV	AACTCCCTACGGACTCGATG

6. számú melléklet. A DIG-dUTP jelölt Southern hibridizációs próbák méretei és a szintézisükkor alkalmazott reakciókörülmények. (Egy egység alatt azt a DIG-dUTP mennyiséget értjük, amelynek használatát a gyártó egyetlen reakcióban javasolja.)

Régió/ Reakció	Termék méret (bázispár)	Annealing hőmérséklet (°C)	Elongációs idő (sec)	DIG-dUTP (egység)
Deléció -3	881	52	80	2/3
Deléció -5	866	55	80	1
Deléció -6	529	57	80	1

7. számú melléklet. A szekvenálás és az *in silico* analízis során használt módszerek részletes leírása.

Genom szekvenálás: A genomi DNS fragmentálása ultrahangos szonikátor segítségével történt, amely ~400-600 bp-os szakaszokat eredményezett. A DNS fragmentumok tompa végűvé alakításához T4 DNS polimerázt (New England Biolabs) és Klenow fragmentumot (New England Biolabs) használtunk. A mintákat tisztítást (Qiagen QIAquick PCR purification kit, a gyártó utasításai szerint alkalmazva) követően a 3'-adenilációhoz dATP-vel és 3'-5'-exo- Klenow fragmentummal (New England Biolabs) inkubáltuk, majd ismét tisztítottuk (Qiagen MinElute Kit-tel). A fragmentumokhoz a kettős szálú Illumina „pair-end” adaptereket rapid T4 DNA ligázzal (New England Biolabs) rögzítettük, majd ezeket egy újabb tisztítási lépés (Qiagen MinElute Kit-tel) során feldúsítottuk. Ezt követően az adapter kötött fragmentumokat Phusion DNS polimerázzal (Finnzymes) szelektíven amplifikáltuk egy 18 ciklusos PCR-ben. Az így létrehozott könyvtárak mennyiségi analízisét követően a mintákat Illumina „flow cell” platformra vittük fel, a koncentrációt egységesen 7-20 pM-ra (Genome Analyzer IIX; GA), vagy 1,4-1,75 pM-ra (HiSeq 2000; HS) állítottuk be. A csoportok létrehozását „Illumina cluster station”-ben (GA) a cBOT-ban (HS) végeztük, rendre 2× 75 (GA) to 2× 100 (HS) cikluson keresztül. Az eredmények kiértékelését az Illumina CASAVA szoftverével végeztük a program használati utasításainak megfelelően.

Genom összeillesztés: Az összeillesztés előtt valamennyi leolvasás végi részéről eltávolítottuk a szekvenálás bizonytalanságából származó, nem egyértelműen meghatározott nukleotidokat, és kizárólag a 10-nél magasabb „PHRED quality score”-ral rendelkező bázisokkal dolgoztunk tovább. Azokat a fragmentumokat, amelyeknek legalább az egyik leolvasásuk rövidebb, mint 31 nukleotid, nem használtuk az összeillesztés során. Az így definiált „pair-end” leolvasásokat a SOAPdenovo program 1.05-ös verziójával illesztettük szuperkontigokba (Li és mtsi, 2008). A legoptimálisabb illesztésért többféle beállításban is (31-től kettesével 91-es K-mer hosszig haladva, mergeLevel értékét 0 és 3 között változtatva) lefuttattuk a programot. Végül a legelőnyösebb statisztikai értékeket (N50, „gap”-ek alacsony száma, 1 kb-nál hosszabb szuperkontigok) produkáló beállításokkal dolgoztunk tovább. A „gap”-eket a SOAPdenovo szoftvercsomag GapCloser alkalmazásával töltöttük fel. A szuperkontigokat a *C. parapsilosis* CDC317 referencia genom alapján az Oslay szoftver 1.0-ás verziójával rendeztük scaffold-okba (Richter és mtsi, 2007).

Genom annotáció: A géneket az Augustus szoftver 2.5.5-ös verziójával prediktáltuk a referencia *C. parapsilosis* CDC317 génmodellek alapján (Stanke és mtsi, 2006). Az így nyert adatokat RNS szekvenálásból származó eredményekkel támasztottuk alá. A géneket kétféle módszerrel annotáltuk. Egyrészt élesztő modellszervezetek (pl.: *C. albicans* és *S. cerevisiae*) ortológjait alapul véve a MetaPhORs webszerver által GO terminológiából jósolt lehetséges funkciók alapján (Pryszcz és mtsi, 2011), másfelől a PFAM (Protein Families Database) adatbázisban (Bateman és mtsi, 2004) elérhető fehérje domain-ek alapján a HMMER szoftver 3.0.3-as verziójának segítségével (Eddy, 2011).

SNP-k és rekombinációk detektálása: A leolvasásokat Bowtie2 szoftverrel (Langmead és Salzberg, 2012) illesztettük a *C. parapsilosis* CDC317 kromoszómákra “very sensitive local alignment” beállítás mellett. Az SNP-k és az INDEL-ek (50 bp-nál kisebb inszerciók és deléciók) azonosítása a GATK program 2.1-13-a verziójával történt (McKenna és mtsi, 2010). Olyan csoportok után kutattunk, amelyek 20 bázispáros szakaszon 3 nukleotid különbséget tartalmaznak. Ehhez a program javasolt beállításait használtuk ($QD < 2.0 \parallel MQ < 40 \parallel FS > 60.0 \parallel HaplotypeScore > 13.0 \parallel MQRankSum < -12.5 \parallel ReadPosRankSum < -8.0$). Az azonosított variánsokat két csoportba osztottuk: homo- és heterozigotikus. Valamennyi bemutatott analízist a homozigotikus variánsok alapján végeztük. Azokat a régiókat, amelyek egy 200 bázispáros szakaszon legalább három közvetlenül egymást követő homozigotikus mutációt tartalmaznak mutációs forrópontokként definiáltuk. Végül rekombinációra utaló jelek után kutatva az RDP3 szoftver segítségével mind a négy *C. parapsilosis* törzs összeillesztett kromoszómáit teljes hosszukban átvizsgáltuk (Martin és mtsi, 2010). Ugyanezt a szoftvert alkalmaztuk az *ALS* gének közötti génkonverziók azonosításához is.

Struktúrális variánsok detektálása: A struktúrális variánsokat először a Delly programcsomaggal azonosítottuk (Rausch és mtsi, 2012). Ezzel lehetséges a pair-end/mate-pair leolvasás távolságok illetve orientációk felderítése, és a duplikációk, deléciók, inverziók és transzlokációk azonosítása. A szoftveres elemzés révén tévesen azonosított nagy kiterjedésű deléciók/inszerciók a régiók és leolvasások kézzel történő felülvizsgálatát tették szükségessé. Deléciónak/duplikációnak azokat a régiókat tekintettük, amelyek eltérő lefedettséget mutattak. Valamennyi *C. parapsilosis* CDC317 génre meghatároztuk az RPKM értéket $\left(\frac{[(\text{illesztett leolvasások száma} / \text{a transzkript kilobázisban mért hossza}) / \text{a leolvasások teljes száma millióban kifejezve}]}{1} \right)$. Ez abban az esetben konstansnak tekinthető, ha deléció/duplikáció nem azonosítható. Egy adott régiót duplikációnak tekintettünk egy adott

