

**A *CANDIDA PARAPSILOSIS* CINK HOMEOSZTÁZISÁBAN SZEREPET JÁTSZÓ
GÉNEK VIZSGÁLATA ÉS FUNKCIONÁLIS JELLEMZÉSE GAZDA-PATOGEN
INTERAKCIÓ SORÁN**

DOKTORI ÉRTEKEZÉS

TAKÁCS TAMÁS

TÉMAVEZETŐK:

PROF. DR. GÁCSEK ATTILA

DR. NÉMETH TIBOR

BIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA



SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM

TERMÉSZETTUDOMÁNYI ÉS INFORMATIKAI KAR

MIKROBIOLÓGIAI TANSZÉK

SZEGED

2024

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék.....	1
I. Rövidítések jegyzéke	4
II. Bevezetés	6
III. Irodalmi áttekintés.....	8
III.1. Az immunrendszer és feladata.....	8
III.2. Az opportunistá patogén gombák egészségügyi jelentősége.....	9
III.3. A humán patogén <i>Candida</i> fajok okozta kórképek	11
III.4. A humán patogén <i>Candida</i> fajok epidemiológiája	12
III.5. A <i>C. parapsilosis</i> klinikai jelentősége.....	14
III.6. A humán patogén <i>C. parapsilosis</i>	15
III.6.1. A <i>C. parapsilosis</i> általános jellemzése	15
III.6.2. A <i>C. parapsilosis</i> virulencia faktorai.....	17
III.7. Gomba növekedést limitáló fém ion felvételi mechanizmusok virulenciában betöltött szerepe..	21
III.7.1. Vas ion felvétel.....	22
III.7.2. Cink ion felvétel és raktározás	24
III.8. A veszélytett immunrendszer és effektor sejtjei gombafertőzések során	26
III.8.1. Neutrofilek.....	27
III.8.2. Természetes öölősejtek.....	27
III.8.3. Dendritikus sejtek.....	28
III.8.4. Monociták és makrofágok	28
IV. Célkitűzések	33
V. Anyagok és módszerek.....	34
V.1. A kísérletek során alkalmazott törzsek	34
V.1.1. Alkalmazott baktérium törzsek.....	34
V.1.2. Alkalmazott <i>Candida</i> törzsek	34
V.1.3. Alkalmazott egér törzsek.....	35
V.2. Táptalajok, tápoldatok és oldatok.....	35
V.3. Törzsek fenntartása és tenyésztése	38
V.3.1. <i>E. coli</i> törzsek fenntartása és tenyésztése	38
V.3.2. <i>C. parapsilosis</i> törzsek fenntartása és tenyésztése	38
V.4. <i>C. parapsilosis</i> mutáns törzsek előállítása.....	39
V.4.1. <i>In silico</i> analízis	39
V.4.2. Homozigóta deléciós mutáns törzsek létrehozása	39
V.4.3. HIS1 és LEU2 markerek amplifikálása	39
V.4.4. Upstream és downstream szakaszok amplifikálása	40
V.4.5. Upstream és downstream amplikonok izolálása.....	41

V.4.6. Horizontális gélelektroforézis.....	41
V.4.7. PCR termék tisztítása polietilén-glikol segítségével (PEG)	41
V.4.8. Össz DNS kivonás <i>C. parapsilosis</i> sejtekből	42
V.4.9 Fúziós PCR.....	43
V.4.10. Kémiai transzformálás.....	43
V.5. Génrekonstruált törzsek létrehozására használt technikák	44
V.5.1. A visszaépíteni kívánt gének amplifikálása Gateway TM klónozáshoz.....	44
V.5.2. BP klónozás	44
V.5.3. LR klónozás.....	44
V.5.4. Bakteriális plazmid izolálása	44
V.5.5. CpZRC1 gén funkcionális helyreállítása CaTDH3 promóter segítségével	45
V.5.6 GFP jelölt törzsek létrehozása	45
V.5.7. CpZrc1-GFPtag törzsek létrehozása.....	46
V.6. <i>C. parapsilosis</i> mutáns törzsek ellenőrzése	46
V.6.1. Kolónia PCR.....	46
V.6.2. Southern hibridizáció.....	48
V.6.3. Fenotípusos jellemzés.....	49
V.6.4. Génexpresszió vizsgálata.....	49
V.7. Fluoreszcens festés	50
V.7.1. Zinquin	50
V.7.2. AlexaFluor 647.....	50
V.7.3. Sejtfalfestés.....	51
V.7.4. Sejtmagfestés.....	51
V.7.5. Vakuólumok festése	51
V.7.6. FluoZin-3.....	51
V.8. J774.2 egér makrofágok fenntartása	52
V.9. PBMC sejtek szeparálása és fenntartása.....	52
V.10. M1-típusú humán makrofágok differenciáltatása, karakterizálása és aktiválása.....	53
V.11. Fagocitózis vizsgálat	53
V.12. Gomba eliminációs vizsgálatok.....	54
V.13. <i>In vivo Galleria mellonella</i> fertőzés	55
V.14. <i>In vivo</i> egér fertőzés.....	55
V.15. CFU meghatározás az egér modellekben	55
V.16. Statisztikai analízis	55
V.17. Alkalmazott programok.....	56
VI. Eredmények.....	57
VI.1. <i>C. parapsilosis</i> potenciális cink transzportereinek <i>in silico</i> azonosítása.....	57

VI.2. Potenciális cink-transzporter gének cink ion-függő expressziója	58
VI.3. Géndeléciós és génreintegrált törzsek létrehozása és jellemzésük.....	59
VI.4. A Δ/Δ CpZRT21 mutánsok cink koncentráció és pH függő növekedése	63
VI.5. A CpZRT2 gének expresszió kompenzációja.....	65
VI.6. CpZrc1 esszenciális magas cink ion koncentrációjú környezetben	66
VI.7. <i>C. parapsilosis</i> cinkoszóma formációjának vizsgálata.....	68
VI.8. A CpZrc1 intracelluláris lokalizációja	71
VI.9. <i>In vitro</i> J774.2 egér makrofágok és a <i>C. parapsilosis</i> cink transzporter mutáns törzsek interakciójának jellemzése: fagocitózis	73
VI.10. <i>In vitro</i> J774.2 egér makrofágok és a <i>C. parapsilosis</i> cink transzporter mutáns törzsek interakciójának jellemzése: ölési hatékonyság	74
VI.11. <i>In vitro</i> M1 típusú humán makrofágok és a <i>C. parapsilosis</i> cink transzporter mutáns törzsek interakciójának jellemzése: fagocitózis.....	77
VI.12. <i>In vitro</i> M1 típusú humán makrofágok és a <i>C. parapsilosis</i> cink transzporter mutáns törzsek interakciójának jellemzése: ölési hatékonyság	78
VI.13. J774.2 egér makrofágok cink ion toxicitáson alapuló <i>C. parapsilosis</i> ölési folyamata	79
VI.14. Az M1 típusú humán makrofágok cink ion mérgezésen alapuló <i>C. parapsilosis</i> ölési mechanizmusa	80
VI.15. <i>C. parapsilosis</i> cink transzportereinek szerepe <i>Galleria mellonella</i> fertőzése során.....	82
VI.16. <i>C. parapsilosis</i> cink transzporterek szerepe vad típusú BALBc egér <i>in vivo</i> fertőzést követően	83
VII. Eredmények értékelése	87
VII.1. A <i>C. parapsilosis</i> potenciális cink transzportereinek génexpressziós jellemzése.....	87
VII.2. A <i>C. parapsilosis</i> cink felvételi rendszere	88
VII.3. A <i>C. parapsilosis</i> cink detoxifikáló rendszere.....	90
VII.4. J774.2 egér és M1 típusú humán makrofágok és <i>C. parapsilosis</i> cink transzporter mutánsok <i>in vitro</i> interakciója.....	91
VII.5. J774.2 egér és az M1 típusú humán makrofágok cink mérgezésen alapuló <i>C. parapsilosis</i> elleni ölési mechanizmusa.....	92
VII.6. Cink transzporterek szerepe <i>C. parapsilosis</i> virulenciájában <i>in vivo</i> <i>G. mellonella</i> és vad típusú egér modellekben	93
VIII. Összefoglalás.....	95
IX. Summary	100
X. Irodalomjegyzék	104
XI. Köszönetnyilvánítás	121
XII. Függelék.....	123

I. Rövidítések jegyzéke

AA: arachidonic acid (arachidonsav)

ALS: agglutinin-like sequence (agglutinin-szerű szekvencia)

BMDM: bone marrow derived macrophage (csontvelőből származó makrofág)

Bp: base pair (bázispár)

BSA: bovine serum albumin (marha szérum albumin)

CDC: Centers for Disease Control and Prevention (Amerikai Járványügyi Hivatal)

CLIB214: *Candida parapsilosis* törzs

DAMP: damage-associated molecular patterns (károsodáshoz kapcsolódó molekuláris mintázat)

DIG: Digoxigenin

DMEM: Dulbecco's modified Eagle's medium

EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid (etilén-diamin-tetraecetsav)

GFP: green fluorescent protein (zöld fluoreszcens fehérje)

GM-CSF: granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (granulocita-makrofág stimuláló faktor)

HIV: humán immundeficiencia-vírus

IFI: invasive fungal infection (invazív gombafertőzés)

IFN-I: Interferon-I

IL: interleukin

J774.2: egér makrofág sejtvonal neve

LIP: Lipase (lipáz)

Mbp: megabázispár

MOI: multiplicity of infection (fertőzési arányszám)

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

NK: natural killer (természetes ölősejt)

ORF: open reading frame (nyílt leolvasási keret)

PAMP: pathogen-associated molecular pattern (patogén-asszociált molekuláris mintázat)

PCR: Polymerase chain reaction (polimeráz láncreakció)

PBS: phosphate-buffered saline (foszfáttal puffereelt sóoldat)

PGE2: prosztaglandin E2

PS: penicillin-sztreptomycin

SAP: szekretált aszpartil proteináz
SAPP: szekretált aszpartil proteináz *Candida parapsilosis*-ban
SC5314: *Candida albicans* törzs
SDS: sodium dodecyl sulfate (nátrium-dodecil-szulfát)
Th: T-helper (T-segítő)
TGF: tumor growth factor (tumor növekedési faktor)
TLR: Toll-like receptor
TNF: tumor nekrosis faktor
VVC: vulvovaginális kandidiázis
YPD: élesztőkivonat-pepton-D-glükóz
YPD-PS: élesztőkivonat-pepton-D-glükóz - penicillin - sztreptomycin
ZnT: cink transzporter
ZIP: Zrt2-Irt-like protein (Zrt2-Irt-szerű fehérje)

II. Bevezetés

A nehéz- és könnyű fémionok nélkülözhetetlenek a sejtek növekedéséhez, számos metalloprotein kofaktoraiként szolgálnak, amelyek esszenciálisak a komplex anyagcsere folyamatokban és a szervezet homeosztázisának fenntartásában (Waldron és mtsai., 2009). Ezen elemek jelenlétének vagy hiányának klinikai jelentősége van, mivel hozzájárulnak a sejt megfelelő működéséhez szükséges fiziológiai szükségletek kielégítéséhez. A cink számos enzim fő alkotóeleme, fontos szerepet játszik mind a veleszületett, mind az adaptív immunrendszer működésében. Számos enzim és más fehérje működéséhez szükséges, beleértve a szuperoxid-diszmutázokat, alkohol-dehidrogenázokat és transzkripció faktorokat (Eide és mtsai., 2006, Andreini és mtsai., 2009). A sejtek cink transzporterei lehetővé teszik a környezetükben lévő cink megszerzését és/vagy a felesleges cink eltávolítását annak érdekében, hogy a sejtek és szervezet ideális homeosztázisa fennmaradjon. Magasabb rendű szervezetek számára a patogénnel szembeni védekezés egy módja a nyomelemek, mint például a cink ionok kötött formában tartása, így az a legtöbb mikroba számára nem hozzáférhető. Ebből kifolyólag azoknak a patogéneknek, amelyek mégis képesek növekedni a gazda szervezeten belül és akár kórfolyamatot kiváltani, olyan cink transzport rendszerrel kell rendelkezniük, amelyek segítségével a kötött állapotú cink ionokhoz hozzá tudnak férni. Másrészt a cinknek mérgező hatása is lehet a kórokozókra. Például az egér makrofágok képesek toxikus szintre emelni a cink koncentrációját a fagolizozómában, ahol hatékonyan eliminálják a *Mycobacterium tuberculosis*-t ebben a kompartmentben (Botella és mtsai., 2011). Ezen túlmenően az egér csontvelőből származó makrofágok (BMDM, bone marrow derived macrophage) esetében egy IFN-I (Interferon-I) -függő útvonal *Candida glabrata* fertőzést követően cink-toxicitást eredményezhet a fagolizozómában (Riedelberger és mtsai., 2020). Összességében a kórokozók mind a limitált, mind a nagy mennyiségű cinkkel szembesülnek amikor potenciális gazdaszervezettel találkoznak, mivel nemcsak az alapvető tápanyagok korlátozott hozzáférést kell leküzdeniük, hanem a gazdasejt hatékony válaszreakciója esetén a fémionok potenciálisan toxikus szintjét is. A gazdaszervezet ezen védekező válaszait „nutritional immunity”-nek nevezi a szakirodalom (Hood és mtsai., 2012). Az elmúlt évtizedekben a *Candida* fajok által kiváltott betegségek esetszáma rohamos emelkedést mutatott, emiatt a *Candida albicans* és *Candida parapsilosis* a gazda-patogén kölcsönhatás tanulmányozásának egyik fő modelljévé lépett elő. Ezek közül a *C. albicans* cink transzporter rendszeréről számos tanulmány érhető el a szakirodalomban, ugyanakkor az

elsősorban csecsemőket veszélyeztető *C. parapsilosis* cink homeosztázisának komponenseiről kevés ismeretanyag áll rendelkezésünkre.

Munkánk során célul tűztük ki a *C. parapsilosis* cink ion transzportereinek *in silico* analízisét, a prediktált cink ion transzportereket kódoló gének deletálását, valamint a mutások fenotípusos és funkcionális jellemzését. Vizsgáltuk a *C. parapsilosis* cink transzporter

deléciós mutánsait *in vitro* egér és humán M1 típusú makrofágok jelenlétében, valamint *in vivo* viaszmosoly lárva és egér modellekben. Emellett elemeztük egér és M1 típusú humán eredetű makrofágok cink ion háztartását a *C. parapsilosis*-szal történő interakció során.

III. Irodalmi áttekintés

III.1. Az immunrendszer és feladata

Földünk élőlényei számos védekezési mechanizmust alkalmaznak annak érdekében, hogy megvédjék saját integritásukat az esetleges külső, és belső veszélyekkel szemben. Míg ez a prokariótáknál különböző enzimrendszereket jelent, magasabb rendűeknél ezt a feladatot egy komplex, finoman hangolt, humorális és sejtes komponenseket is magában foglaló immunrendszer látja el. A védelem mellett az immunrendszer érzékszervi funkciót is betölt, ugyanis képes a gazdaszervezet körül, illetve azon belül található mikrobiológiai környezet érzékelésére, a veszélyest az ártalmatlantól való elkülönítésre, amely szerint megfelelő válaszreakciót indít el. Külső idegen ellenséget jelenthet egy magasabb rendű organizmus számára a gomba, baktérium, vírus, illetve egysejtű parazita jelenléte. Az immunrendszer által érzékelt belső veszély jel lehet a károsodott, vagy a mikroorganizmus által fertőzött szöveti régió, továbbá saját, megváltozott működésű rákos természetű sejt. Szervezetünk számos mikroorganizmussal él együtt, amelyet összefoglaló néven mikrobiomnak nevez a szakirodalom (Gilbert és mtsai., 2018). Egy egészséges szervezet esetében esszenciális a mikrobák ezen közösségének megfelelő minősége és mennyisége, amelynek szabályozása immunrendszerünk kiemelt feladata. Azonban egyes betegségek esetében vagy orvosi beavatkozások során - immunszuppresszált állapotban - a humán flóra egyes, ún. opportunistá patogén baktérium, illetve gomba fajai elszaporodhatnak, és így súlyos megbetegedéseket okozhatnak. Az ilyen típusú belső, illetve külső veszélyt a gazdaszervezet a veleszületett és az adaptív immunrendszer humorális és sejtes komponenseinek közös működésével érzékeli, illetve hárítja el (Yatim és Lakkis, 2015).

A patogén organizmus a külső környezettel közvetlenül érintkező felületekkel kerül interakcióba először, amelyek mind fizikai, mind kémiai gátat jelentenek számára. Fizikai akadályt jelent a testhőmérséklet, az epitél sejtek szorosan egymáshoz kapcsolódó szöveti rétegei, kémiai védelmi rendszerként a gasztro-intesztinális traktus változó pH értékű környezete, valamint a tápcsatornában, az orr- és szemváladékban található mikroba ellenes enzimek funkcionálnak (Ellison és mtsai., 1991). A veszélyforrást jelentő kórokozók elszaporodásának gátlása esszenciális a gazdaszervezet számára, ezt további kémiai úton elsősorban testfelszínre szekretálódó mikroba ellenes peptidek (pl. defenzinek) végzik (Xu és mtsai., 2020). Emellett kiemelt jelentőséggel bír az idegen kórokozók elleni védelemben a gazdaszervezet saját, különböző baktériumok és gombák alkotta közössége. Ez a mikrobióta

egészséges állapotban elfoglalja a káros organizmusok növekedéséhez szükséges felületeket, továbbá elhasználják a kórokozók fennmaradásához elengedhetetlen tápanyagokat és nyomelemeket, valamint egyes tagjai képesek antimikrobiális peptidek szekretálására is (Tancrède, 1992, G. Wang, 2014). Ha egy patogén organizmus átjut a fent említett első védelmi vonalon, akkor a veleszületett immunrendszer egyes elemeivel kerül kapcsolatba. A szervezetben inaktív állapotban jelen lévő komplement rendszer kaszkádszerű aktiválása, valamint az immunsejtek által szekretált gyulladásos (IL-1, IL-6, IL-12, TNF- α , IFN- γ) és antiinflammatorikus (IL-4, IL-10, TGF- β) citokinek és kemokinek mediálják az immunrendszer sejtjeinek válaszütemét egy patogén organizmus megjelenésekor. A veleszületett immunrendszer neutrofil granulocitái, természetes ölüsejtjei, dendritikus sejtjei, monocitái és makrofágjai, valamint az adaptív immunrendszer különböző T-sejt és B-sejt populációi együttesen játszanak szerepet a kórokozók felismerésében, hatékony eliminálásában, immunmemória kialakulásában, és így a szervezet optimális homeosztázisának fenntartásában.

III.2. Az opportunistá patogén gombák egészségügyi jelentősége

Napjainkig ismert gomba fajok száma százezres nagyságrendű, azonban humán patogénként alig több mint ötszázat ismer a klinikum (Brown és mtsai., 2012). Gombák által kiváltott megbetegedések leggyakrabban a bőrt érintik, az ilyen típusú gombás megbetegedésekben a Föld népességének körülbelül negyede érintett (Lopes és Lionakis, 2022). A bőr keratinban gazdag szöveteinek fertőzéséért leggyakrabban dermatofiták, például *Trichophyton rubrum*, *T. interdigitale*, *T. tonsurans* és *Microsporum canis* felelősek (Brown és mtsai., 2012), továbbá a bőr és a nyálkahártya egyik fő kórokozói közé tartoznak a *Candida* nemzetség képviselői (Ameen, 2010, Ameen, 2010). Nyálkahártyával borított felületek gombás fertőzésében évente ~ 100 millió ember szenved, beleértve vulvovaginális megbetegedéseket is, amelyen a legtöbb nő élete során legalább egyszer átesik (Gow és Netea, 2016, Lopes és Lionakis, 2022). Emellett számos humán patogén gomba faj szervek kolonizációjára is képes, amely súlyos, invazív mikózishoz (IFI-Invasive Fungal Infection) vezethet (Köhler és mtsai., 2017). A globális halálozási arány ilyen megbetegedések tekintetében meghaladja az évi 1,5 milliót, amely több, mint a maláriában elhunytak, továbbá közel egyenértékű a HIV és a tuberkulózis okozta halálozások számával (X. Wang és mtsai., 2016, Tóth és mtsai., 2019). A gombaellenes szerek fejlesztésének és a gomba-patogén kölcsönhatás vizsgálatának időszerűségét az elmúlt 30 évben tapasztalt gombafertőzések

magas esetszáma, illetve globális halálozási aránya jelenti, amelyekért több, mint 90%-ban *Aspergillus*, *Cryptococcus* és *Candida* fajok tehetők felelőssé (Brown és mtsai., 2012). Az *Aspergillus fumigatus* okozta aspergillosis becslések szerint évente több, mint 200 000 invazív megbetegedést is jelenthet, amely 30–95 %-os halálozási aránnyal párosul (Brown és mtsai., 2012). Kiemelkedően magas esetszámok ismertek *Cryptococcus neoformans* és *Cryptococcus gatti* fajok által okozott cryptococcosis esetében, amely több, mint egymillió embert érint, 20–70%-os halálozási aránnyal (Park és mtsai., 2009, Brown és mtsai., 2012). Az *Aspergillus* és a *Cryptococcus* nemzetség képviselőin túl a *Candida* fajok szintén jelentős számú, súlyos invazív gombás fertőzések okozói, a gombafertőzések okozta halálozások akár 30%-áért is felelősek lehetnek (Strollo és mtsai., 2017).

Az invazív gombás fertőzések szorosan összefüggenek a gazdaszervezet immunrendszerének állapotával és a fertőzést okozó gombafajjal. Az egészséges immunrendszer hatékonyan biztosít védelmet a szisztémás gombafertőzések ellen, azonban az immunrendszer kórosan legyengült állapota lehetőséget biztosíthat, úgynevezett opportunistá humán patogének elszaporodására és így betegségek kialakítására. Kiemelt rizikócsoporthoz tartoznak a koraszülöttek, legyengült immunrendszerű betegek, például immunszuppresszív terápiák alatt állók szervtranszplantáció vagy sebészi beavatkozás alkalmával, illetve HIV fertőzött vagy daganatos betegek (Muskett és mtsai., 2011, Spellberg, 2011). A gombás fertőzések a kiváltó fajok sokfélesége (kolonizáltság és a fertőzés mértéke, kialakított betegség), valamint a számos morfológiai megjelenésük miatt a különböző patogén gombafajok klinikai tünetek alapján nehezen azonosíthatóak.

Mikózis esetén lehetőség nyílik az adott faj/fajok diagnosztikai azonosítására, amely elősegíti a megfelelő gombaellenes gyógyszerekkel történő kezelés megkezdését. A kritikus állapotú betegek magas halálozási aránya a késleltetett diagnózis, valamint későn megkezdett antifungális kezelés következménye lehet (Pathakumari és mtsai., 2020). A jelenlegi gombaellenes szerek számos korláttal rendelkeznek: kevés típusú és számú érhető el a klinikumban, alacsony hatékonysággal bírnak egyes gombafajok ellen, továbbá káros hatásai is vannak az emberi szervezetre. Ezen túlmenően a gyógyszereknek a hosszú távú használata és helytelen kezelése rezisztens törzsek megjelenéséhez is vezethet (Denning & Bromley, 2015). Számos, a közelmúltban megjelent tanulmány szerint az IFI-k jelentik a legsúlyosabb globális fenyegetést a gyógyszerrezisztens gombák, például rezisztens *Candida auris* törzsek egyre gyakoribb megjelenése miatt (Denning és Bromley, 2015, Lockhart és mtsai., 2017, Navalkele és mtsai., 2017). Nagy segítséget jelentenének a gombafertőzések megelőzésében gombaellenes vakcinák. Jelenleg nincs az Amerikai Élelmiszerbiztonsági és Gyógyszerészeti

Hivatala (FDA, Food and Drug Administration) által jóváhagyott ilyen készítmény, de már több kutatócsoport olyan új gomba elleni vakcinák kifejlesztésén dolgozik, amelyek hosszú távú memóriaválaszt válthatnak ki, különösen immunhiányos betegek esetében (Sandini és mtsai., 2011). Az IFI-k globális előfordulásának és az általuk okozott halálozások csökkentése érdekében Point-of-Care (POC) diagnosztikai eszközök, valamint kevesebb mellékhatással járó gombaellenes szerek és hatékony, biztonságos gombaellenes oltóanyagok fejlesztése van folyamatban (Zhang és mtsai., 2021, Gentilotti és mtsai., 2022, Wijnants és mtsai., 2022).

III.3. A humán patogén *Candida* fajok okozta kórképek

A *Candida* fajok a természetes humán flóra részét képezik, kommenzalista élesztőgombák, amelyek általában az emberi gyomor-bél traktusban, a nyálkahártyákon és a bőrön találhatók. Opportunista patogének, ugyanis az immunrendszer nem megfelelő működése esetén jelentenek csak veszélyt. Ilyen körülmények között, rendszerint széles spektrumú antibiotikumok használata esetén, felborulhat a gazdaszervezet bakteriális flórájának egyensúlya, mert az immunrendszer nem képes kontrollálni a humán gomba flóra tagjainak növekedését, amely így endogén *Candida* fertőzéshez vezethet (Amici és mtsai., 1994), (Marnach és mtsai., 2022). A hosszabb ideig tartó kórházi ellátás esetén fellépő *Candida* fertőzés általában exogén eredetű, amelynek potenciális forrása a kórházi dolgozók kezén, valamint a nem megfelelően sterilizált orvosi eszközök felszínén jelen levő patogének (R. Singh és Parija, 2012). A *Candida* fajok által kiváltott mikózisokat a klinikum összefoglaló néven kandidiázisnak nevezi. Felszíni fertőzés esetén leggyakrabban a bőr és függelékei érintettek, *Candida* eredetű körömggyulladás, illetve körömgombásodás, valamint a csecsemők körében előforduló pelenka dermatitisz a leggyakoribb kórkép. Nyálkahártya kandidiázissal leggyakrabban a szájüreg és az ahhoz kapcsolódó szervek (garat, nyelőcső) hozhatók összefüggésbe, kiemelt rizikócsoporthoz számítanak az újszülöttek, az AIDS-es betegek, illetve a műfogsorral vagy fogpótlással rendelkezők és az idősek (Pappas és mtsai., 2009). Enyhébb tünetekkel járó megbetegedés a vulvovaginális kandidiázis (VVC, Vulvo Vaginal Candidiasis). Felmérések szerint a nők közel 75 százaléka esik át élete során legalább egyszer VVC-n, azonban a gyakori előfordulás ellenére a VVC halálozási aránya elhanyagolható (Pappas és mtsai., 2018). Rendszerint az immunrendszer jelentős alulműködése esetén az arcbőr, valamint a körmök krónikus mukokután *Candida* fertőzése (CMC, Chronic Mucocutaneous Candidiasis) a felszíni gombás fertőzések egyik legveszélyesebb, illetve

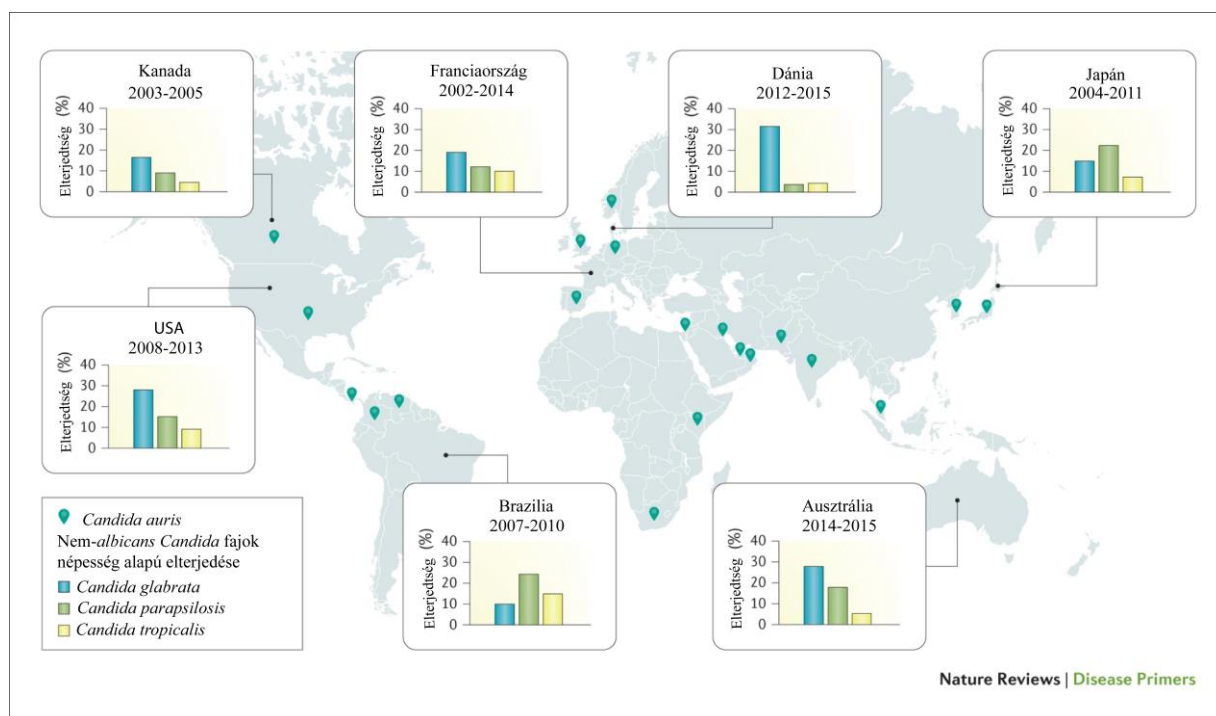
legnehezebben kezelhető megbetegedése (Martins és mtsai., 2014, Sahu és mtsai., 2022). *Candida* fertőzés során, ha a gomba bejut a véráramba kandidémiáról beszélünk, amely invazív kandidiázis kialakulásához vezethet. Ez a *Candida* fajok által kiváltott fertőzések legsúlyosabb formája, számos belső szervre kiterjedhet, szétterjedve szisztémás/disszeminált kandidiázis alakul ki. A *Candida* fertőzés súlyos következménye lehet agyhártyagyulladás (meningitisz), a szívbelhártya gyulladása (endokarditisz), csontbőrnyaggyulladás (osteomyelitis), továbbá a lép (szplenitisz) vagy a hashártyát (peritonitisz) érintő gyulladás (Pfaller és Diekema, 2007, Tóth és mtsai., 2019). Invazív kandidiázis tekintetében legfőképpen a gyenge vagy nem megfelelően működő immunrendszerrel rendelkezők veszélyeztetettek, továbbá az ilyen típusú fertőzések magas százalékban halálos kimenetelűek (Rosati és mtsai., 2020).

III.4. A humán patogén *Candida* fajok epidemiológiája

A fejlett országokból regisztrált esetek szerint világszerte évente több, mint 400 ezer *Candida* fajhoz köthető fertőzés azonosítható, amelyek rendszerint nozokomiális (kórházi környezetben) jelentkeznek (Pfaller & Diekema, 2007, Brown és mtsai., 2012). A *Candida* nemzetség tagjai között a *Candida albicans* klinikai megjelenése a leggyakoribb mind felnőtt, mind gyermek populációban, azonban az elmúlt 20 évben a nem-*albicans* fajok (NAC, Non *albicans Candida*) egyes régiókban meghaladják a *C. albicans* incidenciáját (Caggiano és mtsai., 2017, Harrington és mtsai., 2017, Xiao és mtsai., 2018, Al-Dorzi és mtsai., 2020.). A klinikumban megjelenő NAC fajok közé elsősorban a *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. auris* és a *C. parapsilosis* tartozik. A nem-*albicans Candida* fajok megjelenését a legtöbb régióban általában olyan tényezők határozzák meg, mint a gombaellenes szerek használati szokásai és ezzel a gombákban kialakuló antifungális rezisztencia mértéke, valamint a területre jellemző beteg populációk kockázati tényezői.

Pfaller és munkatársai szerint az Észak-Amerikán belül felmért régiók 62%-ában a *Candida* okozta megbetegedések több mint feléért NAC fajok felelősek (Pfaller és mtsai., 2014). A NAC fajok elterjedésének növekedését egy Japánban végzett felmérés is alátámasztja: a *C. albicans* okozta kandidémiák aránya a 2003-ban mért 58,2%-ról, 2014-re 30%-ra csökkent (Kakeya és mtsai., 2018). Ehhez hasonlóan Xiao és munkatársai is leírták, hogy a *Candida* okozta vérfertőzéseknek 58%-a NAC fajoknak tulajdonítható kínai kórházak adatai szerint (Xiao és mtsai., 2018). A nem-*albicans* fajok manifesztációját tekintve (1. ábra),

az Egyesült Államokban és Északnyugat-Európában a második leggyakrabban megjelenő faj a *C. glabrata*, amely általában a 60 év feletti egyének és szervátültetésben részesülők között fordul elő (Castanheira és mtsai., 2016, Pfaller és mtsai., 2011, Cleveland és mtsai., 2015). Az elmúlt évtizedben a *C. auris* által okozott fertőzések globális fenyegetéssé váltak világszerte, gyors terjedése és számos antifungális szerrel szembeni rezisztenciája miatt. 2016-ban az amerikai Járványügyi Hivatal (Centers for Disease Control and Prevention - CDC) klinikai riasztást adott ki az egészségügyi intézményeknek a magas mortalitási arányú *C. auris* fertőzések nemzetközi megjelenésére hivatkozva. 2020. évi tanulmányok és a CDC adatai alapján a *C. auris*-t 6 kontinens több, mint 40 országában izolálták, mindemellett a közelmúltban számos, kórházakhoz köthető járvány kitörésével is összefüggésbe hozták (<https://www.cdc.gov/candida-auris/hcp/infection-control/index.html>, Schelenz és mtsai., 2016, Biswal és mtsai., 2017, Ruiz-Gaitán és mtsai., 2018, Ruiz-Gaitán és mtsai., 2019). További aggodalomra ad okot az a tény, hogy a legtöbb *C. auris* klinikai izolátum rezisztens a fertőzések kezelésére használt gombaellenes gyógyszerek egy vagy akár több típusával szemben is (Chowdhary és mtsai., 2014, Lockhart és mtsai., 2017). A *C. krusei* a legkevésbé elterjedt az öt fő opportunista humán patogén *Candida* faj közül, leggyakrabban olyan hematológiai alapbetegségben szenvedő betegeknél fordul elő, akik esetében flukonazol profilaxist alkalmaztak (Pfaller és mtsai., 2011, Castanheira és mtsai., 2016). Az NAC fajok körében a *C. glabrata* incidenciáját meghaladja a latin-amerikai és dél-európai országokban, valamint Indiában és Pakisztánban a *C. tropicalis* és a leginkább az újszülötteket



1. ábra. A nem-albicans *Candida* fajok előfordulásának aránya különböző régiók szerint (Pappas és mtsai., 2018).

III.5. A *C. parapsilosis* klinikai jelentősége

A *Candida parapsilosis* széles körben elterjedt a természetben, ugyanis gyakori a nem emberi forrású izolátum, például a rovarokból, különböző háziállatokról, a talajból vagy tengervízből származó törzs (Van Asbeck és mtsai., 2009). Emellett azonban a *C. parapsilosis* a humán mikrobióta szerves részét képezi, kommenzalista élesztőként képes kolonizálni az emberi bőrt és egyes nyálkahártyával borított felületeket (Bonassoli és mtsai., 2005). Ebből kifolyólag a kórházi ápolók bőrfelszíne a fő terjedési vektora ennek a fajnak, amely ebben a környezetben súlyos nozokomiális mikózisok kialakulásához vezethet (Levin és mtsai., 1998, Van Asbeck és mtsai., 2007). Ahogy a legtöbb humán patogén faj esetében a *Candida* nemzetségen belül, a *C. parapsilosis* által okozott fertőzés is jelentős kockázatot jelent az immunhiányos személyek, például sebészeti beavatkozáson, gyomor vagy bélrendszeri műtéten átesett betegek vagy HIV fertőzöttek körében. Mivel a *C. parapsilosis* könnyedén képes biofilmet képezni számos orvosi eszköz felületén, a katéterrel vagy protézissel ellátottak is rizikócsoporthoz tekinthetők (Ramage és mtsai., 2006). A *C. parapsilosis* biofilm képző képessége kiemelt szereppel bír a patogén terjedése és túlélése szempontjából, ugyanis

megállapítást nyert, hogy a biofilmet alkotó sejtek gombaellenes szerekkel szemben kevésbé érzékenyek, mint a planktonikus sejtek, ami potenciálisan életveszélyes következményekhez vezethet a gazdaszervezetben (Cuéllar-Cruz és mtsai., 2012, Németh és mtsai., 2013). Legnyilvánvalóbb rizikócsoporthoz azonban *C. parapsilosis* fertőzés esetén az újszülöttek csoportja, kiváltképp az alacsony súllyal világra jött csecsemők kezelendők kiemelt kockázattal. Körükben ugyanis a *C. parapsilosis* felelős a *Candida* fertőzések egyharmadáért, továbbá jelentős, 10% feletti halálozási arány ismert az újszülöttek *C. parapsilosis*-szal kapcsolatos szisztémás megbetegedése esetén (Pammi és mtsai., 2013).

Kórházi esetszámát tekintve a *C. parapsilosis* előfordulása földrajzi régióként jelentősen eltérhet (Guinea, 2014). Ez a faj a *C. albicans*-t követve a második leggyakoribb a latin-amerikai kórházakban, például Argentínában, Peruban és Brazíliában, de Venezuelában és Kolumbiában a *C. parapsilosis* még a *C. albicans* okozta fertőzések gyakoriságát is meghaladja (Nucci és mtsai., 2013, Guinea, 2014, Rodriguez és mtsai., 2017). A *C. parapsilosis* klinikai előfordulása Európában is régiófüggő; a dél-európai kórházakban, például Portugália, Spanyolország, Olaszország és Görögország esetében a második leggyakrabban izolált *Candida* faj (Baynes és mtsai., 1986, Faria-Ramos és mtsai., 2014, Guinea és mtsai., 2014, Tedeschi és mtsai., 2016). Azonban Európa középső és északi országaiban a harmadik helyen áll a *C. albicans* és a *C. glabrata* mögött (Arendrup és mtsai., 2011, Chalmers és mtsai., 2011, Ericsson és mtsai., 2013). A *C. parapsilosis* az észak-amerikai térségben Kanadában a második, az Egyesült Államokban a harmadik helyen áll a *Candida* fajok által kiváltott megbetegedések tekintetében (Ting és mtsai., 2018, Toda és mtsai., 2019, Pfaller és mtsai., 2019, Tsay és mtsai., 2020). Az ázsiai és ausztráliai földrészen is különböző gyakorisággal azonosítható a véráramból: Kínában és Japánban a NAC fajok közül leggyakoribb, míg Indiában és Ausztráliában a (*C. glabrata*-t követve) a második leggyakoribb kórokozója a szisztémás *Candida* fertőzéseknek (Chapman és mtsai., 2017, Kakeya és mtsai., 2018, Xiao és mtsai., 2020, Rajni és mtsai., 2022).

