

**OVEREXPRESSZIÓS MUTÁNS TÖRZSEK LÉTREHOZÁSA ÉS
SZÉLES KÖRŰ VIZSGÁLATA AZ OPPORTUNISTA
HUMÁNPATOGÉN *CANDIDA PARAPSILOSIS* GOMBAFAJBAN**

DOKTORI ÉRTEKEZÉS

PÁL SÁRA ESZTER

TÉMAVEZETŐ:

PROF. DR. GÁCSER ATTILA

EGYETEMI TANÁR

BIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA



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

2022

Tartalomjegyzék

1. Rövidítések jegyzéke.....	5
2. Bevezetés	8
3. Irodalmi áttekintés.....	11
3.1. Az egysejtű gombák szerepe az élővilágban	11
3.2. A humánpatogén gombafertőzések jelentősége.....	11
3.3. A <i>Candida</i> nemzetség tagjainak klinikai jelentősége	12
3.3.1. Diagnózis felállítása.....	15
3.3.2. Alkalmazott antifungális szerek és az ellenük kialakuló rezisztencia	15
3.4. A <i>Candida</i> nemzetség jellemzése	16
3.4.1. A <i>C. albicans</i> és virulenciafaktorai	17
3.4.2. A <i>C. parapsilosis</i> opportunistá humánpatogén jellemzése.....	20
3.4.2.1. A <i>C. parapsilosis</i> epidemiológiai jelentősége	20
3.4.2.2. A <i>C. parapsilosis</i> jellemzése és virulenciafaktorai	21
3.5. A gazda- <i>Candida</i> kölcsönhatás és vizsgálata	24
3.5.1. J774.2 egér monocita sejtvonal	27
3.5.2. <i>Galleria mellonella</i> lárva modell	27
3.5.3. Egér modell.....	28
3.6. Génmódosító módszerek alkalmazása, mutáns könyvtárak elemzése	29
3.6.1. A <i>C. albicans</i> genetikai módosításának lehetőségei.....	31
3.6.2. A <i>C. parapsilosis</i> genetikai módosításának lehetőségei	32
3.6.2.1. Gateway® klónozási módszer adaptációja <i>C. parapsilosis</i> gombafajban	33
3.6.3. KO és OE könyvtáranalízis eredmények összehasonlítása	35
4. Célkitűzések.....	39
5. Anyagok és módszerek	40
5.1. Alkalmazott törzsek	40
5.2. Tenyésztéshez használt tápközégek	40
5.3. Alkalmazott molekuláris technikák	43
5.3.1. Expressziós konstrukciók létrehozásához szükséges technikák	43

5.3.2. A létrehozott OE mutáns törzsek validálása	47
5.3.3. A létrehozott OE mutáns törzsek karakterizálása.....	50
5.3.3.1. Átfogó fenotípus és életképesség vizsgálatához használt módszerek	50
5.3.3.2. Gazda-patogén interakció vizsgálat.....	54
5.4. Etikai engedély/nyilatkozat	55
5.5. Statisztikai elemzés.....	56
6. Eredmények és értékelésük.....	57
6.1. A vizsgálni kívánt gének kiválasztása	57
6.2. A <i>C. parapsilosis</i> OE mutáns törzsek létrehozása	57
6.3. A létrehozott OE <i>C. parapsilosis</i> mutáns törzsek validálása	59
6.4. A létrehozott OE <i>C. parapsilosis</i> mutáns törzsek karakterizálása.....	61
6.4.1. A mutáns törzsek életképességének vizsgálata	61
6.4.1.1. Életképesség vizsgálat stressz körülmények között.....	62
6.4.2. Az OE mutáns törzsek pseudohifaképzésének és morfológiájának vizsgálata.....	66
6.4.3. Az OE mutáns törzsek biofilmképzésének vizsgálata.....	67
6.4.3.1. A CPAR2_302400 ^{OE} törzs biofilmképzésének szilikon korongon történő SEM mikroszkópos vizsgálata	69
6.4.4. Az OE mutáns törzsek echinokandinokkal szembeni érzékenységének vizsgálata.....	70
6.4.5. Az OE mutáns törzsek J774.2 egér monocita sejtek általi fagocitózisának vizsgálata.....	71
6.4.6. Az OE mutáns törzsek virulencia vizsgálata <i>in vivo</i> <i>Galleria mellonella</i> modellszervezetben	74
6.4.7. A kiválasztott mutáns törzsek bizonyos sejt-falkomponenseinek vizsgálata	75
6.4.8. A CPAR2_109520 ^{OE} és CPAR2_302400 ^{OE} mutáns törzsek virulencia vizsgálata <i>in vivo</i> <i>Mus musculus</i> modellrendszerben	76
6.5. A kísérleti eredmények összefoglalása és összevetése szakirodalmi adatokkal	78
7. Összefoglalás.....	87
8. Summary.....	90

9. Irodalomjegyzék.....	92
10. Köszönetnyilvánítás	122
11. Mellékletek	124

1. Rövidítések jegyzéke

ALS: Agglutinin-Like Sequence (agglutininszerű szekvencia)

AMP: Ampicillin

ANF: Anidulafungin

attB-P-L-R: Attachment siteB-P-L-R (specifikus felismerő szekvenciák)

BAR: Jelölő szekvencia (=TAG szekvencia)

Bp: Base pair (bázis pár)

BPS: Bathophenanthroline disulfonate (batofenantrolin-diszulfonát)

BSA: Bovine Serum Albumin (borjú szérum albumin)

CAF: Caspofungin

ccdB: Citotoxikus fehérjét (kolicin - DNS giráz gátló) kódoló gén

cDNS: Complementary DNS (kiegészítő DNS)

CDG: Candida Genome Database (Candida Genom Adatbázis)

CFU: Colony forming unit (telepképző egység)

CRISPR/Cas9: Clustered Regularly Interspersed Short Palindromic Repeat

ConA-FITC: Concanavalin A–fluorescein isothiocyanate (konkanavalin A–fluoreszcein-izotiocianát)

CUG: Cytosine-Uracil-Guanine (citozin-uracil-guanin triplet)

DIG: Digoxigenin

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium (Dulbecco által módosított Eagle-féle médium)

DMSO: Dimetil-szulfoxid

DO: Dropout (aminosav koktél)

EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid (etilén-diamin-tetraecetsav)

FBS: Fetal Bovine Serum (újszülött borjú szérum)

FLP: flipáz rekombináz

HI FBS: Heat inactivated Fetal Bovine Serum (hőinaktivált újszülött borjú szérum)

HIV: Human Immunodeficiency Virus (emberi immunhiány-előidéző vírus)

HWP1: Hyphal cell Wall Protein 1 (hifa sejtfal protein 1)

KAN: Kanamicin A

KF: Kalkofluor fehér

KO: Knock out (kiütés, deléción)

KV: Kongó vörös

LB: Luria-Bertani táptalaj

LEU2: Izocitrát/izopropil-malát dehidrogenáz (leucin bioszintézisért felelős gén)

MIC: Minimális gátló koncentráció

MIF: Micafungin

MOPS: 3-3-(N-morfolino)-propánszulfonsav

MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2)-2,5-difeniltetrazóliumbromid

NAC: Non-*albicans Candida* (nem-*albicans Candida* faj)

NEUT5L (N5L): Neutrális intergenikus régió

OD_x: Optikai denzitás, x-adott hullámhossz (nm)

OE: Overexpression (túltermelés, overexpresszió)

ORF: Open reading frame (nyitott leolvasási keret)

PAMP: Pathogene Associated Molecular Pattern (patogén asszociált molekuláris mintázat)

PBS: Phosphate Buffered Saline (foszfát pufferelt sóoldat)

PCR: Polymerase Chain Reaction (polimeráz láncreakció)

PEG: Polyethylene Glycol (polietilén-glikol)

PRR: Pathogene Recognition Receptors (patogén felismerő receptorok)

PS: Penicillin-Streptomycin (penicillin-sztreptomicin)

qPCR: quantitative Polymerase Chain Reaction (kvantitatív polimeráz láncreakció)

RPMI-1640: Roswell Park Memorial Institute tápoldat

RPS1: Ribosomal protein of the small (40S) subunit (kis riboszómális fehérje alegység)

Sap: Secreted Aspartyl Proteinase (szekretált savas proteináz fehérje)

SAP: Secreted Aspartyl Proteinase (szekretált savas proteinázt kódoló gén)

SAPP: Secreted Aspartyl Proteinase in *parapsilosis* (*C. parapsilosis* szekretált savas proteinázt kódoló gén)

SDS: Sodium Dodecyl Sulphate (nátrium-lauril-szulfát)

SEM: Scanning electronmicroscope (pásztázó elektronmikroszkóp)

TAE: Tris-Acetate-EDTA (Tris-acetát-EDTA)

TDH3: Triose-phosphate dehydrogenase 3 (trióz foszfát dehidrogenáz 3)

TE: Tris–EDTA

THP-1: Humán monocita sejtvonal

TRIS: Tris(hydroxymethyl)aminometheane (Tris-(hidroximetil)-aminometán)

TUB4: Tubulin 4 (gamma-tubulin 4)

VT: Vad típus

WGA-FITC: Wheat germ agglutinin–fluorescein isothiocyanate (búzacsíra agglutinin–fluoreszcein-izotiocianát)

YNB: Yeast Nitrogen Base (élesztő nitrogénforrás)

YPD: Yeast–Peptone–D-glucose (élesztőkivonat–pepton–D-glükóz)

2. Bevezetés

A nozokomiális szisztémás gombás fertőzések jelentős hányadáért világszerte a *Candida* fajok felelősek. A nemzetség ezen megbetegedésekkel leggyakrabban összefüggésbe hozható tagja a *Candida albicans*, habár az invazív candidiázisok epidemiológiája az elmúlt négy évtizedben jelentősen megváltozott. A gombás megbetegedésekkel (candidémia) összefüggésben olyan tendenciák figyelhetők meg napjainkban, mint például a növekvő esetszámok vagy az ún. nem-*albicans Candida* (NAC) fajok térhódítása és a multidrog-rezisztens fajok megjelenése a klinikumban. A NAC fajok, mint a *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. auris* vagy a *C. tropicalis* által okozott fertőzések növekvő tendenciája rávilágít ezen fajok vizsgálatának fontosságára. Az említett epidemiológiai változások hátterében maga a változó klinikai gyakorlat állhat, akár a daganatos megbetegedések esetén alkalmazott immunszuppresszáns kezelések növekvő gyakoriságára, akár az antifungális szerek túlzott használatára gondolunk.

A *C. parapsilosis* a normál humán mikrobióta közösség tagja, azonban képes betegséget okozni alacsony születési súllyal világra jött csecsemőkben, valamint immunszuppresszált egyéneknél. Képes a horizontális terjedésre, és a többi *Candida* fajhoz képest kevésbé érzékeny a gyakran alkalmazott echinokandin típusú gombaellenes szerekre. Mindezen tényezők szorgalmazzák a faj fiziológiáját, illetve virulenciafaktorait célzó átfogó vizsgálatok elvégzését. A *C. albicans* esetében már számos tanulmány beszámolt a faj fertőzőképességéért felelős gének és mechanizmusok azonosításáról, míg az egyre nagyobb kockázatot jelentő opportunistá humánpatogén *C. parapsilosis* gomba esetében kevés ismeret áll rendelkezésünkre a patomechanizmus tekintetében. A Candida Genom Adatbázisban (Candida Genome Database - CGD) a *C. parapsilosis* esetében a fehérje kódoló géneknek mindössze 1,35%-át azonosították, míg a *C. albicans* esetében a 27,87%-át (Skrzypek és mtsi., 2017).

A gének szerepének feltárásához általánosan alkalmazott módszer a kérdéses gének deletálása a genomból, majd a mutánsok jellemzése. A géndeléción (knocked out - KO) mutánsok létrehozása a *C. parapsilosis* faj esetében többféle módszerrel is megvalósítható. A géndeléción törzsek vizsgálata mellett egy másfajta megközelítést kínál a vizsgált gének folyamatos kifejeztetése, azaz overexpressziója (overexpression - OE). Ha az OE hatása a

KO hatásával ellenkezőleg hat a fenotípusra, az OE vizsgálat megerősítőleg szolgál az adott gén funkcióját tekintve. De az OE hatásának vizsgálata a deléciós fenotípus mellett további információkkal is szolgálhat a vizsgált gén szerepéről, különösen, amikor a deléciós mutáns fenotípusa nem tér el a vad típusú kontroll törzstől, vagy amikor az OE törzs fenotípusa hasonló a KO mutánséval. Abban az esetben, amikor egy gén deléciója letális, az OE hatásának vizsgálata különösen hasznos vizsgálati megközelítés, amelyet, ha összekapcsolunk represszálnak promótert alkalmazó vizsgálatokkal, akkor esszenciális gének funkciójáról is információt nyerhetünk. Diploid organizmusok esetén, mint például bizonyos *Candida* fajok, a KO fenotípus vizsgálatához mindkét allélt deletálni kell, azonban az OE vizsgálatokhoz az OE konstrukciót elégséges egy kópiában integrálni a genomba. Az integráció helyét irányítani is lehet, ha a konstrukcióba homológ rekombinációt biztosító genomi szakaszokat építünk be.

Számításba véve a *C. parapsilosis* gombafaj sajátosságos tulajdonságait a *Candida* nemzetség viszonylatában, valamint az OE megközelítés előnyeit, célunk volt egy OE mutáns *C. parapsilosis* kollekció létrehozása és a mutánsok fiziológiájának és a virulenciával összefüggésbe hozható tulajdonságainak széleskörű vizsgálata.

Az OE mutáns gyűjtemény megtervezéséhez megvizsgáltuk, hogy THP-1 humán monocitákkal együtt inkubált *C. parapsilosis* sejtekben milyen gének transzkripciója változik meg. A THP-1 sejtek jelenlétében megváltozott expressziós mintázatot mutató gének listáját kiegészítettük olyan génekkel is, melyek ortológjai *Saccharomyces cerevisiae* vagy *C. albicans* fajokban a szakirodalmi adatok szerint részt vesznek virulencia asszociált folyamatokban vagy tulajdonságok kialakításában, illetve KO mutáns párjuk már elérhető *C. parapsilosis* géndeléciós könyvtárban.

Létrehoztunk egy 37 különböző gént túltermelő mutáns gyűjteményt, amelynek tagjait különböző molekuláris módszerekkel (PCR, qPCR, Southern hibridizáció) validáltuk. Jellemeztük a mutáns törzsek életképességét, stressz toleranciáját, morfológiaváltásra való képességét, pszeudohifa- és biofilmképzését, valamint antifungális szerekekkel szemben mutatott érzékenységet. A törzsek kölcsönhatását a gazdasejtekkel *in vivo* és *in vitro* modellek alkalmazásával vizsgáltuk. A mutáns kollekció széleskörű vizsgálatát követően összevetettük eredményeinket *C. parapsilosis*, *S. cerevisiae* és *C. albicans* KO, illetve OE mutáns könyvtárak analízise során kapott szakirodalmi adatokkal. Az összehasonlítás során

egyed *C. parapsilosis* gének KO és OE fenotípusa közel azonosnak mutatkozott az összehasonlított faj ortológjának KO és OE fenotípusával, míg más gének KO és OE fenotípusa ellentétesnek vagy ellentmondásosnak mutatkoztak az összehasonlított ortológ KO és OE fenotípusával. A létrehozott *C. parapsilosis* OE mutáns kollekció karakterizálása során nyolc gén esetében azonosítottunk eltérő fenotípust a kontroll törzshöz viszonyítva.

A munkánk során azonosított gének virulenciában betöltött szerepét elsőként mutattuk be *C. parapsilosis*-ban. Eredményeink rávilágítottak, hogy a gén OE vizsgálati megközelítés egy hatékony módszer a virulencia gének azonosítására és vizsgálatára.

3. Irodalmi áttekintés

3.1. Az egysejtű gombák szerepe az élővilágban

Az egysejtű, úgynevezett élesztőgomba fajok a gombák királyságának Ascomycota vagy Basidiomycota törzsének tagjai közé tartoznak. Az élesztő kifejezés számos nyelven, ahogy magyarul is, utal a gomba fermentációs folyamatokban való részvételére. Ipari és kísérleti környezetben egyaránt alkalmazott organizmus a *S. cerevisiae*, amit gyakran szinonim elnevezéssel élesztő néven emlegetnek, ennek köszönhetően a többi egysejtű gombafajnak is gyakran tulajdonítanak fermentációhoz köthető szerepet. Az egysejtű élesztőgombák általános jellemzésük szerint, sarjadzással vagy kettéosztódással, elsősorban aszexuális módon szaporodó, főleg egyedülálló sejtekből álló telepeket létrehozó mikroorganizmusok. A szexuális reprodukcióra képes fajok nem képeznek termőtestet (Kurtzman és mtsi., 2011). Ezen gombafajok fontos szerepet töltenek be az élelmiszeriparban, mezőgazdaságban, biotechnológiában, gyógyszeriparban vagy akár biológiai alapkutatásokban. Elsősorban élelmiszeripari felhasználásukról ismertek alapvető élelmiszerek fermentációs folyamataiban, mint például a sör, bor, sajt vagy különböző pékáruk előállításában. Szintén fontos, ám kevésbé ismert szerepük van például az üzemanyagként használt etanol előállításában, ipari felhasználású enzimek vagy akár kis molekulású anyagcseretermékek termelésében (Johnson és Echavarri-Erasun, 2011). Számos esetben alkalmazzák heterológ expressziós rendszerben a *S. cerevisiae*-t másik faj által termelt fehérjék vagy enzimek termeltetésére. A környezetünkben előforduló és ipari jelentőséggel bíró fajok mellett azonban léteznek olyan fajok is, melyek az emberrel szimbiózisban vagy gazda-parazita kapcsolatban élnek.

3.2. A humánpatogén gombafertőzések jelentősége

A becsült 1,5-5 millió létező gombafaj közül napjainkig csupán néhány százat azonosítottak humánpatogén fajként. Ezek közül is kevés azon gombafajok száma, amelyek képesek egészséges egyedekben fertőzések kialakítására (Köhler és mtsi., 2014). Ezek a gombák obligát patogén szervezetek, míg mások opportunistá patogén fajok, melyek akár

szimbiózisban is élhetnek a gazdával, amíg a gazdaszervezet legyengülése vagy a gazdaszervezet által biztosított mikrokörnyezet megváltozása lehetőséget nem nyit a patogenezisre (Köhler és mtsi., 2017). A betegek immunrendszerének gyengítésével a modern gyógyászat és a változó klinikai gyakorlat paradox módon kedvező hatással van ezen fertőzések kialakulására (Köhler és mtsi., 2014).

A gombás fertőzések leggyakrabban a kültakarón és a nyálkahártyán alakulnak ki, ritkábban súlyosabb, akár halálos kimenetelű invazív fertőzéseket is okozhatnak (Brown és mtsi., 2012; Gow és Netea, 2016). Statisztikák szerint az invazív gombás megbetegedések általi elhalálozások száma közelít a maláriában, illetve a tuberkulózisban szenvedő páciensek esetében tapasztalt letalitás mértékével (Brown és mtsi., 2012). A gombás fertőzések hátterében leggyakrabban azonosított patogén fajok a *Cryptococcus*, *Candida*, *Aspergillus* vagy *Pneumocystis* nemzetség tagjai, melyek megközelítőleg az esetek 90%-áért felelősek (Brown és mtsi., 2012).

3.3. A *Candida* nemzetség tagjainak klinikai jelentősége

A *Candida* nemzetségbe számos olyan faj tartozik, amely a normál humán mikroflóra tagja. Kommenzalistaként az emberi emésztő szervrendszert, a nyálkahártyával borított felszíneket és a bőr felületét egyaránt kolonizálhatják. Azonban a gazdaszervezet védelmi rendszerének gyengülése esetén az opportunistá patogén fajok az emberi test számos pontján képesek lokális vagy szisztémás fertőzések (candidiázisok) kialakítására. Az elmúlt évtizedekben a candidiázisok gyakorisága növekvő tendenciát mutat az immunszuppressziós terápiák alkalmazásának, valamint a HIV (human immunodeficiency virus, emberi immunhiány-előidéző vírus) fertőzés elterjedésének köszönhetően. Feltehetően a gombás megbetegedések köztudatba kerülése és a diagnosztikai lehetőségek, eszközök fejlődése is hozzájárult a fertőzések hátterében egyre gyakrabban azonosított gombafajok klinikai statisztikákban való növekvő megjelenéséhez. A nemzetség legismertebb és legtöbbet vizsgált faja a *C. albicans*. Az 1985 és 2004 közötti időszakban a *C. albicans* gombával kapcsolatban megjelent publikációk száma több mint 334%-os növekedést mutatott (Cooper, 2011). A számok tükrében a *C. albicans* és egyéb más *Candida* fajok közegészségügyre

gyakorolt hatása egyre nagyobb jelentőséggel bír, amely egyre sürgetőbbé teszi tanulmányozásukat és megismerésüket.

A gomba kommenzalista életmódjának patogénre történő váltását számos körülmény befolyásolja, melyek egyike az antimikrobiális szerek gyakori használata. A természetes mikrobióta közösség sérülése teret ad akár endogén, akár exogén fajok túlszaporodásának, ezzel elősegítve a lokális gombafertőzések kialakulását (Amici és mtsi., 1994; Carr és mtsi., 1998). Egyes tanulmányok szerint az egészségügyi intézményeknek jelentős szerepük van az exogén eredetű candidiázisok kialakulásában (Jarvis, 1995). A hosszabb kórházi tartózkodásra kényszerült betegek körében gyakori a kórházi dolgozók vagy az alkalmazott orvosi eszközök (pl. katéterek), mint vektorok által történő megfertőződés (Trofa és mtsi., 2008). A *Candida* fajok által okozott megbetegedések leggyakrabban a nyálkahártyát érintő, például szájüregi vagy hüvelyi fertőzések, amelyek súlyosabb megjelenési formái elsősorban immunszuppresszált egyéneknél (pl. HIV fertőzött páciensek) jelentkezhetnek (Matee és mtsi., 2000; Sobel, 2007). A szisztémás, több szervet, szövetet érintő invazív candidiázisok mind az egészséges, mind pedig az alapbetegséggel vagy hajlamosító tényezővel (pl. égési sérülés) rendelkező betegekben egyaránt magas mortalitással járnak. Az invazív candidiázis számos belső szerv és szövet gyulladását okozhatja, és olyan kórképek kialakulásáért lehet felelős, mint például a szívbelhártya gyulladás (endocarditis), hashártyagyulladás (peritonitis), agyhártyagyulladás (meningitis), csontvártyagyulladás (osteomyelitis), ízületi gyulladás (arthritis), szemgyulladás (onychomycosis) (Pfaller és Diekema, 2007; Trofa és mtsi., 2008).

Habár a *Candida* nemzetség nozokomiális szisztémás gombás fertőzésekkel leggyakrabban összefüggésbe hozható tagja a *C. albicans*, az invazív candidiázisok epidemiológiája az utóbbi évtizedekben jelentős változáson ment keresztül. A candidémiás megbetegedésekkel összefüggésben megfigyelhető a nem-*albicans Candida* fajok (NAC), mint a *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. tropicalis* vagy *C. auris* gyakori előfordulása és térhódítása (Turner és Butler, 2014; Fridkin és mtsi., 2006; Trofa és mtsi., 2008; Cleveland és mtsi., 2012; Juyal és mtsi., 2013; Yapar, 2014; Zuza-Alves és mtsi., 2017; Spivak és Hanson, 2018; Krcmery és Barnes, 2002; Clark és mtsi., 2004; Kuhn és mtsi., 2004; Schelenz és mtsi., 2016). A különböző NAC fajok által azonosított fertőzések száma földrajzi régióként változó (Brown és mtsi., 2012; Yapar, 2014; Quindos, 2014), és az

általuk fertőzött célcsoport sem feltétlenül fed át. A *C. glabrata* gyakran a második helyen szerepel a *C. albicans* után az általa okozott véráramfertőzések számát tekintve, feltehetően a klinikumban leggyakrabban alkalmazott antifungális szerekkel szembeni megnövekedett rezisztenciájának köszönhetően (Malani és mtsi., 2005; Foster és mtsi., 2007). A *C. glabrata* gyakran azonosított faj szájüregi és hüvelyi fertőzések esetén (Bialkova és Subik, 2006; Kaur és mtsi., 2005) az észak-amerikai, illetve az észak- és közép-európai térségben. A *C. krusei* gyakorta azonosított faj a candidémiás megbetegedések kialakulásának hátterében neutropeniás páciensek körében (Hachem és mtsi., 2008; Pfaller és mtsi., 2008). A faj ismert flukonazol rezisztenciájáról és más hatóanyagokkal szemben mutatott csökkent érzékenységről (Pelletier és mtsi., 2005). Földrajzi elterjedését tekintve jellemzően Csehországban, Szlovákiában és Lengyelországban izolált faj. A *C. parapsilosis* gombafaj által okozott candidémiás esetek leggyakrabban a koraszülött osztályokon fordulnak elő (Bendel és mtsi. 2003; Chapman, 2003), és az egyes invazív gombafertőzésekre vonatkozó statisztikai felmérésekben a faj incidenciája szorosan követi a *C. albicans* fajét (Trofa és mtsi., 2008). Az intravénás katéterrel és egyéb orvosi implantátummal, protézissel ellátott betegek körében szintén jelentős a *C. parapsilosis* által okozott fertőzések száma. Világszerte elterjedt, Dél-Amerika, Ausztrália, Afrika és Európa egyes térségeiben gyakori faj (Guinea, 2014; Quindos, 2014). A *C. tropicalis* által okozott megbetegedések száma főleg leukémiában, neutropeniában szenvedő betegek és hosszú kórházi tartózkodásra ítélt egyének esetében jelentős. Dél-Amerikában a második, míg Délkelet-Ázsiában az első helyen szerepel a véráramból leggyakrabban izolálható *Candida* fajok rangsorában (Pfaller és Diekema, 2007; Kothavade és mtsi., 2010). A *C. auris* gombát 2009-ben azonosították Kelet-Ázsiában mint flukonazol rezisztens fajt, azóta további 5 kontinensen izolálták a candidiázis különböző formáiból, köztük véráramfertőzésből is (Spivak és Hanson, 2018).

Korábbi években készült magyarországi összefoglaló tanulmányok szerint hazánkban évente mintegy 1110 candidémiás megbetegedést azonosítanak (Sinkó és mtsi., 2015). Az invazív candidiázist okozó *Candida* fajok közül a *C. albicans* a leggyakrabban izolált faj (Dóczi és mtsi., 2012; Pongrácz és mtsi., 2015), ugyanakkor a nemzetközi trendekhez hasonlóan a *C. parapsilosis* által okozott fertőzések gyakorisága újszülött csecsemők körében hazánkban is növekvő tendenciát mutat (Dóczi és mtsi., 2012).

3.3.1. Diagnózis felállítása

A klinikai gyakorlatban az egyes fajok meghatározása történhet fajspecifikus morfológiai bélyegek, illetve biokémiai profil azonosításán keresztül klasszikus mikrobiológiai módszerek alkalmazásával, továbbá molekuláris technikák felhasználásával (Pincus és mtsi., 2007). Morfológiai azonosítást tesz lehetővé a specifikus képletek (pl.: klamidiospórák, csíratömlő, fonalas formák) megfigyelése. Az egyes fajok CHROM agar tápközegen tenyésztve telepmorfológiai jellegzetességet mutatnak (szín, alak, méret), amely alapján elkülöníthetők egymástól (Jabra-Rizk és mtsi., 2001; Odds és Bernaerts, 1994; Pfaller és mtsi., 1996). A kereskedelmi forgalomban kapható szénhidrát fermentációt és hasznosítást vizsgáló tesztek, valamint a vérmintából történő gomba antigének kimutatása szintén alkalmazott módszerek a fajok azonosítására. Molekuláris biológiai módszerek például a polimeráz láncreakción (PCR) alapuló technikák, a fajspecifikus riboszómális rDNS szekvencia meghatározás (Pincus és mtsi., 2007) vagy az RNS fluoreszcens *in situ* hibridizáció (Kempf és mtsi., 2005). A diagnózis felállítására napjainkban számos molekuláris technikán alapuló módszer is elérhető a konvencionális PCR alapú módszereken túl. A MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry) tömegspektrometria segítségével az egyes izolátumokat eltérő riboszómális fehérjeösszetételük alapján különítik el. A számtalan diagnosztikai módszer közül egyik sem elég megbízható vagy hozzáférhető a gyakorlatban, ami megnehezíti a diagnózis felállítását és a megfelelő terápia minél előbbi megkezdését (Brown és mtsi., 2012).

3.3.2. Alkalmazott antifungális szerek és az ellenük kialakuló rezisztencia

Az invazív *Candida* fertőzésekkel szemben leggyakrabban alkalmazott antifungális szerek, például az echinokandin, az azol és a polién alapú készítmények (Pappas és mtsi., 2004; Roemer és Krysan, 2014). A megfelelő antimikotikum kiválasztását megnehezíti a multidrog-rezisztens fajok megjelenése a klinikumban, valamint a különböző *Candida* fajok eltérő tolerancia szintje a különféle szerekkel szemben. Például *C. glabrata* izolátumok magas toleranciával rendelkeznek, mind azol, mind pedig echinokandin típusú szerekkel szemben (Pfaller, 2012), a *C. krusei* patogén faj pedig csökkent érzékenységet mutat

flukonazol jelenlétében (Lin és mtsi., 2005). *C. parapsilosis* esetében emelkedett toleranciát figyeltek meg echinokandin típusú szerek alkalmazása során, ami a többi *Candida* faj esetében ritkán megfigyelhető tulajdonság (Tóth és mtsi., 2019). Az echinokandinok ciklikus lipopeptid molekulák, melyek gátolják a gomba β -1,3-D-glükán sejtalkomponensének szintéziséért felelős enzimkomplexet, ami a sejt fal dezintegrációjához, majd pedig a sejt halálához vezet (Kofla és Ruhnke, 2011; Mukherjee és mtsi., 2011). A polién típusú antifungális szerek a gombák sejt falának ergoszterol komponenséhez képesek kötődni, ezáltal negatívan befolyásolva a membrán normál működését (Odds és mtsi., 2003). Az azolok az ergoszterol bioszintézisének gátlásán keresztül fejtik ki antifungális hatásukat, megváltoztatva ezzel a gomba sejt fal permeabilitását és fluiditását (Odds és mtsi., 2003). További nehézséget okoz, hogy ezek a fajok szelekciós nyomás hatására szert tehetnek rezisztenciát okozó mutációkra, amelyek számunkra kedvezőtlenül befolyásolják az antifungális szerekkel szembeni érzékenységüket (Park és mtsi., 2005; Beyda és mtsi., 2012; Papp és mtsi., 2018; Tóth és mtsi., 2019). A *C. albicans* esetén már ismertek azokkal szembeni rezisztenciáért felelős mechanizmusok, melyek egyes génekben bekövetkezett mutációknak és adott gének túltermelésének (multidrog transzporterek, ERG11) köszönhetőek (Park és mtsi., 2005; Garcia-Effron és mtsi., 2010). A patogén fajok génmutációk révén újabb és újabb antifungális szer elleni rezisztenciát is kialakíthatnak (Pfaller, 2012).

3.4. A *Candida* nemzetség jellemzése

A *Candida* nemzetség tagjai az Ascomycota törzs, Saccharomycetales rendjének, *Saccharomycetaceae* családjába tartozó élesztőgombák. Fajait izolálták már levegő, talaj, víz és élelmiszer mintákból, míg egyes tagjai kommenzalista életmódot folytatnak más élőlényekkel. Kevés fajszámmal ugyan, de egyaránt képviseltetik magukat humán-, illetve állatpatogén kategóriában (Köhler és mtsi., 2014). A több száz (200-300) *Candida* faj közül mindössze néhány az, amely képes betegséget okozni az emberi szervezetben, ezek közül csupán 5 faj felelős a fertőzések körülbelül 90%-áért (Lachance és mtsi., 2011; Turner és Butler, 2014).

Számos egészségügyi kockázatot jelentő *Candida* faj az úgynevezett CUG (citozin-uracil-guanin triplet) klád tagja, ahol a CUG triplet a konvencionális leucin helyett a szerin aminosav beépülését eredményezi (Butler és mtsi., 2009).

A génusz tagjai között egyaránt találunk haploid (pl. *C. glabrata*) és diploid (pl. *C. tropicalis*) genommal rendelkező fajokat (Cooper, 2011; Turner és Butler, 2014). A genom mérete néhány faj esetében ismert, 12-16 Mb pár, a fehérjét kódoló gének száma pedig 6000 körüli értékre tehető (Dujon, 2010). Többségük ivartalanul, lefűződéssel vagy más néven sarjadzással szaporodik, de megfigyelték már szexuális szaporodási formákat, például a *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae* és *C. krusei* fajok esetében (Turner és Butler, 2014).

A nemzetség képviselőire jellemző a dimorfizmus, kerekded élesztő és megnyúlt fonalas pszeudohifa (pl. *C. glabrata*, *C. lusitaniae*, *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis*) vagy valódi hifa (pl. *C. tropicalis*, *C. dubliniensis*, *C. albicans*) formában fordulhatnak elő (Thompson és mtsi., 2011). Az élesztő sejtek mérete 2-6 µm, általában ovális, kerekded alakúak, telepmorfológiájukat tekintve fehér vagy krémfehér színű, sima, ráncos vagy gyűrött felszínű telepeket képeznek, az utóbbi esetben a fonalas formák dominálnak (Laffey és Butler, 2005). A pszeudohifaképződés során az utódsejtek megnyúlnak és együtt maradnak, élettanilag azonban függetlenek lesznek egymástól, míg a valódi hifák esetében a megnyúlt sejteket pórusokkal rendelkező szeptumok választják el egymástól, amelynek segítségével az egyes sejtek anyagcsere kapcsolatot képesek létesíteni egymással (Thompson és mtsi., 2011). Néhány fajuk (pl. *C. albicans*, *C. dubliniensis*) képes klamidiospóra képzésére, amely egy olyan megvastagodott falú kitartó képlet, ami kedvezőtlen körülmények esetén képződhet a hifák csúcsi régiójában (Staib és Morschhäuser, 2007).

3.4.1. A *C. albicans* és virulenciafaktorai

A *Candida* nemzetség legismertebb és legtöbbet kutatott patogén faja a *C. albicans*. A faj opportunistá patogén organizmus, képes kommenzalista kapcsolat kialakítására az emberi fajjal, de ugyanakkor számos virulenciafaktorral is rendelkezik, ami hozzájárul patogén mivoltához. A *C. albicans* esetében a morfogenezis, biofilmképzés, specifikus sejtfalkomponensek és szekretált hidrolitikus enzimek termelése virulenciafaktorokként ismeretesek (Calderone és Fonzi, 2001; Navarro-García és mtsi., 2001).

A *C. albicans* diploid, valódi ivaros ciklust nem írtak le esetében, azonban paraszexuális életciklusa ismert, amely lehetővé teszi különböző egyedek eltérő genetikai állományának keveredését.

Mindhárom morfológia típus (élesztő, pseudohifa és hifa) képzésére képes és kedvezőtlen körülmények esetén kitartóspórát, klamidiospórát is képezhet. A morfológiaváltásért felelős környezeti tényezők és a fő regulátor gének korábban azonosításra kerültek (Jacobsen és Hube, 2017). A hifaképzésért felelős környezeti tényezők például az alacsony O₂ szint, hőmérséklet, CO₂ koncentráció és tápanyag tartalom (Desai és mtsi., 2015; Lu és mtsi., 2013). Egy 2016-ban azonosított hifaszpecifikus gén egyik terméke a candidalizin fehérje, amely képes lizálni a gazdaszervezet sejtjeit (Moyes és mtsi., 2016). A candidalizint kódoló gén delécioja következtében a gomba nem képes roncsolni az epiteliális sejteket, amely együtt jár a virulencia képesség csökkenésével. A hifa alaknak további szerepe van a gazda immunsejtjeivel való interakció során. A gomba képes a fagoszómák belsejében uralkodó pH érték aktív szabályozására (ammónia transzport útján), amelynek alkalikus irányba történő eltolódása indukálja a hifaképződést (Vylkova és Lorenz, 2014). A gomba piroptózist, gyulladásos sejthalált idéz elő a makrofágban, és a fagocita belsejében növekvő hifa sejtek fizikailag is képesek elpusztítani a makrofágokat, azok sejtmembránjának átdöfése révén (Uwamahoro és mtsi., 2014).

A gombasejtek sejtfa 3 fő rétegből épül fel, melyek a plazmamembrántól az extracelluláris tér felé haladva sorrendben: kitin, β -1,3- és β -1,6-D-glükán és mannoprotein. Utóbbit a fehérjétől függően N- vagy O-kötött mannóz polimerek alkotják, amelyek aránya hatással lehet a sejt adhéziójára és integritására (Bates és mtsi., 2006). A *C. albicans* sejtfaának kitin és glükán rétege közelebb helyezkedik el a plazmamembránhoz, így a mannán réteg által nagymértékben lefedett (Gow és mtsi., 2007; Mora-Montes és mtsi., 2011). Az egyes rétegekbe specifikus fehérjék ékelődhetnek, amelyek számos funkcióval rendelkeznek a szerkezeti stabilitás biztosításán kívül, hiszen szerepük lehet a gomba alkalmazkodóképességében különböző stresszorok jelenlétében vagy akár a gazda immunsejtjei általi felismerés elkerülésében (Brown és mtsi., 2014; Gow és mtsi., 2017; Serrano-Fujarte és mtsi., 2016). Az adhezinek az ún. *ALS* (agglutininszerű sorozat) gének által kódolt sejtfelszíni glikoproteinek, melyeknek szerepe van a gomba kitapadásában, ezáltal pedig virulenciájában (Liu és Filler, 2011). Például a *HWPI* (hifa sejtfa protein 1)

gén által kódolt fehérje egy sejtfelszíni mannoprotein komponens, amely a valódi hifák felszínén jelenik meg a fertőzés során (Staab és mtsi., 1999). Az *INT1* gén az emlős integrinokkal homológ fehérjét kódol *C. albicans* gombában, melynek delécioja a patogén adhéziójának és fertőzőképességének csökkenését okozza (Navarro-García és mtsi., 2001; Calderone és Fonzi, 2001). A sejtfal további egyedi komponensei úgynevezett PAMP (pathogene associated molecular pattern, patogén asszociált molekuláris mintázat) molekulái, mint például a β -glükán, N-mannán és O-mannán, jelentős szerepet játszanak a patogén gomba gazda általi felismerésében (Netea és mtsi., 2015; Bojang és mtsi., 2021). Például a *C. albicans* a β -glükán molekulák mannoprotein réteg általi elfedésével képes gátolni a makrofágok fagoszómájának érési folyamatait, amely normál esetben a gomba sejtek halálához vezetne (Bain és mtsi., 2014).

A *C. albicans* képes biofilm képzésre, elsősorban orvosi eszközök, implantátumok felületén, növelve a kórházi tartózkodásra ítélt páciensek fertőződésének kockázatát. A biofilmképzésben szerepet játszó regulátor gének és szabályozó elemek, valamint a közreműködő jelátviteli útvonalak már ismertek *C. albicans*-ban. A *C. albicans* által képzett biofilmet élesztő és fonalas sejtek alkotják, amelyek az általuk termelt extracelluláris mátrix anyagba ágyazódnak. Kísérletek során bebizonyították, hogy mindkét sejttypusnak fontos szerepe van a biofilm kialakításában, utalva ezzel a különböző morfológiájú sejtek egyedi szerepére (Douglas, 2003). A biofilmképzés első lépése az élesztő sejtek adhéziója a felülethez, melyet követően a sejtek osztódnak és megnyúlnak, ami fonalas hifa és pszeudohifa formák keletkezéséhez vezet (Finkel és Mitchell, 2011). Ezután kezdődik a mátrix anyag exkrécioja és felhalmozása, amely védelmet nyújt az antifungális szerekkel vagy akár a gazda immunsejtjeivel szemben. A biofilm érési fázisa után megjelennek a nem adhezív élesztő sejtek, amelyek további invázióra képesek. A már korábban említett hifaképzésért, illetve adhézióért felelős sejtfalkomponens fehérjék (például *ALS*, *HWPI*) szintéziséhez köthető géneknek egyaránt szerepe van a biofilmképzésben (Finkel és Mitchell, 2011). További szabályozó fehérjék, transzkripciós faktorok vagy protein kinázok szerepe a folyamatban szintén bizonyított.

A szekretált hidrolitikus enzimek patogenezisben betöltött szerepe jól ismert. Ilyen enzimek például a savas proteinázok, lipázok és foszfolipázok, amelyek termelésével a patogén a gazda szövetének károsítása révén hatékonyabb invázióra képes. Emellett a

gazdaszervezet komponenseinek bontása során a felszabadult építőelemek tápanyagforrásként is hasznosulnak a gomba számára. A savas proteinázok (secreted aspartyl proteinase, Sap) *C. albicans* gombában betöltött szerepét számos tanulmány vizsgálta. A Sap-ok képesek bontani a gazdaszervezet extracelluláris mátrix fehérjéit, mint például a kollagén, fibronectin és laminin molekulákat, illetve az immunrendszer részét képező antimikrobiális fehérje komponenseket, mint az immunglobulinok, laktoferrin és a komplement rendszer elemei (Naglik és mtsi., 2003). Az egyes *SAP* gének különböző körülmények (például eltérő pH viszonyok) között eltérően expresszálódnak és olyan funkciót töltenek be a patogén inváziója során, mint az endotélium vagyis az elsődleges védelmi gát áttörése vagy a makrofágok által történő emésztés megakadályozása (Navarro-García és mtsi., 2001). A foszfolipázok és lipázok fertőzésben betöltött szerepe hasonló a Sap-ok esetében tárgyalt szerepkörökhöz. Például a *PLBI* foszfolipáz enzimet kódoló gén deléciója a *C. albicans* csökkent inváziós képességét okozza (Leidich és mtsi., 1998). A lipázok szerepe szintén széleskörű, képesek a gazdaszervezet lipid komponenseinek bontására és energiaforrásként való hasznosítására; a fertőzés során részt vesznek a szövetkárosításban, a szövetekhez való kitapadásban, továbbá az immunrendszer elleni védelemben (Tóth és mtsi., 2016).

3.4.2. A *C. parapsilosis* opportunista humánpatogén jellemzése

3.4.2.1. A *C. parapsilosis* epidemiológiai jelentősége

A candidémiás megbetegedésekkel összefüggésben megfigyelhető a NAC fajok gyakori azonosítása (Fridkin és mtsi., 2006; Trofa és mtsi., 2008; Cleveland és mtsi., 2012; Juyal és mtsi., 2013; Yapar, 2014; Kasper és mtsi., 2015; Tóth és mtsi., 2019; Zuza-Alves és mtsi., 2017; Spivak és Hanson, 2018; Krcmery és Barnes, 2002; Clark és mtsi., 2004; Kuhn és mtsi., 2004; Schelenz és mtsi., 2016). Az egyik növekvő esetszámot mutató NAC faj, a *C. parapsilosis*, a normál humán mikrobiom tagja, azonban egyes esetekben képes megbetegíteni a gazdaszervezetet. Ez az opportunista humánpatogén gombafaj gyakran okoz fertőzéseket alacsony súlyú újszülött csecsemőkben, illetve hosszabb kórházi tartózkodásra ítélt, orvosi katéterrel ellátott betegek körében (Pappas, 2006; Pammi és mtsi., 2013;

Jayaweera és Reyes, 2018). Feltehetően a gomba olyan fajspecifikus tulajdonságai teszik ezt lehetővé, mint a biofilmképző képessége orvosi eszközök (implantátumok, katéterek) felületén, valamint a parenterális tápláláshoz használt tápoldatokban való hatékony szaporodás képessége, vagy akár a horizontális terjedőképesség a kórházi dolgozók kezéről a páciensekre (Critchley és Douglas, 1985; Weems és mtsi., 1987; Huang és mtsi., 1999; Lupetti és mtsi., 2002; Paramythiotou és mtsi., 2014; Harrington és mtsi., 2017). A faj további klinikai jelentőségét bizonyítja, hogy egyes földrajzi régiókban az általa okozott invazív candidiázis a második helyen szerepel vagy akár megelőzve a *C. albicans*-t átveszi az első helyet a gyakoriság tekintetében (Bassetti és mtsi., 2006; Tóth és mtsi., 2019).

Az 1990-es évek óta rutinszerűen alkalmazott azol típusú antifungális terápiáknak köszönhetően mára kialakultak ezen szerekre rezisztens *Candida* törzsek, de nem ritka a multidrog-rezisztens izolátumok megjelenése sem, amikor további antifungális szerekkel – mint echinokandinok vagy poliének – szemben is rezisztenssé válik a gomba (Pfaller és Diekema, 2004; Moudgal és mtsi., 2005; Van Asbeck és mtsi., 2009; Lewis, 2009; Garcia-Effron és mtsi., 2010; Chapeland-Leclerc és mtsi., 2010; Cleveland és mtsi., 2015). A *C. parapsilosis* faj, a *Candida* nemzetségben egyedülállóan, csökkent érzékenységet mutat az ellenük leggyakrabban alkalmazott echinokandin típusú antifungális szerekkel szemben (Meletiadi és mtsi., 2017).

Fentebb említett specifikus tulajdonságainak köszönhetően a faj képes járványszerű terjedésre és fertőzések kialakítására kórházi környezetben (Hernández-Castro és mtsi., 2010; Pinhati és mtsi., 2016; Qi és mtsi., 2018). Mindezen tényezők sürgetik *C. parapsilosis* fajspecifikus hatóanyagok és terápiák fejlesztését.

3.4.2.2. A *C. parapsilosis* jellemzése és virulenciafaktorai

A *C. parapsilosis* a normál humán mikrobióta tagja, elsősorban a kültakaró kommenzalistája (Trofa és mtsi., 2008). Egy 2018-ban megjelent tanulmányban az egészséges emberi bőrfelületet 10 leggyakrabban kolonizáló eukarióta faj között tartják számon (Byrd és mtsi., 2018).

Az első izolátum egy klinikai székletmintából származik és Ashford írta le *Monilia parapsilosis* néven 1928-ban (Ashford, 1928). 1932-ben Langeron és Talice azonosították és

írták le a jelenleg is használatos *C. parapsilosis* megnevezéssel (Lachance és mtsi., 2011). További elterjedése, ökológiai preferenciája kérdéses, hiszen számos, nem humán asszociált mintatípusban is azonosították, mint például sör és tengervíz, olíva bogyó, növénypatogén gomba felülete vagy lepkehernyó ürüléke (Lachance és mtsi., 2011).

Telepmorfológiáját tekintve sima vagy ráncos felszínű, kerekded, ép vagy karéjos szélű telepeket képezhet az élesztő és fonalas formák arányától függően. Színe a krémfehér árnyalattól a rózsaszínig változhat (Lachance és mtsi., 2011).

A *C. parapsilosis* és a *C. albicans* sejtfalának összetétele lényeges eltéréseket mutat a sejtalkomponensek mennyiségét és eloszlását illetően. Előbbi sejtfa porózusabb szerkezetű, kitin és β -1,3-glükán rétege kitettebb, a mannán kevésbé fedi (Shibata és mtsi., 1995; Estrada-Mata és mtsi., 2016). A *C. parapsilosis* sejtfalának glükán rétege vastagabb, mint a *C. albicans* gombáé, aminek szerepe lehet a sejtfa szerkezetének erősítésében (Estrada-Mata és mtsi., 2016). A *C. parapsilosis* O-kötött mannán molekuláit az N-kötött mannánok elfedik, amely szintén hatással lehet a gazda immunrendszere általi felismerés hatékonyságában (Pérez-García és mtsi., 2016). A *C. albicans* esetében már említett, sejtfa felületén Als, illetve Hwp fehérjékén kívül atipikus fehérjék szintén megtalálhatóak a *C. parapsilosis* sejtfalában (Kozik és mtsi., 2015). Ezeknek a fehérjéknek a gazda-patogén felismerés során van jelentőségük, valamint immunogén szerepük is lehet (Lee és mtsi., 2014).