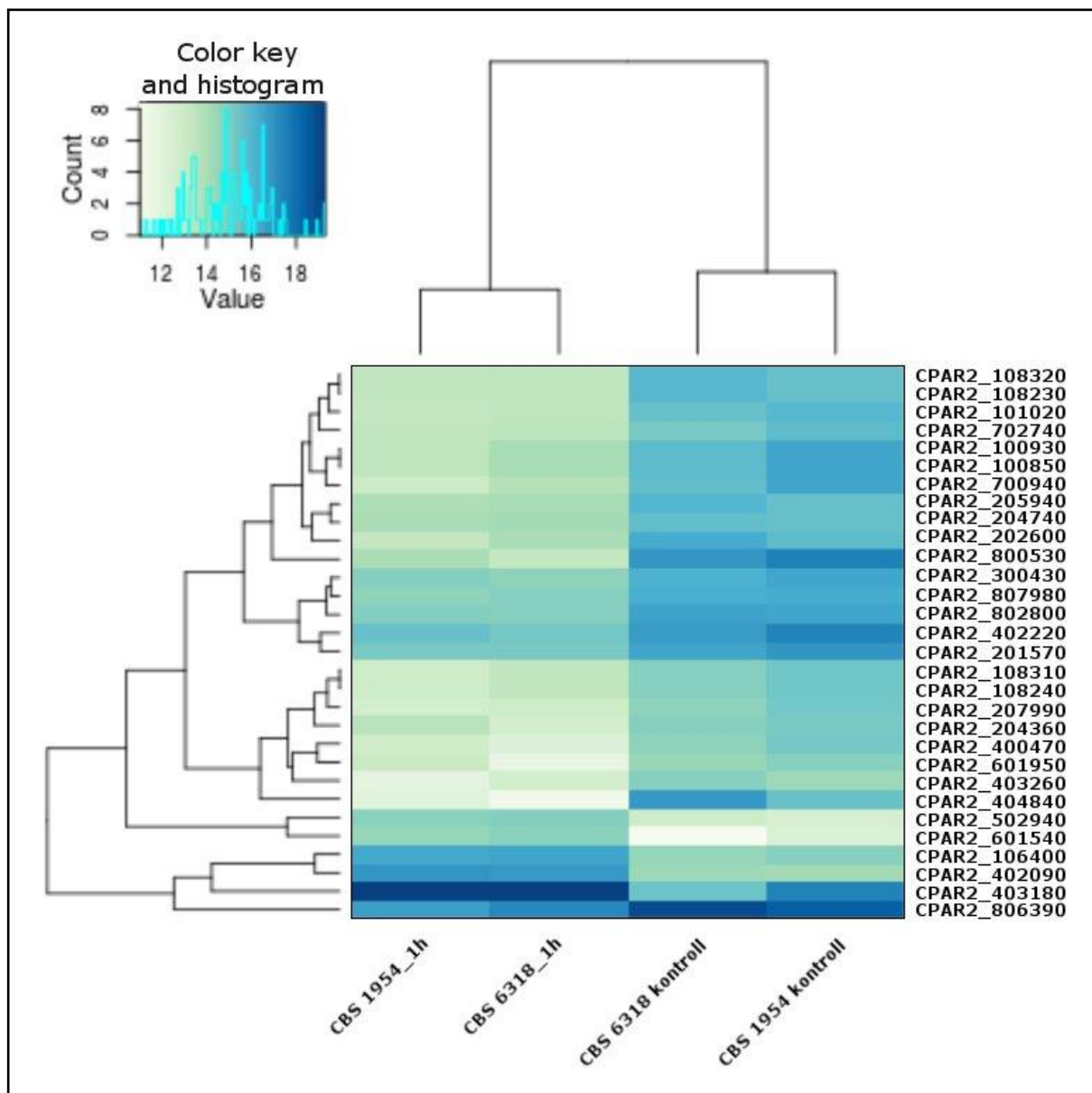
törzsben, ha a megfigyelt és a várt RPKM $\log_2$ értéke nagyobb, mint 0,75 és deléciónak, ha kisebb mint -0,75. A módszer nem csak a kromoszóma mutáció azonosítására alkalmas, de a kópiák számáról is felvilágosítást ad. Azokat a leolvasásokat, amelyek a hosszuk 90%-ánál kisebb mértékben illeszkednek a referencia szekvenciára újbóli elemzésnek vetettük alá. Az eljárással behatárolt régiókat övező szekvenciák sok esetben struktúrális variánsoknak bizonyultak. A szoftveres azonosítást követően minden egyes régiót külön-külön is megvizsgáltunk. Ezek közül huszat kísérletes validációra választottunk ki.

RNS szekvenálás – könyvtár összeállítás: Az mRNS-eket a totál RNS populációból oligo dT Dynabead (Invitrogen) segítségével dúsítottuk fel, majd hőkezeléssel (5 min, 70°C) cink oldatban (Fragmentation Reagent, Ambion) hozzávetőlegesen 200 bázisos oligonukleotidokra daraboltuk. A folyamatot EDTA tartalmú „Stop puffer”-rel állítottuk le (Ambion). Ezt követően az oldatot random hexamer primerekkel inkubáltuk (5 min, 65°C), majd cDNS-t szintetizáltunk Invitrogen SuperScript™ II Reverse Transcriptase Kit-tel. A reakció körülményei a következők voltak: 1 × First Strand Buffer, 10 mM DTT, 500 μ M dNTP mix, 20 Units RNaseOUT és 200 unit enzim. A be nem épült dNTP-eket G-50 Micro Columns (GE Healthcare) segítségével távolítottuk el, a második szál szintéziséhez a következő reakcióelegyet használtuk: 1× Second Strand Buffer, 300 μ M dNTP mix, 2 unit RNaseH, 50 unit DNS polimeráz I (New England Biolabs), a szálspecifikus könyvtár létrehozásához dTTP helyett dUTP-t tartalmazó dNTP mixet használtunk. A szálspecifikus könyvtár létrehozását Parkhomchuk és munkatársai (Parkhomchuk és mtsi, 2009) valamint Weissenmayer és kollégái által leírtak alapján végeztük (Weissenmayer és mtsi, 2011). A DNS fragmentumokat T4 DNS polimeráz, Klenow DNS polimeráz és T4 polinukleotid kináz segítségével alakítottuk tompa végűvé. A 3' adenilációt Klenow Exo Fragment segítségével végeztük. Ezekhez a túlnyúló végekhez Illumina adaptereket ligáltunk, amelyek segítségével később a fragmentumok a szekvenálás kezdetekor az adapterek komplementereit tartalmazó felszínre (flow cell) köthetők. A szálspecifikus könyvtár létrehozásához az uridint tartalmazó szálát 1 unit Uracil-N-glikozilázal emésztettük TE pufferben (15 min, 37°C). Az így előállított, adaptert tartalmazó, egyszálú fragmentumokat PCR segítségével amplifikáltuk 16 cikluson keresztül a gyártó (Illumina) által biztosított primerekkel, Phusion Polymerase (New England Biolabs) enzim felhasználásával. A képződött fragmentumok minőségéről 2%-os agaróz gél -, mennyiségéről Qubit Fluorometer (Invitrogen) segítségével győződünk meg. A fragmentumokat a protokoll utasításai szerint vittük fel a „flow cell”-re. A szekvenálást Illumina Genome Analyzer IIX platformon végeztük 36 cikluson keresztül a gyártó utasításai

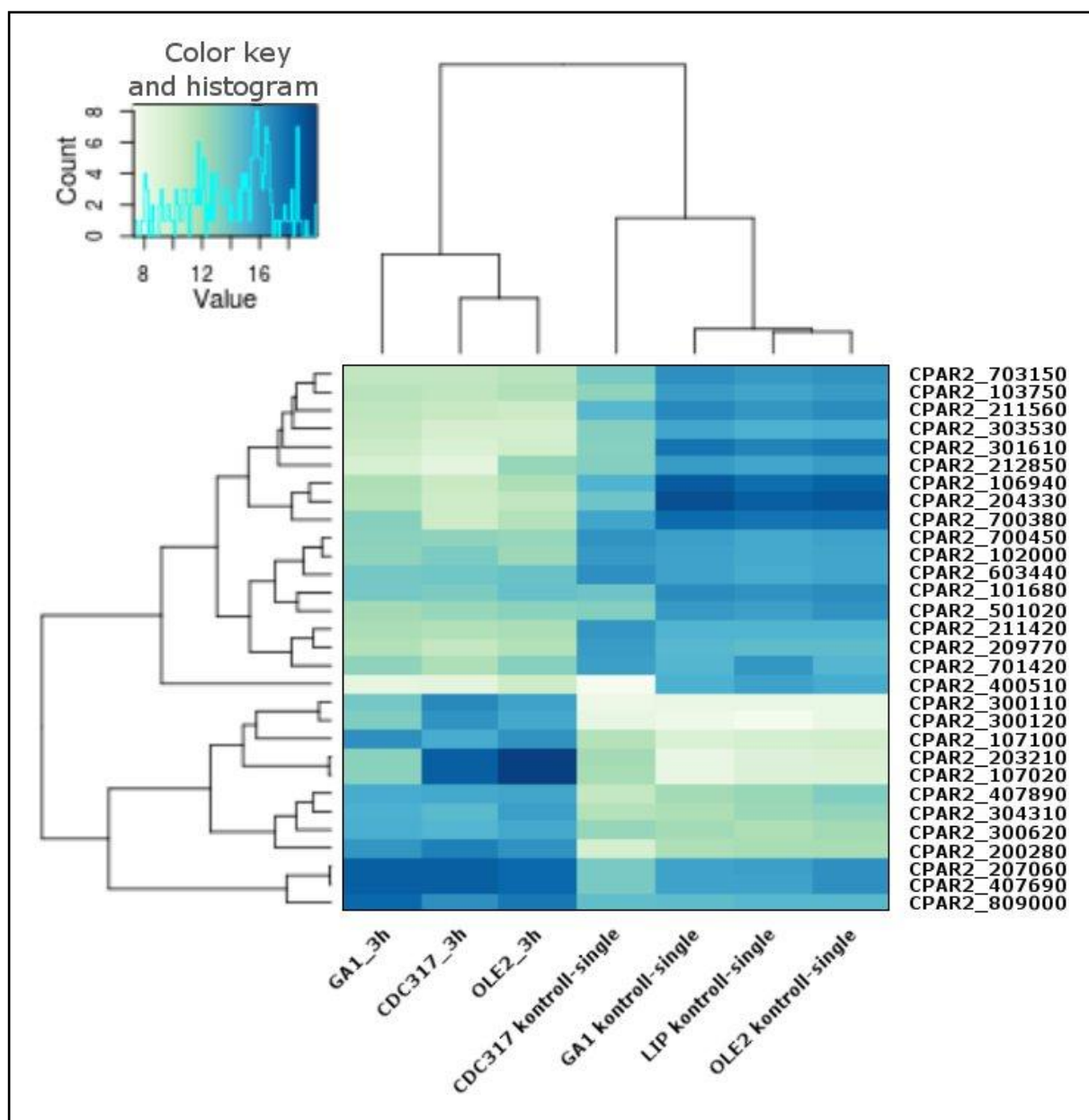
szerint, a fragmentumoknak csak az egyik („single-end”) - vagy mindkét végi szekvenciájának („pair-end”) meghatározásával.