III.6. A humán patogén *C. parapsilosis*

III.6.1. A *C. parapsilosis* általános jellemzése

A *C. parapsilosis* a kb. 150 fajta magába foglaló *Candida* nemzetségbe tartozik, a tömlősgombák között a *Saccharomycotina* altörzs *Saccharomycetes* osztályán belül *Saccharomycetales* rendbe sorolva (Köhler és mtsai., 2017). Mivel a *C. parapsilosis* esetében

a transláció során a CUG (amely rendszerint leucint kódol) triplet szerin aminosav beépülését jelenti, ezért a mikrobát az ún. CUG-kládba sorolja a szakirodalom (Köhler és mtsai., 2017). A *C. parapsilosis* eredetileg Puerto Rico-ban széklet mintából izolált *Monillia parapsilosis*-ként került be a szakirodalomba Ashford 1928-ban megjelent publikációja alapján (Ashford, B. 1928), *Candida* elnevezést csak 1932-ben kapott (Langeron és Talice 1932). Későbbi vizsgálatok alapján a *C. parapsilosis*-ként ismert fajcsoport tagjai mind virulenciájukban, mind molekuláris markereikben jelentős különbséget mutattak, ezért 2005-ben fajsztintú besorolást kaptak (Tavanti és mtsai., 2005). Három fajt különböztet meg ez alapján az irodalom: *C. orthopsilosis*-t, *C. metapsilosis*-t és *C. parapsilosis*-t. A *C. parapsilosis* élesztősejtjei ovális, kerek vagy henger alakúak, a kolóniák komplett táptalajon fehér, vagy sárgás színűek, sima vagy gyűrött felülettel (Laffey és Butler, 2005, R. Singh és Parija, 2012) Számos más *Candida* fajjal ellentétben, a *C. parapsilosis* nem képez valódi hifákat; csak élesztőként vagy pszeudohifa formákban létezik. Az élesztősejtek formája és a kolóniák felülete szorosan összefügg; a gyűrött felülettel rendelkező sejtek csaknem teljesen pszeudohifa, míg a sima felületűek többnyire élesztő formájúak (Laffey és Butler, 2005).

A *C. parapsilosis* CDC317 vad típusú törzs teljes genom szekvenciája 2009 óta elérhető a *Candida* nemzetségbe tartozó egyéb fajokéval egyetemben (Butler és mtsai., 2009). A *C. parapsilosis* diploid organizmus, teljes genomjának mérete 13 Mbp. Nyolc kromoszómapárral rendelkezik 0.9 és 3.0 Mbp közötti mérettartományban, kromoszómáinak végei 23 nukleotid hosszúságú tandem ismétlődésben végződnek, amely a *CpTER1* telomeráz egy részét kódolja (Gunisova és mtsai., 2009). Az ebben az izolátumban prediktált 5837 kódoló régióból (ORF, Open Reading Frame) közül csak 107-et (1,83%) jellemeztek funkcionálisan (Skrzypek és mtsai., 2017). A *C. parapsilosis* genomja erősen konzervált; a többi vizsgált *Candida* fajhoz képest feltűnően alacsony szintű heterozigotizást mutat, mindössze egyetlen nukleotid polimorfizmussal (SNP) 15 553 bázisonként, ami több mint 70-szer kevesebb, mint a közeli rokon *Lodderomyces elongisporus*-ban (Butler és mtsai., 2009). A *C. parapsilosis* kizárólag ivartalan szaporodási ciklussal rendelkezik, ugyanis a más fajokból ismert *MTLa2* lókuszt funkcióját veszítette, pseudogénként ismert (Logue és mtsai., 2005). Összességében az ilyen alacsony genetikai variabilitás, valamint egy hibás ivaros szaporodási rendszerrel rendelkező klón közelmúltbeli globális elterjedésére utal (Sai és mtsai., 2011).

A gazdaszervezet és a kórokozó közötti interakció első pontja a sejtfal, így annak szerkezete kulcsfontosságú tényező a gombasejtek észlelésében és az immunválasz kiváltásában. Rengeteg információ áll rendelkezésre a *C. albicans* sejtfal szerkezetéről, és hasonló struktúrákat figyeltek meg más *Candida* fajok sejtfalával kapcsolatban is (Garcia-

Rubio és mtsai., 2020). A sejtfal elsősorban három kulcsfontosságú poliszacharidot tartalmaz: kitint, glükánt és mannánt. Ezek a poliszacharidok két rétegben helyezkednek el – a belső réteg kitint és β -glükánt tartalmaz, amelyet a külső réteg erősen mannozilált fehérjéi fednek be (Garcia-Rubio és mtsai., 2020). A β -glükán váz β -1,3-glükánból és rövidebb β -1,6-glükán oldalláncokból áll, amelyeket kovalens keresztkötések kötnék össze egymással és a sejtfal bizonyos komponenseivel (de Assis és mtsai., 2022). A β -1,6-glükán összekötő molekulaként működik, a külső réteg mannoproteinjeit és a β -1,3-glükán-kitin vázat glikozil-foszfatidil-inozitol (GPI) horgony segítségével köti össze.

III.6.2. A *C. parapsilosis* virulencia faktorai

A humán patogén organizmusok azon tulajdonságait, amelyekkel képesek kijátszani az immunrendszer védekező mechanizmusait, és így alkalmazkodni a gazda szervezet *niche*-éhez virulencia faktoroknak nevezzük. Más mikroorganizmusokhoz hasonlóan a *Candida* fajok is számos specifikus és hatékony stratégiát dolgoztak ki, lehetővé téve a kórfolyamat kiváltását. Ez a fejezet a *C. parapsilosis* virulenciájában szerepet játszó molekuláris komponenseket foglalja össze.

III.6.2.1. Sejtadhézió

A *C. parapsilosis* virulenciája részben annak tulajdonítható, hogy képes megtapadni az orvosi eszközök, például polivinil-kloridból (PVC), poliuretánból vagy szilikonból készült katéterek és protézisek abiotikus felszínén, valamint a gazdaszervezet nyálkahártyával borított felületein, így képesek túlélni, valamint kórfolyamatokat elindítani (Silva-Dias és mtsai., 2015). A gomba sejtfalában található fehérjék (CpAls, CpHwp, CpHyr) hatékonyan képesek hozzákötődni a gazdasejtek extracelluláris mátrixának fibronektin, vitronektin és laminin proteinjeihez (Silva-Dias és mtsai., 2015). Butler és munkatársai a CDC317 jelű törzs elemzése során rávilágítottak, hogy a *C. parapsilosis* 5 különböző agglutinin-szerű (Als-szerű) fehérje génjét kódolja, de virulenciában betöltött szerepükre nem szolgáltatott kísérletes bizonyítékot (Butler és mtsai., 2009, Pryszcz és mtsai., 2013). Erre 2016-ig kellett várni, amikor Bertini és munkatársai megállapították, hogy a *C. parapsilosis* ALS7 génjének terméke kulcsfontosságú a patogén gazdasejteken való megtapadásában, továbbá hiánya a gomba virulenciájának csökkenésével járt *in vivo* egérfertőzési kísérletben (Bertini és mtsai.,

2016). Ismert emellett, hogy a glikolízist és glükoneogenezist szabályozó foszfoglicerát kináz (CpPgc) és az enoláz 1 (CpEno1) elengedhetetlenek a *C. parapsilosis* szilikonból készült anyagok felületén való megtapadásában (Núñez-Beltrán és mtsai., 2017).

III.6.2.2. Biofilm képzés

A *C. parapsilosis* mind abiotikus, mind a gazda sejtek felszínén megtapadva megteremti a biofilm kialakulásának lehetőségét, amely polimerek alkotta extracelluláris mátrixba ágyazott gombasejtek sűrű hálózatát jelenti (Tóth és mtsai., 2019). A biofilm kialakulás első lépése a sejtek kitapadása adhéziót elősegítő molekulák segítségével, amelyet egy köztes növekedési fázis követ, ahol a sejtek élesztő formából pszeudohifa formába alakulhatnak (Cavalheiro & Teixeira, 2018). Végző lépés az érési vagy diszperziós szakasz, amely során a gomba sejtek poliszaharidokban, lipidekben és fehérjékben gazdag extracelluláris mátrixot termelnek, ami szerkezeti stabilitást biztosít a biofilm számára (Chandra és Mukherjee, 2015, Cavalheiro és Teixeira, 2018). A *C. parapsilosis* biofilm főként szénhidrátokból, valamint aggregált élesztő formájú sejtekből, illetve pszeudohifákból áll, és bár az általa képzett biofilm réteg vékonyabb, azonban kompaktabb, mint más, hifa képzésre képes *Candida* faj esetében (Kuhn és mtsai., 2002, Silva és mtsai., 2009). Mindemellett a gomba biofilmjének felépítését, morfológiai jellemzőit és vastagságát különböző környezeti faktorok befolyásolják. Ide tartozik a felszín, a környezetének pH értéke, tápanyag- (pl. cukor, lipid stb.) és oxigénellátottsága, a folyadékáramlással járó nyíróerő mértéke, továbbá egyéb mikrobák jelenléte és az ezzel járó kölcsönhatások a biofilm növekedésének helyén (Douglas, 2003, Chandra & Mukherjee, 2015). A biofilmképző képesség szorosan összefügg a patogén virulenciájával, ugyanis a biofilm rétegen keresztül nehezebben hatolnak át egyes antimikrobiális/antifungális szerek, emellett a biofilm rétegben található béta-glükán molekulák képesek megkötni számos gombaellenes szert, ezáltal csökken az élesztő sejtek körül kialakuló drogkoncentráció (Mitchell és mtsai., 2015, Mitchell és mtsai., 2016, Silva és mtsai., 2017). Emellett ismert, hogy a *C. albicans* ortológjaival egyetemben azol típusú gombaellenes szer elleni rezisztencia kialakulásában szerepet játszó gének (*CpCDR1*, *CpCDR2*, *CpMDR1*) nem játszanak szerepet a *C. parapsilosis* biofilmjének kialakulásában, azonban amfotericin B-vel, terbinafinnal, flukonazollal, vorikonazollal, ravukonazollal és posakonazollal szembeni rezisztenciát észleltek számos *C. parapsilosis* biofilm esetében (Mukherjee és mtsai., 2003, Katragkou és mtsai., 2008, Cavalheiro & Teixeira, 2018, Ghaddar és mtsai., 2020). A *C. parapsilosis* biofilmjének képződésében a *C. albicans*-hoz

hasonlóan az Ace2, Bcr1 és Efg1 transzkripció faktorok ortológjai játszanak szerepet, azonban egyes gének terméke, például *CpCZF1*, *CPUME6*, *CpGZF3* és *CpCPH2* csak specifikusan a *C. parapsilosis* biofilm képződésekor jelenik meg (Maguire és mtsai., 2013, Tóth és mtsai., 2019).

III.6.2.3. Hidrolitikus enzimek szekréciója

A *Candida* nemzetség tagjai hidrolitikus enzimeket, például aszpartil-proteázokat (SAP) vagy lipázokat (LIP) és foszfolipázokat szekretálnak, amelyek segítik a gomba adhéziós folyamatait és lehetővé teszik a gazdaszövetek invázióját sejtkárosító hatásukkal (Cavalheiro & Teixeira, 2018). Aszpartil-proteázai képesek bontani az immunrendszer egyes fehérje komponenseit, amely így elősegíti a patogén túlélését a gazda szervezetében. A *C. parapsilosis* kisebb mértékű SAP termelésre képes, mint a *C. albicans*, amelynek hátterében az állhat, hogy míg *C. albicans*-ban a SAP-ok egy tíz tagot számláló géncsaládot alkotnak, addig *C. parapsilosis*-ban mindössze három SAP gén került azonosításra. Horváth és munkatársai megállapították továbbá, hogy a három aszpartil-proteáz kódoló gén (*SAPP1-3* közül a *SAPP1* duplikáción esett át, amelyeket *SAPP1a* és *SAPP1b*-ként különítettek el (Horváth és mtsai., 2012. D. K. Singh és mtsai., 2019). Ezeknek a géneknek az expressziója a vizsgált *C. parapsilosis* izolátumok között nagy változatosságot mutat: a gazda felszíneiről (nyálkahártya vagy bőr) izolált törzsek magasabb Sapp szintet mutattak, mint a környezeti izolátumok (Ruchel és mtsai., 1986, Dagdeviren és mtsai., 2005).

A lipázok közé sorolt enzimek a triacilglicerol hidrolízisét katalizálják. Gácsér és munkatársai munkája alapján ismert, hogy a *C. parapsilosis* genomja kettő szekretált lipáz kódoló gént tartalmaz (*CpLIP1* és *CpLIP2*), amelyek közül csak utóbbi kódol funkcionálisan aktív fehérjét (Gácsér és mtsai., 2007). Ahogyan a SAP-ok, úgy a lipázok és foszfolipázok is fontos szerepet töltenek be a patogén sikeres inváziójában, annak biofilm képzésében, valamint a gombaellenes immunválasz mérséklésében (Gácsér és mtsai., 2007, Trofa és mtsai., 2009, Tosun és mtsai., 2013).

III.6.2.4. Zsírsav metabolizmus

A zsírsavak minden élőlény számára esszenciálisak az életképességhez, alkotóelemei a sejtmembránnak, illetve az intracelluláris sejtszerveknek, a telített és telítetlen zsírsavak meghatározzák a membrán rigiditását, befolyásolnak számos anyagcsere folyamatot, ugyanis

makromolekulák prekursoraiként szolgálnak. A zsírsavak szintéziséhez zsírsav szintetázokra és elongázokra van szüksége a gombáknak, ezt a folyamatot *C. parapsilosis*-ban a *CpFAS2* gén terméke modulálja. A zsírsavak kettős kötéseinek kialakítását *C. albicans*-ban az Ole1 zsírsav-deszaturáz végzi, amelynek ortológja *C. parapsilosis* esetében is hasonló funkciót lát el (Nguyen és mtsai., 2009). A fenti gének hiányában a *C. parapsilosis* sejtek érzékenyebbnek bizonyultak humán szérummal szemben, valamint szignifikánsan csökkent virulenciával jellemezhetők mind *in vitro*, J774.1 egér makrofágok jelenlétében, mind *in vivo*, egér modell esetében (Nguyen és mtsai., 2009). A zsírsavak és lipidek szintézise szerepet játszik a *C. parapsilosis* sejten belüli glükóz- és lipidtoxicitás elleni védelmében is. Ismert ugyanis, hogy a *C. parapsilosis* lipidcseppeket hoz létre, hogy csökkentse ezeknek a molekuláknak a gomba számára toxikus szintű intracelluláris felhalmozódását. Ezt a gomba életképességében esszenciális folyamatot a *CpFAS2*, *CpOLE1* és *CpFIT2* gének terméke végzi, utóbbiról Nguyen és munkatársai megállapították, hogy közvetetten befolyásolja a patogén virulenciáját (Nguyen és Nosanchuk, 2011, Nguyen és mtsai., 2011).

III.6.2.5. Prostaglandin termelés

A proszttaglandinok az eikozanoidok 20 szénatomos zsírsav metabolitok családjába tartoznak. A proszttaglandin E2 (PGE2) az arachidonsav (AA) oxigénnel dúsított metabolitja, és egy kétlépéses folyamat során keletkezik magasabbrendű emlős gazdaszervezetben. A PGE2 a gazdaszervezet immunválaszának egyik fontos szabályozója, amely a célsejttől függően képes gyulladáskeltő és gyulladásgátló választ is kiváltani (Ricciotti és Fitzgerald, 2011). A PGE2 a négy különböző G-protein-kapcsolt receptor (EP1-EP4) egyikén keresztül fejt ki hatását. Patogén gombák körében számos olyan faj ismert, amelyek képesek proszttaglandinokat vagy proszttaglandin-szerű molekulákat termelni, amely makromolekulák csökkentik az immunrendszer gombaellenes mechanizmusait, így fokozzák a gombák patogenezisét (Noverr és mtsai., 2001, Noverr és mtsai., 2002, Kecskem és Nosanchuk, 2015). A *C. parapsilosis* (*C. albicans*-hoz hasonlóan) exogén AA-ból proszttaglandinok (*CpPge2*, *CpPgd2*, *CpPga2*, *CpPgb2*) termelésére képes, amelyek részletes biogenezeise még feltáratlan (Kecskem és Nosanchuk, 2015). A fentebb említett zsírsav szintézisben is szerepet játszó *CpOLE2* gén, valamint a *C. albicans* ortológ *FET3* és a pékélesztőből ismert *POX1-3* és *POT1* gén terméke a *C. parapsilosis* esetében egyedi módon vesz részt proszttaglandin termelésben. Chakraborty és munkatársai munkája során bizonyítást nyert, hogy az immunrendszer *C. parapsilosis*-ra adott válaszát és annak mértékét is befolyásolják: a

CpFET3 és *CpPOT1* gén deléciója fokozott fagocitózist és ölési hatékonyságot eredményezett humán PBMC-DM makrofágok esetében, továbbá hiányukban a gomba sejtek a makrofágokra kifejtett károsító hatása is szignifikánsan csökkent. Emellett *in vivo* egér fertőzési kísérletekben vizsgálva ezen gének esszenciálisnak bizonyultak a vese, illetve lép kolonizációjában (Chakraborty és mtsai., 2018).

III.7. Gomba növekedést limitáló fém ion felvételi mechanizmusok virulenciában betöltött szerepe

A nyomelemek közül a fémionok, például a vas és a cink esszenciális minden élő szervezet számára. Ezek a mikrotápanyagok kulcsfontosságúak a sejtek egészséges homeosztázisának fenntartásához, valamint a fehérjék körülbelül egyharmada fémion kofaktort igényel a működéséhez. Az ilyen fémionok számos metabolikus folyamatban nélkülözhetetlenek, továbbá DNS módosítást katalizáló és transzkripciót szabályozó fehérjék megfelelő működéséhez is szükségesek (Waldron és mtsai., 2009, Colvin és mtsai., 2010). Ezek a nyomelemek patogén gombák esetén is elengedhetetlenek, amelyeket más élőlényekhez hasonlóan, a környezetükből kell megszerezniük. Emiatt egy patogén gomba számára kulcsfontosságú, hogy milyen mértékben képes hasznosítani a gazda esszenciális nyomelemeit, hiányuk a gomba alacsony növekedési képességét és virulenciájának csökkenését eredményezheti (Hood és Skaar, 2012). Ez a gazda számára előnyös körülmény, sőt energiaigényes folyamatok révén szekretált fémkötő fehérjék (például kalprotektin és kalgranulin C) segítségével köti meg a szabad fémionokat, így egy nyomelem limitált környezet alakul ki a gazdaszervezetben. A mikroelemek hozzáférhetőségének ilyen korlátozása ezért hatékony megoldás a kórokozók szaporodásának visszaszorítására. Ismert azonban, hogy a cink ionok magas koncentrációja mérgező is lehet a kórokozókra a gazdaszervezeten belül. Például az egér makrofágok képesek *Mycobacterium tuberculosis* számára toxikus szintre emelni a cink koncentrációját a fagolizoszómában, és így hatékonyan eliminálni a baktériumot (Jacobi és mtsai., 1991). Emellett az egér eredetű csontvelőből differenciáltatott makrofágok (BMDM, Bone Marrow Derived Macrophage) *C. glabrata* fertőzést követően IFN-I-függő módon cink-toxicitást eredményeznek a makrofágok fagolizoszómájában (Riedelberger és mtsai., 2020). Összességében a kórokozók mind cink limitált, mind magas cink koncentrációval szembesülnek a gazdaszervezetben, mivel nem csak az alapvető tápanyagok korlátozott hozzáférését kell leküzdeniük, hanem az

immunrendszer egyes effektor sejtjeinek hatékony válaszreakciója esetén a fémionok potenciálisan toxikus szintjét is. Ezeket a folyamatokat a szakirodalom összefoglaló néven „nutritional immunity” -nek nevezi (Hood és Skaar, 2012).

A gazdaszervezet ezen védelmi vonalának kijátszása a mikroba túlélése szempontjából nélkülözhetetlen, emiatt a patogén gombáknak számos mechanizmussal, transzportrendszerrel kell rendelkezniük, amelyek lehetővé teszik, hogy a gazda által kialakított vas - és cink limitált, valamint a potenciálisan toxikus fémion környezetben mégis fent tudjanak maradni.

III.7.1. Vas ion felvétel

A vas ionok különböző fehérjék például laktoferrin és transferrin által kötött formában vannak jelen magasabbrendű szervezetekben a fémion limitált környezet fenntartása érdekében, emiatt a patogén gombafajok különféle vas ion felvételi mechanizmusokat alkalmaznak. A *Saccharomyces cerevisiae* ún. vas ion redukciós felvételi rendszerben az ScFre1 és ScFre2 fehérjékkel redukálja az extracelluláris környezetében lévő vas ionokat, majd azokat sejtfelszíni alacsony- illetve magas affinitású vas transzporterekkel szállítja a sejtek citoplazmájába (Askwith és mtsai., 1996). A pékélesztő az így redukált vas ionokat az ScFtr1 membrán transzporter segítségével is képes felvenni, továbbá Fe^{3+} iont, amelyet az ScFet3 oxidál (Dancis és mtsai., 1994). A humán patogén mikrobák a vas ionokat a redukciós transzport rendszer mellett úgynevezett szekretált sziderofórokkal (fémion kötő fehérjékkel) is képesek felvenni környezetükből (Patel és mtsai., 2018). Ezek a molekulák kelátorként funkcionálnak, ugyanis a gazda fehérjei által limitált formában lévő vas ionokat nagyobb affinitással képesek megkötni, így a patogén számára lehetővé válik ezen ionok megszerzése (Skaar, 2010). Ezt követően a sziderofór-vas ion komplexet a mikroba erre specializált sejtmembrán transzportereivel juttatja az intracelluláris terébe. Ismertek olyan mikroba transzport rendszerek is, amellyel a más fajok által szekretált (heterológ) vas ion kötő fehérjék felvétele is lehetséges. *Escherichia coli* a saját homológ (például enterobaktin és aerobaktin) vas ion kelátorok mellett egyes gomba eredetű heterológ sziderofórokat (pl. ferrikrómot) is képes hasznosítani a környezetéből (Ratledge és Dover, 2000). Heterológ vas ion kötő fehérjék felvétele számos gombafajnál is ismert (Howard, 1999, Howard, 1999). A *S. cerevisiae* ugyan nem termel sziderofórokat, azonban alternatív megoldásként más organizmusok által szekretált vas kelátorokat alkalmazhat (Lesuisse és mtsai., 2001). A Fit1p–Fit3p sejtfa fehérjék többféle pl.: ferrioxamin B (FoxB) és ferrikróm (FCH) sziderofórok felvételéhez szükségesek, továbbá membrán kapcsolt transzporterek segítik a

bakteriális eredetű kelátorok felvételét. Az ScEnb1p transzporter az enterobaktint (EB), a ScArn2p/ScTaf1p komplex triacetilfuzarinint és a fuzigént szállít a sejtek intracelluláris terébe (Yun és mtsai., 2000, Lesuisse és mtsai., 2001, Lesuisse és mtsai., 2001). A pékélesztő Sit1p transzportere ferrioxamin és ferrikróm felvételét mediálja, továbbá az ScArn1 fehérje hidroxiamit-típusú sziderofórok felvételéhez elengedhetetlen (Lesuisse és mtsai., 1998, Yun és mtsai., 2000, Yun és mtsai., 2000).

Annak érdekében, hogy vas ionokhoz jusson a gazdaszervezetből, a *C. albicans* nagy affinitású reduktív rendszert, sziderofór-felvevő rendszert vagy hemoglobin-vas felvevő rendszert használ (Lesuisse és mtsai., 2002, Mukherjee és mtsai., 2014, Ramírez-Zavala és mtsai., 2022). A reduktív vas ion felvétel során a *C. albicans* képes hasznosítani a ferritin, illetve transferrin által kötött fém ionokat, azonban számos humán patogén fajjal ellentétben a laktoferrint nem (Knight és mtsai., 2005, Almeida és mtsai., 2008). A *C. albicans* Fre1 homológ Cfl1, valamint Fre10 homológ Cfl95 és CaHap5 plazmamembránban lokalizált vasreduktázai a vasat oldható vas állapotba redukálják (Xu et al., 2014b; Yu et al., 2014). A vas redukciója során spontán toxikus szabadgyökök keletkezhetnek, amelyek kivédése érdekében multiréz-oxidáz enzim is részt vesz a Fe^{2+} ionok ferrooxidációjában (Kosman, 2003, Almeida és mtsai., 2009). A vas multiréz-oxidázok általi ferrooxidációjához rézre van szükség, amelyet a CaCcc2 intracelluláris réztranszporter szállít, így lehetővé téve a CaFtr1 vas-permeáz - multiréz-oxidáz komplex kialakulását és a vas ionok intracelluláris térbe történő szállítását. (Weissman és mtsai., 2002, Ziegler és mtsai., 2011, Mamouei és mtsai., 2017). A *C. albicans* nem termel szekretált sziderofórokat. Heymann és mtsai. munkája során bizonyítást nyert, hogy a hidroxamát-típusú sziderofórok felvételéhez elengedhetetlen a CaSit1 és CaArn1 proteinek jelenléte, azonban egyéb heterológ sziderofórok felvétele, például ferrikróm és ferrioxamin (a pékélesztővel ellentétben) nem igényeli e két fehérjét (Heymann és mtsai., 2008). Eriteliális fertőzés esetén fontos szerepet tölt be a CaSit1/CaArn1 mediált vas ion felvétel, ezzel ellentétben a véráramon keresztül történő kórfolyamat kiváltása független azoktól (Ardon és mtsai., 2001, Heymann és mtsai., 2002, Lan és mtsai., 2004). A gazdaszervezetben potenciálisan elérhető vas 70%-a hemin és hemoglobin által kötött formában van jelen, amelyeket a *C. albicans* hemolitikus aktivitása révén hasznosíthat (Manns és mtsai., 1994). A hem fehérjékből származó vas felvétele nem a gomba nagy affinitású vas felvételi rendszertől függ, hanem több membránban található fehérje (CaRbt5, CaPga10, CaCsa2) közös működésétől (Weissman és Kornitzer, 2004, Weissman és mtsai., 2008, Nasser és mtsai., 2016, Kuznets és mtsai., 2014). A CaRbt5, egy GPI-horgonyzott hem-

receptor, a CaPga7-tel, és a CaCsa2-vel szekretált hemofórral együtt működik, hogy a hemet a sejt falon keresztül a plazmamembránhoz szállítsa (Kuznets és mtsai., 2014).

C. parapsilosis-ban két vas ion felvételi rendszer ismert. A *C. albicans* Hap5 vas reduktáz ortológja Tóth és munkatársai munkája szerint funkcionálisan is hasonlóságot mutat (Tóth és mtsai., 2018). Emellett Chakraborty és munkatársai bebizonyították, hogy a *FET3* vas ion és multiréz-oxidázt kódoló gén ortológ párja megtalálható *C. parapsilosis*-ban, és számos egyéb virulencia faktort befolyásol (Chakraborty és munkatársai., 2018). *CpFET3* homozigóta deléziós mutáns vas ion hiányos körülmények között növekedési defektust mutat, továbbá a *CpFet3* esszenciális a gomba pseudohifa és biofilm képzésében, valamint prosztaglandin termelésében (Southall és mtsai., 1990).

III.7.2. Cink ion felvétel és raktározás

A cink a vas után a második leggyakrabban előforduló fém nyomelem az emberben. A cink fontos szerepet játszik mind a veleszületett, mind az adaptív immunrendszer működésében, és számos enzim működéséhez elengedhetetlen, beleértve a szuperoxid-diszmutázokat, alkohol-dehidrogenázokat és transzkripció faktorokat, valamint az eukarióta fehérjék (fajtól függően) 5-10%-a rendelkezik cink ion kötő doménnel (Zhang és Zheng, 2020). A cink ion koncentrációja a sejten belül szigorúan meghatározott értékek (0,1-0,5 mM) között mozog (Eide, 2006, Zhang és Zheng, 2020). A gazdaszervezet sejtjei az ideális cink ion homeosztázis fenntartásáért ZnT-ket (Zinc-Transporter) működtetnek. Ezek egyrészt magas intracelluláris cink ion koncentráció esetén az intracelluláris térből a sejten kívülre vagy vezikulákba szállítják a cink ionokat, másrészt alacsony intracelluláris cink ion koncentráció alkalmával képesek cink ionok felvételére az extracelluláris térből. Ez utóbbi a ZIP (Zrt2, Irt-like Protein) feladata (Kambe és mtsai., 2021).

S. cerevisiae-ben a Cation Diffusion Facilitator (CDF) családba tartozó fehérjék (ScZrg17, ScMsc2), valamint a Zrt1- és Irt1-like protein (ZIP) családba tartozó membrán cink transzporterek (ScZrt1, ScZrt2), a vakuoláris cink importer (ScZrc1) és exporter (ScZrt3) valamint az endoplazmatikus retikulum kapcsolt ScYke4 tartja fent a gomba számára optimális citoplazmatikus cink ion szintet (Bird és Wilson, 2020). A cink ionok koncentrációjára reagáló, ScZap1 transzkripció faktorától függő módon az ScZrt2, ScZrt3, ScZrg17 és ScZrc1 cink transzportereket kódoló gének mind magasabb szinten expresszálnak alacsony cink ion tartalmú körülmények között (Lupetti és mtsai., 2002). A pékélesztő cink ion felvételében az alacsony affinitású ScZrt1 és ScZrt2 membrán

transzporter vesz részt, azonban amikor a citoszol cink ion koncentrációja visszaáll az optimális szintre, a ScZap1 aktivitása gátolt, amely így negatív visszacsatoláson alapuló szabályozás alapján megakadályozza a cink toxikus szintjének felhalmozódását a citoszolban (Zhao és Eide, 1996, Bird és Wilson, 2020). Magas intracelluláris cink ion mennyiség esetén a magas affinitású ScZrc1/ScCot1 vakuoláris transzporterek szállítják az organellekbe a feleslegessé vált, vagy már a gomba számára toxikus mennyiségű cink ionokat (Miyabe és mtsai., 2001). Azonban, ha a citoplazmában a cink ion koncentráció nem éri el a fiziológiás mennyiséget, a szintén vakuoláris ScZrt3 transzporter továbbítja a cink ionokat a vakuólumból a gomba citoplazmája felé (Gaither és Eide, 2001).

A *C. albicans* esetében az elsődleges felvételi mód a cink ion kelátor és transzport rendszeren keresztül megy végbe, ahol a korlátozott mennyiségű cink iont egy cinkkötő fehérje másnéven „cinkofór” köti meg (Citiulo és mtsai., 2012). A folyamatot a szekretált CaPra1 (pH regulated antigen 1 - pH-szabályozott antigén 1) fehérje közvetíti, amely nagy affinitással képes megkötni a cink ionokat a gazdaszervezetben, és eljuttatni a gomba CaZrt101 magas affinitású plazmamembrán cink ion transzporterhez. Citiulo és munkatársai kimutatták, hogy a *C. albicans* képes felhasználni az endotélsejtek citoplazmájából származó cinket a hifa-asszociált CaPra-CaZrt101 közös működésével (Citiulo és mtsai., 2012). Míg semleges és lúgos kémhatású környezetben a Pra1-Zrt101 szinergikus cink-felvevő rendszer biztosítja a cink ionok felvételét, addig ez a feladat savas környezetben a Zrt2 plazmamembrán transzporterre hárul (Citiulo és mtsai., 2012). Crawford és munkatársai munkája alapján elmondható, hogy a *CaZRT1* expressziója pH érték függő, és CaZrt2 hiányában semleges és lúgos pH tartományú környezetben biztosítja a *C. albicans* sejtek növekedését. Pékélesztővel ellentétben, a *C. albicans* Zrc1 transzportere nem a vakuoláris cink importért és raktározásért felelős, hanem a Golgi apparátusban lokalizálódik, és magas intracelluláris cink ion mennyiség esetén esszenciális, ugyanis apró cink ion raktárak, ún. cinkoszómák létrehozásában működik közre (Crawford és mtsai., 2018). Ezen cink ion transzporterek a gomba virulenciájában is fontos szerepet töltenek be: a *CaZRT2* delécioja csökkenti a vesék gomba általi kolonizációját egerekben, továbbá *in vivo* körülmények között a CaZrc1 által közvetített gyors cink ion kompartmentalizációs folyamat révén képes tárolni az intracellulárisan felhalmozott cink ionokat a cinkoszómákban. Említésre méltó, hogy a *C. albicans*-ban leírt Pra1 cink kötő fehérje génjének ortológja nem található meg *C. parapsilosis*-ban, emiatt feltételezhetjük, hogy e faj más mechanizmus révén tesz szert cink ionokra a gazda szervezettel történő kölcsönhatás során.

III.8. A veleszületett immunrendszer és effektor sejtjei gombafertőzések során

A komplementrendszer a veleszületett immunrendszer egyik legősibb humorális alkotóeleme. Alkotóelemei egymást láncreakció szerűen aktiváló faktorok összessége, amelyek a szervezetben inaktív állapotban vannak jelen. A több mint 30 komponensből álló kaszkád elemei közé sorolhatóak szolubilis proteinek (aktiválódás sorrendjében: C1r, C1s, C4, C2, C3, C5, C6, C7, C8 és C9), glikoproteinek, sejtmembrán receptorok és szabályozó fehérjék. Ezen rendszer patogének jelenlétében aktiválódhat, amely kiemelt jelentőséggel bír a gyulladásos folyamatok elindításában, ugyanis elemei fokozzák az erek átteresztőképességét, és ezáltal további faktorok és immunsejtek áramlását a fertőzés helyszínére. A komplement kaszkád aktivációja során egyes molekulák (C3b, iC3b és C4b) beborítják, ún. opsonizálják a patogént, amely a fagociták általi bekebelezésüket segítik elő.

A veleszületett immunrendszer elsődleges feladata különbséget tenni az idegen, illetve saját sejtek, molekulák között és veszély jel érzékelése esetén aktiválódni, ezt a szakirodalom „Danger model” -ként definiálja (Matzinger, 2002). Az immunrendszer ezen sejtjei alapvetően jelen vannak a kórokozó mentes, egészséges szervezetben. Az idegen organizmusok felismerése a veleszületett immunrendszer sejtjes komponensei esetében csírávonalban kódolt receptorok az ún. PRR-ek (Pattern Recognition Receptors - Mintázat felismerő receptorok) segítségével történik. A receptorok a patogénekre jellemző evolúciósan konzervált mintázatokat ismerik fel, amelyeket a szakirodalom PAMP-nak (Pathogen Associated Molecular Pattern – Patogén-asszociált molekuláris mintázat) nevez. Charles Janeway 1989-es publikációja szerint a gomba patogének esetében a sejtfal egyes alkotóelemei (mannoproteinek, β -glükánok) ligandként szolgálnak a PRR-ek számára, azonban ligandként kapcsolódhat metilálatlan DNS, RNS vagy fehérje komponens is a megfelelő receptorhoz (Janeway, 1989.). Az így létrejött PRR-PAMP kapcsolódás eredményeként a veleszületett immunrendszer képes felismerni a patogént, és így elindítani a megfelelő immunválaszt. A patogének mintázatfelismerő receptoron keresztül történő felismerését követően effektor mechanizmusok összetett láncolata aktiválódik, amely a veleszületett immunrendszer sejtjes elemeinek az aktiválódásához, és a patogén eliminálásához vezethet. Az immunrendszer effektor sejtjei közé tartoznak a neutrofil granulociták, dendritikus sejtek, természetes ölüsejtek és makrofágok különböző populációi (Netea és mtsai., 2015).

III.8.1. Neutrofilek

Az emberi vérben legnagyobb számban a neutrofil granulociták találhatók, amelyek fertőzés és gyulladásos folyamat során domináns mértékben jelennek meg az adott szöveti régióban. A neutrofilek rendszerint alacsony mértékben expresszálnak Toll-like receptorokat (TLR), azonban nagy számban találhatók sejtmembránjuk felszínén fagolitikus receptorok pl. CR3 (Complement Receptor 3) és Fc γ receptorok (Netea és mtsai., 2008). A kórokozókat PAMP alapján ismerik fel mintázatfelismerő receptoraikkal, továbbá súlyos szöveti károsodás esetén ún. károsodással összefüggő molekuláris mintákat (DAMP- Damage-Associated Molecular Patterns) ismernek fel az ezekre specifikus receptorokkal. A DAMP receptorok képesek aktiválni gyulladásos mediátorok (CXCL1, CXCL2 kemokin) termelését, amelyek G-protein kapcsolt receptorokhoz (GPCR- G-Protein–Coupled Receptor) kötődnek, és indukálnak további folyamatokat (Kolaczowska és Kubes, 2013). Ezen túlmenően a DAMP-ok és PAMP-ok közvetlenül aktiválhatják a neutrofilek receptorait, hogy fokozzák immunsejtek toborzását (Pittman és Kubes, 2013). A neutrofilek effektor mechanizmusok széles skálájával képesek eliminálni a felismert kórokozókat, valamint drasztikusan képesek gátolni gombapatógének szaporodását. Fradin és munkatársainak kísérleteiből ismert, hogy *C. albicans* sejteiben jelentős génexpressziós változásokat indukálnak a neutrofilek, amely a gomba sejtek hifaképződését gátolja (Fradin és mtsai., 2005). A granulociták ezen csoportjának fő gombaelimináló mechanizmusa a patogén fagocitózisa, amely a fagoszómák és lizoszómák fúzióját követően különböző antimikrobiális peptidek, hidrolitikus enzimek, valamint reaktív oxigéngyökök (ROS) segítségével valósul meg (Cheng és mtsai., 2012). Az intracelluláris ölési mechanizmusok mellett a neutrofilek képesek ún. extracelluláris csapdák (NET, Neutrophil Extracellular Trap) segítségével limitálni a *Candida* sejtek növekedését vagy elpusztítani azokat. A NET-ek hálószerű struktúrák, amelyek képesek baktériumokat, gombákat, protozoonokat és vírusokat behálózni és immobilizálni. Az aktivált neutrofilek szekretálják őket, és DNS-szálakból állnak, amelyben az immobilizált patogének magas koncentrációjú antimikrobiális fehérjéknek vannak kitéve (Urban és mtsai., 2006).

III.8.2. Természetes ölüsejtek

A természetes ölüsejtek (NK, Natural Killer) kiemelt szerepet töltenek be a veleszületett immunrendszer gyors és hatékony patogén ellenes válaszában. Az NK sejtek által termelt perforin hatására képesek közvetlenül eliminálni a kórokozót, emellett gyulladásos

citokineket és kemokineket termelnek, amelyek tovább serkentik az immunrendszer antifungális folyamatait (Netea és mtsai., 2015). Granulocita-makrofág kolónia stimuláló faktor (GM-CSF, Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor) szekretálása elősegíti a fertőzés helyére érkező neutrofilek, monocita és makrofág populáció további gombaellenes folyamatait (Netea és mtsai., 2015). Az NK-sejtek hiányára irányuló kísérletek változó eredményeket mutattak a *Candida*-val fertőzött *in vivo* egérmodellek esetében, ugyanis vagy alacsonyabb mértékű kolonizációs képességet, vagy ellenkezőleg, magasabb kandidiázisra való hajlamot tapasztaltak (Romani és mtsai., 1993, Whitney és mtsai., 2014). A súlyos, kombinált immunhiányos (NK-sejt és limfocita-hiányos) egér modellben vizsgálva megnőtt a *C. albicans* szisztémás kolonizáltságának mértéke, amely jelenség az immunkompetens egércsoportban nem volt jellemző (Quintin és mtsai., 2014).

III.8.3. Dendritikus sejtek

Számos veleszületett és adaptív gombaellenes immunválasz elindítását és szabályozását a dendritikus sejtek (DC, Dendritic Cell) végzik. A csontvelőből differenciálódó DC-k a vérben, nyirokszervekben és nyálkahártyával borított felszíneken nagy számban vannak jelen. Különböző típusú DC-k ismertek, amelyek többféle PRR-rel rendelkeznek, így növelve az immunrendszer rugalmasságát, hogy az megfelelően reagálhasson a különféle kórokozókra és veszélyjelekre. A felismerést követően hatékonyan fagocitálják a kórokozókat, majd antigénprezentáló sejtekként jelentős szerepük van az adaptív immunválasz kialakításában (Y. Wang, 2015). Számtalan citokin termelésére képesek, amelyeknek jelenléte esszenciális mind hatékony antifungális gyulladásos válasz, mind specifikus adaptív T-sejtes immunválasz kialakulása esetén (Romani, 2004). Annak ellenére azonban, hogy képesek fagocitálni *Candida* sejteket, kisebb hatékonysággal eliminálják azokat, mint egyes makrofág populációk (Netea és mtsai., 2008).