A *C. parapsilosis* dimorf élesztőgomba, azonban a *C. albicans*-szal ellentétben valódi hifaképzésre nem, de ún. pszeudohifa fonalas forma képzésre képes. A pszeudohifát megnyúlt, a sejtosztódás után együtt maradó, nem lefüződő sejtek alkotják, amelyek önálló anyagcserét folytatnak (Thompson és mtsi., 2011). Kutatások szerint, az egyes komponensek, amelyek felelősek a *C. albicans* és a *C. parapsilosis* fonalas növekedéséért, egyaránt szerepet játszanak azok biofilm képzésében, amely nem meglepő, hiszen a két folyamat szorosan összefügg (Laffey és Butler, 2005; Lackey és mtsi., 2013). Érdekes módon a két faj biofilmképzését eltérő fő regulátor gének szabályozzák (Nobile és mtsi., 2012; Holland és mtsi., 2014). A *C. parapsilosis* által képzett biofilm eltér a *C. albicans*-nál azonosított szerkezettől, kevésbé komplex és vékonyabb rétegű. Aggregálódott élesztő és pszeudohifa sejtek alkotják, amelyek nagy mennyiségű extracelluláris szénhidrát mátrix anyagba ágyazódnak (Silva és mtsi., 2009; Kuhn és mtsi., 2002). Pfaller és munkatársai

különböző *C. parapsilosis* klinikai izolátumok biofilmképző hatékonyságában nagy variációt tapasztaltak (Pfaller és mtsi., 1995).

C. parapsilosis esetében még nem sikerült azonosítani a candidalizin toxin termelésének képességét, és további *in silico* vizsgálatok során sem azonosították az ortológ gént (Tóth és mtsi., 2019).

A *C. albicans*-hoz hasonlóan a *C. parapsilosis* is képes hidrolitikus enzimek termelésére. A savas proteínázok (Sap) exkréciójának képessége a bőr felszínét vagy nyálkahártyát érintő candidiázisból származó *C. parapsilosis* izolátumok esetében gyakoribb (Tóth és mtsi., 2019). A fajban eddig 3 Sap fehérjét kódoló gént azonosítottak (*SAPP1-3*). Egy 2019-ben publikált tanulmány szerint azonban csak a *SAPP1* és *SAPP2* gének vannak befolyással a gomba adhéziójára, a gazdaszervezet sejtjeinek lízisére, fagoszómalizoszómáváérésére, fagocitózisra, ölési hatékonyságra és a gazda immunsejtjeinek citokin termelésére (Singh és mtsi., 2019). A szekretált lipáz termelésére képes izolátumok fertőzőképessége hatékonyabb volt a nem-termelő deléciós törzsekkel összehasonlítva. Mindeztáig 4 lipáz termelésben szerepet játszó gént azonosítottak *C. parapsilosis*-ban, azonban csak kettő (*LIP1* és *LIP2*) esetében bizonyított, hogy funkcionálisan aktív enzimet kódol és befolyással van a gomba patogenitására (Tóth és mtsi., 2019). Foszfopolipáz termelő törzsek is előfordulnak a klinikai izolátumok között, azonban ezen enzimek hozzájárulása a faj virulenciájához nem tisztázott (Tóth és mtsi., 2019).

A *C. parapsilosis* is diploid organizmus, genomja megközelítőleg 13,1 Mb (megabázis) és több mint 5700 génnel rendelkezik. A faj legalább 8 kromoszómával bír és a CUG klád tagja (Nosek és mtsi., 2009; Butler és mtsi., 2009). Ellentétben a legtöbb gombafajjal, lineáris mitokondriális DNS-sel rendelkezik (Nosek és mtsi., 1995). A különböző izolátumok ITS1 szekvenciájának elemzése alapján bebizonyosodott, hogy a *C. parapsilosis*-ként azonosított izolátumok genetikailag heterogének, ezért Lin és munkatársai indokoltnak tartották azok rendszertani megkülönböztetését és külön csoportokba sorolását (I., II., és III. csoport) (Lin és mtsi., 1995). Majd 2005-ben a genetikailag eltérő II. és III. csoport tagjait *C. orthopsilosis* és *C. metapsilosis* kettős latin nevezéktannal látták el, míg az első csoport megtartotta a *C. parapsilosis* fajnevet (Tavanti és mtsi., 2005). Az utóbbi faj esetében tapasztalt alacsony szekvencia diverzitás alapján feltételezik, hogy ez a faj nem olyan régen (az elmúlt 1 millió éven belül) ágazhatott el a '*psilosis*' komplexen belül és

kezdhette meg koevolúcióját az emberi fajjal (Fundyga és mtsi., 2004; Nosek és mtsi., 2009). Ezt a feltételezést támasztja alá, hogy a *C. orthopsilosis* és *C. metapsilosis* fajokat csekély számban azonosítják humán fertőzések kapcsán, továbbá számos tanulmány bizonyította, hogy virulenciájuk elmarad a *C. parapsilosis* virulenciájához képest (Gácsér és mtsi., 2007; Németh és mtsi., 2013).

Egy közel 200 izolátumot vizsgáló kísérlet eredményéből fény derült arra, hogy a faj izolátumainak genomjában csupán az egyik párosodási típus gén található meg (Sai és mtsi., 2011). A *C. parapsilosis*-t anamorf gombafajnak tekintik, tehát aszexuális módon sarjadzással szaporodik, teleomorf szexuális reprodukció ciklusa pedig mindezekig nem ismert.

Egy tanulmány, mely összevetette a *C. parapsilosis* által kódolt fehérjék szekvenciáját a *C. albicans* által kódolt fehérjék szekvenciájával, megállapította, hogy a két faj fehérjéi átlagosan 59%-ban hasonlítanak egymáshoz (Nosek és mtsi., 2009). Ezen ismeretek és a faj specifikus genotípus és fenotípus jellegzetességei rávilágítanak arra, hogy a *C. albicans* faj virulenciájával kapcsolatban szerzett eddigi ismereteink a legtöbb esetben nem vonatkoztathatók közvetlenül a *C. parapsilosis* gombafajra, és a két faj patomechanizmus tekintetében is eltérő jellegeket mutat (Logue és mtsi., 2005; Nosek és mtsi., 2009; Butler és mtsi., 2009; Pryszcz és mtsi., 2013; Papon és mtsi., 2013). Mindezekből következik, hogy nem csak indokolt, de szükséges is a *C. parapsilosis* fertőzésében szerepet játszó faktorok azonosítása és patomechanizmusának feltárása ahhoz, hogy hatékony, célzott prevenciót és terápiát tudjunk alkalmazni a jövőben a *C. parapsilosis* fertőzések megakadályozására és kezelésére.

3.5. A gazda-Candida kölcsönhatás és vizsgálata

A patogén gomba által okozott szisztémás fertőzés adhézió, kolonizáció, biofilmképzés, penetráció és invázió lépéseken keresztül valósulhat meg. Egy patogén organizmusnak képesnek kell lennie arra, hogy letapadjon az adott felületre, amit a későbbiekben kolonizálni fog és amelyen akár biofilmet is képezhet. A patogén szövetkárosító hatása, penetrációs-, illetve inváziós képessége további mércéje lehet

virulenciájának, amelyet a már korábban említett virulenciafaktorok (morfológiaváltás, biofilm, szekretált enzimek) támogatnak.

A penetráció során a véráramba jutott kórokozó gombasejteket a gazdaszervezet veleszületett immunrendszerének elemei ismerik fel. A gazda-patogén interakció első lépését a gomba sejtfa, illetve annak alkotóelemei, a már említett PAMP molekulák és a gazdasejt specifikus sejtfelszíni receptorai (PRR, pathogene recognition receptors) közti kölcsönhatások jelentik.

Számos patogén gomba PAMP molekuláit felismerő PRR molekula ismert, a legjelentősebbek például a Toll-szerű receptorok (Toll-like receptors, TLRs) és a C-típusú lektin receptorok (C-type lectin receptors, CLRs) (Romani, 2011; Drummond és mtsi., 2014). Ezen receptorok közül már ismertek a *C. parapsilosis* felismerésében résztvevő elemek (TLR2, TLR4, TLR6, Galectin-3, Dectin-1), melyek defektusa esetén csökken a szervezet gomba eliminációs képessége és a termelt gyulladásos citokinek mennyisége, ezáltal növelve a fertőződés kockázatát, illetve súlyosságát (Bahri és mtsi., 2010; Tóth és mtsi., 2017; Linden és mtsi., 2013a; Linden és mtsi., 2013b; Tóth és mtsi., 2013). Linden és munkatársai megállapították, hogy a Galectin-3 alacsonyabb mennyiségben van jelen az emberi újszülött köldökzsínor szérumban, mint az egészséges felnőtt humán szérumban, ami magyarázatul szolgálhat az újszülöttek esetében tapasztalt magasabb *C. parapsilosis* általi fertőzések arányára (Linden és mtsi., 2013b).

A patogén PAMP molekuláinak sikeres felismerése a veleszületett és az adaptív immunrendszer elemeinek mozgósítását és további effektor mechanizmusok aktivációját vonja maga után. A patogén eliminálásához szükséges tényezők például a fagocitózis, majd a fagoszóma és lizoszóma fúziója, a reaktív oxigén és nitrogén gyökök képzése, citokinek termelése, valamint antimikrobiális peptidek termelése. A citokinek fehérvérsejteket toboroznak és gyulladásos folyamatok szabályozásában vesznek részt. A veleszületett immunrendszer antifungális válaszában főszerepet játszó elemek a neutrofil granulociták, a monociták, makrofágok, dendritikus sejtek, természetes ölüsejtek. A neutrofil granulociták és makrofágok képesek fagocitálni a gombasejteket. Az előbbi sejtípus a leghatékonyabb a *Candida* sejtek eliminálásában oxidatív stressz kialakítása és enzimek exkréciója, illetve neutrofil extracelluláris csapdák képzése révén, amelyek képesek lehetnek a nagyméretű fonalas formák elpusztítására is (Cheng és mtsi., 2012; Netea és mtsi., 2015). A neutrofil

sejtpopulációt érintő betegségben (neutropénia) szenvedő páciensek így nagyobb eséllyel szenvednek gombás fertőzésben (Salazar és Brown, 2018). A makrofágok alacsonyabb ölési hatékonysággal, de szintén képesek fagocitálni és savas környezet létrehozásán keresztül lizálni a gombasejteket. Kiemelkedő szerepük van a kemokin és citokin szekrécióban és további immunsejtek toborzásában. Ezenfelül az adaptív immunrendszer gombaellenes válaszában kialakításában vesznek részt antigének bemutatása és citokinek termelése révén. Az adaptív immunrendszer részét képező T-sejtes válasz *C. albicans* fertőzés hatására aktiválódik, azonban úgy tűnik, hogy *C. parapsilosis* jelenlétében nem termelődik megfelelő mennyiségű citokin, így ebben az esetben egy eltérő T-sejtes útvonal indukálódik (Tóth és mtsi., 2013).

A patogén *Candida* gombák számos mechanizmussal rendelkeznek, hogy alkalmazkodni tudjanak a gazdaszervezetben uralkodó körülményekhez (pH, hőmérséklet, oxidatív stressz) és elkerüljék annak antifungális válaszreakcióját. A stressztűrő képesség egy jelentős, virulenciában szerepet játszó tulajdonság. A patogén számára mind a savas, mind pedig a lúgos pH értékek sejtkárosító hatásúak lehetnek, továbbá befolyással lehetnek a tápanyagok felvételének hatékonyságára (Almeida és mtsi., 2009). *C. albicans* esetében a stresszt okozó kémhatás elleni toleranciában szerepet játszó kiemelt fontosságú géneket már azonosították. A *PHR1* és *PHR2* gének lúgos, illetve savas közegben expresszálódnak, és a fertőzés kialakításában is szerepet játszanak (Saporito-Irwin és mtsi., 1995; Muhlschlegel és Fonzi, 1997; De Bernardis és mtsi., 1998). A *C. albicans* képes környezete kémhatását aktívan szabályozni (Vylkova és mtsi., 2011). A fagocita sejtek antifungális válasza során termelt reaktív oxigén gyökök sejtkárosító hatással vannak a patogénre. Az oxidatív stressz kivédésére, illetve hatástalanítására a *C. albicans* szuperoxid diszmutázokat és katalázokat képes szekretálni (Wysong és mtsi., 1998), de *C. parapsilosis* esetén egyes sejtfal fehérjéknek is szerepe van a védekezésben (Serrano-Fujarte és mtsi., 2016). Számos patogén esetében, ahogy *C. parapsilosis* esetében is, ismert, hogy képesek endocitózis után túlélni a fagocita sejtekben sarjadzás vagy morfológiaváltáson keresztüli felületnövekedésük révén (Tóth és mtsi., 2014). Továbbá képesek exocitózist indukálni makrofágokban vagy megakadályozni a gazdasejtek teljes mitózisát vagy akár azok apoptózisát indukálni hasonlóan a *C. albicans* gombához (Tóth és mtsi., 2014).

A gazda-patógén kölcsönhatás vizsgálatára *in vitro* és *in vivo* rendszerek is rendelkezésre állnak. *In vitro* megközelítés során célszerű a vizsgálni kívánt interakcióban részt vevő vagy annak funkciójához legközelebb álló sejtvonalat vagy sejttípust alkalmazni. *Candida* fajok vizsgálatakor felhasználható sejttípusok például az epitel sejtek, mivel ezek alkotják az első védőgátat a fertőzésekkel szemben, továbbá a különböző immunsejtek, amelyek szerepe kulcsfontosságú a patógen eliminálásában. Népszerű *in vivo* állatmodellek a kis emlős rágcsáló, például egér vagy patkány rendszerek, de a rovar vagy rovarlárva modelleket is gyakran alkalmazzák különösen nagy vizsgálandó mintaszám esetén. A továbbiakban a kísérleteink során alkalmazott modellrendszereket mutatjuk be.

3.5.1. J774.2 egér monocita sejtvonal

A monocita sejtek a veleszületett immunrendszer részét képező fehérvérsejt populációba tartoznak, szövetekbe való migrációjuk során makrofágokká vagy dendritikus sejtekké differenciálódhatnak. Szerepük a kórokozók bekebelezése, majd azok antigénjeinek prezentálása a T-sejtek felé, illetve citokinek termelése és az adaptív immunrendszer további aktivációja.

A J774.2 sejtvonalat a csontszövetet érintő rákos megbetegedésből (retikulumsejtes szarkóma) izolálták egérből, a sejteket makrofág tulajdonságokkal jellemezték (adhézió, morfológia, receptor repertoár, lízis) (Ralph és Nakin, 1975). A makrofág sejtvonalak jól bevált modellrendszerek mind a sejtszociológia, mind pedig az immunológia tudományterületeken, köszönhetően sokoldalú funkciójuknak, könnyű fenntarthatóságuknak és könnyű genetikai manipulálhatóságuknak (Lam és mtsi., 2009).

3.5.2. *Galleria mellonella* lárva modell

Az utóbbi időben egyre növekszik az igény a kísérleti céllal felhasznált emlősszervezetek számának csökkentésére és azok helyettesítésére alternatív modell állatokkal, például rovar szervezetekkel. Összehasonlításképpen a rovar rendszerek számos előnnyel bírnak az emlős modell állatokkal szemben: 1) erkölcsi szempontok; 2) könnyebb beszerzés és fenntartás; 3) költséghatékonyság; 4) magasabb kísérleti elemszám (Champion és mtsi., 2016). A *Galleria*

mellonella (nagy viaszmol) lárvája egy népszerű rovar modell. A faj az emlősökhöz hasonló humorális és sejtes veleszületett immunválasz mechanizmusokkal rendelkezik, ezért széleskörben alkalmazható a kísérleti célból felhasznált kis emlősök helyettesítésére. Mindemellett úgy tűnik, hogy a lárvák az emlősök adaptív immunrendszerének egyes válasz folyamataihoz hasonló védelmi reakciókra is képesek (Fallon és mtsi., 2011).

Röviddel a fertőzés után a lárvák besötétednek a melanizáció folyamatának következtében. A melanizáció a sejtes immunválasz része, mely egy általános és gyors reakció a rovarok körében, válaszul bármilyen idegen veszélyes anyagra, legyen az patogén organizmus vagy egyéb rizikófaktor. A hemocita sejtek körülzárják az idegen részecskét (noduláció), amely egy hatékony válasz lehet a patogének eliminációjára. A hemociták profenoloxidáz enzim termelésére képesek, amelyek az aktivációjuk után fenoloxidázzá alakulnak, amely ezután képes oxidálni a fenolvegyületeket kinon és melanin vegyületekké, ezzel pedig a hemocita sejtek sötét színét eredményezik (Pereira és mtsi., 2018).

3.5.3. Egér modell

A magasabbrendű állatmodellek kísérleti célú alkalmazása elkerülhetetlen új gyógyszerek és terápiák fejlesztésének, illetve betegségek lefolyásának kutatása céljából. A különböző modellorganizmusok vizsgálata során nyert információk nélkülözhetetlenek a tudásbázisunk gyarapításához a tudomány számos területén. Az alkalmazott modellszervezetek (pl. egér) főbb jellemzői és előnyei a kis méret és a rövid generációs idő (Hedges, 2002). Humán asszociált folyamatok kutatásának modellezése esetén nem elhanyagolható tényező a modell élőlény filogenetikai távolsága az emberi fajtól. A növekvő számú genomanalízisből származó adatok alapján úgy tűnik, hogy az egerek és patkányok genetikailag relevánsabb modellrendszerek lehetnek, mint korábban gondoltuk (Hedges, 2002). A Balb/c egértörzs különlegessége, hogy benne spontán kialakulhat a vesék rákos megbetegedése, ezért gyakran alkalmazott modellrendszer kemo-, immun- és radioterápiás kezelések hatékonyságának és szövődményeinek tesztelésére (Nishisaka és mtsi., 2001). Kereskedelmi forgalomban számos transzgenikus egértörzs beszerezhető specifikus és testreszabott vizsgálatok kivitelezéséhez.

3.6. Génmódosító módszerek alkalmazása, mutáns könyvtárak elemzése

Patogén fajok vizsgálatokor gyakran alkalmazzák a különböző stressz vagy gazda-patogén interakció hatására bekövetkező transzkriptom változás tanulmányozását (Wang és mtsi., 2009; Hrdlickova és mtsi., 2017; Wang és mtsi., 2016). A potenciálisan érdekes gének funkciójának vizsgálatához hagyományos módszer a reverz genetikai megközelítés, azaz a vizsgálni kívánt gének delécioja a genomból, majd a mutáns törzsek fenotípusának megfigyelése. Napjainkban már számos organizmus esetében elérhetőek a KO mutáns törzsekből álló gyűjtemények és az elemzésük során kapott eredmények, köztük *C. parapsilosis* fajban is (Homann és mtsi., 2009; Noble és mtsi., 2010; Holland és mtsi., 2014; Tóth és mtsi., 2018; Breslow és mtsi., 2008; de Groot és mtsi., 2001). A reverz genetikai módszer segítségével számos virulenciában szerepet játszó tulajdonságot azonosítottak *C. albicans* és *C. parapsilosis* fajokban egyaránt, mint például a biofilmképzés, fenotípus és morfológiaváltás vagy antifungális rezisztenciában szerepet játszó gének, illetve transzkripciós regulátorok kapcsolati hálózatai (Homann és mtsi., 2009; Noble és mtsi., 2010; Holland és mtsi., 2014; Tóth és mtsi., 2018). Az egyes gének eltávolításának módszerét még antifungális szerek *in silico* fejlesztésében is felhasználták a *C. albicans* gombában (Verma és mtsi., 2020).

Különféle génmutációk, amelyek adott gén(ek) csökkent vagy megnövekedett kifejeződését eredményezték, felhívták a figyelmet a génkifejeződés sztoichiometriájának fontosságára és szerepére különféle biológiai folyamatokban (Prelich, 2012). Tehát nemcsak a gének hiánya vagy csökkent expressziója, de túlzott kifejeződése is előidézhethet zavart és fenotípus változást az adott élőlényben. Az első OE kísérletek olyan élesztő gének azonosítására fókuszáltak, amelyek túltermelése negatívan befolyásolta bizonyos gyógyszer hatóanyagok növekedést gátló hatását (Rine és mtsi., 1983). Az eredmények rávilágítottak a génkifejeződést túlhajtó rendszer széles körű alkalmazhatóságára a komplementációs kísérleteken túl. A génkiütés módszerével ellentétes megközelítés, amikor az adott gént egy expressziós rendszer segítségével folyamatos vagy szabályozható módon kifejeztetnek a vizsgált organizmusban. Ez az úgynevezett fehérje túltermelő vagy overexpressziós módszer számos előnnyel bír a KO technikával szemben, és képes lehet kiküszöbölni annak hátrányos elemeit. Klasszikus megközelítés szerint az OE módszer segítségével vad típusú (vt) fehérjék

túltermelése vizsgálható vt organizmusban. Ezenfelül módosított fehérjék mutáns háttéren és ezek kombinációi szintén elemezhetők a módszer segítségével (Brunel és mtsi., 2004; Prelich, 2012). Egy még pontosabb és relevánsabb fenotípus feltárása érdekében egyes szerzők javasolják a vizsgált fehérje aktivációért vagy DNS kötésért felelős doménjének túltermelését a teljes fehérje szekvencia helyett, hogy kizárják a fehérje gátlására szolgáló régiók hatásait (Schubert és mtsi., 2011; Schillig és Morschhäuser, 2013). Indukálható (ki-be kapcsolható) promóter alkalmazása esetén az adott gén kifejeződése szabályozható, így akár a szintetizálódó fehérje káros hatásai is kivédhetők vagy esszenciális gének szerepe vizsgálható (Park és Morschhäuser, 2005). Specifikus interakciók és hálózatok, valamint episztatikus viszonyok is felderíthetők egyes fehérjék túltermeltetésével. Az OE technikát különböző organizmusok esetében alkalmazták már átfogó mutáns könyvtáranalízis és gének funkciójának vizsgálatához is (Rorth és mtsi., 1998; Palatnik és mtsi., 2003; Chua és mtsi., 2006; Sopko és mtsi., 2006; Liu és mtsi., 2007; Schubert és mtsi., 2011; Znaidi és mtsi., 2018). A módszer segítségével számos patogénitással összefüggő biológiai folyamatokért - biofilmképzés, invazív hifás növekedés, illetve gombaellenes szer érzékenység - felelős géneket azonosítottak már *C. albicans* vagy *S. cerevisiae* rokon fajokban és egyéb *Candida* fajokban egyaránt (Cabral és mtsi., 2014; Schillig és Morschhäuser, 2013; Schwarzmüller és mtsi., 2014; Sopko és mtsi., 2006; Znaidi és mtsi., 2018; Fu és mtsi., 2008; Chauvel és mtsi., 2012; Magtanong és mtsi., 2011; Zhu és mtsi., 2001).

A KO megközelítés hátránya, hogy a módszer alkalmazása nem feltétlenül ad informatív eredményt, és esszenciális gének esetében sem feltétlenül eredményez életképes egyedeket. Azonban, míg a KO mutánsok létrehozásához mindkét allél delécióját el kell végezni diploid szervezetekben, addig az OE konstrukciót elég egy kópiában bejuttatni. Az OE módszer kiegészítője lehet a KO könyvtáranalíziseknek, korábban azonosított funkciók megerősítésében vagy akár fő szerepe lehet új funkciók génekhez rendelésében is (Prelich, 2012; Sopko és mtsi., 2006; Znaidi és mtsi., 2018; Schillig és Morschhäuser, 2013; Rine, 1991; Zordan és mtsi., 2006).

3.6.1. A *C. albicans* genetikai módosításának lehetőségei

Az első törekvések a *C. albicans* faj transzformációjára már az 1986-os évben megkezdődtek (Kurtz és mtsi., 1987). A homológ rekombináción alapuló integrációs eljárást követte a génkiütés módszerének kifejlesztése az említett fajban (Kelly és mtsi., 1987). Eukarióta organizmusok esetében homozigóta deléciós törzsek létrehozásához az adott gén mindkét allélról való eltávolítása szükséges, különböző szelekciós elemek vagy az adott marker újra felhasználásával. Megszülettek tehát az első laboratóriumi törzsek számos aminosavra nézve auxotróf fenotípussal, lehetővé téve egyszerre több szelekciós marker alkalmazását, így pedig több allélon akár több gén kiütését ugyanazon mutánsban (Wilson és mtsi., 1999). A korai megközelítések segítségével vad típusú izolátumok genomi módosítása még nem volt lehetséges a megfelelő szelekció hiánya miatt. Később az auxotróf fenotípus komplementációján alapuló szelekciót felváltották a domináns szelekciót biztosító módszerek, mint például a nourseothricin rezisztenciáért felelős gén (*NAT1* - nourseothricin acetil transferáz 1), integrációja (Roemer és mtsi., 2003) kombinálva az ún. flipáz (*FLP*) rekombináz hajtotta integrációs technológiával (Reuss és mtsi., 2004). Ezen módszer előnye, hogy egyetlen szelekciós markergénnel több gén egymást követő deléciója megvalósítható, amit az tesz lehetővé, hogy szelekciót követően a deléciós transzformáns törzsekből a szelekciós markergént ki lehet ütni.

Napjainkban egy gyakran használt, sokoldalú, génmódosításra alkalmas módszer a CRISPR/Cas9 (Clustered Regularly Interspersed Short Palindromic Repeat) technika (Raschmanová és mtsi., 2018; Stovicek és mtsi., 2017). A rendszer alkalmazásával bármilyen genommodosítás megvalósítható (géndelécio, integráció, irányított mutáció, promotercsere stb.). A módszer fő erénye, hogy diploid élőlények esetében a kettős DNS szál hasítása egyszerre mindkét allélon megtörténik egyetlen transzformáció során, köszönhetően a Cas9 enzim aktivitásának. *C. albicans* fajban először Vyas és munkatársai adaptálták a technikát a Cas9 enzimet kódoló szekvencia kodon módosítása révén (Vyas és mtsi., 2015). Ez a konstrukció integrálódik a genomba és nem is kerül kihasításra. Manapság ez a technológia már számos variációban elérhető a *C. albicans* gombafaj genomi módosítására, csupán a kívánt változtatásokat maga után hagyva a genomban (Min és mtsi., 2016; Huang és Mitchell, 2017; Nguyen és mtsi., 2017).

A géndeléciós módosítások mellett a génkifejeződés túlműködtetésére való törekvések már az első élesztő transzformációs technikák kifejlesztésével megkezdődtek. A korai OE-t lehetővé tevő konstrukciók a sejtben nagy kópiaszámban jelenlevő, nem integrálódó, autoreplikatív plazmidon alapultak (Kurtz és mtsi., 1987; Rose és Broach, 1990). A *C. albicans* fajban is megkezdődtek az ilyen irányú vizsgálatok, 2008-ban elkészült egy 26, majd 2010-ben egy 103 gént magába foglaló OE mutáns könyvtár, melyek elemzéséből az adhézióban, biofilmképzésben, filamentáris növekedésben, illetve virulenciában szerepet játszó gének kerültek azonosításra (Fu és mtsi., 2008; Sahni és mtsi., 2010; Du és mtsi., 2012). Komolyabb áttörést hozott az OE megközelítés frontján az első nagyszámú ORF-et (open reading frame, nyitott leolvasási keret) tartalmazó OE kollekció megalkotása, mely a Gateway klónozási technológián alapult. Az OE konstrukció integrációját a neutrális *RPS1* (Ribosomal protein of the small (40S) subunit 1 - riboszómális fehérje alegység) genomi régióba integrálták és kétféle indukálható promótert (TET (tetraciklin) promóter, PCK1 (foszfoenolpiruvát karboxikináz 1) promóter) alkalmaztak (Chauvel és mtsi., 2012).

3.6.2. A *C. parapsilosis* genetikai módosításának lehetőségei

Az első lépések a klónozáshoz szükséges elemek (promóterek, terminációs régiók, szelekciós markergének) adaptálására *C. parapsilosis* transzformációjához 2002-ben kezdődtek, hogy lehetővé tegyék a faj genetikai módosítását (Nosek és mtsi., 2002; Gácsér és mtsi., 2005; Gácsér és mtsi., 2007; Ding és Butler, 2007; Kosa és mtsi., 2007). A Nosek és munkatársai (2002) által létrehozott konstrukció használata egy auxotróf mutáns törzset igényelt, nem volt alkalmas prototróf vad típusú törzsek transzformációjára. 2005-ben, majd ezután pedig 2007-ben vált elérhetővé Gácsér és munkatársai munkájának köszönhetően egy mikofenolsav rezisztenciát, illetve egy nourseothricin rezisztenciát biztosító szelekciós marker gént (CaIMH3 és CaSAT1) hordozó rendszer, mely az *FLP* flipázt felhasználva ismételt génkiütést tett lehetővé egy mutáns törzsön belül, amely elérhetővé tette homozigóta mutánsok létrehozását csupán egyetlen szelekciós markergén ismételt alkalmazásával (Gácsér és mtsi., 2005; Gácsér és mtsi., 2007).

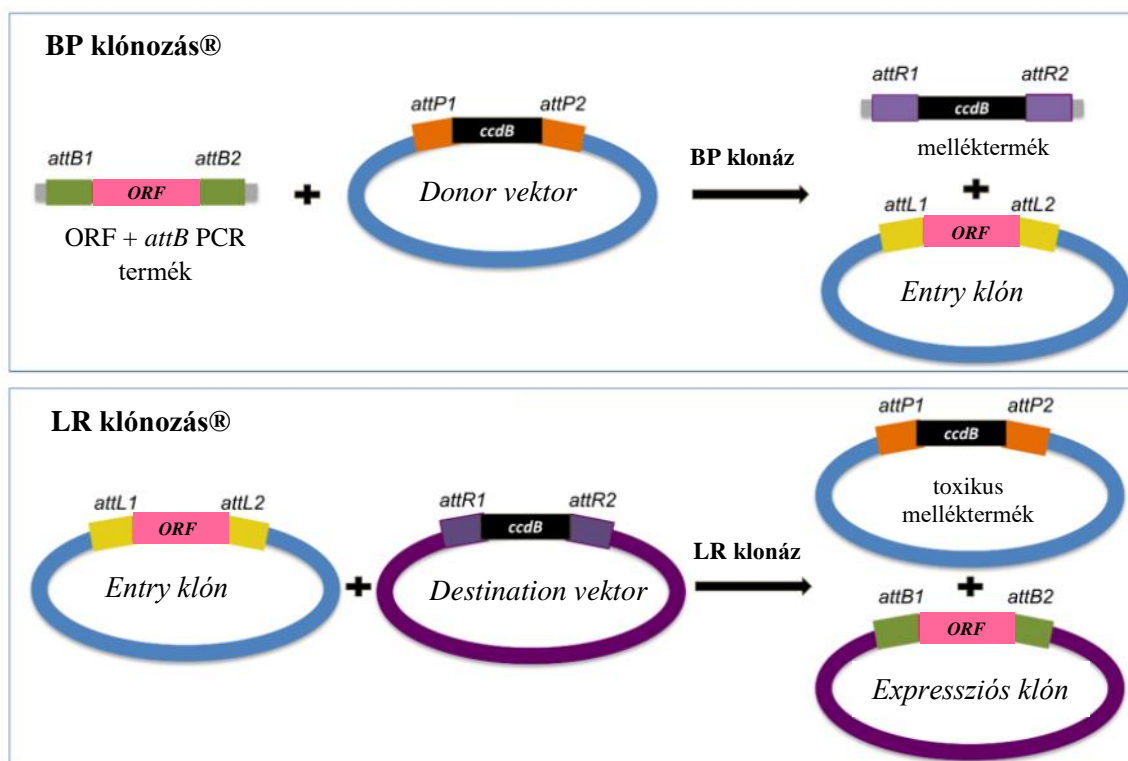
A genommodosító módszerek *C. parapsilosis*-ra történő adaptálásával párhuzamosan megtörtént a *C. parapsilosis* genom szekvenálása és annotálása. Az első teljes genom a *C.*

parapsilosis CDC317-es számú törzsből származik, amely 2009-ben vált elérhetővé. Néhány évvel később további három humán, illetve egy környezeti izolátumból származó törzs genom szekvenciája került meghatározásra és összehasonlításra, lehetővé téve ezzel a későbbi genom- és génszintű fajspecifikus beavatkozásokat és módosításokat (Butler és mtsi., 2009; Pryszcz és mtsi., 2013; Skrzypek és mtsi., 2017).

2017-ben a *C. parapsilosis*-ra adaptálva a CRISPR/Cas9 rendszer is elérhetővé vált. A módszer autoreplikatív plazmidot alkalmaz, mely segítségével vad típusú izolátumok genomja is módosítható (Lombardi és mtsi., 2017). Az autoreplikatív plazmid a szelekciós nyomás megszüntetésével távolítható el.

3.6.2.1. Gateway® klónozási módszer adaptációja *C. parapsilosis* gombafajban

A Gateway® klónozási módszer *C. parapsilosis* modellszervezetben való sikeres adaptációját Németh és munkatársai valósították meg (Németh és mtsi., 2020). A módszer segítségével hagyományos restrikciós endonukleázok és ligáz alkalmazását igénylő klónozás helyett klonáz alkalmazásával, két lépésben hozható létre a gomba transzformációs vektor (1. ábra). Az első klónozási lépésben (BP klónozás®) a célgén szekvenciáját integráljuk az ún. Entry vektorba®, míg a második klónozás (LR klónozás®) során a célszekvenciát az expressziós plazmidba (ún. Destination vektor®) építjük. A klónozást helyspecifikus klonáz/rekombináz végzi, ami úgy irányítható, hogy az amplifikációhoz használt primerekbe beépítjük a helyspecifikus klonázok/rekombinázok felismerő motívumait (B, P, L és R attachment site-ok®) amelyek az Entry és Destination vektorokban® is jelen vannak, lehetővé téve a transzformált DNS helyspecifikus integrációját a vektorba. Az Entry vektorba® épített gén szekvenciáját szekvenálással mindig ellenőrizni kell, ezzel biztosítva azt, hogy akaratlanul létrehozott mutációk ne kerüljenek a rendszerbe. A célgén amplifikálásához használt reverz primer 5' végére, a stop kodontól downstream, jelölő szekvencia (BAR kód) tervezhető, ami nem módosítja a fehérje szekvenciáját, de lehetővé teszi a módosított törzsek kevert mintákban való azonosítását.



1. ábra. Az első klónozási lépésben (BP klónozás®) a vektorba beépül a cél szekvencia *attL* flanking szekvenciákat hordozva. Ezt a konstrukciót nevezzük Entry klónnak®. A második klónozási lépésben (LR klónozás®) az Entry klónból® átrekombinálódik a célszekvencia a destination vektorba létrehozva ezzel az expressziós klónt, amelyet gomba-transzformációra lehet felhasználni. Az integrálódott célszekvencia *attB* flanking szekvenciát hordoz (Soriano, 2017; *attB*-P-R-L: attachment B-P-L-R site, felismerő régiók; *ccdB*: citotoxikus fehérje gén).

A Németh és munkatársai által fejlesztett destination vektor a *C. albicans* konstitutív TDH3 (Trió-z-foszfát dehidrogenáz) promóterét hordozza (Németh és mtsi., 2020). Az expressziós klónt linearizálást követően transzformálják *C. parapsilosis* recipiens törzsbe, ahol a linearizált molekula irányítottan a CpNEUT5L (N5L, neutrális intergenikus régió) intergenomikus régiójába rekombinálódik be. Korábban az *RPS1* régióba építettek be konstrukciókat, mert az *RPS1* régió diszruptálását neutrális hatásúnak gondolták. Idővel bebizonyosodott, hogy a régió elrontása mégis befolyással van a gomba növekedési képességére. A felismerést követően új neutrális régió azonosítása vált szükségessé. Igazolták, hogy az N5L lókuszt diszruptálása nincs hatással a módosított törzs fitnessére és a

lókuszba integrált expressziós kazetták stabilan kifejeződnek (Gerami-Nejad és mtsi., 2013; Németh és mtsi., 2020). Létezik olyan expressziós vektor, mely szelekciós markergénként a *C. maltosa* *LEU2* génjét hordozza (*CmLEU2*). Ez esetben a transzformáláshoz használt recipiens *C. parapsilosis* törzsnek *LEU2* gén funkcióvesztésén alapuló leucin auxotrófiával kell rendelkeznie. Ilyen törzs a homozigóta *LEU2* deléciót hordozó CPL2 törzs (Holland és mtsi., 2014). Létezik azonban olyan expressziós vektor is, mely szelekciós markergénként a nourseothricin rezisztenciáért felelős gént (nourseothricin acetyl transferáz 1, *NAT1*) hordozza (Németh és mtsi., 2020). Ezen expressziós vektor előnye, hogy vad típusú klinikai izolátumok közvetlen genomi módosítására nyújt lehetőséget (Németh és mtsi., 2020). A módszer hátránya lehet, hogy megtörténhet a beépített konstrukció spontán kirekombinálódása a genomból, melynek eredményeként a vad típusú állapot visszaáll. További hátránként lehet megemlíteni a klónozás időigényességét és a beépíteni kívánt vektorok nagy mérete miatt tapasztalt transzformációs hatékonyság csökkenést.

3.6.3. KO és OE könyvtáranalízis eredmények összehasonlítása

A gének szerepének felderítésére a klasszikus deléciós módszer a leggyakrabban alkalmazott megközelítés, azonban a már korábban említett speciális esetekben (pl. esszenciális a gén) nem alkalmazható vagy nem feltétlenül okoz detektálható változást. Kiegészítő vagy bizonyos esetekben a célhoz vezető módszerként az OE vizsgálat hasznos módszer lehet. A KO és az OE könyvtárak analíziséből származó adatok integrálása plusz információkkal szolgálhat az adott gének szerepéről ahhoz képest, amit a csak KO vagy csak OE könyvtárakból származó adatok nyújtanak.

Egy vagy több gén genetikai manipulációjával megfigyelhető fenotípus nem minden esetben magyarázható egyértelműen a jelenség hátterében vélt vagy valós molekuláris mechanizmus megváltozásával.

Számos oka lehet annak, hogy a jegyzett fenotípus egy KO vagy egy OE mutáns esetében nem felel meg a feltételezéseknek, például a géndózishatás, génközösinterakciók, illetve redundáns gének, transzkriptom átirat változások/poszttranszkripciós módosítások, az alkalmazott konstrukció hibás működése vagy nem kívánatos mutációk létrejötte (Yoshikawa és mtsi., 2011). Technikai problémákból is adódhatnak félreértelmezett

eredmények, például a genetikai háttér eltérése (különböző genetikai háttéren létrehozott mutánskönyvtárak eredményei eltérőek lehetnek) vagy nem megfelelő kontroll törzsek alkalmazása. Az ún. géndózishatás nemcsak az élőlény genomjában megtalálható gének kópiaszámának függvénye, hanem elsősorban azok átíródásának szabályozásán múlik. Az alap elgondolás szerint egy adott gén kifejeződésének (mesterséges) serkentése esetén megnövekedett géntermék mennyiség érhető el, amely további gének expressziójára lehet hatással. A géntermékek sztöchiometriai egyensúlyának eltolódása akár pozitív, akár negatív irányba azonban egyaránt okozhat érzékelhető eltérést a sejt működésében (Rine, 1991). Génkölsönhatás vizsgálatra kiváló példával szolgálnak az adott génben már mutációt hordozó és mutáns fenotípust mutató törzsek analízise szuppresszor (”elnyomó”) vagy enhanszer (”serkentő/erősítő”) géninterakciók felderítésével. Hayles és munkatársai a *Schizosaccharomyces pombe* sejtciklus szabályozásában főszerepet játszó CDC2 (catalytic subunit of DNA polymerase delta 2) génjével kölcsönható géneket vizsgálták, mely során olyan géneket szelektáltak, melyek túltermelése elnyomta vagy megszüntette a már meglévő hőmérséklet érzékeny CDC2 mutáns fenotípust. Sikeresen azonosították a Suc1 (sucrose utilization 1) protein kinázt, ami közvetlenül szabályozza a Cdc2 kináz működését (Hayles és mtsi., 1986a). Az eredményeket további kísérletekkel is alátámasztották vad típusú organizmusban, a *SUC1* gén kiütésével, illetve túltermelésével hiba keletkezett a sejtciklus szabályozásában és lefolyásában (Hayles és mtsi., 1986b). Az enhanszer típusú gének jellemzője, hogy megváltozott működésük során nagyobb pozitív, illetve negatív hatást képesek elérni a pusztán a két gén megváltozott/mutáns hatásának összeadódásával (additív hatás) elérhető kapacitásnál. Erre példa, amikor az enhanszer gén túltermelése letális egy másik génmutációt is hordozó egyedben, míg a vad típusú élőlényben nem (Kroll és mtsi., 1996; Measday és Hieter, 2002).

Annak érdekében, hogy értékeljük és összehasonlítsuk a különböző megközelítéssel létrehozott OE és KO könyvtáranalízisből származó adatokat, a következő szempontokat szükséges figyelembe venni. Prelich ajánlása szerint az azonos génre nézve OE, illetve KO mutánsok fenotípusának összehasonlítása során a következő variációkat figyelhetjük meg: 1) ellentétes fenotípus (-/+; +/-); 2) azonos fenotípus (-/-; +/+; 0/0); 3) normál/változatlan, illetve eltérő fenotípus (-/0 vagy 0/-; +/0 vagy 0/+) (Prelich, 2012). A mutáns fenotípusok pedig a következők lehetnek: hipermorf, hipomorf, neomorf vagy antimorf (Muller, 1932).

Hipermorf tulajdonság, ha egy gén terméke funkciónyeréses vagy hiperaktív fenotípusban nyilvánul meg a vad típusú kifejeződéséhez képest. Ennek szöges ellentéte a hipomorf vagy funkcióvesztéses fenotípus megjelenése, a gén aktivációjának csökkenése a normál állapothoz képest. Antimorf tulajdonság, amikor egy mutáns allél antagonistaként jelenik meg egy vad típusú géntermék mellett/szemben, csökkentve annak funkcióképességét és aktivitását. Neomorfnak tulajdonítható egy fenotípus, ha az adott géntermék funkciója megváltozik és egy új abnormális tulajdonsággal bővül a mutáció hatására, például az enzim célpontja más szubsztrát molekula lesz vagy egy akceptor molekula kötőhelyének specificitása változik meg.

Az összehasonlítások során ellentétes fenotípusokat várnánk a KO és OE konstrukciók esetén (ugyanazon génre nézve), sőt mi több, gyakran a funkcióvesztéses fenotípust a KO, míg a funkciónyeréses tulajdonságokat az OE mutánsoknak tulajdonítják. Ezek a megkülönböztetések azonban az átfogó génfunkció meghatározások esetében a már korábban említett tényezők és a valós kísérleti adatok tükrében sem ennyire egyértelműek (Swanson és mtsi., 1991; Hadwiger és mtsi., 1989; Sopko és mtsi., 2006; Yoshikawa és mtsi., 2011; Prelich, 2012).

A szakirodalomban mind a három fentebb említett fenotípus kategóriára találunk példát. *C. albicans* fajban a *WOR1* (White-opaque regulator) gén kiütése gátolja a matt fehér – fényes opálos morfológiaváltást, míg a gén túltermelése indukálja a folyamatot (Zordan és mtsi., 2006). Csökkent életképesség vagy változatlan fenotípus kategóriák megfigyelése túltermeltetett gének esetében nem számít egyedi esetnek (Prelich, 2012). Yoshikawa és munkatársai *S. cerevisiae* élesztőben figyeltek meg 1302 mutáns törzset csökkent növekedési képességgel, 4488 törzset változatlan fenotípussal, és mindössze 2 törzs mutatott funkciónyeréses tulajdonságot a vizsgált 5792 OE mutánsból, amikor a sejtek növekedési képességét vizsgálták (Yoshikawa és mtsi., 2011). Összehasonlításképpen ugyanezen gének deléciós mutáns párjainak vizsgálata során 646 mutáns mutatott csökkent növekedést, 4073 mutáns esetében nem volt változás, míg 8 esetben találtak növekedést a fitneszben a vizsgált 4727 KO törzsben. Egyes *C. albicans* tanulmányok során a kutatók funkciónyeréses fenotípusú OE mutánsokat nem, csupán redukált tulajdonságokkal rendelkező törzseket tudtak azonosítani a vad típusú kontroll egyedhez képest (Cabral és mtsi., 2014; Znaidi és mtsi., 2018). A szakirodalmi adatokat alapul véve további megfontolandó szempont lehet a

sejtek energiaigényének figyelembevétele egy adott gén duplikálódása vagy mesterséges túltermelése esetén a kísérleti eredmények értékelésekor. Nem meglepő, hogy amikor a sejtben megemelkedik mind az mRNS átiratok száma, mind pedig a fehérjeszintézis szintje, az zavart/hiányt okozhat a sejt normális homeosztázisában/energia ellátásában és negatív hatással lehet annak növekedési képességére/fitneszére függetlenül az adott gén konkrét funkciójától. Wagner kutatásai szerint egy 10%-os emelkedés a fehérjeszintézis mennyiségében már extra energiaköltséget/terhet jelent a sejt számára (Wagner, 2007). Egy lehetséges virulenciafaktor kifejeződése nem feltétlen jár biokémiai aktivitással (vagy annak változásával) és/vagy könnyen vizsgálható/felismerhető fenotípus változással a patogén életciklusa során, vagy csupán a fertőzés egy bizonyos fázisában érvényesül, így megnehezítve az adott gén funkcióvizsgálatát (Navarro-García és mtsi., 2001).

4. Célkitűzések

Annak ellenére, hogy a *C. parapsilosis* opportunista humánpatogén gomba által okozott fertőzések száma évről-évre növekvő tendenciát mutat, a *C. parapsilosis* fertőzése során szerepet játszó génekről kevés ismeret áll rendelkezésünkre szemben a *C. albicans*-szal. Számos tanulmány bizonyítja, hogy a két faj mind genomi, mind pedig fenotípus szinten jelentős különbségeket mutat, de egyes eredmények már arra is rávilágítottak, hogy a *C. parapsilosis* a *C. albicans*-tól eltérő stratégiát alkalmaz a fertőzés során.

Az általánosan alkalmazott gendelécíós módszerrel szemben az úgynevezett gén overexpressziós technika számos előnnyel és további lehetőséggel bír az egyes gének szerepének feltárása során. A laboratóriumunkban kifejlesztett *C. parapsilosis*-ra alkalmazható OE rendszer alkalmazásával (Németh és mtsi., 2020) a *C. parapsilosis* virulenciájában szerepet játszó, eddig még nem azonosított gének azonosítását és funkcionális vizsgálatát tűztük ki célul az alábbi tervek alapján:

- Egy válogatott géneket túltermelő mutáns kollekció létrehozása *C. parapsilosis* modellrendszerben.
- A túltermelő törzsek validálása és karakterizálása fókuszálva a virulenciában szerepet játszó tulajdonságaikra.
- Saját eredmények összevetése korábbi OE vagy KO mutáns könyvtáranalízis során nyert adatokkal *C. parapsilosis* és rokon fajok esetében, valamint az OE módszer létjogosultságának bizonyítása gén funkció azonosításra irányuló kísérletekben.

5. Anyagok és módszerek

5.1. Alkalmazott törzsek

A munkánk során használt baktérium és gombatörzseket az 1. sz. melléklet tartalmazza.

5.2. Tenyésztéshez használt tápközegek

Tápközegek az *Escherichia coli* sejtek tenyésztéséhez és szelekciójához

LB tápoldat (Luria-Bertani táptalaj): 0,5% (m/V) élesztőkivonat, 1% (m/V) tripton és 1% (m/V) nátrium-klorid, szilárd tápközeg esetén 2% (m/V) agarral kiegészítve. *E. coli* 2T1 törzsek esetén a szelekciót 10 µg/mL tetraciklin biztosította. Transzformálás után a transzformánsok szelekciójához 100 µg/mL ampicillinnel (LB+AMP) (Sigma) vagy 50 µg/mL kanamicin A-val (Sigma) kiegészített LB tápközeget (LB+KAN) alkalmaztunk.

Tápközegek a gombatörzsek tenyésztéséhez és szelekciójához

YPD tápközeg (élesztőkivonat–pepton–D-glükóz): 0,5% (m/V) élesztőkivonat, 1% (m/V) pepton és 1% (m/V) D-glükóz, 100 U/mL penicillin-sztreptomycin (PS) (ThermoFisher) oldat. A tápoldatot szilárd táptalaj esetén 2% (m/V) agarral egészítettük ki.

YNB (minimál élesztő nitrogénforrás) tápközeg aminosavakkal kiegészítve: 0,19% (m/V) YNB (Yeast nitrogen base - élesztő nitrogén alap, aminosavak nélkül) kiegészítve 2% (m/V) D-glükózzal, 2% (m/V) agarral, 100 U/mL PS oldattal és 10% (V/V) 10x Dropout (DO) aminosav oldattal (leucin nélkül) (Holland és mtsi., 2014).

Tápoldat a J774.2 egér monocita sejtvonal fenntartásához

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) tápoldat: 10% (V/V) (58 °C-on, 30 percig) hőinaktivált magzati borjú szérum (HI FBS) 100 U/mL PS oldattal kiegészítve.