„Read-mapping” és expressziós analízis: A szekvenálás eredményeként meghatározott leolvasások minőségi analízisét az Illumina Genome Analysis szoftver 1.4-es verziójával végeztük. Az adatcsoportok leolvasásait a TopHat 2.0.6 programmal illesztettük a referencia genomra (Trapnell és mtsi, 2009). Azokat a leolvasásokat, amelyek több mint egy régióra illeszkednek, vagy több, mint két nukleotid eltérést mutatnak a genomi szekvenciához képest, kihagytuk a további analízisből. Az RNS populáció mennyiségi meghatározását Flux-capacitor 1.24-es verziójával végeztük. Az expressziók összehasonlítását az RNS mennyiségek normalizálásával kezdtük. Az eltérően regulálódó géneket DESeq programmal azonosítottuk. Két minta között szignifikánsan eltérőnek tekintettük egy adott transzkript mennyiségét, ha abban legalább kétszeres különbséget állapítottunk meg ($p < 0,05$).

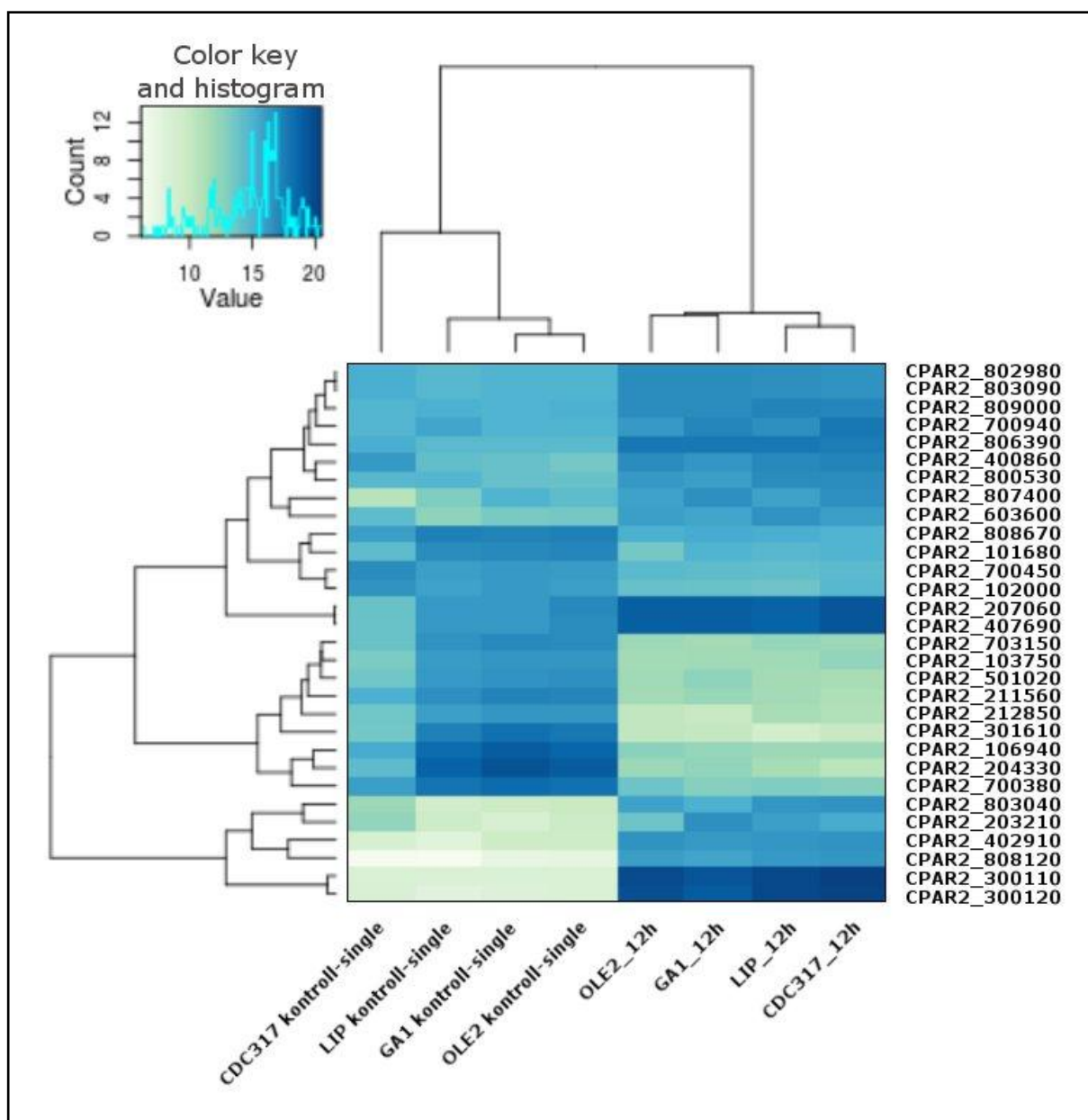
8. számú melléklet. A környezeti *C. parapsilosis* izolátumok monocitával indukált és kontroll körülmények vonatkozásában meghatározott harminc legnagyobb expressziós különbséget mutató transzkript euklidészi távolságainak „heatmap”-je a fertőzés első órájában.



9. számú melléklet. A klinikai *C. parapsilosis* izolátumok monocitával indukált és kontroll körülmények vonatkozásában meghatározott harminc legnagyobb expressziós különbséget mutató transzkript euklidészi távolságainak „heatmap”-je a fertőzés harmadik órájában.



10. számú melléklet. A klinikai *C. parapsilosis* izolátumok monocitával indukált és kontroll körülmények vonatkozásában meghatározott harminc legnagyobb expressziós különbséget mutató transzkript euklidészi távolságainak „heatmap”-je a fertőzés tizenkettedik órájában.



11a. számú melléklet. Az euklidészi távolságok meghatározásához használt *Candida* transzkriptek nevei és feltételezett funkciói.

	Név	Alternatív név	Funkció
1.	CPAR2_100850	CPAG_02012	ORF, Uncharacterized, Ortholog(s) have cytosol localization
2.	CPAR2_100930	?	ORF, Uncharacterized, Ortholog(s) have cytosol localization
3.	CPAR2_101020	CPAG_02003	ORF, Uncharacterized, Ortholog(s) have cytosol localization
4.	CPAR2_101680	CPAG_00481	ORF, Uncharacterized, Ortholog(s) have nitric oxide dioxygenase activity, nitric oxide reductase activity
5.	CPAR2_102000	CPAG_02577	ORF, Uncharacterized, Ortholog(s) have role in growth of symbiont in host
6.	CPAR2_103750	CPAG_00100	ORF, Uncharacterized, Ortholog(s) have ATP binding, adenyl-nucleotide exchange factor activity, peptide binding activity, role in cellular response to drug, pathogenesis, protein refolding and cytosol, nucleus, polysome localization
7.	CPAR2_104450	CPAG_02817	ORF, Uncharacterized, Ortholog(s) have ammonium transmembrane transporter activity, role in ammonium transport, nitrogen utilization and Golgi apparatus, endoplasmic reticulum, fungal-type vacuole membrane, mitochondrion, plasma membrane localization
8.	CPAR2_105050	CPAG_03670	ORF, Uncharacterized, Ortholog(s) have ATPase activity, enzyme regulator activity and role in positive regulation of endodeoxyribonuclease activity, protein import into mitochondrial matrix, protein refolding, protein unfolding
9.	CPAR2_106400	CPAG_04882	ORF, Uncharacterized, Ortholog(s) have 1,3-beta-D-glucan synthase activity and role in ascospore wall assembly, cell wall (1->3)-beta-D-glucan biosynthetic process, cellular response to drug, cytokinesis, pathogenesis, regulation of cell shape
10.	CPAR2_106940	CPAG_04938	ORF, Uncharacterized, Ortholog(s) have ATP binding, peptide binding, unfolded protein binding activity
11.	CPAR2_107020	CPAG_05580	ORF, Uncharacterized, Ortholog(s) have role in histone H3-K79 methylation, sexual sporulation resulting in formation of a cellular spore and replication fork protection complex localization
12.	CPAR2_107100	CPAG_04954	ORF, Uncharacterized, Ortholog(s) have role in DNA damage induced protein phosphorylation, DNA repair, negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter, protein localization to kinetochore, signal transduction in response to DNA damage
13.	CPAR2_108230	CPAG_00929	ORF, Uncharacterized, Has domain(s) with predicted ion channel activity, role in ion transport and membrane localization
14.	CPAR2_108240	CPAG_00229	ORF, Uncharacterized, Ortholog(s) have endoplasmic reticulum, nuclear pore localization
15.	CPAR2_108310	?	ORF, Uncharacterized
16.	CPAR2_108320	CPAG_00230	ORF, Uncharacterized, Ortholog(s) have role in negative regulation of ATPase activity, response to stress and plasma membrane localization
17.	CPAR2_109480	?	ORF, Uncharacterized, Ortholog(s) have structural constituent of ribosome activity and 90S preribosome, cytosolic small ribosomal subunit, nucleolus localization (1)
18.	CPAR2_109940	?	ORF, Uncharacterized, Ortholog(s) have mitochondrion localization
19.	CPAR2_200280	CPAG_01530	ORF, Uncharacterized, Ortholog(s) have cytosol, hyphal cell wall localization
20.	CPAR2_201570	CPAG_03056	ORF, Uncharacterized, Ortholog(s) have structural constituent of cytoskeleton activity
21.	CPAR2_202600	CPAG_05638	ORF, Uncharacterized, Ortholog(s) have sedoheptulose-7-phosphate:D-glyceraldehyde-3-phosphate glycerone transferase activity, role in pentose-phosphate shunt and cell surface, cytosol, nucleus localization

11b. számú melléklet. Az euklidészi távolságok meghatározásához használt *Candida* transzkriptek nevei és feltételezett funkciói.