III.8.4. Monociták és makrofágok

A makrofágokról ismert, hogy széles körben elterjedtek a limfoid és nem limfoid szövetekben az egész testben. Ez a sejtípus a vérben keringő monocita populációból származik, amelyek folyamatosan vándorolnak a különböző szöveti régiókba, ahol a környezet által determinált típusú makrofágokká differenciálódnak (Epelman és mtsai., 2014).

A monocita sejtekből differenciálódott makrofágok kiemelt szerepet játszanak a veleszületett immunválasz kiváltásában, effektor sejtekként részt vesznek a veszélyt jelentő mikroorganizmusok felismerésében és eliminálásában, továbbá kulcsfontosságúak egyes szöveti régiók fejlődésében és működésében mind egészséges, mind patológiás körülmények között (Wynn és mtsai., 2011, Viola és mtsai., 2019). A szakirodalom a makrofágokat anatómiai elhelyezkedésük alapján alpopulációk szerint megkülönbözteti: speciális ún. szöveti rezidens makrofágokat (TRM- Tissue Resident Macrophage), amelyek a Kupffer-sejtekben (máj), a tüdőben (alveoláris makrofágok), intersticiális kötőszövetben (hisztiociták), illetve a csontokban (oszteoklasztok) találhatóak. A bélrendszerben is több különböző típusú makrofág található, amelyek eltérő fenotípussal és funkcióval rendelkeznek, és együttműködnek az egészséges bélflóra fenntartásának érdekében (Wynn és mtsai., 2013). A másodlagos limfoid szervekben is különálló makrofág-populációk vannak jelen, amelyek egyedi funkciókat látnak el, beleértve a nyirokcsomóban található makrofágokat, valamint a lép makrofág populációját. Emellett különböző makrofág-alpopulációk fokozott mennyiségben vannak jelen bizonyos immun-privilegizált régiókban (agyban, szemben és a herékben), ahol központi szerepet töltenek be a szövetek átalakulásában és a szerv homeosztázisban (Wu és Hirschi, 2021).

A makrofágok figyelemre méltóan plasztikus sejtek, amelyek funkciójuk szerint egyik fenotípusról a másikra válhatnak polarizációjuk során (Sridharan és mtsai., 2019). A makrofág polarizáció egy olyan folyamat, amelynek során a makrofágok adott populációja egy specifikus fenotípust és funkcionális választ ad az egyes szövetekben előforduló mikrokörnyezeti ingerekre és jelekre (Sica és Mantovani, 2012). A lokális citokin-környezet determinálja a polarizációt, ennek megfelelően a makrofágok számos osztályát leírták emberben és egerekben, specifikus faktorok termelődése, sejtfelszíni markereik expressziója és biológiai funkcióik alapján. Két alapvetően különböző funkciójú makrofág szubpopulációt különböztet meg a szakirodalom: a klasszikusan aktivált vagy gyulladásos M1 típusú, valamint az alternatív módon aktivált vagy antiinflammatorikus M2 típusú makrofágokat.

III.8.4.1. *M1 típusú makrofágok*

Az M1 makrofágokat jellemzően TNF- α , bakteriális lipopoliszacharid (LPS) felismerés vagy IFN- γ jelenléte indukálja. Az IFN- γ , amelyet korábban makrofág-aktiváló faktornak neveztek, aktiválja a nyugvó makrofágokat, hogy elpusztítsák a fagocitált mikrobákat például nitrogén-monoxid (NO), reaktív oxigénfajták (ROS) és lizoszómális enzimek szintézisével. Ezt a folyamatot klasszikus makrofág aktivációnak nevezik, mivel először azonosították,

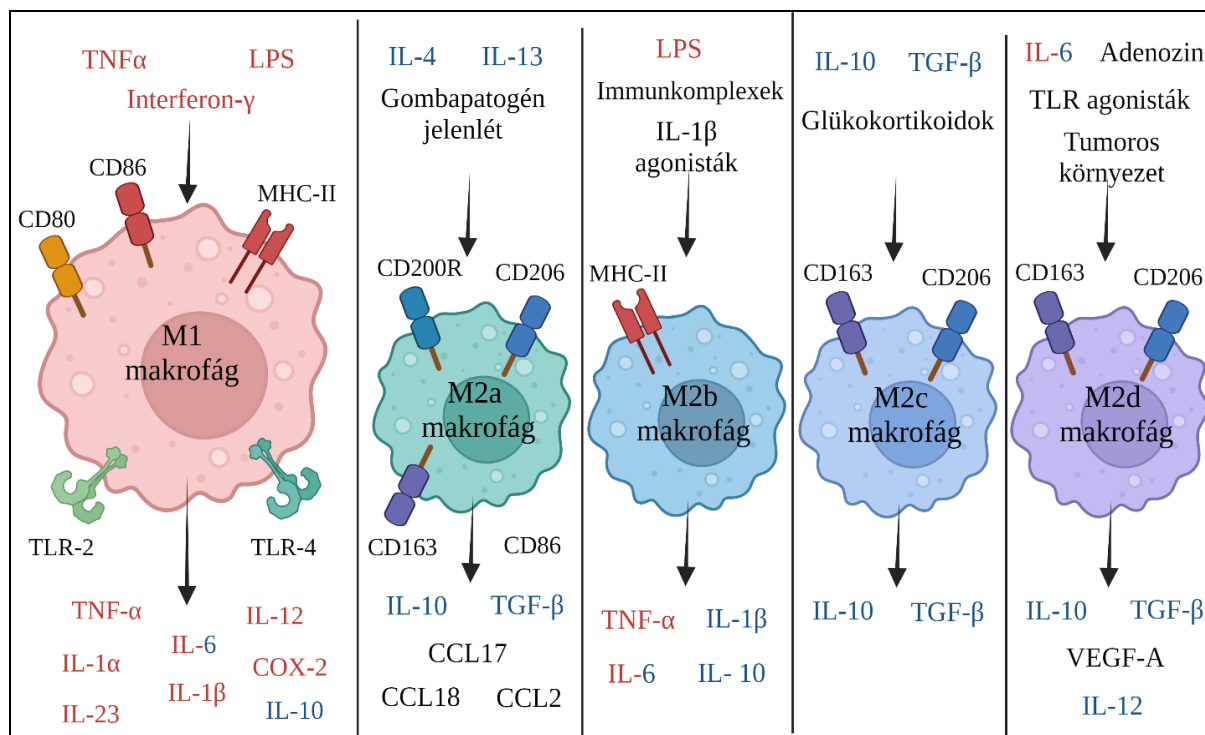
egyben a Th1 sejtek aktiválásának klasszikus útját is jelenti (Ivashkiv, 2018). Az M1 típusú makrofágok sejtfelszínén magas CD80 és CD86, MHC-II, illetve TLR-4 és TLR-2 jelenléte a jellemző. Polarizációjukat követően az M1 makrofágok nagy mennyiségű pro-inflammatorikus citokineket termelnek és választanak ki, mint például a TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-23 és ciklooxygenáz-2 (COX-2), valamint kis mértékben antiinflammatorikus IL-10-et (N. Wang és mtsai., 2014). Az M1 típusú makrofágok részt vesznek patogének eltávolításában a fertőzés során nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát (NADPH) oxidáz rendszer aktiválásával, továbbá reaktív oxigéngyökök (ROS), nitrogén-monoxid (NO) létrehozásával a kórokozók fagocitózist követően a fagolizozómában (Nathan és Cunningham-Bussel, 2013). Emellett számos tanulmány a közelmúltban rávilágított a makrofágok cink ion homeosztázisának jelentőségére egyes patogén organizmusok eliminálása vagy növekedésük limitálása esetében. A makrofágok két cink ion mennyiségen alapuló védelmi stratégiát fejlesztettek ki számos mikroba ellen (Subramanian Vignesh & Deepe, 2016). *Histoplasma capsulatum* fagocitózist követően a makrofágok cink ionokat szállítanak a fagolizozómából a citoplazmába, hogy csökkentsék a cink ionok mennyiségét, így limitálják a gombasejtek cinkhez való hozzáférését (Assunção és mtsai., 2020). Ezzel szemben a *M. tuberculosis*, az *E. coli* és a *Salmonella enterica*, valamint *C. glabrata* fertőzések esetén ismert, hogy egér és M1 polarizált humán makrofágok képesek megnövelni a fagolizozómában található cink ionok mennyiségét a patogének számára toxikus szintre, amely a mikrobák elpusztítását eredményezi (Botella és mtsai., 2011, Stocks és mtsai., 2021, Neyrolles, 2021, Riedelberger és mtsai., 2020). Az M1 makrofágok erőteljes antimikrobiális és tumorelles aktivitással rendelkeznek, amelyeknek így jelentős szövetkárosító hatásuk van, valamint csökkentik a szövetek regenerálódását és a sebgyógyulást. Az ilyen szövetkárosodások elleni védelem érdekében a krónikus gyulladásos választ a különböző típusú M2 makrofágok populációinak gyulladásgátló funkciója által vezérelt szabályozó mechanizmusok gátolják (Pal és mtsai., 2016, Chistiakov és mtsai., 2018, Shapouri-Moghaddam és mtsai., 2018).

III.8.4.2. M2 típusú makrofágok

Az M2 makrofágok csoportja funkcionálisan diverz populációt alkot (Chistiakov és mtsai., 2015). Az adott szöveti régióban érzékelt aktiváló ingertől függően az M2 makrofágokat a szakirodalom további négy különböző típusra osztja: M2a, M2b, M2c és M2d alpopulációkra (Chistiakov és mtsai., 2015, Sica & Mantovani, 2012). A makrofágok M2a alcsoportjának

polarizációját IL-4, IL-13 és egyes gombapatogének jelenléte indukálhatja, amely további IL-10, TGF- β , valamint különböző kemokinek (CCL17, CCL18 és CCL2) fokozott termeléséhez vezet. Sejtfelszínükön CD200R, CD163, CD206 markerek a jellemzőek, és emellett alacsony mennyiségű CD14 és TLR4 receptorok találhatók (N. Wang és mtsai., 2014; J. Wu és mtsai., 2021, Krust és mtsai., 2011). Az M2a típusú makrofágok funkciójukat tekintve képesek egyes kórokozók endocitózisára és eliminálására, emellett elősegítik a sejtnövekedést és a szöveti regenerációt (Colin és mtsai., 2014). Az M2b típusú makrofágokat egyes immunkomplexek, TLR-ek jelenléte, valamint IL-1 β agonistái indukálják. Képesek mind pro-(TNF- α) mind antiinflammatorikus (IL-1 β , IL-6 és IL-10) citokinek termelésére, így az M2b makrofágok populációja felelős immunszabályozó funkciókért és gyulladásos folyamatok indukálásáért (L. xun Wang és mtsai., 2019). Az M2c alcsoportot glükokortikoidok és IL-10 jelenléte indukálja, és erősen gyulladásgátló hatást fejt ki az apoptotikus sejtekkel szemben azáltal, hogy nagy mennyiségű IL-10-et és TGF- β -t szekretál (Zizzo és mtsai., 2012). Az M2 makrofág negyedik típusát, az M2d-t TLR agonisták indukálják adenzin receptorokon keresztül. Az adenzin receptor aktiválását a pro-inflammatorikus citokinek termelésének gátlása, valamint a gyulladásgátló citokinek (IL-10 magas, IL-12 alacsony) és a vaszkuláris endoteliális növekedési faktor (VEGF) szekréciójának növekedése követi, amelyek serkentik az angiogenezist és a tumor progresszióját (Huang és mtsai., 2018). Proangiogén és tumorindukáló hatásuk miatt a szakirodalom az M2d makrofágok populációját TAM-nak (Tumor Associated Macrophage) nevezi (Huang és mtsai., 2018). Az M1 és M2 makrofágok, sejtfelszíni markereit, valamint a citokinek, kemokinek és más szekretált faktorok szekréciójának különböző fenotípusait és alosztályait a 2. ábra foglalja össze.

A makrofágok kiemelt szerepet játszanak a *Candida* sejtek PAMP-jainak felismerésében nagy mennyiségű sejtfelszíni TLR és lektin receptoraikkal (LR), valamint a gombapatogén eliminálásában. Jelentőségük már 1994-ben igazolást nyert: makrofág deficiens egerekben jelentősen megnövekedett *C. albicans* osztódási képességet és fokozott szöveti kolonizációt detektáltak, amely az állatcsoport magas mortalitási rátájával társult (Qian és mtsai., 1994). Azonban a *C. albicans* sejtek a gazdaszervezetben történő túlélésük érdekében képesek a gyulladásos, M1 típusú makrofágok fenotípusos változását eredményezni. A klasszikusan gombaellenes M1 makrofágok *C. albicans* jelenlétében antiinflammatorikus M2 típusú makrofágokká differenciálódnak, amely folyamat egyrészt elősegíti a patogén túlélését, továbbá szerepe lehet a gombaelimináló tulajdonságának csökkentésében (Reales-Calderón és mtsai., 2014).



2. ábra. Makrofágok alpopulációi, sejtfelszíni markereik, stimuláló, illetve szekretált citokinjeik szerint. A kép Biorender (<https://www.biorender.com/>) online szoftverrel készült.

IV. Célkitűzések

A patogén mikroorganizmusok cink ion homeosztázisának esszenciális szerepe mind a mikrobák túlélése, mind a kórfolyamatok kialakítása esetén több tanulmányból ismert, azonban a humán patogén *C. parapsilosis* cink ion homeosztázisában szerepet játszó molekulákról, transzporterekről és azok funkciójáról gazda-patogén kölcsönhatás során ismeretanyag nem érhető el. Ebből kifolyólag munkánk során az alábbi célokat fogalmaztuk meg:

1. A *C. parapsilosis* cink ion transzporter kódoló gének *in silico* analízise *S. cerevisiae*, illetve *C. albicans* ismert cink transzporterei alapján.
2. A *C. parapsilosis* prediktált cink ion transzporter génjeinek deletálása, valamint a mutánsok és génreintegrált törzsek fenotípusos és a gének funkcionális jellemzése.
3. A deléciós mutánsok *in vitro* vizsgálata egér és humán M1 típusú makrofágok jelenlétében, valamint *in vivo* kísérletek viaszmosy lárva és egér modellekben.
4. Egér és M1 típusú humán eredetű makrofágok cink ion háztartásának vizsgálata *C. parapsilosis*-szal történő interakció során.

V. Anyagok és módszerek

V.1. A kísérletek során alkalmazott törzsek

V.1.1. Alkalmazott baktérium törzsek

A klónozási kísérletek során az *E. coli* 2T1 törzset alkalmaztuk.

V.1.2. Alkalmazott *Candida* törzsek

A kísérletek során felhasznált *Candida* törzsek nevét, genotípusát és a hozzá tartozó referenciát az 1. táblázat foglalja össze.

1. táblázat. Felhasznált *Candida* törzsek

Törzs neve	Eltávolított gén	Genotípus	Leírás	Referencia
<i>C. parapsilosis</i> CLIB214		Vad típus	Vad típus	Laffey és Butler, 2005.
<i>C. parapsilosis</i> HIS1-/LEU2- (CPL2H1)	HIS1/LEU2	<i>leu2::FRT/leu2::FRT</i> , <i>his1::FRT/his1::FRT</i>	CLIB214 hisztidin, leucin auxotróf deléció mutáns	Holland és mtsai., 2014.
<i>C. parapsilosis</i> HIS1-/LEU2- RI		<i>leu2::FRT/leu2::FRT</i> , <i>his1::FRT/his1::FRT</i> , <i>frt::CmLEU2/frt::CdHIS1</i>	CPL2H1 <i>CdHIS1</i> és <i>CmLEU2</i> génreintegrált prototróf mutáns	Holland és mtsai., 2014.
<i>C.p.</i> Δ/Δ CPAR2_210740	CPAR2_210740	<i>leu2::FRT/leu2::FRT</i> , <i>his1::FRT/his1::FRT</i> , <i>CPAR2_210740::HIS1/CPAR2_210740::LEU2</i>	Homozigóta deléció mutáns törzs	Munkánk során előállított
<i>C.p.</i> Δ/Δ CPAR2_212080	CPAR2_212080	<i>leu2::FRT/leu2::FRT</i> , <i>his1::FRT/his1::FRT</i> , <i>CPAR2_212080::HIS1/CPAR2_212080::LEU2</i>	Homozigóta deléció mutáns törzs	Munkánk során előállított
<i>C.p.</i> Δ/Δ CPAR2_212100	CPAR2_212100	<i>leu2::FRT/leu2::FRT</i> , <i>his1::FRT/his1::FRT</i> , <i>CPAR2_212100::HIS1/CPAR2_212100::LEU2</i>	Homozigóta deléció mutáns törzs	Munkánk során előállított
<i>C.p.</i> Δ/Δ CPAR2_500170	CPAR2_500170	<i>leu2::FRT/leu2::FRT</i> , <i>his1::FRT/his1::FRT</i> , <i>CPAR2_500170::HIS1/CPAR2_500170::LEU2</i>	Homozigóta deléció mutáns törzs	Munkánk során előállított
<i>C.p.</i> Δ/Δ CPAR2_806710	CPAR2_806710	<i>leu2::FRT/leu2::FRT</i> , <i>his1::FRT/his1::FRT</i> , <i>CPAR2_806710::HIS1/CPAR2_806710::LEU2</i>	Homozigóta deléció mutáns törzs	Munkánk során előállított
<i>C.p.</i> Δ/Δ CPAR2_806720	CPAR2_806720	<i>leu2::FRT/leu2::FRT</i> , <i>his1::FRT/his1::FRT</i> , <i>CPAR2_806720::HIS1/CPAR2_806720::LEU2</i>	Homozigóta deléció mutáns törzs	Munkánk során előállított
<i>C.p.</i> Δ/Δ CPAR2_806710-806720	CPAR2_806710-806720	<i>leu2::FRT/leu2::FRT</i> , <i>his1::FRT/his1::FRT</i> , <i>CPAR2_806710-806720::HIS1/CPAR2_806710-806720::LEU2</i>	Homozigóta deléció mutáns törzs	Munkánk során előállított
<i>C. parapsilosis</i> HIS1-/LEU2- RI-GFP	HIS1/LEU2	<i>leu2::FRT/leu2::FRT</i> , <i>his1::FRT/his1::FRT</i> , <i>frt::CmLEU2/frt::CdHIS1</i> , <i>CpNEUT5L/cpneut5l::PTDH3-GFP::SAT1</i>	GFP jelölt CPL2H1 <i>CdHIS1</i> és <i>CmLEU2</i> génreintegrált prototróf	Munkánk során előállított

			törzs	
<i>C.p.</i> Δ/Δ CPAR2_210740-GFP	CPAR2_210740	<i>leu2::FRT/leu2::FRT, his1::FRT/his1::FRT, CPAR2_210740::HIS1/CPAR2_210740::LEU2, CpNEUT5L/cpneut5l::PTDH3-GFP::SAT1</i>	GFP jelölt homozigóta deléciós mutáns törzs	Munkánk során előállított
<i>C.p.</i> Δ/Δ CPAR2_212100-GFP	CPAR2_212100	<i>leu2::FRT/leu2::FRT, his1::FRT/his1::FRT, CPAR2_212100::HIS1/CPAR2_212100::LEU2, CpNEUT5L/cpneut5l::PTDH3-GFP::SAT1</i>	GFP jelölt homozigóta deléciós mutáns törzs	Munkánk során előállított
<i>C. parapsilosis</i> CLIB214_CPAR2_212100-GFPtag		CPAR2_212100-GFP	CpZRC1-GFP jelölt vad típus	Munkánk során előállított
<i>C.p.</i> Δ/Δ CPAR2_210740_RI	CPAR2_210740	<i>leu2::FRT/leu2::FRT, his1::FRT/his1::FRT, CPAR2_210740::HIS1/CPAR2_210740::LEU2, CpNEUT5L/cpneut5l::CPAR2_210740</i>	Homozigóta deléciós mutáns egy kópiás génreintegrált törzse	Munkánk során előállított
<i>C.p.</i> Δ/Δ CPAR2_212100_RI	CPAR2_212100	<i>leu2::FRT/leu2::FRT, his1::FRT/his1::FRT, CPAR2_212100::HIS1/CPAR2_212100::LEU2, CpNEUT5L/cpneut5l::CPAR2_212100</i>	Homozigóta deléciós mutáns egy kópiás génreintegrált törzse	Munkánk során előállított
<i>C.p.</i> Δ/Δ CPAR2_212100_OE_RI	CPAR2_212100	<i>leu2::FRT/leu2::FRT, his1::FRT/his1::FRT, CPAR2_212100::HIS1/CPAR2_212100::LEU2, CpNEUT5L/cpneut5l::PTDH3-CPAR2_212100</i>	Homozigóta deléciós mutáns egy géntúltermeltetett génreintegrált törzse	Munkánk során előállított

V.1.3. Alkalmazott egér törzsek

Kísérleteink során 8-12 hetes immunkompetens vad típusú BALB/c egereket használtunk, amelyek az HUN-REN SZBK állatházából származtak. A kísérleteink során az állatokat állandó, kontrollált körülmények között (12 óra fény/12 óra sötét ciklus, 21 °C tartási hőmérséklet, igény szerint hozzáférhető ivóvíz és normál rágcsálótáp) tartottuk. Az *in vivo* kísérletek engedély száma: XVI./3646/2016.

V.2. Táptalajok, tápoldatok és oldatok

YPD-PS (yeast extract-peptone-dextrose) tápoldat/táptalaj: 0,5% (m/V) élesztőkivonat, 1% (m/V) pepton, 1% (m/V) glükóz tartalmú tápoldat 100 unit/ml penicillin-streptomycin (PS) antibiotikummal (Sigma-Aldrich), továbbá szilárd táptalaj esetén 2% (m/V) agarral kiegészítve.

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

A fenotípusos vizsgálatok alapjaként a legtöbb esetben a fentebb leírt YPD-PS táptalaj szolgált, ahol ettől eltértünk az külön említésre kerül. Az YPD-PS táptalajt a továbbiakban felsorolt stresszorokkal egészítettük ki. Ahol nincs jelezve, ott a stresszort a sterilizálás előtt adtuk a táptalajhoz. Ahol sterilizálás után adtuk a stresszort a táptalajhoz, ott a stresszort szűréssel (Milipore, pórusméret: 0.22 μm) sterilizáltuk.

YPD + 1 M NaCl

YPD + 1 M szorbitol

YPD + 30% (V/V) glicerol

YPD + 10 mM H_2O_2 : 30% (V/V) törzsoldatból hozzáadva sterilizálás után

YPD + 0,05 mM CdSO_4 : 0,1 M $3\text{CdSO}_4 \cdot 8 \text{H}_2\text{O}$ (desztillált vízben oldott) törzsoldatból hozzáadva sterilizálás után

YPD + 0,2 mM menadion: 1 M-os 96%-os etanolban oldott törzsoldatból hozzáadva, sterilizálás után

YPD + 10/25/50/75/100 $\mu\text{g/ml}$ kongóvörös: frissen készített 100 mg/ml koncentrációjú (desztillált vízben oldott) kongóvörös törzsoldatból hozzáadva, sterilizálás után

YPD + 10/25/50 $\mu\text{g/ml}$ kalkofluor fehér: frissen készített 100 mg/ml koncentrációjú (desztillált vízben oldott) kalkofluor fehér törzsoldatból hozzáadva, sterilizálás után

YPD + 10 mM koffein: 70 mM-os (desztillált vízben oldott) törzsoldatból hozzáadva, sterilizálás után

YPD + 0,04% (m/V) SDS

YPD + 4 mM CuCl_2 : 1 M CuCl_2 (desztillált vízben oldott) törzsoldatból hozzáadva, sterilizálás után

YPD + 4 mM CuSO_4 : 1 M CuSO_4 (desztillált vízben oldott) törzsoldatból hozzáadva, sterilizálás után

YPD + 0,25 mM EDTA: 0,5 M-os EDTA (pH=7,5) oldatból

YPD + 150 μM BPS: a táptalaj 1,5% (m/V) agart tartalmazott, sterilizálást követően 45° -os vízfürdőbe helyeztük, majd 150 μM -os végkoncentrációban 0,025 M-os (desztillált vízben oldott) BPS törzsoldatot adtunk hozzá, és csészeöntés előtt 2 percig állni hagytuk.

YPD + 500 μM BPS + 0,2 μM hemin: a táptalaj 1,5% (m/V) agart tartalmazott, sterilizálást követően 45°C-os vízfürdőbe helyeztük, majd 500 μM -os végkoncentrációban 0,025 M-os (desztillált vízben oldott) BPS törzsoldat adtunk hozzá, és 2 percig állni hagytuk. Ezt

követően 2 μ M végkoncentrációban 1 mM-os (DMSO-ban oldott) hemin törzsoldatot adtunk hozzá.

YPD (pH 4/5/6/7/8): a különböző pH értékű táptalajok elkészítéséhez a táptalaj komponenseket Mc Ilvaine pufferoldatok (0,2 M Na_2HPO_4 és 0,1 M Citromsav) megfelelő arányú oldatában oldottuk fel.

Szelektív Drop Out táptalaj: 0,19% (m/V) YNB, 2% (m/V) glükóz, 2,5% (m/V) agar, sterilizést és 50°C alá hűlést követően steril 10x-es töménységű Drop Out aminosav oldattal és szükség esetén L-Leucin törzsoldattal kiegészítve 2,5 mg/ml végkoncentrációban.

10x-es töménységű Drop Out aminosav oldat (1000 ml-re):

200 mg L-arginin, 300 mg L-izoleucin, 300 mg L-lizin, 200 mg L-metionin, 500 mg L-fenilalanin, 2000 mg L-treonin, 300 mg L-tirozin, 200 mg uracil, 1500 mg L-valin, 2000 mg adenin, 2000 mg L-triptofán. Az oldat steril szűrővel (Milipore, pórusméret: 0.22 μ m) segítségével sterilizésre.

Alacsony cinktartalmú tápoldat és táptalaj (LZM): A cink transzporter mutáns törzsek növekedési tulajdonságainak és a cink ionnal szembeni tolerancia jellemzésére alacsony cinktartalmú táptalajt (LZM) használtunk, amelyet különböző végkoncentrációkban (0,05; 1; 10; 15; 17,5; 20; 22,5; 25; 50 és 100 mM) ZnSO_4 -al egészítettünk ki 0,1 vagy 2 M ZnSO_4 törzsoldat felhasználásával. Az LZM elkészítéséhez a táptalajt a cink ionok kivételével az összes esszenciális aminosav, tápanyag és ion hozzáadásával hoztuk létre, amelyhez a Crawford és munkatársai által biztosított módosított protokollt követtük (Crawford és mtsai., 2018). Az LZM tápoldat pH értéke puffereletlen formában 7,5 volt. A savas/lúgos kémhatás beállításához citromsavat (1 M) vagy dinátrium-hidrogén-foszfátot (0,2 M) használtunk. A tápoldat pontos leírása a függelékben (Függelék 3. táblázat) található.

LB tápoldat és táptalaj: 0,5% (m/V) élesztőkivonat, 1% (m/V) tripton és 1% (m/V) nátrium-klorid (NaCl) tartalmú tápoldat, szilárd táptalaj esetén 2,5% (m/V) agarral kiegészítve.

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

RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute 1640) tápoldat (Lonza): RPMI 1640 tápoldat (Lonza) 100 unit/ml végkoncentrációban PS antibiotikumokkal kiegészítve.

X-VIVO 15 (Chemically Defined, Serum-free Hematopoietic Cell Medium): X-VIVO 15 tápoldat (Lonza) 100 unit/ml végkoncentrációban PS kombinációjával kiegészítve, kísérlettől függően 10 ng/ml granulocita-makrofág stimuláló faktorról (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF) kiegészítve.

PBS (phosphate buffered saline): 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄ (pH 7,4).

Lízis puffer: (1 m/V% SDS, 50 mM EDTA, 100 mM TRIS pH 8)

Alkalikus SDS: 0,2 M NaOH, 2% (m/V) SDS

Magas sótartalmú (high salt) oldat: 3 M K-acetát, pH 4

V.3. Törzsek fenntartása és tenyésztése

V.3.1. *E. coli* törzsek fenntartása és tenyésztése

Az *E. coli* 2T1 törzset LB táptalajon tartottunk fent, felnövesztésüket LB tápoldatban végeztük. Az *E. coli* sejtek transzformálását követően a transzformánsok szelekciójához 50 µg/ml ampicillinnel (Sigma-Aldrich) vagy 50 µg/ml kanamicinnel (Sigma-Aldrich) kiegészített LB táptalajokat használtunk.

V.3.2. *C. parapsilosis* törzsek fenntartása és tenyésztése

Az összes törzset a Szegedi Tudományegyetem, Biotechnológiai és Mikrobiológiai Tanszéken fenntartott Szeged Mikrobiológiai Gyűjtemény (SZMC) törzsgyűjteményben tároltuk. A tárolás -80 °C-on történt. A homozigóta mutánsokat 100 unit/ml PS-nel kiegészített Selective Drop Out agar táptalajon tartottuk fenn, amelyeket havonta friss táptalajra oltottunk át. A heterozigóta mutáns törzseket hasonlóan tartottuk fenn, kiegészítésként L-leucint (2,5 mg/ml) adtunk a táptalajhoz. A *C. parapsilosis* CLIB 214 vad típusú törzset 100 unit/ml PS tartalmú YPD táptalajon neveltük. A génreintegrált és zöld

fluoreszcens fehérjével (Green Fluorescence Protein, GFP) jelölt törzseket 100 µg/ml nourseothricinnel kiegészített YPD táptalajon tartottuk fenn.

A kísérletek előtt a törzseket 2 ml YPD tápoldatban növesztettük 30 °C-on, egész éjszakán át rázatva (200 fordulat/perc), majd a tenyészet 100 µl-ét 2 ml YPD-PS tápoldatba oltva a tenyészetet újra 30 °C-on egy éjszakán át rázatva (200 fordulat/perc) neveltük a sejtnövekedés frissítése érdekében. A sejteket ezután háromszor 1x PBS-sel mostuk, minden alkalommal 2000 x g fordulatszám 5 percig centrifugálva gyűjtöttük össze, majd Bürker kamrával meghatároztuk a sejtszámot, és beállítottuk a kísérletekhez szükséges koncentrációkat.

V.4. *C. parapsilosis* mutáns törzsek előállítása

A kísérletekhez használt összes törzset az 1. táblázat foglalja össze. A mutáns törzsek előállítására használt primereket a Függelék 1. táblázatában, a plazmidokat a Függelék 2. táblázatban foglaltuk össze.

V.4.1. *In silico* analízis

A doméneket a <http://smart.embl-heidelberg.de> honlapon, a gén családokat a <http://pfam.xfam.org> honlapon elérhető online szoftverek segítségével azonosítottuk. A művelet során minden beállítást alap értéken hagytunk.

V.4.2. Homozigóta deléciós mutáns törzsek létrehozása

A cink transzporter homozigóta mutánsokat Holland és munkatársai által leírt, majd módosított protokoll szerint hoztuk létre a *C. parapsilosis* CLIB 214 prototróf törzsből előállított hisztidin és leucin auxotróf szülői törzs felhasználásával (Holland és mtsai., 2014).

V.4.3. HIS1 és LEU2 markerek amplifikálása

A *Candida dubliniensis* HIS1 és *Candida maltosa* LEU2 marker géneket az univerzális Primer 2 és a specifikus Primer 5-ös oligonukleotidokkal amplifikáltuk Phusion DNS polimerázzal (Thermo Fisher Scientific) (ez utóbbi oligonukleotid minden génre egyedi BAR kódot tartalmazott), a reakcióban sorrendben a pSN52, illetve pSN40 plazmid szolgált templátként (lásd: Függelék 2. táblázat).

Reakcióelegy összetétele

(20 µl végtérfogatra):

A reakció paraméterei:

5x GC puffer	4 µl	98 °C, 30 mp	
1-1 mM dTNP oldat	4 µl	98 °C, 10 mp	} 35x
5 µM Forward primer	2 µl	60 °C, 30 mp	
5 µM Reverse primer	2 µl	72 °C, 1:20 perc	
2 ng/µl plazmid templát	1 µl	72 °C, 2:40 perc	
Steril bidesztillált víz	7 µl	10 °C, ∞	
5 u/µl Phusion polimeráz	0,2 µl		

HIS1 és LEU2 amplikonokat PEG hozzáadásával izoláltuk (V.4.7. fejezet) majd horizontális gélelektroforézis során határoztuk meg a méretüket és koncentrációjukat (V.4.6. fejezet).

V.4.4. Upstream és downstream szakaszok amplifikálása

A genomból eltávolítani kívánt génektől upstream és downstream elhelyezkedő, hozzávetőlegesen 500 bp méretű fragmenteket amplifikáltunk az adott régióra specifikus 1 és 3 illetve 4 és 6 primerekkel DreamTaq (Thermo Fischer Scientific) DNS polimerázzal. A reakciókban *C. parapsilosis* CLIB 214 jelű vad típusú törzs genomi DNS-ét használtuk templátként, amelyet a V.4.8 fejezetben leírtak szerint izoláltunk.

Reakcióelegy összetétele

(20 µl végtérfogatra):

A reakció paraméterei:

10x DreamTaq puffer	2 µl	95 °C, 1 perc	
1-1 mM dTNP oldat	4 µl	95 °C, 15 mp	} 35x
5 µM Forward primer	1 µl	54 °C, 20 mp	
5 µM Reverse primer	1 µl	72 °C, 30 mp	
1 ng/µl genomi DNS	1 µl	72 °C, 1 perc	
Steril bidesztillált víz	11 µl	10 °C, ∞	
5 u/µl DreamTaq polimeráz	0,2 µl		

V.4.5. Upstream és downstream amplikonok izolálása

A PCR termékeket agaróz gélen ellenőriztük DNS marker mellett a V.4.6. fejezetben leírtak szerint. Félbevágott és kilyukasztott steril mikrocentrifuga csőbe steril szűrővattát helyeztünk. Ezt egy másik mikrocentrifuga csőbe illesztettük, majd a várt méretben megjelenő fragmentet a gélből steril pengével óvatosan kivágtuk, és a horgászvattát tartalmazó mikrocentrifuga csőbe raktuk, és centrifugáltuk (17000 x g, 10 perc). Az átfolyt oldat tartalmazta az amplikont, amelyhez 1/10 térfogatnyi 3 M-os Na-acetátot, majd egységnyi térfogatnyi izopropanolt adtunk. Az oldatot alaposan összeráztuk, és egy éjszakán át -20°-os fagyasztószekrényben tároltuk. Másnap centrifugáltuk (17000 x g, 10 perc), és a kiülepedett DNS-t 70% (V/V) -os etanollal mostuk, azonos körülmények között. Az etanolt eltávolítottuk és a DNS-t hagytuk szobahőmérsékleten megszáradni. Ezt követően a fragmentumot 10 µl steril bidesztillált vízben felszuszpendáltuk és agaróz gélen megfuttattuk 1 µl ismert mennyiségű DNS marker mellett a V.4.6. fejezetben leírtak szerint, majd meghatároztuk az amplikonok koncentrációját.

V.4.6. Horizontális gélelektroforézis

A PCR sikerességének ellenőrzéséhez, illetve a fragmentumok koncentrációjának megbecsléséhez 0,8 % (m/V)-os agaróz gél (0,8 g agaróz/100 ml 1x TAE puffer) alkalmaztunk. A gél 10 µl/100 ml etídium-bromidot tartalmazott. 1 µl amplikonhoz 1 µl 6X-os töménységű brómfenolkék festéket és 4 µl steril bidesztillált vizet adtunk. A gél az elválasztás során 1x TAE pufferbe és 35-40 percre 90V-os egyenáramú elektromos térbe helyeztük. Az agaróz gélen UV-fénnyel megvilágítva tettük láthatóvá az amplikonokat.

V.4.7. PCR termék tisztítása polietilén-glikol segítségével (PEG)

A PCR reakcióelegyet 4x-esére hígítottuk 1x TE (pH 8) pufferrel, majd ehhez ezen térfogat felének megfelelő mennyiségű 30 % (m/V) PEG 8000 és 30 mM MgCl₂ oldatát adtuk. 1 percig vortexeltük, majd centrifugáltuk (17000 x g 15 perc). A felülúszót eltávolítottuk, a kiülepedett fragmentumot 10 µl steril bidesztillált vízben felszuszpendáltuk és -20 °C-on tároltuk felhasználásig.

V.4.8. Össz DNS kivonás *C. parapsilosis* sejtekből

A genomi DNS izolálásához az adott törzset 2 ml YPD (szükség esetén nourseothricinnel kiegészített) tápoldatban növesztettük fel 30 °C-on egy éjszaka alatt. A sejteket ezután centrifugálással gyűjtöttük össze (2000 x g, 5 perc), majd a sejtpelletre 500 µl lízis puffert mértünk. A mikrocentrifuga csöveket 0,5 mm átmérőjű üveggyönggyel töltöttük fel 1 ml térfogatig, majd kétszer 3 percig vortexeltük a mintákat (az első 3 perc után megfordítva a csöveket). Az így kapott homogén lizátumokra 275 µl 7 M-os ammónium-acetátot mértünk, majd a mintákat 5 percig 65 °C -on kezeltük. Ezt követően 5 percig jégen tároltuk a mintákat, amelyekhez 500 µl kloroform-izoamilalkohol 24:1 arányú keverékét adtuk. A mintákat az alapos vortexelésüket követően centrifugáltuk (17000 x g, 10 perc), majd 480 µl-t mértünk át a felső, vizes fázisból egy új mikrocentrifuga csőbe. Egyenlő mennyiségű izopropanol hozzáadása után 20 percig -20 °C-on tároltuk a mintákat a genomi DNS kicsapása érdekében. Ezt követően centrifugáltuk a mintákat (17000 x g, 10 perc), majd 500 µl 70 % (V/V) -os etanollal mostuk a DNS-t. Az újabb centrifugálást (17000 x g, 5 perc) követően a felülúszót maradéktalanul leszívtuk, a mintát szárítottuk, majd RNáz tartalmú (500 µg/ml) desztillált vízben oldottuk fel. A DNS minták integritását gélelektroforézissel ellenőriztük a V.4.6. fejezetben leírtak szerint

V.4.9 Fúziós PCR

Az izolált upstream/downstream illetve HIS1/LEU2 fragmentumokat fúziós PCR során illesztettük egymáshoz. A fúziós PCR-eket Holland és mtsai. által adaptált technika alapján végeztük (Holland és mtsai., 2014).

Reakcióelegy összetétele

(20µl végtérfogatra):

A reakció paraméterei:

GC puffer (5 X)	4 µl	98 °C, 30 mp	
dNTP mix (1-1 mM)	4 µl	98 °C, 10 mp	} 35x
Forward primer (5 µM)	2 µl	57 °C, 30 mp	
Reverse primer (5 µM)	2 µl	72 °C, 2 perc	
Upstream fragmentum (20 fmol/µl)	1 µl	72 °C, 4 perc	
Downstream fragmentum (20 fmol/µl)	1 µl	10 °C, ∞	
HIS1/LEU2 marker (20 fmol/µl)	1 µl		
Steril bidesztillált víz	5 µl		
Phusion polimeráz (5 u/µl)	0,2 µl		

Az így nyert fúziós fragmenteket horizontális gélelektroforézissel ellenőriztük az V.4.6. fejezetben leírtak szerint. Az amplikonokat PEG hozzáadásával izoláltuk (V.4.7. fejezet) majd horizontális gélelektroforézis során határoztuk meg a méretüket és koncentrációjukat (V.4.6. fejezet).