Törzsek fenntartása és tárolása

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

Az *E. coli* 2T1 sejteket LB táptalajon, 4 °C-on tartottuk fenn.

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

A vad típusú, a reintegrált, a leucin auxotróf és az mCherry^{OE} élesztőtörzseket 4 °C-on, YPD táptalajon tartottuk fenn. A *Candida* törzsek tárolása 20% (V/V) glicerint tartalmazó YPD tápoldatban történt -80 °C-on. A prototróf OE transzformánsok szelektálásához és tenyésztéséhez YNB minimál táptalajt alkalmaztunk a folyamatos szelekciós nyomás fenntartása érdekében. A törzseket havonta frissítettük.

J774.2 egér monocita sejt vonal fenntartása

Az egér J774.2 monocita sejt vonalat DMEM + 10% (V/V) HI FBS tápoldatban növesztettük, 37 °C-on, 5% (V/V) CO₂ tenzió mellett. A konfluens tenyészeteket 2 naponta mostuk és frissítettük. A sejt vonalat hosszútávon folyékony nitrogén tartalmazó tartályban tároltuk.

Fenotipizálás során alkalmazott tápközegek

Különböző pH értékű YPD táptalajok

A táptalajok pH értéke 0,2 M Na₂HPO₄ és 0,1 M citromsav törzsoldatok különböző arányú keverékével került beállításra McIlvaine szerint (1. táblázat).

1. táblázat. Eltérő kémhatású YPD táptalajokhoz szükséges oldatok 100 mL végtérfogatra vonatkoztatva.

	pH=4	pH=5	pH=6	pH=7	pH=8
0,2 M Na₂HPO₄	38,56 mL	51,48 mL	63,16 mL	82,36 mL	97,24 mL
0,1 M Citromsav	61,44 mL	48,52 mL	36,84 mL	17,64 mL	2,76 mL

Az alkalmazott stresszorokat és koncentrációikat a 2. táblázat tartalmazza.

2. táblázat. Alkalmazott stresszorok listája és mennyisége.

Ozmotikus stressz
3% (V/V) glicerin
1 M NaCl
1 M szorbitol
Oxidatív és fémion stressz
2 mM CuCl ₂
2 mM CuSO ₄
12,5 µM CdSO ₄
5 mM H ₂ O ₂
Sejtfalstresszor
10 mM koffein
10, 25, 50 µg/mL kalkofluor fehér (KF)
10, 25, 50, 75, 100 µg/mL kongó vörös (KV)
Sejtmembrán detergens
0,04% (m/V) SDS*
Fémion megvonás
0,25 mM EDTA**
0,15 mM BPS***
0,5 mM BPS + 2 µM Hemin

*SDS: nátrium-dodecil-szulfát

**EDTA: etilén-diamin-tetraecetsav

***BPS: batofenantrolin-diszulfonát

RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute) tápoldat: RPMI-1640 tápoldat L-glutaminnal, 2% (m/V) D-glükózzal és 0,165 M 3-3-(N-morfolino)-propánszulfonsavval (MOPS) kiegészítve.

YNB tápoldat és tápközeg aminosavak nélkül: 0,67% (m/V) YNB tápoldat, illetve 0,19% (m/V) YNB 10% (V/V) HI FBS-sel vagy anélkül, kiegészítve 0,5% (m/V) D-glükózzal, 100 U/mL PS oldattal és 2% (m/V) agarral szilárd tápközeg esetén.

5.3. Alkalmazott molekuláris technikák

5.3.1. Expressziós konstrukciók létrehozásához szükséges technikák

Totál DNS tisztítás gombasejtekből

A gombatörzseket 2 mL YPD tápoldatban növesztettük egy éjszakán át, 30 °C-on, 150 rpm rázatás mellett. A sejteket centrifugálással összegyűjtöttük (2500 g, 5 perc), majd a sejtpelletre 500 µL lízis puffert (1% (V/V) SDS, 50 mM EDTA, 100 mM TRIS (Tris-(hidroximetil)-aminometán)pH=8) mértünk. A mikrocentrifuga csövet 1 mL térfogatnyi üveggyönggyel (0,5 mm átmérő) töltöttük fel, majd vortexeltük 3 percen keresztül. A lizátumokra 270 µL 7 M-os ammónium-acetátot mértünk és 5 percig 65 °C-on inkubáltuk, majd ezt követően a sejteket jégre helyeztük 5 percre. Ezután 500 µL kloroform-izoamilalkoholt (24:1) adtunk az elegyhez, vortexeltünk és centrifugálás (6500 g, 10 perc) után a DNS tartalmú felső vizes fázist új mikrocentrifuga csőbe pipettáztuk. A vizes fázishoz 500 µL izopropanolt adtunk, alapos vortexelés után a mintákat minimum 20 percig -20 °C-on inkubáltuk. A kicsapódott DNS-t centrifugálással (6500 g, 10 perc) kiülepítettük, majd 500 µL 70%-os etanollal mostuk. Újabb centrifugálás (6500 g, 5 perc) után a mintákat beszárítottuk, majd 100 µL (250 µg/mL) RNáz tartalmú desztillált vízben feloldottuk. A DNS minőségét és mennyiségét 0,5 µg/mL etídium-bromiddal kiegészített 0,8%-os (m/V) agaróz gélen történő horizontális gélelektroforézissel ellenőriztük (futtató közeg: 1x TAE puffer pH=8; 50x TAE törzsoldat: 2 M TRIS, 1 M ecetsav, 50 mM EDTA; feszültség: 60-90 V). A géleket UV fénnnyel történő megvilágítás mellett kamerával dokumentáltuk.

A vizsgált gének amplifikálása

A kiválasztott gének amplifikálásához a 2. sz. mellékletben feltüntetett primereket használtuk. A primerpár 5' végei az alkalmazott klónozási eljáráshoz szükséges attB1 és attB2 szekvenciákat hordozzák, míg a reverz primer ezenkívül egy húsz nukleotid hosszúságú egyedi azonosító szekvenciát (BAR kód) is tartalmaz. A PCR-ek során Phusion Green Hot Start II DNS polimerázt (Thermo Scientific) és a *C. parapsilosis* CLIB214 törzsből tisztított genomi DNS templátot alkalmaztuk. Egy 50 µL végtérfogatú reakcióhoz a következő komponenseket használtuk fel: 1x Phusion GC puffer (1,5 mM MgCl₂-dal

kiegészítve), 1 U Phusion Green Hot Start II DNS polimeráz, 0,2-0,2 mM dNTP, 0,5-0,5 μ M forward és reverz primer, továbbá 20-50 ng genomi DNS templát. A PCR reakcióhoz használt program a következő lépéseket tartalmazta: 98 °C, 30 mp elődenaturáció; 35 cikluson keresztül 98 °C, 10 mp denaturáció, 60 °C, 30 mp hibridizáció és 72 °C-on polimerizációs lépések követték egymást. A polimerizáció hosszát az ampikon mérete és a polimeráz hatékonysága/sebessége (bp/perc) alapján számítottuk ki. A program 72 °C, 5 perc utópolimerizációval ért véget.

PCR termék tisztítása polietilén-glikollal (PEG)

A PCR terméket polietilén-glikol segítségével tisztítottuk az alábbiak szerint. Az 50 μ L végtérfogatú PCR terméket 1x TE (10 mM TRIS, 1 mM EDTA, pH=7,5) oldattal négyszeresre hígítottuk, majd 100 μ L 30% (m/V) PEG₈₀₀₀/30 mM MgCl₂ oldatot adtunk hozzá. A kapott elegyet 5 percig vortexeltük, ezt követően centrifugáltuk (6500 g, 15 perc), a felülúszót eltávolítottuk, majd a pelletet 10 μ L 1x TE pufferben oldottuk fel.

Klónozás Gateway™ (Invitrogen) rendszerrel

A túltermelő mutáns könyvtár létrehozásához az Invitrogen által forgalmazott Gateway® technológiát alkalmaztuk a gyártó utasításainak megfelelően. A BP klónozási® lépés során kanamicint, míg az LR klónozási® lépést követően ampicillint használtunk szelekciós ágensként. A felhasznált Entry és Destination vektorokat® a *ccdB* gén termékére rezisztens *E. coli* DB3.1 törzsben szaporítottuk fel. A BP klónozási® lépésben sztöchiometrikus arányban (50-50 fmol) volt jelen a tisztított ampikon és a pDONOR221 plazmid. A reakció 0,75 μ L BP klonáz® enzimkeveréket (Invitrogen) tartalmazott és 1x-es TE pufferben zajlott 25 °C-on, egy éjszakán keresztül. A reakciót 1 μ L proteináz K (>600 U/ μ L, Invitrogen) hozzáadásával állítottuk le (37 °C, 10 perc), majd az elegyet *E. coli* 2T1 sejtek transzformálására használtuk. A transzformánsokból plazmidot preparáltunk (pENTRY®), a klónozás sikerességéről a plazmidok restrikciós endonukleázzal kapott hasítási mintázata alapján győződünk meg. Az ily módon ellenőrzött Entry plazmidok® nukleotid sorrendjét NGS (újgenerációs szekvenálás) szekvenálással határoztuk meg és a továbbiakban azokkal a preparátumokkal dolgoztunk, amelyek szekvenciája nem tért el a referenciától, vagy ha eltért, akkor az aminosav változást nem okozott. Az LR klónozás során 25 fmol Destination

vektort® (pDCpOE-L-N5L) alkalmaztunk azonos anyagmennyiségű Entry vektor® jelenlétében. A reakció 1x-es TE pufferben 0,75 µL LR klonáz® enzimkeverék (Invitrogen) hozzáadásával zajlott. A reakcióelegyet 25 °C-on, 2 órán keresztül inkubáltuk, majd 1 µL proteináz K (>600 U/µL, Invitrogen) hozzáadásával (37 °C, 10 perc) inaktiváltuk a klonáz enzimkeveréket. Az eleggyel *E. coli* 2T1 sejteket transzformáltunk.

***E. coli* sejtek transzformálása**

A kompetens sejtek előállításához *E. coli* 2T1 sejteket 5 mL LB tápoldatban neveltünk egy éjszakán át, 37 °C-on, 150 rpm rázatás mellett. A sejteket másnap 50 mL LB tápoldatba átolttva OD₆₀₀=0,3-0,4 eléréséig növesztettük. A sejteket centrifugálással összegyűjtöttük (2000 g, 10 perc, 4 °C), majd 4 °C-os 1-es oldattal (80 mM MgCl₂, 20 mM CaCl₂) mostuk (2000 g, 10 perc, 4 °C). Ezt követően a pelletet 2 mL jéghideg, 100 mM CaCl₂ tartalmú oldatban vettük fel. A kompetens sejteket jégen tároltuk, majd 1-2 órán belül felhasználtuk. Az *E. coli* sejtek transzformálása során 100-100 µL kompetens *E. coli* 2T1 sejthez hozzámértük a bejuttatni kívánt plazmid DNS-t, majd a sejteket 25 percen át jégen inkubáltuk. Ezt követően a sejteket 2 percre 42 °C-os vízfürdőbe, majd 2 percre jégre helyeztük és 1 mL LB tápoldat hozzáadása után 37 °C-on, rázatás mellett regeneráltattuk azokat 1 órán keresztül. A szuszpenziót centrifugáltuk (2500 g, 5 perc), majd a kiülepedett sejteket 100 µL LB tápoldatban szuszpendáltuk fel, szelektív táptalajra (LB+AMP vagy LB+KAN) szélesztettük, és 37 °C-on, egy éjszakán át inkubáltuk.

Bakteriális plazmid DNS izolálása

A transzformáns *E. coli* sejteket 2 mL, a megfelelő antibiotikummal kiegészített, LB tápoldatba oltottuk, majd egy éjszakán át, 37 °C-on, 150 rpm-mel rázatva növesztettük. Másnap a sejteket centrifugáltuk (2500 g, 5 perc), a felülúszót eltávolítottuk, a sejteket vortex segítségével fellazítottuk, majd 100 µL lízis pufferben (50 mM glükóz, 10 mM EDTA, 25 mM TRIS, pH=7,5) szuszpendáltuk fel. Az elegyhez 200 µL alkalikus SDS oldatot (4,4 mL steril desztillált víz, 100 µL 10 M NaOH, 0,5 mL 20% (m/V) SDS) pipettáztunk és óvatosan összekevertük. További 150 µL High Salt oldatot (33% (m/V) K-acetát, 13% (V/V) jégecet, 1000 mL desztillált víz, pH=4) adtunk az elegyhez a nagyméretű kromoszómális DNS denaturálása céljából. A mintákat ismét óvatosan kevertük össze, majd centrifugálással

ülepítettük (6500 g, 10 perc). A felülúszót (ami tartalmazta az oldott plazmid DNS-t) új mikrocentrifuga csőbe pipettáztuk, majd ahhoz 0,5 mL kloroform-izoamilalkohol (24:1) keverékét adtuk, összeráztuk és újracentrifugáltuk (6500 g, 10 perc). A felső vizes fázist ismét új mikrocentrifuga csőbe mértük át és megegyező térfogatú izopropanol hozzáadása után 30 percig -20 °C-on inkubáltuk. A plazmid DNS-t ezután centrifugálással ülepítettük (6500 g, 10 perc), majd 70%-os (V/V) etanollal mostuk (6500 g, 10 perc). Szárítást követően a mintát 30 µL RNázt (250 µg/mL) tartalmazó desztillált vízben oldottuk fel. Az izolált plazmidok ellenőrzését restrikciós emésztéssel végeztük el, majd gélelektroforézis (0,8 % (m/V) agaróz) segítségével detektáltuk az emésztési mintázatokat.

***C. parapsilosis* sejtek transzformálása az expressziós konstrukciókkal**

Az LR klónozási lépéssel létrehozott expressziós vektort *StuI* restrikciós endonukleázzal (ThermoFisher) linearizáltuk (1 U enzim/1 µg plazmid). A reakcióelegyet egy éjszakán keresztül, 37 °C-on inkubáltuk. A plazmid DNS kicsapását azonos térfogatnyi izopropanol hozzáadásával hajtottuk végre, majd a mintát 70% (V/V) etanollal mostuk (6500 g, 10 perc). A mintát beszáritottuk és 10 µL desztillált vízben vettük fel a transzformáláshoz. Kompetens *C. parapsilosis* sejtek készítéséhez az élesztő sejteket 5 mL YPD tápoldatba oltottuk, majd 150 rpm-mel rázatva, 30 °C-on, egy éjszakán át inkubáltuk. Másnap a gombaszuszpenziót OD₆₀₀=0,2 értékre hígítottuk és 30 ml YPD tápoldatban a sejteket OD₆₀₀=1,0 érték eléréséig növesztettük. A sejteket centrifugálással összegyűjtöttük (2000 g, 5 perc, 4 °C), majd 3 mL jéghideg steril desztillált vízzel mostuk (2000 g, 5 perc, 4 °C). Ezután 1 mL hideg TELIOAC oldattal (100 µL 10x TE puffer, 100 µL 1 M lítium-acetát, 800 µL desztillált víz) mostuk a sejteket, majd centrifugálás után (6500 g, 30 mp) a pelletet 200 µL TELIOAC oldatban vettük fel. A kompetens sejteket felhasználásig jégen tároltuk. 100 µL kompetens *C. parapsilosis* sejthez hozzáadtunk 10 µL, a transzformálást megelőzően denaturált (100 °C, 10 perc, majd hűtés jégen) hering sperma DNS-t (Sigma), majd a transzformálni kívánt plazmid DNS-t (3 µg). Az elegyet 30 °C-on, 30 percen át inkubáltuk ráztatás nélkül, majd a sejtekhez 700 µL PLATE oldatot mértünk (560 µL 50% (m/V) PEG₃₃₅₀, 70 µL 1 M lítium-acetát, 70 µL 10x TE puffer). Ezt követően a sejteket egy éjszakán át, 30 °C-on inkubáltuk szintén statikus állapotban. Másnap hősokkot alkalmaztunk (44 °C, 15 perc), majd a transzformált sejteket centrifugálással összegyűjtöttük (6500 g, 30 mp) és 1 mL YPD oldattal a kiülepedett sejtek

felzavarása nélkül mostuk (6500 g, 30 mp). Ezután a sejteket 2 órán át, 30 °C-on rázatva 1 mL YPD tápoldatban növesztettük. Végül a sejteket centrifugálással ismét összegyűjtöttük (6500 g, 30 mp), a felülúszóból 850 µL-t eltávolítottunk, majd a maradék felülúszóban felfuszpendálva a sejteket szelektív táptalajra (YNB minimál + DO oldat leucin nélkül) szélesztettük. A csészéket 30 °C-on, két napon keresztül inkubáltuk.

5.3.2. A létrehozott OE mutáns törzsek validálása

Kolónia PCR

Az expressziós vektorok beépülését kolónia PCR segítségével ellenőriztük. A reakcióhoz a DNS templátot a következő lépések során készítettük elő. Az adott gombatelepet 80 µL 200 mM-os LiOAc oldatba mostuk bele, majd 70 °C-on, 5 percig, majd jégen 3 percig inkubáltuk. A DNS-t háromszoros mennyiségű 96% (V/V) etanollal csaptuk ki, majd 3 perc vortexelést követően centrifugáltuk (6500 g, 5 perc). 70% (V/V) etanollal (6500 g, 5 perc) történő mosást követően a pelletet beszárítottuk és a DNS-t 50 µL desztillált vízben vettük fel. Centrifugálást követően (6500 g, 3 perc) a felülúszó 1 µL-ét használtuk templátként.

Egy 25 µL végtérfogatú elegyhez a következő komponenseket mértük össze: 1x DreamTaq puffer (20 mM MgCl₂-dal kiegészítve, ThermoFisher), 0,25-0,25 µM forward és reverz primer, 0,2-0,2 mM dNTP, 1 µL genomi DNS templát és 1,25 U DreamTaq DNS polimeráz (ThermoFisher). A reakció az alábbiak szerint zajlott: 95 °C, 3 perc elődenaturáció, majd 35 cikluson át 95 °C, 30 mp denaturáció, 53 °C, 30 mp hibridizáció és 72 °C, 1 perc 15 mp polimerizáció, továbbá 72 °C, 6 perc utópolimerizáció. A DNS minőségét és mennyiségét 0,5 µg/mL etídium-bromiddal kiegészített 0,8%-os (m/V) agaróz gélen történő horizontális gélelektroforézissel ellenőriztük az 5.3.1. „Totál DNS tisztítása gombasejtekből” alfejezetben részletezett paramétereknek megfelelően.

RNS izolálás

Az OE gombatörzsekből történő RNS izoláláshoz a RiboPureTM-Yeast RNS izoláló kit-et (Ambion) használtuk a gyártó utasításait követve. Az RNS tisztítás mintaként 3-3 párhuzamos leoltás 1-1-1 arányú keverékből történt. Az izolált RNS mennyiségét NanoDrop spektrofotométer (ND-1000 Spectrophotometer, ThermoFisher) segítségével

határoztuk meg. Az RNS minták DNS szennyezettségét további felhasználásuk előtt real-time PCR módszerrel ellenőriztük a *C. parapsilosis* β -tubulin (*TUB4*, *CPAR2_500510*) génre specifikus primerek segítségével. Egy 20 μ L végtérfogatú elegyhez a következő reagenseket mértük össze: 10 μ L 2x SYBR Green qPCR Master Mix (ThermoFisher), 2-2 μ L 3 μ M forward és reverz *TUB4* specifikus primer mix, 1 μ L RNS templát és 7 μ L desztillált víz. Csak azokból az RNS mintákból szintetizáltunk cDNS-t (kiegészítő DNS), amelyek C_t értéke nagyobb vagy egyenlő volt, mint 32.

cDNS szintézis

A cDNS szintézishez RevertAid First Strand cDNA Synthesis kit-et (ThermoFisher) használtunk a gyártó utasításai szerint. A szintézishez maximum 1 μ g totál RNS-t használtunk. Egy reakció során 0,5 μ L oligo (dT)₁₈ és 0,5 μ L random hexamer primer keverékét használtuk fel 12,5 μ L végtérfogatban és a mintákat 65 °C-on, 5 percen keresztül hőkezeltük, majd jégen inkubáltuk. Ezután az alábbi reagenseket adtuk az elegyhez: 4 μ L 5x reakció puffer, 1 μ L RiboLock RNáz inhibitor (20 U/ μ L), 2 μ L 10 mM dNTP mix, 0,5 μ L RevertAid M-MuL V (reverz transzkriptáz, 200 U/ μ L). A reakcióelegyet 25 °C-on 5 percen át, majd 42 °C-on 60 percen át inkubáltuk. Az enzim inaktivációja 70 °C-on, 5 percig történt. A reakcióelegyet 50x-re hígítottuk desztillált vízben.

Real-time (valós idejű) PCR (RT-qPCR)

Az egyes OE mutánsokban az adott gén relatív expressziójának vizsgálatához valós idejű PCR technikát alkalmaztunk. Egy 20 μ L végtérfogatú reakcióhoz a következő komponenseket alkalmaztuk: 10 μ L 2x SYBR Green qPCR Master Mix (ThermoFisher), 2-2 μ L 3 μ M forward és reverz primer mix, 1 μ L 100 ng cDNS. Az alkalmazott reakciókörülmények a következők voltak: 95 °C, 3 perc elődenaturáció, majd 50 cikluson át 95 °C, 10 mp denaturáció és 60 °C, 30 mp hibridizáció-polimerizáció. A relatív expressziós értékek kiszámítása a $2^{-\Delta\Delta C_q}$ eljárással történt (Livak és Schmittgen, 2001) a Bio-Rad CFX Manager szoftver segítségével. Az alkalmazott primerek listáját és szekvenciáját a 2. sz. mellékletben tüntettük fel.

Southern blot analízis

DIG (digoxigenin) jelölt DNS próba szintézise Southern blot detektáláshoz

A DIG-jelölt DNS próba szintéziséhez a kolónia PCR esetében feltüntetett mennyiségeket és reagenseket alkalmaztuk a dNTP mix kivételével. A dNTP mix összeállítása dNTP és Digoxigenin-11-dUTP (Roche) felhasználásával történt (1-1 mM dATP, dCTP, dGTP és 0,65 mM dTTP és 0,35 mM DIG-dUTP). A CpN5LDo1SouFor és CpN5LDo2SouRev primereket és a vad típusú CLIB214 *C. parapsilosis* törzs genomi DNS-ét használtuk templátként (2. sz. melléklet) a reakcióban. A reakció a következő lépésekből állt: elődenaturáció 94 °C, 3 perc, majd 35 cikluson keresztül 94 °C, 15 mp denaturáció, 57 °C, 15 mp hibridizáció, 68 °C, 80 mp polimerizáció, végül utópolimerizáció 68 °C, 3 perc.

A Southern blot analízis kivitelezését a Gácsér és munkatársai által publikált protokoll szerint végeztük (Gácsér és mtsi., 2007). A genomi DNS-t a korábban leírtak alapján izoláltuk és abból 10 µg mennyiséget *EcoRI* restrikciós enzimmal (ThermoFisher) 37 °C-on, egy éjszakán át emésztettünk. A DNS-t azonos térfogatú izopropanollal csaptuk ki, a centrifugálással (6500 g, 10 perc) ülepitett DNS-t 70% (V/V) etanollal mostuk, beszárítottuk és 15 µL desztillált vízben oldottuk fel. A DNS fragmentumokat 0,8% (m/V) agaróz gélen történő horizontális gélelektroforézissel szeparáltuk (az 5.3.1. „Totál DNS tisztítás gombasejtekből” alfejezetben részletezett paramétereknek megfelelően). DNS markerként DIG-jelölt DNA Molecular Weight Marker VII-et (Roche) alkalmaztunk. A gélelektroforézist követően a DNS fragmentumokat Amersham Hybond-N (GE Healthcare) filterre blottoltuk kapilláris blot alkalmazásával egy éjszakán keresztül, majd 1,5 perc UV fény kezeléssel kovalensen rögzítettük a DNS-t a filterre. A hibridizáció szintén egy éjszakán át zajlott 65 °C-on hibridizációs pufferben forralással és hirtelen lehűtéssel egyszálúsított specifikus DIG-dUTP jelölt próba hozzáadásával. A DNS szakaszokat Antidigoxigenin-AP Fab (alkalikus-foszfataz kapcsolt anti-DIG molekulák) fragmentumokkal (Roche) és NBT/BCIP color (Roche) oldattal tettük láthatóvá.

5.3.3. A létrehozott OE mutáns törzsek karakterizálása

5.3.3.1. Átfogó fenotípus és életképesség vizsgálatához használt módszerek

Életképesség vizsgálat folyadéktenyészetben

A továbbiakban leírásra kerülő kísérleteket 3 ismétléssel végeztük, ahol ettől eltértünk, azt az adott tesztnél jeleztük. A kísérleteket az összes, jelen munkánk során létrehozott OE mutáns törzsszel elvégeztük, kivételt képeznek ez alól a sejtalkomponens festés, SEM biofilm analízis, *G. mellonella* fertőzés modell és egér virulencia kísérletek.

A kísérletekhez a gombákat YPD tápoldatban növesztettük 100 U/mL PS oldattal kiegészítve, rázó termosztátban (150 rpm), 30 °C-on, egy éjszakán keresztül. Az egy éjszakai tenyészetből 1 µL gombaszuszpenziót vittünk 3 mL friss tápoldatba és hasonló körülmények között növesztettük még egy éjszakán keresztül. A tenyészetből 2 mL mennyiséget centrifugáltunk (2500 g, 5 perc) és két körben mostuk steril 1x PBS oldattal (10x PBS oldat (foszfát puffertelt sóoldat): 8% (m/V) NaCl, 0,2% (m/V) KCl, 1,44% (m/V) Na₂HPO₄, 0,24% (m/V) KH₂PO₄), majd az adott kísérletnek megfelelő sejtkoncentrációt állítottuk be szintén steril 1x PBS oldatban, Bürker-kamrával való számolás és hígítás útján. 3 különböző *C. parapsilosis* törzset alkalmaztunk kontrollként - vt törzs (CLIB214), a kettős auxotróf reintegrált törzs (CPRI) és a fluoreszcens mCherry fehérjét expresszáló mCherry^{OE} törzs – a növekedési kinetika, stressz tolerancia és antifungális érzékenység vizsgálatokban. A létrehozott OE mutánsok életképességének vizsgálatához növekedési kinetikájukat YPD, illetve YNB minimál tápoldatokban monitoroztuk, rázás nélkül 30 °C-on, 24 órán keresztül. A minták OD₆₀₀ értékeinek mérését óránként 1 perces rázás (200 rpm) előzte meg (SpectroStar Nano, BMGLabtech). A kísérletet három ismételtsben, 3 technikai párhuzamos mintával végeztük 48 lyukú tenyésztőedényben. A gombaszuszpenziók kiindulási koncentrációja 5x10⁵ sejt/mL volt 1 mL végtérfogatban.

Életképesség vizsgálata különböző stresszorok jelenlétében szilárd táptalajon

Az egyes mutánsok fitnessét a 2. táblázatban feltüntetett stresszorok jelenlétében vizsgáltuk. A gombaszuszpenziókból 4 lépcsős 10x-es hígítási sort készítettünk 10⁵-10² sejt/5 µL koncentráció tartományban, amelyekből 5-5 µL-t pipettáztunk a táptalajok felszínére. A

hőmérsékletnek a törzsek életképességére gyakorolt hatását YPD táptalajon 20, 25, 30, 37 és 40 °C-on vizsgáltuk. Növekedésüket YNB minimál táptalajon hőinaktivált FBS-sel kiegészítve és anélkül is nyomon követtük. Az adott stresszorokkal szembeni toleranciát 30 és 37 °C-os hőmérsékleten is tanulmányoztuk. Az inkubációs idő 48 óra volt, kivétel a KV és KF 50 µg/µL és afeletti koncentrációin, különösen 37° C-on, amikor a kiértékelés megkönnyítése miatt további 1-2 napig inkubáltuk a csészéket.

Sejtfalkomponens vizsgálatok fluoreszcens festékek alkalmazásával

A kiválasztott mutáns törzseket a korábban leírtak szerint készítettük elő. A centrifugálás után a kiülepedett sejteket 0,5 mL 1% (m/V) BSA-t (bovine serum albumin, szarvasmarha szérum albumin) tartalmazó 1x PBS oldatban szuszpendáltuk fel és 30 percen át szobahőmérsékleten rázatva inkubáltuk, majd a sejteket 1x PBS-sel mostuk (2500 g, 5 perc), végül 400 µL 1x PBS-ben vettük fel. A szuszpenziókból 2x100 µL-nyi mennyiségeket új mikrocentrifuga csövekbe pipettáztunk, amelyhez 100 µL fluoreszcens 1., illetve 2. festékoldatot tartalmazó elegyet adtunk. Az első festékoldat a következő komponenseket tartalmazta: 0,5 µL 1 mg/mL kalkofluor fehér (KF, Sigma-Aldrich) és 4 µL 2,5 mg/mL konkanavalin A kötött fluoreszcein-izotiocianát (ConA-FITC, Sigma-Aldrich) 1% (m/V) BSA tartalmú 1x PBS oldatban. A második festékoldat (amit önállóan alkalmaztunk a festékek átfedését elkerülendő) pedig 0,25 µL 2 mg/mL búzacsíra-agglutinin kapcsolt fluoreszcein-izotiocianátot (WGA-FITC, Sigma-Aldrich) tartalmazott 1% (m/V) BSA tartalmú 1x PBS oldatban. A festékek hozzáadása után a mintákat 30 percen keresztül folyamatos rázatás mellett, sötétben, szobahőmérsékleten inkubáltuk. Az inkubációs idő letelte után a festett sejteket 1x PBS-sel háromszor mostuk, majd 100 µL 1x PBS oldatban szuszpendáltuk és felhasználásig jégen tároltuk. A mintákat tárgylemezre cseppentettük és Zeiss Axio Observer fluoreszcens mikroszkóp segítségével vizsgáltuk. Az egyes fluoreszcens festékek intenzitását Amnis FlowSight® áramlási citométer (Luminex) segítségével detektáltuk. Az adatokat a mellékelt IDEAS 6.0 szoftver segítségével értékeltük.

Morfológiaváltás és pszeudohifaképzés vizsgálata

A törzsek morfológiáját először fénymikroszkóp segítségével vizsgáltuk YPD tápoldatban történő tenyésztés után. A vizsgálathoz az egyes gombaszuszpenziókat közvetlenül tárgylemezre cseppentettük.

A mutánsok pszeudohifaképzését YPD és DMEM + HI FBS tápoldatokban vizsgáltuk, 37 °C-on, 5% (V/V) CO₂ jelenlétében 24, illetve 48 óra elteltével fénymikroszkóp segítségével. 2 nap elteltével Amnis FlowSight® áramlási citométerrel (Luminex) kvantifikáltuk a mintákban az élesztő és pszeudohifa sejtek arányát. Az adatokat a mellékelt IDEAS 6.0 szoftver segítségével értékeltük.

Biofilmképzés vizsgálata

A biofilmképzés vizsgálatát YNB minimál tápoldatban végeztük el 37 °C-on, 5% (V/V) CO₂ jelenlétében, 48 órás inkubációval. A kísérletet megelőző napon a 96 lyukú tenyésztőedény mintahelyeit 100 µL 10% (V/V) HI FBS oldattal előkezeltük egy éjszakán keresztül az említett körülmények között. Másnap a mintahelyeket kétszer mostuk 1x PBS oldattal, majd hozzáadtunk 200 µL 10⁶ sejtet tartalmazó gombaszuszpenziót. Egy adott mutáns törzsből 8 technikai párhuzamos mintát alkalmaztunk. A 2 napos inkubáció lejártával a tenyésztőedény mintahelyeit két alkalommal 1x PBS pufferrel mostuk, majd 20 µL 5 mg/mL 3-(4,5-dimetiltiazolil-2)-2,5-difeniltetrazólium bromid (MTT) oldatot pipettáztunk a mintákhoz, amit 5 órás inkubáció követett a már említett körülmények között. A mintákat kétszer mostuk 1x PBS pufferrel, majd 200 µL DMSO (dimetil-szulfoxid) hozzáadása után 10-15 percen keresztül tovább inkubáltuk. Az egyes mintahelyek optikai denzitását 540 nm hullámhosszon detektáltuk spektrofotométer segítségével (SpectroStar Nano, BMGLabtech). Kontrollként sejtmentes MTT-t és DMSO-t, illetve kizárólag sejteket tartalmazó mintákat alkalmaztunk.

Scanning elektronmikroszkópos (SEM) analízis

A kiválasztott *C. parapsilosis* törzsek biofilmképzési képességét pásztázó elektronmikroszkóppal is megvizsgáltuk. Ehhez a tenyésztőedény mintahelyeibe steril szilikon korongot tettünk és ezen a felületen neveltük a sejteket a „Biofilmképzés vizsgálata” című fejezetben ismertetett tenyésztési körülmények között. A 2 napos inkubáció letelte után a szilikon korongokat óvatosan 1x PBS pufferbe merítettük, majd a mintákat fixáltuk 2,5%

(V/V) glutáraldehid és 0,05 M Na-kakodilát (pH=7,2) 1x PBS oldatban egy éjszakán keresztül 4 °C-on. Ezután a korongokat ismét óvatosan mostuk 1x PBS pufferbe történő merítéssel, majd a mintákat emelkedő koncentrációjú alkoholsorral (30-50-70-80-100% (V/V) etanol) víztelenítettük minden esetben 1,5 órán keresztül, 4 °C-on. Utolsó lépésként a mintákat abszolút etanolban inkubáltuk egy éjszakán keresztül, 4 °C-on, majd szárítottuk kritikus pont szárító segítségével. A mintákat 12 nm-es rétegben aranybevonattal vontuk be (Quorum Technologies, Laughton, East Sussex, UK) és JEOL JSM-7100F/LV scanning elektronmikroszkóppal vizsgáltuk (JEOL Ltd., Tokió, Japán). A kísérletet Dr. Farkas Attila, a Szegedi Biológiai Kutatóközpont munkatársának segítségével végeztük.

Antifungális szerekkel szembeni érzékenység vizsgálata

A gombasejtek előkészítése a korábban leírtak szerint történt, a sejtkoncentrációkat 3×10^4 sejt/mL koncentrációra állítottuk be RPMI-MOPS tápoldatban. 9 lépcsős, felező hígítási sort készítettünk az anidulafungin (ANF), caspofungin (CAF) és micafungin (MIF) gombaellenes szerekből RPMI-MOPS tápoldatban, úgy, hogy a kezdeti legmagasabb drog koncentráció 8 $\mu\text{g/mL}$, míg a legalacsonyabb 0,0156 $\mu\text{g/mL}$ legyen. A kísérletet 96 lyukú tenyésztőedényben végeztük úgy, hogy az egyes mintahelyekben a 200 μL végtérfogatú tápközeg 3×10^3 gombasejtet tartalmazott, az adott hatóanyag pedig 4 $\mu\text{g/mL}$ -től 0,0078 $\mu\text{g/mL}$ -ig terjedő koncentráció tartományban volt jelen. A tenyésztőedényeket 30 °C-on, rázatás nélkül inkubáltuk, és az egyes antifungális szerekhez tartozó minimális gátló koncentráció (MIC_{50}) értékeket 24 és 48 óra elteltével határoztuk meg a Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) M27-A3 és M27-S4 protokolljai alapján (CLSI, 2008; CLSI, 2012; Papp és mtsi., 2018). A kísérletet egy alkalommal, 3 technikai párhuzamos mintával végeztük minden törzs esetében. A korábban már említett 3 kontroll törzs mellett egy további, ismert érzékenységű *C. krusei* gombatörzset is bevontunk a kísérletbe. A növekedési képességet vizuálisan detektáltuk.

5.3.3.2. Gazda-patogén interakció vizsgálat

In vitro fagocitózis vizsgálat

Az egér J774.2 monocita sejtvonalat DMEM + 10% (V/V) HI FBS tápoldatban növesztettük 37 °C-on, 5% (V/V) CO₂ tenzió mellett. A korábban előnevelt konfluens makrofág sejteket felmostuk előmelegített (37 °C) DMEM + 10% (V/V) HI FBS tápoldattal és azokat 15 mL térfogatú Falcon csőbe pipettáztuk és meghatároztuk a sejtkoncentrációt. A makrofág sejtekből 1 mL, 2x10⁶ sejtet tartalmazó mennyiséget pipettáztunk 12 lyukú tenyésztőedények mintahelyeibe. A festett gombaszuszpenziók előkészítéséig az edényt 37 °C-on, 5% (V/V) CO₂ tenzió inkubáltuk 1 órán keresztül, elősegítve azok kitapadását a felületen.

A gombasejteket a korábban leírt módon neveltük fel, a mosási lépések után 500 µL 1x PBS-ben szuszpendáltuk fel a sejteket, amiből 100 µL-nyi mennyiségeket pipettáztunk új mikrocentrifuga csövekbe. A szuszpenzióhoz 11 µL 1 M Na₂CO₃ oldatot és 2 µL AlexaFluor® 488 fluoreszcens festéket adtunk, az elegyet 1 órán keresztül szobahőmérsékleten, sötétben inkubáltuk. Ezután a szuszpenziót kétszer mostuk 1x PBS pufferrel (2500 g, 5 perc), végül 500 µL 1x PBS pufferben vettük fel a sejteket. A sejtkoncentrációt 10⁷ sejt/mL-re hígítottuk DMEM + 10% (V/V) HI FBS tápoldatban.

Az 1 órás inkubáció letelte után a makrofág sejtekről eltávolítottuk a felülúszót, majd 1:5 (makrofág:gomba) arányban hozzáadtuk a festett gombaszuszpenziót 1 mL végtérfogatban. A sejteket 1 órán keresztül inkubáltuk 37 °C-on, 5% (V/V) CO₂ tenzió mellett, fénytől védve, majd a sejteket kétszer mostuk steril 1x PBS-sel, majd a kitapadt sejteket felmostuk 1 mL 1x PBS pufferrel és centrifugálással üleptítettük (1000 g, 5 perc). A sejteket 200 µL 1x PBS-ben szuszpendáltuk fel. A kísérlethez gombasejtet nem, csak monocitákat tartalmazó kontrollt használtunk a sejtek autofluoreszcenciájának kiszűrése céljából. A gombasejt festés hatékonyságát 1-1 festett gombaszuszpenzió mérésével ellenőriztük. A gombát fagocitált makrofágok arányát a lemerített összmakrofág populációhoz képest az Amnis FlowSight® áramlási citométerrel (Luminex) határoztuk meg a kontroll mintákra beállított mérési paraméterekkel. Az adatokat a mellékelt IDEAS 6.0 szoftver segítségével értékeltük ki.

***In vivo Galleria mellonella* fertőzés modell**

A nagy viasmoly (*G. mellonella*) lárvákat (BioSystems Technology - TruLarv®) felhasználásig 4 °C-on tároltuk, a kísérletet megelőző éjszakán 30 °C-on inkubáltuk. A mutáns törzseket 2-3 kísérletben teszteltük törzsenként 20-20 lárvával fertőzésével. A gombaszuszpenziókat az 5.3.3.1. „Életképesség vizsgálat folyadéktenyészetben” alfejezben leírtak szerint készítettük elő és 5×10^7 sejt/mL koncentrációra hígítottuk 1x PBS pufferben. A lárvákat 10 µL gombaszuszpenzióval (5×10^5 sejt) injektáltuk Hamilton fecskendő segítségével, majd 30 °C-on, sötétben tartottuk őket és 10 napon keresztül követtük nyomon az életképességüket. Kontrollként kezeletlen, illetve 10 µL 1x PBS pufferrel injektált lárvákat alkalmaztunk.

***In vivo* egérfertőzés modell**

Az egérfertőzési kísérlethez választott mutáns törzseket az 5.3.3.1. „Életképesség vizsgálat folyadéktenyészetben” alfejezben ismertetett módon neveltük és készítettük elő, a gombasejtek koncentrációját 2×10^8 sejt/mL-re állítottuk be 1x PBS pufferben. A tesztekhez *Mus musculus* Balb/c egértörzs 7-8 hetes nőstény példányait alkalmaztuk (Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Szeged, Magyarország, XVI./2015). Az egereket oldalsó farki vénájukon keresztül (i.v.) fertőztük 100 µL gombaszuszpenzióval (2×10^7 sejt). Az állatok állapotát naponta monitoroztuk, majd 3 nap elteltével termináltuk őket. Agy, máj, lép és vese szerveiket steril körülmények között izoláltuk, lemértük, majd homogenizáltuk 1x steril PBS pufferben. A mintákat hígítottuk, majd azokból 50 µL-nyi mennyiségeket YPD táptalajra szélesztettünk. A Petri-csészéket 2 napon keresztül, 30 °C-on inkubáltuk. Az önálló telepkepző egységeket (colony forming unit, CFU) leszámoltuk, az eredményeket pedig CFU/g szövet mértékegységben adtuk meg. A vizsgálatot 2 kísérletben végeztük el, törzsenként 4-5 állat felhasználásával.

5.4. Etikai engedély/nyilatkozat

Az állatkísérleteket a Magyarországon hatályos nemzeti állatjogi szabályoknak (1998, XXVIII; 40/2013), valamint az európai állatjogi szabályozásnak megfelelően végeztük (2010/63/EU). A vizsgálatokat a Munkahelyi Állatjóléti Bizottság (MÁB) által jóváhagyott

állatkísérletes engedély hatálya alatt végeztük (XVI./03521/2011) a Szegedi Tudományegyetem engedélyével (XII./00455/2011 and XVI./3646/2016).

5.5. Statisztikai elemzés

Az eredmények kiértékelését és statisztikai elemzését a GraphPad Prism 7 nevű szoftver segítségével végeztük el. A biofilmképzés és fagocitózis vizsgálatok eredményeinek értékeléséhez ANOVA (analysis of variance) és Dunnette-féle sokszoros összehasonlítás tesztet használtunk. A *G. mellonella* kísérlet során kapott túlélési görbéket Mantel-Cox (Log-rank) teszt segítségével elemeztük, míg az egér kísérletekhez Mann-Whitney tesztet alkalmaztunk. Statisztikailag szignifikáns eltérésnek a $P \leq 0,05$ (* $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$; **** $P \leq 0,0001$) adatokat tulajdonítottunk.

6. Eredmények és értékelésük

6.1. A vizsgálni kívánt gének kiválasztása

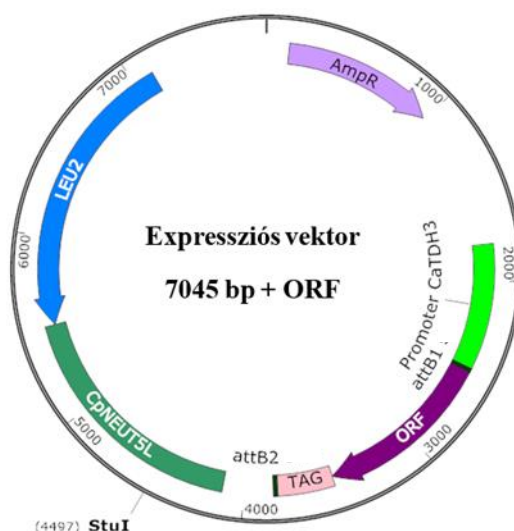
A túltermeltetni kívánt géneket egy korábban, a laboratóriumunkban elvégzett transzkriptom analízis eredményei, valamint szakirodalmi adatok alapján választottuk ki. A transzkriptom analízis során Tóth és munkatársai azt vizsgálták, hogy a vad típusú *C. parapsilosis* sejtek génexpressziós mintázata hogyan változik humán monocita sejtvonal (THP-1) sejtjeivel történő *in vitro* ko-inkubáció során a gazdasejteket nem tartalmazó kontroll körülményhez képest (Tóth és mtsi., 2018). A kísérletben megváltozott expressziós mintázatot mutató gének közül azon 18-at választottuk ki, amelyek deléciós mutáns párja korábbi tanulmányokban már előállításra és jellemzésre került (Holland és mtsi., 2014; Cillingová és mtsi., 2017; Tóth és mtsi., 2018). A fenti gének körét további 19 olyan génnel egészítettük ki, amelyek ortológjai a szakirodalmi adatok alapján *C. albicans*, illetve *S. cerevisiae* fajokban virulenciával összefüggésbe hozható folyamatokban játszanak szerepet (3. sz. melléklet). Az összesen 37 kiválasztott gén más fajokban jellemzett ortológjai változatos folyamatokban működnek közre, vannak köztük sejtalkomponens szintézisért, biofilmképzésért, morfológiaváltásért, illetve antifungális szer elleni toleranciáért felelős gének, transzkripciós faktorokat, valamint protein kinázokat kódoló gének.

6.2. A *C. parapsilosis* OE mutáns törzsek létrehozása

Az OE törzseket egy Németh és munkatársai által *C. parapsilosis* gombafajra adaptált, eredetileg *C. albicans*-ra kidolgozott Gateway® klónozási technika segítségével hoztuk létre (Chauvel és mtsi., 2012; Németh és mtsi., 2020). A kiválasztott géneket egyedi, 20 bp hosszúságú, nem transzlálódó BAR kód szekvenciákkal láttuk el, amelyek az egyes mutánsok további, akár kevert mintából történő gyors azonosítását teszik lehetővé.

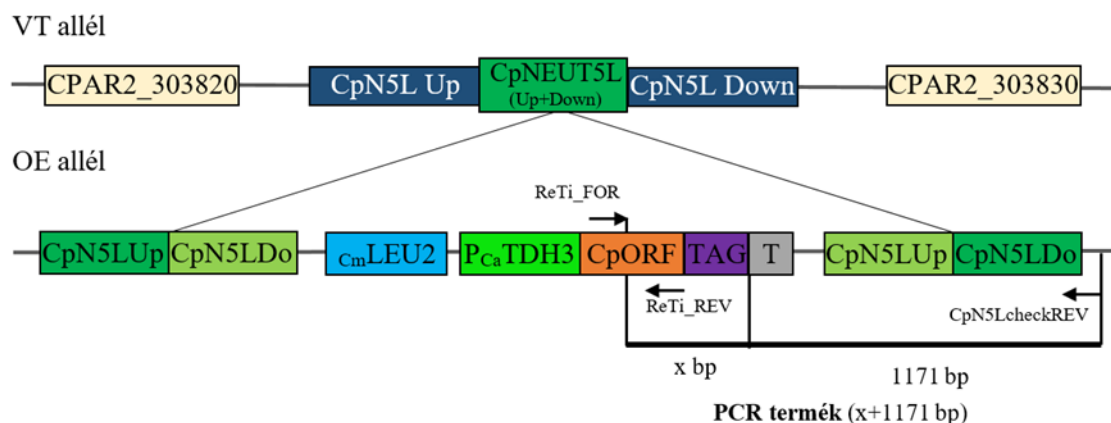
Az amplitikonok pDONOR vektorba® klónozását követően valamennyi pENTRY vektor® nukleotidsorrendjét meghatároztuk újgenerációs szekvenálási eljárással, és csak azokat a szekvenciákat klónoztuk expressziós vektorba (pEXPR), amelyek nem vagy

legfeljebb olyan mutációkat hordoztak, amelyek nem érintik a fehérje szekvenciát. A gének expresszióját a *C. albicans* *TDH3* konstitutív promótere biztosította (2. ábra).



2. ábra. Az OE mutánsok előállításához alkalmazott expressziós vektor sematikus felépítése. Az *attB1* és *attB2* régiók a klónozási lépések során hátramaradó szekvenciák. (Az ábra Németh és mtsi. (2020) publikációja alapján lett módosítva; *LEU2*: leucin bioszintézisért felelős gén; *CpNEUT5L*: *C. parapsilosis* neutrális intergenikus régió; *TAG*: mutáns-specifikus jelölő szekvencia (BAR szekvencia); *ORF*: adott gén kódolószekvenciája; *attB2-B1*: specifikus felismerő szekvenciák; *CaTDH3*: *C. albicans* *TDH3* promóter; *AmpR*: ampicillin rezisztencia gén; *StuI*: restrikciós enzim hasítóhely).

A linearizált integrációs kazettát a *C. parapsilosis* *CpNEUT5L* (*CpN5L*) vektor neutrális, géneket nem tartalmazó, intergenikus régiójába építettük, melynek diszrupciója nem befolyásolja a törzsek életképességét és stressztoleranciáját, valamint a beépített OE kazetta zavartalanul ki tud fejlődni (2-4. ábra) (Gerami-Nejad és mtsi., 2013; Németh és mtsi., 2020). Az expressziós vektor szelekciós markergénként a *C. maltosa* gomba leucin aminosav szintézisért felelős génjét (*CmLEU2*) hordozza, amely a transzformációra használt recipiens törzs *LEU2* deléció alapján leucin auxotrófiáját komplementálni tudja (Holland és mtsi., 2014). A Southern blot analízis alapján az OE rendszer a megfelelő helyre integrálódott ektopikus beépülést nem detektáltunk (3. ábra).