	Név	Alternatív név	Funkció
22.	CPAR2_203210	?	ORF, Uncharacterized, Ortholog(s) have role in histone H3-K79 methylation, sexual sporulation resulting in formation of a cellular spore and nucleus localization
23.	CPAR2_204330	CPAG_05471	ORF, Uncharacterized, Ortholog(s) have ADP binding, ATP binding, ATPase activity, coupled, chaperone binding, unfolded protein binding activity
24.	CPAR2_204360	CPAG_00147	ORF, Uncharacterized, Dihydrolipoyl transsuccinylase; mitochondrial alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex component; catalyzes oxidative decarboxylation of alpha-ketoglutarate to succinyl-CoA in the TCA cycle; predicted mitochondrial nucleoid localization
25.	CPAR2_204740	CPAG_04115	ORF, Uncharacterized, Ortholog(s) have succinate-CoA ligase (ADP-forming) activity, role in succinyl-CoA metabolic process and mitochondrion localization
26.	CPAR2_204880	CPAG_04129	ORF, Uncharacterized, Ortholog(s) have glucose-6-phosphate isomerase activity, role in gluconeogenesis, glycolysis, pentose-phosphate shunt and cytosol, mitochondrion, plasma membrane localization
27.	CPAR2_205670	CPAG_04207	ORF, Uncharacterized, Ortholog(s) have ATPase activity, unfolded protein binding activity
28.	CPAR2_205940	CPAG_00214	ORF, Uncharacterized, Dihydrolipoamide dehydrogenase; lipoamide dehydrogenase component (E3) of the pyruvate dehydrogenase and 2-oxoglutarate dehydrogenase multi-enzyme complexes
29.	CPAR2_207060	?	ORF, Uncharacterized, Ortholog(s) have GDP binding, GTP binding, translation elongation factor activity, role in tRNA export from nucleus, translational elongation and cytosol, nucleus localization
30.	CPAR2_207210	CPAG_00042	ORF, Uncharacterized, Ortholog(s) have high molecular weight kininogen binding, phosphopyruvate hydratase activity
31.	CPAR2_207990	CPAG_00709	ORF, Uncharacterized, Ortholog(s) have methionine adenosyltransferase activity, role in S-adenosylmethionine biosynthetic process, methionine metabolic process and cell surface, cytosol, hyphal cell wall, nucleus, plasma membrane localization
32.	CPAR2_209770	CPAG_01196	ORF, Uncharacterized, Ortholog(s) have plasma membrane localization
33.	CPAR2_211420	CPAG_00299	ORF, Uncharacterized, Has domain(s) with predicted DNA binding, methyltransferase activity, zinc ion binding activity and role in DNA repair, regulation of transcription, DNA-dependent
34.	CPAR2_211560	CPAG_00553	ORF, Uncharacterized, Ortholog(s) have ATPase activity, misfolded protein binding activity
35.	CPAR2_211630	CPAG_00546	ORF, Uncharacterized, Ortholog(s) have GTPase activity, drug binding, translation elongation factor activity, role in cellular response to drug and cell surface, cytosol, plasma membrane, yeast-form cell wall localization
36.	CPAR2_212850	CPAG_04533	ORF, Uncharacterized, Ortholog(s) have plasma membrane localization
37.	CPAR2_300110	CPAG_00621 CFEM5	ORF, Uncharacterized, Putative membrane protein, member of the CFEM family
38.	CPAR2_300120	CPAG_00622 CFEM6	ORF, Uncharacterized, Ortholog(s) have heme binding activity, role in cellular iron ion homeostasis, single-species biofilm formation on inanimate substrate and anchored to plasma membrane, cell surface, cellular bud, hyphal cell wall localization
39.	CPAR2_300270	CPAG_00637	ORF, Uncharacterized, Ortholog(s) have LSU rRNA binding activity, role in ribosomal large subunit assembly and 90S preribosome, cytosol, preribosome, large subunit precursor localization

11c. számú melléklet. Az euklidészi távolságok meghatározásához használt *Candida* transzkriptek nevei és feltételezett funkciói.

	Név	Alternatív név	Funkció
40.	CPAR2_300430	CPAG_00408	ORF, Uncharacterized, Ortholog(s) have G-protein alpha-subunit binding, GDP-dissociation inhibitor activity, protein kinase C binding, ribosome binding, signal transducer activity
41.	CPAR2_300620	CPAG_00390	ORF, Uncharacterized, Ortholog(s) have ferric-chelate reductase activity, role in copper ion import, iron ion transport and plasma membrane localization
42.	CPAR2_301610	CPAG_03949	ORF, Uncharacterized, Ortholog of <i>C. albicans</i> SC5314 : orf19.7085, <i>C. dubliniensis</i> CD36 : Cd36_70560, <i>Candida tenuis</i> NRRL Y-1498 : cten_CGOB_00180 and <i>Debaryomyces hansenii</i> CBS767 : DEHA2F13398g
43.	CPAR2_302650	CPAG_00344	ORF, Uncharacterized, Beta subunit of fatty acid synthetase which catalyzes the synthesis of long-chain saturated fatty acids; has acetyltransacylase, dehydratase, enoyl reductase, malonyl transacylase, and palmitoyl transacylase activities
44.	CPAR2_303530	CPAG_03329	ORF, Uncharacterized, Ortholog(s) have ATPase inhibitor activity, Hsp70 protein binding, Hsp90 protein binding, mRNA binding activity, role in protein folding and cytosol, nucleus localization
45.	CPAR2_304310	CPAG_02186	ORF, Uncharacterized, Ortholog(s) have structural constituent of ribosome activity and cytosolic small ribosomal subunit localization
46.	CPAR2_400470	CPAG_00694	ORF, Uncharacterized, Ortholog(s) have L-malate dehydrogenase activity, mRNA binding activity, role in chronological cell aging, replicative cell aging, tricarboxylic acid cycle and mitochondrial matrix localization
47.	CPAR2_400510	CPAG_00690	ORF, Uncharacterized, Ortholog(s) have sodium:inorganic phosphate symporter activity, role in phosphate ion transmembrane transport and plasma membrane localization
48.	CPAR2_400770	CPAG_03201	ORF, Uncharacterized, Ortholog(s) have dextrin alpha-glucosidase activity, maltose alpha-glucosidase activity, starch alpha-glucosidase activity, sucrose alpha-glucosidase activity
49.	CPAR2_400790	CPAG_03200	ORF, Uncharacterized, Has domain(s) with predicted substrate-specific transmembrane transporter activity, transmembrane transporter activity, transporter activity, role in transmembrane transport and integral to membrane, membrane localization
50.	CPAR2_400860	CPAG_03194	ORF, Uncharacterized, Ortholog(s) have transferase activity, transferring glycosyl groups activity and role in cell wall chitin metabolic process, fungal-type cell wall organization
51.	CPAR2_402000	CPAG_04045	ORF, Uncharacterized, Ortholog(s) have cell surface, hyphal cell wall, yeast-form cell wall localization
52.	CPAR2_402010	CPAG_04046	ORF, Uncharacterized, Ortholog(s) have role in fungal-type cell wall organization, pathogenesis and anchored to plasma membrane, cell surface, extracellular region, hyphal cell wall, yeast-form cell wall localization
53.	CPAR2_402090	CPAG_04053	ORF, Uncharacterized, Ortholog(s) have pyruvate carboxylase activity, role in gluconeogenesis and cytosol localization
54.	CPAR2_402220	CPAG_04066	ORF, Uncharacterized, Ortholog(s) have ADP binding, proton-transporting ATP synthase activity, rotational mechanism, proton-transporting ATPase activity, rotational mechanism activity and role in mitochondrial ATP synthesis coupled proton transport
55.	CPAR2_402910	CPAG_02387	ORF, Uncharacterized, Ortholog of <i>Candida orthopsilosis</i> Co 90-125 : CORT_0E02945
56.	CPAR2_403180	CPAG_00861	ORF, Uncharacterized, Ortholog(s) have role in cellular response to drug, fungal-type cell wall organization and hyphal cell wall localization

11d. számú melléklet. Az euklidészi távolságok meghatározásához használt *Candida* transzkriptek nevei és feltételezett funkciói.