V.4.10. Kémiai transzformálás

A hetero- és homozigóta mutánsokat Holland és munkatársai által leírt protokoll szerint állítottuk elő a *C. parapsilosis* CLIB 214 hisztidin és leucin dupla auxotróf törzs (CPL2H1) felhasználásával (Holland és mtsai., 2014). Minden géndeléciós homozigóta mutánsból két egyedi, egymástól független transzformánst választottunk ki és használtunk a további kísérletekhez.

V.5. Génrekonstruált törzsek létrehozására használt technikák

V.5.1. A visszaépíteni kívánt gének amplifikálása Gateway TM klónozáshoz

CpZRT21 és *CpZRC1* gének visszaépítéséhez a vad típusú CLIB 214 *C. parapsilosis* genomi DNS-t templátként használva szaporítottuk fel Phusion Hot Start II DNS polimerázzal a *CpZRT21* és *CpZRC1* ORF (kódoló) régióit, valamint az adott gén 500 bázispárnyi up- illetve downstream szakaszát. Az amplitikonokat PEG hozzáadásával izoláltuk (V.4.7. fejezet) majd horizontális gélelektroforézis során határoztuk meg a méretüket és koncentrációjukat (V.4.6. fejezet).

V.5.2. BP klónozás

50 fmol donor vektorhoz (pDONR221) 50 fmol tisztított inszertet adtunk, továbbá 0,7 µl BP klonáz enzimet, valamint 1x TE (pH 8) puffert 8 µl végtérfogatban, és az elegyet egész éjszakán át 25 °C-on inkubáltuk. A klónozási reakciót 1 µl 50 µg/ml koncentrációjú proteináz K hozzáadásával termináltuk, majd az elegyre kémiai kompetens *E. coli* 2T1 sejteket mértünk, amelyeket 25 percig jégen inkubáltunk. A szuszpenziót 2 percre 42 °C-os vízfürdőbe, majd 2 percre jégre helyeztük, és a sejteket 1 ml LB tápoldatban regeneráltuk 37 °C-on rázatva egy órán keresztül. A transzformánsokat kanamicinnel kiegészített LB táptalajon szelektáltuk egy éjszakán át 37 °C -on történő inkubációt követően.

V.5.3. LR klónozás

8 µl reakció 25 fmol inszertet tartalmazó donor vektort, 25 fmol módosított „destination” (*pDCpOE-N-N5L*) vektort, 0,7 µl LR klonáz enzimet, valamint 1x TE puffert tartalmazott (Németh és mtsai., 2018). A reakció 2 órán keresztül 25 °C-on zajlott, és a BP klónozáshoz hasonlóan, 1 µl proteináz K-val állítottuk le, majd az eleggyel a korábban leírtak szerint kémiai kompetens *E. coli* 2T1 sejteket transzformáltunk. A transzformánsokat ampicillin tartalmú LB táptalajon szelektáltuk egy éjszakán át 37 °C -on történő inkubációt követően.

V.5.4. Bakteriális plazmid izolálása

A transzformánsokat a megfelelő szelekciós antibiotikummal (kanamicin vagy ampicillin) kiegészített 2 ml LB tápoldatban növesztettük fel 37 °C-on egy éjszakán át. Másnap a sejteket centrifugálással (2000 x g, 5 perc) összegyűjtöttük, majd a pelletet vortexelve fellazítottuk

100 µl lízis pufferben (50 mM glükóz, 10 mM EDTA, 25 mM TRIS, pH=7,5) homogenizálva. Ezt követően 200 µl alkalikus SDS oldatot és 150 µl „high salt” oldatot adtunk az elegyhez. A mintákat óvatosan összekevertük, majd a kicsapódott fehérjéket üleptítettük (17000 x g, 10 perc). A felülúszót új mikrocentrifuga csőbe mértük át, amelyre azzal megegyező térfogatú (470 µl) kloroform-izoamilalkohol 24:1 arányú keverékét adtuk, majd azonos körülmények között centrifugáltuk a mintákat. A felső vizes fázist új mikrocentrifuga csőbe mértük, amelyre megegyező mennyiségű (450 µl) izopropanolt mértünk, majd 20 percig -20 °C-on inkubáltuk. Ezt követően üleptítettük a kicsapódott DNS-t (17000 x g, 10 perc), majd 70% (V/V) -os etanollal mostuk (17000 x g, 5 perc), és a pelletet cseppmentesre szárítottuk. Szárítást követően a plazmid DNS-t 30 µl RNázt (250 µg/ml, Sigma) tartalmazó desztillált vízben oldottuk fel, amelyet restrikciós emésztéssel ellenőriztünk. Amennyiben nagy mennyiségű plazmid DNS-re volt szükségünk, 100 ml LB tápoldatban növesztettük fel a sejteket megfelelő szelekciós nyomás mellett, és a Geneaid Plasmid Midi Kit segítségével izoláltuk azt a gyártó által javasolt protokoll szerint.

V.5.5. CpZRC1 gén funkcionális helyreállítása CaTDH3 promóter segítségével

A *CaTDH3-CpZRC1* fúziós konstrukciót a két fragment külön történő amplifikálása után hoztuk létre, amelyet PEG-gel történő visszaizolálás után (V.4.7. fejezet) *C. parapsilosis* sejteket transzformáltunk Németh és mtsai. alapján leírt transzformációs protokoll szerint (Németh és mtsai., 2021).

V.5.6 GFP jelölt törzsek létrehozása

A fagocitózisos kísérletekhez GFP-vel jelölt CLIB 214 RI, Δ/Δ *Cp ZRT21* és Δ/Δ *Cp ZRC1* törzseket használtunk, ahol a *CaTDH3* promóterének szabályozása alatt álló GFP fúziós konstrukciót a *CpNEUT5L* semleges lókuszbba integráltuk Németh és munkatársai által leírtak szerint (Németh és mtsai., 2021). A beépülés sikerességét kolónia PCR-rel, helyes integrációját Southern hibridizációval, a GFP expressziót fluoreszcens mikroszkóp segítségével ellenőriztük.

V.5.7. CpZrc1-GFPtag törzsek létrehozása

A CpZrc1 intracelluláris lokalizációjának meghatározására a célgén C-terminálisát jelöltük meg Gly5-GFP konstrukcióval a Lombardi és munkatársai által leírt CRISPR-Cas9 alapú génmódosítási és transzformációs módszer szerint (Lombardi és mtsai., 2019).

V.6. *C. parapsilosis* mutáns törzsek ellenőrzése

V.6.1. Kolónia PCR

V.6.1.1. Homozigóta deléciós mutánsok ellenőrzése

Kolónia PCR során a heterozigóták esetében az integráció upstream régióját a genomra specifikus 5' forward check és a kazettára specifikus HIS1 reverse check primerekkel, a downstream szakaszt pedig a genomra specifikus 3' reverse check és a kazettára specifikus HIS1 forward check primerek segítségével ellenőriztük. Homozigóták ellenőrzésekor mindkét allélban található HIS1 vagy LEU2 kazetta beépülését vizsgáltuk. Mindkét reakció esetében egy a szakirodalomban elérhető egyszerűsített DNS kivonási protokollt követtünk (Noble és Johnson, 2005). A genomi DNS-t 50 µl steril bidesztillált vízben szuszpendáltuk fel. A PCR paraméterei az alábbiak voltak:

Reakcióelegy összetétele

(20µl végtérfogatra):

A reakció paraméterei:

2 µl DreamTaq puffer (10 X)	95 °C, 1 perc	} 35x
4 µl dNTP mix (1-1 mM)	95 °C, 15 mp	
1 µl 5' forward primer (5 µM)	54 °C, 20 mp	
1 µl 3' reverse primer (5 µM)	72 °C, 3 perc	
1 µl Templát genomi DNS	72 °C, 6 perc	
11 µl Steril desztillált víz	10 °C, ∞	
0,15 µl DreamTaq DNS polimeráz		

V.6.1.2. Génrekonstruált törzsek ellenőrzése

A reakciók esetében egy a szakirodalomban elérhető egyszerűsített DNS kivonási protokollt követtünk (Noble és Johnson, 2005), az így kivont genomi DNS-t 50 µl steril bidesztillált vízben oldottuk fel és használtuk a reakció templátjaként:

Reakcióelegy összetétele

(20µl végtérfogatra):

A reakció paraméterei:

2 µl DreamTaq puffer (10 X)	95 °C, 1 perc	} 35x
4 µl dNTP mix (1-1 mM)	95 °C, 15 mp	
1 µl 5' CpOEDoChkF (5 µM)	54 °C, 20 mp	
1 µl CpNEUT5L_Dodo_check_REV (5 µM)	72 °C, 3 perc	
1 µl Templát genomi DNS	72 °C, 6 perc	
11 µl Steril desztillált víz	10 °C, ∞	
0,15 µl DreamTaq DNS polimeráz		

V.6.1.3. GFP jelölt törzsek ellenőrzése

A transzformánsokból a reakció templátjaként szolgáló DNS-t a szakirodalomban elérhető egyszerűsített DNS kivonási protokoll szerint vontuk ki (Noble és Johnson, 2005). Az így kivont genomi DNS-t 50 µl steril bidesztillált vízben oldottuk fel.

Reakcióelegy összetétele

(20µl végtérfogatra):

A reakció paraméterei:

2 µl DreamTaq puffer (10 X)	95 °C, 1 perc	} 35x
4 µl dNTP mix (1-1 mM)	95 °C, 15 mp	
1 µl GFP-attB2_REV (5 µM)	54 °C, 20 mp	
1 µl CpNEUT5L_Dodo_check_REV (5 µM)	72 °C, 3 perc	
1 µl Templát genomi DNS	72 °C, 6 perc	
11 µl Steril desztillált víz	10 °C, ∞	
0,15 µl DreamTaq DNS polimeráz		

V.6.1.4. *CpZRC1-GFPtag* törzsek ellenőrzése

Az előzőekhez hasonlóan a szakirodalomban található egyszerűsített DNS kivonási protokollt követtünk (Noble és Johnson, 2005), és az így kivont genomi DNS-t 50 µl steril bidesztillált vízben oldottuk fel és használtuk a PCR reakció templátjaként.

Reakcióelegy összetétele

(20µl végtérfogatra):

A reakció paraméterei:

2 µl DreamTaq puffer (10 X)	95 °C, 1 perc	} 35x
4 µl dNTP mix (1-1 mM)	95 °C, 15 mp	
1 µl CPAR2_212100 5' forward check primer (5 µM)	54 °C, 20 mp	
1 µl CpNEUT5L_Dodo_check_REV (5 µM)	72 °C, 3 perc	
1 µl Templát genomi DNS	72 °C, 6 perc	
11 µl Steril desztillált víz	10 °C, ∞	
0,15 µl DreamTaq DNS polimeráz		

V.6.2. Southern hibridizáció

Az élesztő totál DNS izolálást és a Southern hibridizációt Horváth és mtsai. által leírtak szerint végeztük (Horváth és mtsai., 2012). Az eljárást homozigóta mutánsok, a génrekonstruált, valamint a *CpZRC1-GFPtag* jelölt törzsek ellenőrzésekor használtuk a markerekre (HIS1/LEU2) a reintegrációhoz használt kazetta downstream részére (CpNEUT5LDoDo), a Zrc1-GFPtag esetében a GFP-tag-re specifikus digoxigenin (DIG) jelölt próbákat. Az emésztési reakciókhoz ~10 µg genomi DNS-t használtunk, amit HindIII vagy PvuII restrikciós enzimekkel emésztettünk. A mintáinkat Roche DIG-labeled Molecular weight marker VII mellett futtattuk.

V.6.2.1. DIG jelölt próbák létrehozása

A DIG jelölt próbák létrehozása 2 ng DNS plazmid eredetű (pSN40 pSN52) vagy gomba genomi DNS templát felhasználásával történt.

Reakcióelegy összetétele

(20µl végtérfogatra):

A reakció paramétereit:

2 µl DreamTaq puffer (10 X)	95 °C, 1 perc	
4 µl dNTP mix (1-1 mM)	95 °C, 15 mp	} 35x
1 µl forward primer (5 µM)	52 °C, 30 mp	
1 µl reverse primer (5 µM)	68 °C, 1:30 perc	
1 µl Templát genomi DNS	72 °C, 6 perc	
11 µl Steril desztillált víz	10 °C, ∞	
0,15 µl DreamTaq DNS polimeráz		

V.6.3. Fenotípusos jellemzés

Minden homozigóta mutáns életképességét 30 különböző stressz körülmény között teszteltük. A törzseket a korábban említett módon készítettük elő, a kísérletekhez továbbá a sejtkoncentrációt $10^4/10^3/10^2/10^1$ sejt/ 5 µl értékre állítottuk be, majd 5-5 µl sejtszuszpenziót cseppentettünk a különböző stresszort tartalmazó táptalajok felületére. A törzsek növekedését 30 °C-on 3 nap inkubációt követően vizsgáltuk. A folyadék tápoldatban végzett növekedési teszteket 4×10^5 sejt/ 200 µl térfogatban, 96 lyukú mikrotiter lemezekben végeztük, a törzsek növekedési kinetikáját 600 nm-en mértük BioTek Synergy HTX spektrofotométerrel.

V.6.4. Génexpresszió vizsgálata

A törzseket YPD tápoldatban tenyésztettük 30 °C-on, rázatva (200 fordulat/perc), egy éjszakán át. Ezután 4×10^5 sejtet oltottunk YPD tápoldatba vagy LYM médiumba különböző cink ion mennyiséggel kiegészítve, és a sejteket 24 órán át szaporítottuk. A sejteket összegyűjtöttük és az RNS-t RiboPure™ RNS Purification Kit (Merc) segítségével izoláltuk a gyártó által javasolt protokoll szerint. A reverz transzkripcióhoz 500 ng totál RNS-t alkalmaztunk, a reakcióhoz a RevertAid single strand cDNA szintézis kitet (Merc) használtuk a gyártó utasításainak megfelelően. A valós idejű PCR során a Függelék 1. táblázatban

felsorolt primereket használtuk és a körülmények a következők voltak: elődenaturáció 95 °C-on 3 perc; majd 50 cikluson keresztül denaturáció 95 °C-on 10 másodperc; primerbekötés 60 °C-on 30 másodperc, láncszintézis 65 °C-on 30 másodperc. A termékek tisztaságát olvadási görbe analízissel ellenőriztük, amelynek során a fluoreszcencia intenzitását mértük az alábbi program minden lépésében: 65 °C, 5 másodperc majd 95 °C-ig fél fok emelkedéssel.

A CLIB 214 kontroll ΔC_t “threshold cycle” (CT) analízis során a cink transzporter génnek normalizált Cq értékeit viszonyítottuk a *CpTUB4* háztartásgén expressziójához YPD tápközegben. A *ZRT2* ortológok génexpressziós változásait Δ/C_t analízissel számítottuk ki, a cink transzporter gén Cq értékeit a savas LZM tápközegben lévő *CpTUB4* expressziós értékeire normalizáltuk minden törzs esetében.

V.7. Fluoreszcens festés

V.7.1. Zinquin

A *C. parapsilosis* sejtek intracelluláris cink tartalmának megjelenítéséhez Zinquin (Invitrogen™) fluoreszcens festéket használtuk. A V.3.2. fejezetben leírtak alapján tenyésztettük elő a sejteket majd 1×10^7 sejtet 200 μ l 1x PBS-be oltottuk, és 25 μ M végkoncentrációjú Zinquin-nel festettük 40 percen keresztül szobahőmérsékleten, fénytől védve. A sejteket ezután kétszer mostuk 1xPBS-ben (2000 x g, 5 perc). A Zinquin + populációt a Függelék 1. ábrán látható kapuzási stratégia alkalmazásával határoztuk meg.

V.7.2. AlexaFluor 647

Alexa 647 szukcinimidil észterrel (Invitrogen™) jelölni kívánt *C. parapsilosis* sejteket a kísérletet megelőzően előnövesztettük és előkészítettük az V.3.2. fejezetben leírtak alapján. 100 μ l 1x PBS-ben felvett 3×10^8 sejt/ml szuszpenzióhoz 21 μ l 1M-os trinátrium-hidrogén-karbonátot, majd 4 μ l 1 mg/ml töménységű AlexaFluor 647-et adtunk, amelyet vortexelést követően 40 percig szobahőmérsékleten inkubáltunk. A sejteket ezt követően két alkalommal 1x PBS oldatban mostuk (2000 x g, 5 perc), majd 100 μ l 1x PBS oldatot adva a pellethez meghatároztuk a szuszpenzió sejtkoncentrációját, és előkészítettük a kísérletekhez.

V.7.3. Sejtfalfestés

Az élesztősejteket az V.3.2. fejezet szerint növesztettük és készítettük elő a kísérletekhez. A sejtfalfestéshez Concanavalin-TRITC (Invitrogen™) festéket (100 µg/ml koncentrációban) vagy kalkofluor fehérét (5 µg/ml koncentrációban) használtunk, mindkét festék esetében 200 µl végtérfogóban 40 percig történt a festés szobahőmérsékleten. Az inkubációs idő elteltével 1x PBS-sel kétszer mostuk a sejteket (2000 x g, 5 perc), majd előkészítettük a mintákat mikroszkópos vizsgálatra.

V.7.4. Sejtmagfestés

Az élesztősejteket az V.3.2. fejezetben leírtak szerint készítettük elő a kísérletekhez. A sejtmagot 4',6-diamidino-2-phenylindole-lal (DAPI, Invitrogen™) jelöltük (50 µg /ml koncentrációban) 200 µl végtérfogóban, majd 40 percig inkubáltuk a mintákat szobahőmérsékleten. Ezt követően 1x PBS pufferrel mostuk a sejteket két alkalommal (2000 x g, 5 perc), majd tárgylemezre cseppentettünk 5 µl térfogatú 1×10^5 sejtet, amelyre fedőlemezt helyeztünk a mikroszkópos vizsgálat érdekében.

V.7.5. Vakuólumok festése

Az élesztősejteket az V.3.2. fejezet szerint növesztettük és készítettük elő a kísérletekhez. A gombasejtek vakuólumjait FM4-64-gyel (Invitrogen™) (10 µg / ml koncentrációban) festettük 200 µl végtérfogóban, 40 percig, 30 °C-on, állandó rázatás mellett (200 fordulat/perc), fénytől védve. Ezt követően a sejteket kétszer 1x PBS-ben mostuk, majd 5 µl térfogatú 1×10^5 sejtet mikroszkópos elemzésre készítettük elő tárgylemezre cseppentve és fedőlemezzel lefedve.

V.7.6. FluoZin-3

Mind a J774.2 egér, mind az M1-típusú humán makrofágok intracelluláris szabad cink ionjait FluoZin-3 (Invitrogen™) cink specifikus fluoreszcens festékkel jelöltük a kísérletek során. A különböző *C. parapsilosis* sejtekkel végzett ko-inkubációs kísérletek során fél, 1, 2, 3 és 4 óra elteltével, a gomba sejtek lemosását követően, 500 µl 1mM FluoZin-3 oldatot adtunk a 12 vagy 24 lyukú tenyésztőedény mintahelyeiben található makrofágokhoz (J774.2

sejtek esetében 10^6 sejt/lyuk, M1 típusú makrofágok esetében 2×10^5 sejt/lyuk), majd 40 percig jégén, fénytől védve inkubáltuk a mintákat. Az inkubációs idő elteltével lemostuk a festéket 1x PBS oldattal, majd 500 μ l 1x PBS-ben szobahőmérsékleten inkubáltuk a sejteket a FluoZin-3 festék re-észterifikációja miatt. Az inkubációs idő elteltével képkalkotó áramlási citometriás méréshez vagy konfokális mikroszkópiához készítettük elő a mintákat.

V.8. J774.2 egér makrofágok fenntartása

A sejtvonalakat folyékony nitrogénben tároltuk. A kísérletekhez a J774.2 makrofágokat 10 % (V/V) hőinaktivált borjú szérummal és 100 unit/ml PS-nel kiegészített Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Lonza) tápközegben tenyésztettük 37 °C-on, 5 % (V/V) CO₂-ot tartalmazó légtérben, 100 % relatív páratartalom mellett. A tápoldatot 3 naponta és közvetlenül a kísérletek előtt cseréltük, a sejteket maximum 3 héten át használtuk.

V.9. PBMC sejtek szeparálása és fenntartása

A Szegedi Regionális Vérellátó Központ biztosított a laboratóriumunk számára egészséges felnőtt donoroktól származó perifériás vérből származó vérképzőanyag mononukleáris sejtek (PBMC) izolálására. A “buffy coat” vérképzőanyagokból Ficoll gradiens centrifugálással választottuk el a PBMC-t tartalmazó frakciót. Ehhez a vérképzőanyagot 1:2 arányban 1x PBS-sel hígítottuk, majd Ficoll Paque PlusTM oldat felszínére rétegeztük, és centrifugálással (550 x g, 30 perc) szobahőmérsékleten különítettük el a mononukleáris sejteket tartalmazó réteget. A rétegből izoláltuk a sejtfrakciót, jéghideg 1x PBS pufferrel mostuk két alkalommal (550 x g, 10 perc, 4 °C), majd RPMI 1640 tápoldatba szuszpendáltuk fel a kiülepedett sejteket. 1-1 ml sejtuszupenziót adagoltunk 12 lyukú tenyésztőedényekbe, majd 1 óra inkubációt követően eltávolítottuk a le nem tapadt sejteket szobahőmérsékletű, 1x PBS oldattal történő kétszeri mosással. A sejteket kísérleti elrendezéstől függően fenntartottuk, illetve differenciáltattuk.

V.10. M1-típusú humán makrofágok differenciálata, karakterizálása és aktiválása

A “buffy coat”-ból frissen izolált PBMC-ket X-vivo tápoldatban neveltük 100 unit/ml PS-el, valamint 10 ng/mL GM-CSF-el kiegészítve. A tápoldatot 2 nap elteltével lecseréltük, majd 6 nap inkubációt követően karakterizáltuk a makrofágokat CD68 intracelluláris monocita, CD86 M1 típusú, valamint CD163 M2 típusú makrofág specifikus sejtfelszíni receptorokhoz kötődő antitestekkel. Az antitesteket a gyártó (BioLegend) által javasolt protokoll alapján használtuk, az antitesteknek megfelelő izotípus kontrollakat használva. A mintákat képkotó áramlási citométer segítségével analizáltuk. Bizonyos kísérletek esetében a 6 napos PBMC differenciálata követően 24 órán át 100 ng/ml koncentrációjú interferon- γ citokin jelenlétében inkubáltuk a sejteket, majd a fent említett módon karakterizáltuk, és használtuk fel a kísérleteink során.

V.11. Fagocitózis vizsgálat

J774.2 egér vagy M1-típusú humán makrofágok és a különböző *C. parapsilosis* törzsek közötti interakció vizsgálata során képkotó áramlási citométer segítségével állapítottuk meg a fagocitózis mértékét. A kísérletet megelőzően 10^6 J774.2 egér makrofág sejtet mértünk ki 24 lyukú tenyésztőedények mintahelyeibe. M1-típusú humán makrofágok esetén a szeparálást és differenciálást követően határoztuk meg a 12 lyukú tenyésztőedény felszínére kitapadt sejtek számát és a sejtszám függvényében fertőztük azokat *C. parapsilosis* sejtekkel. A gombasejteket GFP vagy AlexaFluor 647 fluoreszcens fehérjével/festékkel jelöltük. Mind az egér, mind a humán makrofágok esetében 1:5 gazda: gomba arányt (MOI – multiplicity of infection) alkalmaztunk és fél, 1, 2, valamint 3 órán keresztül inkubáltuk a makrofágokat az élesztővel. Az inkubációs idő elteltével szobahőmérsékletű 1x PBS-sel mostuk a sejteket, majd a letapadt makrofágokat szobahőmérsékletű 1x PBS-sel távolítottuk el a tenyésztőedények felszínéről. A makrofágokat 1x PBS-sel mostuk (550 x g, 5 perc), majd 50 μ l térfogatú 1x PBS-ben felfuszpendálva készítettük elő az Amnis Flow Sight áramlási citometriás méréshez. Az analízist IDEAS kiértékelő programmal végeztük, a fagocitáló populációt a fertőzetlen makrofágok autofluoreszcenciájához mérten állapítottuk meg; az alacsony (1 vagy 2), illetve magas (3 vagy több) gomba sejtet tartalmazó makrofág populáció

elkülönítésére a program “spotcount” mátrixát használtuk. A kapuzási stratégiák összefoglalva a Függelék 3. ábráján láthatóak.

V.12. Gomba eliminációs vizsgálatok

A *C. parapsilosis* törzsek J774.2 makrofágok általi ölési hatékonyságát két módszerrel határoztuk meg.

Az áramlási citometrián alapuló gombaeliminációs vizsgálathoz mind a J774.2, mind az M1 típusú humán makrofágok esetén 1:5 fertőzési arányt alkalmaztunk. Előbbi esetben 24, utóbbi esetben 12 mintahelyes tenyésztőedényben végeztük a kísérletet. A kontroll minták csak élesztősejteket tartalmaztak. 3 vagy 6 órás inkubációt követően a sejteket összegyűjtöttük, és kétszer mostuk FUN1 pufferrel (10 mM NaHEPES, pH 8, 2 m/V % glükóz), majd az összegyűjtött makrofágokat feltártuk 29G-s fecskendőn keresztül történő átpréseléssel. Az élesztősejtek és a makrofágok törmelékének elkülönítésére a gomba sejtfalra specifikus kalkofluor fehérét, az élő sejtek detektálására FUN1 festéket használtunk. A kombinált festés a következőképpen történt: 195 µl sejtuszpenziót (kb. 5×10^6 sejt) tartalmazó FUN1 pufferhez 1 µl FUN1 (100 µM) és 4 µl Kalkofluor fehér (2,5 mg/ml) festéket adtunk. 40 percig sötétben, szobahőmérsékleten történő festés után a sejteket kétszer mostuk FUN1 pufferrel és az élő sejtek számát áramlási citométer segítségével határoztuk meg. A kontroll minták csak gombasejteket tartalmaztak DMEM tápoldatban. A kalkofluor fehér pozitív és FUN1 pozitív populációkat a Függelék 3. ábrán látható kapuzási stratégiával határoztuk meg.

Az élő csíraszám (CFU) alapú gomba eliminációs vizsgálatot standardizált protokoll szerint végeztük, kisebb változtatásokkal (Németh és mtsai., 2013). 2×10^5 J774.2 sejtet 10^6 élesztősejttel fertőztünk 96 mintahelyes tenyésztőedényben. M1 típusú humán makrofágok esetében szintén 5x mennyiségű gomba sejteket adtunk a 12 mintahelyes tenyésztőedényben fenntartott makrofágokhoz. A kontroll minták csak *Candida* sejteket tartalmaztak a fertőzési számmal megegyező mennyiségben. Három vagy hat órával a fertőzés után a sejteket összegyűjtöttük, a szuszpenziót a fentiekben leírtak szerint kezeltük a makrofág sejtek feltárása érdekében. A szuszpenziókat YPD-PS lemezekre szélesztettük, majd 30 °C-on 3 napig inkubáltuk azokat. A kísérletet 3 biológiai és 3 technikai párhuzamosban végeztük. A makrofágok ölési hatékonyságát az alábbi egyenlet szerint határoztuk meg (Németh és mtsai., 2013):

$$[(\text{Átlag}_{\text{Kontroll}} - \text{Átlag}_{\text{Fertőzés}}) / \text{Átlag}_{\text{Kontroll}}] \times 100$$

V.13. *In vivo* *Galleria mellonella* fertőzés

G. mellonella túlélési kísérleteket a Németh és munkatársai által korábban leírtak szerint végeztük (Németh és mtsai., 2013). A lárvákat 10 µl *Candida* szuszpenzióval fertőztük, amely 6×10^6 élesztősejtet tartalmazott 1x PBS-ben. A fertőzést az utolsó lábkezdemenyen keresztül végeztük 26 G fecskendőtü segítségével. Kontrollként a lárvák egy csoportját PBS-sel oltottuk be, egy másik csoport pedig kezeletlen maradt. A lárvákat 25 °C-on inkubáltuk, a túlélést 14 napon keresztül naponta ellenőriztük.

V.14. *In vivo* egér fertőzés

A kifejlett 8-12 hetes BALB/c hím és nőstény egereket az oldalsó farokvénán keresztül, intravénásan fertőztük 100 µl 2×10^7 *Candida* sejtet tartalmazó szuszpenzióval. A fertőzést követően az egereket naponta monitoroztuk. A fertőzési kísérletet 10-10 párhuzamosban végeztük.

V.15. CFU meghatározás az egér modellekben

Az egerek fertőzését követő 3. napon kíméletes, CO₂ túlaltatással termináltuk az állatokat, majd az egerek szerveit eltávolítottuk és tömegüket megmértük. A lép, májat, veséket és az agyat PBS-ben homogenizáltuk. A tömény homogenizátumokból 100-100 µl-t szélesztettük YPD+PS agar lemezekre, majd 30 °C-on 48 óráig inkubáltuk azokat. A megjelenő gombatelepeket megszámoltuk, majd a szervek kolonizáltságának mértékét a szerv tömegére normalizálva, CFU/g szövetként adtuk meg.

V.16. Statisztikai analízis

A statisztikai szignifikanciákat párosítatlan t-tesztekkel vagy Mann-Whitney tesztekkel határoztuk meg GraphPad Prism v 8.0 szoftverrel. A nem-paraméteres Mann-Whitney

teszteket rutinszerűen használtuk a génexpressziós adatok kiértékelése során (Vengatesan és mtsai., 2018). Az adatokat $p < 0,05$ értéknél tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

V.17. Alkalmazott programok

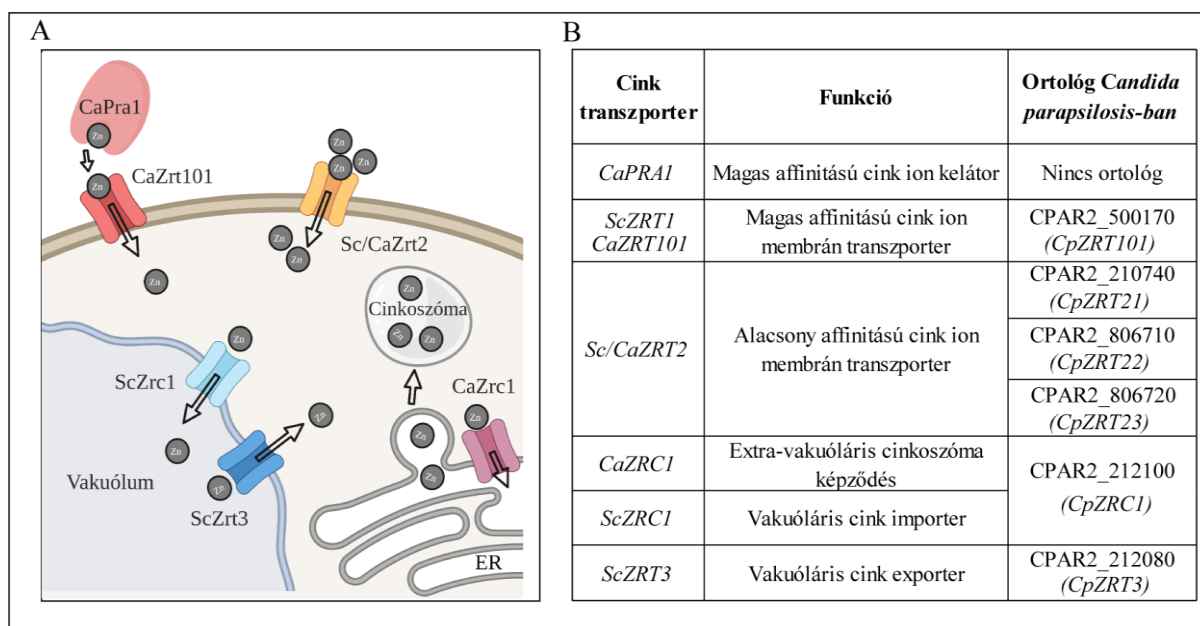
Nukleotid szekvencia megjelenítéséhez Ape v10.11. szoftvert, továbbá a kísérleti eredmények kiértékelése során GraphPad Prism v 8.0 statisztikai, az áramlási citometriás mérésekhez IDEAS 2.1.5. programokat használtunk. A doktori értekezésben található képek szerkesztéséhez és összeállításához Adobe Illustrator 3.0 szoftvert alkalmaztunk.

VI. Eredmények

VI.1. *C. parapsilosis* potenciális cink transzportereinek *in silico* azonosítása

Munkánk kezdetén *in silico* azonosítottuk a *C. parapsilosis* feltételezett cink transzportereit kódoló génszakaszokat (3. ábra). Az analízis során a *C. albicans* SC5314 és *S. cerevisiae* S288C vad típusú törzsek genomszekvenciáit hasonlítottuk össze a *C. parapsilosis* CLIB 214 vad típusú törzsével.

Nukleotid elemzés során hat *C. parapsilosis* ortológ gént azonosítottunk, amelyek nagymértékű hasonlóságot mutattak *CaZRT101*, *Sc/CaZRT2*, *Sc/CaZRC1*, és *Sc/CaZRT3* már ismert cink transzportereket kódoló génekkel. Érdeemes megemlíteni, hogy a *C. albicans*-ban ismert Pra1 cink ion megkötésére képes úgynevezett „cinkofór” szekretált fehérjét kódoló gén nem található meg a *C. parapsilosis* genomjában. Azonban azonosítottuk a CPAR2_500170 gént, mint *CaZRT101* magas affinitású cink ion transzporter ortológját, amely membrán transzporter a CaPra1 fehérjéjével közösen alkot cink ion felvételi rendszert *C. albicans*-ban. A mind *S. cerevisiae*-ben, mind *C. albicans*-ban ismert Zrt2 alacsony affinitású membrán transzporter három ortológját is azonosítottuk *C. parapsilosis* esetében, ezek a CPAR2_210740 (*CpZRT21*), CPAR2_806710 (*CpZRT22*) és CPAR2_806720 (*CpZRT23*) gének. A felsoroltak közül a CPAR2_210740 mutat legnagyobb nukleotid hasonlóságot a *C. albicans* ZRT2 génjével (87 %), továbbá feltételezhető, hogy a CPAR2_806710 és a CPAR2_806720 gének paralógok, amelyek egy ősi ZRT2 gén megkettőződésének eredményei. A CPAR2_212100 jelű génszakasz hasonlóságot mutat mind a pékélesztő, mind a *C. albicans* ZRC1 génjével, amely gén terméke a felsorolt gombák cink detoxifikáló folyamataiban játszik szerepet: intracelluláris cink ion raktárak úgynevezett cinkoszómák kialakításában vagy vakuoláris cink ion importban. Az *Sc/CaZRT3* vakuoláris cink exporter ortológját is azonosítottuk a *C. parapsilosis* genomjában CPAR2_212080 jelű génként.



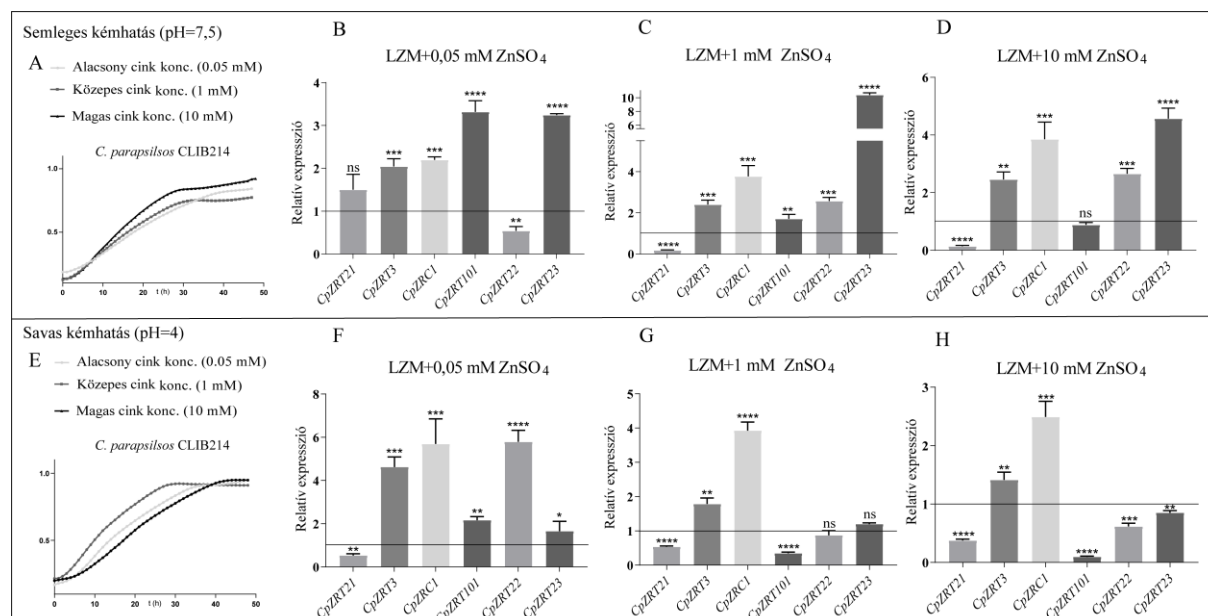
3. ábra. A cink homeosztázis vázlata, valamint a transzporterek ortológjainak *in silico* predikciója *C. parapsilosis*-ban. (A) *S. cerevisiae* és *C. albicans* ismert cink transzporterei. (B) *C. parapsilosis in silico* prediktált és géndelációra kiválasztott cink transzporter génjei. Az ábra Biorender (<https://www.biorender.com/>) online szoftwerrel készült.

VI.2. Potenciális cink-transzporter gének cink ion-függő expressziója

A továbbiakban megvizsgáltuk a prediktált cink transzporter gének expressziós mintázatát különböző cink ion koncentrációjú, valamint semleges vagy savas kémhatású közegekben.

Megállapítottuk, hogy a *C. parapsilosis* CLIB 214 kontroll törzs életképes az alacsony (0,05 mM), közepes (1 mM) és magas (10 mM) cink ion koncentrációjú, savas és neutrális kémhatású környezetben egyaránt (4./A és E ábra). Neutrális kémhatás esetén a *CpZRT101* mutatta a legmagasabb expressziót alacsony cink tartalmú közegben. Kémhatástól függetlenül a gén kifejeződése fokozatosan csökkent a cink koncentrációjának növelésével (4/B–D ábra). A *CpZRT21* jóval alacsonyabb szinten íródott át, és magasabb expressziót mutat semleges pH érték mellett, mint savas közegben. A *CpZRT22* legmagasabb transzkripcióját alacsony cink koncentráció és savas környezetben mértük, míg paralógja, a *CpZRT23* mutatta a legmagasabb transzkripciót minden gén közül közepes mennyiségű cink jelenlétében és semleges kémhatású közegben, ugyanakkor a gén transzkripciója jelentősen lecsökkentett savas kémhatású környezetben. Megvizsgáltuk a *CpZRC1* és a *CpZRT3* gének transzkripcióját is, amely gének termékei sorrendben a vakuoláris cink importért, illetve exportért felelősek.

Semleges kémhatású közegben a *CpZRC1* transzkripciója mérsékelten emelkedett a megnövekedett cink hatására. A *CpZRT3*, amely más fajokban vakuoláris cink exportban játszik szerepet, nem mutatott jelentős eltérést, kivéve alacsony cink koncentrációjú és savas tápközegben, amelyben indukálódott.