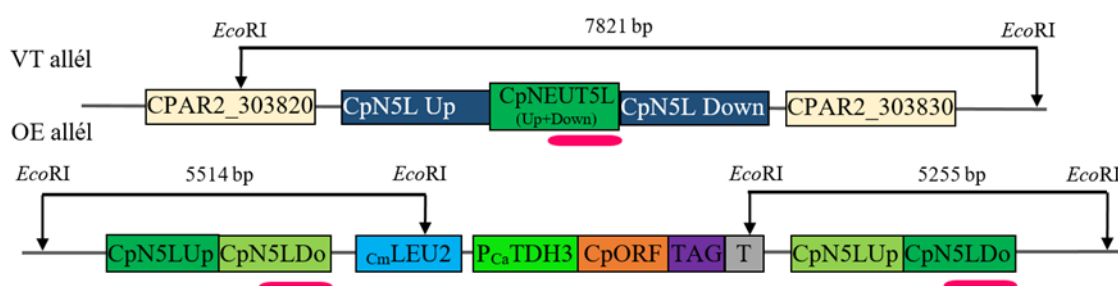


3. ábra. Az OE konstrukció sematikus felépítése a CpN5L régióba történő integrálódása után. A nyilak a specifikus real-time (ReTi_FOR és ReTi_REV) és az univerzális (CpN5LcheckREV) primereket jelölik, melyeket a kolónia és real-time PCR reakciókhoz alkalmaztunk (CPAR2_x: *C.parapsilosis* gén; CpN5LUp/Do: *C.parapsilosis* neutrális intergenikus régió up- és downstream régió; CmLEU2: *C. maltosa* leucin bioszintézisért felelős gén; P_{Ca}TDH3: *C. albicans* TDH3 promóter; CpORF: *C.parapsilosis* adott gén kódoláshoz tartozó szekvenciája; TAG: mutáns-specifikus jelölő szekvencia (BAR szekvencia); T: terminátor/terminációs régió). (Az ábra Németh és mtsi. (2020) publikációja alapján lett módosítva).

6.3. A létrehozott OE *C. parapsilosis* mutáns törzsek validálása

A génexpressziós konstrukciók megfelelő integrációját először kolónia PCR segítségével ellenőriztük, amelynek során egy minden konstrukcióra egyedi forward és egy genomra specifikus univerzális reverz primert használtunk. A PCR termék mérete minden mutáns esetében egyedi volt, tekintve a beépült gének eltérő méretét (3. ábra). A mutánsokat Southern blot eljárással is ellenőriztük, hogy vizsgáljuk az ektopikus integráció bekövetkezését, amely befolyásolná a későbbi vizsgálatok eredményét. Az integratív konstrukció mindig egy kópiában épült be, ezért a mutáns törzsek az érintetlen allélra utaló (7821 bp) és az integrációt jelző további két fragmentummal (5514 és 5255 bp) voltak jellemezhetők *Eco*RI enzim használata esetén (4. ábra).

Továbbá megvizsgáltuk, hogy az adott génről az elvárásoknak megfelelően nagyobb mennyiségben keletkezik-e mRNS átírat, tehát növekszik-e azok kifejeződése a mutáns gombasejtekben. Ezen kérdés megválaszolására valós idejű PCR technikát alkalmaztunk. cDNS mintákat templátként felhasználva génspecifikus primerek felhasználásával végeztünk RT-qPCR analízist. Mivel az említett primerek a natív génszekvenciákhoz is kötődnek, ezért kontrollként a vad típusú törzsből kivont cDNS átíratot is alkalmaztunk, amelynek segítségével az adott gén normál (OE konstrukciótól mentes) kifejeződéséről is információt kaptunk. További kontrollként a *CpTUB4* háztartási gén szolgált. A két kontroll eredményeihez viszonyítva adtuk meg az adott mutánshoz tartozó génextpressziós értéket.



4. ábra. A cél genomi régióba integrált OE kazetta sematikus felépítése kiemelve a Southern blot analízis lényeges jellemzőit. A fekete függőleges nyilak az *EcoRI* restriktációs enzim hasítóhelyeit mutatják az egyes genomi szakaszokon a vad típusú és a módosított allélok esetében. Szintén feltüntettük a detektálás során várt fragmentum méreteket. A rózsaszín vízszintes vonalak az alkalmazott DIG-jelölt próbák specifikus kötőhelyeit mutatják. (CPAR2_x: *C.parapsilosis* gén; CpN5LUp/Do: *C.parapsilosis* neutrális intergenikus régió up- és downstream régió; CmLEU2: *C. maltosa* leucin bioszintézisért felelős gén; P_{Ca}TDH3: *C. albicans* TDH3 promóter; CpORF: *C.parapsilosis* adott gén kódolószekvenciája; TAG: mutáns-specifikus jelölő szekvencia (BAR szekvencia); T: terminátor/terminációs régió, *EcoRI*: restriktációs enzim hasítóhely). (Az ábra Németh és mtsi. (2020) publikációja alapján lett módosítva).

3. táblázat. Az OE mutáns törzsek normalizált génexpressziós értékei (RNE - relatív normalizált expresszió) és a szórási adatok.

Gén	Ortológ	RNE*	Gén	Ortológ	RNE*
CPAR2_100460	<i>CpHBT4</i>	122,5±17,7	CPAR2_302400	<i>ScMGT1</i>	424,4±90,5
CPAR2_100470	<i>CpHBT3</i>	18,6±0,9	CPAR2_303240	<i>ScPFA5</i>	44,7±2,8
CPAR2_100540	<i>CaHAP5</i>	7,6±0,9	CPAR2_303730	<i>ScTHR1</i>	66,1±26
CPAR2_104420	<i>ScLTE1</i>	378,5±22,1	CPAR2_400270	<i>ScHIT1</i>	31,6±2,3
CPAR2_105250	<i>CaPHO85</i>	44,8±3,5	CPAR2_406400	<i>ScRPA12</i>	41,7±7,3
CPAR2_107020	<i>CaHHF1</i>	118,2±11,0	CPAR2_500180	<i>ScKIN3</i>	675,7±89,3
CPAR2_107240	<i>CaKTR4/MNT4</i>	70,4±12,4	CPAR2_500360	<i>ScAMS1</i>	37,2±2,6
CPAR2_108840	<i>ScSPS1</i>	50,5±9,6	CPAR2_501400	<i>CaCWH41</i>	90,0±11,2
CPAR2_109520	<i>CaTUP1</i>	19,1±4,5	CPAR2_503290	<i>CaRAD53</i>	218,4±25,9
CPAR2_200040	-	212,2±17,3	CPAR2_503760	<i>ScTMA46</i>	7,3±0,7
CPAR2_200390	<i>CaSPT3</i>	9,0±0,6	CPAR2_602370	<i>ScRAD18</i>	17,3±2,1
CPAR2_201920	<i>ScMNT2</i>	7,3±1,1	CPAR2_602820	<i>CaFCA1</i>	28,4±8,4
CPAR2_204840	<i>CpHBT2</i>	8,9±1,8	CPAR2_602840	<i>ScTFB4</i>	176,7±30,6
CPAR2_205060	<i>CaCDC28</i>	30,6±5,6	CPAR2_700550	<i>ScRSC8</i>	4,5±0,5
CPAR2_208600	<i>CaCPH1</i>	44,5±3,6	CPAR2_703840	<i>ScSLM5</i>	52,5±8,4
CPAR2_209240	<i>CaCDC19/PYK</i>	2,6±0,0	CPAR2_804030	<i>ScGSC2</i>	134,6±29,9
CPAR2_209520	<i>CaMKK2</i>	7,8±1,3	CPAR2_805930	<i>CaTEC1</i>	34,5±6,9
CPAR2_300080	<i>ScADK2</i>	134,8±7,3	CPAR2_806950	<i>ScNOB1</i>	65,7±9,9
CPAR2_301360	<i>CaPMR1</i>	38,9±3,1			

*Az adatok a CLIB214 vad típusú törzs értékeire lettek normalizálva. A viszonylagos transzkripciós értékek egy háztartási gén (*CpTUB4*) szintjéhez lettek viszonyítva. A kísérletet három statisztikai párhuzamos mintával végeztük. Az értékek $2^{-\Delta\Delta Cq}$ összehasonlító módszerrel lettek meghatározva Bio-Rad CFX Manager szoftver használatával (Livak és Schmittgen, 2001).

Cp: *C. parapsilosis*; *Ca*: *C. albicans*; *Sc*: *Saccharomyces cerevisiae*.

6.4. A létrehozott OE *C. parapsilosis* mutáns törzsek karakterizálása

6.4.1. A mutáns törzsek életképességének vizsgálata

A létrehozott mutáns törzseket életképesség vizsgálatoknak vetettük alá annak érdekében, hogy kizárjuk az optimális – a törzsek tenyésztéséhez és fenntartásához alkalmazott – körülményeken vad típustól eltérő fitness mutató mutánsokat. A kísérletek során három kontroll törzset alkalmaztunk (CLIB214, CPRI, mCherry^{OE}). A CLIB214 vad típusú prototróf izolátumon kívül a CPRI törzset is alkalmaztuk, amely a leucin auxotróf laboratóriumi törzs (CPL2) *C. maltosa* *LEU2* génjével komplementált változata. Mivel a

CPL2 törzset alkalmaztuk a mutánsok létrehozásához és a transzformálás során ugyanazon leucin gén beépülésére szelektáltunk, így az ezzel megegyező szelekciós markert hordozó törzset (CPRI) szükséges kontrollnak ítéltük meg, hogy kizárhassuk a szülői törzsben esetlegesen meglévő vad típustól eltérő fenotípus változásokat. Továbbá fontosnak tartottuk az OE konstrukció beépüléséből, illetve működéséből, valamint a CpN5L régió módosításából adódó fenotípus varianciák kizárását, aminek érdekében egy a *C. parapsilosis* faj virulenciájának szempontjából irrelevánsnak vélt fluoreszcens proteint (mCherry) túltermelő mCherry^{OE} kontroll törzset is bevontunk a kísérletbe.

Első körben a mutánsok életképességét komplett (YPD), valamint minimál (YNB) tápoldatban vizsgáltuk 24 órás intervallumban. A növekedési képesség méréséhez a szuszpenziók optikai denzitását mértük, majd azokat a kontroll törzsekéhez hasonlítottuk. Az adatok értékelése során egyetlen esetben sem találtunk eltérő fitnesszel rendelkező mutáns törzset a kontroll adatokhoz viszonyítva, ebből arra következtettünk, hogy az általunk vizsgált gének között feltehetően nincsen olyan funkcióval bíró, ami hatással lenne a *C. parapsilosis* életképességére (4. és 5. sz. melléklet). Az eredmények tükrében mind a 37 mutánsal elvégeztük a további kísérleteket.

A kontroll törzsek az eddig bemutatott növekedési képesség és stressz vizsgálatok során nem mutattak szignifikáns eltérést a növekedésben/stressztoleranciában, ezért a további kísérletek esetében már csak egyetlen kontroll törzset vizsgáltunk, a vad típusú CLIB214 törzset.

6.4.1.1. Életképesség vizsgálat stresszkörülmények között

A patogén gombáknak számos fizikai és kémiai stresszkörülményhez kell alkalmazkodnia a gazdaszervezettel való interakció során, mint például az emelkedett hőmérséklet, különböző kémhatás vagy az oxidatív stressz. Az ezen körülmények között való túlélés képessége nagyban hozzájárul az adott patogén eredményesebb fertőzési képességéhez, így fontos virulenciában szerepet játszó tulajdonságnak tekinthető. Ennek modellezése céljából hőmérséklet-stressz vizsgálatot végeztünk YPD táptalajon 20, 25, 30, 37 és 40 °C-on, továbbá számos sejtfalstresszor vegyülettel szemben mutatott érzékenységet vizsgáltunk stresszorral kiegészített YPD táptalajon az OE mutánsokon és a kontroll

törzseken (1-2. táblázat). Ez utóbbi vizsgálatot párhuzamosan 30, illetve 37 °C-on is elvégeztük annak érdekében, hogy megvizsgálhassuk, hogy az OE mutáns hogyan reagál a sejtfalstresszorok jelenlétében a gazda fiziológiás hőmérsékleti optimumán, amely már túl van a gomba számára optimális hőmérsékleten. A mutáns törzsek életképességét szilárd YNB minimál, valamint magzati marha szérummal (FBS) kiegészített táptalajon is monitoroztuk. Előbbivel a csökkent tápanyag tartalmú közeghez való alkalmazkodás, míg utóbbival a gazdában is jelenlévő komponensek bontási/hasznosítási képességét vizsgáltuk. Sem a különböző hőmérsékleti viszonyok között, sem a minimál vagy szérummal kiegészített tápközegek alkalmazása során nem tapasztaltunk eltérő növekedési képességet a kontrollokhoz képest (6. sz. melléklet).

A 37 mutánsból három esetében a 2. táblázatban feltüntetett koffein, kalkofluor fehér, kongóvörös és SDS stresszorok közül legalább egy jelenlétében tapasztaltunk változást, míg a három kontroll törzs esetében egyetlen alkalommal sem jegyeztünk fel eltérő növekedési képességet (4. táblázat, 5. ábra). Csökkent életképességet detektáltunk kalkofluor fehér és kongóvörös stresszorok jelenlétében a CPAR2_200040^{OE} és CPAR2_302400^{OE} mutánsok esetében. SDS érzékenységet a CPAR2_109520^{OE} és CPAR2_302400^{OE} mutánsok tesztelése során, míg csökkent növekedést koffein jelenlétében egyedül az utóbbi esetében tapasztaltunk (4. táblázat, 5. ábra).

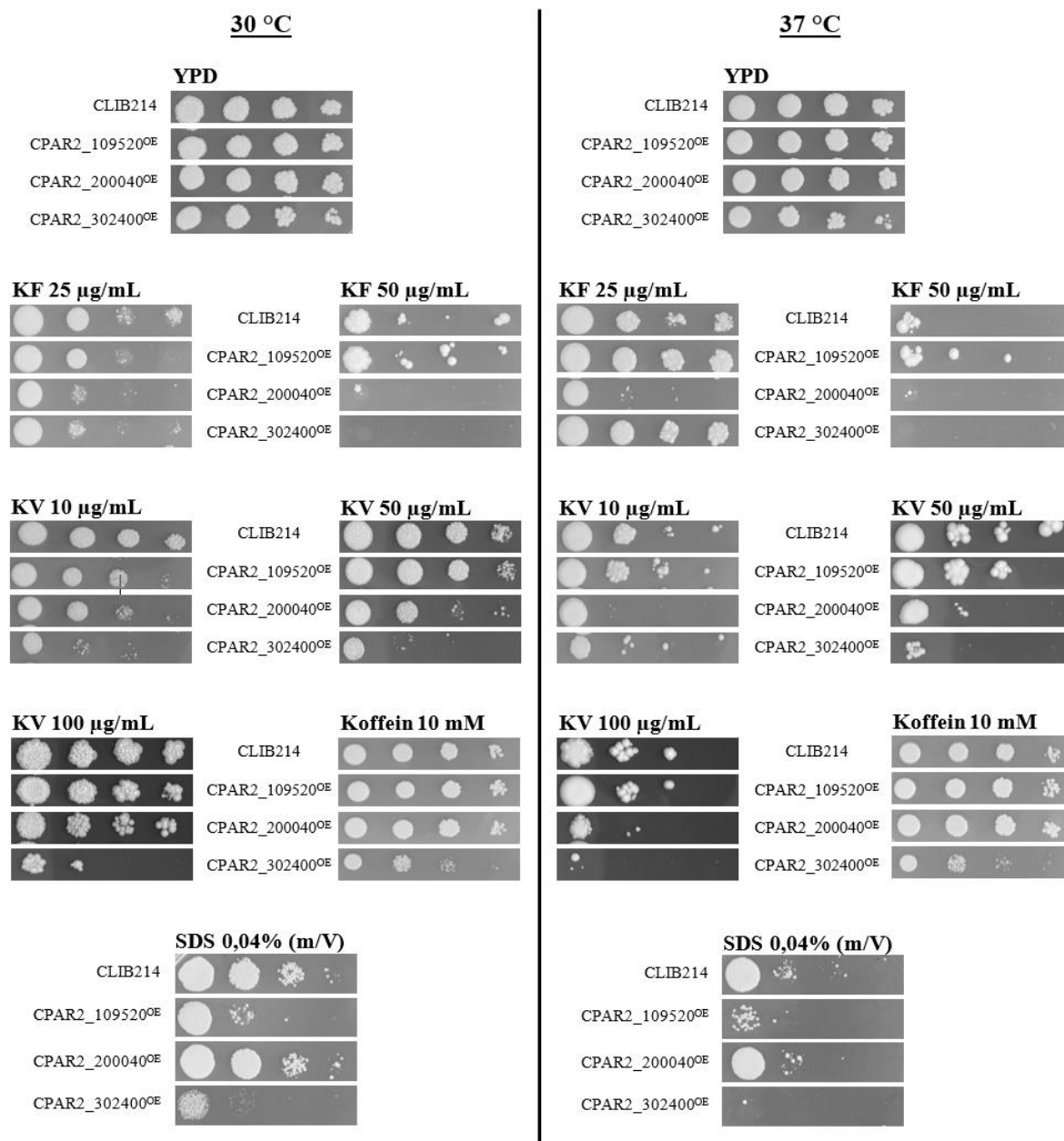
4. táblázat. Életképesség vizsgálat eredményeit bemutató táblázat.

Stresszor	Koffein 10 mM		KF 25 µg/mL		KF 50 µg/mL		KV 10 µg/mL		KV 25 µg/mL		KV 50 µg/mL		KV 75 µg/mL		KV 100 µg/mL		SDS 0,04% (m/V)	
	30	37	30	37	30	37	30	37	30	37	30	37	30	37	30	37	30	37
CPAR2_109520 ^{OE} (<i>CpTUP1</i>)																		
CPAR2_200040 ^{OE}																		
CPAR2_302400 ^{OE} (<i>CpMGT1</i>)																		

KF: kalkofluor fehér

KV: kongóvörös

Színkódolás: fekete - nincs növekedés, piros - erős növekedési defektus, narancssárga - közepes növekedési defektus, sárga - enyhe növekedési defektus, szürke - nincs különbség.



5. ábra. A mutáns törzsek stressztoleranciája szilárd táptalajon. Az ábrákon a CPAR2_109520^{OE}, CPAR2_200040^{OE} és CPAR2_302400^{OE} törzsek eltérő növekedési képessége látható a CLIB214 vad típusához viszonyítva az alkalmazott stresszorok jelenlétében. A vizsgálat során 10^5 - 10^2 sejt/5 µL-ig terjedő sejtkoncentrációt alkalmaztunk, 10x-es hígítási tagokkal. A KF (50 µg/mL) és a KV (50-100 µg/mL) tartalmú csészéket 3-4 napig inkubáltuk.

A sejtfal részét képző PAMP molekulák fontos szerepet játszanak a gazda-patogén interakció során, ezért ezen komponensek minőségi és mennyiségi változása befolyással lehet a gazdaszervezet immunválaszának hatékonyságára. A kalkofluor fehér vegyület képes gátolni a kitin polimerizációját, míg a kongóvörös egy β -1,3-glükánhoz kötődő festék, tehát mindkét ágens képes interakcióba lépni a gomba sejtfal egyik fő elemével, így pedig negatívan befolyásolni és gyengíteni a sejtfal normál felépítését és struktúráját (Levin, 2005; Ram és Klis, 2006; Sanz és mtsi., 2017). A koffein egy purin analóg molekula, amely specifikus géneket képes aktiválni a *S. cerevisiae* gombában és negatív hatással bír a sejtfal biogenezésére. Kuranda és munkatársai megállapították, hogy a koffein aktiválja a gomba sejtfal integritásáért felelős szignalizációs útvonalat, hasonlóan a KF és KV ágensekhez, azonban eltérő komponenseken keresztül (Kuranda és mtsi., 2006). Az SDS egy membránkárosító vegyület, emellett pedig negatív hatással lehet a sejtfal integritására, de akár fehérje denaturációt és sejtlízist is indukálhat (Igual és mtsi., 1996). Az említett vegyületek tehát jól ismert antagonistái egyes gomba sejtfalkomponenseknek, ezért sejtfal stressztolerancia vizsgálatok során rutinszerűen alkalmazzák őket. Feltételezhető, hogy az említett stresszorokra érzékenyebb mutánsok a releváns sejtfalkomponensekben valamilyen defektussal rendelkeznek (de Groot és mtsi., 2001; Ram és Klis, 2006; Tóth és mtsi., 2018).

A CPAR2_302400^{OE} mutáns törzs fitnessze az alkalmazott sejtfal, illetve membránkárosító vegyületek mindegyikének hatására csökkent (4. táblázat, 5. ábra). A törzs életképességének redukciója a KF és KV ágensek jelenlétében koncentrációfüggést is mutatott. A növekvő koncentrációjú KV közepes (10, 25, 50 $\mu\text{g/mL}$), majd erős (75, 100 $\mu\text{g/mL}$) növekedési defektust okozott. A KF magas koncentrációban (50 $\mu\text{g/mL}$) teljes vagy erős növekedési gátlást okozott, míg alacsonyabb mennyiségben nem volt hatással a mutáns életképességére. A CPAR2_302400^{OE} volt az egyetlen, ami defektust mutatott koffein jelenlétében, de ezenkívül az SDS stresszorra is érzékenynek bizonyult, ami erősen redukálódott növekedési képességben nyilvánult meg. A gén ortológia (*ScMGT1*) egy DNS hibajavító metiltranszferáz funkcióval rendelkező proteint kódol *S. cerevisiae*-ben (Xiao és mtsi., 1991).

A CPAR2_200040^{OE} mutáns vizsgálata során enyhe, közepes és erős mértékű növekedéskor csökkenés volt megfigyelhető KV és KF jelenlétében (4. táblázat, 5. ábra). Az ortológ funkciója napjainkig nem ismert. Érdekes módon, ugyanezen gén deléciós mutáns

törzse ellenállóbbnak bizonyult KF stresszorral szemben a vad típushoz viszonyítva (Tóth és mtsi., 2018). A KO és OE mutáns ellentétes fenotípusából arra következtethetünk, hogy a génnek szerepe lehet a gomba sejtfal felépítésének szabályozásában.

A CPAR2_109520^{OE} törzs egyedül SDS jelenlétére volt érzékeny közepes mértékben (4. táblázat, 5. ábra). Hasonló redukált növekedést jegyeztek fel ugyanezen gén deléció párvának vizsgálata során *C. parapsilosis* fajban (Holland és mtsi., 2014). A vizsgált gén ortológja egy transzkripció korepresszor fehérjét kódoló gén (*CaTUP1*), ami képes gátolni a *C. albicans* fonalas növekedését (Braun és Johnson, 1997).

6.4.2. Az OE mutáns törzsek pszeudohifaképzésének és morfológiájának vizsgálata

A *C. parapsilosis*, szemben a *C. albicans* fajjal, nem képez valódi hifát, azonban az élesztő formán túl az úgynevezett pszeudohifa morfológia kialakítására képes lehet. A kétféle fonalas forma felépítésében ugyan eltérést mutat, azonban hasonló funkciót látnak el. A morfológiaváltás képessége, vagyis az élesztő és fonalas képletek közötti reverzibilis átalakulás fontos virulencia tulajdonsága lehet egy patogén gombának. A fonalas forma felelős a gomba felületének növeléséért és hatékonyabb adhéziójáért abiotikus és biotikus felületeken egyaránt, így megkönnyítve annak terjedését és biofilmképzését. Ez utóbbi pedig elősegíti a gomba további kolonizációját és invázióját a gazdaszervezetben. A gomba méretének növelése révén további előnyre tehet szert a gazda immunsejtjeivel szemben, hogy elkerülje a sejt általi fagocitózist (Thompson és mtsi., 2011). A morfológiaváltásért felelős géneket *C. albicans* fajban géndeléció és génexpresszió vizsgálatok során részletesen feltárták, további kísérletek pedig fényt derítettek arra, hogy ebben a fajban a hifaképzés szabályozása filogenetikailag konzervált tulajdonság, ellentétben egyéb vizsgált *Candida* fajokkal (*C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondii*, *C. dubliniensis*) (Lackey és mtsi., 2013; O'Connor és mtsi., 2010).

Ismeretes, hogy a morfológiaváltásban szerepet játszó géneket számos faktor indukálhatja, ezek közül is a legfontosabbak a gazda szérum komponensei *C. albicans* faj esetében (Ene és mtsi., 2012). A dimorfizmus vizsgálatok során YPD, illetve magzati borjú szérummal kiegészített DMEM tápoldatot alkalmaztunk, mint indukáló közeget, az inkubáció pedig 37 °C-on, 5% (V/V) CO₂ mellett történt. A mintákat 24 és 48 óra elteltével

vizsgáltuk. Első lépésként fénymikroszkópos megfigyelést végeztünk a szembetűnő morfológiai változások kiszűrése érdekében, majd áramlási citométerrel monitoroztuk az egyes mutánsok pszeudohifa képzésének hatékonyságát. A kísérletet egy alkalommal végeztük el, három technikai párhuzamos mintával. Sem a fénymikroszkópos, sem az áramlási citométerrel végzett kísérletek során nem tapasztaltunk fenotípusbeli varianciát a mutáns törzsek és a vad típusú törzs összehasonlításakor (7. sz. melléklet).

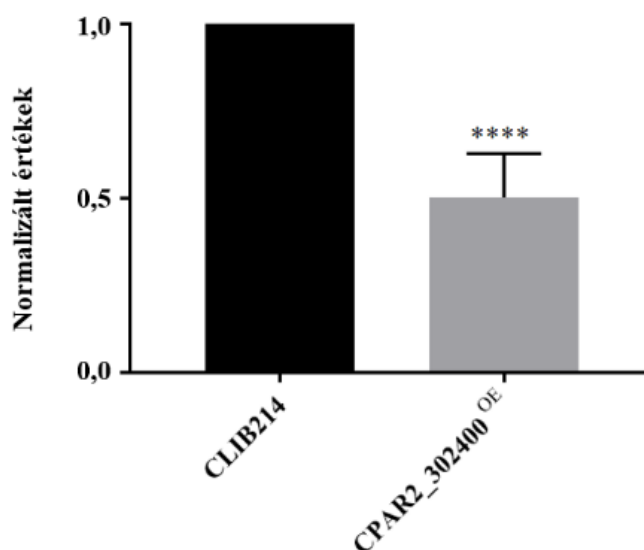
Az általunk vizsgált gének közül kettő esetében találtak eltérő pszeudohifa formációt a KO könyvtár vizsgálata során (Tóth és mtsi., 2018). A *CPAR2_501400* géndeléciós törzs esetében pszeudohifaképzés nem volt kimutatható, míg a *CPAR2_200390* deléciós törzs hosszabb fonalakat képzett, amelyek pehelyszerűen egymáshoz tapadtak és aggregátumokat képeztek. A *CPAR2_501400* gén ortológjának vizsgálatakor *C. albicans*-ban szintén fonalas forma képzési defektust tapasztaltak a deléciós mutánsban (Mora-Montes és mtsi., 2007).

6.4.3. Az OE mutáns törzsek biofilmképzésének vizsgálata

A letapadás és a morfológiaváltás képessége elősegíthetik, illetve erősíthetik a patogén gombafajok biofilmképzését, ezáltal pedig virulencia tulajdonságait. A *C. parapsilosis* képes megtapadni és biofilmet képezni különféle orvosi eszközök felületén, ezáltal pedig akár nozokómiális szisztémás fertőzések kialakítására is képes lehet (Trofa és mtsi., 2008). Holland és munkatársai kutatásai révén fény derült arra, hogy a *C. albicans* és a *C. parapsilosis* biofilmképzésében eltérő gének vesznek részt. Míg a *CZF1*, *UME6*, *CPH2* és *GZF3* gének a fő regulátorai a *C. parapsilosis* biofilmképzésének, addig *C. albicans* esetében a *BRG1* és a *TEC1* gének bizonyultak a folyamat központi szabályozó elemeinek (Holland és mtsi., 2014; Nobile és mtsi., 2012). Kuhn és munkatársai a *C. albicans* és a *C. parapsilosis* biofilmjének összehasonlítása során megállapították, hogy az előbbi faj komplexebb, több rétegből álló biofilmet alkot jelentős mennyiségű hifaképzés mellett, míg a *C. parapsilosis* biofilmjét főleg aggregálódott élesztő sejtek alkotják (Kuhn és mtsi., 2002).

Korábbi transzkriptomikai és KO könyvtáranalízis vizsgálatok eredményeire alapozva szeretnénk volna a választott gének túltermelésének szerepét vizsgálni biofilmet indukáló körülmények között. Az egyes mutáns törzsek biofilmképző képességét minimál tápközegben, 37 °C-on, 5% (V/V) CO₂ tartalom mellett vizsgáltuk, metabolikus aktivitásuk

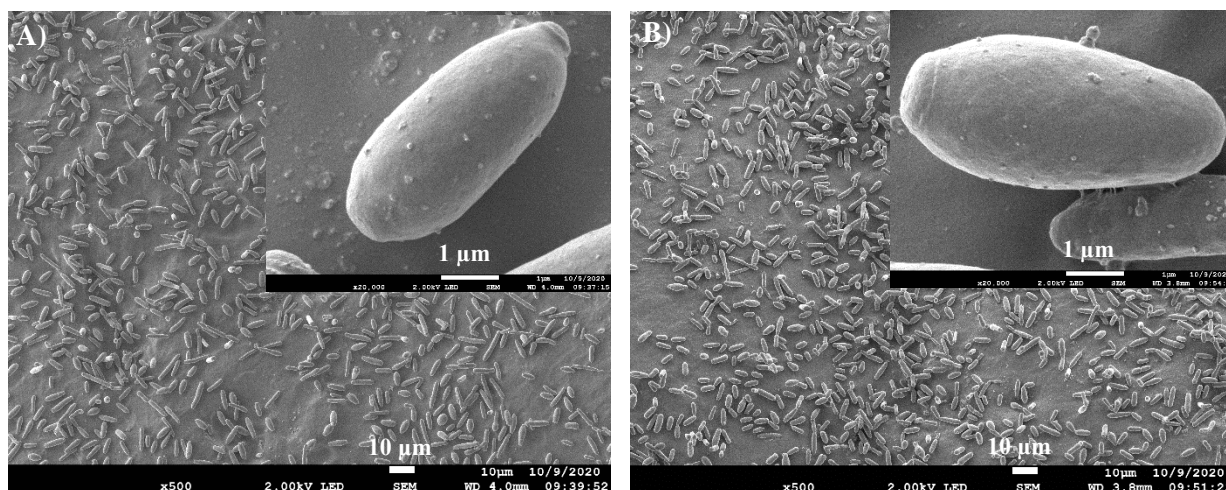
mérésével. A letapadt és életképes sejtek aktív metabolizmussal rendelkeznek és oxidoreduktáz enzimeik segítségével képesek bontani az életképesség monitorozására alkalmazott MTT-t, mely reakció során formazán csapadék keletkezik. A csapadékot DMSO-ban oldottuk, majd spektrofotométerrel mértük az egyes mintahelyek optikai denzitását 540 nm hullámhosszon. A magasabb OD₅₄₀ érték több életképes sejt jelenlétére utalt, amit hatékonyabb biofilmképzési hatékonyságnak tekintettünk. Kísérleteink során a 37 mutáns törzs közül egy esetben találtunk eltérő biofilmképzési képességet a vad típusú törzshöz viszonyítva (8. sz. melléklet). A CPAR2_302400^{OE} szignifikánsan alacsonyabb metabolikus aktivitást mutatott az általunk alkalmazott modellrendszerben, így feltételezzük, hogy a génnek szerepe lehet a faj adhéziójának és biofilmképzésének szabályozásában (6. ábra). Ennek megállapítására azonban további génspecifikus tesztek szükségesek. A deléciós mutáns törzs nem mutatott eltérő fenotípust hasonló kísérleti körülmények között *C. parapsilosis* gombában (Tóth és mtsi., 2018).



6. ábra. Biofilmképzési hatékonyság vizsgálata. Az egyes OE mutánsokat tartalmazó mintahelyek OD₅₄₀ értékeit mértük spektrofotométer segítségével, amelyeket az értékelés során a CLIB214 vad típusú törzs adataihoz normalizáltunk. A kísérleteket 3 alkalommal ismételtük, 8-8 párhuzamos mintával mind a 37 mutáns esetében. Statisztikai analízisként egyszempontos varianciaanalízist alkalmaztunk (one-way ANOVA, Dunnett próba, **** $P < 0,0001$).

6.4.3.1. A CPAR2_302400^{OE} törzs biofilmképzésének szilikon korongon történő SEM mikroszkópos vizsgálata

A CPAR2_302400^{OE} mutáns volt az egyetlen mutáns, amely megváltozott biofilmképzési hatékonyságot mutatott az általunk alkalmazott metabolikai vizsgálat során. A kontroll CLIB214 törzshöz képest csökkent metabolikus aktivitást, vagyis gyengébb biofilmképzést tapasztaltunk a mutáns esetében. Az eredmények alapján feltételeztük, hogy a mutáns egyúttal gyengébb adhéziós képességgel rendelkezhet a referencia törzshöz viszonyítva, ezért ezt az OE törzset további kísérletbe vontuk be, hogy fényt derítsünk az általa képzett biofilm természetére. A teszt során szilikon felületet alkalmaztunk, amely az orvosi katéterek alapanyaga, ezzel jobban modellezve a kórházi környezetben való megtapadás körülményeit. Meglepő módon, a kísérlet során hasonló sejtmennyiséget tapasztaltunk az OE és a referencia törzs minták esetében a korongok felületén. Mindkét minta esetében láthatóak voltak a kezdeti biofilmképzésre utaló jelek (Dr. Farkas Attila szóbeli közlése), mint a poliszacharid molekulák exkréciója a sejtek felületén, illetve a sejtek egymáshoz és a felülethez való kitapadása mikrofilamentumokon keresztül (7. ábra).



7. ábra. Szilikon korongon történő biofilmképzés SEM mikroszkópos vizsgálata. A CLIB214 törzs (A) és a CPAR2_302400^{OE} mutáns törzs (B) biofilmképzés vizsgálata során készült SEM felvételek.

Egyik esetben sem tapasztaltunk jelentős pszeudohifaképződést. Biofilmképzése során a sejtek különféle molekulákat választanak ki a környezetükbe, ez a keletkező mátrix anyag segíti a sejtek letapadását, védelmi szereppel is rendelkezik a gazda immunsejtjei és antimikrobiális anyagokkal szemben, valamint tápanyagok felhalmozásában is szerepet játszhat (Blankenship és Mitchell, 2006; Silva és mtsi., 2011).

6.4.4. Az OE mutáns törzsek echinokandinokkal szembeni érzékenységeinek vizsgálata

Az echinokandinok a klinikai gyakorlatban elsődlegesen alkalmazott antifungális terápiás szerek candidémiás megbetegedések kezelésére. A *C. parapsilosis* izolátumok általában kevésbé érzékenyek ezen típusú gombaellenes hatóanyagokkal szemben más *Candida* fajokhoz viszonyítva (Pfaller és Diekema, 2007; Papp és mtsi., 2018; Barchiesi és mtsi., 2006). Egy lehetséges magyarázat a jelenség okára, hogy a *C. parapsilosis* izolátumok hajlamosak pontmutációk felhalmozására az antifungális szer rezisztenciában szerepet játszó fehérjéket kódoló gének bizonyos kritikus régióiban (Tóth és mtsi., 2019). Ezek a pontmutációk funkcionyeréses fenotípust alakíthatnak ki, így növelve a gomba echinokandinokkal szembeni ellenállóképességét (Pfaller, 2012; Schillig és Morschhäuser, 2013; Papp és mtsi., 2018). Azonban az antifungális szerekkel szembeni rezisztencia és a (hatékonyabb) fertőzőképesség nem feltétlenül állnak összefüggésben. Példaként Papp és munkatársai mikroevolúciós kísérletei szolgálnak, mely során számos antifungális szerre alakítottak ki magas toleranciával rendelkező törzseket szelekciós nyomás gyakorlása révén, majd vizsgálták a mutánsok virulencia tulajdonságait (Papp és mtsi., 2018). Eredményeik rávilágítottak, hogy a csökkent antifungális szer érzékenység párhuzamosan együtt járt a fertőzőképesség csökkenésével.

Annak érdekében, hogy megvizsgáljuk a választott gének által kódolt fehérjék túltermelésének hatását a gomba echinokandin típusú szerekkel szembeni érzékenységére, meghatároztuk a MIC (minimal inhibitory concentration - legkisebb gátló koncentráció) értékeket az anidulafungin, caspofungin és micafungin hatóanyagok esetében. Az OE törzsek egymással és az alkalmazott kontroll törzsekkel hasonló, illetve azonos MIC értékeket mutattak a vizsgált antifungális szerekkel szemben. 48 óra inkubáció után a MIC_{ANF} értéke 2-4 µg/mL volt a mutánsok és a *C. parapsilosis* kontroll törzsek esetében egyaránt, míg a

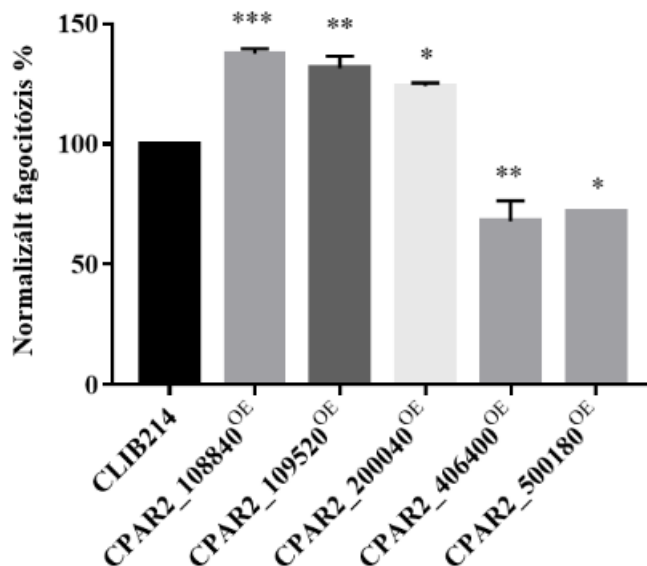
MIC_{CAF} és MIC_{MIF} értékek hasonlóan 1-2 µg/mL voltak. A *C. krusei* kontroll törzs érzékenyebbnek bizonyult mindhárom szer esetében (MIC_{ANF}: 0,125-0,25 µg/mL; MIC_{CAF}: 0,5 µg/mL; MIC_{MIF}: 0,25 µg/mL), amely összhangban van a faj ismert toleranciájával. A kísérletet egy alkalommal végeztük három technikai párhuzamos mintával. A kapott eredmények megfelelnek a szakirodalmi adatoknak, tehát egy esetben sem tapasztaltunk eltérő tűrőképességet a vizsgált hatóanyagokkal szemben (Cappelletty és Eiselstein-McKittrick, 2007; Pfaller és mtsi., 2008).

6.4.5. Az OE mutáns törzsek J774.2 egér monocita sejtek általi fagocitózisának vizsgálata

A fagocitózisra képes sejtek a veleszületett immunrendszer azon komponensei, amelyek az elsők között veszik fel a harcot a gazdát megfertőző kórokozókkal szemben. Ezek a neutrofil granulociták, monociták és makrofágok. A makrofágok fontos védelmi vonalat jelentenek a patogén gombák ellen azáltal, hogy monocitaként a véráramból kilépve a fertőzés helyére áramlanak, ahol differenciálódást követően megkezdik a gombasejtek bekebelezését, majd eliminálását, valamint az antigének prezentációját. Aktivációjuk során citokineket és kemokineket termelnek és szekretálnak, amelyek az adaptív immunrendszer sejtjeit riasztják és aktiválják (Shoham és Levitz, 2005; Balish és mtsi., 1993; Brown, 2011; Qin és mtsi., 2016; Netea és mtsi., 2015). Egy sikeres patogénnek tehát előnyére válhat, ha az említett mechanizmusok ellen védelmi válaszreakciót alkalmaz. A veleszületett immunrendszer gombainvázio elleni válaszreakciójának a következő lépései ismertek: felismerés, felvétel, fagoszóma érés, lízis és ölés. Ezen lépések során a patogén organizmus számos mechanizmus útján kerülheti el a makrofágok általi endocitózist (Brown, 2011; Höfs és mtsi., 2016; García-Rodas és mtsi., 2011; Ellerbroek és mtsi., 2004).

Annak céljából, hogy megvizsgáljuk az általunk létrehozott mutánsok interakcióját makrofág sejtekkel, *in vitro* fagocitózis modellrendszert alkalmaztunk. Az egyes gombatörzseket fluoreszcensen jelöltük és külön-külön inkubáltuk J774.2 egér makrofág sejtekkel 1 órán keresztül, 37 °C-on, 5% (V/V) CO₂ tenzió mellett. A fagocitózis hatékonyságát áramlási citométerrel való mérés során határoztuk meg az egyes mutáns törzsek esetében. A fagocitózis aktivitást %-ban adtuk meg a CLIB214 vad típusú törzs

értékeire normalizálva, az ismételt kísérletek adatsorainak összehasonlíthatósága érdekében. A kísérlet során összesen 5 mutáns törzs esetében tapasztaltunk szignifikáns eltérést a makrofág sejtek endocitózis értékeiben a kontrollhoz viszonyítva. Három törzs esetében (CPAR2_108840^{OE}, CPAR2_109520^{OE}, CPAR2_200040^{OE}) növekedett, míg kettő esetében (CPAR2_406400^{OE}, CPAR2_500180^{OE}) csökkent fagocitózis százalékot tapasztaltunk (8. ábra).



8. ábra. A mutáns törzsek fagocitózisának vizsgálata *in vitro* J774.2 egér fagocitákkal való interakció során. A kísérletet 3 alkalommal ismételtük. Statisztikai analízisként egyszempontos varianciaanalízist alkalmaztunk (one-way ANOVA, Dunnett próba, * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$).

Az *ScSPS1* gén (a *CPAR2_108840* gén ortológja) feltehetően egy szerin/treonin kináz fehérjét kódol és a *S. cerevisiae* spóráképzésének szabályozásában lehet szerepe (Percival-Smith és Segall, 1986). A gén szerepét virulenciához köthető folyamatokban még nem vizsgálták, így ezzel kapcsolatos információ nem áll rendelkezésünkre. A CPAR2_109520^{OE} mutáns esetében is emelkedett fagocitózis %-ot tapasztaltunk, vagyis a makrofágok nagyobb eséllyel tudták bekebelezni ezt a törzset. Egy korábbi tanulmányban vizsgálták az ortológ gén (*CaTUP1*) szerepét *C. albicans* virulencia folyamatainak szabályozásában, és a gén deléciós mutáns tesztelése során redukált adhéziót, inváziós képességet és sejtkárosítást tapasztaltak orális laphámsejtekkel való inkubáció során (Wächtler és mtsi., 2011). Továbbá

a mutáns törzs abnormalis telepmorfológiát és nagyobb mértékű hifaképzést produkált a szülői törzshöz viszonyítva (Zhao és mtsi., 2002; Braun és Johnson, 1997; Hu és mtsi., 2002; Noble és Johnson, 2005; Murad és mtsi., 2001). A CPAR2_200040^{OE} mutáns esetében szintén emelkedett fagocitózis %-ot detektáltunk, így kijelenthetjük, hogy a makrofágok nagyobb hatékonysággal tudták fagocitálni ezt a mutáns törzset, mint a kontroll típust. A gén ortológjának funkciója nem ismert, és nincsen információnk korábbi J774.2 makrofág sejtvonallal való vizsgálatból származó eredményekről. A CPAR2_406400^{OE} mutáns az eredmények alapján nagyobb eséllyel volt képes elkerülni a makrofágok általi bekebelezést. Az ortológ gén *ScRPA12* az RNS polimeráz I enzim alegységét kódolja *S. cerevisiae* élesztőben (Nogi és mtsi., 1993). Az ortológ fehérje funkcióját korábban a sejt méretének szabályozásához köötték *C. albicans* gombában (Chaillot és mtsi., 2017). A CPAR2_500180^{OE} törzset szintén kisebb mértékben voltak csak képesek fagocitálni az egér monocita sejtek. Az ortológ gén (*ScKIN3*) által kódolt fehérje egy nem esszenciális szerin/treonin kináz, amelynek szerepe lehet a DNS károsodás indukálta válaszreakcióban (Jones és Rosamond, 1990; Moura és mtsi., 2010; Pais és mtsi., 2013). A gén túltermelése csökkent növekedési képességet és abnormalis sejtmorfológiát és sejtciklust eredményezett *S. cerevisiae* élesztőben (Sopko és mtsi., 2006). Tehát a gén túltermelése negatívan befolyásolta az élesztő virulencia tulajdonságait, míg saját vizsgálataink során az ortológ konstitutív kifejeződése *C. parapsilosis* fajban előnyt jelentett a fagocitózis elkerülésében.

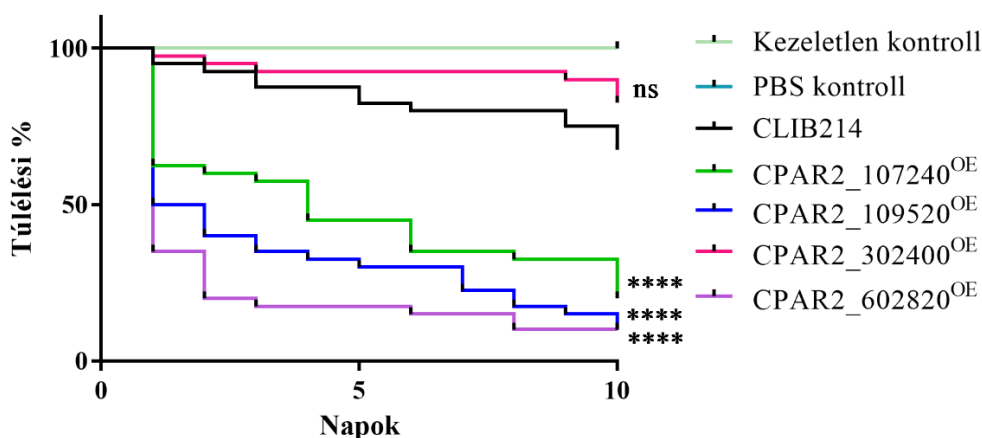
Fontos kihangsúlyozni, hogy jelen kísérletben az említett folyamatok közül a felismerés és felvétel fázisaiban történt gazda-patogén interakció eredményét tudtuk monitorozni. Az endocitózis folyamatában az első meghatározó lépés a patogén bizonyos sejtalkomponenseinek felismerése. A patogén részéről tehát jó taktika lehet a sejtfallal specifikus összetevőinek elrejtése, esetleg morfológiájának megváltoztatása (Brown, 2011). Eredményeink tükrében feltételezhetjük, hogy a megfigyelt fagocitózis hatékonyságot érintő változások az egyes mutánsok sejtfallal elemeinek megváltozása miatt történhettek.

6.4.6. Az OE mutáns törzsek virulencia vizsgálata *in vivo* *Galleria mellonella* modellszervezetben

A mutánsok virulenciáját a lárvák túlélési görbéjének felvételével vizsgáltuk 10 napos intervallumban. A *G. mellonella* lárva esetében a melanizáció percekben belül megtörtént a *C. parapsilosis* fertőzés hatására, azonban a CPAR2_302400^{OE} mutáns esetében nem tapasztaltuk ezt a reakciót, továbbá a lárvák pusztulása is itt mutatta a legalacsonyabb értéket. A többi vizsgált OE törzs esetében tapasztaltunk melanizációt, és három mutánssal (CPAR2_107240^{OE}, CPAR2_109520^{OE}, CPAR2_602820^{OE}) fertőzött lárva populációnál gyorsabb és magasabb számú elhullást tapasztaltunk, mint a referencia törzsnél (9. ábra). A többi esetben a CLIB214 kontrollhoz hasonló, szignifikáns eltérést nem mutató lárvapusztulást jegyeztünk fel. Negatív kontrollként 1x PBS oldattal injektált állatokat használtunk, illetve az abszolút életképesség kontrolljaként minden beavatkozástól mentes egyedeket is alkalmaztunk, hogy kizárható legyen az állatok rossz minőségéből vagy magából a rosszul kivitelezett kezelésből adódó esetleges halálozás. Utóbbi két kontroll csoportban egyetlen esetben sem tapasztaltunk 10 napnál korábbi elhullást.