	Név	Alternatív név	Funkció
57.	CPAR2_403260	CPAG_00854	ORF, Uncharacterized, Ortholog of <i>C. albicans</i> SC5314 : orf19.2758/PGA38, <i>C. dubliniensis</i> CD36 : Cd36_42320, <i>Candida tenuis</i> NRRL Y-1498 : cten_CGOB_00184 and <i>Debaryomyces hansenii</i> CBS767 : DEHA2G17930g
58.	CPAR2_404840	CPAG_05060	ORF, Uncharacterized, Ortholog(s) have high molecular weight kininogen binding, ribosome binding, thioredoxin peroxidase activity, unfolded protein binding activity
59.	CPAR2_405510	CPAG_05125	ORF, Uncharacterized, Ortholog(s) have role in eisosome assembly, establishment of protein localization to plasma membrane, negative regulation of protein phosphorylation, protein secretion
60.	CPAR2_406150	CPAG_05187	ORF, Uncharacterized, Ortholog(s) have role in ribosomal large subunit assembly and cell surface, cytosol, small-subunit processome localization
61.	CPAR2_407690	CPAG_02465	ORF, Uncharacterized, Ortholog(s) have GDP binding, GTP binding, translation elongation factor activity and role in interaction with host, tRNA export from nucleus, translational elongation
62.	CPAR2_407890	CPAG_02482	ORF, Uncharacterized, Has domain(s) with predicted RNA binding, structural constituent of ribosome activity, role in translation and ribosome localization
63.	CPAR2_501020	CPAG_05350	ORF, Uncharacterized, Ortholog(s) have pyruvate decarboxylase activity
64.	CPAR2_501710	CPAG_05416	ORF, Uncharacterized, Ortholog(s) have ATPase activity, translation elongation factor activity, role in translational elongation, translational termination and cell surface, cytosolic ribosome, plasma membrane, yeast-form cell wall localization
65.	CPAR2_502940	CPAG_03867	ORF, Uncharacterized, Ortholog(s) have chitin synthase activity, role in cell wall chitin biosynthetic process and cell septum localization
66.	CPAR2_601540	CPAG_00419	ORF, Uncharacterized, Ortholog(s) have role in beta-1,2-oligomannoside metabolic process
67.	CPAR2_601950	CPAG_02752	ORF, Uncharacterized, Putative alcohol dehydrogenase (NADP+); role in alcohol metabolism; expression increased in fluconazole and voriconazole resistant strains
68.	CPAR2_602730	CPAG_00659	ORF, Uncharacterized, Has domain(s) with predicted aspartic-type endopeptidase activity and role in proteolysis
69.	CPAR2_603440	CPAG_03745	ORF, Uncharacterized, Ortholog(s) have double-stranded DNA binding, sequence-specific DNA binding transcription factor activity
70.	CPAR2_603600	CPAG_03729	ORF, Uncharacterized, Ortholog(s) have ferroxidase activity, role in cellular response to drug, ferrous iron import, high-affinity iron ion transport, prostaglandin biosynthetic process and endoplasmic reticulum, plasma membrane localization
71.	CPAR2_700380	CPAG_04247	ORF, Uncharacterized, Ortholog(s) have peptide binding, unfolded protein binding activity
72.	CPAR2_700450	CPAG_04254	ORF, Uncharacterized, Ortholog(s) have RNA polymerase II core promoter proximal region sequence-specific DNA binding transcription factor activity involved in negative regulation of transcription, sequence-specific DNA binding activity
73.	CPAR2_700940	CPAG_04301	ORF, Uncharacterized, Ortholog(s) have alternative oxidase activity, role in alternative respiration and mitochondrion, plasma membrane localization
74.	CPAR2_701420	CPAG_00171	ORF, Uncharacterized, Ortholog(s) have role in reciprocal meiotic recombination and endoplasmic reticulum, mitochondrion, plasma membrane localization

11e. számú melléklet. Az euklidészi távolságok meghatározásához használt *Candida* transzkriptek nevei és feltételezett funkciói.

	Név	Alternatív név	Funkció
75.	CPAR2_702740	CPAG_04720	ORF, Uncharacterized, Ortholog(s) have cyclosporin A binding, peptidyl-prolyl cis-trans isomerase activity and role in ascospore formation, histone deacetylation, positive regulation of meiosis
76.	CPAR2_703150	CPAG_04681	ORF, Uncharacterized, Ortholog(s) have ATPase activity, coupled, unfolded protein binding activity
77.	CPAR2_800530	CPAG_04396	ORF, Uncharacterized, Ortholog(s) have phosphoenolpyruvate carboxykinase (ATP) activity and cytosol localization
78.	CPAR2_802800	CPAG_00445	ORF, Uncharacterized, Ortholog(s) have 5-methyltetrahydropteroyltriglutamate-homocysteine S-methyltransferase activity, zinc ion binding activity
79.	CPAR2_802980	CPAG_00463	ORF, Uncharacterized
80.	CPAR2_803040	CPAG_02689	ORF, Uncharacterized
81.	CPAR2_803090	CPAG_02685	ORF, Uncharacterized, Ortholog(s) have role in pathogenesis and cell surface, hyphal cell wall, integral to mitochondrial outer membrane, plasma membrane localization
82.	CPAR2_803890	CPAG_01823	ORF, Uncharacterized, Ortholog(s) have malate synthase activity, role in glyoxylate cycle and cytosol, peroxisomal matrix localization
83.	CPAR2_804740	CPAG_02066	ORF, Uncharacterized, Ortholog(s) have transketolase activity, role in pentose-phosphate shunt and cell surface, cytosol, nucleus, plasma membrane, yeast-form cell wall localization
84.	CPAR2_806390	CPAG_01112	ORF, Uncharacterized
85.	CPAR2_807400	CPAG_02861 FAS2	ORF, Verified, Alpha subunit of fatty acid synthetase; catalyzes the synthesis of long-chain saturated fatty acids; has the acyl-carrier protein domain and beta-ketoacyl reductase, beta-ketoacyl synthase and self-pantetheinylation activities
86.	CPAR2_807700	CPAG_00224	ORF, Uncharacterized, Ortholog(s) have role in fatty acid beta-oxidation and peroxisomal matrix localization
87.	CPAR2_807980	CPAG_01135	ORF, Uncharacterized, Ortholog(s) have triose-phosphate isomerase activity
88.	CPAR2_808120	CPAG_01121	ORF, Uncharacterized, Ortholog(s) have role in siderophore transport and plasma membrane localization
89.	CPAR2_808670	CPAG_02232	ORF, Uncharacterized, Ortholog(s) have fibronectin binding, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (NAD+) (phosphorylating) activity, laminin binding activity
90.	CPAR2_809000	CPAG_02199	ORF, Uncharacterized, Ortholog(s) have protein tag activity and role in cell morphogenesis, cellular response to heat, filamentous growth of a population of unicellular organisms, pathogenesis, phenotypic switching, protein ubiquitination

12a. számú melléklet. Az euklidészi távolságok meghatározásához használt humán transzkriptek nevei és feltételezett funkciói.

	Transzkript neve	Ismert Exonok száma	Ismert kódoló Exonok száma	Transzkript mérete (nt)	Fehérje mérete (as)	Kódoló fehérje funkciója	Amennyiben nem kódol fehérjét, a funkcionális transzkript által kódolt fehérje funkciója	Azonosított domain-ek (Pfam)
1.	ENST 00000479759.1	7	0	888	475	Known processed transcript	CAP, adenylate cyclase-associated protein 1 (yeast) [Source:HGNC Symbol;Acc:20040]	
2.	ENST 00000583036.1	7	5	576	138	Ribosomal protein L17 [Source:HGNC Symbol;Acc:10307]		Ribosomal_L22
3.	ENST 00000446441.2	1	0	963	-	Known processed pseudogene	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 pseudogene 8 [Source:HGNC Symbol;Acc:39126]	
4.	ENST 00000525215.1	2	0	478	-	Known retained intron	Amyloid beta (A4) precursor-like protein 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:598]	
5.	ENST 00000377298.4	19	19	5221	981	Calsynenin 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:17447]		Cadherin
6.	ENST 00000527109.1	5	0	1030	-	Known retained intron	Ribosomal protein S2 [Source:HGNC Symbol;Acc:10404]	
7.	ENST 00000397334.2	5	4	801	187	transgelin 2		CH-domain, Calponin repeat, SM22_calponin
8.	ENST 00000454165.1	5	4	544	158	BCL2-associated athanogene 6 [Source:HGNC Symbol;Acc:13919]		SUMO ubiquitin

12b. számú melléklet. Az euklidészi távolságok meghatározásához használt humán transzkriptek nevei és feltételezett funkciói.

	Transzkript neve	Ismert Exonok száma	Ismert kódoló Exonok száma	Transzkript mérete (nt)	Fehérje mérete (as)	Kódoló fehérje funkciója	Amennyiben nem kódol fehérjét, a funkcionális transzkript által kódolt fehérje funkciója	Azonosított domain-ek (Pfam)
9.	ENST0000050544.1	1	0	468	-	Known processed pseudogene	Phosphoglycerate mutase 1 pseudogene 8 [Source:HGNC Symbol;Acc:42455]	
10.	ENST0000058780.1	12	0	1858	-	Known processed transcript	Ubiquitin-like with PHD and ring finger domains 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:12556]	
11.	ENST00000434469.1	6	6	920	230	Neurobeachin-like 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:20681]		WD40 domain
12.	ENST00000563494.1	5	3	533	59	Known nonsense mediated decay	Golgi-associated, gamma adaptin ear containing, ARF binding protein 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:16064]	VHS
13.	ENST00000539396.1	19	16	2608	634	Striatin, calmodulin binding protein 4 [Source:HGNC Symbol;Acc:15721]		
14.	ENST00000396265.3	3	2	654	102	Translocator protein (18kDa) [Source:HGNC Symbol;Acc:1158]		?
15.	ENST00000552401.1	7	0	1153	-	Known processed transcript	Caspase 8 associated protein 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:1510]	?