4. ábra. A *C. parapsilosis* potenciális cink transzportereinek génexpressziós változásai semleges (pH 7,5) és savas (pH 4) kémhatású körülmények között. A *C. parapsilosis* CLIB 214 sejteket YPD-ben növesztettük, majd semleges vagy savas kémhatású, alacsony (0,05 mM), közepes (1 mM) vagy magas (10 mM) koncentrációjú cink ionnal kiegészített folyékony LZM-be oltottuk át és 24 óráig növesztettük. **(A, E)** *C. parapsilosis* CLIB 214 kontroll sejtek növekedési kinetikája különböző cink koncentrációjú LZM tápoldatokban. **(B–D, F–G)** Génexpressziós változások a prediktált cink transzporter génekben. Az adatokat három párhuzamos kísérletből nyertük és a *CpTUB4* YPD tápközegben meghatározott expresszióját használtuk kontrollként a $\Delta\Delta Ct$ elemzés során. A szignifikancia mértékét Mann-Whitney test szerint állapítottuk meg, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

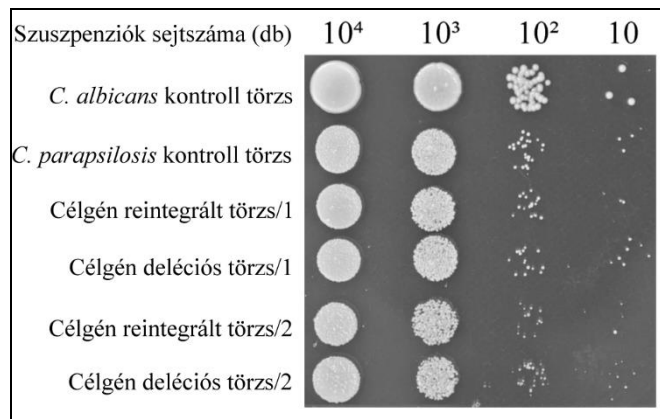
VI.3. Géndelégiós és génreintegrált törzsek létrehozása és jellemzésük

Annak érdekében, hogy feltérképezzük az azonosított potenciális cink transzporterek szerepét a *C. parapsilosis* cink homeosztázisában, homozigóta géndelégiós (KO, Knock Out) törzseket hoztunk létre. A hat különböző génszakasz delégióját Holland és mtsai. által kifejlesztett kettős auxotrófia komplementáción alapuló rendszerrel hajtottuk végre (Holland

és mtsai., 2014). Szülői törzsként *C. parapsilosis* CLIB 214 hisztidin és leucin szintéziséért felelős gén hiányos törzset használtuk, kísérleteink során kontroll törzsként a *C. parapsilosis* CLIB 214 *HIS1/LEU2* reintegrált törzset alkalmaztuk. Valamennyi génre nézve két-két egymástól független KO mutánst hoztunk létre.

Mivel növekedési változást csak a *CpZRT21* és *CpZRC1* gén deléciója esetén tapasztaltunk, ezen gének vizsgálatával foglalkoztunk részletesebben a későbbiekben. A *CpZRT21* és *CpZRC1* deléciós törzsek esetében génreintegrált törzseket is létrehoztunk. A génreintegráció érdekében a *CpZRT21* és a *CpZRC1* ORF-eket a *CpNEUT5L* semleges lókuszbba építettük egy kópiában a GatewayTM klónozási módszerrel, amelyet Németh és munkatársai adaptáltak *C. parapsilosis*-ra (Németh és mtsai., 2020). A beépíteni kívánt gént először az úgynevezett “donor” vektorba juttattuk BP klónozási technikával, a rekombináció a donor vektorban található *attP* (P1 és P2) és az inszerten található *attB* régiók (B1 és B2) között ment végbe. Ezt követte az LR klonálási lépés, amely rekombinációs folyamat az “entry” vektorban található (a BP klónozás során létrejött) *attL* (L1 és L2) szekvenciák és a “destination” vektor *attR* (R1 és R2) régiói között történt. Az így létrehozott expressziós vektort kémiai úton transzformáltuk az adott géndeléciós *C. parapsilosis* törzsekbe, szelekciós markerként az expressziós vektorban található nourseothricin rezisztencia markert használtuk. A *CpZRC1* gén GatewayTM klónozási módszerrel történő rekonstruálása nem komplementálta a *CpZRC1* gén elvesztését, ezért a gén funkcionális helyreállításának érdekében az erősebben kifejeződő *CaTDH3* promóter szabályozása alatt álló *CpZRC1* gént a Δ/Δ *CpZRC1* mutáns törzsbe kémiai transzformációval bejuttattuk Németh és munkatársai által leírtak szerint (Németh és mtsai., 2020).

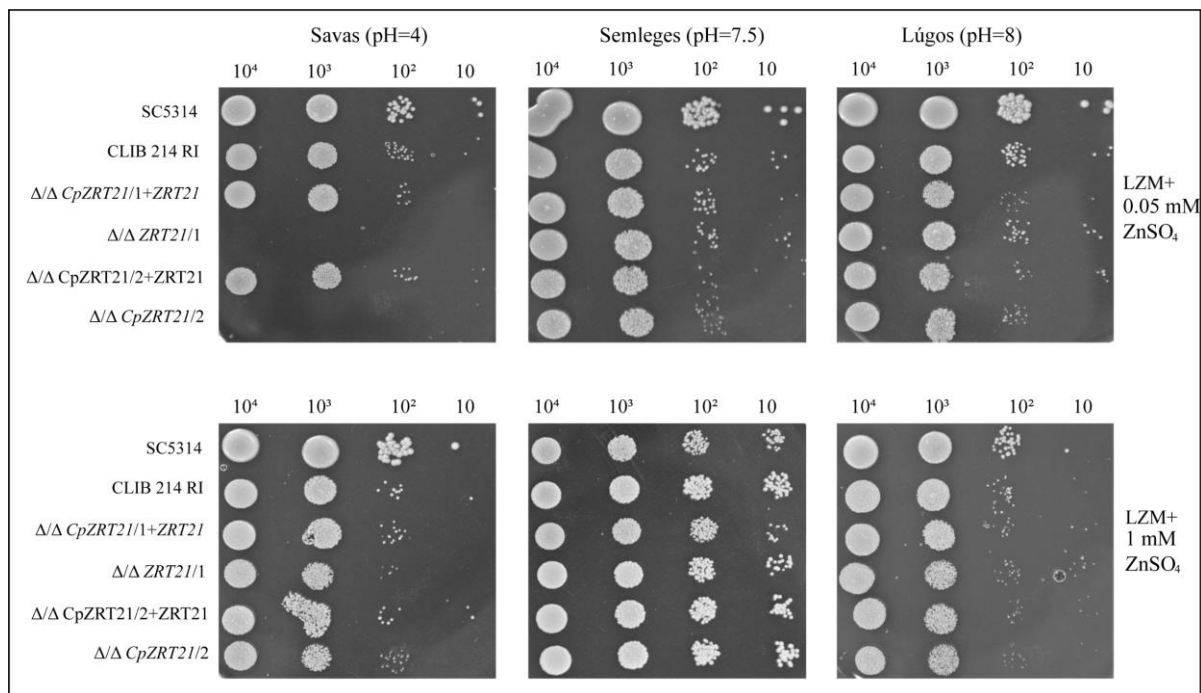
A létrehozott törzsek életképességét különböző hőmérsékleten, változatos stressz körülmények között (pl: különböző sejtfal és membránstresszorok, savas és lúgos kémhatás, valamint könnyű és nehéz fémek jelenlétében) vizsgáltuk. A mintafelvételi sorrendet a 5. ábra reprezentálja.



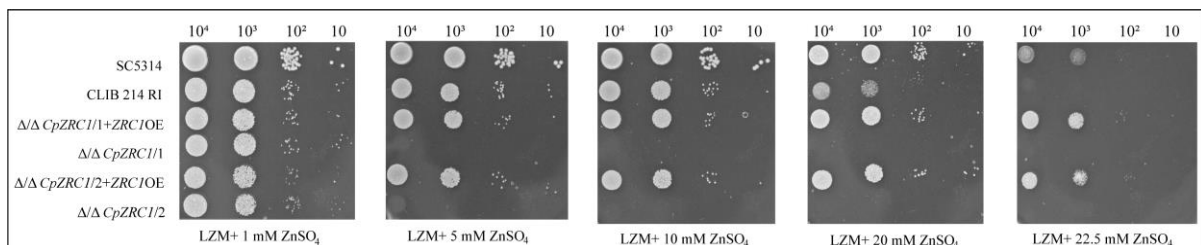
5. ábra. A potenciális cinktranszporter deléció törzsek szilárd táptalajon végzett fenotípusos jellemzése során használt mintafelvétel sorrendje.

Általában sem a stresszorok jelenléte, sem a különböző tenyésztési hőmérséklet nem eredményezett a kontrolltól eltérő fenotípust, kivételt a *CpZRT21* és *CpZRC1* gének deléciója jelentett. Szignifikáns növekedés-csökkenést figyeltünk meg a *CpZRT21* deléció mutánsokban alacsony cink ion koncentrációjú és savas kémhatású környezetben, valamint a *CpZRC1* deléciója során magas cink ion koncentrációjú környezetben. Mivel ellentétben *CpZRT21* gén reintegrációjával a *CpZRC1* delécióját az eredeti gén és promóterének reintegrálása nem komplementálta, ezért egy hatékonyabb, a *CaTDH3* promóter szabályozása alá helyezett *CpZRC1* konstrukciót alkalmaztunk szintén a *CpNEUT5L* régióban.

Eredményeink alapján megállapítottuk, hogy kizárólag a *CpZRT21* deléciója csökkentette a *C. parapsilosis* növekedését alacsony cinktartalmú, savas kémhatás táptalajon (6. ábra). Megvizsgáltuk mind a *C. parapsilosis*, mind a *C. albicans* cink ionokkal szembeni toleranciáját LYM agar lemezekon tenyésztve. A vad típusú *C. parapsilosis* és *C. albicans* sejtek növekedése megegyezett 10 mM cink ion jelenlétében, azonban 20 mM cink koncentráció esetén a *C. parapsilosis* életképessége csökkenést mutatott, míg a *C. albicans* képes volt tolerálni ezt a magasabb cink ion koncentrációt is jelentősebb fitness csökkenés nélkül (7. ábra). A *C. parapsilosis* cink ion toleranciájának határa 22,5 mM-nak mutatkozott, ezt a cink mennyiséget a sejtek már nem tolerálták, ugyanakkor a *C. albicans* sejtek, bár növekedési ütemük csökkent, de életképesek maradtak. Megállapíthatjuk továbbá, hogy a *CpZRC1* deléciója nem volt hatással a *C. parapsilosis* kolóniaképző képességére 1 mM cinket tartalmazó LYM szilárd táptalajokon, azonban 5 mM és annál nagyobb cink koncentráció teljes növekedésgátlást okozott a Δ/Δ *CpZRC1* mutáns esetében.



6. ábra. A *C. parapsilosis* $\Delta\Delta$ CpZRT21 és reintegrált mutánsok fenotípusos jellemzése különböző pH értékű, limitált mennyiségű cink ion tartalmú környezetben. A jellemzést savas (pH 4), semleges (pH 7,5) és lúgos (pH 8) kémhatású, valamint különböző mennyiségű cink-szulfáttal kiegészített szilárd táptalajokon végeztük három biológiai párhuzamosban.



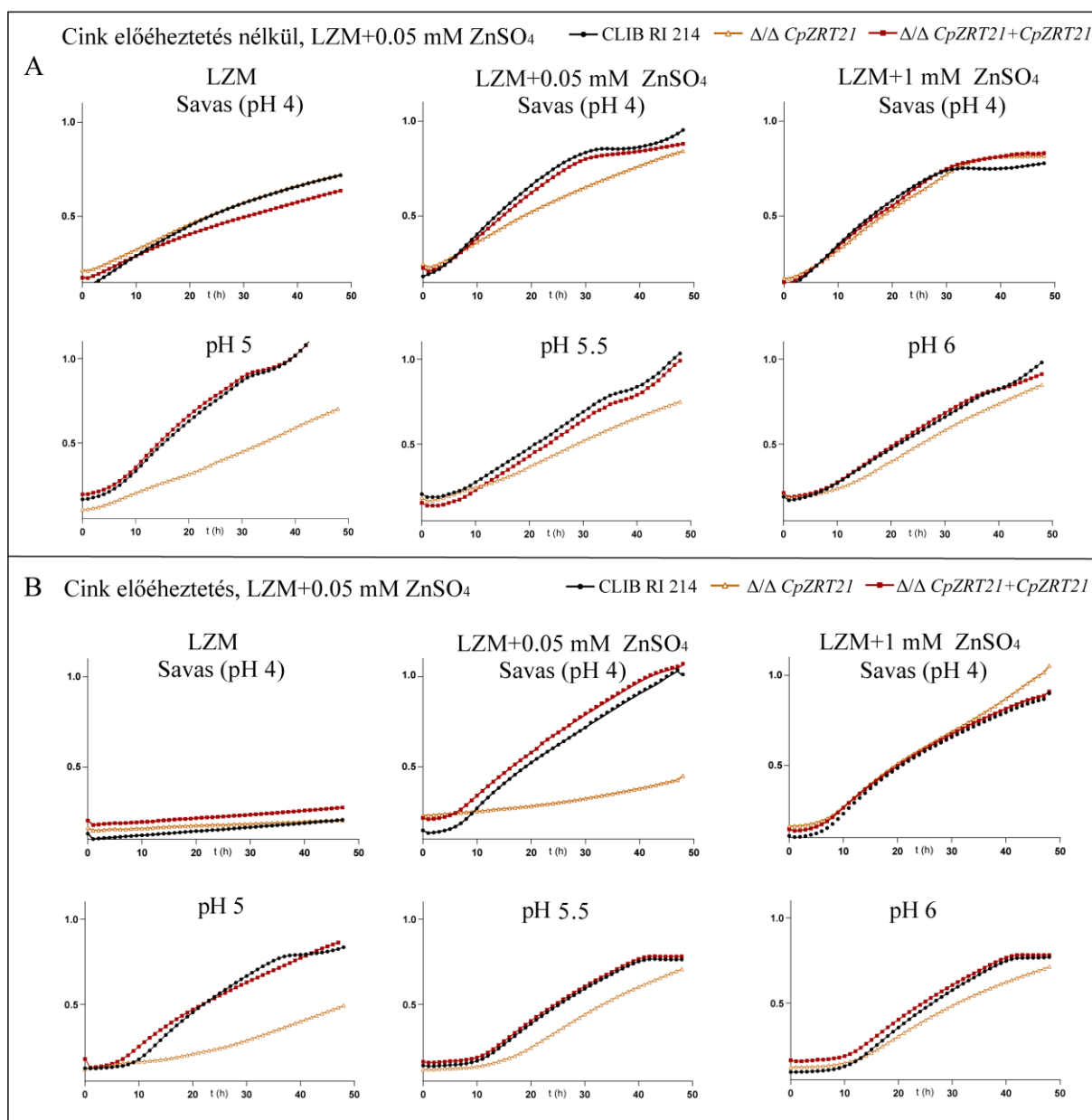
7. ábra A *CpZRC1* mutáns törzsek növekedése magas cink mennyiség jelenlétében, semleges pH értékű szilárd tápközegen. A szilárd táptalajon végzett fenotípusos vizsgálatok és a *CpZRC1* törzsek növekedési változásainak reprezentatív képei. A fenotípusos vizsgálatokat három biológiai párhuzamosban végeztük.

VI.4. A $\Delta/\Delta\text{CpZRT21}$ mutánsok cink koncentráció és pH függő növekedése

A *C. parapsilosis* cink importereinek *in silico* elemzése alapján (3. ábra) ennek a fajnak a legszembetűnőbb jellemzője a *ZRT2* gén expansiója volt. Ez a transzporter kritikus szereppel bír a *C. albicans* növekedésében és a cink savas környezetben történő felvételében. Emiatt munkák további részében funkcionálisan jellemeztük a *C. parapsilosis* *CaZRT2* transzporter ortológját (melyet *CpZRT21*-nek neveztünk el), valamint paralógjait – a *CpZRT22*-t és a *CpZRT23*-at. Minden génre két-két deléciós törzset ($\Delta/\Delta\text{CpZRT21}$, $\Delta/\Delta\text{CpZRT22}$ és $\Delta/\Delta\text{CpZRT23}$), valamint egy kettős deléciós mutánst ($\Delta/\Delta\text{CpZRT22}-\Delta/\Delta\text{CpZRT23}$) hoztunk létre, majd megvizsgáltuk ezek növekedését savas, semleges és lúgos környezetben különböző cink-szulfát mennyiség jelenlétében.

Folyékony tápközegben a kontroll törzs, a $\Delta/\Delta\text{CpZRT21}$ és a komplementált *CpZRT21* deléciós mutáns alacsony mértékű növekedést mutatott cink ion hiányos LZM-ben, de a növekedésük fokozódott cink-szulfát hozzáadásával. Szembetűnő, hogy a $\Delta/\Delta\text{CpZRT21}$ mutáns csupán mérsékelt növekedést mutatott a vad típushoz képest a 0,05 mM cink-szulfátos LZM tápközegben (8/A ábra). Kísérleteinket kiterjesztettük azzal, hogy először előtenyészítettük a sejteket korlátozott cink ion mennyiség mellett annak érdekében, hogy kimerítsük az élesztő sejtek intracelluláris cink tartalékait a növekedési vizsgálatok előtt. A 8/B ábrán látható, hogy cink előéheztetés során egyik törzs sem tudott növekedni a cink nélküli LZM tápközegben. A normál és a cink előéheztett sejtek növekedésének összehasonlítása nem kiegészített LZM-ben arra utal, hogy a *C. parapsilosis* intracelluláris cink ion raktárakat használ. Abban az esetben, amikor a törzsek növekedését cink előéheztetés mellett, savas környezetben, 0,05 mM cink-szulfát jelenlétében vizsgáltuk, megfigyeltük, hogy a $\Delta/\Delta\text{CpZRT21}$ mutáns súlyos növekedési defektust mutat a vad típusú és génreintegrált törzshöz képest. Elmondható tehát, hogy a *C. albicans* *Zrt2*-höz hasonlóan a *CpZrt21* is létfontosságú szerepet játszik a cink felvételében savas közegben, alacsony cink ion koncentráció esetén (8/A ábra), míg a transzporter nélkülözhető a semleges-lúgos kémhatás melletti növekedéshez (6. ábra). A továbbiakban vizsgáltuk a *CpZrt21* szerepét pH 5,0 /5,5 /6,0 értékeken alacsony cink ion koncentráció esetén cink előéheztetéssel vagy anélkül. A $\Delta/\Delta\text{CpZRT21}$ növekedése erősen lecsökkent pH 5,0 mellett, mérsékeltebb növekedési defektust mutatott 5,5 pH-n, ugyanakkor a vad-típusúhoz hasonló volt pH 6,0 kémhatású tápoldatban (8/A és B ábra). Megfigyelésünk szerint a cink előéheztetés is hasonló lefutású növekedési görbéket eredményezett. Ezek az adatok azt mutatják, hogy a pH a savastól a neutrális szint felé történő emelésével a *Zrt21* cink transzporter egyre kevésbé szükséges *C.*

parapsilosis-ban. A Δ/Δ CpZRT22 és a Δ/Δ CpZRT23, illetve a Δ/Δ CpZRT22-CpZRT23 törzsek egyik esetben sem mutattak növekedési eltérést a kontroll törzshöz képest. A növekedési kinetikáik összefoglalása a Függelék 1. ábráján látható.



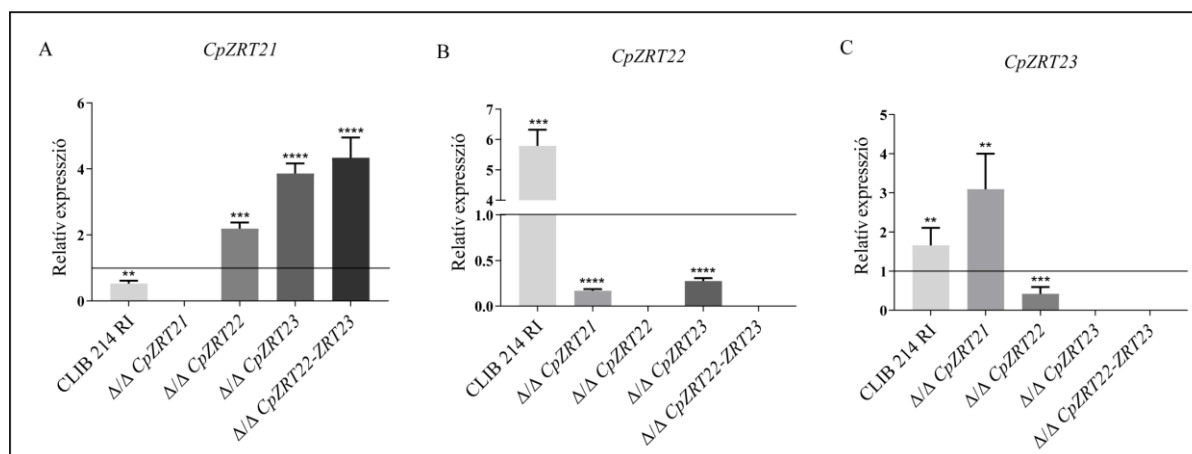
8. ábra. A *C. parapsilosis* Δ/Δ CpZRT21 mutáns fenotípusos jellemzése különböző kémhatású, limitált mennyiségű cink iont tartalmazó környezetben. (A) Az ábrák a jelzett törzsek növekedési kinetikáját mutatják savas (pH 4, pH 5, pH 5,5, pH 6) LDM tápoldatban, amelyet 0,05 mM cinkkel egészítettünk ki cink előéheztetés nélkül. (B) A cink előéheztetéshez a törzseket folyékony YPD tápoldatban előtenyésztettük, majd 24 órára folyékony LDM táptalajba oltottuk. Ezt követően a sejteket 1 mM EDTA-val mostuk a növekedési teszt előtt, majd vizsgáltuk a törzsek növekedését 0,05 mM cink-szulfáttal kiegészített, savas (pH 4, pH 5, pH 5,5, pH 6) LDM tápoldatban. A növekedési görbék három

biológiai, valamint három technikai párhuzamosban elvégzett kísérletek eredményeit mutatják.

VI.5. A *CpZRT2* gén expresszió kompenzációja

A *C. parapsilosis* cinkfelvételi repertoárjának összetettsége és a *CpZRT21* savas környezetben való esszenciális szerepéből kifolyólag megvizsgáltuk a *CpZRT21*, *CpZRT22* és *CpZRT23* gén deléciójának hatását ezen gén expressziójára. Ehhez az elemzéshez 0,05 mM cinkkel kiegészített folyékony LYM tápoldatot (pH 4) választottunk. A sejteket YPD komplett tápoldatban neveltük elő, mivel ez az állapot tette lehetővé az összes törzs növekedését és amelyből a *Zrt21*-függő cinkfelvétel meglétére következtettünk (lásd 6. és 8. ábra).

A *CpZRT22* és *CpZRT23* gén külön-külön és együttes deléciója is a *CpZRT21* expressziójának növekedését eredményezte (9/A ábra). Ezenkívül a *CpZRT21* hiányában csökkent *CpZRT22*, de megemelkedett *CpZRT23* expressziót állapítottunk meg. Végül a *CpZRT22* és *CpZRT23* expressziója csökkent mind a Δ/Δ *CpZRT23*, mind a Δ/Δ *CpZRT22* mutánsokban (9/B és C ábra). Ezek az adatok a *C. parapsilosis*-ban a cink import gén közötti szorosan kapcsolt és komplex szabályozási kölcsönhatásra utalnak.

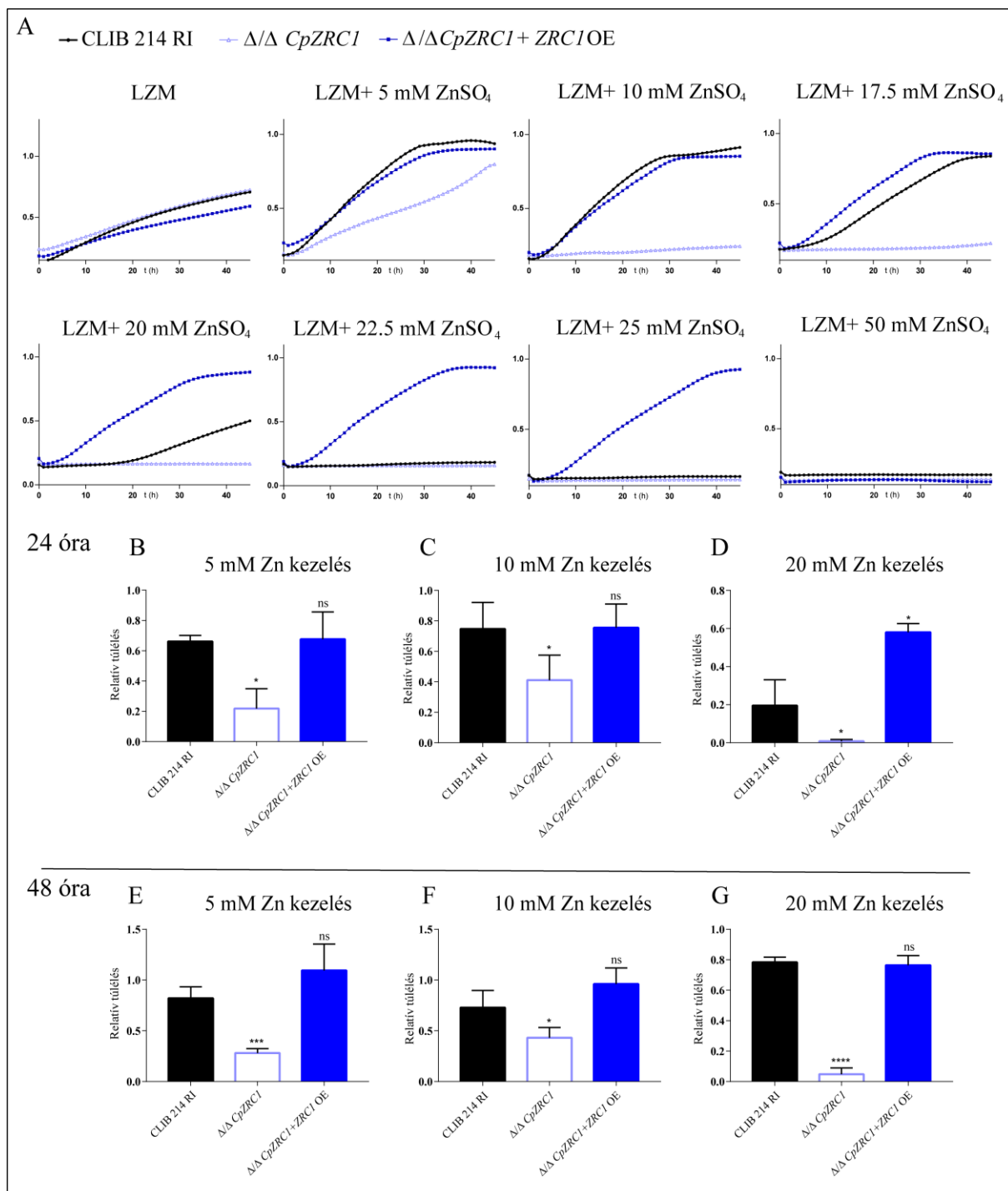


9. ábra. A *CpZRT2* gén transzkripciója savas kémhatású és alacsony cink koncentrációjú közegben. (A–C) A vizsgált gén (*CpZRT21*, *CpZRT22* és *CpZRT23*) relatív transzkripciója, a *CpTUB4* háztartás gén savas és alacsony cinktartalmú környezetben mért transzkripciójára normalizálva (Δ/Δ analízis szerint). Az adatok három párhuzamos kísérlet átlagát mutatják. A statisztikai elemzéshez Mann–Whitney tesztet használtunk, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

VI.6. CpZrc1 esszenciális magas cink ion koncentrációjú környezetben

A *C. parapsilosis* CpZRC1 génjének ortológja pékélesztőben vakuoláris cink transzporterként funkcionál, amíg a *C. albicans* ZRC1 a vakuoláris cink raktárak, ún. cinkoszómák kialakulásáért felelős. Mind a pékélesztő mind a *C. albicans* esetében a Zrc1 jelenléte esszenciálisnak bizonyult magas cink ion tartalmú környezetben. Szilárd táptalajon végzett fenotípusos jellemzésünk alapján a CpZRC1 deléciója növekedési defektus eredményezett a *C. parapsilosis* esetében is (7. ábra). A továbbiakban megvizsgáltuk a Δ/Δ CpZRC1 törzsek életképességét magas cink ion tartalmú folyadék tápoldatban.

Hasonló eredményeket figyeltünk meg a Δ/Δ CpZRC1 törzs növekedését tekintve folyékony tápközegben, mint szilárd táptalajon: a vad típusú *C. parapsilosis* 17,5 mM cink-szulfát koncentrációt tolerált folyékony LZM tápközegben, az 5 mM cink-szulfát koncentráció jelentős növekedésgátlást okozott, valamint a növekedés 20 mM és afeletti koncentrációnál elhanyagolható volt (10/A ábra). A kisebb mértékű osztódási képesség mellett a Δ/Δ CpZRC1 sejtek életképessége is csökkent, amelyet a 24 és 48 órán keresztüli, 5 mM, 10 mM és 20 mM koncentrációjú cink-szulfát kezelés után YPD lemezen megjelent szignifikánsan alacsonyabb telepszámuk tükröz (10/B–G ábra). A *CaTDH3* promóter szabályozása alá helyezett Δ/Δ CpZRC1+ZRC1OE törzs növekedése és túlélése egyaránt meghaladta a vad típusú törzsét mind szilárd lemezeken, mind nagyobb koncentrációjú cinkkel (20 mM; 22,5 mM; 25 mM ZnSO₄-al) kiegészített folyékony tápközegben (10. ábra).

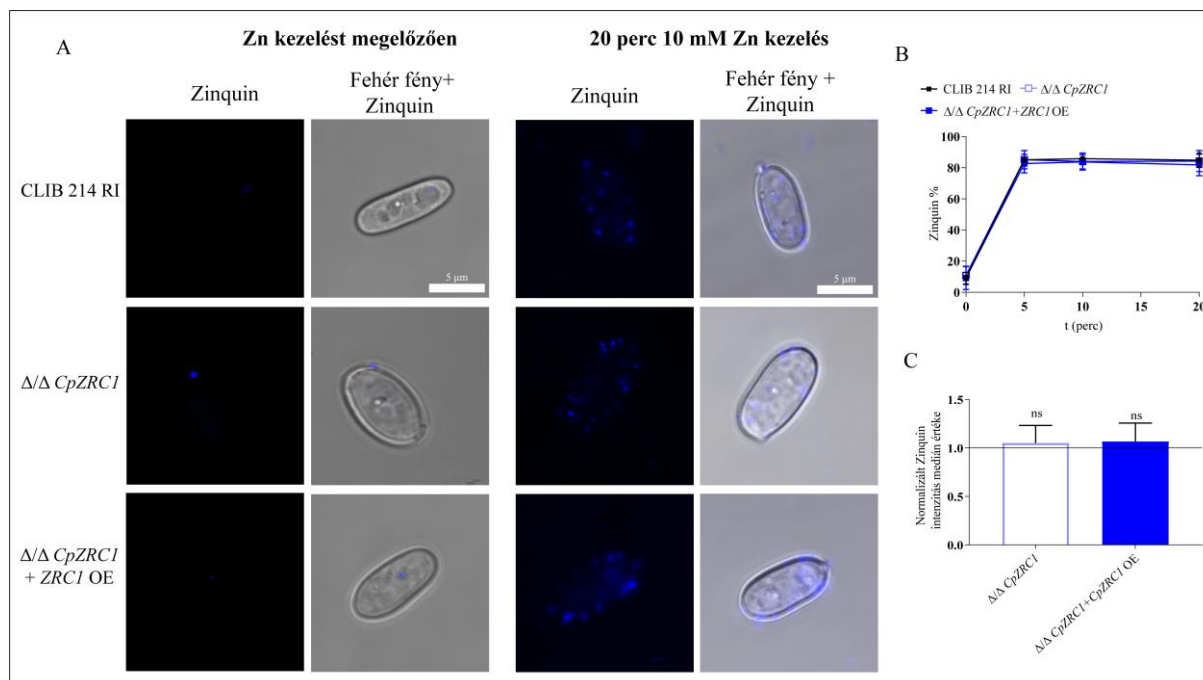


10. ábra. A *CpZRC1* gén hiányának vizsgálata magas cink-szulfát tartalmú folyadék környezetben (A) A Δ/Δ *CpZRC1* törzsek növekedési kinetikája különböző cink-szulfát koncentrációjú folyékony LZW tápközegben. (B–G) A cink túlélési tesztek eredményei. 5, 10 és 20 mM cink-szulfáttal történő kezelést követően 24 és 48 órás időpontokban 500 sejtet szélesztettünk YPD táptalajra, majd a telepek száma alapján következtettünk az életképes sejtek számára. A növekedési tesztek, illetve a cink ion kezelés túlélési tesztek három biológiai, valamint három technikai párhuzamosban végeztük el. A statisztikai elemzéshez nem párosított t-próbákat használtunk, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

VI.7. *C. parapsilosis* cinkoszóma formációjának vizsgálata

A fenotípusos vizsgálatok eredményei arra utaltak, hogy a *CpZRC1* nélkülözhetetlen a *C. parapsilosis* cink detoxifikáló mechanizmusaiban (7. ábra). A szakirodalom szerint a *S. cerevisiae* Zrc1 egy vakuoláris cink importer, azonban a *C. albicans* Zrc1 a cinkoszóma (intracelluláris cinkraktár) képződéséért felelős (Simm és mtsai., 2007, Crawford és mtsai., 2018). Emiatt célul tűztük ki funkcionálisan is jellemezni a *CpZrc1* transzportert.

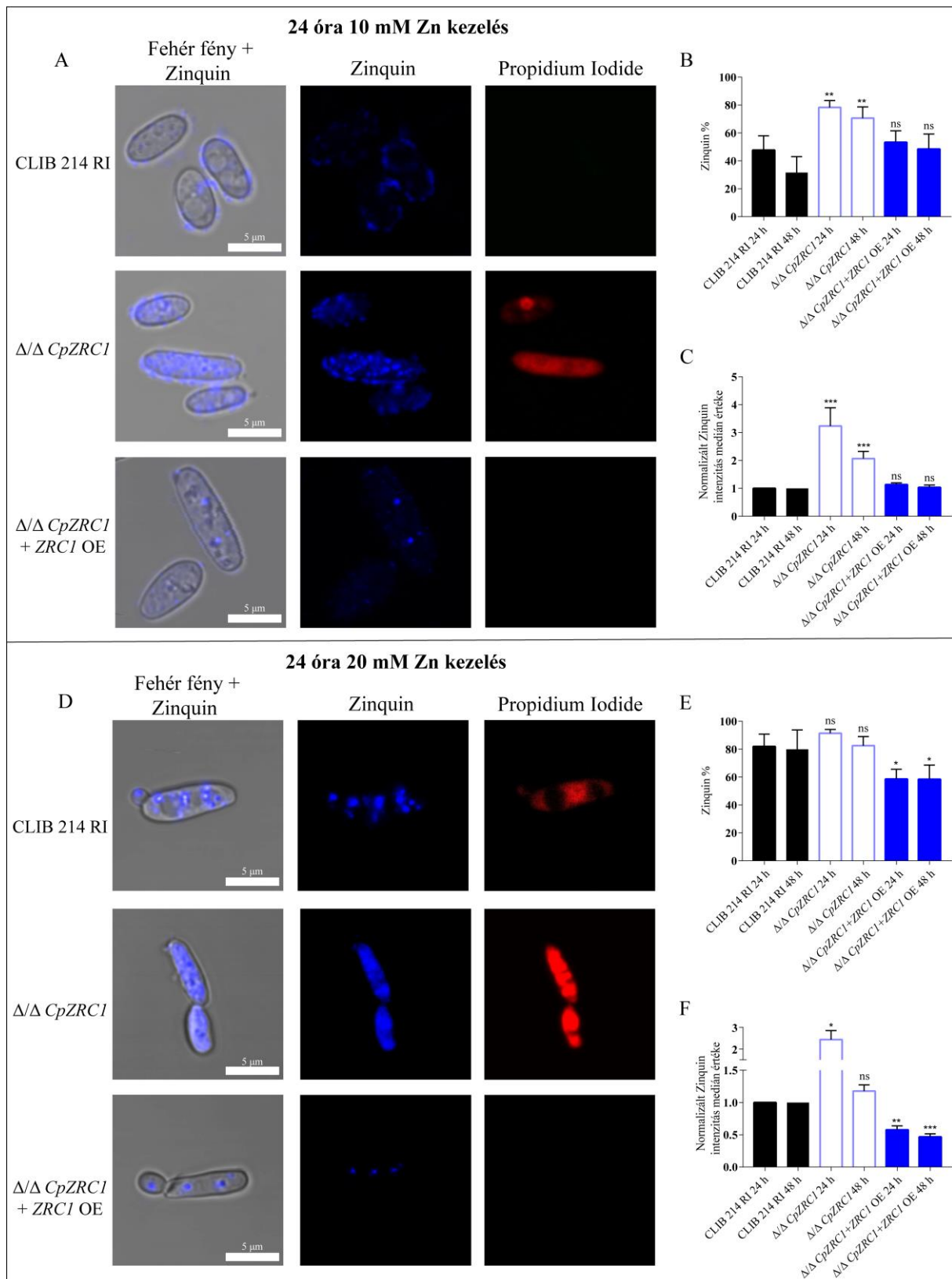
Kísérleteink során Zinquin-t, a cinkoszóma cink festésére szolgáló festéket használtuk. A *C. parapsilosis* törzseket 10 mM koncentrációjú cink-szulfáttal kezeltük 5, 10 és 20 percig. A cinkkel történő kezelést követően a Zinquin jel intracelluláris lokalizációját konfokális mikroszkóppal határoztuk meg (11/A ábra). Ezenkívül a Zinquin-pozitív populáció százalékos arányát (11/B ábra), valamint a Zinquin jel intenzitás medián értékét (11/C ábra) képalkotó áramlási citométerrel határoztuk meg. Eredményeink alapján megállapíthatjuk, hogy a vad típusú *C. parapsilosis*, a Δ/Δ *CpZRC1* és a Δ/Δ *CpZRC1* + *ZRC1OE* törzsek 10 mM cink-szulfát kezelést követően 5-20 perc elteltével egyenlő mértékben voltak képesek cinkoszómák kialakítására.



11. ábra. A *C. parapsilosis* cinkoszóma kialakításának jellemzése. A törzseket folyékony YPD tápközegben tenyésztettük, majd nagy mennyiségű (10 mM) cinkkel kiegészített LZM folyékony táptalajba oltottuk. Zinquin fluoreszcens festéket használtunk az intracelluláris cinkoszómák megjelenítésére. (A)) A Zinquin-pozitív sejtek százalékos aránya 5, 10, 15 és

20 perccel a 10 mM-os cink-szulfátkezelés után. **(B (C))** A képek a cinkoszómák lokalizációját mutatják 20 perces 10 mM cink-szulfátkezelést követően. Az ábra a Zinquin intenzitás medián értékét mutatja az élesztő sejtekben 20 perc 10 mM cink-szulfátkezelést követően. A kísérleteket három párhuzamosban végeztük, a B és C ábrák képalkotó áramlási citométerrel mért eredményeket mutatják. A statisztikai elemzéshez nem párosított t-próbákat használtunk, $p < 0,05$.