A *CaKTR4/MNT4* gén (a CPAR2_107240 gén ortológja) által kódolt fehérje mannozil transzferázként lett azonosítva *C. albicans*-ban, amelynek szerepe van az N-kötött glikoziláció folyamatában és a sejtfal regenerációjában (Mora-Montes és mtsi., 2010). Géndeléciós vizsgálatok során fény derült rá, hogy a gén része egy 5 tagból álló *MNT* (alpha-1,2-mannosyl transferase) géncsaládnak. A géncsalád tagjai képesek átvenni, illetve helyettesíteni egymás szerepét (redundáns gének), hiszen a szimpla mutánsok nem, míg a több génre nézve deléciós mutánsok számos sejtfalat érintő defektussal rendelkeztek (Mora-Montes és mtsi., 2010). A CPAR2_109520^{OE} mutáns is nagyobb számban volt képes elpusztítani a lárvákat, tehát hatékonyabb fertőzőképességet mutatott kísérleteink során. A mutáns az életképesség kísérlet (6.4.2.) során redukált növekedést mutatott SDS jelenlétében, a fagocitózis vizsgálat (6.4.6.) során pedig a makrofágok nagyobb hatékonysággal tudták fagocitálni ezt a törzset. A *C. albicans* géndeléciós mutáns ellentétes, vagyis kevésbé hatékony virulencia tulajdonsággal rendelkezett *in vitro* rendszerben vizsgálva (Wächtler és mtsi., 2011). A CPAR2_602820 ortológ génje (*CaFCAI*) egy citozin deamináz fehérjét kódol (Erbs és mtsi., 1997; Marcus és mtsi., 2004). Az ortológ gén gazda-patogén interakcióban

való részvételéről és szerepéről nincs információnk. A CPAR2_302400^{OE} mutáns által fertőzött lárvák rendelkeztek a legmagasabb túlélési képességgel, habár szignifikáns eltérést nem mutattak a vad típushoz képest, bennük azonban melanizáció sem indukálódott a fertőzés hatására. A CPAR2_302400^{OE} mutáns törzs fitnessze a korábbi kísérletekben az alkalmazott sejtfal, illetve membránkárosító vegyületek mindegyikének hatására csökkent, mint a KF és KV, koffein és SDS, továbbá redukált biofilmképzési hatékonyságot mutatott. Az *in vivo* eredmények tükrében feltételezzük, hogy a CPAR2_302400 gén túltermelése olyan folyamatokat indukálhat a gombában, amelynek következtében a lárva számára veszélytelenné válhatnak.



9. ábra. Az *in vivo* *G. mellonella* fertőzés kísérleti eredményei. A kísérletet 3 ismétlésben végeztük, 20-20 lárvát használva mintánként. A 3 teszt átlagolt napi túlélési %-át ábrázoltuk 10 napos intervallumban. A kezelést nem kapott és a PBS kontroll minták görbéi átfednek, hiszen egyik esetben sem történt 10 napnál korábbi pusztulás. A túlélési adatok statisztikai elemzéséhez Mantel-Cox (Log-rank) tesztet alkalmaztunk (**** $P < 0,0001$; ns: nem szignifikáns).

6.4.7. A kiválasztott mutáns törzsek bizonyos sejtfalkomponenseinek vizsgálata

A korábbi eredményeket alapul véve kiválasztottunk 8 OE törzset (CPAR2_107240^{OE}, CPAR2_108840^{OE}, CPAR2_109520^{OE}, CPAR2_200040^{OE}, CPAR2_302400^{OE}, CPAR2_406400^{OE}, CPAR2_500180^{OE}, CPAR2_602820^{OE}), amelyeken sejtfalkomponens analízist végeztünk el. A korábbi kísérletek során vizsgált, virulenciában

szerepet játszó tulajdonságok mindegyikére hatással lehet, ha csak részben is, a gomba egyes sejtfa alkotóelemeinek minőségi és mennyiségi megváltozása. Tehát indokoltnak tartottuk a vad típusú törzshöz képest eltérő fenotípust mutató mutánsok bizonyos sejtfa komponenseinek vizsgálatát, amelyet az adott molekulára specifikus fluoreszcens festékkel jelöltünk, majd detektáltunk. A 8 mutáns törzs három különböző sejtfa komponensének arányát vizsgáltuk fluoreszcens mikroszkóp és áramlási citométer segítségével. A három vizsgált összetevő a kitin (kalkofluor fehér), az elszórtan található kitin oligomer molekulái (WGA-FITC) és a sejtfa felszínén található mannoproteinek (ConA-FITC) voltak. A kísérletet egy alkalommal végeztük. Kísérleteink során nem találtunk eltérést sem a komponensek eloszlásában, sem pedig mennyiségében a kontroll törzshöz viszonyítva (9. sz. melléklet).

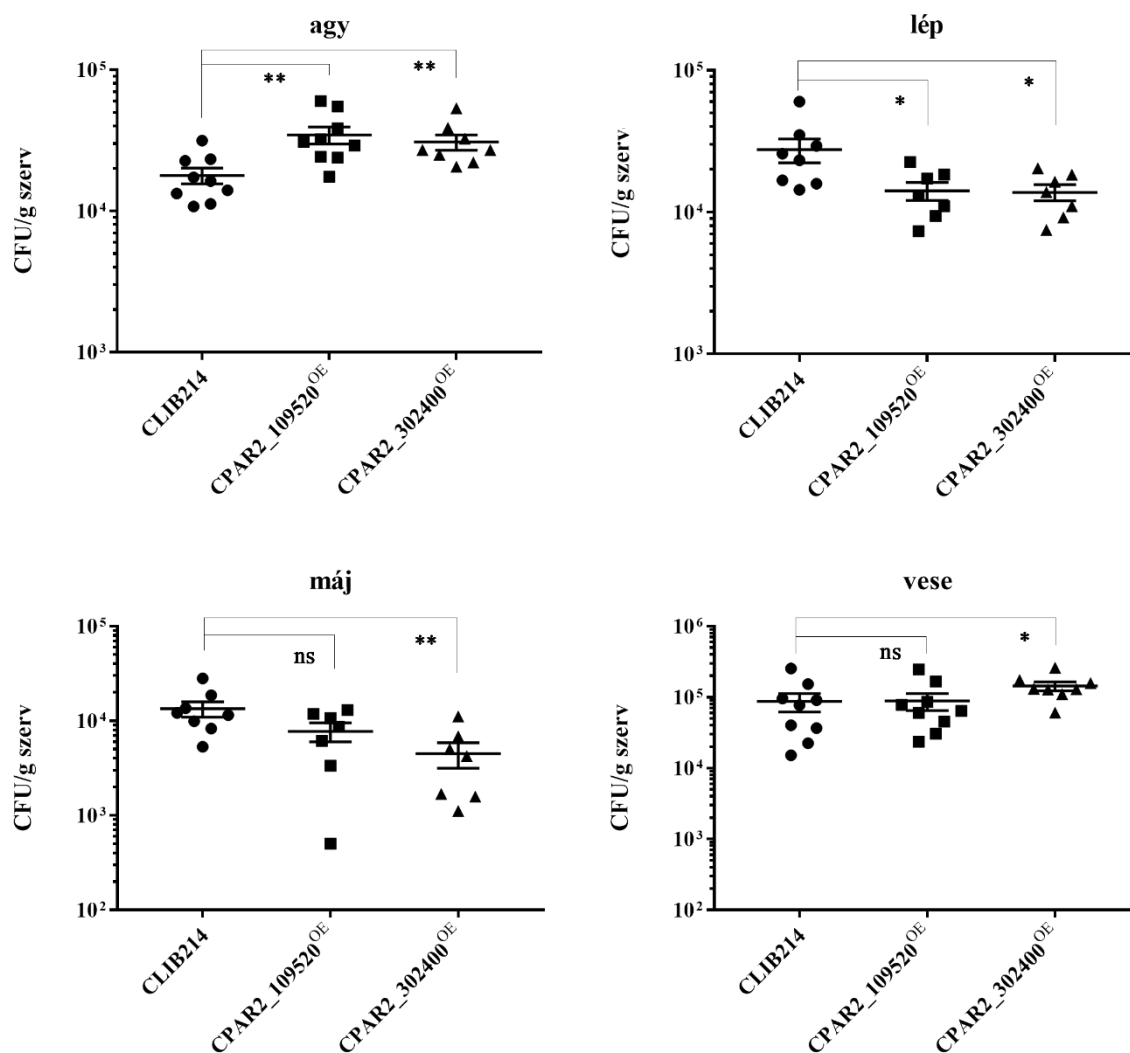
6.4.8. A CPAR2_109520^{OE} és CPAR2_302400^{OE} mutáns törzsek virulencia vizsgálata *in vivo Mus musculus* modellrendszerben

A további *in vivo* virulencia vizsgálatokhoz a *G. mellonella* kísérlet eredményei alapján választottuk ki a CPAR2_109520^{OE} mutáns törzset, mivel nagymértékben csökkentette a lárvák túlélését a vad típusú törzshöz képest. A CPAR2_302400^{OE} törzs ugyan szignifikáns mértékben nem mutatott eltérést a referencia törzshöz viszonyítva, azonban a legkisebb számú pusztulást okozta a fertőzött lárva populációban, valamint melanizációt sem indukált, ezért redukált fertőzőképességű mutánsnak tekintettük és bevontuk az egérfertőzés kísérletbe.

Az egereket a fertőzés után 3 nappal túlaltattuk, szerveiket (agy, lép, vese, máj) izoláltuk és meghatároztuk az egyes szervekben akkumulálódott élőcsíraszámot (CFU). A CFU értékek az egyes szervekben eltéréseket mutathatnak, mivel a vizsgált szervek eltérő szöveti és keringési felépítéssel rendelkeznek, így feltételezhető, hogy az állat immunrendszerének elemei ennek megfelelően különböző mértékben képesek eliminálni az adott gombát.

A CPAR2_302400^{OE} mutáns vizsgálata során magasabb CFU értékeket tapasztaltunk az agy és vese szövetekben, míg ez a szám alacsonyabbnak bizonyult a lép és máj szövetek elemzése során. A CPAR2_109520^{OE} törzs szintén magasabb CFU szintet mutatott az agy

szövetben, míg alacsonyabbat a lép szövetben. Vese és máj szövetekben nem tapasztaltunk szignifikáns CFU értékbeli eltérést a CLIB214 törzs adataihoz viszonyítva (10. ábra).

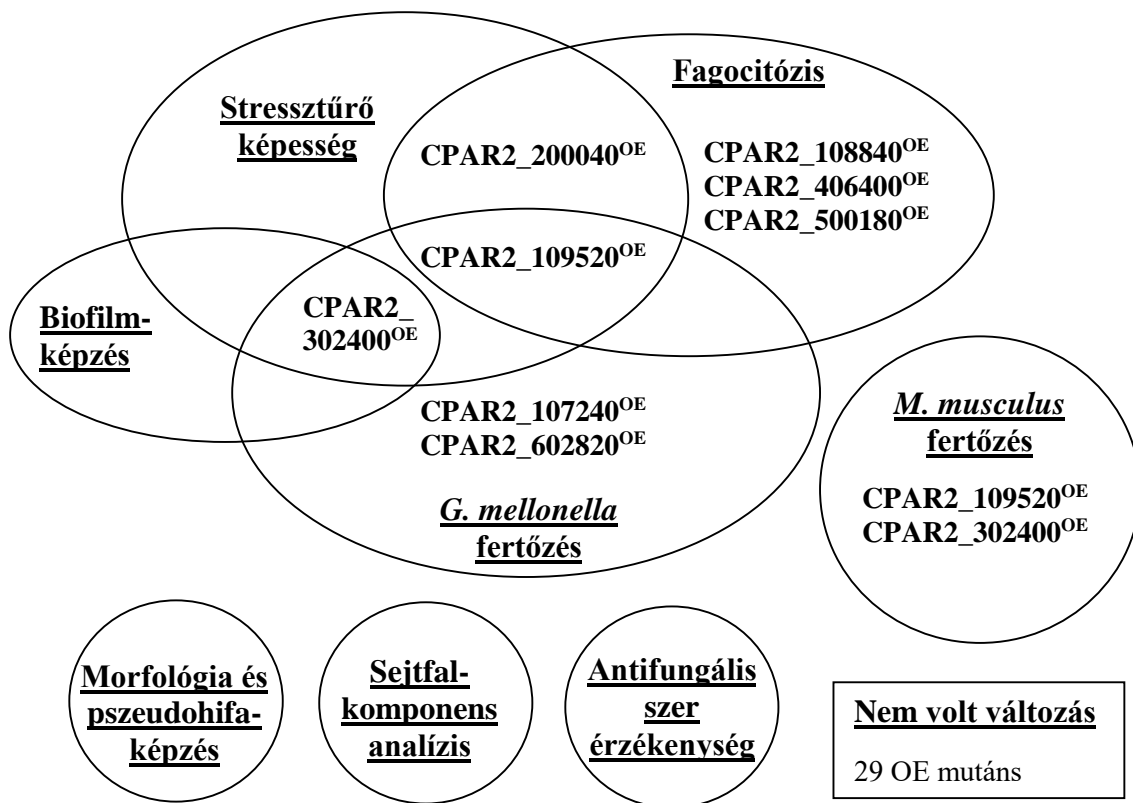


10. ábra. Az egyes egérszervekben felhalmozódott gombasejtek száma 3 nappal a fertőzést követően. Az ábrák a különböző szövetekben (agy, lép, máj, vese) meghatározott CFU értékeket mutatják az adott szövet 1 g mennyiségére vonatkoztatva. Az állatokat 2×10^7 gombasejtet tartalmazó szuszpenzióval fertőztük 100 μ L végtérfogatban oldalsó farki vénájukon keresztül, majd három nap elteltével termináltuk őket. A kísérletet 2 ismétlésben végeztük, gombatörzsenként 4-5 állat bevonásával. Az adatok statisztikai kiértékeléséhez Mann-Whitney próbát alkalmaztunk (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; ns: nem szignifikáns).

6.5. A kísérleti eredmények összefoglalása és összevetése szakirodalmi adatokkal

Jelen munkánk során célunk volt egy OE mutáns gyűjtemény létrehozása és széles körű karakterizálása a *C. parapsilosis* opportunista humánpatogén gomba virulenciában szerepet játszó génjei után kutatva. Vizsgáltuk a létrehozott, 37 különböző gént overexpresszáló mutáns törzs stressztűrő, morfológiaváltás és biofilmképző képességét, valamint gazda-patogén interakcióban való részvételét *in vitro* fagocitózis és *in vivo* *G. mellonella* lárva és egérfertőzés modellben. Kísérleteink során összesen 8 mutáns törzs esetében tapasztaltunk eltérő fenotípust az alkalmazott kontroll törzsekhez viszonyítva. A CPAR2_109520^{OE} és CPAR2_302400^{OE} mutánsok egyaránt 3-3 kísérletben (stressztűrés, *G. mellonella* fertőzés, illetve fagocitózis/biofilmképzés kísérletek), valamint az egérfertőzés során mutattak eltérő fenotípust a CLIB214 vad típusú kontroll törzshöz hasonlítva. A CPAR2_200040^{OE} törzs 2 kísérletben (stressztűrő képesség és fagocitózis vizsgálatok), míg a további 5 mutáns (CPAR2_107240^{OE} - lárva fertőzés; CPAR2_108840^{OE} - fagocitózis; CPAR2_406400^{OE} - fagocitózis; CPAR2_500180^{OE} - fagocitózis; CPAR2_602820^{OE} - lárva fertőzés) 1-1 vizsgálatban mutatott megváltozott tulajdonságot a referencia értékhez képest (11. ábra). A következő kísérletek értékelése során nem találtunk a vad típustól különböző értékeket: morfológia, morfológiaváltás, illetve pszeudohifaképzés, antifungális szer érzékenység, sejtfal felépítő elemeinek vizsgálata (11. ábra).

Az elmúlt években az általunk vizsgált 37 *C. parapsilosis* gén közül Cillingová munkásságának köszönhetően fény derült 3 gén funkciójára (Cillingová és mtsi., 2017). A CPAR2_100460 (*CpHBT4*), a CPAR2_100470 (*CpHBT3*) és a CPAR2_204840 (*CpHBT2*) géneket hidroxibenzoát transzporterekként azonosították. A *CpHBT4* génre deléciós mutáns törzs toleráns volt a koffein jelenlétére a táptalajban és megváltozott érzékenységet mutatott a caspofungin antimikrobiális szerre, míg saját kísérleteink során egyik vizsgált körülmény mellett sem találtunk eltérő fenotípust a párhuzamos OE mutáns esetében. A további vizsgált gének közül 18 ortológ gén szerepe ismert *S. cerevisiae*-ben, valamint 15 ortológ gén szerepe ismert *C. albicans*-ban. A CPAR2_200040 gén esetében az ortológok funkciója nem ismert az említett gombafajokban (3. sz. melléklet).



11. ábra. A kísérleti eredményeket összesítő Venn diagramm. Vizsgálataink során 8 mutáns esetében tapasztaltunk megváltozott fenotípust a CLIB214 vad típusú kontrollhoz képest, míg 29 mutáns esetében nem találtunk eltérő fenotípust.

Annak érdekében, hogy a kapott eredményeket elhelyezzük a szakirodalomban, az OE mutáns gyűjtemény elemzése során nyert saját adatainkat összevetettük az általunk választott génekkel azonos vagy azok ortológjának vizsgálatára irányuló korábbi KO (illetve OE) könyvtáranalízisből származó eredményekkel (10. sz. melléklet). Az azonos KO és OE mutánsok fenotípusának összehasonlításakor háromféle eredményt kaphatunk. Megfigyelhetünk ellentétes fenotípust a két mutáns esetében, ezek lehetnek hipo- vagy hiper-morfak, vagyis az adott tulajdonság lehet alul vagy felülreprezentált (-/+; +/-). Hasonló fenotípusokat is megfigyelhetünk az adott gén deléciója vagy konstitutív expressziója révén (-/-; +/+; 0/0). A harmadik kategória amikor az egyik esetben nem tapasztalunk eltérést egy tulajdonságban, míg az ellentétes mutánsban észlelhető változás, ez akár lehet egy teljesen új (neomorf) tulajdonság megjelenése (-/0 vagy 0/-; +/- vagy 0/+) (Prelich, 2012). Az általunk vizsgált OE mutánsok közül 18 gén deléciós mutáns párja érhető el *C. parapsilosis*-

ban, ezek közül 11 Tóth és munkatársai (2018), 3 Holland és munkatársai (2014), 3 Cillingová és munkatársai (2017), illetve 1 Tóth és munkatársai (2018) és Holland és munkatársai (2014) munkásságához is kapcsolódik, amelyeket az általunk alkalmazott módszerekhez hasonlóan elemeztek (3. sz. melléklet). Az eredmények összehasonlítása Tóth és munkatársai (2018) esetében releváns, mivel az adott KO és OE mutánsok azonos genetikai háttérrel rendelkeztek az alkalmazott közös szülői törzsnek köszönhetően.

A *CPAR2_109520* gént túltermelő mutáns törzs volt az egyik, amelyik 4 kísérletben (stressztűrés, fagocitózis illetve *G. mellonella* és *M. musculus* fertőzés kísérletek) is megváltozott fenotípussal rendelkezett (10. sz. melléklet). A gén ortológja (*CaTUP1*) egy transzkripciós korepresszor funkcióval rendelkező fehérjét kódol *C. albicans*-ban, és gátolja a gomba fonális növekedését (Braun és Johnson, 1997). Az általunk vizsgált OE törzs csökkent növekedési képességet mutatott a stressztolerancia vizsgálatok során SDS jelenlétében, a J774.2 makrofágok nagyobb mértékben voltak képesek fagocitálni, rovarlárva modellben pedig fertőzőbbnek bizonyult a vad típusú törzsnél. A parallel KO mutáns törzs szintén érzékeny volt SDS jelenlétére a tápközegben (Holland és mtsi., 2014). A *C. albicans* *TUP1* deléciós mutáns abnormális telepmorfológiával rendelkezett és emelkedett mértékben képzett fonális sejteket a referencia törzshöz képest (Braun és Johnson, 1997; Zhao és mtsi., 2002; Hu és mtsi., 2002; Murad és mtsi., 2001). Egy korábbi tanulmányban, ahol szintén vizsgálták a *C. albicans* *TUP1* gén deléciós mutáns virulenciához köthető tulajdonságait, csökkent adhéziós, inváziós és károsító képességet jegyeztek fel orális hámsejtekkel való interakció során (Wächter és mtsi., 2011). Habár saját kísérleteinket tekintve szintén csökkent virulenciát figyeltünk meg *in vitro* gazda-patogén interakció vizsgálata során, azonban a *CPAR2_109520*^{OE} mutáns fertőzőképesebb volt *in vivo* rovarlárva rendszerben vizsgálva. Szakirodalmi adatokra támaszkodva kijelenthetjük, hogy a makrofágok általi hatékonyabb endocitózis jelensége nem egyértelműen jelenti azt, hogy nagyobb százalékban lennének képesek elpusztítani az adott gombát, vagyis nem feltétlenül mondhatjuk ki ilyen esetekben, hogy az adott patogén alacsonyabb fertőzőképességgel bír. Tóth és munkatársai *in vitro* kísérletek során bizonyították, hogy a *C. parapsilosis* gomba képes túlélni a fagocita sejten és kiszabadulni, vagy akár elkerülni az endocitózist és a lízist különféle túlélési mechanizmusokon keresztül, mint például a szaporodás, pszeudohifaképzés, hidrolitikus enzimek termelése és a makrofág sejtek mitózisának gátlása (Tóth és mtsi., 2014).

Szintén négy kísérletben (stressztűrés, biofilmképzés illetve *G. mellonella* és *M. musculus* fertőzés kísérletek) megváltozott fenotípust mutató mutáns a CPAR2_302400^{OE} törzs volt (11. ábra, 10. sz. melléklet). Az ortológ gén egy DNS-hibajavító metiltranszferáz aktivitással rendelkező fehérjét (*ScMGT1*) kódol *S. cerevisiae* élesztőben (Sassanfar és Samson, 1990; Xiao és mtsi., 1991). A homozigóta deléciós mutáns jobb növekedést produkált kompetitív fitness vizsgálat során (Breslow és mtsi., 2008), biofilmképzési hatékonyságban viszont nem mutatott eltérést (Scherz és mtsi., 2014). Az *ScMGT1*-nek megfelelőített *C. albicans* null mutáns változatlan fenotípussal rendelkezett életképesség vizsgálatok során (Noble és mtsi., 2010), míg a *C. parapsilosis* deléciós törzs csökkent adhéziós képességet, de változatlan biofilmformációt mutatott (Tóth és mtsi., 2014). A CPAR2_302400^{OE} törzs volt az egyetlen, amely a kísérleteink során nem indukált melanizációt *G. mellonella* lárvában, holott a folyamat fontos szerepet tölt be a rovar idegen anyagok elleni védelmi válaszreakciójában, amelyet meg is figyeltünk a többi mutánsal való fertőzés során pár perccel közvetlenül az injektálás után. Ugyan a statisztikai analízis során a mutáns statisztikailag nem adódott virulensebbnek a vad típusú törzshöz viszonyítva, azonban esetében jegyeztük fel a legkevesebb lárvapusztulást. Fagocitózis hatékonyságában nem volt eltérés, azonban stressztűrő képességében és biofilmformációjában igen. A CPAR2_302400^{OE} mutáns fitnessze csökkent az összes tesztelt sejtfal- és membránkárosító anyag jelenlétében, mint a kalkofluor fehér, kongó vörös, SDS és koffein. Ez a mutáns törzs volt az egyetlen, amelynek életképességére hatással volt a koffein, és az általunk alkalmazott metabolikus aktivitás meghatározása alapján redukált biofilmképzési hatékonysággal rendelkezett. A biofilm segíti a patogén terjedését a gazdaszervezetben, miközben védelmet is nyújt a gombasejtek számára egyes antimikrobiális ágensekkel szemben, továbbá a gazda immunsejtjei általi felismerés ellen is védelmet nyújthat. A *C. parapsilosis* gyakran képez biofilmet orvosi eszközök felületén, így ez a tulajdonság egy fontos és releváns virulenciafaktora a gombának (Trofa és mtsi., 2008). Jelen tanulmány az első, amely bizonyította a CPAR2_302400 gén szerepét a gomba biofilmképzésének szabályozásában, ezáltal pedig összefüggésbe hozta a gént a *C. parapsilosis* faj patogenitásával.

További *in vivo* modellrendszert alkalmaztunk a választott mutáns törzsek virulencia tulajdonságának vizsgálatához. Két OE mutáns gombát választottunk az egér infekciós kísérlethez, a *G. mellonella* lárvá fertőzés során virulens és kevésbé virulens fenotípussal

rendelkező CPAR2_109520^{OE} és CPAR2_302400^{OE} törzseket. A *G. mellonella* és az egérfertőzésből származó kísérleti eredmények elemzése során információt nyerhetünk az egyes mutánsok eltérő inváziós képességéről, illetve az egér szervezetében működő gombaeliminációs mechanizmusok hatékonyságáról a különböző állati szövetekben. Az *in vivo* lárva kísérletből származó adatokra támaszkodva hasonló eredményt vártunk az egérfertőzés során az egyes mutánsokat tekintve, azonban az utóbbi esetében a CFU értékek eltérőek voltak a különböző szervek tekintetében, ami megnehezítette az eredmények interpretációját. A CPAR2_109520^{OE} mutáns egyedül az egér agyszövetében halmozódott fel nagyobb mértékben, míg a lépben erre kevésbé volt képes. A CPAR2_302400^{OE} gomba mind az agy-, mind pedig a vese szövetben nagyobb számban, míg a lép- és a májszövetben alacsonyabb mennyiségben volt jelen. Korábbi összehasonlító elemzések, amelyek a lárva és egérfertőzésből származó adatokat állították párhuzamba, hasonló eredményre jutottak, mint mi a jelen tanulmányban, vagyis, hogy a két modellállattal végzett kísérletből származó adatok nem minden esetben voltak összhangban egymással (Brennan és mtsi., 2002; Slater és mtsi., 2011; Amorim-Vaz és mtsi., 2015). Érdemes számításba venni, hogy jelen tanulmányban a két modellállattal végzett kísérletek eltérő jellegűek voltak, hiszen a lárva esetében túlélési görbét határoztunk meg, míg az egerek esetében meghatározott inkubációs idő (3 nap) letelte után a még jó kondícióban lévő állatokat túlaltattuk és vizsgáltuk a szerveiket. Meg kell említenünk azonban, hogy túlélési görbe felvételét célzó egér kísérlet számos NAC faj, ahogy *C. parapsilosis* esetében sem megoldható, mivel a faj nem okoz letális fertőzést egérben (Jacobsen, 2014). A *C. albicans* TUP1 null mutáns (CPAR2_109520 gén ortológ) csökkent virulenciát mutatott szisztémás egérfertőzés során (Murad és mtsi., 2001), egy másik tanulmányban pedig 30 nap után sem tapasztaltak pusztulást az azonos mutánssal való fertőzést követően szintén egér modellt alkalmazva (Bendel és mtsi., 2003). A *C. albicans* MGT1 (CPAR2_302400 gén ortológ) homozigóta deléciós mutáns esetében nem tapasztaltak kontrolltól eltérő fenotípust kompetitív egérfertőzés során (Noble és mtsi., 2010). A két *Candida* faj vizsgálata során tapasztalt eltérő eredmények alátámasztják a *C. parapsilosis* gombával végzett hasonló kísérletek fontosságát, és többféle modellorganizmus alkalmazásának szükségére hívják fel a figyelmet.

A CPAR2_107240^{OE} és CPAR2_602820^{OE} mutánsok egyaránt magasabb ölési hatékonysággal rendelkeztek *G. mellonella* lárva fertőzéses kísérletben (10. sz. melléklet). A

CaKTR4/MNT4 gént (a *CPAR2_107240* gén ortológja) *C. albicans* fajban azonosították mint mannozil transzferázt kódoló gént, amelynek szerepe van az N-kötött glikozilációban és sejtfal regenerációban (Mora-Montes és mtsi., 2010). A géndeléciós mutáns normális növekedési hatékonyságot, morfológiát és fitneszt mutatott több mutánssal végzett ún. kevert egérfertőzéses kísérletben (Noble és mtsi., 2010). A 2-3-4 vagy akár 5 *CaMNT1-2-3-4-5* gén kombinációjára nézve deléciós mutánsok eltérő sejtfalösszetétellel és megnövekedett érzékenységgel rendelkeztek KF és SDS sejtfalkárosító ágensekkel szemben, mivel a szimpla null mutánsok nem mutattak eltérő fenotípust, így feltételezhetően az *MNT* gének redundáns funkcióval bírnak a *C. albicans* gombában (Mora-Montes és mtsi., 2010). A sejtfal összetételének megváltozása egyúttal okozhatja a gomba gazdával való interakciójának megváltozását is (Mora-Montes és mtsi., 2010). A *CPAR2_602820* ortológ génje (*CaFCA1*) egy citozin deamináz fehérjét kódol, az enzim a pirimidin szerkezettel rendelkező molekulák hasítását végzi (Erbs és mtsi., 1997; Harcus és mtsi., 2004). A gén ortológ funkciójával kapcsolatban nem áll rendelkezésre gazda-patogén kölcsönhatás vizsgálatból származó szakirodalmi adat.

A *CPAR2_200040*^{OE} mutáns törzs két kísérletben mutatott eltérő fenotípust a kontroll törzshöz viszonyítva. A gén túltermelésének köszönhetően a mutáns érzékeny volt a KV és KF sejtfalkárosító ágensek jelenlétére, valamint az egér makrofágok nagyobb mértékben tudták bekebelezni a gombasejteket. Az ortológ funkciója mindeztidáig nem ismert. Az azonos deléciós mutáns törzs toleráns volt KF jelenlétére, tovább erősítve a *CPAR2_200040* gén szerepét a *C. parapsilosis* gomba sejtfal felépítésének szabályozásában (Tóth és mtsi., 2018).

A *CPAR2_108840*^{OE}, *CPAR2_406400*^{OE} és a *CPAR2_500180*^{OE} mutánsok esetében egyedül a fagocitózis kísérletek során tapasztaltunk fenotípusbeli változást a vad típusú törzshöz képest. Az egér makrofágok nagyobb hatékonysággal fagocitálták a *CPAR2_108840*^{OE} gombát. Az *ScSPS1* gén (a *CPAR2_1088840* gén ortológja) feltehetően egy szerin/treonin kináz, amelynek szerepe van a *S. cerevisiae* élesztő spóráképzésében (Percival-Smith és Segall, 1986). A párhuzamos KO mutáns érzékeny volt SDS jelenlétére *C. parapsilosis*-ban (Tóth és mtsi., 2018), míg az ortológ deléciós mutáns a kontrolltól nem mutatott eltérő fenotípust *C. albicans* gombában (Holland és mtsi., 2014). A gén funkcióját korábban nem kötötték össze virulenciában szerepet játszó tulajdonsággal. A

CPAR2_406400^{OE} mutáns vizsgálata során alacsonyabb fagocitózis százalékot jegyeztünk fel. A gén ortológ által kódolt fehérje az *ScRPA12* az RNS-polimeráz I enzim alegységeként lett azonosítva *S. cerevisiae* élesztőben (Nogi és mtsi., 1993). Chaillot kutatásai révén ismert, hogy a génnek szerepe van a sejtek méretének fenntartásában *C. albicans*-ban (Chaillot és mtsi., 2017), de funkcióját korábban még nem kötötték össze virulencia asszociált tulajdonság kialakításával. A CPAR2_500180^{OE} gombát kevésbé tudták fagocitálni a J774.2 egér monocita sejtek, így ezt a mutáns törzset fertőzőképesebbnek gondoljuk a vad típusú törzshöz viszonyítva. A gén ortológja az *ScKIN3*, ami egy nem esszenciális szerin/trypton kináz proteinként lett azonosítva, és feltehetően szerepet játszik a DNS károsítás által indukált válaszreakcióban/szignáltranszdukcióban *S. cerevisiae* élesztőgombában (Jones és Rosamond, 1990; Moura és mtsi., 2010; Pais és mtsi., 2013). A párhuzamos *C. parapsilosis* KO mutáns érzékenynek bizonyult KV és koffein jelenlétére a tápközegben (Tóth és mtsi., 2018), míg *C. albicans*-ban a gén eliminációja a sejtek méretének növekedését okozta és csökkentette a caspofunginnal szemben mutatott toleranciát (Sellam és mtsi., 2019; Blankenship és mtsi., 2010). *S. cerevisiae*-ben elérhető az OE mutáns, mely csökkent növekedési képességet, abnormális sejt morfológiát és abnormális sejt ciklust mutatott a vizsgálatok során (Sopko és mtsi., 2006), habár saját kísérleteink során nem tapasztaltunk hasonló fenotípusos változásokat *C. parapsilosis*-ban. Az általunk alkalmazott fagocitózis vizsgálat során a makrofág-patogén interakció felismerés és endocitózis lépéseinek következményét tudtuk megfigyelni. Előbbi folyamat elsősorban a patogén specifikus sejtalkomponenseinek makrofág általi felismerésén alapul, ebből következően pedig maga az endocitózis is. Egy sikeres patogén faj többféle védelmi stratégiát alkalmazhat a bekebelezés és sejt lízis elkerülése érdekében, mint például a specifikus felszíni sejtalkomponensek elrejtése vagy a morfológiaváltás képessége (Brown, 2011). Eredményeink alapján feltételezhetjük, hogy az eltérő fagocitózis hatékonyság értékek az adott OE mutánsok sejt fal összetételének referencia törzstől való eltérését tükrözhetik, amelyet az egyes sejtalkomponens vizsgálatok során nem sikerült alátámasztani.

Eredményeink részletesebb interpretációja végett a saját kísérleteink során keletkezett adatokat összevetettük korábbi génanalízis vizsgálatok eredményeivel. Első körben az azonos, vagyis *C. parapsilosis* faj vizsgálatából származó adatokat gyűjtöttük össze. Az eredmények csak akkor voltak összevethetőek, ha a mutánsok előállításához

alkalmazott kiindulási törzs megegyezett az általunk is felhasznált törzsszel, továbbá, ha a mutánsok vizsgálatánál használt kontroll törzsek is megegyeztek, valamint az alkalmazott kísérleti körülmények is hasonlóak voltak az általunk használt rendszerekhez. A 8 eltérő fenotípussal rendelkező OE mutáns törzsből 6 esetében történt már korábban géndeléciós vizsgálat (3. és 10. sz. melléklet). A géndeléciós és overexpressziós adatok összehasonlítása során a *CPAR2_200040* gén esetében találtunk ellentétes fenotípust, amely csökkent növekedési képességet jelentett KF jelenlétében az OE mutáns, míg növekedett KV rezisztenciát a KO mutáns esetében (Tóth és mtsi., 2018). Hasonló vagy közel azonos fenotípus 2-2 parallel mutáns esetében lett feljegyezve. A *CPAR2_109520* gén KO és OE mutánsai egyaránt érzékenyek voltak SDS jelenlétére és redukált növekedést produkáltak, míg a *CPAR2_302400* gén KO és OE mutánsok csökkent adhézisiós képességet és biofilmformációt mutattak (Tóth és mtsi., 2018). További példaként ennél a kategóriánál említjük meg a *CPAR2_500180* gén mutánsokat, amelyek hasonló kísérleti körülmények között egy esetben sem mutattak elváltozást. Természetesen találtunk példát olyan esetekre is, amikor az egyik mutáns nem, míg a másik megváltozott fenotípusos jegyeket mutatott. A *CPAR2_108840* deléciós törzs érzékeny volt az SDS membránkárosító ágens jelenlétére, míg az OE mutáns vizsgálata során nem tapasztaltunk ilyen válaszreakciót (Tóth és mtsi., 2018). Hasonlóan, a *CPAR2_602820*^{OE} mutáns stressztűrő képessége nem tért el a vad típustól, míg a deléciós mutáns enyhe és erős növekedési defektust mutatott minimál táptalajon 30 és 37 °C-on egyaránt. Olyankor, amikor csak más fajokban, például *S. cerevisiae* vagy *C. albicans*, elvégzett kísérleti eredmények voltak elérhetőek az adott génnel kapcsolatban, az összehasonlítás nehezkesebb volt.

A kísérleti adatok elemzése és összehasonlítása során további szempontokat is figyelembe kellett vennünk, különösen akkor, amikor egyáltalán nem tapasztaltunk fenotípus változást vagy nem a KO mutánsnál jelentkezővel ellentétes tulajdonságot detektáltunk. Ezekben az esetekben felmerülhet a gyanú, hogy az adott gén nem felelős vagy nem egyedül felelős az adott funkció ellátásáért, vagy a túltermelt fehérje szerepe nem tudott kiteljesedni/érvényre jutni, de természetesen az is lehetséges, hogy az általunk alkalmazott módszerekkel nem tudtuk monitorozni az adott tulajdonságot (Prelich, 2012). Ezenkívül a kísérletek során rosszul kiválasztott kontroll törzsek alkalmazása is befolyással lehet a kapott eredmények téves értékelésére. Ezt a tényezőt kizárandó, az életképesség vizsgálatára

irányuló tesztekben három kontrollt is alkalmaztunk. A CLIB214 vad típusú törzs mellett kísérletbe vontuk a CPRI törzset, amely a mutánsok létrehozásához alkalmazott *LEU2* deléciós leucin auxotróf törzs *LEU2* génnel komplementált formája, továbbá az mCherry^{OE} mutánst. Utóbbi az mCherry fluoreszcens fehérjét túltermelő mutáns, amelynek létrehozásához a többi mutáns esetében is alkalmazott azonos génexpressziós konstrukciót használtuk. Ezzel a megoldással nem csak a konstrukció beépüléséből esetlegesen adódó defektusokat tudtuk kizárni, hanem magából a konstitutív működésből származókat is, szemben az olyan kontroll törzsekkel, amelyek csak az üres, működésképtelen vektort hordozzák (Cabral és mtsi., 2014; Znaidi és mtsi., 2018; Németh és mtsi., 2020). A három kontroll törzs vizsgálata során egy esetben sem fedeztünk fel életképességbeli változást az alkalmazott kísérletek értékelésekor, így a további tesztekhez már csak a CLIB214 törzset választottuk.

Munkánk során egy gén overexpressziós konstrukciót alkalmazva gén összehasonlító vizsgálatokat végeztünk a *C. parapsilosis* modellorganizmusban. A vizsgált gének közül öt gén – *CPAR2_107240*, *CPAR2_108840*, *CPAR2_302400*, *CPAR2_406400*, *CPAR2_602820* – esetében sikerült első alkalommal bizonyítani azok szerepét a *C. parapsilosis* faj virulenciájában, feltehetően biofilmképzés és gazda-patogén interakció szabályzásában vesznek részt. További három gén – *CPAR2_109520*, *CPAR2_200040*, *CPAR2_500180* – esetében tudtuk megerősíteni azok szerepét a *C. parapsilosi* virulenciájában. Eredményeink rávilágítottak arra, hogy a gén overexpressziós megközelítés egy effektív módszer lehet az egyre nagyobb veszélyt jelentő humánpatogén *C. parapsilosis* génjeinek funkció vizsgálatára, valamint az OE technika segítségével további virulenciában szerepet játszó faktorok és útvonalak szerepére derülhet fény.

7. Összefoglalás

Kórházi statisztikai adatok szerint a nozokomiális szisztémás gombás fertőzések jelentős hányadáért *Candida* fajok felelősek. A szisztémás candidiázisok gyakorisága világszinten növekvő tendenciát mutat, amelyhez hozzájárul a nem-*albicans Candida* fajok növekvő azonosítása a gombás fertőzések hátterében. Az ilyen esetekben az egyik leggyakrabban izolált NAC faj a *C. parapsilosis*, amely annak ellenére, hogy a normál humán kültakaró kommenzalistája, egyes esetekben képes megbetegíteni a gazdaszervezetet. Az általa támadott célcsoport tagjai lehetnek alacsony születési súlyú csecsemők, koraszülött csecsemők, illetve immunszuppresszált felnőtt/időskorú egyének. A *C. albicans* fajhoz viszonyítva a *C. parapsilosis* gombáról kevés ismeret áll rendelkezésünkre annak patomechanizmusával kapcsolatban. A *C. parapsilosis* specifikus, a *C. albicans* fajtól eltérő tulajdonságai, mint például a gyakori biofilmképzés orvosi eszközök, katéterek felületén vagy az echinocandin típusú antifungális szerekkel szembeni csökkent érzékenység, mind szorgalmazzák a faj virulenciafaktorait célzó kutatásokat.

A gének szerepének feltárásához általánosan alkalmazott módszer a kérdéses gének deletálása a genomból, majd a mutánsok fenotípusának jellemzése. Egy másfajta megközelítést kínál a vizsgált gének folyamatos mesterséges overexpressziója, amelynek segítségével áthidalhatók a KO technika egyes hátrányai, ahogy azt számos tanulmány bizonyítja különféle modellrendszerekben.

Jelen tanulmány célja volt egy overexpressziós mutáns gyűjtemény létrehozása és széles körű elemzése, a Dr. Németh Tibor által korábban létrehozott *C. parapsilosis* specifikus gén OE rendszer segítségével. A kísérletbe olyan géneket vontunk be, amelyek korábbi vizsgálatok során eltérő expressziós mintázatot mutattak gazda-patogén kölcsönhatást követően, ezért feltételeztük azok szerepét a faj patogenitásában. További gének kerültek kiválasztásra, amelyek ortológ funkciójuk ismeretében potenciális virulenciafaktorok lehetnek.

Munkánk során létrehoztunk egy 37 különböző gént túltermelő mutáns gyűjteményt, amelynek tagjait különböző molekuláris módszerekkel validáltuk. Jellemeztük a mutáns törzsek életképességét, stressz toleranciáját, morfológiaváltásra való képességét, pszeudohifa- és biofilmképzését, valamint antifungális szerekkel szembeni érzékenységét. A

gazdával való kölcsönhatás vizsgálatát *in vivo* és *in vitro* modellek alkalmazásával végeztük el. Az egyes kísérletek során a gazdaszervezetben uralkodó viszonyokat modelleztük, amelyhez a patogén fajnak alkalmazkodnia kell a fertőzés során. A különböző stresszkörülményhez való alkalmazkodás vizsgálata során 3 esetben találtunk eltérő, mégpedig csökkent növekedési képességet a vad típusú törzshöz képest. Egy esetben tapasztaltunk biofilmképzési defektust a vizsgált mutánsok körében. Gazda-patogén interakció modellezésekor a fagocitózis vizsgálatok során 5 esetben, míg az *in vivo* viaszmosy lárvák infekciós kísérletben 4 mutáns esetében detektáltunk eltérő fenotípust a referencia törzshöz viszonyítva. A 37 mutánsból összesen 8 esetben tapasztaltunk a vad típustól eltérő fenotípust, ebből 3 mutáns esetében feltételezhető, hogy az adott gén túltermelése pleiotróp hatással bír, tehát több virulencia tulajdonságra is befolyással lehet, mivel a mutánsok több kísérletben is megváltozott fenotípussal rendelkeztek.

A mutáns kollekció széles körű vizsgálatát követően összevetettük eredményeinket korábbi KO, illetve OE mutáns könyvtárak analízise során kapott szakirodalmi adatokkal *C. parapsilosis*, *S. cerevisiae* és *C. albicans* fajokban egyaránt. Első körben a választott modell fajra vonatkozó adatokat elemeztük, mely során egyaránt tapasztaltunk ellentétes és közel azonos fenotípust az azonos gén deléciós és túltermelő mutánsai esetében. Találtunk példákat olyan esetre is, amikor az egyik mutánsban megfigyelhető volt a fenotípus változása, míg KO vagy OE paraleljében nem, illetve amikor egyik esetben sem volt eltérő fenotípus.

A létrehozott OE mutáns kollekció karakterizálása során nyolc mutáns esetében azonosítottunk eltérő fenotípust a kontroll törzshöz viszonyítva. A *CPAR2_107240*, *CPAR2_108840*, *CPAR2_302400*, *CPAR2_406400* és *CPAR2_602820* génekhez korábban ismeretlen/új funkciókat tudtunk rendelni, melyek hatással lehetnek a *C. parapsilosis* fertőzőképességére a gazda-patogén kölcsönhatás és a biofilmképzés szabályozásán keresztül. Továbbá megerősítettük a *CPAR2_109520*, *CPAR2_200040* és *CPAR2_500180* gének szerepét a faj patomechanizmusában. Munkánk során először kerültek azonosításra a *C. parapsilosis* virulenciájában szerepet játszó gének funkciói a Gateway® fehérje túltermelő konstrukciót alkalmazva. Eredményeink rávilágítottak arra, hogy a gén overexpressziós megközelítés egy hatékony módszer lehet az egyes gének funkciójának vizsgálatára.

Széles körű, mesterségesen overexpresszáltatott gének vizsgálati eredményei *C. albicans* és *S. cerevisiae* rokon fajokban elérhetőek, azonban a *C. parapsilosis* gombafaj

esetében OE mutánskönyvtárak létrehozására és részletes elemzésére eddig még nem volt példa. Tudomásunk szerint jelen tanulmány az első, amely az opportunistá humánpatogén *C. parapsilosis* virulenciafaktorait vizsgálta overexpressziós megközelítést alkalmazva.

8. Summary

According to hospital statistics, *Candida* species are responsible for a significant proportion of nosocomial systemic fungal infections. The incidence of systemic candidiasis is increasing worldwide, contributing to the increasing identification of non-*albicans* *Candida* species in connection with fungal infections. In such cases, one of the most commonly isolated NAC species is *C. parapsilosis*, which, despite being a commensal of the normal human skin, in some cases can infect the host organism. The target group may be low birth weight newborns or premature infants or immunosuppressed adults/elderly individuals. Little is known about the fungus *C. parapsilosis* regarding its pathomechanism compared to *C. albicans*. Specific traits of *C. parapsilosis* other than *C. albicans*, such as frequent biofilm formation on the surface of medical devices, catheters, or reduced susceptibility to echinocandin-type antifungal agents make the study of the virulence factors and molecular pathomechanism of this species urgent.

A commonly used method to explore genes' function is to delete the candidate genes from the genome and then characterize the phenotype of the mutants. The continuous artificial overexpression of the examined genes offers a different experimental approach, which can overcome some of the disadvantages of the KO method as demonstrated by several studies in different model systems.

The aim of the present study was to create and extensively analyze an overexpression mutant collection using the *C. parapsilosis*-specific gene overexpression system previously developed by Dr. Tibor Németh. Genes that showed a different expression pattern after host-pathogen interaction in previous studies were included in the experiment, so we hypothesized their role in the pathogenicity. Additional genes have been selected that may be potential virulence factors based on the reported functions of their orthologs.

In this study, we created a collection of mutants overexpressing 37 different genes, which were validated by different molecular methods. We characterized the viability, stress tolerance, ability to switch morphology, pseudohypha and biofilm formation, and antifungal sensitivity of the mutant strains. Their interaction with the host was performed using *in vivo* and *in vitro* models. In each experiment, we modeled the conditions prevailing in the host organism to which the pathogenic species must adapt during infection. In the study of

adaptation to different stress conditions, we found reduced growth ability in 3 cases compared to the wild-type strain. In one case, we found biofilm formation defect among the studied mutants. When modeling host-pathogen interaction, altered phenotype was detected in 5 mutants during the examination of phagocytosis and in 4 mutants in an *in vivo* wax moth larval infection experiment compared to the reference strain. Out of the 37 mutants 8 showed different phenotypes, of which 3 overexpressed genes were presumed to have a pleiotropic effect, so they may affect several virulence traits of *C. parapsilosis*, as the mutants had an altered phenotype in several experiments.

After extensive examination of the mutant collection, we compared our results with the literature data obtained during the analysis of previous KO and OE mutant libraries in *C. parapsilosis*, *S. cerevisiae* and *C. albicans*. First, we analyzed data for the chosen model species, in which we found both opposite and nearly identical phenotypes for the same gene deletion and overproducing mutants. We also found examples of cases where a change in phenotype was observed in one of the mutants, but not in a parallel of KO or OE, or when there was no difference in either case.

During the characterization of the generated OE mutant collection, altered phenotype was identified for eight mutants compared to the control strain. We assigned previously unknown functions to the genes *CPAR2_107240*, *CPAR2_108840*, *CPAR2_302400*, *CPAR2_406400*, and *CPAR2_602820* that may affect the virulence traits of *C. parapsilosis* through the regulation of host-pathogen interaction and biofilm formation. Furthermore, we confirmed the role of *CPAR2_109520*, *CPAR2_200040* and *CPAR2_500180* genes in the pathomechanism of the species. For the first time, the functions of genes involved in the virulence of *C. parapsilosis* were identified using a gene overexpression method in this study. Our results highlighted that the gene overexpression approach can be an effective method to study the function of individual genes.