12c. számú melléklet. Az euklidészi távolságok meghatározásához használt humán transzkriptek nevei és feltételezett funkciói.

	Transzkript neve	Ismert Exonok száma	Ismert kódoló Exonok száma	Transzkript mérete (nt)	Fehérje mérete (aa)	Kódoló fehérje funkciója	Amennyiben nem kódol fehérjét, a funkcionális transzkript által kódolt fehérje funkciója	Azonosított domain-ek (Pfam)
16.	ENST00000508848.1	8	4	1030	115	Polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide J3 [Source:HGNC Symbol;Acc:33853]		DNA-dir_RNA_pol_dimerisation
17.	ENST00000392669.2	11	10	1724	333	ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 4 [Source:HGNC Symbol;Acc:10864]		Glyco_trans_29
18.	ENST00000526320.1	16	10	3081	374	Known nonsense mediated decay	V-myb avian myeloblastosis viral oncogene homolog [Source:HGNC Symbol;Acc:7545]	SANT/Myb, Tscript_reg_Wos2-domain
19.	ENST00000344824.6	9	9	1417	284	Tropomyosin 4 [Source:HGNC Symbol;Acc:12013]		Tropomyosin
20.	ENST00000583903.1	5	0	549	-	Known processed transcript	Protein phosphatase 4, regulatory subunit 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:9320]	
21.	ENST00000401088.4	4	4	3636	152	SUZ RNA binding domain containing 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:30232]		?
22.	ENST00000596314.1	6	5	718	200	Ribosomal protein S5 [Source:HGNC Symbol;Acc:10426]		Ribosomal_S7_dom TPD52

12d. számú melléklet. Az euklidészi távolságok meghatározásához használt humán transzkriptek nevei és feltételezett funkciói.

	Transzkript neve	Ismert Exonok száma	Ismert kódoló Exonok száma	Transzkript mérete (nt)	Fehérje mérete (as)	Kódoló fehérje funkciója	Amennyiben nem kódol fehérjét, a funkcionális transzkript által kódolt fehérje funkciója	Azonosított domain-ek (Pfam)
23.	ENST 00000517427.1	7	7	2596	233	Tumor protein D52 [Source:HGNC Symbol;Acc:12005]		TPD52
24.	ENST 00000423014.2	4	4	593	115	Thiosulfate sulfurtransferase (rhodanese)-like domain containing 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:35410]		Rodanese-like_dom
25.	ENST 00000242285.6	7	7	1152	248	Clathrin, light chain A [Source:HGNC Symbol;Acc:2090]		Clathrin_L-chain
26.	ENST 00000545334.1	4	2	2805	109	Putative Protein Coding	PTPRF interacting protein, binding protein 1 (liprin beta 1) [Source:HGNC Symbol;Acc:9249]	?
27.	ENST 00000431893.2	29	29	6541	2154	SEC16 homolog A (S. cerevisiae) [Source:HGNC Symbol;Acc:29006]		?
28.	ENST 00000586463.1	7	2	743	30	Ankyrin repeat domain 27 (VPS9 domain) [Source:HGNC Symbol;Acc:25310]		?
29.	ENST 00000397446.1	17	15	2077	537	Copine I [Source:HGNC Symbol;Acc:2314]		C2_Ca-dep, Copine

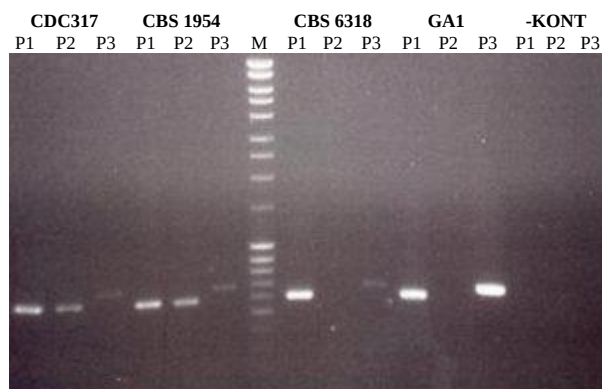
13a. számú melléklet. Az *in silico* azonosított kromoszómaputációk, tulajdonságaik, az érintett gének, és a kísérletes validáció eredményei. Félkövér betűtípus jelöli azokat a régiókat, amelyeket kísérletesen validáltunk. * heterozigotikus régió. – az adott kísérletet nem végeztük el.

In silico	Kiterjedés (bp)	Érintett törzs	Fúzió	Érintett gének	Sikeres validálás		Megjegyzések
					PCR	Sanger Southern	
DUP#1	~5.900	CBS6318 (6x)		CPAR2_101680	-	-	tandem duplikáció
DUP#2	~6.900	GA1(4x)		CPAR2_204330 CPAR2_204340 CPAR2_204350	-	-	tandem duplikáció
DUP#3	~840	CBS1954 (4x) CBS6318 (4x)		CPAR2_301450	-	-	
DUP#4	~4.400	CBS1954 GA1		CPAR2_304370	-	-	
DUP#5	~10.000	CBS1954 (8x) CBS6318 (6x) CDC317 (~8x) GA1 (10x)		CPAR2_601000 CPAR2_601010 CPAR2_601040 CPAR2_601050	-	-	CPAR2_601000 (GA1) CPAR2_601010 (GA1) CPAR2_601040 (GA1 és CDC317) CPAR2_601050 (összes)
DEL#1	23.475	GA1	IGEN	CPAR2_404770 CPAR2_404780 CPAR2_404790 CPAR2_404800	NEM	IGEN	
DEL#2	11.573	CBS1954	NEM	CPAR2_808620	IGEN	NEM	
DEL#3	9.714	* GA1	IGEN	CPAR2_210310 CPAR2_210320 CPAR2_210340 CPAR2_210350 CPAR2_210360 CPAR2_210370	NEM	NEM	
DEL#4	2.847	CBS6318	IGEN	CPAR2_802700 CPAR2_802710	IGEN	IGEN	direkt ismétlődések (SSA)
DEL#5	1.648	* GA1	IGEN	CPAR2_601400 CPAR2_601410	IGEN	IGEN	direkt ismétlődések (SSA)
DEL#6	1.560	GA1 CBS1954 CBS6318	IGEN	CPAR2_205560 CPAR2_205570	IGEN	IGEN	direkt ismétlődések (SSA)
DEL#7	1.420	GA1	IGEN	CPAR2_808310 CPAR2_808320	IGEN	IGEN	direkt ismétlődések (SSA)
DEL#8	1.273	GA1	NEM	CPAR2_302610	IGEN	IGEN	direkt ismétlődések (SSA)
DEL#9	350	GA1	NEM	-	IGEN	IGEN	direkt ismétlődések (SSA)
DEL#10	227	CBS6318	NEM	CPAR2_205990	IGEN	IGEN	direkt ismétlődések (SSA)
DEL#11	141	CBS6318	NEM	CPAR2_603420	IGEN	IGEN	direkt ismétlődések (SSA)
DEL#12	132	CBS1954	NEM	CPAR2_603050	IGEN	NEM	direkt ismétlődések (SSA)
DEL#13	105	CBS6318	NEM	CPAR2_213830	IGEN	NEM	direkt ismétlődések (SSA)

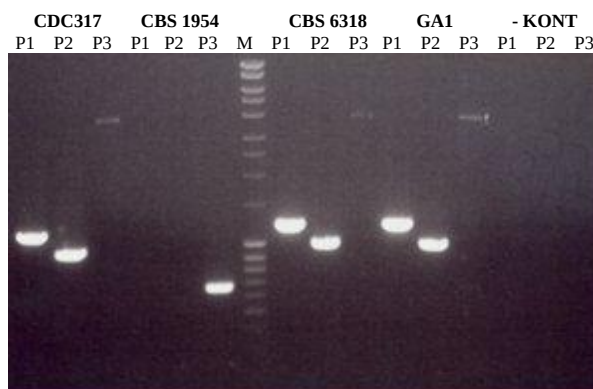
13b. számú melléklet. Az *in silico* azonosított kromoszómaputációk, tulajdonságaik, az érintett gének, és a kísérletes validáció eredményei. Félkövér betűtípus jelöli azokat a régiókat, amelyeket kísérletesen validáltunk. * heterozigotikus régió. – az adott kísérletet nem végeztük el.