Megvizsgáltuk a hosszan tartó, magas mennyiségű cink ion kezelés cinkoszóma képződésére kifejtett hatását is. A sejteket 10 vagy 20 mM cink-szulfáttal kezeltük 24 órán keresztül, majd Zinquinrel, valamint propidium-jodiddal festettük a sejteket, utóbbit az életképességük felmérése érdekében (12/A, és D ábra). Érdekes módon a $\Delta/\Delta CpZRC1$ törzs intenzívebb Zinquin festődést mutatott, mint a kontroll reintegrált törzs sejtjei. Ez ellentétben áll a *C. albicans* $\Delta/\Delta ZRC1$ sejteknél tapasztaltakkal, amelyek ugyanis csökkent Zinquin festődést, vagyis kisebb mértékű cinkoszóma képződést mutatnak (Crawford és mtsai., 2018). A *CpZRC1* hiányában a 24 és 48 órán át alkalmazott 10 mM-os cinkimpulzus növelte a Zinquin-pozitív populációt és a Zinquin jel intenzitását, de csökkentette az életképességet is (12/A–C, E, F ábra). Korábbi megfigyeléseinkkel összhangban a 20 mM cinkimpulzus toxikusnak bizonyult a kontroll sejtekre, míg a $\Delta/\Delta CpZRC1 + ZRC1OE$ törzs képes volt túlélni ezt a koncentrációt (12/D ábra). Továbbá, a vad típusú és $\Delta/\Delta CpZRC1$ mutáns törzsben a Zinquin-pozitív populáció megnövekedett 20 mM cink-szulfáton a 10 mM-os környezethez képest, és úgy tűnt, hogy a cinkoszómák kiszivárogtak, ami homogén Zinquin jeleket eredményezett (12/D, E ábra). A reintegrált $\Delta/\Delta CpZRC1 + ZRC1OE$ törzs csak 10 mM cink kezelés esetén mutatott a kontrollhoz hasonló fenotípust, 20 mM-nál ugyanis lecsökkent a Zinquin-pozitív populáció mennyisége.



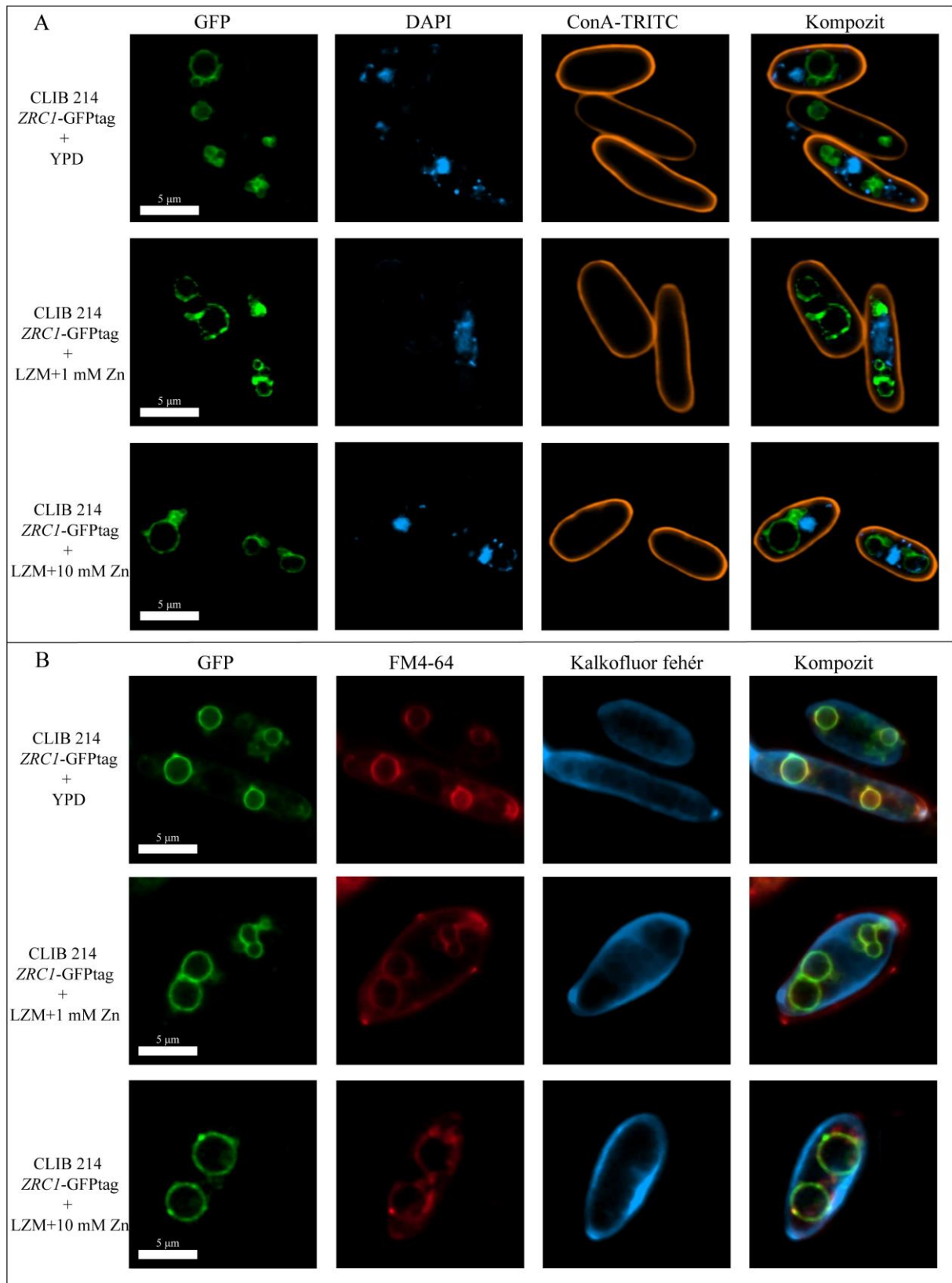
12. ábra. A *C. parapsilosis* cinkoszóma képződésének vizsgálata toxikus mennyiségű cink jelenlétében. A törzseket folyékony YPD tápközegben tenyésztettük, majd 10 vagy 20 mM cinkkel kiegészített LZM folyékony tápoldatba oltottuk. A cinkoszómák megjelenítése

érdekében Zinquin fluoreszcens festéket, a sejtek életképességének meghatározásához propidium-jodidot használtunk. (A, D) Reprezentatív képek a *CpZRC1* törzsekről 10 mM vagy 20 mM koncentrációjú cink ion kezelés, valamint az ezt követő Zinquin és propidium-jodid festés után. (B, E) A Zinquin-pozitív populáció százalékos aránya toxikus cink kezelést követően a *CpZRC1* törzsek esetében (C, F) A toxikus cink ion kezelést követő Zinquin fluoreszcens festés medián értékei. B, C, E, F diagrammok képkalkotó áramlási citométer által mért eredményeket mutatják be. A statisztikai elemzéshez nem párosított t-próbákat használtunk, *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001.

VI.8. A *CpZrc1* intracelluláris lokalizációja

A *CpZrc1* lokalizációjának megjelenítéséhez a *CpZrc1* fehérje C-terminálisát zöld fluoreszcens fehérjével, GFP-vel fúzionáltattuk. A létrehozott törzset 1 mM (közepes) vagy 10 mM (magas) koncentrációjú cinkkel kiegészített YPD vagy LZM folyékony tápközegbe oltottuk és 24 órán át növesztettük. Inkubálás után ConcanavalinA-TRITC-t és DAPI-t alkalmaztunk sejtfal- és sejtmagfestésként. Ezenkívül a kalkofluor fehér sejtfalfestéket (kék) és az FM4-64 vakuólumfestéket (piros) is használtuk a *CpZrc1* lokalizációjának jellemzésére.

Megállapítottuk, hogy a *CpZrc1* a sejtmagon kívül lokalizálódik, nincs jelen a sejtfalban, ehelyett az FM4-64 jellel együtt lokalizálódik a gomba sejtek vakuolumjainak membránjában. Igazoltuk továbbá, hogy a cink-kiegészítés nem befolyásolta a GFP-vel jelölt *CpZrc1* jelet egyik alkalmazott koncentrációban sem (13. ábra).



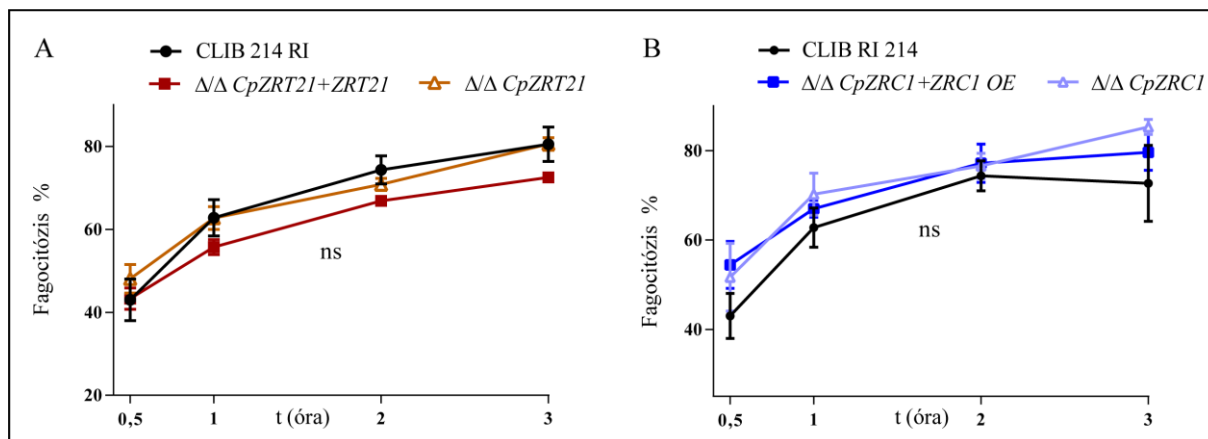
13. ábra. A CpZrc1 intracelluláris lokalizációjának vizsgálata. A CLIB 214 *ZRC1*-GFP-vel jelölt törzseket folyékony YPD tápközegben tenyésztettük, majd 1 mM vagy 10 mM cinket tartalmazó folyékony YPD vagy LZM tápoldatba oltottuk. A sejteket 24 órán át

inkubáltuk. **(A)** A sejtfalagt ezután ConcanavalinA-TRITC (narancssárga), míg a sejtmagokat DAPI (kék) fluoreszcens festékekkel festettük. **(B)** Reprezentatív képek a vakuólumok FM4-64-gyel és a sejtfal kalkofluor fehérrel történő festéséről. Az intracelluláris CpZrc1 lokalizációról reprezentatív képeket konfokális mikroszkóppal készítettünk, a kísérletet két párhuzamosban végeztük el.

VI.9. *In vitro* J774.2 egér makrofágok és a *C. parapsilosis* cink transzporter mutáns törzsek interakciójának jellemzése: fagocitózis

A makrofágok kulcsszerepet játszanak a patogén gombák elleni védekezésben, amelyek cink-éheztetéssel vagy a cink ionok magas koncentrációjával képesek eliminálni a patogéneket vagy korlátozni azok növekedését (Botella és mtsai., 2018, Riedelberger és mtsai., 2020). Ezért megvizsgáltuk a *C. parapsilosis* cink transzporter mutáns törzsek és a J774.2 egér makrofágok közötti kölcsönhatást. Először a makrofágok fagocitózis hatékonyságát vizsgáltuk 0,5, 1, 2 és 3 órával a gombafertőzést követően képalakító áramlási citometriás analízissel. Annak érdekében, hogy meghatározzuk a fagocitózis pozitív makrofág populációt a megadott időpontok után a kontroll törzset, valamint a *CpZRT21* és *CpZRC1* deléciós törzseket GFP-vel jelöltük a *CpNEUT5L* neutrális régióba integrálva, míg a génrekonstruált törzseket Alexafluor 647 szukcinimidil-észterrel (GFP jelölésük a *CpNEUT5L* régióban nem volt lehetséges, mert a génreintegrációt szintén ebben a régióban végeztük).

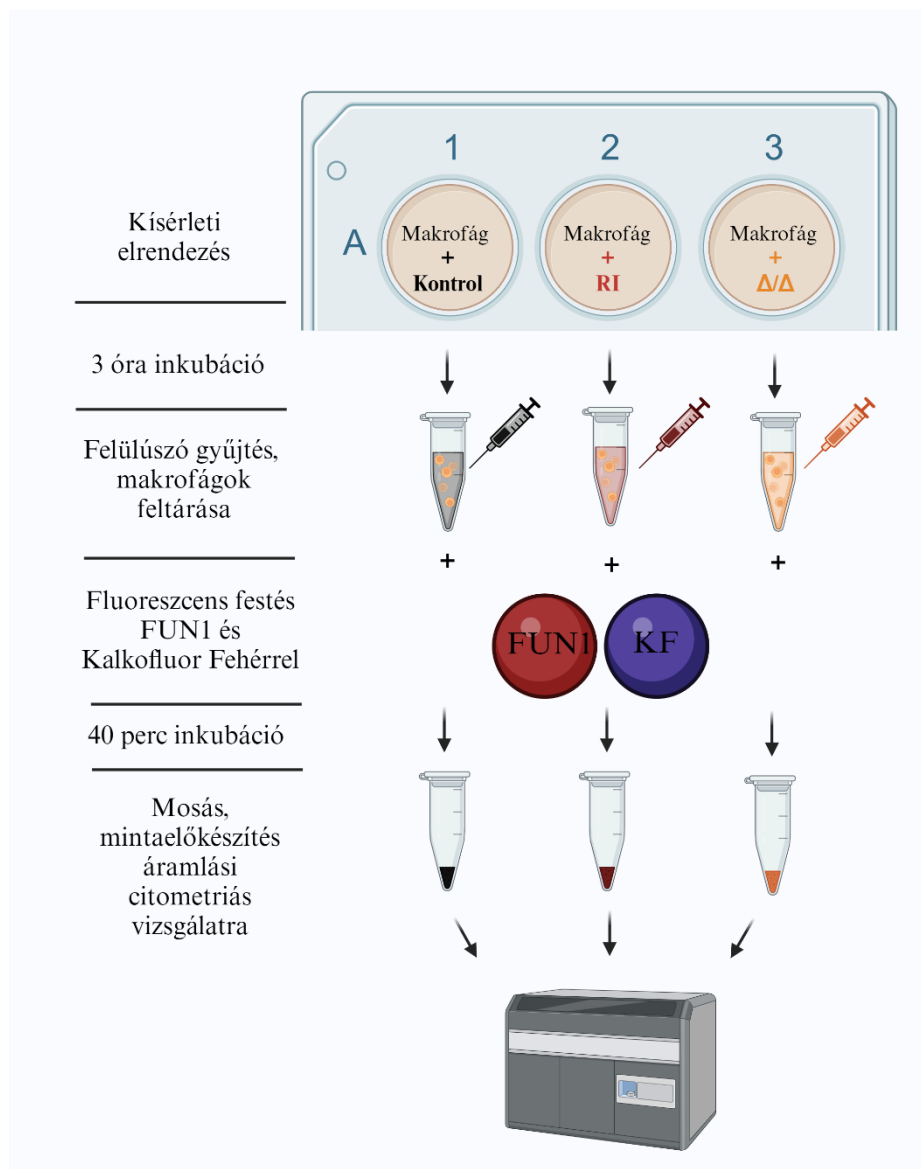
Eredményeink nem mutattak szignifikáns különbséget a *CpZRT21* és a *CpZRC1* deléciós mutánsok, valamint a vad típusú törzs makrofágok általi fagocitózisában, függetlenül a vizsgált időpontoktól (14/A és B ábra).



14. ábra. A *CpZRT21* és *CpZRC1* gének hiányának hatása J774.2 egér makrofágok fagocitózisára (A, B). A J774.2 egér makrofágokat a GFP-vel vagy AlexaFluor 647-tel jelölt *C. parapsilosis* törzsekkel együtt inkubáltuk, majd áramlási citometriával meghatároztuk a fagocitózis mértéket 0,5, 1, 2 és 3 óra elteltével. A kísérletekhez a MOI = 1:5 makrofág gomba) arányt használtuk, az adatokat a vad típusú törzs gombaeliminációs értékeire normalizáltuk. A kísérleteket legalább három párhuzamosban végeztük. A statisztikai elemzéshez nem párosított t-próbát használtunk, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

VI.10. *In vitro* J774.2 egér makrofágok és a *C. parapsilosis* cink transzporter mutáns törzsek interakciójának jellemzése: ölési hatékonyság

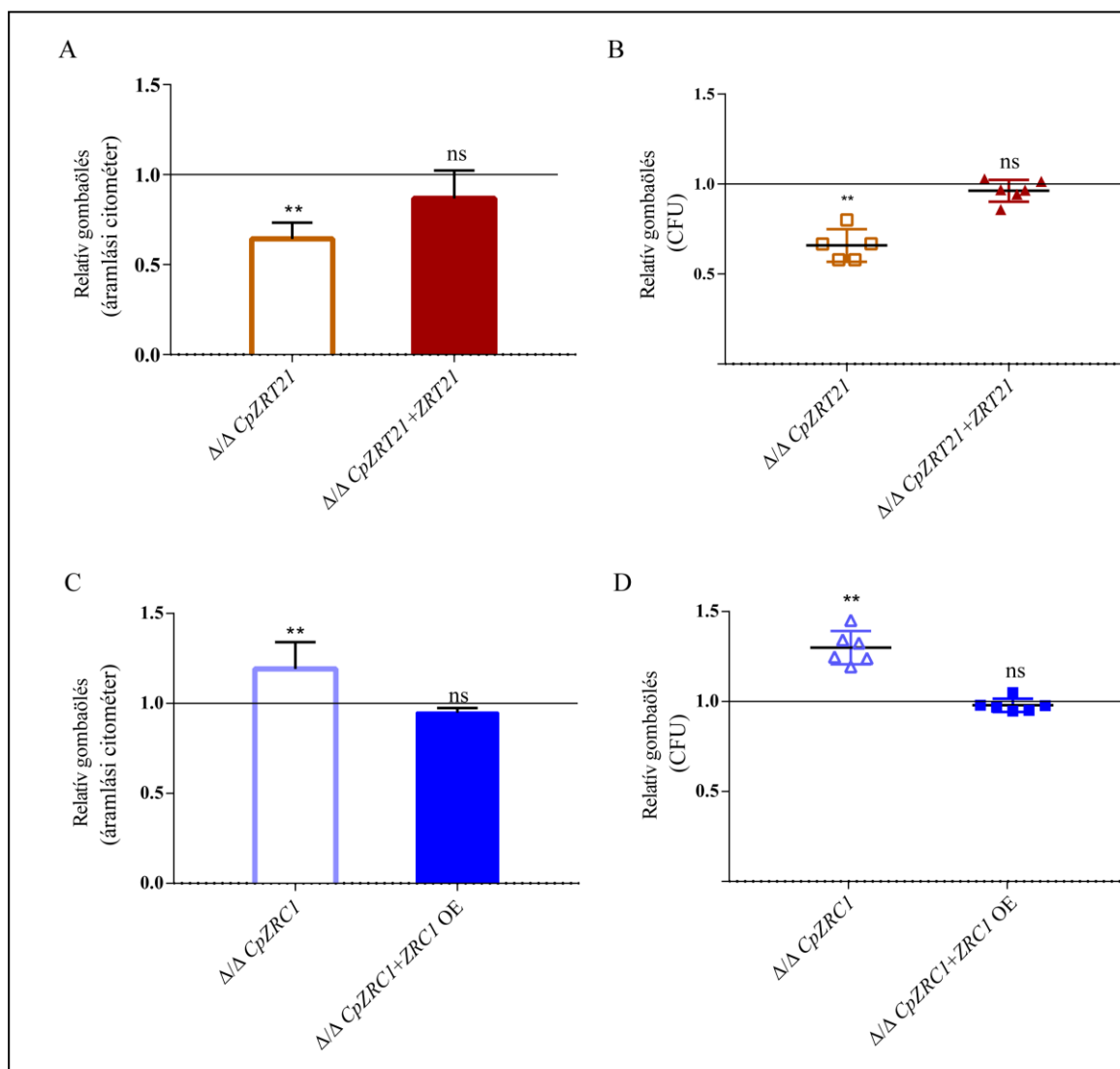
A J774.2 makrofágok gomba sejt eliminációs hatékonyságát 3 órával a fertőzés után FUN1 és kalkofluor fehér festést követően képalkotó áramlási citometriás analízissel (15. ábra), valamint az élő *Candida* sejtek CFU-számlálásával határoztuk meg.



15. ábra. A FUN1 és kalkofluor fehér festésen alapuló ölési hatékonyságot vizsgáló kísérleti elrendezés sematikus összefoglalása. Az újonnan fejlesztett és optimalizált munkafolyamat részletes leírása az Anyagok és Módszerek V. 12. pontjában található.

Mindkét ölési hatékonyságot vizsgáló módszer eredményei azt mutatták, hogy a *CpZRT21* deléciója a gombák kevésbé hatékony eliminációjához vezetett (16/A és B ábra). Ezzel szemben a *CpZRC1* hiányában a makrofágok hatékonyabban voltak képesek elpusztítani a gomba sejteket (16/C és D ábra). A génrekonstruált törzsek a vad típusúhoz hasonló fenotípust mutattak. Mivel a *Zrc1* elengedhetetlen a cink méregtelenítéséhez, ezek az adatok

arra utalnak, hogy a J774.2 makrofágok a gomba számára toxikusan magas koncentrációjú cink mennyiség alkalmazásával pusztítják a *C. parapsilosis* sejteket.

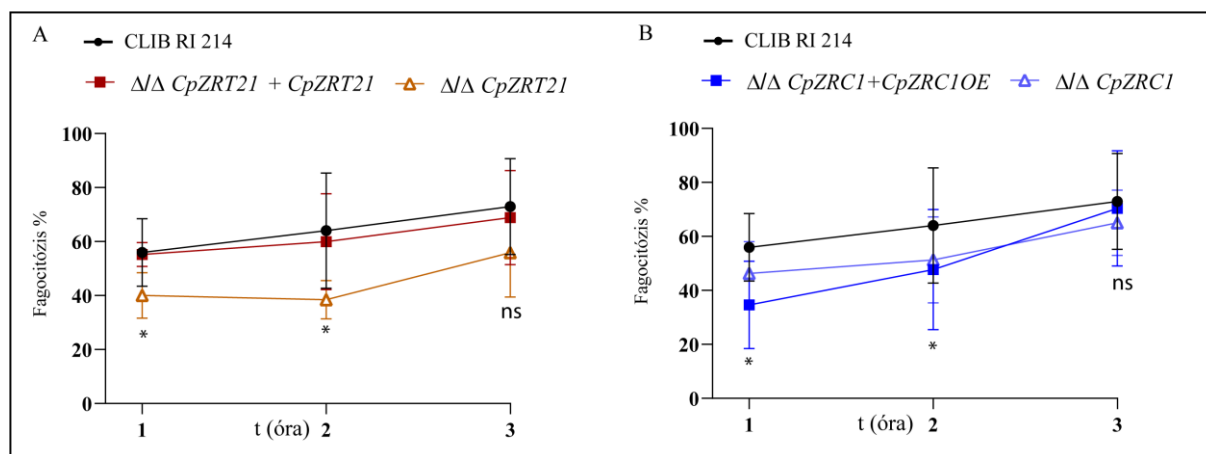


16. ábra. A *CpZRT21* és *CpZRC1* gének hiányának hatása a J774.2 makrofágok ölési hatékonyságára. (A, C) Az élesztősejtek életképességének meghatározása képalkotó áramlási citométerrel kalkofluor fehér és FUN1 fluoreszcens festést követően. (B, D) J774.2 egér makrofágok gombaölési hatékonysága élőcsíraszám meghatározásával. A J774.2 makrofágok gombaölési hatékonyságát 3 óra elteltével határoztuk meg, a fertőzés során MOI=1:5 arányt alkalmaztunk. A CFU alapú gombaeliminációs kísérletet 6, az áramlási citométerrel végzett méréseket 3 párhuzamosban végeztük. A statisztikai elemzéshez nem párosított t-próbát használtunk, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

VI.11. *In vitro* M1 típusú humán makrofágok és a *C. parapsilosis* cink transzporter mutáns törzsek interakciójának jellemzése: fagocitózis

Kísérleteink során humán eredetű buffy coat vérkészítményből izoláltunk PBMC sejteket, majd Interferon-gamma hozzáadásával 6 napig tartó M1 típusú makrofág irányú differenciálást követően használtuk fel azokat.

Eredményeink alapján megállapítható, hogy a *CpZRT21* plazmamembrán cink ion transzporter hiányában kisebb mértékű a gomba sejtek fagocitózisa (A), továbbá a *CpZrc1* vakuoláris cink importer hiánya szintén alacsonyabb mértékű gombafelvételt eredményezett az M1 típusú humán makrofágok esetében 1 és 2 óra elteltével, azonban 3 óra inkubáció után nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget a kontroll sejtek fagocitózisához képest.

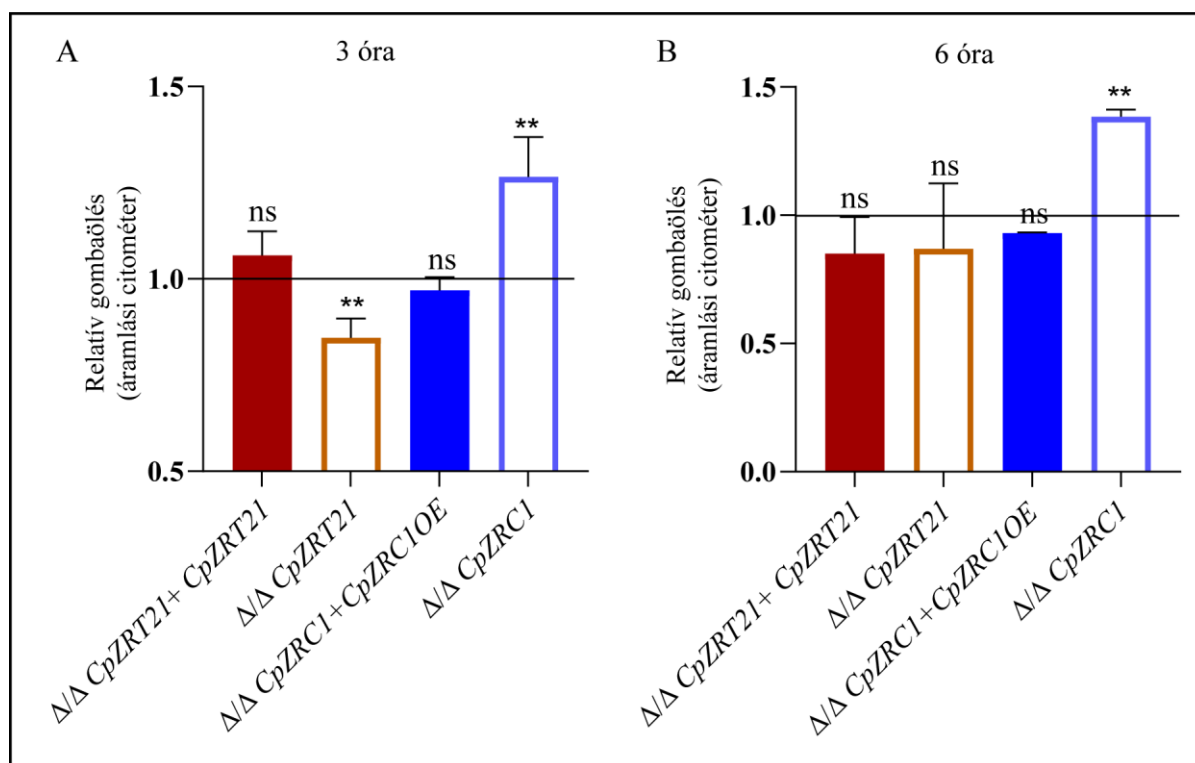


17. ábra. A *CpZRT21* és *CpZRC1* hiányának hatása az M1 típusú humán makrofágok fagocitáló képességére. Képkalkító áramlási citométerrel határoztuk meg a *CpZRT21* (A) és *CpZRC1* (B) deléciós és reintegrált törzsek fagocitózisának mértékét a kontroll törzshöz képest 1, 2 és 3 óra elteltével. A kísérleteket négy különböző donorból izolált és differenciáltatott M1 típusú makrofágokkal végeztük el, a fertőzési arány 1 (makrofág): 5 (élesztő) volt. A statisztikai elemzéshez nem párosított t-próbát használtunk, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

VI.12. *In vitro* M1 típusú humán makrofágok és a *C. parapsilosis* cink transzporter mutáns törzsek interakciójának jellemzése: ölési hatékonyság

A *CpZRT21* és *CpZRC1* deléciós mutánsok fagocitózisának vizsgálatát követően a cink transzporterek hiányának hatását elemeztük az M1 típusú humán makrofágok gombaölési hatékonyságára is.

Eredményeink szerint a J774.2 egér makrofágok gombaölési hatékonyságának esetében tapasztaltak az M1 típusú humán makrofágok esetében is megállapíthatóak. A *CpZRT21* gén hiánya nagyobb mértékű túlélést biztosít a *C. parapsilosis* sejteknek 3 óra inkubációt követően (18/A ábra), továbbá a *CpZrc1* vakuoláris cink transzporter fontos szerepet játszik a *C. parapsilosis* túlélésében M1 típusú humán makrofágok jelenlétében mind 3 óra (18/A ábra) mind 6 óra (18/B ábra) ko-inkubációt követően.



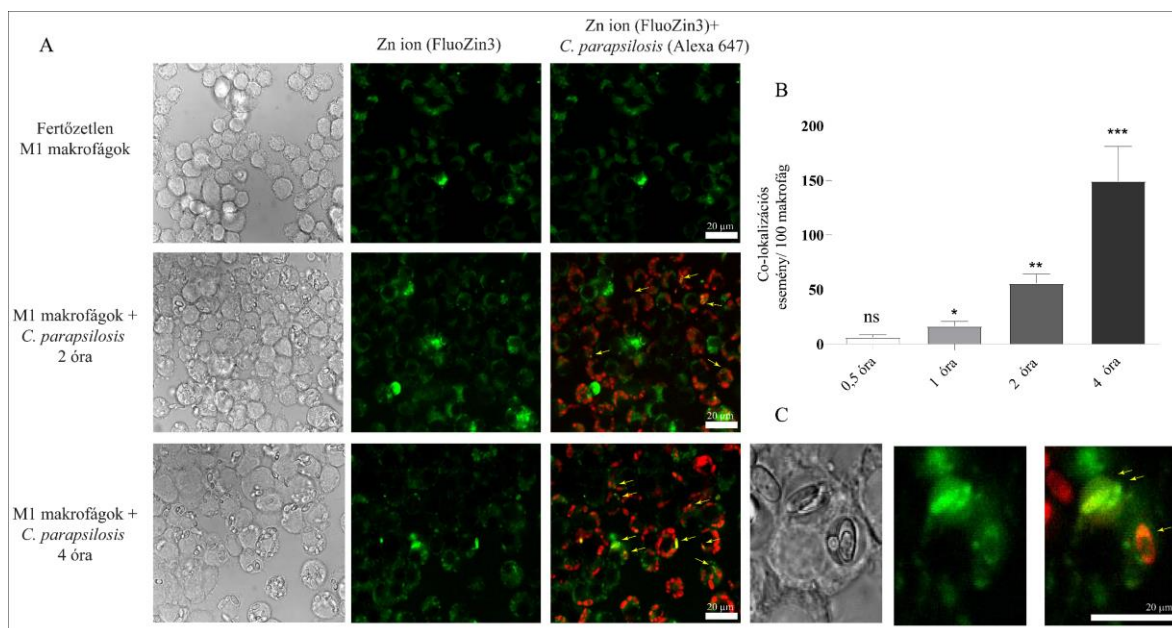
18. ábra. A *CpZRT21* és *CpZRC1* deléciós mutánsok túlélésének vizsgálata M1 típusú humán makrofágok jelenlétében. Az M1 típusú makrofágok cink transzporter mutáns gombatörzsek ölési hatékonyságát képalkotó áramlási citométerrel határoztuk meg 3 (A) illetve 6 óra (B) inkubációt követően. A mintákban található élesztő sejteket kalkofluor fehér sejtalfestékkel jelöltük, a gomba sejtek életképességének meghatározásához FUN1 fluoreszcens festéket használtunk. A kísérleteket három különböző donorból származó M1

típusú makrofágokkal végeztük el, statisztikai elemzéshez nem párosított t-próbát használtunk, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

VI.13. J774.2 egér makrofágok cink ion toxicitáson alapuló *C. parapsilosis* ölési folyamata

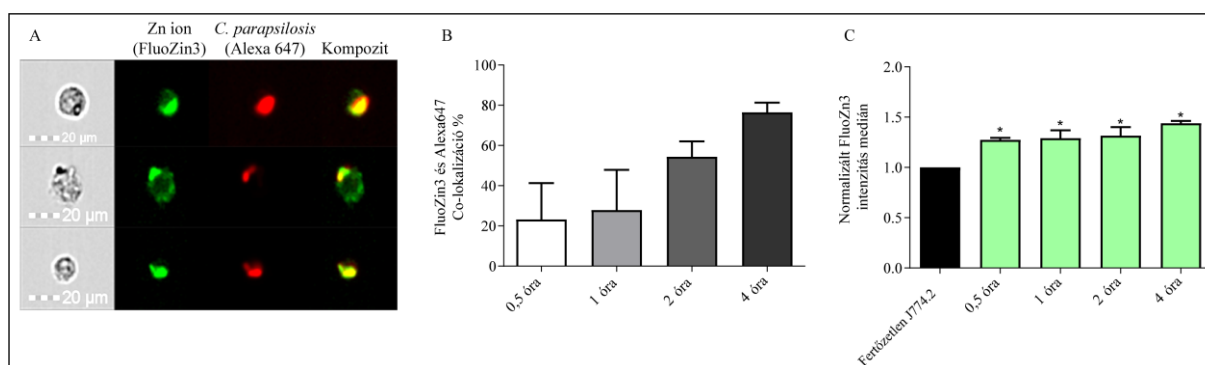
Annak érdekében, hogy megállapítsuk a J774.2 makrofágok intracelluláris cink ion lokalizációját és mennyiségét, FluoZin3 szabad cink ion specifikus festékekkel (zöld) fluoreszcensen jelöltük meg a makrofágokat az Alexa 647 (piros) fluoreszcensen jelölt vad típusú *C. parapsilosis* fertőzést követően.

Fél, 1, 2, 3 és 4 óra koinkubáció elteltével konfokális mikroszkóp, illetve képalkotó áramlási citométer segítségével határoztuk meg a szabad cink ionok helyét a gomba sejtekhez képest. Mindkét módszer eredményei szerint a J774.2 egér makrofágok intracelluláris cink ion jele és a fagocitált *C. parapsilosis* sejtek időarányosan növekvő mértékben kolokalizálnak (19/B ábra, 20/B ábra), valamint a *C. parapsilosis* fertőzés hatására megnövekszik a szabad cink ionok mennyisége a makrofágokon belül (20/C ábra).



19. ábra. J774.2 egér makrofágok intracelluláris cink ion kolokalizációjának vizsgálata *C. parapsilosis* sejtekkel. A J774.2 egér eredetű makrofágokat 0,5, 1, 2, valamint 4 órán át együtt inkubáltuk az Alexa 647-tel festett vad típusú CLIB 214 *C. parapsilosis* sejtekkel MOI=1:5 arányban. (A, C) Az inkubációs idő leteltével FluoZin3 cink ion specifikus fluoreszcens festékekkel festettük meg a makrofágokat, majd konfokális mikroszkóppal

vizsgáltuk a mintákat. **(B)** A konfokális mikroszkóppal készített képek esetében három látótérből 100-100 véletlenszerűen kiválasztott makrofág megszámlálásával határoztuk meg a cink ionok és fagocitált gomba sejtek kolokalizációját. A makrofágok cink ion és a gomba sejtek kolokalizációját a sárga nyilak jelölik a reprezentatív **A, C** ábrákon. A kísérletet három párhuzamosban végeztük el. A statisztikai elemzéshez nem párosított t-próbát használtunk, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.



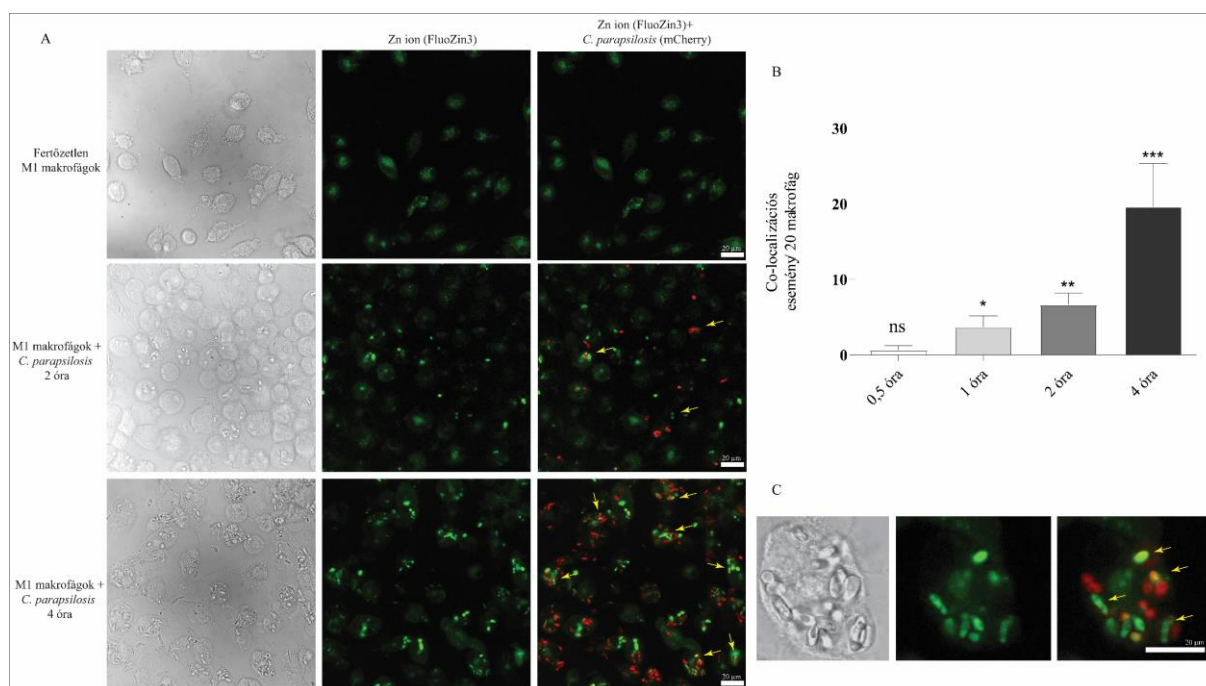
20. ábra. J774.2 egér makrofágok intracelluláris cink ion kolokalizációja *C. parapsilosis* sejtekkel: képkötő áramlási citométerrel történő vizsgálat. A kísérleteket hasonlóan kivitelezte, mint a konfokális mikroszkóppal végzett analízist (19. ábra). Az inkubációs és festési idő leteltével a makrofágokat képkötő áramlási citométerrel végzett méréshez készítettük elő. **(A)** Reprezentatív képek a cink ion (FluoZin3, zöld) és *C. parapsilosis* sejtek (Alexa 647, piros) kolokalizációjáról. **(B)** A kolokalizációs események százalékos aránya. **(C)** A FluoZin3 (cink ionok) fluoreszcens intenzitásának a fertőzetlen makrofágok jeléhez normalizált medián értéke az idő függvényében. A képkötő áramlási citométerrel mért eredményeket IDEAS kiértékelő program kolokalizációs események megállapítására alkalmas mátrixával értékeltük ki, valamint a FluoZin3 (cink) fluoreszcens jelének medián értékét definiáltuk. A kísérletet három párhuzamosban végeztük el, valamint a statisztikai elemzéshez nem párosított t-próbát használtunk, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

VI.14. Az M1 típusú humán makrofágok cink ion mérgezésen alapuló *C. parapsilosis* ölési mechanizmusa

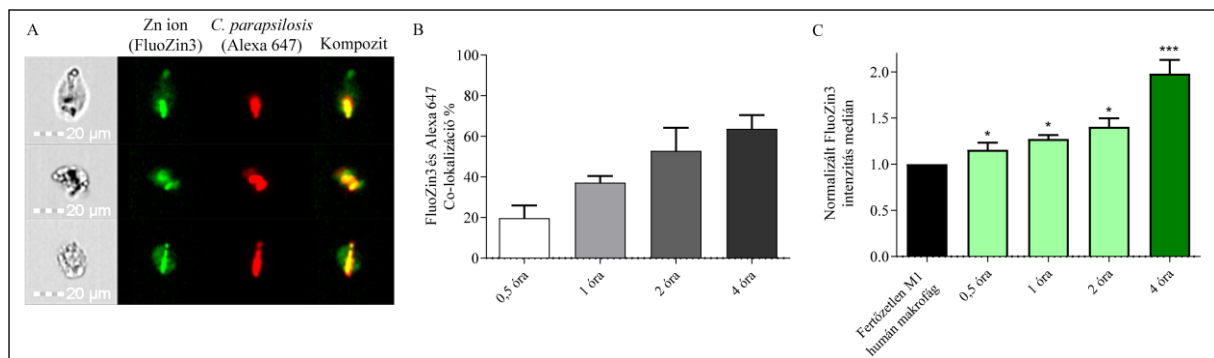
Hasonlóan a J774.2 egér makrofágokon végzett kísérletekhez, a buffy coat vérkészítményből izolált és differenciáltatott M1 típusú makrofágok esetében is

megvizsgáltuk a makrofágok intracelluláris cink ion és a vad típusú *C. parapsilosis* sejtek kolokalizációját mind konfokális mikroszkóp, mind képalkotó áramlási citométer segítségével.