Test results for a wide range of artificially overexpressed genes are available in *C. albicans* or *S. cerevisiae*, however, OE mutant libraries and their detailed analysis have not yet been released for the *C. parapsilosis* fungal species. To our knowledge, the present study is the first to investigate virulence factors of the opportunistic human pathogen *C. parapsilosis* using an overexpression approach.

9. Irodalomjegyzék

- Almeida, R.S.; Wilson, D.; Hube, B. *Candida albicans* iron acquisition within the host. *FEMS Yeast Res.*, **2009**, 9(7): 1000-1012.
- Amici, G.; Grandesso, S.; Mottola, A.; Virga, G.; Calconi, G. és mtsi. Fungal peritonitis in peritoneal dialysis: critical review of six cases. *Adv. Perit. Dial.*, **1994**, 10: 169-173.
- Amorim-Vaz, S.; Delarze, E.; Ischer, F.; Sanglard, D.; Coste, A.T. Examining the virulence of *Candida albicans* transcription factor mutants using *Galleria mellonella* and mouse infection models. *Front. Microbiol.*, **2015**, 6: 367.
- Ashford, B. Certain conditions of the gastrointestinal tract in Puerto Rico and their relation to tropical sprue. *The American J. of Trop. Med. and Hyg.*, **1928**, 8: 507-538.
- Audhya, A.; Loewith, R.; Parsons, A.B.; Gao, L.; Tabuchi, M. és mtsi. Genome-wide lethality screen identifies new PI4,5P2 effectors that regulate the actin cytoskeleton. *EMBO J.*, **2004**, 23, 3747-3757, doi:10.1038/sj.emboj.7600384.
- Bahri, R.; Curt, S.; Saidane-Mosbahi, D.; Rouabhia, M. Normal Human Gingival Epithelial Cells Sense *C. parapsilosis* by Toll-Like Receptors and Module Its Pathogenesis through Antimicrobial Peptides and Proinflammatory Cytokines. *Mediators Inflamm.*, **2010**, 940383, doi:10.1155/2010/940383.
- Bailly, V.; Lauder, S.; Prakash, S.; Prakash, L. Yeast DNA repair proteins Rad6 and Rad18 form a heterodimer that has ubiquitin conjugating, DNA binding, and ATP hydrolytic activities. *J. Biol. Chem.*, **1997**, 272, 23360-23365, doi:10.1074/jbc.272.37.23360.
- Bain, J.M.; Louw, J.; Lewis, L.E.; Okai, B.; Walls, C.A. és mtsi. *Candida albicans* hypha formation and mannan masking of β -glucan inhibit macrophage phagosome maturation. *MBio.*, **2014**, 5, e01874, doi:10.1128/mBio.01874-14.
- Balish, E.; Jensen, J.; Warner, T.; Brekke, J.; Leonard, B. Mucosal and disseminated candidiasis in gnotobiotic SCID mice. *J. Med. Vet. Mycol.*, **1993**, 31: 143-154, doi:10.1080/02681219380000161.
- Barchiesi, F.; Spreghini, E.; Tomassetti, S.; Della Vittoria, A.; Arzeni, D. és mtsi. Effects of caspofungin against *Candida guilliermondii* and *Candida parapsilosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2006**, 50: 2719-2727, doi:10.1128/AAC.00111-06.

- Bassetti, M.; Righi, E.; Costa, A.; Fasce, R.; Molinari, M.P. és mtsi. Epidemiological trends in nosocomial candidemia in intensive care. *BMC Infect. Dis.*, **2006**, 6: 21, doi:10.1186/1471-2334-6-21.
- Bates, S.; Hughes, H.B.; Munro, C.A.; Thomas, W.P.H.; MacCallum, D.M. és mtsi. Outer chain N-glycans are required for cell wall integrity and virulence of *Candida albicans*. *J. Biol. Chem.*, **2006**, 281: 90-98, doi:10.1074/jbc.M510360200.
- Bates, S.; MacCallum, D.M.; Bertram, G.; Munro, C.A.; Hughes, H.B. és mtsi. *Candida albicans* Pmr1p, a secretory pathway P-type $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ -ATPase, is required for glycosylation and virulence. *J. Biol. Chem.*, **2005**, 280, 23408-23415, doi:10.1074/jbc.M502162200.
- Bendel, C.M.; Hess, D.J.; Garni, R.M.; Henry-Stanley, M.; Wells, C.L. Comparative virulence of *Candida albicans* yeast and filamentous forms in orally and intravenously inoculated mice. *Crit. Care Med.*, **2003**, 31.
- Beyda, N.D.; Lewis, R.E.; Garey, K.W. Echinocandin Resistance in *Candida* Species: Mechanisms of Reduced Susceptibility and Therapeutic Approaches. *Ann. Pharmacother.*, **2012**, 46: 1086-1096, doi:10.1345/aph.1R020.
- Bialkova, A.; Šubík, J. Biology of the pathogenic yeast *Candida glabrata*. *F. microbiologica*, **2006**, 51(1): 3-20.
- Blankenship, J.R.; Fanning, S.; Hamaker, J.J.; Mitchell, A.P. An extensive circuitry for cell wall regulation in *Candida albicans*. *PLOS Pathog.*, **2010**, 6, e1000752.
- Blankenship, J.R.; Mitchell, A.P. How to build a biofilm: a fungal perspective. *Curr. Opin. Microbiol.*, **2006**, 9: 588-594, doi:https://doi.org/10.1016/j.mib.2006.10.003.
- Bojang, E.; Ghuman, H.; Kumwenda, P.; Hall, R.A. Immune Sensing of *Candida albicans*. *J. Fungi*, **2021**, 7:119.
- Braun, B.R.; Johnson, A.D. Control of filament formation in *Candida albicans* by the transcriptional repressor TUP1. *Science*, **1997**, 277: 105-109, doi:10.1126/science.277.5322.105.
- Brennan, M.; Thomas, D.Y.; Whiteway, M.; Kavanagh, K. Correlation between virulence of *Candida albicans* mutants in mice and *Galleria mellonella* larvae. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, **2002**, 34: 153-157, doi:10.1111/j.1574-695X.2002.tb00617.x.

- Breslow, D.K.; Cameron, D.M.; Collins, S.R.; Schuldiner, M.; Stewart-Ornstein, J.; Newman, H.W.; Braun, S.; Madhani, H.D.; Krogan, N.J.; Weissman, J.S. és mtsi. A comprehensive strategy enabling high-resolution functional analysis of the yeast genome. *Nat. Methods* **2008**, *5*: 711-718, doi:10.1038/nmeth.1234.
- Brown, A.J.; Brown, G.D.; Netea, M.G.; Gow, N.A. Metabolism impacts upon *Candida* immunogenicity and pathogenicity at multiple levels. *Trends Microbiol.*, **2014**, *22*(11): 614-622.
- Brown, G.D. Innate antifungal immunity: The key role of phagocytes. *Annu. Rev. Immunol.*, **2011**, *29*: 1-21, doi:10.1146/annurev-immunol-030409-101229.
- Brown, G.D.; Denning, D.W.; Gow, N.A.R.; Levitz, S.M.; Netea, M.G.; White, T.C. Hidden Killers: Human Fungal Infections. *Sci. Trans. Med.*, **2012**, *4*(165): 165rv13-165rv13. doi:10.1126/scitranslmed.3004404.
- Brunel, L.; Neugnot, V.; Landucci, L.; Boze, H.; Moulin, G. és mtsi. High-level expression of *Candida parapsilosis* lipase/acyltransferase in *Pichia pastoris*. *J. Biotechnol.*, **2004**, *111*: 41-50, doi:https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2004.03.007.
- Butler, G.; Rasmussen, M.D.; Lin, M.F.; Santos, M.A.S.; Sakthikumar, S. és mtsi. Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight *Candida* genomes. *Nature*, **2009**, *459*: 657-662, doi:10.1038/nature08064.
- Byrd, A.L.; Belkaid, Y.; Segre, J.A. The human skin microbiome. *Nature Rev. Mb.*, **2018**, *16*(3): 143-155. doi:10.1038/nrmicro.2017.157.
- Cabral, V.; Znaidi, S.; Walker, L.A.; Martin-Yken, H.; Dague, E. és mtsi. Targeted changes of the cell wall proteome influence *Candida albicans* ability to form single- and multi-strain biofilms. *PLoS Pathog.*, **2014**, *10*, e1004542, doi:10.1371/journal.ppat.1004542.
- Cairns, B.R.; Lorch, Y.; Li, Y.; Zhang, M.; Lacomis, L. és mtsi. RSC, an essential, abundant chromatin-remodeling complex. *Cell*, **1996**, *87*, 1249-1260, doi:10.1016/s0092-8674(00)81820-6.
- Calderone, R.A.; Fonzi, W.A. Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends Microbiol.*, **2001**, *9*: 327-335, doi:https://doi.org/10.1016/S0966-842X(01)02094-7.
- Cappelletty, D.; Eiselstein-McKittrick, K. The echinocandins. *Pharmacotherapy*, **2007**, *27*: 369-388, doi:10.1592/phco.27.3.369.

- Carr, P.L.; Felsenstein, D.; Friedman, R.H. Evaluation and management of vaginitis, *J. Gen. Intern. Med.*, **1998**, 13(5): 335-346.
- Chaillot, J.; Cook, M.A.; Corbeil, J.; Sellam, A. Genome-wide screen for haploinsufficient cell size genes in the opportunistic yeast *Candida albicans*. *G3 Genes/Genomes/Genetics*, **2017**, 7: 355-360, doi:10.1534/g3.116.037986.
- Champion, O.L.; Wagley, S.; Titball, R.W. *Galleria mellonella* as a model host for microbiological and toxin research. *Virulence* **2016**, 7: 840-845, doi:10.1080/21505594.2016.1203486.
- Chapeland-Leclerc, F.; Hennequin, C.; Papon, N.; Noël, T.; Girard, A. és mtsi. Acquisition of Flucytosine, Azole, and Caspofungin Resistance in *Candida glabrata* Bloodstream Isolates Serially Obtained from a Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipient. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2010**, 54: 1360-1362, doi:10.1128/AAC.01138-09.
- Chapman, R.L. *Candida* infections in the neonate. *Curr. Op. in Ped.*, **2003**, 15(1): 97-102.
- Chauvel, M.; Nesseir, A.; Cabral, V.; Znaidi, S.; Goyard, S. és mtsi. A Versatile overexpression strategy in the pathogenic yeast *Candida albicans*: Identification of regulators of morphogenesis and fitness. *PLoS ONE*, **2012**, 7, e45912.
- Cheng, S-C.; Joosten, L.A.B.; Kullberg, B-J.; Netea, M.G. Interplay between *Candida albicans* and the Mammalian Innate Host Defense. *Infect. and Imm.*, **2012**, 80(4): 1304-1313. doi:10.1128/iai.06146-11.
- Chua, G.; Morris, Q.D.; Sopko, R.; Robinson, M.D.; Ryan, O. és mtsi. Identifying transcription factor functions and targets by phenotypic activation. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **2006**, 103: 12045-12050, doi:10.1073/pnas.0605140103.
- Cillingová, A.; Zeman, I.; Tóth, R.; Neboháčová, M.; Dunčková, I. és mtsi. Eukaryotic transporters for hydroxyderivatives of benzoic acid. *Sci. Rep.*, **2017**, 7: 8998, doi:10.1038/s41598-017-09408-6.
- Clark, T.A.; Slavinski, S.A.; Morgan, J.; Lott, T.; Arthington-Skaggs, B.A. és mtsi. Epidemiologic and molecular characterization of an outbreak of *Candida parapsilosis* bloodstream infections in a community hospital. *J. Clin. Microbiol.*, **2004**, 42: 4468-4472, doi:10.1128/JCM.42.10.4468-4472.2004.

- Cleveland, A.A.; Farley, M.M.; Harrison, L.H.; Stein, B.; Hollick, R. és mtsi. Changes in incidence and antifungal drug resistance in *Candidemia*: Results from population-based laboratory surveillance in Atlanta and Baltimore, 2008–2011. *Clin. Infect. Dis.*, **2012**, 55: 1352-1361, doi:10.1093/cid/cis697.
- Cleveland, A.A.; Harrison, L.H.; Farley, M.M.; Hollick, R.; Stein, B. és mtsi. Declining incidence of *Candidemia* and the shifting epidemiology of *Candida* resistance in two US Metropolitan Areas, 2008–2013: Results from population-based surveillance. *PLoS ONE*, **2015**, 10, e0120452.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. **2008**. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard, 3rd ed. CLSI document M27-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. **2012**. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard, 4th ed. CLSI document M27-S4. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- Cooper, A.J.; Friedberg, E.C. A putative second adenylate kinase-encoding gene from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, **1992**, 114, 145-148, doi:10.1016/0378-1119(92)90721-z.
- Cooper, C.R. Yeasts Pathogenic to Humans. In Kurtzman, C.P.; Fell J.W.; Boekhout T. (szerk.) The Yeasts, a Taxonomic Study, 5th Edition, Vol. 1., **2011**, Elsevier.
- Critchley, I.A.; Douglas, L.J. Differential adhesion of pathogenic *Candida* species to epithelial and inert surfaces. *FEMS Microbiol. Lett.*, **1985**, 28: 199-203, doi:10.1111/j.1574-6968.1985.tb00791.x.
- De Bernardis, F.; Muhlschlegel, F.A.; Cassone, A.; Fonzi, W.A. The pH of the host niche controls gene expression in and virulence of *Candida albicans*. *Infect. Immun.*, **1998**, 66(7): 3317-3325.
- De Groot, P.W.J.; Ruiz, C.; Vázquez de Aldana, C.R.; Dueñas, E.; Cid, V.J. és mtsi. A genomic approach for the identification and classification of genes involved in cell wall formation and its regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Comp. Funct. Genomics*, **2001**, 2: 124-142, doi:10.1002/cfg.85.
- Desai, P.R.; van Wijlick, L.; Kurtz, D.; Juchimiuk, M.; Ernst, J.F. Hypoxia and Temperature Regulated Morphogenesis in *Candida albicans*. *PLOS Genet.*, **2015**, 11, e1005447.

- Ding, C.; Butler, G. Development of a gene knockout system in *Candida parapsilosis* reveals a conserved role for BCR1 in biofilm formation. *Eukaryot. Cell*, **2007**, 6: 1310-1319, doi:10.1128/EC.00136-07.
- Dóczi, I.; Peto, Z.; Fodor, E.; Bereczki, L.; Nagy, E. és mtsi. Evaluation of fungaemia infections in a Hungarian university hospital between 1996 and 2009. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.*, **2012**, 59(1): 29-41.
- Doedt, T.; Krishnamurthy, S.; Bockmühl, D.P.; Tebarth, B.; Stempel, C. és mtsi. APSES proteins regulate morphogenesis and metabolism in *Candida albicans*. *Mol. Biol. Cell*, **2004**, 15, 3167-3180, doi:10.1091/mbc.e03-11-0782.
- Douglas, L.J. *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends Microbiol.*, **2003**, 11: 30-36, doi:10.1016/s0966-842x(02)00002-1.
- Drummond, R.A.; Gaffen, S.L.; Hise, A.G.; Brown, G.D. Innate Defense against Fungal Pathogens. *Cold Spring Harbor Perspect. in Med.*, **2014**, 5(6): a019620-a019620. doi:10.1101/cshperspect.a019620.
- Du, H.; Guan, G.; Xie, J.; Sun, Y.; Tong, Y. és mtsi. Roles of *Candida albicans* Gat2, a GATA-Type Zinc Finger Transcription Factor, in Biofilm Formation, Filamentous Growth and Virulence. *PLoS One*, **2012**, 7, e29707.
- Dujon, B. Yeast evolutionary genomics. *Nature Rev. Gen.*, **2010**, 11(7): 512-524. doi:10.1038/nrg2811.
- Ellerbroek, P.M.; Walenkamp, A.M.E.; Hoepelman, A.I.M.; Coenjaerts, F.E.J. Effects of the capsular polysaccharides of *Cryptococcus neoformans* on phagocyte migration and inflammatory mediators. *Curr. Med. Chem.*, **2004**, 11: 253-266, doi:10.2174/0929867043456188.
- Ene, I. V; Adya, A.K.; Wehmeier, S.; Brand, A.C.; MacCallum, D.M. és mtsi. Host carbon sources modulate cell wall architecture, drug resistance and virulence in a fungal pathogen. *Cell. Microbiol.*, **2012**, 14: 1319-1335, doi:10.1111/j.1462-5822.2012.01813.x.
- Erbs, P.; Exinger, F.; Jund, R. Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* *FCY1* gene encoding cytosine deaminase and its homologue FCA1 of *Candida albicans*. *Curr. Genet.*, **1997**, 31: 1-6, doi:10.1007/s002940050169.

- Estrada-Mata, E.; Navarro-Arias, M.J.; Pérez-García, L.A.; Mellado-Mojica, E.; López, M.G. és mtsi. Members of the *Candida parapsilosis* Complex and *Candida albicans* are Differentially Recognized by Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Front. Microbiol.*, **2016**, 6: 1527.
- Fallon, J.P.; Troy, N.; Kavanagh, K. Pre-exposure of *Galleria mellonella* larvae to different doses of *Aspergillus fumigatus* conidia causes differential activation of cellular and humoral immune responses. *Virulence*, **2011**, 2: 413-421, doi:10.4161/viru.2.5.17811.
- Feaver, W.J.; Henry, N.L.; Wang, Z.; Wu, X.; Svejstrup, J.Q.; Bushnell, D.A.; Friedberg, E.C.; Kornberg, R.D. Genes for Tfb2, Tfb3, and Tfb4 subunits of yeast transcription/repair factor IIIH. Homology to human cyclin-dependent kinase activating kinase and IIIH subunits. *J. Biol. Chem.*, **1997**, 272, 19319-19327, doi:10.1074/jbc.272.31.19319.
- Finkel, J.S.; Mitchell, A.P. Genetic control of *Candida albicans* biofilm development. *Nat. Rev. Microbiol.*, **2011**, 9: 109-118, doi:10.1038/nrmicro2475.
- Fleischer, T.C.; Weaver, C.M.; McAfee, K.J.; Jennings, J.L.; Link, A.J. Systematic identification and functional screens of uncharacterized proteins associated with eukaryotic ribosomal complexes. *Genes Dev.*, **2006**, 20, 1294-1307, doi:10.1101/gad.1422006.
- Foster, N.; Symes, C.; Barton, R.; Hobson, R. Rapid identification of *Candida glabrata* in *Candida* bloodstream infections. *J. Med. Microbiol.*, **2007**, 56(Pt 12): 1639-1643.
- Fridkin, S.K.; Kaufman, D.; Edwards, J.R.; Shetty, S.; Horan, T. Changing incidence of *Candida* bloodstream infections among NICU patients in the United States: 1995–2004. *Pediatrics*, **2006**, 117: 1680-1687, doi:10.1542/peds.2005-1996.
- Fu, Y.; Luo, G.; Spellberg, B.J.; Edwards, J.E.; Ibrahim, A.S. Gene overexpression/suppression analysis of candidate virulence factors of *Candida albicans*. *Eukaryot. Cell*, **2008**, 7: 483-492, doi:10.1128/EC.00445-07.
- Fundyga, R.E.; Kuykendall, R.J.; Lee-Yang, W.; Lott, T.J. Evidence for aneuploidy and recombination in the human commensal yeast *Candida parapsilosis*. *Infect. Genet. Evol. J. Mol. Epidemiol. Evol. Genet. Infect. Dis.*, **2004**, 4: 37-43, doi:10.1016/j.meegid.2003.11.002.
- Gácsér, A.; Salomon, S.; Schäfer, W. Direct transformation of a clinical isolate of *Candida parapsilosis* using a dominant selection marker. *FEMS Microbiol. Lett.*, **2005**, 245: 117-121, doi:10.1016/j.femsle.2005.02.035.

- Gácsér, A.; Trofa, D.; Schäfer, W.; Nosanchuk, J.D. Targeted gene deletion in *Candida parapsilosis* demonstrates the role of secreted lipase in virulence. *J. Clin. Invest.*, **2007**, 117: 3049-3058, doi:10.1172/JCI32294.
- Garcia-Effron, G.; Chua, D.J.; Tomada, J.R.; DiPersio, J.; Perlin, D.S.; Ghannoum, M.; Bonilla, H. Novel Mutations Associated with Echinocandin Resistance in *Candida* Species. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2010**, 54: 2225-2227, doi:10.1128/AAC.00998-09.
- García-Rodas, R.; González-Camacho, F.; Rodríguez-Tudela, J.L.; Cuenca-Estrella, M.; Zaragoza, O. The interaction between *Candida krusei* and murine macrophages results in multiple outcomes, including intracellular survival and escape from killing. *Infect. Immun.*, **2011**, 79: 2136-2144, doi:10.1128/IAI.00044-11.
- Gerami-Nejad, M.; Zacchi, L.F.; McClellan, M.; Matter, K.; Berman, J. Shuttle vectors for facile gap repair cloning and integration into a neutral locus in *Candida albicans*. *Microbiology*, **2013**, 159: 565-579, doi:10.1099/mic.0.064097-0.
- Geymonat, M.; Spanos, A.; de Bettignies, G.; Sedgwick, S.G. Lte1 contributes to Bfa1 localization rather than stimulating nucleotide exchange by Tem1. *J. Cell Biol.*, **2009**, 187, 497–511, doi:10.1083/jcb.200905114.
- Gow, N.A.R.; Netea, M.G. Medical mycology and fungal immunology: new research perspectives addressing a major world health challenge. *Phil. Transact. of the Royal Soc. B: Biol. Sci.*, **2016**, 371: 20150462. doi:10.1098/rstb.2015.0462.
- Gow, N.A.R.; Latge, J.-P.; Munro, C.A. The Fungal Cell Wall: Structure, Biosynthesis, and Function. *Microbiol. Spectr.*, **2017**, 5:3. doi: 10.1128/microbiolspec.FUNK-0035-2016.
- Gow, N.A.R.; Netea, M.G.; Munro, C.A.; Ferwerda, G.; Bates, S. és mtsi. Immune Recognition of *Candida albicans* β -glucan by Dectin-1. *J. Infect. Dis.*, **2007**, 196: 1565-1571, doi:10.1086/523110.
- Gu, Y.; Gordon, D.M.; Amutha, B.; Pain, D. A GTP:AMP phosphotransferase, Adk2p, in *Saccharomyces cerevisiae*. Role of the C terminus in protein folding/stabilization, thermal tolerance, and enzymatic activity. *J. Biol. Chem.*, **2005**, 280, 18604-18609, doi:10.1074/jbc.M500847200.
- Guinea, J. Global trends in the distribution of *Candida* species causing candidemia. *Clin. Microbiol. Infect.*, **2014**, 20 Suppl 6: 5-10, doi:10.1111/1469-0691.12539.

- Hachem, R.; Hanna, H.; Kontoyiannis, D.; Jiang, Y.; Raad, I. The changing epidemiology of invasive candidiasis. *Cancer*, **2008**, 112: 2493-2499. <https://doi.org/10.1002/cncr.23466>.
- Hadwiger, J.A.; Wittenberg, C.; Richardson, H.E.; de Barros Lopes, M.; Reed, S.I. A family of cyclin homologs that control the G1 phase in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1989**, 86: 6255-6259, doi:10.1073/pnas.86.16.6255.
- Harcus, D.; Nantel, A.; Marcil, A.; Rigby, T.; Whiteway, M. Transcription profiling of cyclic AMP signaling in *Candida albicans*. *Mol. Biol. Cell*, **2004**, 15: 4490-4499, doi:10.1091/mbc.e04-02-0144.
- Harrington, R.; Kindermann, S.L.; Hou, Q.; Taylor, R.J.; Azie, N.; Horn, D.L. Candidemia and invasive candidiasis among hospitalized neonates and pediatric patients. *Curr. Med. Res. Opin.*, **2017**, 33: 1803-1812, doi:10.1080/03007995.2017.1354824.
- Hayles, J.; Aves, S.; Nurse, P. *Suc1* is an essential gene involved in both the cell cycle and growth in fission yeast. *EMBO J.*, **1986a**, 5: 3373-3379.
- Hayles, J.; Beach, D.; Durkacz, B.; Nurse, P. The fission yeast cell cycle control gene *cdc2*: isolation of a sequence *suc1* that suppresses *cdc2* mutant function. *Mol. Gen. Genet.*, **1986b**, 202: 291-293, doi:10.1007/BF00331653.
- Hedges, S.B. The origin and evolution of model organisms. *Nat. Rev. Genet.*, **2002**, 3: 838-849, doi:10.1038/nrg929.
- Hernández-Castro, R.; Arroyo-Escalante, S.; Carrillo-Casas, E.M.; Moncada-Barrón, D.; Álvarez-Verona, E. és mtsi. Outbreak of *Candida parapsilosis* in a neonatal intensive care unit: a health care workers source. *Eur. J. Pediatr.*, **2010**, 169: 783-787, doi:10.1007/s00431-009-1109-7.
- Höfs, S.; Mogavero, S.; Hube, B. Interaction of *Candida albicans* with host cells: virulence factors, host defense, escape strategies, and the microbiota. *J. Microbiol.*, **2016**, 54: 149-169, doi:10.1007/s12275-016-5514-0.
- Holland, L.M.; Schröder, M.S.; Turner, S.A.; Taff, H.; Andes, D. és mtsi. Comparative phenotypic analysis of the major fungal pathogens *Candida parapsilosis* and *Candida albicans*. *PLOS Pathog.*, **2014**, 10, e1004365.
- Homann, O.R.; Dea, J.; Noble, S.M.; Johnson, A.D. A Phenotypic Profile of the *Candida albicans* Regulatory Network. *PLOS Genet.*, **2009**, 5, e1000783.

- Hrdlickova, R.; Toloue, M.; Tian, B. RNA-Seq methods for transcriptome analysis. *WIREs RNA*, **2017**, 8, e1364, doi:<https://doi.org/10.1002/wrna.1364>.
- Hu, C.-J.; Bai, C.; Zheng, X.-D.; Wang, Y.-M.; Wang, Y. Characterization and functional analysis of the siderophore-iron transporter CaArn1p in *Candida albicans*. *J. Biol. Chem.*, **2002**, 277: 30598-30605, doi:10.1074/jbc.M204545200.
- Huang, M.Y.; Mitchell, A.P. Marker Recycling in *Candida albicans* through CRISPR-Cas9-Induced Marker Excision. *mSphere*, **2017**, 2, e00050-17, doi:10.1128/mSphere.00050-17.
- Huang, Y.-C.; Lin, T.-Y.; Leu, H.-S.; Peng, H.-L.; Wu, J.-H.; Chang, H.-Y. Outbreak of *Candida parapsilosis* fungemia in neonatal intensive care units: Clinical implications and genotyping analysis. *Infection*, **1999**, 27: 97-102, doi:10.1007/BF02560505.
- Igual, J.C.; Johnson, A.L.; Johnston, L.H. Coordinated regulation of gene expression by the cell cycle transcription factor Swi4 and the protein kinase C MAP kinase pathway for yeast cell integrity. *EMBO J.*, **1996**, 15: 5001-5013.
- Inoue, S.B.; Takewaki, N.; Takasuka, T.; Mio, T.; Adachi, M. és mtsi. Characterization and gene cloning of 1,3-beta-D-glucan synthase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.*, **1995**, 231, 845-854, doi:10.1111/j.1432-1033.1995.tb20770.x.
- Jabra-Rizk, M.A.; Brenner, T.M.; Romagnoli, M.; Baqui, A.A.; Merz, W.G. és mtsi. Evaluation of a reformulated CHROMagar *Candida*. *J. Clin. Microbiol.*, **2001**, 39: 2015-2016, doi:10.1128/JCM.39.5.2015-2016.2001.
- Jacobsen, I.D. *Galleria mellonella* as a model host to study virulence of *Candida*. *Virulence*, **2014**, 5: 237-239, doi:10.4161/viru.27434.
- Jacobsen, I.D.; Hube, B. *Candida albicans* morphology: still in focus. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.*, **2017**, 15: 327-330, doi:10.1080/14787210.2017.1290524.
- Jarvis, W.R. Epidemiology of Nosocomial Fungal Infections, with Emphasis on *Candida* Species. *Clin. Infect. Dis.*, **1995**, 20: 1526-1530, doi:10.1093/clinids/20.6.1526.
- Jayaweera, J.A.A.S.; Reyes, M. Antimicrobial misuse in pediatric urinary tract infections: recurrences and renal scarring. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.*, **2018**, 17: 27, doi:10.1186/s12941-018-0279-4.
- Johnson, D.C.; Cano, K.E.; Kroger, E.C.; McNabb, D.S. Novel regulatory function for the CCAAT-binding factor in *Candida albicans*. *Eukaryot. Cell*, **2005**, 4, 1662-1676, doi:10.1128/EC.4.10.1662-1676.2005.

- Johnson E.A.; Echavarri-Erasun C. Yeast Biotechnology. In Kurtzman, C.P.; Fell J.W.; Boekhout T. (szerk.) The Yeasts, a Taxonomic Study, 5th Edition, Vol. 1., **2011**, Elsevier.
- Jones, D.G.L.; Rosamond, J. Isolation of a novel protein kinase-encoding gene from yeast by oligodeoxyribonucleotide probing. *Gene*, **1990**, 90: 87-92, doi:10.1016/0378-1119(90)90442-T.
- Juyal, D.; Sharma, M.; Pal, S.; Rathaur, V.K.; Sharma, N. Emergence of non-*albicans* *Candida* species in neonatal candidemia. *N. Am. J. Med. Sci.*, **2013**, 5: 541-545, doi:10.4103/1947-2714.118919.
- Kasper, L.; Seider, K.; Hube, B. Intracellular survival of *Candida glabrata* in macrophages: immune evasion and persistence. *FEMS Yeast Res.* **2015**, 15:5, doi:10.1093/femsyr/fov042.
- Kaur, R.; Domergue, R.; Zupancic, M.L.; Cormack, B.P. A yeast by any other name: *Candida glabrata* and its interaction with the host. *Curr. Opin. Microbiol.*, **2005**, 8: 378-384, doi:https://doi.org/10.1016/j.mib.2005.06.012.
- Kelly, R.; Miller, S.M.; Kurtz, M.B.; Kirsch, D.R. Directed mutagenesis in *Candida albicans*: one-step gene disruption to isolate *ura3* mutants. *Mol. Cell. Biol.*, **1987**, 7: 199-208, doi:10.1128/mcb.7.1.199-208.1987.
- Kempf, V.A.J.; Mändle, T.; Schumacher, U.; Schäfer, A.; Autenrieth, I.B. Rapid detection and identification of pathogens in blood cultures by fluorescence *in situ* hybridization and flow cytometry. *Int. J. of Med. Microbiol.*, **2005**, 295(1): 47-55. doi:10.1016/j.ijmm.2004.12.006.
- Kofla, G.; Ruhnke, M. Pharmacology and metabolism of anidulafungin, caspofungin and micafungin in the treatment of invasive candidosis: review of the literature. *Eur. J. Med. Res.*, **2011**, 16: 159-166, doi:10.1186/2047-783x-16-4-159.
- Köhler, J.R.; Casadevall, A.; Perfect, J. The Spectrum of Fungi That Infects Humans. *Cold Spring Harbor Persp. in Med.*, **2014**, 5(1): a019273-a019273. doi:10.1101/cshperspect.a019273
- Köhler, J.R.; Hube, B.; Puccia, R.; Casadevall, A.; Perfect, J. Fungi that Infect Humans. In Heitman, J.; Howlett, B.; Crous, P.; Stukenbrock, E.; James, T.; Gow, N. (szerk.): The Fungal Kingdom, **2017**, ASM Press, Washington, DC, 813-843. doi:10.1128/microbiolspec.FUNK-0014-2016.

- Kosa, P.; Gavenciakova, B.; Nosek, J. Development of a set of plasmid vectors for genetic manipulations of the pathogenic yeast *Candida parapsilosis*. *Gene*, **2007**, 396: 338-345, doi:10.1016/j.gene.2007.04.008.
- Kothavade, R.J.; Kura, M.M.; Valand, A.G.; Panthaki, M.H. *Candida tropicalis*: its prevalence, pathogenicity and increasing resistance to fluconazole. *J. Med. Microbiol.*, **2010**, 59(Pt 8): 873-880.
- Kozik, A.; Karkowska-Kuleta, J.; Zajac, D.; Bochenska, O.; Kedracka-Krok, S. és mtsi. Fibronectin-, vitronectin- and laminin-binding proteins at the cell walls of *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis* pathogenic yeasts. *BMC Microbiol.*, **2015**, 15: 197, doi:10.1186/s12866-015-0531-4.
- Krcmery, V.; Barnes, A.J. Non-albicans *Candida* spp. causing fungaemia: pathogenicity and antifungal resistance. *J. Hosp. Infect.*, **2002**, 50: 243-260, doi:https://doi.org/10.1053/jhin.2001.1151.
- Kroll, E.S.; Hyland, K.M.; Hieter, P.; Li, J.J. Establishing genetic interactions by a synthetic dosage lethality phenotype. *Genetics*, **1996**, 143: 95-102.
- Kruppa, M.; Jabra-Rizk, M.A.; Meiller, T.F.; Calderone, R. The histidine kinases of *Candida albicans*: regulation of cell wall mannan biosynthesis. *FEMS Yeast Res.*, **2004**, 4, 409-416, doi:10.1016/S1567-1356(03)00201-0.
- Kuhn, D.M.; Chandra, J.; Mukherjee, P.K.; Ghannoum, M.A. Comparison of Biofilms Formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on Bioprosthetic Surfaces. *Infect. Immun.*, **2002**, 70: 878-888, doi:10.1128/IAI.70.2.878-888.2002.
- Kuhn, D.M.; Mukherjee, P.K.; Clark, T.A.; Pujol, C.; Chandra, J. és mtsi. *Candida parapsilosis* characterization in an outbreak setting. *Emerg. Infect. Dis.*, **2004**, 10: 1074-1081, doi:10.3201/eid1006.030873.
- Kuranda, K.; Leberre, V.; Sokol, S.; Palamarczyk, G.; François, J. Investigating the caffeine effects in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* brings new insights into the connection between TOR, PKC and Ras/cAMP signalling pathways. *Mol. Microbiol.*, **2006**, 61: 1147-1166, doi:10.1111/j.1365-2958.2006.05300.x.
- Kurtz, M.B.; Cortelyou, M.W.; Miller, S.M.; Lai, M.; Kirsch, D.R. Development of autonomously replicating plasmids for *Candida albicans*. *Mol. Cell. Biol.*, **1987**, 7: 209-217, doi:10.1128/MCB.7.1.209.

- Kurtzman, C.P.; Fell J.W.; Boekhout T. Definition, Classification and Nomenclature of the Yeasts. In Kurtzman, C.P.; Fell J.W.; Boekhout T. (szerk.) The Yeasts, a Taxonomic Study, 5th Edition, Vol. 1., **2011**, Elsevier.
- Lachance, M.-A.; Boekhout, T.; Scorzetti, G.; Fell, J.W.; Kurtzman C.P. *Candida* Berkhout (1923). In Kurtzman, C.P.; Fell J.W.; Boekhout T. (szerk.) The Yeasts, a Taxonomic Study, 5th Edition, Vol. 1., **2011**, Elsevier.
- Lackey, E.; Vipulanandan, G.; Childers, D.S.; Kadosh, D. Comparative evolution of morphological regulatory functions in *Candida* species. *Eukaryot. Cell*, **2013**, 12: 1356-1368, doi:10.1128/EC.00164-13.
- Laffey, S.F.; Butler, G. Phenotype switching affects biofilm formation by *Candida parapsilosis*. *Microbiology*, **2005**, 151(Pt 4): 1073-1081.
- Lam, J.; Herant, M.; Dembo, M.; Heinrich, V. Baseline mechanical characterization of J774 macrophages. *Biophys. J.*, **2009**, 96: 248-254, doi:10.1529/biophysj.108.139154.
- Landrieu, I.; Vandenbol, M.; Härtlein, M.; Portetelle, D. Mitochondrial asparaginyl-tRNA synthetase is encoded by the yeast nuclear gene YCR24c. *Eur. J. Biochem.*, **1997**, 243, 268-273, doi:10.1111/j.1432-1033.1997.0268a.x.
- Lee, P.Y.; Gam, L.H.; Yong, V.C.; Rosli, R.; Ng, K.P.; Chong, P.P. Identification of immunogenic proteins of *Candida parapsilosis* by serological proteome analysis. *J. Appl. Microbiol.*, **2014**, 116: 999-1009, doi:https://doi.org/10.1111/jam.12408.
- Leidich, S.D.; Ibrahim, A.S.; Fu, Y.; Koul, A.; Jessup, C. és mtsi. Cloning and disruption of *caPLB1*, a phospholipase B gene involved in the pathogenicity of *Candida albicans*. *J. Biol. Chem.*, **1998**, 273: 26078-26086, doi:10.1074/jbc.273.40.26078.
- Laprade, L.; Boyartchuk, V.L.; Dietrich, W.F.; Winston, F. Spt3 plays opposite roles in filamentous growth in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans* and is required for *C. albicans* virulence. *Genetics*, **2002**, 161, 509–519.
- Levin, D.E. Cell wall integrity signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **2005**, 69: 262-291, doi:10.1128/MMBR.69.2.262-291.2005.
- Lewis, R.E. Overview of the changing epidemiology of candidemia. *Curr Med Res Opin.*, **2009**, 25: 1732-1740.

- Lin, D.; Wu, L.C.; Rinaldi, M.G.; Lehmann, P.F. Three distinct genotypes within *Candida parapsilosis* from clinical sources. *J. Clin. Microbiol.*, **1995**, 33: 1815-1821, doi:10.1128/JCM.33.7.1815-1821.1995.
- Lin, M.Y.; Carmeli, Y.; Zumsteg, J.; Flores, E.L.; Tolentino, J.; Sreeramoju, P.; Weber, S.G. Prior antimicrobial therapy and risk for hospital-acquired *Candida glabrata* and *Candida krusei* fungemia: a case-case-control study. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2005**, 49: 4555-4560, doi:10.1128/AAC.49.11.4555-4560.2005.
- Linden, J.R.; De Paepe, M.E.; Laforce-Nesbitt, S.S.; Bliss, J.M. Galectin-3 plays an important role in protection against disseminated candidiasis. *Med. Mycol.*, **2013b**, 51: 641-651, doi:10.3109/13693786.2013.770607.
- Linden, J.R.; Kunkel, D.; Laforce-Nesbitt, S.S.; Bliss, J.M. The role of galectin-3 in phagocytosis of *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* by human neutrophils. *Cellular Microbiology*, **2013a**, 15(7): 1127-1142. doi:10.1111/cmi.12103.
- Liu, H.; Köhler, J.; Fink, G.R. Suppression of hyphal formation in *Candida albicans* by mutation of a STE12 homolog. *Science*, **1994**, 266, 1723-1726, doi:10.1126/science.7992058.
- Liu, Y.; Filler, S.G. *Candida albicans* Als3, a multifunctional adhesin and invasin. *Eukaryot Cell*, **2011**, 10(2): 168-173.
- Liu, Y.; Kern, J.T.; Walker, J.R.; Johnson, J.A.; Schultz, P.G.; Luesch, H. A genomic screen for activators of the antioxidant response element. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2007**, 104: 5205-5210, doi:10.1073/pnas.0700898104.
- Livak, K. J. és Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, **2001**, 25(4): 402-408.
- Logue, M.E.; Wong, S.; Wolfe, K.H.; Butler, G. A genome sequence survey shows that the pathogenic yeast *Candida parapsilosis* has a defective MTL_{a1} allele at its mating type locus. *Eukaryot. Cell*, **2005**, 4: 1009-1017, doi:10.1128/EC.4.6.1009-1017.2005.
- Lombardi, L.; Turner, S.A.; Zhao, F.; Butler, G. Gene editing in clinical isolates of *Candida parapsilosis* using CRISPR/Cas9. *Sci. Rep.*, **2017**, 7: 8051, doi:10.1038/s41598-017-08500-1.

- Lu, Y.; Su, C.; Solis, N.V.; Filler, S.G.; Liu, H. Synergistic regulation of hyphal elongation by hypoxia, CO₂, and nutrient conditions controls the virulence of *Candida albicans*. *Cell Host Microbe*, **2013**, 14: 499-509, doi:10.1016/j.chom.2013.10.008.
- Lupetti, A.; Tavanti, A.; Davini, P.; Ghelardi, E.; Corsini, V. és mtsi. Horizontal Transmission of *Candida parapsilosis*; Candidemia in a Neonatal Intensive Care Unit. *J. Clin. Microbiol.*, **2002**, 40: 2363-2369, doi:10.1128/JCM.40.7.2363-2369.2002.
- Magtanong, L.; Ho, C.H.; Barker, S.L.; Jiao, W.; Baryshnikova, A. és mtsi. Dosage suppression genetic interaction networks enhance functional wiring diagrams of the cell. *Nat. Biotechnol.*, **2011**, 29: 505-511, doi:10.1038/nbt.1855.
- Malani, A.; Hmoud, J.; Chiu, L.; Carver, P.L.; Bielaczyc, A. és mtsi. *Candida glabrata* fungemia: experience in a tertiary care center. *Clin. Infect. Dis.*, **2005**, 41(7): 975-981.
- Mannhaupt, G.; Pohlenz, H.D.; Seefluth, A.K.; Pilz, U.; Feldmann, H. Yeast homoserine kinase. Characteristics of the corresponding gene, THR1, and the purified enzyme, and evolutionary relationships with other enzymes of threonine metabolism. *Eur. J. Biochem.*, **1990**, 191, 115-122, doi:10.1111/j.1432-1033.1990.tb19100.x.
- Matee, M.I.; Scheutz, F.; Moshy, J. Occurrence of oral lesions in relation to clinical and immunological status among HIV-infected adult Tanzanians. *Oral Dis.*, **2000**, 6(2): 106-111.
- Measday, V.; Hieter, P. Synthetic dosage lethality. In Guide to Yeast Genetics and Molecular and Cell Biology - Part B; Guthrie, C., Fink, G.R.B.T.-M. in E., Eds.; Academic Press, **2002**; Vol. 350, pp. 316-326 ISBN 0076-6879.
- Meletiadiis, J.; Curfs-Breuker, I.; Meis, J.F.; Mouton, J.W. *In Vitro* Antifungal Susceptibility Testing of *Candida* Isolates with the EUCAST Methodology, a New Method for ECOFF Determination. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2017**, 61, e02372-16, doi:10.1128/AAC.02372-16.
- Min, K.; Ichikawa, Y.; Woolford, C.A.; Mitchell, A.P. *Candida albicans* Gene Deletion with a Transient CRISPR-Cas9 System. *mSphere*, **2016**, 1, e00130-16, doi:10.1128/mSphere.00130-16.
- Mitchell, D.A.; Vasudevan, A.; Linder, M.E.; Deschenes, R.J. Protein palmitoylation by a family of DHHC protein S-acyltransferases. *J. Lipid Res.*, **2006**, 47, 1118-1127, doi:10.1194/jlr.R600007-JLR200.

- Miyakawa, Y. Identification of a *Candida albicans* homologue of the PHO85 gene, a negative regulator of the PHO system in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **2000**, 16, 1045-1051, doi:10.1002/1097-0061(200008)16:11.
- Mora-Montes, H.M.; Bates, S.; Netea, M.G.; Castillo, L.; Brand, A. és mtsi. A multifunctional mannosyltransferase family in *Candida albicans* determines cell wall mannan structure and host-fungus interactions. *J. Biol. Chem.*, **2010**, 285: 12087-12095, doi:10.1074/jbc.M109.081513.
- Mora-Montes, H.M.; Bates, S.; Netea, M.G.; Díaz-Jiménez, D.F.; López-Romero, E. és mtsi. Endoplasmic reticulum alpha-glycosidases of *Candida albicans* are required for N glycosylation, cell wall integrity, and normal host-fungus interaction. *Eukaryot. Cell*, **2007**, 6: 2184-2193, doi:10.1128/EC.00350-07.
- Mora-Montes, H.M.; Netea, M.G.; Ferwerda, G.; Lenardon, M.D.; Brown, G.D. és mtsi. Recognition and Blocking of Innate Immunity Cells by *Candida albicans*. Chitin. *Infect. Immun.*, **2011**, 79: 1961-1970, doi:10.1128/IAI.01282-10.
- Mortimer, R.K.; Contopoulou, C.R.; King, J.S. Genetic and physical maps of *Saccharomyces cerevisiae*. Edition 11. *Yeast*, **1992**, 8, 817-902, doi:10.1002/yea.320081002.
- Mortimer, R.K.; Hawthorne, D.C. Genetic mapping in *Saccharomyces*. *Genetics*, **1966**, 53, 165-173.
- Moudgal, V.; Little, T.; Boikov, D.; Vazquez, J.A. Multiechinocandin- and Multiazole-Resistant *Candida parapsilosis*; Isolates Serially Obtained during Therapy for Prosthetic Valve Endocarditis. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2005**, 49: 767-769, doi:10.1128/AAC.49.2.767-769.2005.
- Moura, D.J.; Castilhos, B.; Immich, B.F.; Cañedo, A.D.; Henriques, J.A.P.; Lenz, G.; Saffi, J. Kin3 protein, a NIMA-related kinase of *Saccharomyces cerevisiae*, is involved in DNA adduct damage response. *Cell Cycle*, **2010**, 9: 2220-2229, doi:10.4161/cc.9.11.11892.
- Moyes, D.L.; Wilson, D.; Richardson, J.P.; Mogavero, S.; Tang, S.X. és mtsi. Candidalysin is a fungal peptide toxin critical for mucosal infection. *Nature*, **2016**, 532: 64-68, doi:10.1038/nature17625.
- Muhlschlegel, F.A.; Fonzi, W.A. PHR2 of *Candida albicans* encodes a functional homolog of the pH-regulated gene PHR1 with an inverted pattern of pH-dependent expression. *Mol. Cell Biol.*, **1997**, 17(10): 5960-5967.

- Mukherjee, P.K.; Sheehan, D.; Puzniak, L.; Schlamm, H.; Ghannoum, M.A. Echinocandins: are they all the same? *J. Chemother.*, **2011**, 23: 319-325, doi:10.1179/joc.2011.23.6.319.
- Muller, H.J. Further studies on the nature and causes of gene mutations. *Proceedings of the 6th International Congress on Genetics*, Ithaca, NY, **1932**, pp. 213-255.
- Munro, C.A.; Bates, S.; Buurman, E.R.; Hughes, H.B.; MacCallum, D.M. és mtsi. Mnt1p and Mnt2p of *Candida albicans* Are Partially Redundant α -1,2-Mannosyltransferases That Participate in O-Linked Mannosylation and Are Required for Adhesion and Virulence. *J. of Biol. Chem.*, **2005**, 280:2, 1051-1060.
- Murad, A.M.; Leng, P.; Straffon, M.; Wishart, J.; Macaskill, S. és mtsi. NRG1 represses yeast-hypha morphogenesis and hypha-specific gene expression in *Candida albicans*. *EMBO J.*, **2001**, 20: 4742-4752, doi:10.1093/emboj/20.17.4742.
- Naglik, J.R.; Challacombe, S.J.; Hube, B. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev.*, **2003**, 67(3): 400-428.
- Navarro-García, F.; Sánchez, M.; Nombela, C.; Pla, J. Virulence genes in the pathogenic yeast *Candida albicans*. *FEMS Microbiol. Rev.*, **2001**, 25: 245-268, doi:10.1111/j.1574-6976.2001.tb00577.x.
- Németh, T.; Papp, C.; Vagvolgyi, C.; Chakraborty, T.; Gacser, A. Identification and characterization of a neutral locus for knock-in purposes in *C. parapsilosis*. *Front. Microbiol.*, **2020**, 11: 1194.
- Németh, T.; Tóth, A.; Szenzenstein, J.; Horváth, P.; Nosanchuk, J.D. és mtsi. Characterization of Virulence Properties in the *C. parapsilosis Sensu Lato Species*. *PLoS One*, **2013**, 8, e68704, doi:10.1371/journal.pone.0068704.
- Netea, M.G.; Joosten, L.A.B.; van der Meer, J.W.M.; Kullberg, B.-J.; van de Veerdonk, F.L. Immune defence against *Candida* fungal infections. *Nat. Rev. Immunol.*, **2015**, 15: 630-642, doi:10.1038/nri3897.
- Nguyen, N.; Quail, M.M.F.; Hernday, A.D. An Efficient, Rapid, and Recyclable System for CRISPR-Mediated Genome Editing in *Candida albicans*. *mSphere*, **2017**, 2, e00149-17, doi:10.1128/mSphereDirect.00149-17.
- Nishisaka, N.; Morse, P.; Jones, R.F.; Wang, C.Y.; Haas, G.P. Murine animal model. *Methods Mol. Med.*, **2001**, 53: 255-264, doi:10.1385/1-59259-144-2:255.