In silico	Kiterjedés (bp)	Érintett törzs	Fúzió	Érintett gének	Sikeres validálás			Megjegyzések
					PCR	Sanger	Southern	
DEL#16	42	CBS1954	NEM	-	IGEN	IGEN	-	direkt ismétlődések (SSA)
DEL#17	38	CBS1954	NEM	-	IGEN	NEM	-	
DEL#18	34	* CDC317	NEM	CPAR2_208720	IGEN	-	-	hiba a referencia illesztésben, nem heterozigotikus
DEL#19	18	* CDC317	NEM	CPAR2_502060	IGEN	-	-	
DEL#20	r	* CDC317	NEM	-	IGEN	-	-	34bp deléció CBS1954-ben és CBS6318-ban; 17bp deléció GA1-ben, 17bp heterozigotikus deléció CDC317-ben
DEL#21	2.305	CBS1954	IGEN	CPAR2_204210	-	-	-	
DEL#22	2.742	CBS6318	IGEN	CPAR2_207250	-	-	-	
DEL#23	3.186	CBS1954	IGEN	CPAR2_212370	-	-	-	
DEL#24	3.061	CBS1954	NEM	CPAR2_213230	-	-	-	
DEL#25	4.174	CBS6318	IGEN	CPAR2_300110	-	-	-	
DEL#26	3.872	CBS6318	IGEN	CPAR2_301300	-	-	-	
DEL#27	2.962	CBS1954	IGEN	CPAR2_402000	-	-	-	
DEL#28	2.690	GA1	IGEN	CPAR2_404110	-	-	-	
DEL#29	2.697	CBS6318	IGEN	CPAR2_407290	-	-	-	
DEL#30	23.989	CBS1954	IGEN	CPAR2_502560 CPAR2_502570 CPAR2_502580 CPAR2_502590 CPAR2_502610 CPAR2_502620 CPAR2_502630 CPAR2_502640	-	-	-	
DEL#31	~6.800	CBS1954	IGEN	CPAR2_600430	-	-	-	
DEL#32	3.062	CBS1954	IGEN	CPAR2_601740	-	-	-	
DEL#33	2.228	CBS1954	NEM	CPAR2_701840	-	-	-	
DEL#34	2.623	CBS6318	IGEN	CPAR2_800340	-	-	-	
DEL#35	1.864	CBS1954	NEM	CPAR2_807740	-	-	-	

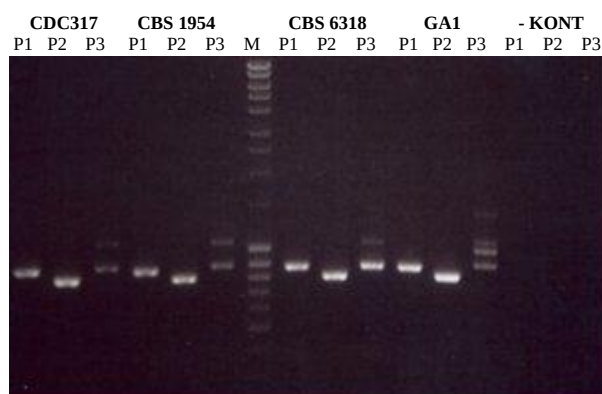
14a. számú melléklet. A kísérletes validációra kiválasztott 20 deléció PCR termékeinek gélfotója a deléció kiterjedésének és a várt fragmentumok méretének feltüntetésével.

**DEL#1**

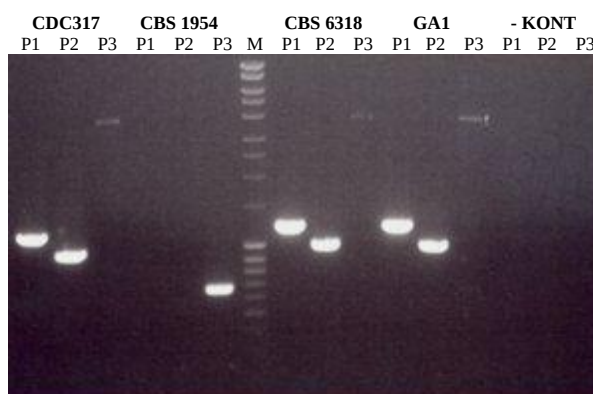
23475 bp deléció GA1-ben
PCR1 - 609 bp, PCR2 - 595, PCR3 - 24161/686 bp

**DEL#2**

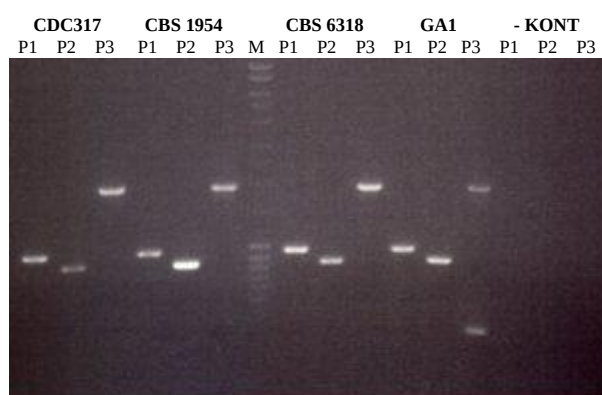
11573 bp deléció CBS 1954-ben
PCR1 - 1250 bp, PCR2 - 1045, PCR3 - 12247/674 bp

**DEL#3**

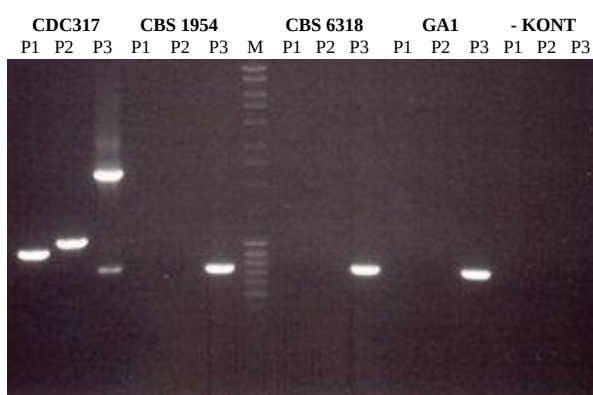
9808 bp heterozigotitás GA1-ben
PCR1 - 875 bp, PCR2 - 811, PCR3 - 10717/909 bp

**DEL#4**

2847 bp deléció CBS 6318-ban
PCR1 - 1089, PCR2 - 516, PCR3 - 3425/578 bp

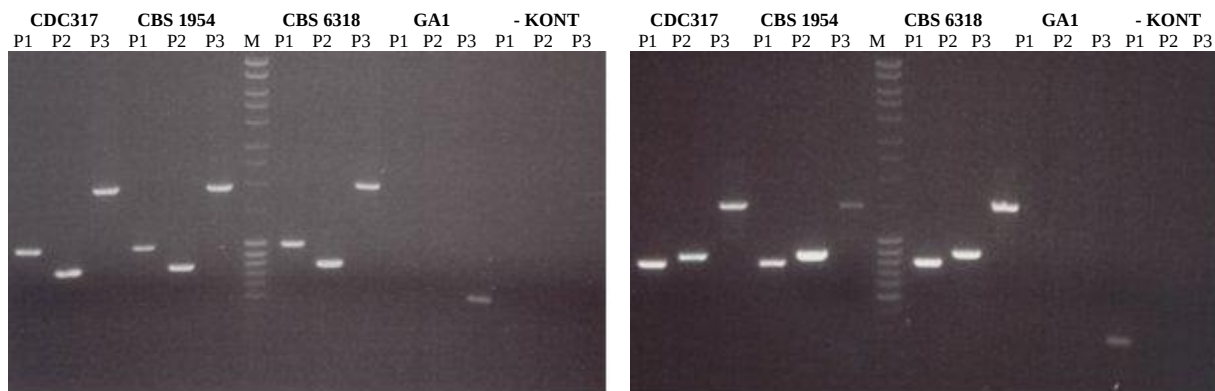
**DEL#5**

1640 bp heterozigotitás GA1-ben
PCR1 - 986 bp, PCR2 - 858 bp, PCR3 - 1931/291 bp

**DEL#6**

1595 bp deléció CBS1954-ben, CBS6318-ban GA1-ben
PCR1 - 965 bp, PCR2 - 1090 bp, PCR3 - 2308/713 bp

14b. számú melléklet. A kísérletes validációra kiválasztott 20 deléció PCR termékeinek gélfotója a deléció kiterjedésének és a várt fragmentumok méretének feltüntetésével.

**DEL#7**

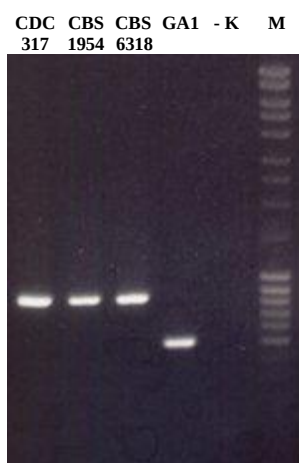
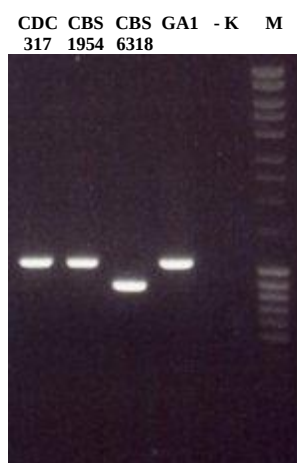
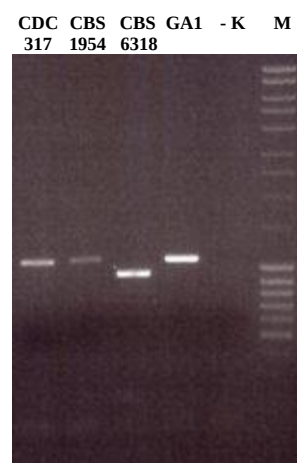
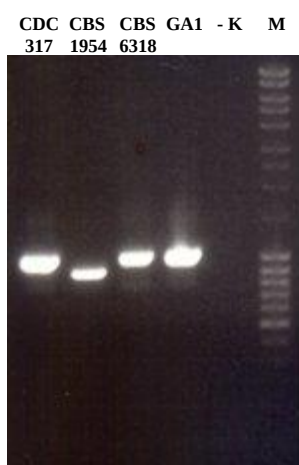
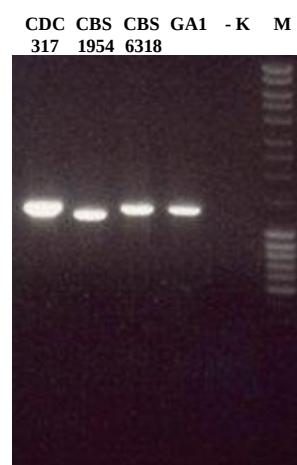
1497 bp deléció GA1-ben