Megállapítottuk, hogy a fertőzési idő előrehaladtával a kolokalizációs események gyakorisága megnőtt (21/B ábra, 22/B ábra), valamint egy makrofágon belül akár több ilyen esemény is jellemző lehet 4 óra elteltével (21/A, C ábra). Ezzel párhuzamosan a *C. parapsilosis* fertőzés hatására az M1 típusú makrofágok intracelluláris cink ion szintje szignifikánsan megnő az inkubáció 2., 3., 4. és 6. órájában (22/C ábra).



21. ábra. M1 típusú humán makrofágok intracelluláris cink ion és *C. parapsilosis* sejtek kolokalizációjának konfokális mikroszkópos analízise. (A, C) Konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk az M1 típusú humán makrofágok cink ion jelei (FluoZin3, zöld) és *C. parapsilosis* sejtek (Alexa 647, piros) kolokalizációjának (sárga nyilak) gyakoriságát 0,5, 1, 2 és 4 óra elteltével, MOI=1:5 arányban elvégzett fertőzést követően. (B) 3-3 látómezőben véletlenszerűen kiválasztott 20-20 sejt esetében számoltuk meg a kolokalizációs eseményeket. A kísérletet három párhuzamosban végeztük el, statisztikai elemzéshez nem párosított t-próbát használtunk, *p <0,05; **p <0,01.

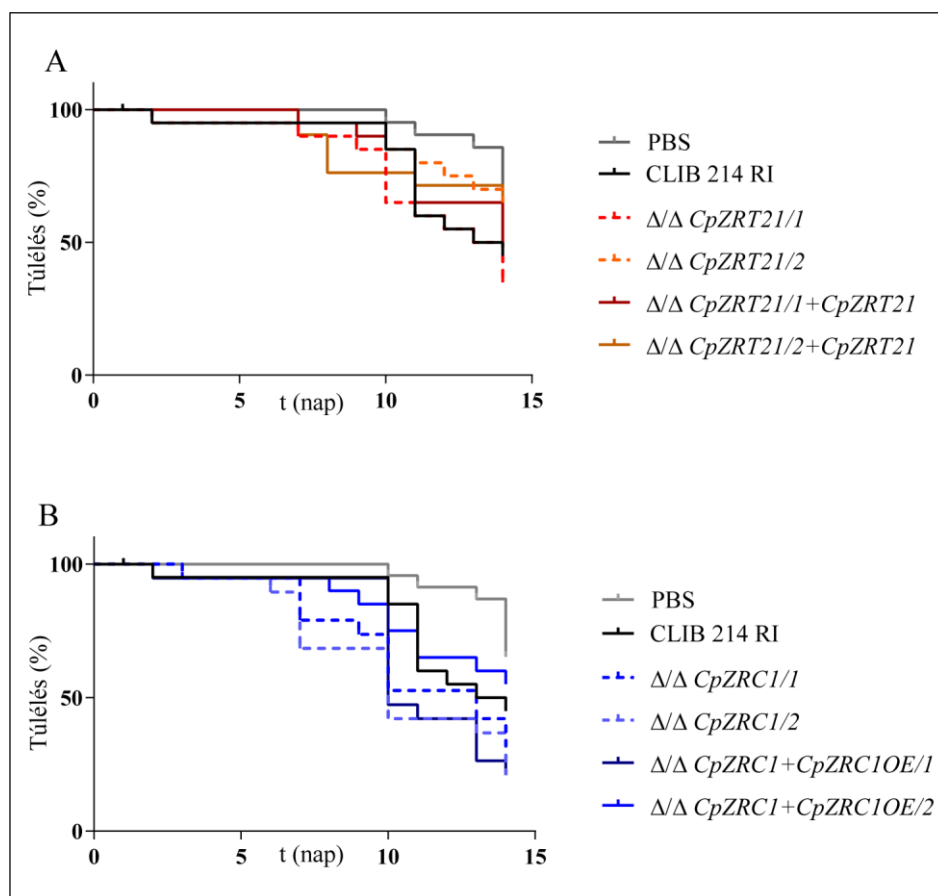


22. ábra. M1 típusú humán makrofágok intracelluláris cink ion kolokalizációja *C. parapsilosis* sejtekkel: analízis áramlási citométerrel. A gomba sejteket Alexa-647, a cink ionokat FluoZin3 fluoreszcens festékekkel tettük láthatóvá. **(A)** Reprezentatív képek az M1 típusú humán makrofágok és *C. parapsilosis* sejtek interakciójáról. **(B)** A FluoZin3 (cink ion) és az élesztő sejtek (Alexa 647) kolokalizációs eseményeinek százalékos aránya. **(C)** A FluoZin3 jel medián intenzitása az inkubáció különböző időpontjaiban. Az elemzéshez a képkalkoló áramlási citométer IDEAS kiértékelő programját használtuk. A kísérleteket 3 párhuzamosan végeztük el, statisztikai elemzéshez nem párosított t-próbát használtunk, *p < 0,05; **p < 0,01.

VI.15. *C. parapsilosis* cink transzportereinek szerepe *Galleria mellonella* fertőzése során

A *G. mellonella* lárvák hasonló humorális és celluláris veleszületett immunmechanizmusokkal rendelkeznek, mint a magasabbrendű emlős szervezetek. Ebből kifolyólag ezt a rovarot széles körben használják gerinces fertőzési kísérletek alternatívájaként az emlős modell használatának csökkentése érdekében. Röviddel az injekció beadása után a lárvák barnássá váltak a melanizációnak nevezett folyamat következtében. Ez a rovarok gyakori és gyors reakciója bármilyen idegen részecskével (beleértve a kórokozókat is) szemben, melynek során a hemociták körülveszik az idegen részecskét, és többlépcsős biokémiai folyamaton keresztül melanint termelnek. A *G. mellonella* esetében a melanizáció a *C. parapsilosis* injekció beadása után percekben belül megtörténik. A korábbi kísérleteinkben a kontrolltól eltérő fenotípust mutató ZnT-k szerepét megvizsgáltuk *G. mellonella* fertőzési kísérletben is. A lárvákat a kontroll, a $\Delta/\Delta\text{CpZRT21}$ és $\Delta/\Delta\text{CpZRC1}$ deléciós és komplementált törzsekkel fertőztük meg, majd a túlélési arányt 14 napon keresztül követtük nyomon.

Kísérleteink eredményei alapján megállapítható, hogy a *G. mellonella* rovar modellben nincs szignifikáns különbség a lárvák túlélésében a mutáns törzsek és a vad típusú törzsek között (23. ábra).



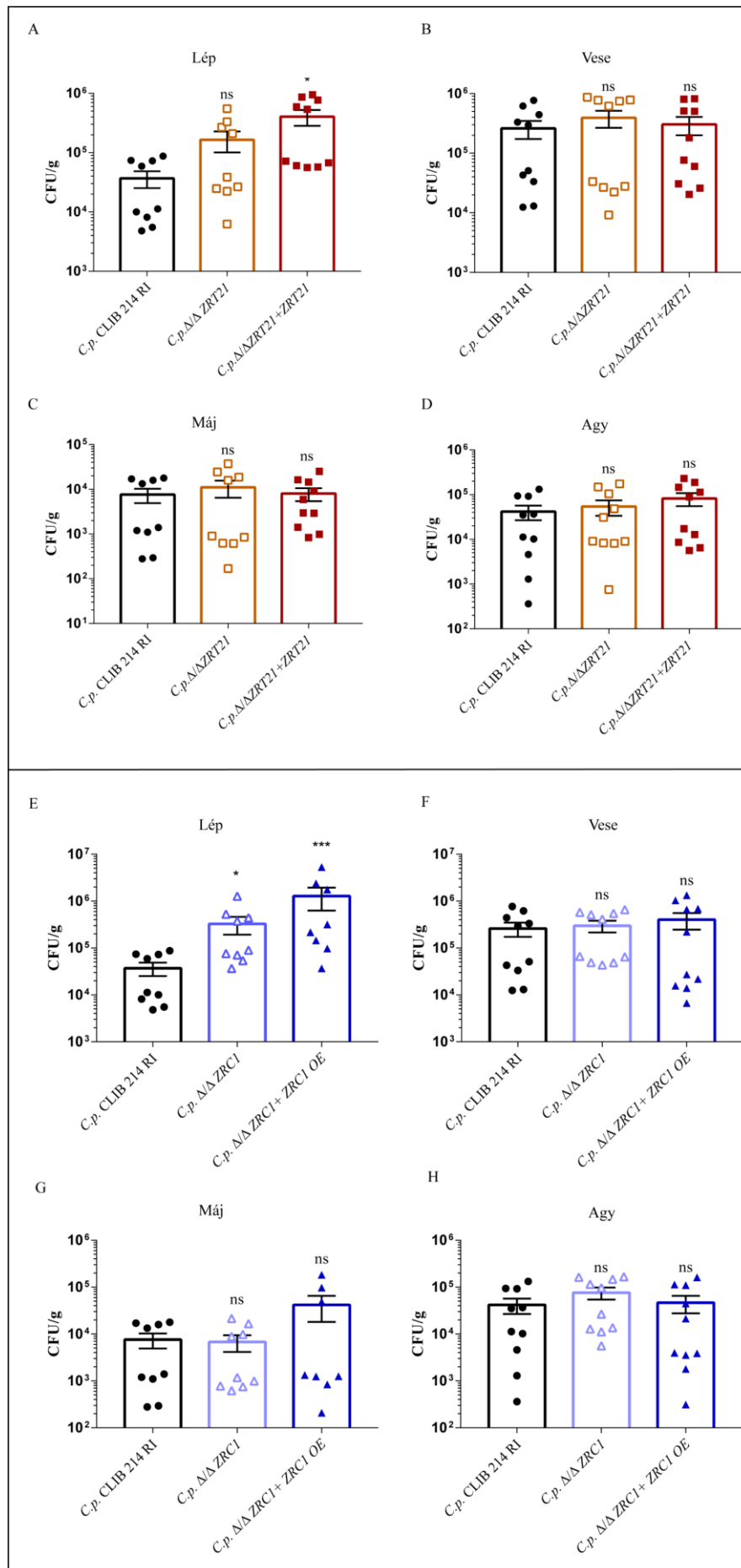
23. ábra. A *CpZRT21* és *CpZRC1* cink transzporter gének hiányának hatása *G. mellonella* életképességére. (A, B) *In vivo* *G. mellonella* fertőzést végeztünk a lárvák 7 napos akklimatizációját követően. A lárvákat vad típusú, *CpZRT21* és *CpZRC1* mutáns törzsekkel fertőztük meg, amelyek életképességét 14 napon keresztül monitoroztuk. Gomba törzsenként húsz lárvát használtunk. A statisztikai elemzéshez Mantel–Cox tesztet végeztünk el, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,001$.**

VI.16. *C. parapsilosis* cink transzporterek szerepe vad típusú BALBc egér *in vivo* fertőzést követően

További *in vivo* fertőzési kísérleteket egérmodellel végeztünk. A vad típusú BALB/c egerek különböző szerveinek (lép, vese, máj és az agy) 3 napos gombakolonizációját

vizsgáltuk a CLIB 214 RI, $\Delta/\Delta CpZRT21$, $\Delta/\Delta CpZRC1$ deléció és a reintegrált *C. parapsilosis* törzsek felhasználásával.

A kísérletek eredményeként megállapítottuk, hogy a *CpZRT21* deléciója, valamint a gén reintegrációja is növelte a gombakolonizáció mértékét, de kizárólag a lépben (24/A ábra). Hasonlóképpen megállapítható, hogy mind a *CpZRC1* hiánya mind túlzott expressziója megnövelte az az egerek lépében az élesztő sejtek számát a vad-típushoz képest (24/E ábra).



24. ábra. A *C. parapsilosis* *CpZRT21* és *CpZRC1* gének virulenciában betöltött szerepének vizsgálata *in vivo* egér modellben. Vad típusú BALB/c egereket fertőztünk az állatok farokvénáján keresztül kontroll, *CpZRT21* (A-D) és *CpZRC1* (E-F) cink transzporter mutáns és ezek génreintegrált törzseivel. 3 nap inkubációt követően az állatok lépéből, veséjéből, májából és agyából állapítottuk meg a gombakolonizáltság mértékét YPD táptalajra történő szervhomogenizátum szélesztést követően. A szervek élesztő kolonizáltságának mértékét CFU/szervtömeg (g) egységben adtuk meg. Minden törzs esetében 10-10 állatot használtunk fel 2 párhuzamos kísérletben. Statisztikai analízishez Mann-Whitney tesztet használtunk, *p <0,05; ** p <0,01; ***p <0,001.

VII. Eredmények értékelése

VII.1. A *C. parapsilosis* potenciális cink transzportereinek génexpressziós jellemzése

A nyomelemek kulcsfontosságúak valamennyi élőlény számára. A gazda szervezetben a cink ionok, ahogyan egyéb fém ionok is, fehérjékhez kötött formában fordulnak elő, így azok hozzáférhetősége korlátozott a kórokozók számára. Patogén gombák esetében a cink ionok megszerzése emiatt komoly kihívást jelent, amely folyamatban a mikroba különböző Zip transzporterei játszanak kitüntetett szerepet (Eide, 2006). Az *in silico* vizsgálataink alapján a *C. parapsilosis*-ban azonosítottuk a cink felvételben (Sc/CaZrt2, CaZrt101), a cink detoxifikáló folyamataiban (Sc/CaZrc1) és a vakuoláris cink ion exportban (ScZrt3) potenciálisan szerepet játszó transzporterek génjeit, azonban nem találtuk meg a CaPra1 cinkofór fehérjét kódoló gén ortológját. A *CpZRT101* mind szekvenciájában, mind pedig expressziójának szabályozásában jelentős hasonlóságot mutat a *C. albicans* *Zrt101* nagy affinitású plazmamembrán importer génjével. Expressziója semleges kémhatás esetén, mintsem savas környezetben domináns. Hasonló funkciót tölt be e két fajtól távol álló, ám *Ca/CpZRT101* ortológ *Aspergillus fumigatus* *zrfC* transzporter gén által kódolt fehérje is, amely arra enged következtetni, hogy ez a cink transzporter konzerváltan van jelen az *Ascomycota* törzsben. Ezzel összefüggésben érdemes megjegyezni, hogy bár a *S. cerevisiae*-ből hiányzik a *Zrt101*, az ortológok a legtöbb *Ascomycota* gombában jelen vannak (Citiulo és mtsai., 2012).

Egy korábbi tanulmánnyal összhangban, az általunk elvégzett *in silico* analízis szerint sem található meg a *C. albicans*-ban a *Zrt101* transzporterrel közösen működő *Pra1* ortológ génje a *C. parapsilosis* genomjában (Citiulo és mtsai., 2012). Ellentétben három gén (*CpZRT21*, *CpZRT22* és *CpZRT23*) nagy mértékű hasonlóságot mutatott a savas közegben működő membránhoz kapcsolt cink ion transzporter *Sc/CaZRT2*-vel. A szekvencia hasonlóság alapján feltételezhető, hogy a *CpZRT22* és a *CpZRT23* a konzervált *CaZRT2/CpZRT21* ősi megkettőződésének eredménye, amit egy későbbi tandem duplikáció követhetett (Wilson, 2015). A *C. parapsilosis* így filogenetikai és evolúciós szempontból is figyelemre méltó a *PRA1* elvesztése és a *ZRT2* gén expanziója miatt. Ez az élesztő az emberi bőr gyakori kolonizálója, amely közeg enyhén savas kémhatású. Mivel a *Pra1* semleges-lúgos, valamint a *Zrt2* savas kémhatású környezetben szükséges a cinkfelvételhez, a *PRA1* gén hiánya és a *ZRT2* gének expanziója összefüggésbe hozható a *C. parapsilosis* környezetének pH értékéhez ilyen módon történő alkalmazkodásával.

Génexpressziós elemzésünk kimutatta, hogy a *CpZRT21* alacsony szinten íródott át savas és semleges kémhatás esetében. Ez ellentétes a *C. albicans ZRT2* génjének (a *CpZRT21* ortológ párja) szakirodalomban fellelhető expressziós mintázatával, amely gén magasabb mértékben expresszálódik savas, mint semleges-lúgos kémhatású környezetben (Tóth és mtsai., 2019, Bensen és mtsai., 2004). Mindazonáltal, a *CpZRT21* expressziója csökkent közepes (1 mM) és magas (10 mM) cink koncentrációjú mind neutrális, mind savas környezetben, amely génexpressziós mintázat egybevág egy alacsony affinitású cink ion transzporter funkciójával és a korábban a *CaZRT2* esetében megfigyelttel (Bensen és mtsai., 2004, Citiulo és mtsai., 2012).

CpZRT22 kanonikus, savas környezethez adaptálódott cinkfelvétel expressziós profilját mutatta, megnövekedett expresszióval alacsony cink koncentráció és alacsony pH-értékek mellett. Paralóg génpárja, a *CpZRT23* mutatta a legmagasabb expressziót semleges kémhatású tápoldatban és szignifikánsan csökkent a tápközeg pH-jának csökkentésével. Érdekes módon savas közegben a *CpZRT23* erősebben expresszálódott közepes mennyiségű (1 mM) cink jelenlétében, mint alacsony (0,05 mM) vagy magas (10 mM) cink tartalmú környezetben. Ez a cinkre adott bimodális mintázat a *S. cerevisiae*-ből származó alacsony affinitású cinkimporter *ZRT2* működéséhez hasonló (Bird és mtsai., 2004).

Meg kell jegyezni, hogy az összes eddig tanulmányozott *ZRC1* ortológ fontos szerepet játszik a cink méregtelenítésében (Crawford és mtsai., 2018, MacDiarmid és mtsai., 2003, Cho és mtsai., 2018, Clemens és mtsai., 2002). Alacsony pH értékű környezetben a *CpZRC1* expressziója nőtt a környezetének cink ion szintjének csökkenésével. Bár ez ellentmondónak tűnik, más gombok esetében is leírásra került, és adaptív mechanizmust jelenthet a sejtek jövőbeli cinksokk elleni védelmére. Az a tény, hogy ezt a jelenséget savas, de nem semleges/lúgos kémhatású tápoldatban figyeltük meg, a cink ionok alacsonyabb pH melletti sokkal nagyobb oldhatósága magyarázhatja, amelynek így biológiai hasznosulása is nagyobb mértékű lehet (Łoboda és Rowińska-Zyrek, 2017).

Összességében megállapítható, hogy ezek a filogenetikai és génexpressziós megfigyelések együttesen azt mutatják, hogy a *C. parapsilosis* cinkfelvételi mechanizmusa összetettebb, mint a többi vizsgált élesztőfajé.

VII.2. A *C. parapsilosis* cink felvételi rendszere

Kísérleteink alapján megállapítható, hogy cink ion limitált folyékony tápközegben a *C. parapsilosis* osztódási üteme alacsonyabbnak bizonyult, de helyreállt a cink ionok pótlásának

hatására. A $\Delta/\Delta\text{CpZRT21}$ csak csekély növekedési defektust mutatott a vad típusú és génreintegrált törzshöz képest savas kémhatású LZM + 0,05 mM cinkkel kiegészített közegben. Ezekhez a növekedési vizsgálatokhoz a törzsek előtenyésztése YPD komplett tápoldatban zajlott, amely körülbelül 29 μM cinket tartalmazott (Wehmeier és mtsai., 2020). Feltételeztük, hogy a *C. parapsilosis* gomba sejtek tárolhatták az előtenyésztetből származó cink egy részét, amint azt korábban a *S. cerevisiae* esetében kimutatták (Simm és mtsai., 2007). Ez alapján a sejteket először előtenyésztettük cink-limitáló körülmények között a növekedési teszteket megelőzően 24 órán át. A cinkhiányos előtenyésztetből származó sejtek nem tudtak növekedni, amikor cink ion nélküli LZM tápközegbe kerültek. Ez azt jelzi, hogy a *C. parapsilosis*, akárcsak a *S. cerevisiae*, képes lehet intracelluláris raktárakat létrehozni és felhasználni az elraktározott cink ionokat.

Abban az esetben, amikor cink ion hiányos előtenyésztetből származó sejteket használtunk a növekedési tesztek során 0,05 mM cink jelenlétében, a vad típusú és $\Delta/\Delta\text{CpZRT21} + \text{ZRT21}$ reintegrált törzsek normális mértékben növekedtek, de a $\Delta/\Delta\text{CpZRT21}$ növekedése erősen gátoltnak bizonyult. Ez arra utal, hogy a CpZrt21 nélkülözhetetlen a cink ionok felvételéhez és a *C. parapsilosis* növekedéséhez, amikor a sejteknek alacsony mennyiségű (0,05 mM) cink ion áll rendelkezésükre a környezetükben, továbbá a megnövelt cink mennyiség (1 mM) nem tette nélkülözhetetlenné a CpZrt21 transzporter jelenlétét.

A négy azonosított ZnT (*CpZRT101*, *CpZRT21*, *CpZRT22* és *CpZRT23*) közül csak a *CpZRT21* hiánya eredményezett csökkent növekedést *C. parapsilosis* esetében cink ion hiányos savas környezetben. A *CpZRT21*, *CpZRT22* és *CpZRT23* transzkripciója ebben a tápközegben érdekes expressziós mintákat tárt fel. A vad típusú sejtekhez képest a *CpZRT22* és *CpZRT23* deléciója akár önmagában, akár e két gén deléciójának kombinációjában a *CpZRT21* gén expressziójának növekedését eredményezte. Az ilyen típusú fokozott génexpresszió kompenzáció gyakori az azonos mikrotápanyag-felvételi útvonalért felelős fehérjéket kódoló gének esetén. A *CpZRT22* és a *CpZRT23* vonatkozásában bármelyik deléciója a másik gén expressziójának a csökkenését eredményezte. Ez a két gén ugyanabban a lókuszbán található, és nem zárhatjuk ki, hogy a közös szabályozásuk bizonyos zavara lépett fel az adott gének eltávolítása miatt. A legérdekesebb megfigyelés az volt, hogy a *CpZRT21* deléciója (amely más kromoszómán található, mint a *CpZRT22/23*) a *CpZRT22* csökkent - és a *CpZRT23* megnövekedett transzkripcióját eredményezte. Bár lehetséges, hogy a $\Delta/\Delta\text{CpZRT21}$ sejtek által tapasztalt cink limitált környezet hozzájárulhat a *CpZRT22* és a *CpZRT23* megfigyelt eltérő szabályozásához, úgy gondoljuk, hogy ez nem valószínű, mivel a *CpZRT22* fokozatosan magas expressziós szintet mutatott alacsony cink ion tartalmú

körülmények között savas közegben, míg a *CpZRT23* expressziója csak kisebb mértékben növekedett a kontroll génhez képest. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a *CpZRT21*, *CpZRT22* és *CpZRT23* szerepet játszik *C. parapsilosis*-ban a Zrt2 alapú cinkfelvételben, továbbá egymást kölcsönösen befolyásoló, ugyanazon szabályozási folyamat alatt állhatnak. Ez megmagyarázhatja, hogy sem a *CpZRT22* vagy *CpZRT23* egyszeri deléciója, sem a kettős deléciójuk miatt nem eredményezte a gomba életképességének elvesztését, mivel a *CpZRT21* kompenzálhatja a *CpZRT22* és a *CpZRT23* hiányát. A jövőben ezt a hipotézist tervezzük megerősíteni egy Δ/Δ *CpZRT21/ZRT22/ZRT23* hármas mutáns törzs létrehozásával és jellemzésével.

VII.3. A *C. parapsilosis* cink detoxifikáló rendszere

A gazda szervezetben a mikroorganizmusok potenciálisan toxikus cinkszinttel találkozhatnak az immunsejtek fagocitózisát követően. A legújabb tanulmányok kimutatták, hogy a makrofágok képesek károsítani a kórokozókat azáltal, hogy toxikus mennyiségű cink iont szállítanak a fagolizoszómába, hogy elpusztítsák vagy korlátozzák a patogének növekedését (Botella és mtsai., 2011, Riedelberger és mtsai., 2020). Ezzel párhuzamosan azonban számos patogén faj rendelkezik stratégiával a magas cink ion koncentráció csökkentésére, hogy túlélje az ilyen antimikrobiális hatást, amely képességet fontos virulencia faktornak tekintjük (Botella és mtsai., 2011, Crawford és mtsai., 2018). A *S. cerevisiae*-vel és a *C. albicans*-szal való szekvencia hasonlóság alapján a cink-méregtelenítő transzporter Zrc1-et CPAR2_212100-ként azonosítottuk *C. parapsilosis*-ban.

A *CpZRC1* deléciója életképesség csökkenéséhez vezetett 5 mM vagy azt meghaladó cink ion tartalmú körülmények között, ami alátámasztja a *CpZrc1* cink detoxifikáló szerepét. A *CpZRC1* egy kópiájának natív promóterével való reintegrálása nem komplementálta a növekedési defektust, ami miatt a *CpZRC1* magasabb mértékű expresszióját a *CaTDH3* promóter használatával kellett biztosítanunk a Δ/Δ *CpZRC1* mutáns törzsben. A *CpZRC1* ily módon előidézett emelkedett expressziója nem csak visszaállította a vad típusú fenotípust 5-10 mM cink tartalmú környezetben, de 17,5 mM vagy annál nagyobb cink ion koncentráció esetén, ahol a kontrollként alkalmazott törzs sejtei már nem voltak képesek növekedni, a gént túltermelő gombák túlélését is biztosította. A cink túlélési teszt is alátámasztotta a *CpZrc1* cink méregtelenítő szerepét: a *CpZRC1* deléciója a telepek formálódásának elmaradását eredményezte 24 és 48 órán át történő 5-20 mM cink kezelés után. A Zrc1 két különböző

cink-méregtelenítési folyamatot működtet *S. cerevisiae* és *C. albicans* esetében. Pékésztőben az ScZrc1 felelős a vakuoláris cink transzportért, míg a *C. albicans* CaZrc1-függő cinkoszómaképződéssel védekezik a nagy mennyiségű intracelluláris cink ion ellen (Crawford és mtsai., 2018, MacDiarmid, 2000). A Zrc1 funkciójának meghatározására *C. parapsilosis*-ban cinkoszóma-specifikus fluoreszcens festéket (Zinquin) használtunk. A toxikus mennyiségű (10 mM) cink-szulfát kezelés gyors cinkoszóma képződést eredményezett *C. parapsilosis*-ban 5-20 perces inkubáció után, és a $\Delta/\Delta\text{CpZRC1}$ mutáns is képes volt ugyanannyi cinkoszómát képezni, mint a kontroll törzs. A 24 és 48 órás 10 mM cink kezelés toxikusnak bizonyult a $\Delta/\Delta\text{CpZRC1}$ törzs esetében, ami korrelált a konfokális mikroszkóppal és áramlási citométerrel azonos körülmények között kimutatott nagy mennyiségű cinkoszómával és elpusztult sejtekkel. Érdekes módon míg a 20 mM cinkkezelés (amely már toxikus a vad típusra) nagy mennyiségű cinkoszóma képződést eredményezett a vad típusú és $\Delta/\Delta\text{CpZRC1}$ törzsekben, addig a Zinquin jel mennyisége a $\Delta/\Delta\text{CpZRC1} + \text{ZRC1OE}$ törzsben alacsonyabb szintet mutatott. A *C. parapsilosis*-ban a cinkoszóma képződés túlterheltnak tűnt CpZrc1 hiányában, így a cinkoszómák telítettnak bizonyultak cink ionokkal magas cink szint esetén. Feltételeztük, hogy a CpZrc1-nek vagy van egy másik intracelluláris cink-méregtelenítési célorganelluma, vagy (a *C. albicans*-szal ellentétben) a vakuólumok membránján lokalizálódik. A Zrc1 C-terminális megjelölése GFP-vel és a sejtfal, nukleusz és vakuólum együttes fluoreszcens festésével a CpZrc1 vakuoláris membránhoz való lokalizációját tártuk fel. Ezért annak ellenére, hogy filogenetikailag szorosabb rokonságban áll a *C. albicans*-szal, a *C. parapsilosis* Zrc1 szubcelluláris lokalizációja jobban hasonlít a *S. cerevisiae* és a *Cryptococcus neoformans*-éhoz (Cho és mtsai., 2018, MacDiarmid, 2000).

VII.4. J774.2 egér és M1 típusú humán makrofágok és *C. parapsilosis* cink transzporter mutánsok *in vitro* interakciója

A gazdaszervezet immunválaszában kiemelt szerepet töltenek be az esszenciális nyomelemek, mint például a cink. A cink ionok alacsony mennyiségben, fehérjékhez kötött formában vannak jelen, amelyek felvétele egy patogén organizmus túléléséhez, illetve a gazdaszervezetben való megtelepedéséhez elengedhetetlen. Azonban nem csak a cink alacsony koncentrációja limitálja a patogének növekedését, hanem a makrofágok fagolizozómájában található cink ionok magas, a gomba számára toxikus szintű mennyisége is (Botella és mtsai., 2011, Riedelberger és mtsai., 2020)

A gazda sejtek és a *C. parapsilosis* cink transzporter mutánsok interakciójának *in vitro* vizsgálata során J774.2 egér, illetve humán M1 típusú makrofágokat használtunk, amelyek fagocitózis, illetve gombaeliminálási mértékét állapítottuk meg. A $\Delta/\Delta\text{CpZRT21}$ és $\Delta/\Delta\text{CpZRC1}$ törzsek fagocitózisa a J774.2 sejtek által minden időpontban hasonló volt a vad típusú törzséhez, továbbá az M1 típusú humán makrofágok esetében 3 óra elteltével nem tapasztaltunk különbséget. A $\Delta/\Delta\text{CpZRT21}$ sejteket kisebb, a $\Delta/\Delta\text{CpZRC1}$ sejteket magasabb mértékben eliminálták mind az egér makrofágok 3 óra elteltével, mind a humán makrofágok 3 illetve 6 órával a fertőzést követően.

Feltételezésünk szerint a $\Delta/\Delta\text{CpZRT21}$ mutánst részben megvédheti a gomba sejteket a toxikus fagolizoszómális cink ion koncentrációtól, mivel hiányzik belőle a fő plazmamembrán cink importer, azonban ezzel egyidejűleg a vakuoláris membrán lokalizált cink-méregtelenítő rendszerrel nem rendelkező $\Delta/\Delta\text{CpZRC1}$ sejtek fokozott pusztulása arra enged következtetni, hogy a *C. parapsilosis* sejteknek a gomba számára mérgező cink mennyiséggel kell megküzdeniük a vizsgált makrofágokon belül.

VII.5. J774.2 egér és az M1 típusú humán makrofágok cink mérgezésen alapuló *C. parapsilosis* elleni ölési mechanizmusa

Az *in vitro* J774.2 és M1 típusú humán makrofágokkal végzett fagocitózis és gombaeliminálási eredményeink alapján megállapítottuk, hogy *CpZRT21* gén hiányában nagyobb mértékben élnek túl a gomba sejtek a makrofágokkal történő interakciót, míg a *CpZrc1* vakuoláris cink transzporter hiányában a sejtek nagyobb mértékben pusztulnak el, mint a kontroll törzs mindkét típusú makrofág sejtek jelenlétében. Így feltételezhetjük, hogy cinkfelvételben ($\Delta/\Delta\text{CpZRT21}$) és a cink méregtelenítésében ($\Delta/\Delta\text{CpZRC1}$) hibás *C. parapsilosis* mutánsok viselkedése hasonló hatást válthatnak ki: ha a makrofágok fagocitálják a gombákat, toxikus mennyiségű cink ion segítségével eliminálják azokat. Hipotézisünk bebizonyítása érdekében a fent említett mindkét típusú makrofág sejt intracelluláris cink mennyiségét és lokalizációját vizsgáltuk *C. parapsilosis* fertőzést követően. A vad típusú CLIB 214 *C. parapsilosis* sejteket AlexaFluor 647 fluoreszcens festékkel, a makrofágok intracelluláris szabad cink ionjait FluoZin3 cink specifikus próbával jelöltük meg a koinkubációt követően. Mind a J774.2 egér, mind az M1 típusú humán makrofágok esetében megállapíthatjuk, hogy a makrofágok intracelluláris szabad cink ionjai kolokalizálnak a *C. parapsilosis* sejtekkel már fél órával a fertőzést követően, a jelenség 4 óra inkubációs idő után

a leggyakoribb. Eredményeink összhangban vannak a szakirodalommal, ugyanis több tanulmány alátámasztotta a közelmúltban, hogy a makrofágok képesek növelni a fagolizoszomális cink mennyiségét, hogy elősegítsék a kórokozók eliminálását. *M. tuberculosis* és egér csontvelőből izolált BMDM sejtek interakciója esetén került leírásra először a jelenség, miszerint a baktériumok fagocitózist követően a cink ionok felhalmozódnak a fagolizoszómákban (Botella és mtsai., 2011). Egy közelmúltban végzett tanulmány azt is feltárta, hogy *C. glabrata* fertőzés során szintén az egér csontvelőből származó makrofágok képesek a *Candida* sejteket a fagolizoszómában felhalmozódó toxikus cink ion mennyiséggel elpusztítani (Rindlemeyer és mtsai., 2020). Eredményeink és a szakirodalmi adatok alapján elmondható, hogy *C. parapsilosis* fagocitózisa során az J774.2 egér, illetve M1 típusú humán makrofágokban megnő a szabad cink ionok mennyisége, amely a fagocitált gombasejtek köré lokalizálódik, így hozzájárulva a patogén eliminációjához (Botella és mtsai., 2011, Rindlemeyer és mtsai., 2020).

VII.6. Cink transzporterek szerepe *C. parapsilosis* virulenciájában *in vivo* *G. mellonella* és vad típusú egér modellekben

A *G. mellonella* viaszmosy lárvák a humorális és celluláris veleszületett immunválaszok modelljeként használhatók. Trevijano-Contador és Zaragoza szerint a viaszmosy lárvák alkalmasak a veleszületett immunitás gomba fertőzésekre adott válaszána vizsgálatára (Trevijano-Contador és Zaragoza, 2019). A *G. mellonella* lárvákat számos mutáns gomba törzs virulencia tulajdonságainak feltárására, valamint a tápanyaghiány hatásának vizsgálatára használták *C. albicans*al történő fertőzést követően (Desalermos és mtsai., 2015, Banville és mtsai., 2012).

CpZRT21 és a *CpZRC1* deléción gazdaszervezetben kifejtett hatásainak feltárása érdekében viaszmosy lárvákat fertőztünk, majd 14 napon keresztül monitoroztuk a túlélésüket. Kísérleteink során nem tapasztaltunk különbséget a túlélési görbék lefutásában a vad típusú *C. parapsilosis*, illetve a cink transzporter mutánsok között, ezért feltételezhetjük, hogy a *CpZrt21* sejtmembránhoz kötött cink transzporter és a *CpZrc1* vakuoláris membránhoz lokalizált cink importer hiánya nem befolyásolja a *C. parapsilosis* virulenciáját ebben a modellben. Feltételezésünk szerint azonban, magasabb rendű organizmus belső környezetét reálisabban modellezve különböző ion- vagy tápanyaghiányos környezetben nevelt viaszmosy

lárvákkal végzett elemzés feltárhatja a *C. parapsilosis* ezen cink transzportereinek virulenciában betöltött szerepét.

Az *in vivo* rovar modell mellett BALB/c vad típusú egér modellben is megvizsgáltuk a *C. parapsilosis* cink transzporter mutáns törzsek kolonizációs képességét az állatok agyában, májában, lépében és veséjében 3 nappal a fertőzést követően. A *C. albicans*-ban ismert CaZrt2 és CaZrc1 jelentős szerepe ellenére a CpZrt21 és CpZrc1 nem játszik szerepet a patogén szervkolonizáló képességében (Crawford és mtsai., 2018). Azonban megállapítottuk, hogy a *CpZRC1* gén túlzott expressziója szignifikánsan növelte az élesztő sejtek túlélését az egerek lépében. Feltételezésünk szerint, a cink detoxifikálásért felelős CpZrc1 cink transzporter fokozott működése jelentősen megnövelte az ellenálló képességét a *C. parapsilosis* sejteknek a lépben található nagy mennyiségű makrofág fagolizoszómális cink mérgezésen alapuló ölési mechanizmusával szemben. Úgy gondoljuk, hogy a CpZrt21 és CpZrc1 további, virulenciában betöltött szerepének feltérképezésére akár neutropéniás, akár kalprotectin (cink ion kötésére alkalmas fehérje) hiányos egér modell használatával nyílna lehetőség.

VIII. Összefoglalás

Az invazív *Candida* fertőzések napjainkban jelentős egészségügyi problémát jelentenek, különösen a legyengült immunrendszerű egyének számára, ahol a kezeletlen, súlyos tünetekkel járó esetek végzetes kimenetelűek lehetnek. Míg a *C. albicans* okozza a szisztémás fertőzések többségét, az elmúlt évtizedekben rohamos növekedés figyelhető meg a nem-*albicans Candida* fajok elterjedésének esetében (Lamoth et al., 2018). E fajok közül kiemelkedik a *C. parapsilosis*, amely számos nosokomiális fertőzés kialakulásáért felelős, leggyakrabban a koraszülötteket és az alacsony születési súlyú újszülötteket érintő fertőzésekben van jelen, amely esetekben magas halálozási arány ismert (Pammi et al., 2013; Quindos 2014). Míg széleskörű kutatás folyik az opportunist gomba patogén fertőzésekhez vezető fő folyamatok feltérképezésére, a vizsgálatok leggyakrabban a *C. albicans* patogenitásának meghatározó tényezőire összpontosítanak. Ezzel szemben egyes rizikócsoportok és földrajzi területek esetében kiemelkedően gyakran és súlyos tüneteket okozó *C. parapsilosis*-ról, virulencia faktorairól és annak az immunrendszerrel való kölcsönhatásáról kevés információ található a szakirodalomban.