- Nobile, C.J.; Bruno, V.M.; Richard, M.L.; Davis, D.A.; Mitchell, A.P. Genetic control of chlamydospore formation in *Candida albicans*. *Microbiology*, **2003**, *149*, 3629-3637, doi:10.1099/mic.0.26640-0.
- Nobile, C.J.; Fox, E.P.; Nett, J.E.; Sorrells, T.R.; Mitrovich, Q.M. és mtsi. A recently evolved transcriptional network controls biofilm development in *Candida albicans*. *Cell*, **2012**, *148*: 126-138, doi:10.1016/j.cell.2011.10.048.
- Noble, S.M.; French, S.; Kohn, L.A.; Chen, V.; Johnson, A.D. Systematic screens of a *Candida albicans* homozygous deletion library decouple morphogenetic switching and pathogenicity. *Nat. Genet.*, **2010**, *42*: 590-598, doi:10.1038/ng.605.
- Noble, S.M.; Johnson, A.D. Strains and strategies for large-scale gene deletion studies of the diploid human fungal pathogen *Candida albicans*. *Eukaryot. Cell*, **2005**, *4*: 298-309, doi:10.1128/EC.4.2.298-309.2005.
- Nogi, Y.; Yano, R.; Dodd, J.; Carles, C.; Nomura, M. Gene *RRN4* in *Saccharomyces cerevisiae* encodes the A12.2 subunit of RNA polymerase I and is essential only at high temperatures. *Mol. Cell. Biol.*, **1993**, *13*: 114-122, doi:10.1128/MCB.13.1.114.
- Nosek, J.; Adamíková, L.; Zemanová, J.; Tomáška, L.; Zufferey, R.; Mamoun, C. Genetic manipulation of the pathogenic yeast *Candida parapsilosis*. *Curr. Genet.*, **2002**, *42*: 27-35, doi:10.1007/s00294-002-0326-7.
- Nosek, J.; Dinouël, N.; Kovac, L.; Fukuhara, H. Linear mitochondrial DNAs from yeasts: telomeres with large tandem repetitions. *Mol. Gen. Genet.*, **1995**, *247*: 61-72, doi:10.1007/BF00425822.
- Nosek, J.; Holesova, Z.; Kosa, P.; Gacser, A.; Tomaska, L. Biology and genetics of the pathogenic yeast *Candida parapsilosis*. *Curr. Genet.*, **2009**, *55*: 497-509, doi:10.1007/s00294-009-0268-4.
- Nucci, M.; Marr, K.A. Emerging fungal diseases. *Clin. Infect. Dis.*, **2005**, *41*: 521-526, doi:10.1086/432060.
- O'Connor, L.; Caplice, N.; Coleman, D.C.; Sullivan, D.J.; Moran, G.P. Differential filamentation of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* is governed by nutrient regulation of UME6 expression. *Eukaryot. Cell*, **2010**, *9*: 1383-1397, doi:10.1128/EC.00042-10.

- Odds, F.C.; Bernaerts, R. CHROMagar *Candida*, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important *Candida* species. *J. Clin. Microbiol.*, **1994**, 32: 1923-1929, doi:10.1128/jcm.32.8.1923-1929.1994.
- Odds, F.C.; Brown, A.J.P.; Gow, N.A.R. Antifungal agents: mechanisms of action. *Trends Microbiol.*, **2003**, 11: 272-279, doi:https://doi.org/10.1016/S0966-842X(03)00117-3.
- Pais, T.M.; Foulquié-Moreno, M.R.; Hubmann, G.; Duitama, J.; Swinnen, S. és msti. Comparative polygenic analysis of maximal ethanol accumulation capacity and tolerance to high ethanol levels of cell proliferation in yeast. *PLoS Genet.*, **2013**, 9, e1003548, doi:10.1371/journal.pgen.1003548.
- Palatnik, J.F.; Allen, E.; Wu, X.; Schommer, C.; Schwab, R. és msti. Control of leaf morphogenesis by microRNAs. *Nature*, **2003**, 425: 257-263, doi:10.1038/nature01958.
- Pammi, M.; Holland, L.; Butler, G.; Gacser, A.; Bliss, J.M. *Candida parapsilosis* is a significant neonatal pathogen: A systematic review and meta-analysis. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, **2013**, 32: e206–e216, doi:10.1097/INF.0b013e3182863a1c.
- Papon, N.; Courdavault, V.; Clastre, M.; Bennett, R.J. Emerging and emerged pathogenic *Candida* species: beyond the *Candida albicans* paradigm. *PLoS Pathog.*, **2013**, 9, e1003550, doi:10.1371/journal.ppat.1003550.
- Papp, C.; Kocsis, K.; Tóth, R.; Bodai, L.; Willis, J.R. és mtsi. Echinocandin-induced microevolution of *Candida parapsilosis* influences virulence and abiotic stress tolerance. *mSphere*, **2018**, 14;3(6):e00547-18. doi:10.1128/mSphere.00547–18.
- Pappas, P.G. Invasive Candidiasis. *Infect. Dis. Clin. North Am.*, **2006**, 20: 485-506, doi:https://doi.org/10.1016/j.idc.2006.07.004.
- Pappas, P.G.; Rex, J.H.; Sobel, J.D.; Filler, S.G.; Dismukes, W.E.; Walsh, T.J.; Edwards, J.E. Guidelines for Treatment of Candidiasis. *Clin. Infect. Dis.*, **2004**, 38(2): 161-189. doi:10.1086/380796.
- Paramythiotou, E.; Frantzeskaki, F.; Flevari, A.; Armaganidis, A.; Dimopoulos, G. Invasive Fungal Infections in the ICU: How to Approach, How to Treat. *Molecules*, **2014**, 19: 1085-1119, doi:10.3390/molecules19011085.

- Park, S.; Kelly, R.; Nielsen, K.J.; Robles, J.; Hsu, M.-J. és mtsi. Specific Substitutions in the Echinocandin Target *Fks1p* Account for Reduced Susceptibility of Rare Laboratory and Clinical *Candida* sp. Isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2005**, 49: 3264-3273, doi:10.1128/AAC.49.8.3264-3273.2005.
- Park, Y-N.; Morschhäuser, J. Tetracycline-Inducible Gene Expression and Gene Deletion in *Candida albicans*. *Eukaryot. Cell*, **2005**, 4: 1328-1342, doi:10.1128/EC.4.8.1328-1342.2005.
- Pelletier, R.; Alarie, I.; Lagacé, R.; Walsh, T.J.; Emergence of disseminated candidiasis caused by *Candida krusei* during treatment with caspofungin: Case report and review of literature, *Med. Mycol.*, **2005**, 43(6): 559-564. <https://doi.org/10.1080/13693780500220415>.
- Percival-Smith, A.; Segall, J. Characterization and mutational analysis of a cluster of three genes expressed preferentially during sporulation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, **1986**, 6: 2443-2451, doi:10.1128/mcb.6.7.2443.
- Pereira, T.; de Barros, P.; Fugisaki, L.; Rossoni, R.; Ribeiro, F. és msti. Recent advances in the use of *Galleria mellonella* model to study immune responses against human pathogens. *J. Fungi*, **2018**, 4: 128, doi:10.3390/jof4040128.
- Pérez-García, L.A.; Csonka, K.; Flores-Carreón, A.; Estrada-Mata, E.; Mellado-Mojica, E.; Németh, T.; López-Ramírez, L.A.; Toth, R.; López, M.G.; Vizler, C. és mtsi. Role of Protein Glycosylation in *Candida parapsilosis* Cell Wall Integrity and Host Interaction. *Front. Microbiol.*, **2016**, 7: 306.
- Pfaller, M.A. Antifungal Drug Resistance: Mechanisms, Epidemiology, and Consequences for Treatment. *Am. J. Med.*, **2012**, 125: S3-S13, doi:<https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2011.11.001>.
- Pfaller, M.A.; Boyken, L.; Hollis, R.J.; Kroeger, J.; Messer, S.A.; Tendolkar, S.; Diekema, D.J. *In vitro* susceptibility of invasive isolates of *Candida* spp. to anidulafungin, caspofungin, and micafungin: Six years of global surveillance. *J. Clin. Microbiol.*, **2008**, 46: 150-156, doi:10.1128/JCM.01901-07.
- Pfaller, M.A.; Diekema, D.J. Epidemiology of invasive *Candidiasis*: A persistent public health problem. *Clin. Microbiol. Rev.*, **2007**, 20: 133-163, doi:10.1128/CMR.00029-06.

- Pfaller, M.A.; Diekema, D.J. Rare and emerging opportunistic fungal pathogens: concern for resistance beyond *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. *J. Clin. Microbiol.*, **2004**, 42: 4419-4431, doi:10.1128/JCM.42.10.4419-4431.2004.
- Pfaller, M.A.; Houston, A.; Coffmann, S. Application of CHROMagar *Candida* for rapid screening of clinical specimens for *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, and *Candida (Torulopsis) glabrata*. *J. Clin. Microbiol.*, **1996**, 34: 58-61, doi:10.1128/jcm.34.1.58-61.1996.
- Pfaller, M.A.; Messer, S.A.; Hollis, R.J. Variations in DNA subtype, antifungal susceptibility, and slime production among clinical isolates of *Candida parapsilosis*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, **1995**, 21: 9-14, doi:10.1016/0732-8893(94)00114-c.
- Pincus, D.H.; Orena, S.; Chatellier, S. Yeast identification--past, present, and future methods. *Med. Mycol.*, **2007**, 45: 97-121, doi:10.1080/13693780601059936.
- Pinhati, H.M.S.; Casulari, L.A.; Souza, A.C.R.; Siqueira, R.A.; Damasceno, C.M.G.; Colombo, A.L. Outbreak of candidemia caused by fluconazole resistant *Candida parapsilosis* strains in an intensive care unit. *BMC Infect. Dis.*, **2016**, 16: 433, doi:10.1186/s12879-016-1767-9.
- Pongrácz, J.; Juhasz, E.; Ivan, M.; Kristof, K. Significance of yeasts in bloodstream infection: Epidemiology and predisposing factors of Candidaemia in adult patients at a university hospital (2010-2014). *Acta Microbiol. Immunol. Hung.*, **2015**, 62(3): 317-329.
- Prakash, L. Effect of Genes Controlling Radiation Sensitivity on Chemically Induced Mutations in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **1976**, 83, 285-301.
- Prelich, G. Gene overexpression: uses, mechanisms, and interpretation. *Genetics*, **2012**, 190: 841-854, doi:10.1534/genetics.111.136911.
- Pryszcz, L.P.; Németh, T.; Gácsér, A.; Gabaldón, T. Unexpected genomic variability in clinical and environmental strains of the pathogenic yeast *Candida parapsilosis*. *Genome Biol. Evol.*, **2013**, 5: 2382-2392, doi:10.1093/gbe/evt185.
- Qi, L.; Fan, W.; Xia, X.; Yao, L.; Liu, L. és mtsi. Nosocomial outbreak of *Candida parapsilosis sensu stricto* fungaemia in a neonatal intensive care unit in China. *J. Hosp. Infect.*, **2018**, 100: e246-e252, doi:10.1016/j.jhin.2018.06.009.

- Qin, Y.; Zhang, L.; Xu, Z.; Zhang, J.; Jiang, Y.-Y. és mtsi. Innate immune cell response upon *Candida albicans* infection. *Virulence*, **2016**, 7: 512-526, doi:10.1080/21505594.2016.1138201.
- Quindós, G. Epidemiology of candidaemia and invasive candidiasis. A changing face. *Rev. Iberoam. de Micol.*, **2014**, 31(1): 42-48. doi:10.1016/j.riam.2013.10.001.
- Ralph, P.; Nakoinz, I. Phagocytosis and cytolysis by a macrophage tumour and its cloned cell line. *Nature*, **1975**, 257: 393-394, doi:10.1038/257393a0.
- Ram, A.F.J.; Klis, F.M. Identification of fungal cell wall mutants using susceptibility assays based on Calcofluor white and Congo red. *Nat. Protoc.*, **2006**, 1: 2253-2256, doi:10.1038/nprot.2006.397.
- Raschmanová, H.; Weninger, A.; Glieder, A.; Kovar, K.; Vogl, T. Implementing CRISPR-Cas technologies in conventional and non-conventional yeasts: Current state and future prospects. *Biotechnol. Adv.*, **2018**, 36: 641-665, doi:https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.01.006.
- Reuss, O.; Vik, A.; Kolter, R.; Morschhäuser, J. The SAT1 flipper, an optimized tool for gene disruption in *Candida albicans*. *Gene*, **2004**, 341: 119-127, doi:10.1016/j.gene.2004.06.021.
- Rine, J. Gene overexpression in studies of *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Enzymol.*, **1991**, 194: 239-251, doi:10.1016/0076-6879(91)94019-9.
- Rine, J.; Hansen, W.; Hardeman, E.; Davis, R.W. Targeted selection of recombinant clones through gene dosage effects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1983**, 80: 6750-6754, doi:10.1073/pnas.80.22.6750.
- Roemer, T.; Jiang, B.; Davison, J.; Ketela, T.; Veillette, K. és mtsi. Large-scale essential gene identification in *Candida albicans* and applications to antifungal drug discovery. *Mol. Microbiol.*, **2003**, 50: 167-181, doi:https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03697.x.
- Roemer, T.; Krysan, D.J. Antifungal Drug Development: Challenges, Unmet Clinical Needs, and New Approaches. *Cold Spring Harbor Persp. in Med.*, **2014**, 4(5): a019703-a019703. doi:10.1101/cshperspect.a019703.
- Romani, L. Immunity to fungal infections. *Nature Rev. Immuno.*, **2011**, 11(4): 275-288. doi:10.1038/nri2939.

- Rorth, P.; Szabo, K.; Bailey, A.; Lavery, T.; Rehm, J. és mtsi. Systematic gain-of-function genetics in *Drosophila*. *Development*, **1998**, 125: 1049-1057.
- Rose, A.B.; Broach, J.R. Propagation and expression of cloned genes in yeast: 2-microns circle-based vectors. *Methods Enzymol.*, **1990**, 185: 234-279, doi:10.1016/0076-6879(90)85024-i.
- Rothé, B.; Saliou, J.-M.; Quinternet, M.; Back, R.; Tiotiu, D. és mtsi. Protein Hit1, a novel box C/D snoRNP assembly factor, controls cellular concentration of the scaffolding protein Rsa1 by direct interaction. *Nucleic Acids Res.*, **2014**, 42, 10731-10747, doi:10.1093/nar/gku612.
- Sahni, N.; Yi, S.; Daniels, K.J.; Huang, G.; Srikantha, T.; Soll, D.R. Tec1 Mediates the Pheromone Response of the White Phenotype of *Candida albicans*: Insights into the Evolution of New Signal Transduction Pathways. *PLOS Biol.*, **2010**, 8, e1000363.
- Sai, S.; Holland, L.M.; McGee, C.F.; Lynch, D.B.; Butler, G. Evolution of mating within the *Candida parapsilosis* species group. *Eukaryot. Cell*, **2011**, 10: 578-587, doi:10.1128/EC.00276-10.
- Salazar, F.; Brown, G.D. Antifungal Innate Immunity: A Perspective from the Last 10 Years. *J. of Innate Immun.*, **2018**, 10: 373-397. doi:10.1159/000488539.
- Sanz, A.B.; García, R.; Rodríguez-Peña, J.M.; Arroyo, J. The CWI Pathway: Regulation of the Transcriptional Adaptive Response to Cell Wall Stress in Yeast. *J. fungi (Basel, Switzerland)*, **2017**, 4: 1, doi:10.3390/jof4010001.
- Saporito-Irwin, S.M.; Birse, C.E.; Sypherd, P.S.; Fonzi, W.A. *PHR1*, a pH-regulated gene of *Candida albicans*, is required for morphogenesis. *Mol. Cell Biol.*, **1995**, 15(2): 601-613.
- Sassanfar, M.; Samson, L. Identification and preliminary characterization of an O6-methylguanine DNA repair methyltransferase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, **1990**, 265: 20-25.
- Schelenz, S.; Hagen, F.; Rhodes, J.L.; Abdolrasouli, A.; Chowdhary, A. és mtsi. First hospital outbreak of the globally emerging *Candida auris* in a European hospital. *Antimicrob. Resist. Infect. Control*, **2016**, 5: 35, doi:10.1186/s13756-016-0132-5.
- Scherz, K.; Bojsen, R.; Gro, L.; Weiss, M.; Lisby, M. és mtsi. Genetic basis for *Saccharomyces cerevisiae* biofilm in liquid medium. *G3(Bethesda)*, **2014**, 9;4(9):1671-80 doi:10.1534/g3.114.010892.

- Schillig, R.; Morschhäuser, J. Analysis of a fungus-specific transcription factor family, the *Candida albicans* zinc cluster proteins, by artificial activation. *Mol. Microbiol.*, **2013**, 89: 1003-1017, doi:10.1111/mmi.12327.
- Schubert, S.; Barker, K.S.; Znaidi, S.; Schneider, S.; Dierolf, F. és mtsi. Regulation of efflux pump expression and drug resistance by the transcription factors *Mrr1*, *Upc2*, and *Cap1* in *Candida albicans*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2011**, 55: 2212-2223, doi:10.1128/AAC.01343-10.
- Schwarz Müller, T.; Ma, B.; Hiller, E.; Istel, F.; Tscherner, M. és mtsi. Systematic phenotyping of a large-scale *Candida glabrata* deletion collection reveals novel antifungal tolerance genes. *PLoS Pathog.*, **2014**, 10: e1004211-e1004211, doi:10.1371/journal.ppat.1004211.
- Schweizer, A.; Rupp, S.; Taylor, B.N.; Röllinghoff, M.; Schröppel, K. The TEA/ATTS transcription factor CaTec1p regulates hyphal development and virulence in *Candida albicans*. *Mol. Microbiol.*, **2000**, 38, 435-445, doi:10.1046/j.1365-2958.2000.02132.x.
- Sellam, A.; Chaillot, J.; Mallick, J.; Tebbji, F.; Richard Albert, J. és mtsi. The p38/HOG stress-activated protein kinase network couples growth to division in *Candida albicans*. *PLoS Genet.*, **2019**, 15, e1008052, doi:10.1371/journal.pgen.1008052.
- Serrano-Fujarte, I.; López-Romero, E.; Cuéllar-Cruz, M. Moonlight-like proteins of the cell wall protect sessile cells of *Candida* from oxidative stress. *Microb. Pathog.*, **2016**, 90: 22-33, doi:https://doi.org/10.1016/j.micpath.2015.10.001.
- Sherlock, G.; Bahman, A.M.; Mahal, A.; Shieh, J.C.; Ferreira, M.; Rosamond, J. Molecular cloning and analysis of CDC28 and cyclin homologues from the human fungal pathogen *Candida albicans*. *Mol. Gen. Genet.*, **1994**, 245, 716-723, doi:10.1007/BF00297278.
- Shibata, N.; Ikuta, K.; Imai, T.; Satoh, Y.; Satoh, R. és mtsi. Existence of branched side chains in the cell wall mannan of pathogenic yeast, *Candida albicans*. Structure-antigenicity relationship between the cell wall mannans of *Candida albicans* and *Candida parapsilosis*. *J. Biol. Chem.*, **1995**, 270: 1113-1122, doi:10.1074/jbc.270.3.1113.
- Shi, Q.-M.; Wang, Y.-M.; Zheng, X.-D.; Lee, R.T.H.; Wang, Y. Critical role of DNA checkpoints in mediating genotoxic-stress-induced filamentous growth in *Candida albicans*. *Mol. Biol. Cell*, **2007**, 18, 815-826, doi:10.1091/mbc.e06-05-0442.

- Shirayama, M.; Matsui, Y.; Tanaka, K.; Toh-e, A. Isolation of a CDC25 family gene, MSI2/LTE1, as a multicopy suppressor of *ira1*. *Yeast*, **1994**, *10*, 451-461, doi:10.1002/yea.320100404.
- Shoham, S.; Levitz, S.M. The immune response to fungal infections. *Br. J. Haematol.* **2005**, *129*: 569-582, doi:10.1111/j.1365-2141.2005.05397.x.
- Silva, S.; Henriques, M.; Martins, A.; Oliveira, R.; Williams, D.; Azeredo, J. Biofilms of non-*Candida albicans* *Candida* species: quantification, structure and matrix composition. *Med. Mycol.*, **2009**, *47*: 681-689, doi:10.3109/13693780802549594.
- Silva, S.; Negri, M.; Henriques, M.; Oliveira, R.; Williams, D.W.; Azeredo, J. Adherence and biofilm formation of non-*Candida albicans* *Candida* species. *Trends Microbiol.*, **2011**, *19*: 241-247, doi:https://doi.org/10.1016/j.tim.2011.02.003.
- Singh, D.K.; Németh, T.; Papp, A.; Tóth, R.; Lukácsi, S. és mtsi. Functional characterization of secreted aspartyl proteases in *Candida parapsilosis*. *Msphere*, **2019**, *4*, e00484-19.
- Sinkó, J.; Sulyok, M.; Denning, D.W. Burden of serious fungal diseases in Hungary. *Mycoses*, **2015**, *58*: 29-33. doi:10.1111/myc.12385.
- Skrzypek M.S.; Binkley J.; Binkley G.; Miyasato S.R.; Simison M.; Sherlock G. The *Candida* Genome Database (CGD): incorporation of Assembly 22, systematic identifiers and visualization of high throughput sequencing data. *Nucleic Acids Res.*, **2017**, *45* (D1): D592-D596.
- Slater, J.L.; Gregson, L.; Denning, D.W.; Warn, P.A. Pathogenicity of *Aspergillus fumigatus* mutants assessed in *Galleria mellonella* matches that in mice. *Med. Mycol.*, **2011**, *49*: S107-S113, doi:10.3109/13693786.2010.523852.
- Sobel, J.D. Vulvovaginal candidosis. *Lancet*, **2007**, *369*(9577): 1961-1971.
- Sopko, R.; Huang, D.; Preston, N.; Chua, G.; Papp, B. és mtsi. Mapping pathways and phenotypes by systematic gene overexpression. *Mol. Cell*, **2006**, *21*: 319-330, doi:10.1016/j.molcel.2005.12.011.
- Soriano, M. Plasmids 101: Gateway Cloning, **2017**, <https://blog.addgene.org/plasmids-101-gateway-cloning>.
- Spivak, E.S.; Hanson, K.E. *Candida auris*: an Emerging Fungal Pathogen. *J. Clin. Microbiol.*, **2018**, *56*, e01588-17, doi:10.1128/JCM.01588-17.

- Staab, J.F.; Bradway, S.D.; Fidel, P.L.; Sundstrom, P. Adhesive and mammalian transglutaminase substrate properties of *Candida albicans* Hwp1. *Science*, **1999**, 283(5407): 1535-1538.
- Staib, P.; Morschhäuser, J. Chlamydospore formation in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* – an enigmatic developmental programme. *Mycoses*, **2007**, 50: 1-12, doi:<https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2006.01308.x>.
- Stovicek, V.; Holkenbrink, C.; Borodina, I. CRISPR/Cas system for yeast genome engineering: advances and applications. *FEMS Yeast Res.*, **2017**, 17:5, doi:10.1093/femsyr/fox030.
- Swanson, M.S.; Malone, E.A.; Winston, F. *SPT5*, an essential gene important for normal transcription in *Saccharomyces cerevisiae*, encodes an acidic nuclear protein with a carboxy-terminal repeat. *Mol. Cell. Biol.*, **1991**, 11, 4286, doi:10.1128/mcb.11.8.4286.
- Swoboda, R.K.; Bertram, G.; Hollander, H.; Greenspan, D.; Greenspan, J.S.; Gow, N.A.; Gooday, G.W.; Brown, A.J. Glycolytic enzymes of *Candida albicans* are nonubiquitous immunogens during candidiasis. *Infect. Immun.*, **1993**, 61, 4263-4271, doi:10.1128/IAI.61.10.4263-4271.1993.
- Tavanti, A.; Davidson, A.D.; Gow, N.A.; Maiden, M.C.; Odds, F.C. *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* groups II and III. *J. Clin. Microbiol.*, **2005**, 43(1): 284-292.
- Thompson, D.S.; Carlisle, P.L.; Kadosh, D. Coevolution of morphology and virulence in *Candida* species. *Eukaryot. Cell*, **2011**, 10: 1173-1182, doi:10.1128/EC.05085-11.
- Tone, Y.; Tanahashi, N.; Tanaka, K.; Fujimuro, M.; Yokosawa, H.; Toh-e, A. Nob1p, a new essential protein, associates with the 26S proteasome of growing *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Gene*, **2000**, 243, 37-45, doi:10.1016/s0378-1119(99)00566-1.
- Tóth, A.; Csonka, K.; Jacobs, C.; Vágvölgyi, C.; Nosanchuk, J.D.; Netea, M.G.; Gácsér, A. *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* Induce Different T-Cell Responses in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. *The J. of Infect. Dis.*, **2013**, 208(4): 690-698. doi:10.1093/infdis/jit188.
- Tóth, A.; Zajta, E.; Csonka, K.; Vágvölgyi, Cs.; Netea, M.G.; Gácsér, A. Specific pathways mediating inflammasome activation by *Candida parapsilosis*. *Sci. Rep.*, **2017**, 7: 43129. doi: 10.1038/srep43129.

- Tóth, R.; Cabral, V.; Thuer, E.; Bohner, F.; Németh, T. és mtsi. Investigation of *Candida parapsilosis* virulence regulatory factors during host-pathogen interaction. *Sci. Rep.*, **2018**, 8, 1346, doi:10.1038/s41598-018-19453-4.
- Tóth, R.; Nosek, J.; Mora-Montes, H.M.; Gabaldon, T.; Bliss, J.M. és mtsi. *Candida parapsilosis*: From genes to the bedside. *Clin. Microbiol. Rev.*, **2019**, 32, e00111-18, doi:10.1128/CMR.00111-18.
- Tóth, R.; Tóth, A.; Papp, C.; Jankovics, F.; Vágvolgyi, C. és mtsi. Kinetic studies of *Candida parapsilosis* phagocytosis by macrophages and detection of intracellular survival mechanisms. *Front. Microbiol.*, **2014**, 5: 633.
- Tóth, R.; Toth, A.; Vagvolgyi, C.; Gacser, A. *Candida parapsilosis* secreted lipase as an important virulence factor. *Curr Protein Pept Sci.*, **2016**, 18(10):1043-1049. doi: 10.2174/1389203717666160813163054.
- Trofa, D.; Gácser, A.; Nosanchuk, J.D. *Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen. *Clin. Microbiol. Rev.*, **2008**, 21: 606-625, doi:10.1128/CMR.00013-08.
- Turner, S.A; Butler, G. The *Candida* Pathogenic Species Complex. *Cold Spring Harbor Persp. in Med.*, **2014**, 4(9): a019778-a019778. doi:10.1101/cshperspect.a019778.
- Uwamahoro, N.; Verma-Gaur, J.; Shen, H.-H.; Qu, Y.; Lewis, R. és mtsi. The pathogen *Candida albicans* hijacks pyroptosis for escape from macrophages. *MBio*, **2014**, 5, e00003-14, doi:10.1128/mBio.00003-14.
- Van Asbeck, E.C.; Clemons, K. V; Stevens, D.A. *Candida parapsilosis*: a review of its epidemiology, pathogenesis, clinical aspects, typing and antimicrobial susceptibility. *Crit. Rev. Microbiol.*, **2009**, 35: 283-309, doi:10.3109/10408410903213393.
- Verma, R.; Pradhan, D.; Maseet, M.; Singh, H.; Jain, A.K.; Khan, L.A. Genome-wide screening and *in silico* gene knockout to predict potential candidates for drug designing against *Candida albicans*. *Infect. Genet. Evol.*, **2020**, 80, 104196, doi:10.1016/j.meegid.2020.104196.
- Vyas, V.K.; Barrasa, M.I.; Fink, G.R. A *Candida albicans* CRISPR system permits genetic engineering of essential genes and gene families. *Sci. Adv.*, **2015**, 1, e1500248, doi:10.1126/sciadv.1500248.

- Vylkova S.; Lorenz M.C. Modulation of Phagosomal pH by *Candida albicans* Promotes Hyphal Morphogenesis and Requires Stp2p, a Regulator of Amino Acid Transport. *PLoS Pathog.*, **2014**, 10(3): e1003995. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003995>.
- Vylkova, S.; Carman, A.J.; Danhof, H.A.; Collette, J.R.; Zhou, H. és mtsi. The fungal pathogen *Candida albicans* autoinduces hyphal morphogenesis by raising extracellular pH. *MBio.*, **2011**, 2(3): e00055-00011.
- Wächtler, B.; Wilson, D.; Haedicke, K.; Dalle, F.; Hube, B. From attachment to damage: defined genes of *Candida albicans* mediate adhesion, invasion and damage during interaction with oral epithelial cells. *PLoS ONE*, **2011**, 6, e17046, doi:10.1371/journal.pone.0017046.
- Wagner, A. Energy costs constrain the evolution of gene expression. *J. Exp. Zool. Part. B Mol. Dev. Evol.* **2007**, 308B: 322-324, doi:10.1002/jez.b.21152.
- Wang, C., Schröder, M.S., Hammel, S., Butler, G. Using RNA-seq for Analysis of Differential Gene Expression in Fungal Species. Devaux F., Ed.; vol 1361.; Yeast Functional Genomics. Methods in Molecular Biology. Humana Press, New York, **2016**.
- Wang, Z.; Gerstein, M.; Snyder, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat. Rev. Genet.*, **2009**, 10: 57-63, doi:10.1038/nrg2484.
- Warnock, D.W. Trends in the epidemiology of invasive fungal infections. *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi.* **2007**, 48: 1-12, doi:10.3314/jjmm.48.1.
- Weems Jr, J.J.; Chamberland, M.E.; Ward, J.; Willy, M.; Padhye, A.A.; Solomon, S.L. *Candida parapsilosis* fungemia associated with parenteral nutrition and contaminated blood pressure transducers. *J. Clin. Microbiol.*, **1987**, 25: 1029-1032, doi:10.1128/JCM.25.6.1029-1032.1987.
- White, M.H. Editorial response: The contribution of fluconazole to the changing epidemiology of invasive *Candidal* infections. *Clin. Infect. Dis.*, **1997**, 24: 1129-1130, doi:10.1086/513661.
- Wilson, B.R.; Dana, D.; Mitchell, A.P. Rapid Hypothesis Testing with *Candida albicans* through Gene Disruption with Short Homology Regions. *J. Bacteriol.*, **1999**, 181: 1868-1874, doi:10.1128/JB.181.6.1868-1874.1999.

- Wysong, D.R.; Christin, L.; Sugar, A.M.; Robbins, P.W.; Diamond, R.D. Cloning and sequencing of a *Candida albicans* catalase gene and effects of disruption of this gene. *Infect. Immun.*, **1998**, 66(5): 1953-1961.
- Xiao, W.; Derfler, B.; Chen, J.; Samson, L. Primary sequence and biological functions of a *Saccharomyces cerevisiae* O6-methylguanine/O4-methylthymine DNA repair methyltransferase gene. *EMBO J.*, **1991**, 10: 2179-2186.
- Yan, L.; Zhang, J.-D.; Cao, Y.-B.; Gao, P.-H.; Jiang, Y.-Y. Proteomic analysis reveals a metabolism shift in a laboratory fluconazole-resistant *Candida albicans* strain. *J. Proteome Res.*, **2007**, 6, 2248-2256, doi:10.1021/pr060656c.
- Yapar, N. Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis. *Ther. Clin. Risk Manag.*, **2014**, 10: 95-105, doi:10.2147/TCRM.S40160.
- Yoshihisa, T.; Anraku, Y. Nucleotide sequence of AMS1, the structure gene of vacuolar alpha-mannosidase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1989**, 163, 908-915, doi:10.1016/0006-291x(89)92308-5.
- Yoshihisa, T.; Anraku, Y. A novel pathway of import of alpha-mannosidase, a marker enzyme of vacuolar membrane, in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, **1990**, 265, 22418-22425.
- Yoshikawa, K.; Tanaka, T.; Ida, Y.; Furusawa, C.; Hirasawa, T.; Shimizu, H. Comprehensive phenotypic analysis of single-gene deletion and overexpression strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **2011**, 28: 349-361, doi:10.1002/yea.1843.
- Zaoutis, T. Candidemia in children. *Curr. Med. Res. Opin.* **2010**, 26: 1761-1768, doi:10.1185/03007995.2010.487796.
- Zhao, R.; Lockhart, S.R.; Daniels, K.; Soll, D.R. Roles of *TUP1* in switching, phase maintenance, and phase-specific gene expression in *Candida albicans*. *Eukaryot. Cell*, **2002**, 1: 353-365, doi:10.1128/ec.1.3.353-365.2002.
- Zhu, H.; Bilgin, M.; Bangham, R.; Hall, D.; Casamayor, A. és mtsi. Global analysis of protein activities using proteome chips. *Science*, **2001**, 293: 2101-2105, doi:10.1126/science.1062191.

- Znaidi, S.; van Wijlick, L.; Hernández-Cervantes, A.; Sertour, N.; Desseyn, J.-L. és mtsi. Systematic gene overexpression in *Candida albicans* identifies a regulator of early adaptation to the mammalian gut. *Cell. Microbiol.*, **2018**, 20, e12890, doi:10.1111/cmi.12890.
- Zordan, R.E.; Galgoczy, D.J.; Johnson, A.D. Epigenetic properties of white–opaque switching in *Candida albicans* are based on a self-sustaining transcriptional feedback loop. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2006**, 103: 12807-12812, doi:10.1073/pnas.0605138103.
- Zuza-Alves, D.L.; Silva-Rocha, W.P.; Chaves, G.M. An Update on *Candida tropicalis* Based on Basic and Clinical Approaches. *Front. Microbiol.*, **2017**, 8: 1927.

10. Köszönetnyilvánítás

Elsősorban szeretném megköszönni családomnak, vőlegényemnek és barátaimnak, akik folyamatos támogatásukkal hozzájárultak és hozzájárulnak ahhoz, hogy elérjem céljaimat.

Köszönettel tartozom Prof. Dr. Vágvölgyi Csabának, a Szegedi Tudományegyetem, Természettudományi és Informatikai Kar, Mikrobiológiai Tanszék vezetőjének, amiért lehetővé tette, hogy doktori tanulmányaimat a tanszéken végezhessem.

Igazán hálás vagyok témavezetőmnek, Prof. Dr. Gácsér Attilának, hogy ismeretlenül is bizalmat szavazott nekem és esélyt adott, hogy tagja lehessen az általa létrehozott, nagy múlttal rendelkező, nemzetközileg is elismert kutatócsoportjának. Személyében egy olyan embert ismertem meg, aki mind szakmailag, mind pedig emberileg pozitív példaként szolgál.

Külön köszönöm Dr. Németh Tibornak a magas színvonalú szakmai és gyakorlati segítséget és útmutatást, ami nélkül doktori dolgozatom nem készülhetett volna el. Mindemellett köszönöm példaértékű szakmai alázatát és hozzáállását, amit rendületlenül tanúsított az elmúlt évek során és ami számomra is etalonként szolgált.

Szintén hálás vagyok Dr. Tóth Renátának, akihez bármikor fordulhattam segítségért, és aki fáradhatatlanul dolgozott a doktori tanulmányaim során közölt írásos anyagok színvonalának emeléséért.

Köszönettel tartozom Dr. Csonka Katalinnak és Dr. Zajta Eriknek az áramlási citométerrel végzett kísérletekben és az *in vivo* egér kísérletekben nyújtott segítségért és tanácsokért.

Hálásan köszönöm Dr. Papp Csabának az áramlási citométerrel végzett vizsgálatokban, a mikroszkópos kísérletekben és antifungális tesztekben nyújtott segítségét és tanácsait.

Köszönetet szeretnék mondani Dr. Farkas Attilának a SEM mikroszkópiás felvételek elkészítésében nyújtott segítségével.

Szeretném megköszönni Dr. Joshua D. Nosanchuknak a publikációban nyújtott nélkülözhetetlen segítségét.

Köszönöm Dr. Nyilasi Ildikónak és Dr. Hamari Zsuzsannának, hogy elvállalták dolgozatom házi bírálatát és segítettek emelni annak színvonalát.

Továbbá szeretném megköszönni a támogatást a „Gácser laboratórium” összes tagjának és a Mikrobiológiai Tanszék valamennyi dolgozójának, kiemelve Lele Máriát és Deákné Kulcsár Melindát a gyakorlatok tartásában nyújtott segítségért, valamint Lengyel Boglárkát a munkámmal kapcsolatos gazdasági ügyek fáradhatatlan intézéséért.

Szeretném megköszönni az anyagi támogatást a Richter Gedeon Talentum Alapítványnak.

Jelen kutatás megvalósítása a 20391-3/2018/FEKUSTRAT, az NKFIH K 123952 és a GINOP-2.3.2.-15-2016-00035 azonosító számú kiemelt projektek keretében zajlott.

11. Mellékletek

1. számú melléklet. Az alkalmazott baktérium és gombatörzsek listája és a munkánk során létrehozott overexpressziós hemizigóta *C. parapsilosis* törzsek genotípusa.

Törzs név	Genotípus	Leírás
<i>E. coli</i> 2T1		CcdB toxin érzékeny törzs
<i>E. coli</i> DB3.1		CcdB toxin rezisztens törzs
<i>C. parapsilosis</i> törzsek		
CLIB214		vt izolátum
CPL2	<i>leu2::FRT/leu2::FRT, his1::FRT/his1::FRT, frt::CdHIS1</i>	<i>CdHIS1</i> reintegrált, leucin auxotróf törzs (Holland és mtsi., 2014)
CPRI	<i>leu2::FRT/leu2::FRT, his1::FRT/his1::FRT, frt::CmLEU2/frt::CdHIS1</i>	<i>CdHIS1</i> és <i>CmLEU2</i> reintegrált prototróf törzs (Holland és mtsi., 2014)
mCherry ^{OE}	<i>leu2::FRT/leu2::FRT, his1::FRT/his1::FRT, frt::CdHIS1, CpNEUT5L/CpNEUT5L::pECpOE-mCherry-L-N5L</i>	mCherry fluoreszcens proteint túltermelő mutáns törzs

Munkánk során létrehozott overexpressziós <i>C. parapsilosis</i> törzsek		
Törzs név	Genotípus	
CPAR2_100460 ^{OE}	<i>leu2::FRT/leu2::FRT, his1::FRT/his1::FRT, frt::CdHIS1, CpNEUT5L/CpNEUT5L::pECpOE-CPAR2_100460-L-N5L</i>	
CPAR2_100470 ^{OE}	<i>leu2::FRT/leu2::FRT, his1::FRT/his1::FRT, frt::CdHIS1, CpNEUT5L/CpNEUT5L::pECpOE-CPAR2_100470-L-N5L</i>	
CPAR2_100540 ^{OE}	<i>leu2::FRT/leu2::FRT, his1::FRT/his1::FRT, frt::CdHIS1, CpNEUT5L/CpNEUT5L::pECpOE-CPAR2_100540-L-N5L</i>	
CPAR2_104420 ^{OE}	<i>leu2::FRT/leu2::FRT, his1::FRT/his1::FRT, frt::CdHIS1, CpNEUT5L/CpNEUT5L::pECpOE-CPAR2_104420-L-N5L</i>	
CPAR2_105250 ^{OE}	<i>leu2::FRT/leu2::FRT, his1::FRT/his1::FRT, frt::CdHIS1, CpNEUT5L/CpNEUT5L::pECpOE-CPAR2_105250-L-N5L</i>	
CPAR2_107020 ^{OE}	<i>leu2::FRT/leu2::FRT, his1::FRT/his1::FRT, frt::CdHIS1, CpNEUT5L/CpNEUT5L::pECpOE-CPAR2_107020-L-N5L</i>	
CPAR2_107240 ^{OE}	<i>leu2::FRT/leu2::FRT, his1::FRT/his1::FRT, frt::CdHIS1, CpNEUT5L/CpNEUT5L::pECpOE-CPAR2_107240-L-N5L</i>	
CPAR2_108840 ^{OE}	<i>leu2::FRT/leu2::FRT, his1::FRT/his1::FRT, frt::CdHIS1, CpNEUT5L/CpNEUT5L::pECpOE-CPAR2_108840-L-N5L</i>	
CPAR2_109520 ^{OE}	<i>leu2::FRT/leu2::FRT, his1::FRT/his1::FRT, frt::CdHIS1, CpNEUT5L/CpNEUT5L::pECpOE-CPAR2_109520-L-N5L</i>	
CPAR2_200040 ^{OE}	<i>leu2::FRT/leu2::FRT, his1::FRT/his1::FRT, frt::CdHIS1, CpNEUT5L/CpNEUT5L::pECpOE-CPAR2_200040-L-N5L</i>	
CPAR2_200390 ^{OE}	<i>leu2::FRT/leu2::FRT, his1::FRT/his1::FRT, frt::CdHIS1, CpNEUT5L/CpNEUT5L::pECpOE-CPAR2_200390-L-N5L</i>	
CPAR2_201920 ^{OE}	<i>leu2::FRT/leu2::FRT, his1::FRT/his1::FRT, frt::CdHIS1, CpNEUT5L/CpNEUT5L::pECpOE-CPAR2_201920-L-N5L</i>	

CPAR2_204840 ^{OE}	<i>leu2::FRT/leu2::FRT, his1::FRT/his1::FRT, frt::CdHIS1,</i> <i>CpNEUT5L/CpNEUT5L::pECpOE-CPAR2_204840-L-N5L</i>
CPAR2_205060 ^{OE}	<i>leu2::FRT/leu2::FRT, his1::FRT/his1::FRT, frt::CdHIS1,</i> <i>CpNEUT5L/CpNEUT5L::pECpOE-CPAR2_205060-L-N5L</i>
CPAR2_208600 ^{OE}	<i>leu2::FRT/leu2::FRT, his1::FRT/his1::FRT, frt::CdHIS1,</i> <i>CpNEUT5L/CpNEUT5L::pECpOE-CPAR2_208600-L-N5L</i>
CPAR2_209240 ^{OE}	<i>leu2::FRT/leu2::FRT, his1::FRT/his1::FRT, frt::CdHIS1,</i> <i>CpNEUT5L/CpNEUT5L::pECpOE-CPAR2_209240-L-N5L</i>
CPAR2_209520 ^{OE}	<i>leu2::FRT/leu2::FRT, his1::FRT/his1::FRT, frt::CdHIS1,</i> <i>CpNEUT5L/CpNEUT5L::pECpOE-CPAR2_209520-L-N5L</i>
CPAR2_300080 ^{OE}	<i>leu2::FRT/leu2::FRT, his1::FRT/his1::FRT, frt::CdHIS1,</i> <i>CpNEUT5L/CpNEUT5L::pECpOE-CPAR2_300080-L-N5L</i>
CPAR2_301360 ^{OE}	<i>leu2::FRT/leu2::FRT, his1::FRT/his1::FRT, frt::CdHIS1,</i> <i>CpNEUT5L/CpNEUT5L::pECpOE-CPAR2_301360-L-N5L</i>
CPAR2_302400 ^{OE}	<i>leu2::FRT/leu2::FRT, his1::FRT/his1::FRT, frt::CdHIS1,</i> <i>CpNEUT5L/CpNEUT5L::pECpOE-CPAR2_302400-L-N5L</i>
CPAR2_303240 ^{OE}	<i>leu2::FRT/leu2::FRT, his1::FRT/his1::FRT, frt::CdHIS1,</i> <i>CpNEUT5L/CpNEUT5L::pECpOE-CPAR2_303240-L-N5L</i>
CPAR2_303730 ^{OE}	<i>leu2::FRT/leu2::FRT, his1::FRT/his1::FRT, frt::CdHIS1,</i> <i>CpNEUT5L/CpNEUT5L::pECpOE-CPAR2_303730-L-N5L</i>
CPAR2_400270 ^{OE}	<i>leu2::FRT/leu2::FRT, his1::FRT/his1::FRT, frt::CdHIS1,</i> <i>CpNEUT5L/CpNEUT5L::pECpOE-CPAR2_400270-L-N5L</i>
CPAR2_406400 ^{OE}	<i>leu2::FRT/leu2::FRT, his1::FRT/his1::FRT, frt::CdHIS1,</i> <i>CpNEUT5L/CpNEUT5L::pECpOE-CPAR2_406400-L-N5L</i>
CPAR2_500180 ^{OE}	<i>leu2::FRT/leu2::FRT, his1::FRT/his1::FRT, frt::CdHIS1,</i> <i>CpNEUT5L/CpNEUT5L::pECpOE-CPAR2_500180-L-N5L</i>
CPAR2_500360 ^{OE}	<i>leu2::FRT/leu2::FRT, his1::FRT/his1::FRT, frt::CdHIS1,</i> <i>CpNEUT5L/CpNEUT5L::pECpOE-CPAR2_500360-L-N5L</i>
CPAR2_501400 ^{OE}	<i>leu2::FRT/leu2::FRT, his1::FRT/his1::FRT, frt::CdHIS1,</i> <i>CpNEUT5L/CpNEUT5L::pECpOE-CPAR2_501400-L-N5L</i>
CPAR2_503290 ^{OE}	<i>leu2::FRT/leu2::FRT, his1::FRT/his1::FRT, frt::CdHIS1,</i> <i>CpNEUT5L/CpNEUT5L::pECpOE-CPAR2_503290-L-N5L</i>
CPAR2_503760 ^{OE}	<i>leu2::FRT/leu2::FRT, his1::FRT/his1::FRT, frt::CdHIS1,</i> <i>CpNEUT5L/CpNEUT5L::pECpOE-CPAR2_503760-L-N5L</i>
CPAR2_602370 ^{OE}	<i>leu2::FRT/leu2::FRT, his1::FRT/his1::FRT, frt::CdHIS1,</i> <i>CpNEUT5L/CpNEUT5L::pECpOE-CPAR2_602370-L-N5L</i>
CPAR2_602820 ^{OE}	<i>leu2::FRT/leu2::FRT, his1::FRT/his1::FRT, frt::CdHIS1,</i> <i>CpNEUT5L/CpNEUT5L::pECpOE-CPAR2_602820-L-N5L</i>
CPAR2_602840 ^{OE}	<i>leu2::FRT/leu2::FRT, his1::FRT/his1::FRT, frt::CdHIS1,</i> <i>CpNEUT5L/CpNEUT5L::pECpOE-CPAR2_602840-L-N5L</i>
CPAR2_700550 ^{OE}	<i>leu2::FRT/leu2::FRT, his1::FRT/his1::FRT, frt::CdHIS1,</i> <i>CpNEUT5L/CpNEUT5L::pECpOE-CPAR2_700550-L-N5L</i>
CPAR2_703840 ^{OE}	<i>leu2::FRT/leu2::FRT, his1::FRT/his1::FRT, frt::CdHIS1,</i> <i>CpNEUT5L/CpNEUT5L::pECpOE-CPAR2_703840-L-N5L</i>
CPAR2_804030 ^{OE}	<i>leu2::FRT/leu2::FRT, his1::FRT/his1::FRT, frt::CdHIS1,</i> <i>CpNEUT5L/CpNEUT5L::pECpOE-CPAR2_804030-L-N5L</i>
CPAR2_805930 ^{OE}	<i>leu2::FRT/leu2::FRT, his1::FRT/his1::FRT, frt::CdHIS1,</i> <i>CpNEUT5L/CpNEUT5L::pECpOE-CPAR2_805930-L-N5L</i>
CPAR2_806950 ^{OE}	<i>leu2::FRT/leu2::FRT, his1::FRT/his1::FRT, frt::CdHIS1,</i> <i>CpNEUT5L/CpNEUT5L::pECpOE-CPAR2_806950-L-N5L</i>

2. számú melléklet. Az alkalmazott primerek listája. (A nagybetűk az attB szekvenciákat, a kis betűk a génspecifikus szakaszokat, míg a félkövér régiók az egyedi BAR szekvenciákat jelölik.)