PCR1 - 1020 bp, PCR2 - 787 bp, PCR3 - 1932/435 bp

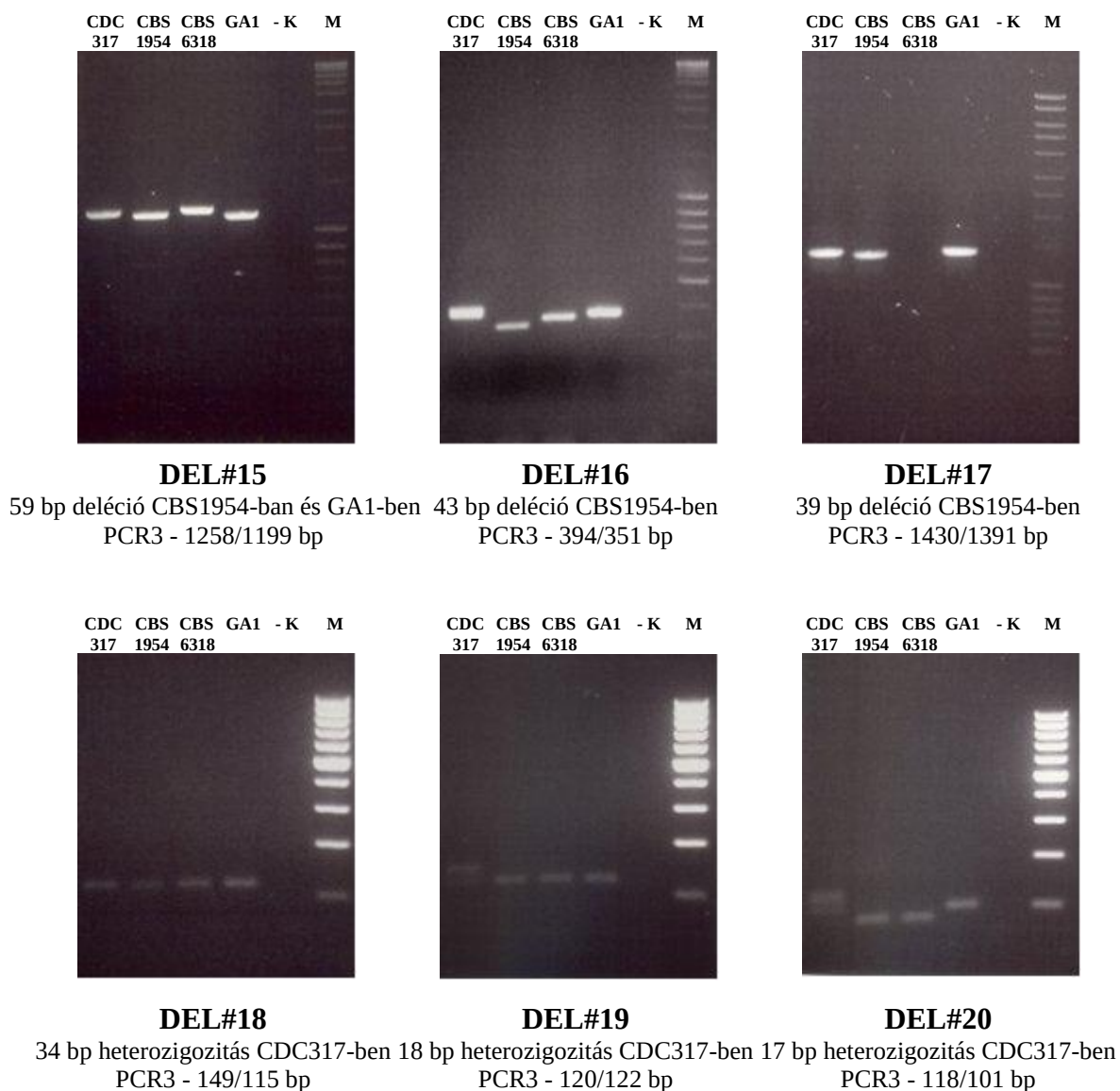
DEL#8

1268 deléció GA1-ben

PCR1 - 818 bp, PCR2 - 902 bp, PCR3 - 1543/275 bp

**DEL#9**354 bp deléció GA1-ben
PCR3 - 853/499 bp**DEL#10**235 bp deléció CBS6318-ban
PCR3 - 1104/869 bp**DEL#11**141 bp deléció CBS6318-ban
PCR3 - 1118/977 bp**DEL#12**132 bp deléció CBS1954-ben
PCR3 - 1092/960 bp**DEL#13**105 bp deléció CBS6318-ban
PCR3 - 1220/1115 bp**DEL#14**95 bp deléció CBS1954-ben
PCR3 - 1298/1203 bp

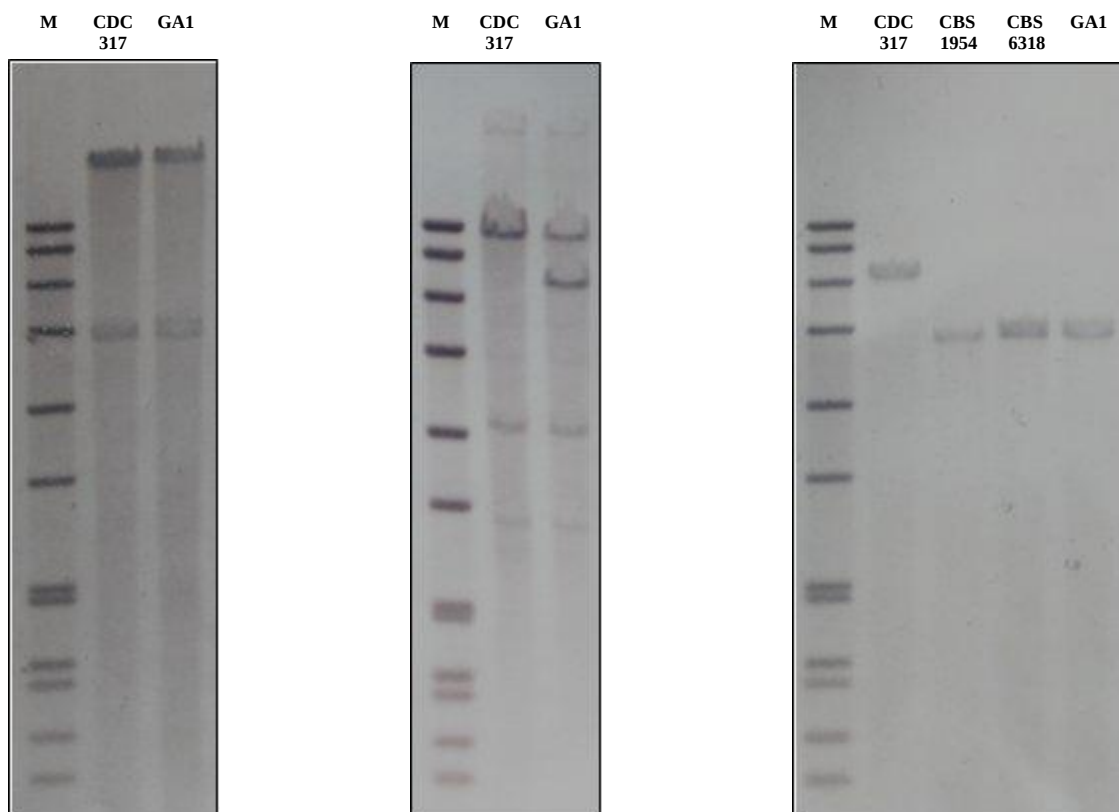
14c. számú melléklet. A kísérletes validációra kiválasztott 20 deléció PCR termékeinek gélfotója a deléció kiterjedésének és a várt fragmentumok méretének feltüntetésével.



M (DEL#1 - DEL#17): Fermentas MassRuler DNA Ladder Mix, ready-to-use, #SM0403: 10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3000, 2500, 2000, 1500, 1031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100, 80 bp

M (DEL#18 - DEL#20): Fermentas GeneRuler 100bp DNA Ladder Plus #SM0321: 3000, 2000, 1500, 1200, 1031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 bp

15. számú melléklet. A Southern hibridizáció eredményei, a deléción kiterjedésének és a várt fragmentumok méretének feltüntetésével.

**DEL#3**

9808 bp heterozigotitás GA1-ben

WT: 13228 bp

HZY: 13228 és 3514 bp

DEL#5

1640 bp heterozigotitás GA1-ben

WT: 8161 bp

HZY 8161 és 6513 bp

DEL#6

1595 bp deléción

CBS1954-ben, CBS6318-ban és GA1-ben

WT: 6167 bp

 Δ : 4617 bp

M: Roche DIG-labeled DNA Molecular Weight Marker VII 0.081 - 8.57 kbp: 8576, 7427, 6106, 4899, 3639, 2799, 1953, 1882, 1515, 1482, 1164, 992, 718, 710, 492, 359, 81 bp