A kiválasztott gének amplifikálásához alkalmazott primerek:

Törzs név	Forward primerek attB1 szekvenciával ellátva
CPAR2_100460 ^{OE}	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTatgtcttcattaacggaggataaaatggtc
CPAR2_100470 ^{OE}	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTatgaaagttcagatttttcgttgcacgt
CPAR2_100540 ^{OE}	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTatggacacatacgtagagacgaattacata
CPAR2_104420 ^{OE}	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTatggaaaaagaggtttctgtatcagc
CPAR2_105250 ^{OE}	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTatgaccggttcacatcccagttccaacag
CPAR2_107020 ^{OE}	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTatgtctggtagaggaaaaggaggaaaagga
CPAR2_107240 ^{OE}	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTatgccatactcaggaaaagaaagttgcta
CPAR2_108840 ^{OE}	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTatgctgtctaggagagacaataagcaaatt
CPAR2_109520 ^{OE}	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTatgtctgtgtacaatcaagaacccatcaa
CPAR2_200040 ^{OE}	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTatggtatcattttcatgcgaagtttg
CPAR2_200390 ^{OE}	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTatgtccaacgatagcaagtacaagtataga
CPAR2_201920 ^{OE}	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTatgattgagaaacttaccagaatagatct
CPAR2_204840 ^{OE}	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTatgacttcttcaatacacccctctatagat
CPAR2_205060 ^{OE}	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTatggttgagttatcagattaccaacgacaa
CPAR2_208600 ^{OE}	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTatgtcatacaacaatccacaactcaagag
CPAR2_209240 ^{OE}	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTatgtccactcatccttatcttgg
CPAR2_209520 ^{OE}	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTatgtccgatgttccattgttcaag
CPAR2_300080 ^{OE}	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTatgtgtcaacattttgtggagtttg
CPAR2_301360 ^{OE}	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTatgagcaatccctatgatatagatccagat
CPAR2_302400 ^{OE}	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTatgaaagtcagcaacagtcctagaaaac
CPAR2_303240 ^{OE}	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTatgaacattgataccttgtcacagatec
CPAR2_303730 ^{OE}	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTatggcaaagtcatttcaaatcaagtaccc
CPAR2_400270 ^{OE}	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTatgctctgtcagatatgtagccag
CPAR2_406400 ^{OE}	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTatgtcagtggttaggatctttgatctttgc
CPAR2_500180 ^{OE}	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTatgagcagtgattatgagccg
CPAR2_500360 ^{OE}	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTatgggatacgaaaatttcaatcatcaacca
CPAR2_501400 ^{OE}	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTatgatatggcgtctttggagcccgttactt
CPAR2_503290 ^{OE}	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTatggaggcgcctcaattcactgaaacgcag
CPAR2_503760 ^{OE}	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTatgccacaaaaaagaagcaac
CPAR2_602370 ^{OE}	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTatgtcgccgcaaccaccac
CPAR2_602820 ^{OE}	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTatgtcttcttcttcttcttcttcttct

CPAR2_602840 ^{OE}	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTatggatgctatatcagatagagtatttacag
CPAR2_700550 ^{OE}	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTatgtctagtgtgaaccaagtgcac
CPAR2_703840 ^{OE}	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTatgattagagcaatatccgctggattg
CPAR2_804030 ^{OE}	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTatgagtggtttaaacacctcattttgat
CPAR2_805930 ^{OE}	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTatgagttcatcacgcttggtctttcaca
CPAR2_806950 ^{OE}	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTatggctactacaaaacacgtgaaaac

Törzs név	Reverz primerek BAR kód és attB2 szekvenciával ellátva
CPAR2_100460 ^{OE}	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTATCAATCCGGCGGTAGAT GT tcaacttgccactcttagcgtctttgattg
CPAR2_100470 ^{OE}	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTACTTCTGGAGTATCGGAT GT tactttcctttacttgcagctaaatagt
CPAR2_100540 ^{OE}	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCGTGTCAGCAAATCTACC AA tcactttgatgacttctcctcttctctagg
CPAR2_104420 ^{OE}	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCGATTCGATAAATGACGC GA tagtcatatgtaaacagaatacaatagttcatc
CPAR2_105250 ^{OE}	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGATATGATGTAATCCTGC CG ttaattgatgatcaataatagttgatg
CPAR2_107020 ^{OE}	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTATTGTCACCTCAGAGCCG TG ttaacctccgaaaccatacaaggttctacc
CPAR2_107240 ^{OE}	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTATTCATCCGGGCGAGTCT GT ctaggttctcttataaacatctttgatttt
CPAR2_108840 ^{OE}	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGATCCGCGTCGATGCTC TT tcaattttcaagagctcgcctcgatttcttc
CPAR2_109520 ^{OE}	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTATTGTAGCTCCCGCGCTT GT ttaaacctttctgtccacttccaaattct
CPAR2_200040 ^{OE}	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTACTATATGTGAAGGCATG GC ctattgtataatcaatttcccatcaatgtt
CPAR2_200390 ^{OE}	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCAGTAATCAGAAGCTCGC AC ctaaataagtctagttegcgttttaacct
CPAR2_201920 ^{OE}	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTACCGCTGCGAGGCTTAGA TT tattctagtcgacccagatatctccata
CPAR2_204840 ^{OE}	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTATGTCCCGACGCCTAGAT GT ctatctgcatgcctctgtcccaaaattg
CPAR2_205060 ^{OE}	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGCCAGATCATCAATAGGC AC ttaacctatgtttaccgatcgtgaaaagct
CPAR2_208600 ^{OE}	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTACTCACCGTGGTCAGTGT GT tactccttgcttattctattggttttga
CPAR2_209240 ^{OE}	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCGCATACCGAATTGCTA TA taagcttgaacaattctgacggtg
CPAR2_209520 ^{OE}	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTATTGAGAGTCAGTGCCAG AT tcaactcatcaatttccaaacaacagc
CPAR2_300080 ^{OE}	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTGCCATGCGAACAAGAG CA ctaccagttaccaacttttcaacttg
CPAR2_301360 ^{OE}	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTATGAGTCTCTTCCACCGA TT ctactctccaaaattgtaattattagtagt
CPAR2_302400 ^{OE}	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGCGCATCAAAGAGGCC AA ctacaatgcaccatcacttgcag

CPAR2_303240^{OE} GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTGTATAGCTCGATATGGC
CGttaccttgattcagtggttgcataaag

CPAR2_303730^{OE} GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGAGTGATCCATACACATT
CCctacaagtactctacagtggcccc

CPAR2_400270^{OE} GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGGACCTCTGCTCATTATG
CTtcaggcttcactagttccaatactc

CPAR2_406400^{OE} GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTATGGCACGGCAGACATT
CCttaattgttgcctgaatctgtaaccgca

CPAR2_500180^{OE} GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTAGAGCAGACGCATTGAC
AGctaattatacggatatttcgtatttccat

CPAR2_500360^{OE} GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTAAGCTAGGGTCATTTGCT
GTtactttaacaaaattttaaaagtaccaat

CPAR2_501400^{OE} GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTATATCGCCCTGAGGACCT
GTtatatgtttctggcatggcataatcaa

CPAR2_503290^{OE} GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGGTCTGCTCAAATACACC
AAttacatactttcaataagcagctctttta

CPAR2_503760^{OE} GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGCGCAGAAGGCAATGCTA
TAttaggcatgaataactgtctacca

CPAR2_602370^{OE} GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTGACTTAGTGCATACTG
CTctatcctttagctcccctagctgttttaac

CPAR2_602820^{OE} GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTAGACGTGATTCAGCTCTC
TTttatacacctatactcattccaacaatg

CPAR2_602840^{OE} GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTATTGGTCACTCTGCACTG
CTtcaactatcaacaactaacctttctgtttg

CPAR2_700550^{OE} GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTATATGCGATCACCGCCG
TGctagccggaccagaattggtattc

CPAR2_703840^{OE} GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGTCCGACGTTAGATCACC
TGctacgctttacaagacctgggg

CPAR2_804030^{OE} GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTAGGGCGACTGTGATTCCA
TTctaaaattgcttgattccaacttttcaa

CPAR2_805930^{OE} GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTATCGTAGTGTCACGGCTT
GTctaataatcactagcataacctggatata

CPAR2_806950^{OE} GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTACTAGCACGGCTGAGCAG
ATtactttttacccttgagggtgtttacata

A létrehozott mutáns törzsek validálásához alkalmazott primerek:

Törzs név	Real-time forward primerek	Real-time reverz primerek
CPAR2_100460 ^{OE}	ATTGGGAAGTGTGTTTAGTACCAC	CCACCGACTGCTAATCCAGG
CPAR2_100470 ^{OE}	TTTGCTTTAGGTCCGCAAGC	CCCAAGCAACTAACCGATCAG
CPAR2_100540 ^{OE}	TGATGCAATACTGGCAAGAGAC	TTTGATTCTAGCCAATGGTAGCTG
CPAR2_104420 ^{OE}	CAATGATGCAAGGTCCGAAGATG	AGTGGTACGCTTCCTGATTGG
CPAR2_105250 ^{OE}	TACAGATGAGGCCGAGC	CTCAAATGGTGCTGTACTGGAG
CPAR2_107020 ^{OE}	GATTGGCAAGAAGAGGTGGTG	GCGTGTTCAGTATAAGTGACAGC
CPAR2_107240 ^{OE}	GGGCTCTTACCATAACATGTGTC	TGAACTTGTGGCTCAATTCTCC
CPAR2_108840 ^{OE}	TGTTATTGAGTTGGCTACTGGC	TGTAATAACCCCGCAATTGTGG
CPAR2_109520 ^{OE}	GAAGATGGTGTCCTACTGTTGC	CAAACACGGACTGTGCGATC

CPAR2_200040 ^{OE}	AGAAGTTGGGTCAGCATCAGC	CATGGTCATTGTTGTGAAATGTGG
CPAR2_200390 ^{OE}	AGAAAGCAGCCACTATTGCTTC	CCAATGAACGTACTCCTCCCTTG
CPAR2_201920 ^{OE}	ATGATGACGAACCTAGTCGAGG	CCCACCAATTGACAGATAGGC
CPAR2_204840 ^{OE}	GGTTACTTGTCTGGACAGATTGG	TAGCCTGGATGGGTAACCC
CPAR2_205060 ^{OE}	AATCCACCTCAATCAAATACGG	CATGGCAATGCTTGATTCTCTCG
CPAR2_208600 ^{OE}	GGTTTAGGATACGGTTACCTGTG	GGCTGATTGACAAAGTAGGGC
CPAR2_209240 ^{OE}	TGAAATTCCAGCACCACAAGTG	AGTTGCACAAATAACTGGCTTGG
CPAR2_209520 ^{OE}	GGTTGAAGCGAAAACCACCAC	CAGGGTATTCCGCAGTCGTAC
CPAR2_300080 ^{OE}	TATGTCCATTTGCCAAGTGGTAG	AACCAAAGGCTCTCCAGTCAC
CPAR2_301360 ^{OE}	TATGCCGATAACGGGAGATCG	TGTGTATAGCCTCACTTAGGGTG
CPAR2_302400 ^{OE}	ACTAAACTTGCTGGGGAAATACG	CAACACGATGACAAGGAACGAC
CPAR2_303240 ^{OE}	GGAAATATGGCTCGAGAAAGGAG	CCGCAAACGGTATAACCAAGAC
CPAR2_303730 ^{OE}	TCACGTACGAAGGAAACCTAGC	CACCGAAGTAGATACAATGCAGC
CPAR2_400270 ^{OE}	GTAGCCAGAATGACGGCAAG	GGTTCTCTGACTTGTAGCATGC
CPAR2_406400 ^{OE}	TGCACTTATTGTGGTGACTTGC	CGGATTTAGGATAAGTTGCCAGAC
CPAR2_500180 ^{OE}	CCAGTTTGTGATGTCTGGTCTC	AGTTGTAAATGAGTCTTTGCCTGG
CPAR2_500360 ^{OE}	ACAAGGTGAGATTAAGTTGCACG	ATCGTTAATCTCCTTGAGGGG
CPAR2_501400 ^{OE}	ATCAGCCCATAGACATGGAGAC	ATTGACCAAGACTTCAGGGTTG
CPAR2_503290 ^{OE}	CATTGGAACCGATCCCAGATTC	TTGCAAACATCAGCACGTCC
CPAR2_503760 ^{OE}	CTCATTGCCACCAGGATTCG	CCTCTAGTGTAATCTTTGGTGCAC
CPAR2_602370 ^{OE}	GAAGTCGGGAGGAGAGTACTG	CATCCAGCGACTCCCTTAGC
CPAR2_602820 ^{OE}	GAGATGTCAGTCTTGGAACATGC	CATTGAGCAAGGCGATAACGTAG
CPAR2_602840 ^{OE}	ACCGGTGCCATTAGTATGGC	ACTGCTTAGCGCTACTCATGG
CPAR2_700550 ^{OE}	GAAACCAGTAAAGGCAGTACTGG	TATCACCCTACCTTCTGCACG
CPAR2_703840 ^{OE}	ATAGGCACGGTGCCAGATG	TCGTTGAGGCTCTGTGCTTC
CPAR2_804030 ^{OE}	CGATCTTGTTAATCCCGTACGC	TTTGACAAAACACGGGGACG
CPAR2_805930 ^{OE}	CGGCAAATATGGACCTTATGATGG	ACCTTGGATATAGCCCTGATTGG
CPAR2_806950 ^{OE}	GGAAGGTCAAGAAAGGGATGC	CGTTTACCGCCTCTCTTACG

	Forward primerek	Reverz primerek
kolónia PCR	ReTi Forward_CPAR2_XY	NEUT5L_check_REVERSE_primer TGTACCAATCAGGGTTAGTGACC
Southern blot DIG-jelölt próba	CpN5LDo1SouFor TACACACAAAATTGGAATCCCATTC	CpN5LDo2SouRev ACACAAAATACATGATTGCGT C

3. számú melléklet. A kísérletekhez választott gének ortológ funkcióit összesítő táblázat

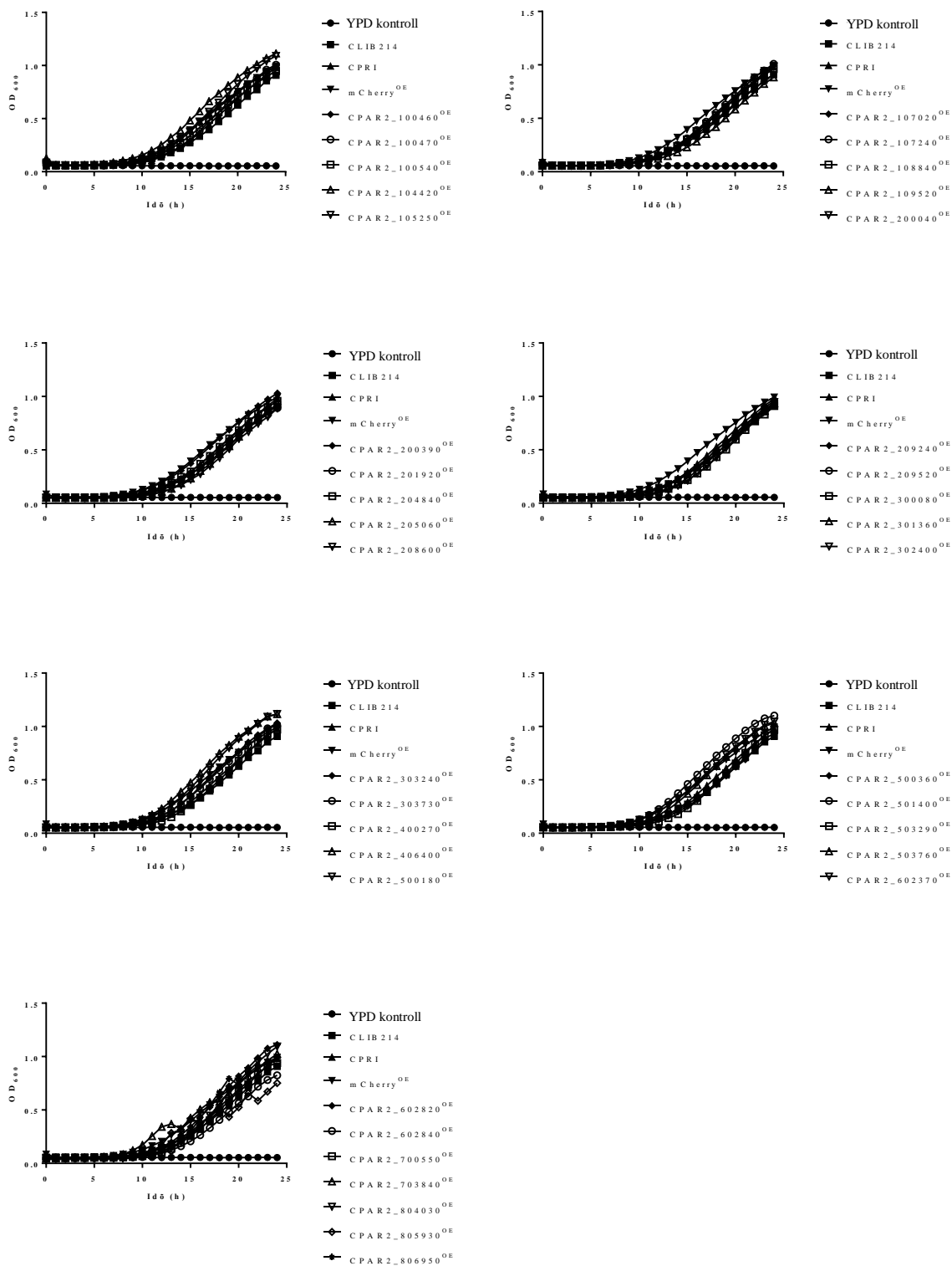
Tóth és mtsi. (2018) eredményei alapján választott gének				
Gén név	Ortológ név	Ortológ funkció	1.	2.
<i>CPAR2_100540</i>	<i>CaHAP5</i>	<i>HAP5</i> , a CCAAT-kötő transzkripciós faktor (TF) komponense (Johnson és mtsi., 2005)	Holland és mtsi., 2014 Tóth és mtsi., 2018	nem
<i>CPAR2_105250</i>	<i>CaPHO85</i>	<i>PHO85</i> , ciklin-függő kináz (Miyakawa, 2000)	-	nem
<i>CPAR2_104420</i>	<i>ScLTE1</i>	<i>LTE1</i> , fehérje hasonló funkcióval, mint a GDP/GTP cserélő faktor (Shirayama és mtsi., 1994; Geymonat és mtsi., 2009)	Tóth és mtsi., 2018	nem
<i>CPAR2_108840</i>	<i>ScSPS1</i>	<i>SPS1</i> , szerin/treonin kináz (Percival-Smith és Segall, 1986)	Tóth és mtsi., 2018	igen
<i>CPAR2_200040</i>	-	Ismeretlen funkció	Tóth és mtsi., 2018	igen
<i>CPAR2_200390</i>	<i>CaSPT3</i>	<i>SPT3</i> , <i>Sc Spt3p</i> fehérje homológ, TF (Laprade és mtsi., 2002)	Tóth és mtsi., 2018	nem
<i>CPAR2_205060</i>	<i>CaCDC28</i>	<i>CDC28</i> , ciklin-függő kináz (Sherlock és mtsi., 1994)	-	nem
<i>CPAR2_208600</i>	<i>CaCPH1</i>	<i>CPH1</i> , TF (Liu és mtsi., 1994)	Holland és mtsi., 2014	nem
<i>CPAR2_209240</i>	<i>CaCDC19/PYK</i>	<i>CDC19/PYK</i> , piruvát kináz (Swoboda és mtsi., 1993; Yan és mtsi., 2007)	-	nem
<i>CPAR2_209520</i>	<i>CaMKK2</i>	<i>MKK2</i> , MAP kináz kináz (Nobile és mtsi., 2003)	Tóth és mtsi., 2018	nem
<i>CPAR2_300080</i>	<i>ScADK2</i>	<i>ADK2</i> , mitokondriális adenilát kináz (Cooper és Friedberg, 1992; Gu és mtsi., 2005)	Tóth és mtsi., 2018	nem
<i>CPAR2_302400</i>	<i>ScMGT1</i>	<i>MGT1</i> , DNS javító metiltranszferáz (Xiao és mtsi., 1991)	Tóth és mtsi., 2018	igen
<i>CPAR2_303240</i>	<i>ScPFA5</i>	<i>PFA5</i> , palmitoiltranszferáz (Mitchell és mtsi., 2006)	-	nem
<i>CPAR2_303730</i>	<i>ScTHR1</i>	<i>THR1</i> , homoszerin kináz (Mortimer és Hawthorne, 1966; Mannhaupt és mtsi., 1990)	-	nem
<i>CPAR2_400270</i>	<i>ScHIT1</i>	<i>HIT1</i> , kis nukleoláris RNS fehérje összeszerelés (Mortimer és mtsi., 1992; Rothé és mtsi., 2014)	Tóth és mtsi., 2018	nem
<i>CPAR2_406400</i>	<i>ScRPA12</i>	<i>RPA12</i> , RNS polimeráz I alegység (Nogi és mtsi., 1993)	-	igen

CPAR2_500180	ScKIN3	KIN3, szerin/treonin kináz (Jones és Rosamond, 1990)	Tóth és mtsi., 2018	igen
CPAR2_500360	ScAMS1	AMS1, alfa mannozidáz (Yoshihisa és Anraku, 1989 és 1990)	-	nem
CPAR2_501400	CaCWH41	CWH41, alfa-glükózidáz I, (Mora-Montes és mtsi., 2007)	Tóth és mtsi., 2018	nem
CPAR2_503290	CaRAD53	RAD53, protein kináz (Shi és mtsi., 2007)	-	nem
CPAR2_503760	ScTMA46	TMA46, riboszómális transzláció (Fleischer és mtsi., 2006)	-	nem
CPAR2_602370	ScRAD18	RAD18, E3 ubikvitin ligáz (Prakash és mtsi., 1976; Bailly és mtsi., 1997)	-	nem
CPAR2_602820	CaFCA1	FCA1, citozin deamináz (Erbs és mtsi., 1997)	Tóth és mtsi., 2018	igen
CPAR2_602840	ScTFB4	TFB4, TFIIF komplex alegysége (Feaver és mtsi., 1997)	-	nem
CPAR2_700550	ScRSC8	RSC8, kromatin újraszervező komplex (Cairns és mtsi., 1996)	-	nem
CPAR2_703840	ScSLM5	SLM5, mitokondriális aszparaginil-tRNS szintáz (Audhya és mtsi., 2004; Landrieu és mtsi., 1997)	-	nem
CPAR2_806950	ScNOB1	NOB1, proteasóma és 40S riboszóma alegység biogenezeise (Tone és mtsi., 2000)	-	nem
Ortológ funkció alapján kiválasztott gének				
Gén név	Ortológ név	Ortológ funkció	1.	2.
CPAR2_100460	CpHBT4	HBT4, hidroxibenzoát transzporter (Cillingova és mtsi., 2017)	Cillingova és mtsi., 2017	nem
CPAR2_100470	CpHBT3	HBT3, hidroxibenzoát transzporter (Cillingova és mtsi., 2017)	Cillingova és mtsi., 2017	nem
CPAR2_107020	CaHHF1	HHF1, hiszton fehérje (Doedt és mtsi., 2004)	-	nem
CPAR2_107240	CaKTR4/MNT4	KTR4/MNT4, mannozil transzferáz, (Kruppa és mtsi., 2004)	-	igen

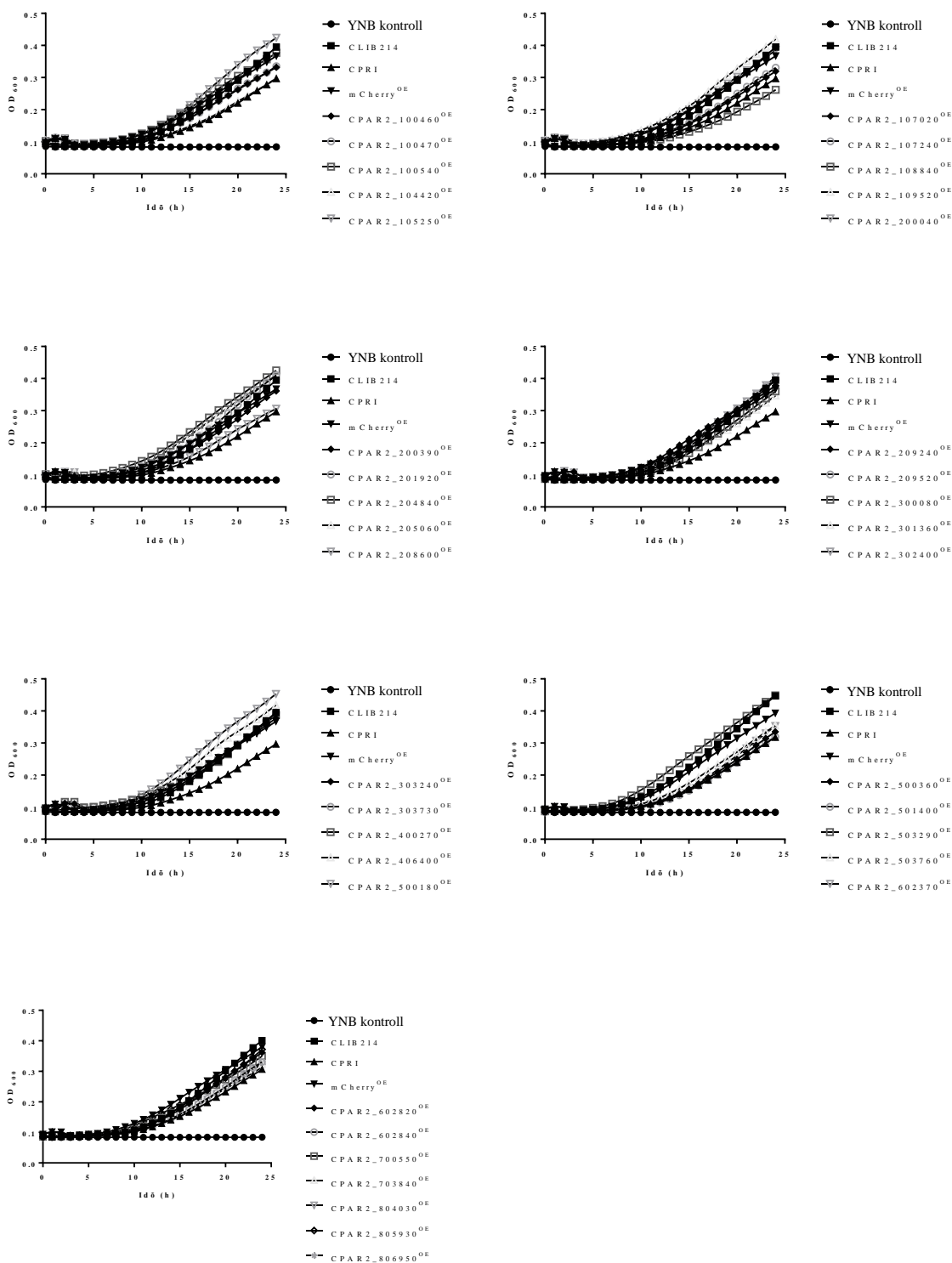
CPAR2_109520	CaTUP1	TUP1, transzkripcionális korepresszor (Braun és Johnson, 1997)	Holland és mtsi., 2014	igen
CPAR2_201920	CaMNT2	CaMNT2, alfa-1,2-mannozil transzferáz (Munro és mtsi., 2005)	-	nem
CPAR2_204840	CpHBT2	HBT2, hidroxibenzoát transzporter (Cillingova és mtsi., 2017)	Cillingova és mtsi., 2017	nem
CPAR2_301360	CaPMR1	PMR1, Ca ²⁺ /Mn ²⁺ -ATPáz (Bates és mtsi., 2005)	-	nem
CPAR2_804030	ScGSC2	GSC2, 1,3-béta-glükán szintáz katalitikus alegysége (Inoue és mtsi., 1995)	-	nem
CPAR2_805930	CaTEC1	TEC1, TF (Schweizer és mtsi., 2000)	Holland és mtsi., 2014	nem

Ca - *C. albicans* fajban azonosított funkcióval rendelkező gén; Sc - *Saccharomyces cerevisiae* fajban azonosított funkcióval rendelkező gén; TF - transzkripció faktor; 1. - Az adott *C. parapsilosis* gén deléciós mutáns törzsét leíró és jellemző tanulmány(ok); 2. - Jelen tanulmányban detektálható volt eltérő fenotípus az adott mutáns esetén (igen/nem).

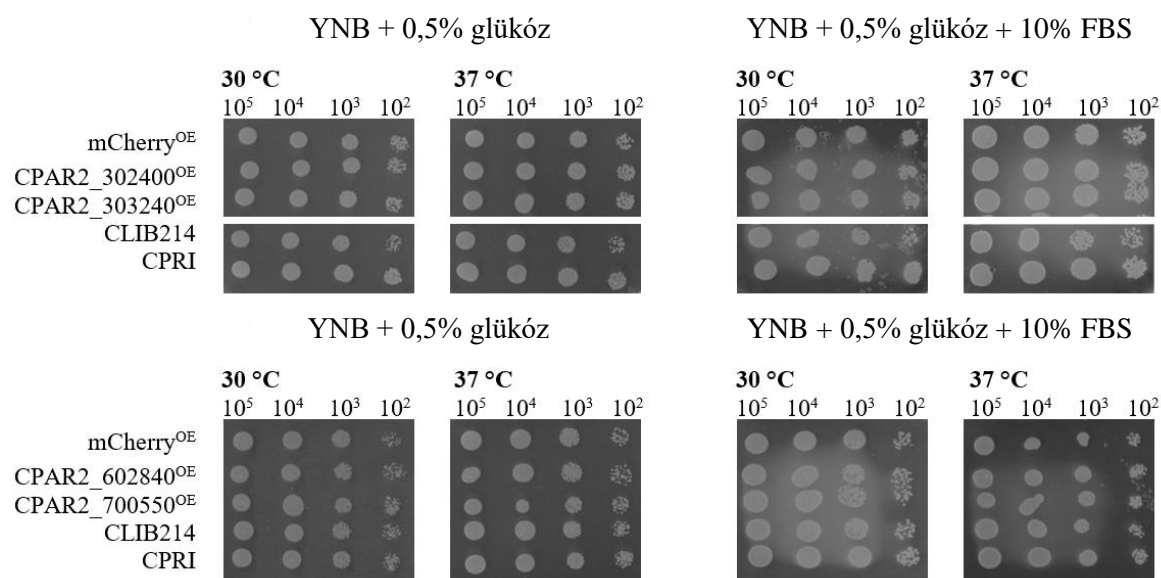
4. számú melléklet. A komplett tápoldatban (YPD) végzett növekedési kinetika vizsgálat eredményeit bemutató grafikonok (T=30°C, N=3, 8-8 technikai párhuzamos minta).



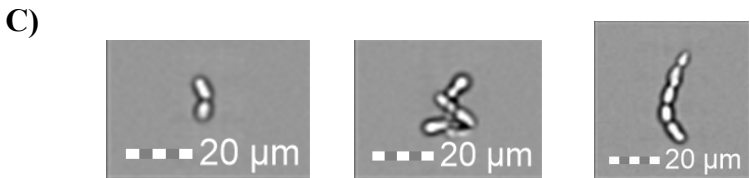
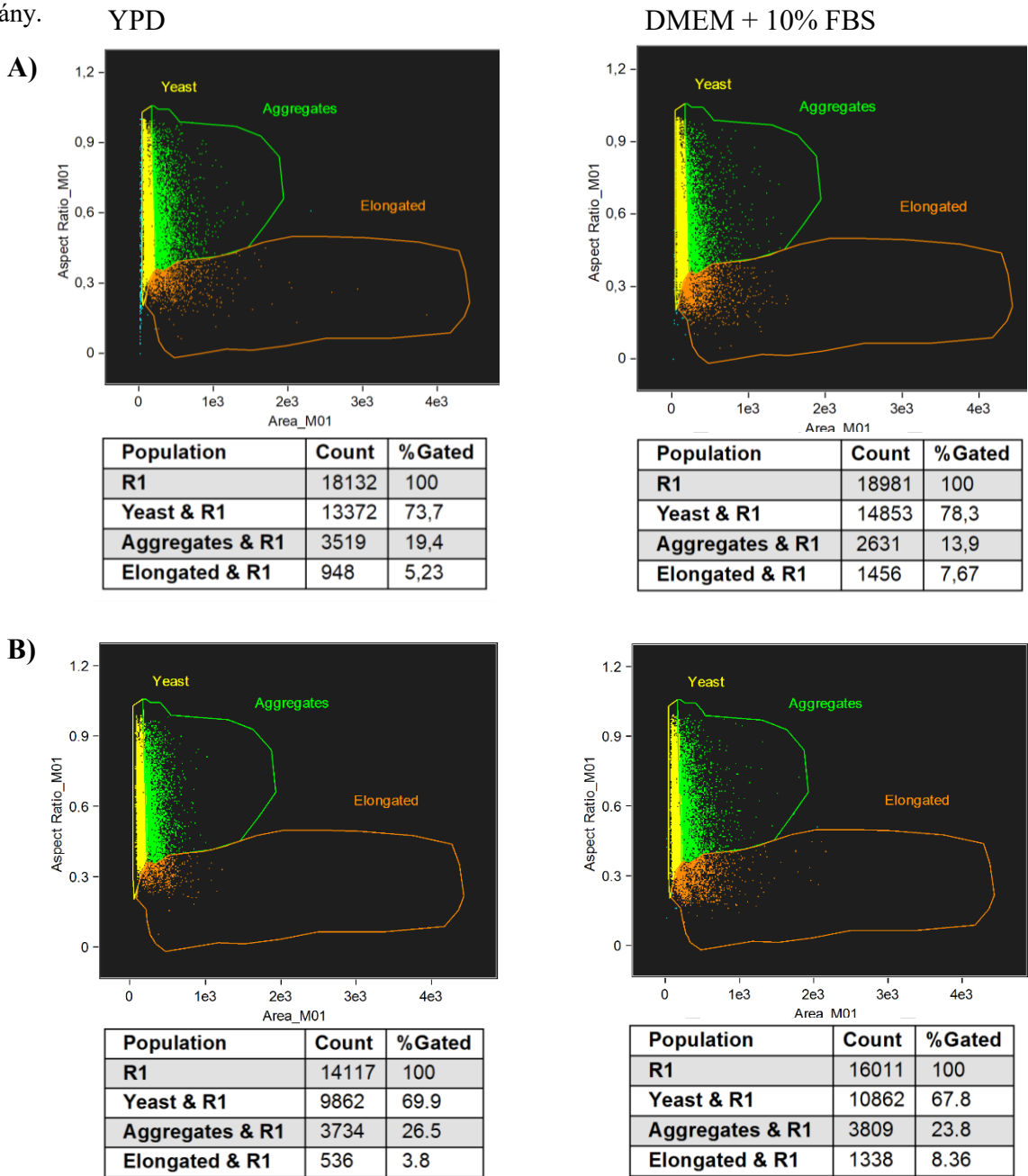
5. számú melléklet. A minimál tápoldatban (YNB) végzett növekedési kinetika vizsgálat eredményeit bemutató grafikonok (T=30°C, N=3, 8-8 technikai párhuzamos minta).



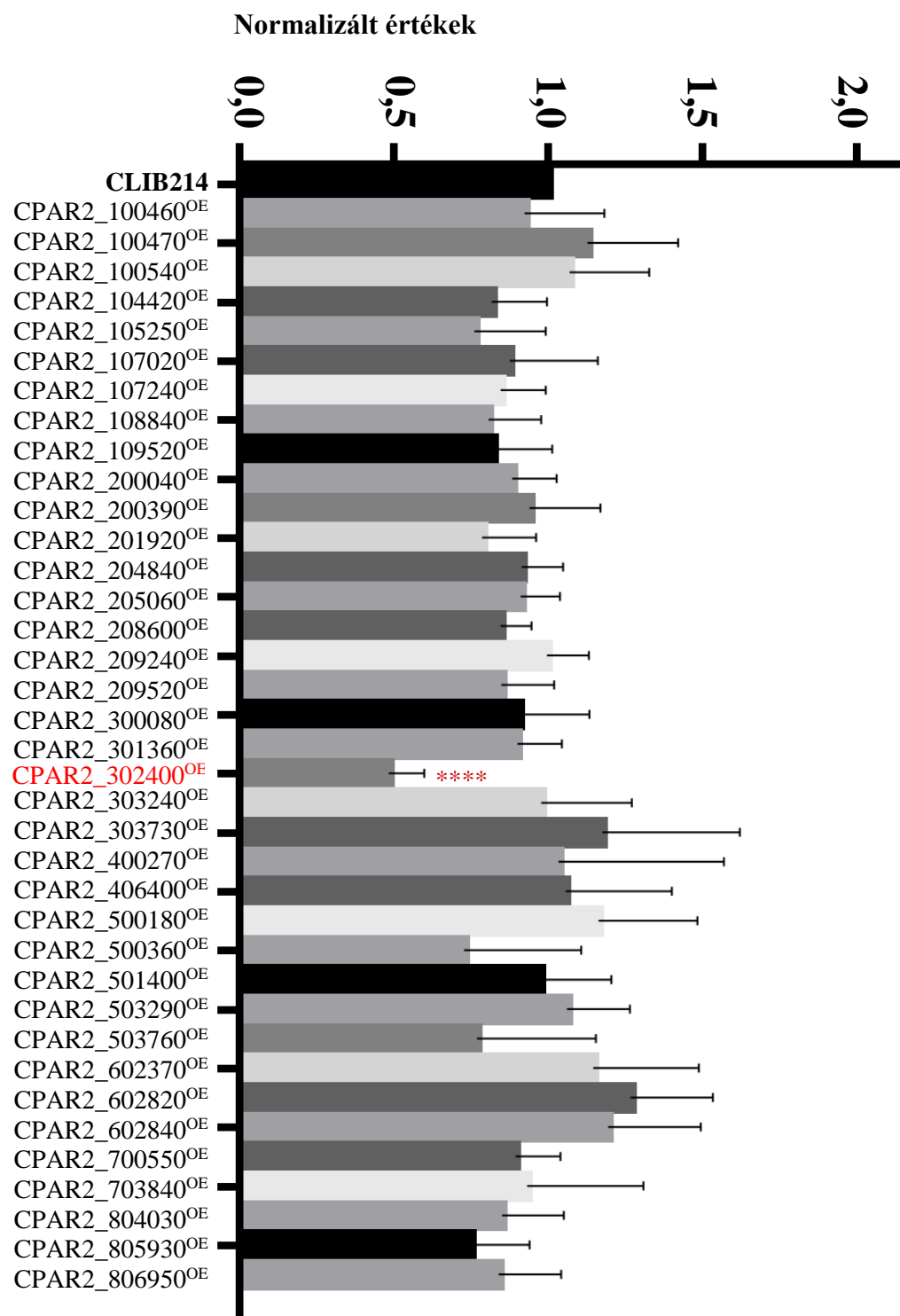
6. számú melléklet. A minimál táptalajon (YNB magzati borjú szérummal kiegészítve és nélküle) 30 és 37°C-on végzett növekedési vizsgálat eredményeit bemutató reprezentatív ábrák.



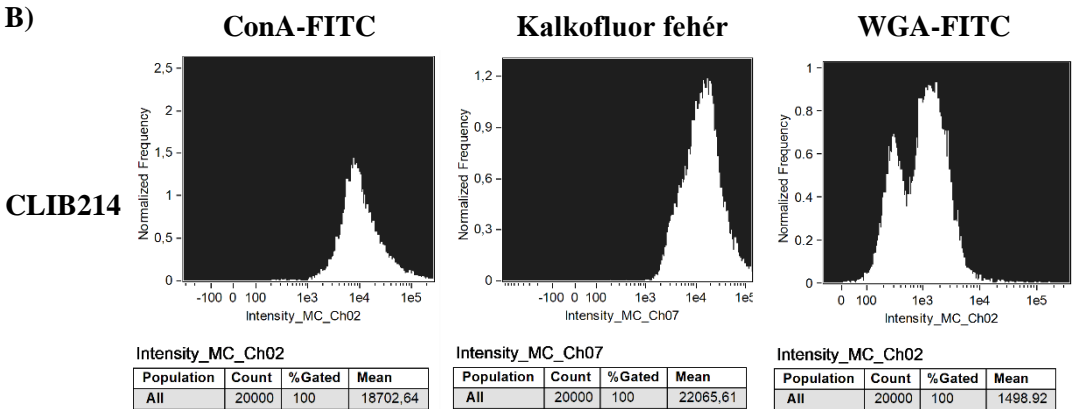
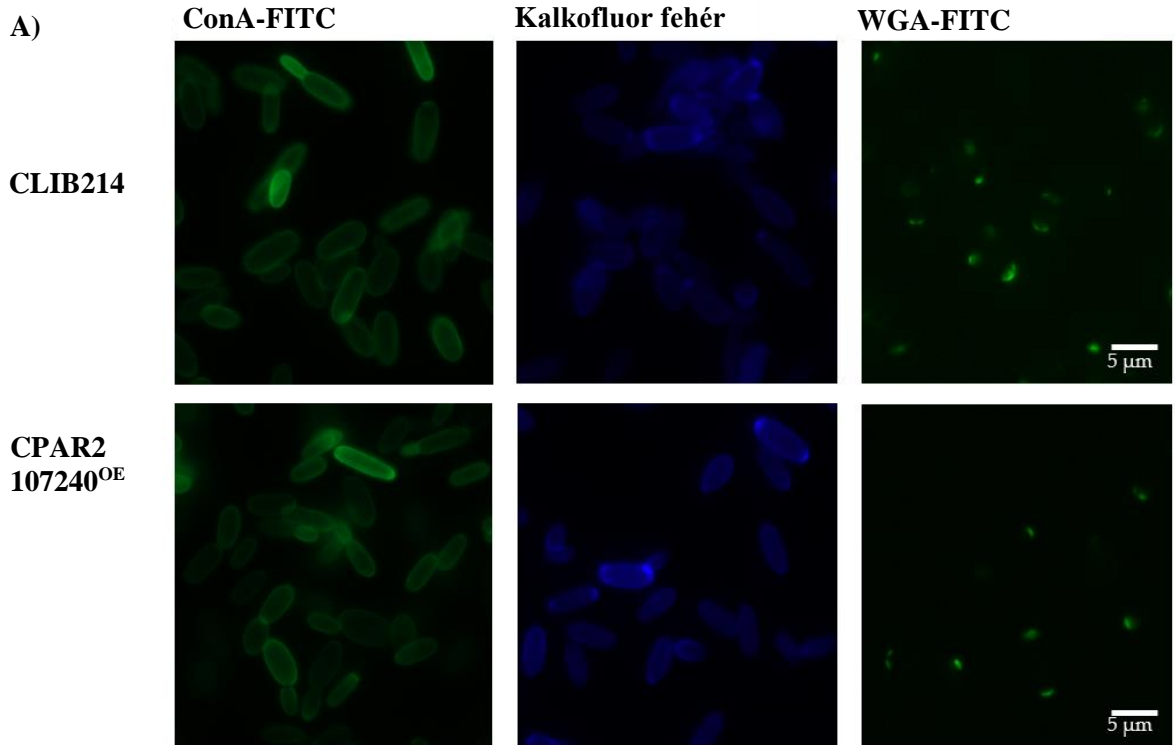
7. számú melléklet. Áramlási citométerrel végzett pszeudohifaképzés vizsgálat. A CLIB214 törzs (A) és a CPAR2_302400^{OE} (B) YPD és DMEM + 10% FBS tápoldatban 48 órás tenyésztés után detektált sejtmegoszlási eredményei. C) A fénymikroszkópos felvételek a háromféle detektált sejtalakot ábrázolják: élesztő (yeast), aggregált/összetapadt (aggregated) és fonalas (elongated) sejtalakok. A különböző sejtípusokat méretük alapján különítettük el. Population: adott populáció; Count: adott populációhoz tartozó detektált sejtszám; %Gated: az összsejtszámhoz viszonyított %-os arány.



8. számú melléklet. Az OE mutánsok biofilmképző hatékonyságának vizsgálata. Az OE mutánsok metabolikus aktivitását MTT reagens segítségével vizsgáltuk a gyártó utasításait követve, majd a mért OD₅₄₀ értékeket a CLIB214 adataira normalizálva tüntettük fel. A kísérletet 3 ismételtsben, kísérletenként 8 párhuzamos mintát alkalmazva végeztük. A statisztikai analízishez egyszempontos varianciaanalízist alkalmaztunk (one-way ANOVA, Dunnett's multiple comparisons test, **** $P < 0,0001$).



9. számú melléklet. A kiválasztott mutáns törzsek egyes sejtalkomponenseinek analízise. Fluoreszcens mikroszkópos felvételek (A) a vizsgált sejtalkomponensekről – a kitin (kalkofluor fehér), a kitin oligomer molekulái (WGA-FITC) és a sejt fal felszínén található mannoproteinek (ConA-FITC) – a CLIB214 és a CPAR2_107240^{OE} mutánsok esetében. A vizsgált sejtalkomponensek analízise áramlási citométer segítségével (B) a CLIB214 mutáns esetében. A hisztogramok az egyes festékek átlag fluoreszcencia intenzitását („Mean”) ábrázolják.



10. számú melléklet. Saját és korábbi tanulmányok eredményeit összesítő táblázat. 1. - Parallel KO/OE mutáns fenotípus (*Cp* - *C. parapsilosis*; *Ca* - *C. albicans*; *Sc* - *Saccharomyces cerevisiae*); 2. - OE/KO fenotípus összehasonlítás Prelich, 2012 szerint.

Mutáns törzs	Ortológ név	Ortológ funkció	Elérhető <i>C. parapsilosis</i> KO mutáns	Detektált fenotípus jelen tanulmányban	1.	2.
CPAR2_107240 ^{OE}	<i>CaKTR4/MNT4</i>	<i>TR4/MNT4</i> , mannozil transferáz (Kruppa és mtsi., 2004)	-	Fertőzőbb <i>G. mellonella</i> lárva modellben	-	-
CPAR2_108840 ^{OE}	<i>ScSPS1</i>	<i>SPS1</i> , szerin/treonin kináz (Percival-Smith és Segall, 1986)	Tóth és mtsi., 2018	Magas fagocitózis %	SDS érzékenység (<i>Cp</i> , KO)	-
CPAR2_109520 ^{OE}	<i>CaTUP1</i>	<i>TUP1</i> , transzkripció korepresszor (Braun és Johnson, 1997)	Holland és mtsi., 2014	Csökkent stressztűrés, Magas fagocitózis %, Fertőzőbb <i>G. mellonella</i> lárva modellben, Eltérő fertőzőképesség egér modellben	Csökkent stressztűrés (<i>Cp</i> , KO), Abnormális telepmorfológia és növekedett filamentáris növekedés, csökkent invázió <i>in vitro</i> gazda-patogén interakcióban (<i>Ca</i> , KO)	hasonló fenotípus (-/-)
CPAR2_200040 ^{OE}	-	Ismeretlen funkció	Tóth és mtsi., 2018	Csökkent stressztűrés, Magas fagocitózis %	KV rezisztencia (<i>Cp</i> , KO)	ellentétes fenotípus (+/-)
CPAR2_302400 ^{OE}	<i>ScMGT1</i>	<i>MGT1</i> , DNS javító metiltransferáz (Xiao és mtsi., 1991)	Tóth és mtsi., 2018	Csökkent stressztűrés, Csökkent biofilmképzés, Kevésbé fertőző <i>G. mellonella</i> lárva modellben (melanizáció hiánya), Eltérő fertőzőképesség egér modellben	jobb növekedés kompetíciós fitness kísérletben (<i>Sc</i> , KO), csökkent adhézió (<i>Cp</i> , KO)	közel azonos fenotípus (-/-)
CPAR2_406400 ^{OE}	<i>ScRPA12</i>	<i>RPA12</i> , RNS-polimeráz I alegység (Nogi és mtsi., 1993)	-	Alacsony fagocitózis %	sejtméret szabályozás (<i>Ca</i>)	-
CPAR2_500180 ^{OE}	<i>ScKIN3</i>	<i>KIN3</i> , szerin/treonin kináz (Jones és Rosamond, 1990)	Tóth és mtsi., 2018	Alacsony fagocitózis %	KV és koffein érzékenység (<i>Cp</i> , KO), nagyobb sejtméret és csökkent caspofungin rezisztencia (<i>Ca</i> , KO), csökkent növekedés abnormális sejtmorfológia és sejtciklus (<i>Sc</i> , OE)	-
CPAR2_602820 ^{OE}	<i>CaFCA1</i>	<i>FCA1</i> , citozin deamináz (Erbs és mtsi., 1997)	Tóth és mtsi., 2018	Fertőzőbb <i>G. mellonella</i> lárva modellben	enyhe/erős növekedési defektus minimál táptalajon (30 és 37 °C) (<i>Cp</i> , KO)	-