A nehéz- és könnyűfém-ionok döntő szerepet játszanak a sejtnövekedésben, számos metalloprotein kofaktoraként szolgálnak, amelyek nélkülözhetetlenek a komplex metabolikus folyamatokban és a szervezet homeosztázisában (Waldron et al., 2009). Ezen elemek megfelelő egyensúlyának fenntartása esszenciális, mivel szükséges a sejtek megfelelő működéséhez és számos élettani folyamathoz. Az ilyen fémionok közül kiemelt jelentőségű a cink, amely számos enzim fő alkotóeleme, létfontosságú szerepet játszik a veleszületett és adaptív immunrendszerben, jelenléte pedig különböző enzimek és fehérjék működéséhez szükséges, beleértve a szuperoxid-diszmutázokat, alkohol-dehidrogenázokat és transzkripciós faktorokat (Andreini et al., 2009; Eide, 2006). A sejtek cink transzportereket alkalmaznak, hogy a cinket felszívják környezetükből, vagy eltávolítsák a felesleges cinket, biztosítva a sejtek és a test homeosztázisát. A magasabb rendű organizmusok úgy védekeznek a kórokozók ellen, hogy a nyomelemeket, például a cink ionokat fehérjékhez kötik, amelyek így a legtöbb mikroba számára elérhetetlenek lesznek. Emiatt a kórokozóknak rendelkezniük kell cink transzportrendszerrel, hogy hozzáférjenek, szállítsák és felhasználják az így módon kötött cink ionokat. Ezzel szemben a kórokozóknak a cink mérgező is lehet abban az esetben, ha a felesleges, vagy nagy mennyiségű cink ionokat nem képesek intracelluláris raktáraikba szállítani. *M. tuberculosis*-t vagy *C. glabrata*-t fagocitáló és elimináló makrofágokban a

fagolizoszmában a gomba számára toxikus szintre emelkedik a cink ionok koncentrációja, amely a kórokozó pusztulásához vezet (Botella és mtsai., 2011, Riedelberger és mtsai., 2020). A gazdaszervezetben tehát mind a korlátozott mennyiségű cink, mind a patogének számára toxikus koncentráció jelenléte cink védelmi funkciót tölt be, amelyet „nutritional immunity”-nek nevez a szakirodalom (Hood et al., 2012).

Kutatócsoportunk tehát célul tűzte ki a *C. parapsilosis* cink ion transzportereinek *in silico* elemzését, a feltételezett cink ion transzporterek géndeléciós mutánsainak létrehozását, valamint a mutánsok fenotípusos és a transzporterek funkcionális jellemzését. Részletesen vizsgáltuk a *CpZRT21* és *CpZRC1* cink transzporterek jelentőségét *in vitro* egér és humán makrofágokkal történő interakciójuk során, valamint *in vivo* viaszmosy lárvák és egerek fertőzése során.

Eredményeink az alábbiak szerint foglalhatóak össze:

1. A *C. parapsilosis* cink homeosztázisában résztvevő transzporterek azonosítása

Munkánk kezdetén Duncan Wilson-nal kollaborációban *in silico* elemeztük és összehasonlítottuk a *C. albicans* SC5314 és *S. cerevisiae* S288C vad típusú törzsének genomjait a *C. parapsilosis* CLIB 214 vad típusú törzsével, a *C. parapsilosis* cink transzportert kódoló génjeinek azonosítása érdekében. 6 potenciális cink transzporter kódoló gént azonosítottunk, amelyek a cink felvételben (Sc/CaZrt2 ortológ: CPAR2_210740, CPAR2_806710, CPAR2_806720, CaZrt101 ortológ: CPAR2_500170), a cink detoxifikáló folyamataiban (Sc/CaZrc1 ortológ: CPAR2_212100) és a vakuoláris cink ion exportban (ScZrt3 ortológ: CPAR2_212080) potenciálisan szerepet játszanak. Az *in silico* analízis során nem találtunk CaPra1 cinkofór fehérjét kódoló génszakaszhoz hasonlót a *C. parapsilosis* genomjában, amely arra enged következtetni, hogy ez a faj a többi patogéntől eltérően más módon mozgósíthatja, használja fel és raktározza a környezetében található cink ionokat.

Az azonosított gének expresszióját is vizsgáltuk különböző cink ion koncentrációjú, valamint savas vagy neutrális kémhatású környezetben. Általánosságban megállapíthattuk, hogy az azonosított cink felvételben szerepet játszó gének (*CpZRT21*, *CpZRT22* és *CpZRT23*, *CpZRT101*) expressziós profilja a *C. albicans*-ban ismert gének mintázatához nagymértékben hasonlít, ugyanakkor a feltételezetten cink-detoxifikációban és raktározásban szerepet játszó *CpZRC1* egyedi, a vizsgált fajoktól eltérő expressziós mintázatot mutatott. Munkánk következő lépéseként az azonosított 6 potenciális cink transzporter gén homozigóta deléciós mutánsait hoztuk létre, amelyek életképességét különböző hőmérsékleten tenyésztve

változatos stressz körülmények (pl. különböző sejttal és membránstresszorok, savas és lúgos kémhatás, valamint könnyű és nehéz fémek jelenlétében) között vizsgáltuk. Megállapítottuk, hogy a *CpZRT21* gén deléciója alacsony cink koncentrációjú környezetben mutatott növekedési defektust, valamint a *CpZRC1* gén pedig magas cink ion tartalmú körülmény között bizonyult esszenciálisnak.

Összességében mind az *in silico* analízis, mind a potenciális cink transzporter gének expressziójára irányuló kísérletek eredményei szerint feltételezhetjük, hogy a *C. parapsilosis* cinkfelvételi rendszere egyedi és összetettebb, mint az eddig ismert patogéneké.

2. A *CpZRT21* gén és cink felvétel analízise és funkcionális vizsgálata *in vitro* makrofág és *in vivo* modellekben

A savas közegben működő és cink felvételért felelős *Sc/CaZRT2* génhez a *CpZRT21*, *CpZRT22* és *CpZRT23* *C. parapsilosis* gén is nagymértékű hasonlóságot mutatott, utóbbi kettő gén egymás paralógjainak tekinthető. Feltételezhető, hogy ezen gének ilyen mértékű expansziója a Pra1 cinkofór fehérje elvesztésének kompenzációjával magyarázható. A *CpZRT21* (ahogy *C. albicans* esetében ismert) esszenciálisnak bizonyult savas kémhatású cink ion limitált környezetben, azonban fenotípusos vizsgálat során a *CpZRT22* és *CpZRT23* gének nem bizonyultak esszenciálisnak. Kimutattuk, hogy a *CpZRT22* vagy *CpZRT23* gén elvesztése megnövekedett *CpZRT21* expressziót eredményez, amely arra enged következtetni, hogy e 3 gén egymást kölcsönösen befolyásoló, ugyanazon szabályozási folyamat alatt állhat.

In vitro J774.2 egér és humán M1-típusú makrofágokkal végzett fagocitózis és gomba eliminálásra irányuló kísérleteink eredményei szerint megállapítottuk, hogy a *CpZRT21* gén deléciója nagyobb mértékű túlélést biztosít a patogén számára a makrofágokkal történő interakciójuk során a patogén számára a makrofágokkal történő interakciókor. Eredményeink szerint a $\Delta/\Delta CpZRT21$ mutánst részben megvédheti a gomba sejteket a nagy mennyiségű, a gomba számára toxikus fagolizoszómális cink ion koncentrációtól, ugyanis hiányzik belőle a fő plazmamembrán cink importer.

In vivo *G. mellonella* rovar és BALB/c vad típusú egér modellben végzett kísérleteink során megállapítottuk, hogy a *C. albicans*-ban ismert CaZrt2 jelentős szerepe ellenére a *CpZRT21* gén nem befolyásolja a *C. parapsilosis* virulenciáját.

3. A *C. parapsilosis* cink detoxifikáló rendszerének részletes jellemzése, valamint CpZrc1 vakuoláris cink transzporter funkcionális vizsgálata *in vitro* makrofág és *in vivo* modellekben

Munkánk során azonosítottuk a *S. cerevisiae* a *C. albicans* cink-méregtelenítő transzporter ZRC1 ortológot (CPAR2_212100, *CpZRC1*) *C. parapsilosis*-ban. A *CpZRC1* eltávolítása a gomba életképességének csökkenéséhez vezetett 5 mM vagy azt meghaladó cink-szulfát tartalmú környezetben, ami alátámasztja a *CpZrc1* cink detoxifikáló szerepét. Megállapítottuk, hogy a *C. parapsilosis* képes intracelluláris cink ion raktárak, cinkoszómák létrehozására magas cink ion tartalmú közegben, azonban (*C. albicans*-szal ellentétben) *ZRC1* független módon. A *CpZRC1* funkcionális vizsgálata során leírtuk a *CpZrc1* transzporter vakuoláris lokalizációját, amely a pékélesztő és a *Cr. neoformans* cink detoxifikáló rendszeréhez hasonlít.

J774.2 egér és humán M1 típusú makrofágokkal végzett *in vitro* kísérleteink eredményeként elmondható, hogy a *CpZRC1* gén hiánya nem befolyásolja a makrofágok fagocitózisának mértékét, azonban a vakuoláris membrán lokalizált cink-importerrel nem rendelkező Δ/Δ *CpZRC1* sejtek fokozott pusztulását detektáltuk. Eredményeink alapján arra következtettünk, hogy a *C. parapsilosis* sejtek a gomba számára mérgező cink mennyiséggel kell megküzdeniük a vizsgált makrofágokon belül.

In vivo viaszmosy lárvával végzett kísérleteink során nem tapasztaltunk virulencia változást a *CpZRC1* eltávolítását követően, azonban vad típusú egér modell esetében megállapítottuk, hogy a *CpZRC1* gén fokozott működése jelentősen megnövelte az ellenálló képességét a *C. parapsilosis* sejteknek a lépben, amely szerint feltételezhetjük, hogy e szervben található nagy mennyiségű makrofág fagolizoszómális cink mérgezésen alapuló ölési mechanizmusával szemben jelentős szereppel bírhat a *CpZRC1*.

4. Egér és humán makrofágok cink mérgezésen alapuló *C. parapsilosis* elimináló rendszerének jellemzése

A J774.2 és M1 típusú humán makrofágokat érintő fagocitózisra és gomba eliminációra vonatkozó *in vitro* vizsgálataink bebizonyították, hogy a cink felvételért felelős *CpZRT21* gén hiányában a gombasejtek fokozott túlélést mutattak a makrofágokkal való kölcsönhatás során. Ezzel szemben a vakuoláris cink transzporter *CpZrc1* hiánya a kontroll törzshöz képest megnövekedett sejtpusztulást eredményezett mind J774.2, mind M1 típusú makrofágok jelenlétében. Eredményeink arra utalnak, hogy a cinkfelvétel (Δ/Δ *CpZRT21*) és a cink

méregtelenítés (Δ/Δ CpZRC1) hiányos *C. parapsilosis* mutánsokra irányuló hatások oka megegyezik. Megállapítottuk, hogy amikor a makrofágok fagocitizálják a *C. parapsilosis* sejteket, az immunsejtek megnövelik a cink ionok mennyiségét toxikus szintre, amely a patogén eliminációjához vezet. Ez a megfigyelés igaz mind az egér J774.2, mind a humán M1 típusú makrofágokra. Megfigyeltük, hogy a makrofágokon belüli intracelluláris szabad cink ionok már fél órával a fertőzés után együtt lokalizálódnak a *C. parapsilosis* sejtekkel, és ez a jelenség 4 órás inkubáció után egyre gyakoribbá válik. Ezek az eredmények összhangban vannak a legújabb irodalommal, amely alátámasztja azt az elképzelést, hogy a makrofágok képesek növelni a fagolizoszomális cink szintjét, ezáltal elősegítve a kórokozók hatékony eliminációját.

Munkánk elsőként járul hozzá a humán patogén *C. parapsilosis* cink ion homeosztázisának funkcionális elemzéséhez, valamint a gombafaj a cink felvétel és raktározásának makrofágokkal történő interakciójának és virulenciában betöltött szerepének vizsgálatához. Összefoglalva, *C. parapsilosisban* azonosítottunk kettő cink transzportert, amelyeket részletesen funkcionálisan jellemeztünk. *C. albicans*-hoz hasonlóan a *C. parapsilosis* savas környezetben történő növekedését kizárólag CpZrt21 cink transzporter közvetíti. Ebben a fajban azonban két további Zrt2 ortológ is jelen van, amelyek a CpZRT21-gyel megegyező szabályozás alá eshetnek cink ion limitált körülmények között. Megállapítottuk, hogy a *C. parapsilosis* magas cink tartalmú környezeti körülmények között cink raktárakat, ún. cinkoszómákat képez, bár a *C. albicans*-szal ellentétben Zrc1-független módon. Azonosítottunk egy *C. parapsilosis* vakuolárisan lokalizált cink transzportert, a CpZrc1-et, amely erre a fajra egyedi módon nélkülözhetetlen a cink méregtelenítéséhez, és megvédi a *C. parapsilosis* sejteket az egér makrofágok általi pusztulástól. Eredményeink alapján megállapíthatjuk, hogy amint a *C. parapsilosis* sejteket a makrofágok fagocitizálják, cink ionok halmozódnak fel a fagolizoszómában, ami hozzájárulhat a gombasejtek pusztulásához.

IX. Summary

Invasive *Candida* infections pose a significant health threat today, particularly for individuals with compromised immune systems, where untreated cases can be fatal. While *C. albicans* is the primary cause of systemic infections, but a notable surge in non-*albicans* *Candida* species, such as *C. parapsilosis*, has been observed in recent decades (Lamoth et al., 2018). *C. parapsilosis*, known for causing numerous nosocomial infections, is particularly prevalent in cases involving premature babies and low-birth-weight newborns, often leading to high mortality rates (Pammi et al., 2013; Quindos 2014). Despite extensive research on opportunistic fungal pathogenic infections, focus has predominantly been on understanding the determinants of *C. albicans* pathogenicity, leaving a knowledge gap for *C. parapsilosis*, especially regarding its virulence factors and interaction with the immune system.

Heavy and light metal ions serving as cofactors for essential metalloproteins, play a critical role in cell growth and overall body homeostasis (Waldron et al., 2009). Maintaining a proper balance of these ions is crucial for cellular functionality and various physiological processes. Zinc in particular is vital, being a key component of many enzymes and playing a crucial role in both the innate and adaptive immune systems. Cells utilize zinc transporters to regulate zinc absorption and store, ensuring cellular and the host zinc homeostasis. Host organisms protect themselves against pathogens by sequestering trace element (like zinc ion) binding proteins, rendering them inaccessible to most microbes—a phenomenon referred to as "nutritional immunity" (Hood et al., 2012). Consequently, pathogens must possess efficient zinc transport systems to access and utilize bound zinc ions. However, zinc can be toxic to pathogens if they fail to transport excess or substantial amounts of zinc ions to their intracellular stores. In the phagolysosome of macrophages, the concentration of zinc ions increases to a level toxic to pathogens, contributing to the elimination of the pathogen.

In light of the abovementioned information, our research group aimed to conduct an *in silico* analysis of *Candida parapsilosis* zinc ion transporters, create gene deletion mutants for putative zinc ion transporters, and characterize the mutants phenotypically and the transporters functionally. Our investigation specifically focused on the roles of zinc transporters *CpZRT21* and *CpZRC1* during interactions with mouse and human macrophages *in vitro*, as well as in the infection of *Galleria mellonella* larvae and mice *in vivo*.

Our findings can be summarized as follows:

1. Identification of zinc transporters in *C. parapsilosis*

In collaboration with Duncan Wilson, we initiated our investigation by performing *in silico* analyses on the genomes of wild-type strains of *C. albicans* SC5314 and *S. cerevisiae* S288C, alongside *C. parapsilosis* CLIB 214 in order to identify genes responsible for zinc transport in *C. parapsilosis*. Six potential zinc transporter-coding genes were identified, playing roles in zinc uptake (CPAR2_210740, CPAR2_806710, CPAR2_806720, CPAR2_500170), zinc detoxification (CPAR2_212100), and vacuolar zinc ion export (CPAR2_212080). Notably, no homologous gene segment encoding the CaPra1 zincophore protein was found in the *C. parapsilosis* genome, suggesting a unique mechanism for zinc mobilization and utilization compared to other pathogens. We investigated the expression of the identified genes in environments with different zinc ion concentrations and varying pH levels. The gene expression profiles of zinc uptake genes (*CpZRT21*, *CpZRT22*, *CpZRT23*, *CpZRT101*) were found to be similar to known patterns in *C. albicans*. However, *CpZRC1*, implicated in zinc detoxification and storage, exhibited a distinct expression pattern. This uniqueness hinted at a potential divergence in zinc-related processes compared to other species.

As the next step, we have created homozygous deletion mutants of the six identified potential zinc transporter genes. Their viability was assessed under diverse stress conditions, including different temperatures and exposure to various stressors (e.g., cell wall and membrane stressors, acidic and alkaline chemicals, and light and heavy metals). Deletion of the *CpZRT21* gene resulted in a growth defect in acidic low zinc concentration environments, while *CpZRC1* was identified as essential in environments with high zinc ion content.

Combining *in silico* analyses and experimental results, our study suggests that the zinc uptake system in *C. parapsilosis* is unique and more intricate compared to known pathogens. This novel insight enhances our understanding of zinc homeostasis mechanisms in this species.

2. Analysis and functional characterization of the *CpZRT21* gene and the zinc uptake in *in vitro* macrophage and *in vivo* models

The *CpZRT21*, *CpZRT22*, and *CpZRT23* genes of *C. parapsilosis* exhibit substantial similarity to the *Sc/CaZRT2* genes, renowned for functioning in an acidic environment and zinc uptake. *CpZRT22* and *CpZRT23*, sharing a high degree of similarity which can be regarded as paralogs. This gene expansion is presumed to compensate for the absence of the zincophore protein Pra1. While *CpZRT21* is essential in an acidic, zinc-ion-limited setting,

phenotypic studies reveal that *CpZRT22* and *CpZRT23* are not essential. However, the loss of *CpZRT22* or *CpZRT23* results in increased *CpZRT21* expression, indicating potential shared regulatory mechanisms.

In vitro experiments involving phagocytosis and fungal elimination with mouse J774.2 and human M1-type macrophages demonstrate that *CpZRT21* deletion enhances the pathogen's survival during macrophage interaction. The Δ/Δ *CpZRT21* mutant exhibits partial protection against high phagolysosomal zinc ion concentrations, as it lacks the principal plasma membrane zinc importer. However, *in vivo* experiments using *Galleria mellonella* insects and BALB/c wild-type mice reveal that, unlike the well-established role of CaZrt2 in *C. albicans*, *CpZRT21* does not impact the virulence of *C. parapsilosis*.

3. Detailed characterization of the zinc detoxification system in *C. parapsilosis* and functional investigation of the vacuolar zinc transporter *CpZrc1* in *in vitro* macrophage and *in vivo* models

We have identified the *S. cerevisiae* and *C. albicans* ortholog ZRC1 (CPAR2_212100, *CpZRC1*) in *C. parapsilosis* as a zinc detoxification transporter. We observed a reduction in fungal viability upon *CpZRC1* deletion in environments with 5 mM zinc ions or more which underlines the zinc detoxifying role of *CpZrc1*. *C. parapsilosis* demonstrates the capability to form intracellular zinc ion stores, termed zincosomes in high zinc ion environments independent of *ZRC1* (in contrast to *C. albicans*). Our functional studies confirm the vacuolar localization of the *CpZrc1* transporter, resembling the zinc detoxification system in baker's yeast and *Cryptococcus neoformans*.

Our *in vitro* experiments with J774.2 mouse and human M1-type macrophages show that the absence of the *CpZRC1* gene does not impact macrophage phagocytosis but leads to increased death of Δ/Δ *CpZRC1* cells lacking a localized zinc importer in the vacuolar membrane. *In vivo* experiments using *G. mellonella* larvae do not reveal changes in virulence after *CpZRC1* removal. However, in a wild-type mouse model, enhanced *CpZRC1* function significantly boosts resistance to *C. parapsilosis* cells in the spleen. This suggests a substantial role for *CpZRC1* in countering the killing mechanism involving large numbers of macrophages based on phagolysosomal zinc poisoning.

4. Characterization of the *C. parapsilosis* elimination system of murine and human macrophages based on zinc poisoning

Based on our *in vitro* investigations of phagocytosis and fungal elimination involving human macrophages of the J774.2 and M1 type macrophages, we observed distinctive outcomes when *CpZRT21* gene was deleted in *C. parapsilosis*. Specifically, in the absence of the *CpZRT21* gene responsible for zinc uptake, fungal cells exhibited enhanced survival during interaction with macrophages. Conversely, the absence of the vacuolar zinc transporter *CpZrc1* resulted in increased cell death compared to the control strain in the presence of both J774.2 and M1 type macrophages.

Our findings suggest a commonality in the effects of *C. parapsilosis* mutants deficient in zinc uptake (Δ/Δ *CpZRT21*) and zinc detoxification (Δ/Δ *CpZRC1*). When macrophages phagocytize the fungi, it appears that the cells are eliminated with the assistance of toxic levels of zinc ions. This observation observed for both mouse J774.2 and human M1 type macrophages. Additionally, we noted that intracellular free zinc ions within macrophages co-localize with *C. parapsilosis* cells as early as half an hour after infection, with this phenomenon becoming more pronounced after 4 hours of incubation. These results align with recent literature supporting the notion that macrophages have the ability to augment phagolysosomal zinc levels, thereby promoting the effective elimination of pathogens.

Significantly, our study marks the first contribution to the functional analysis of zinc ion homeostasis in the human pathogen *C. parapsilosis*. It also delves into the intricate interplay of zinc uptake and zinc storage with macrophages and their role in virulence. In summary, our research unveiled two functionally characterized zinc transporters in *C. parapsilosis*. While *CpZrt21* exclusively mediates *C. parapsilosis* growth in acidic environments, two additional *Zrt2* orthologs in this species may share regulatory mechanisms with *CpZRT21* under zinc ion-limited conditions. Furthermore, *C. parapsilosis* was found to accumulate zinc stores, termed as zincosomes, in environments with high zinc content independent of *Zrc1* which is distinct as known from *C. albicans*. We identified a vacuolarly localized zinc transporter, *CpZrc1*, crucial for unique zinc detoxification in *C. parapsilosis* that also protecting cells from destruction by murine macrophages. Our results support the notion that upon phagocytosis of murine and M1 type human macrophages, zinc ions accumulate in the phagolysosome and contributing to fungal cell death.

X. Irodalomjegyzék

- Al-Dorzi, H. M., Sakkijha, H., Khan, R., Aldabbagh, T., Toledo, A., Ntinika, P., Al Johani, S. M., & Arabi, Y. M. (2020). Invasive Candidiasis in Critically Ill Patients: A Prospective Cohort Study in Two Tertiary Care Centers. *Journal of Intensive Care Medicine*, 35(6). <https://doi.org/10.1177/0885066618767835>
- Almeida, R. S., Brunke, S., Albrecht, A., Thewes, S., Laue, M., Edwards, J. E., Filler, S. G., & Hube, B. (2008). The hyphal-associated adhesin and invasin Als3 of *Candida albicans* mediates iron acquisition from host ferritin. *PLoS Pathogens*, 4(11). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000217>
- Almeida, R. S., Wilson, D., & Hube, B. (2009). *Candida albicans* iron acquisition within the host. *FEMS Yeast Research*, 9(7), 1000–1012. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2009.00570.x>
- Ameen, M. (2010). Epidemiology of superficial fungal infections. In *Clinics in Dermatology* (Köt. 28, Szám 2). <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2009.12.005>
- Amici, G., Grandesso, S., Mottola, A., Virga, G., Calconi, G., & Bocci, C. (1994). Fungal peritonitis in peritoneal dialysis: critical review of six cases. *Advances in peritoneal dialysis. Conference on Peritoneal Dialysis*, 10.
- Andreini, C., Bertini, I., & Rosato, A. (2009). Metalloproteomes: A bioinformatic approach. *Accounts of Chemical Research*, 42(10), 1471–1479. <https://doi.org/10.1021/ar900015x>
- Ardon, O., Bussey, H., Philpott, C., Ward, D. M., Davis-Kaplan, S., Verroneau, S., Jiang, B., & Kaplan, J. (2001). Identification of a *Candida albicans* ferrichrome transporter and its characterization by expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry*, 276(46), 43049–43055. <https://doi.org/10.1074/jbc.M108701200>
- Arendrup, M. C., Bruun, B., Christensen, J. J., Fuursted, K., Johansen, H. K., Kjældgaard, P., Knudsen, J. D., Kristensen, L., Møller, J., Nielsen, L., Rosenvinge, F. S., Røder, B., Schønheyder, H. C., Thomsen, M. K., & Truberg, K. (2011). National surveillance of fungemia in Denmark (2004 to 2009). *Journal of Clinical Microbiology*, 49(1). <https://doi.org/10.1128/JCM.01811-10>
- Askwith, C. C., de Silva, D., & Kaplan, J. (1996). Molecular biology of iron acquisition in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular microbiology*, 20(0950–382; 1), 27–34.
- Assunção, L. do P., Moraes, D., Soares, L. W., Silva-Bailão, M. G., de Siqueira, J. G., Baeza, L. C., Bão, S. N., Soares, C. M. de A., & Bailão, A. M. (2020). Insights Into *Histoplasma capsulatum* Behavior on Zinc Deprivation. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.573097>
- Banville, N., Browne, N., & Kavanagh, K. (2012). Effect of nutrient deprivation on the susceptibility of *Galleria mellonella* larvae to infection. *Virulence*, 3(6). <https://doi.org/10.4161/viru.21972>
- Baynes, K., Holtzman, J. D., & Volpe, B. T. (1986). Components of visual attention: Alterations in response pattern to visual stimuli following parietal lobe infarction. *Brain*, 109(1). <https://doi.org/10.1093/brain/109.1.99>
- Bensen, E. S., Martin, S. J., Li, M., Berman, J., & Davis, D. A. (2004). Transcriptional profiling in *Candida albicans* reveals new adaptive responses to extracellular pH and functions for Rim101p. *Molecular Microbiology*, 54(5). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04350.x>
- Bertini, A., Zoppo, M., Lombardi, L., Rizzato, C., De Carolis, E., Vella, A., Torelli, R., Sanguinetti, M., & Tavanti, A. (2016). Targeted gene disruption in *Candida parapsilosis* demonstrates a role for

CPAR2_404800 in adhesion to a biotic surface and in a murine model of ascending urinary tract infection. *Virulence*, 7(2). <https://doi.org/10.1080/21505594.2015.1112491>

Bird, A. J., Blankman, E., Stillman, D. J., Eide, D. J., & Winge, D. R. (2004). The Zap1 transcriptional activator also acts as a repressor by binding downstream of the TATA box in ZRT2. *EMBO Journal*, 23(5). <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600122>

Bird, A. J., & Wilson, S. (2020). Zinc homeostasis in the secretory pathway in yeast. In *Current Opinion in Chemical Biology* (Köt. 55). <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2020.01.011>

Biswal, M., Rudramurthy, S. M., Jain, N., Shamanth, A. S., Sharma, D., Jain, K., Yaddanapudi, L. N., & Chakrabarti, A. (2017). Controlling a possible outbreak of *Candida auris* infection: lessons learnt from multiple interventions. *Journal of Hospital Infection*, 97(4). <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2017.09.009>

Bonassoli, L. A., Bertoli, M., & Svidzinski, T. I. E. (2005). High frequency of *Candida parapsilosis* on the hands of healthy hosts. *Journal of Hospital Infection*, 59(2), 159–162. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2004.06.033>

Botella, H., Peyron, P., Levillain, F., Poincloux, R., Poquet, Y., Brandli, I., Wang, C., Tailleux, L., Tilleul, S., Charrire, G. M., Waddell, S. J., Foti, M., Lugo-Villarino, G., Gao, Q., Maridonneau-Parini, I., Butcher, P. D., Castagnoli, P. R., Gicquel, B., De Chastellier, C., & Neyrolles, O. (2011). Mycobacterial P1-Type ATPases mediate resistance to Zinc poisoning in human macrophages. *Cell Host and Microbe*, 10(3), 248–259. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2011.08.006>

Brown, G. D., Denning, D. W., Gow, N. A. R., Levitz, S. M., Netea, M. G., & White, T. C. (2012). Hidden killers: Human fungal infections. In *Science Translational Medicine* (Köt. 4, Szám 165). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3004404>

Butler, G., Rasmussen, M. D., Lin, M. F., Santos, M. A. S., Sakthikumar, S., Munro, C. A., Rheinbay, E., Grabherr, M., Forche, A., Reedy, J. L., Agraftioti, I., Arnaud, M. B., Bates, S., Brown, A. J. P., Brunke, S., Costanzo, M. C., Fitzpatrick, D. A., De Groot, P. W. J., Harris, D., ... Cuomo, C. A. (2009). Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight *Candida* genomes. *Nature*, 459(7247), 657–662. <https://doi.org/10.1038/nature08064>

Caggiano, G., Lovero, G., De Giglio, O., Barbuti, G., Montagna, O., Laforgia, N., & Montagna, M. T. (2017). Candidemia in the Neonatal Intensive Care Unit: A Retrospective, Observational Survey and Analysis of Literature Data. *BioMed Research International*, 2017(ii). <https://doi.org/10.1155/2017/7901763>

Castanheira, M., Messer, S. A., Rhomberg, P. R., & Pfaller, M. A. (2016). Antifungal susceptibility patterns of a global collection of fungal isolates: Results of the SENTRY Antifungal Surveillance Program (2013). *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 85(2). <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2016.02.009>

Cavalheiro, M., & Teixeira, M. C. (2018). *Candida* Biofilms: Threats, challenges, and promising strategies. In *Frontiers in Medicine* (Köt. 5, Szám FEB). <https://doi.org/10.3389/fmed.2018.00028>

Chakraborty, T., Thuer, E., Heijink, M., Tóth, R., Bodai, L., & Vágvölgyi, C. (2018). Eicosanoid biosynthesis influences the virulence of *Candida parapsilosis*. *Virulence*, 9(1), 1019–1035. <https://doi.org/10.1080/21505594.2018.1475797>

Chalmers, C., Gaur, S., Chew, J., Wright, T., Kumar, A., Mathur, S., Wan, W. Y., Gould, I. M., Leanord, A., & Bal, A. M. (2011). Epidemiology and management of candidaemia - a retrospective, multicentre study in five hospitals in the UK. *Mycoses*, 54(6). <https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2011.02027.x>

- Chandra, J., & Mukherjee, P. K. (2015). Candida Biofilms: Development, Architecture, and Resistance . *Microbiology Spectrum*, 3(4). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.mb-0020-2015>
- Chapman, B., Slavin, M., Marriott, D., Halliday, C., Kidd, S. E., Arthur, I., Bak, N., Heath, C., Kennedy, K., Morrissey, C. O., Sorrell, T., van Hal, S., Keighley, C., Goeman, E., Underwood, N., Hajkiewicz, K., Hofmeyr, A., Leung, M., Macesic, N., ... Menon, V. (2017). Changing epidemiology of candidaemia in Australia. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 72(4). <https://doi.org/10.1093/jac/dkw422>
- Cheng, S. C., Joosten, L. A. B., Kullberg, B. J., & Netea, M. G. (2012). Interplay between Candida albicans and the mammalian innate host defense. In *Infection and Immunity* (Köt. 80, Szám 4). <https://doi.org/10.1128/IAI.06146-11>
- Chistiakov, D. A., Bobryshev, Y. V., Nikiforov, N. G., Elizova, N. V., Sobenin, I. A., & Orekhov, A. N. (2015). Macrophage phenotypic plasticity in atherosclerosis: The associated features and the peculiarities of the expression of inflammatory genes. In *International Journal of Cardiology* (Köt. 184, Szám 1). <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2015.03.055>
- Chistiakov, D. A., Myasoedova, V. A., Revin, V. V., Orekhov, A. N., & Bobryshev, Y. V. (2018). The impact of interferon-regulatory factors to macrophage differentiation and polarization into M1 and M2. In *Immunobiology* (Köt. 223, Szám 1). <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2017.10.005>
- Cho, M., Hu, G., Caza, M., Horianopoulos, L. C., Kronstad, J. W., & Jung, W. H. (2018). Vacuolar zinc transporter Zrc1 is required for detoxification of excess intracellular zinc in the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Journal of Microbiology*, 56(1). <https://doi.org/10.1007/s12275-018-7475-y>
- Chowdhary, A., Anil Kumar, V., Sharma, C., Prakash, A., Agarwal, K., Babu, R., Dinesh, K. R., Karim, S., Singh, S. K., Hagen, F., & Meis, J. F. (2014). Multidrug-resistant endemic clonal strain of *Candida auris* in India. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 33(6). <https://doi.org/10.1007/s10096-013-2027-1>
- Citiulo, F., Jacobsen, I. D., Miramón, P., Schild, L., Brunke, S., Zipfel, P., Brock, M., Hube, B., & Wilson, D. (2012). *Candida albicans* scavenges host zinc via Pra1 during endothelial invasion. *PLoS Pathogens*, 8(6). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002777>
- Clemens, S., Bloss, T., Vess, C., Neumann, D., Nies, D. H., & Zur Nieden, U. (2002). A transporter in the endoplasmic reticulum of *Schizosaccharomyces pombe* cells mediates zinc storage and differentially affects transition metal tolerance. *Journal of Biological Chemistry*, 277(20). <https://doi.org/10.1074/jbc.M201031200>
- Cleveland, A. A., Harrison, L. H., Farley, M. M., Hollick, R., Stein, B., Chiller, T. M., Lockhart, S. R., & Park, B. J. (2015). 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*, 10(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120452>
- Colin, S., Chinetti-Gbaguidi, G., & Staels, B. (2014). Macrophage phenotypes in atherosclerosis. *Immunological Reviews*, 262(1). <https://doi.org/10.1111/imr.12218>
- Colvin, R. A., Holmes, W. R., Fontaine, C. P., & Maret, W. (2010). Cytosolic zinc buffering and muffling: Their role in intracellular zinc homeostasis. *Metallomics*, 2(5), 306–317. <https://doi.org/10.1039/b926662c>
- Crawford, A. C., Lehtovirta-Morley, L. E., Alamir, O., Niemiec, M. J., Alawfi, B., Alsarraf, M., Skrahina, V., Costa, A. C. B. P., Anderson, A., Yellagunda, S., Ballou, E. R., Hube, B., Urban, C. F.,

- & Wilson, D. (2018). Biphasic zinc compartmentalisation in a human fungal pathogen. *PLoS Pathogens*, 14(5), 979–985. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007013>
- Cuéllar-Cruz, M., López-Romero, E., Villagómez-Castro, J. C., & Ruiz-Baca, E. (2012). *Candida* species: New insights into biofilm formation. In *Future Microbiology* (Köt. 7, Szám 6). <https://doi.org/10.2217/fmb.12.48>
- Dagdeviren, M., Cerikcioglu, N., & Karavus, M. (2005). Acid proteinase, phospholipase and adherence properties of *Candida parapsilosis* strains isolated from clinical specimens of hospitalised patients. *Mycoses*, 48(5). <https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2005.01145.x>
- Dancis, A., Yuan, D. S., Haile, D., Askwith, C., Eide, D., Moehle, C., Kaplan, J., & Klausner, R. D. (1994). Molecular characterization of a copper transport protein in *S. cerevisiae*: An unexpected role for copper in iron transport. *Cell*, 76(2). [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90345-X](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90345-X)
- de Assis, L. J., Bain, J. M., Liddle, C., Leaves, I., Hacker, C., da Silva, R. P., Yuecel, R., Bebes, A., Stead, D., Childers, D. S., Pradhan, A., Mackenzie, K., Lagree, K., Larcombe, D. E., Ma, Q., Avelar, G. M., Netea, M. G., Erwig, L. P., Mitchell, A. P., ... Brown, A. J. P. (2022). Nature of b-1,3-Glucan-Exposing Features on *Candida albicans* Cell Wall and Their Modulation. *mBio*, 13(6). <https://doi.org/10.1128/mbio.02605-22>
- Denning, D. W., & Bromley, M. J. (2015). Infectious Disease. How to bolster the antifungal pipeline. *Science (New York, N.Y.)*, 347(6229).
- Desalermos, A., Tan, X., Rajamuthiah, R., Arvanitis, M., Wang, Y., Li, D., Kourkoumpetis, T. K., Fuchs, B. B., & Mylonakis, E. (2015). A multi-host approach for the systematic analysis of virulence factors in *Cryptococcus neoformans*. *Journal of Infectious Diseases*, 211(2). <https://doi.org/10.1093/infdis/jiu441>
- Douglas, L. J. (2003). *Candida* biofilms and their role in infection. In *Trends in Microbiology* (Köt. 11, Szám 1). [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(02\)00002-1](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(02)00002-1)
- Eide, D. J. (2006). Zinc transporters and the cellular trafficking of zinc. In *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* (Köt. 1763, Szám 7, o. 711–722). <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.03.005>
- Ellison, R. T., & Giehl, T. J. (1991). Killing of gram-negative bacteria by lactoferrin and lysozyme. *Journal of Clinical Investigation*, 88(4), 1080–1091. <https://doi.org/10.1172/JCI115407>
- Epelman, S., Lavine, K. J., & Randolph, G. J. (2014). Origin and Functions of Tissue Macrophages. In *Immunity* (Köt. 41, Szám 1). <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.06.013>
- Ericsson, J., Chryssanthou, E., Klingspor, L., Johansson, A. G., Ljungman, P., Svensson, E., & Sjölin, J. (2013). *Candidaemia* in Sweden: A nationwide prospective observational survey. *Clinical Microbiology and Infection*, 19(4). <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12111>
- Faria-Ramos, I., Neves-Maia, J., Ricardo, E., Santos-Antunes, J., Silva, A. T., Costa-de-Oliveira, S., Cantón, E., Rodrigues, A. G., & Pina-Vaz, C. (2014). Species distribution and in vitro antifungal susceptibility profiles of yeast isolates from invasive infections during a Portuguese multicenter survey. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 33(12). <https://doi.org/10.1007/s10096-014-2194-8>
- Fradin, C., De Groot, P., MacCallum, D., Schaller, M., Klis, F., Odds, F. C., & Hube, B. (2005). Granulocytes govern the transcriptional response, morphology and proliferation of *Candida albicans* in human blood. *Molecular Microbiology*, 56(2). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04557.x>

- Gácsér, A., Trofa, D., Schäfer, W., & Nosanchuk, J. D. (2007). Targeted gene deletion in *Candida parapsilosis* demonstrates the role of secreted lipase in virulence. *Journal of Clinical Investigation*, 117(10), 3049–3058. <https://doi.org/10.1172/JCI32294>
- Gaither, L. A., & Eide, D. J. (2001). *Eukaryotic zinc transporters and their regulation* BT - *Zinc Biochemistry, Physiology, and Homeostasis: Recent Insights and Current Trends*. 65–84. https://doi.org/10.1007/978-94-017-3728-9_5
- Garcia-Rubio, R., de Oliveira, H. C., Rivera, J., & Trevijano-Contador, N. (2020). The Fungal Cell Wall: *Candida*, *Cryptococcus*, and *Aspergillus* Species. In *Frontiers in Microbiology* (Köt. 10). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02993>
- Gentilotti, E., De Nardo, P., Cremonini, E., Górska, A., Mazzaferri, F., Canziani, L. M., Hellou, M. M., Olchowski, Y., Poran, I., Leeflang, M., Villacian, J., Goossens, H., Paul, M., & Tacconelli, E. (2022). Diagnostic accuracy of point-of-care tests in acute community-acquired lower respiratory tract infections. A systematic review and meta-analysis. In *Clinical Microbiology and Infection* (Köt. 28, Szám 1). <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2021.09.025>
- Ghaddar, N., Anastasiadis, E., Halimeh, R., Ghaddar, A., Dhar, R., Alfouzan, W., Yusef, H., & El Chaar, M. (2020). Prevalence and antifungal susceptibility of *Candida albicans* causing vaginal discharge among pregnant women in Lebanon. *BMC Infectious Diseases*, 20(1). <https://doi.org/10.1186/s12879-019-4736-2>
- Gilbert, J. A., Blaser, M. J., Caporaso, J. G., Jansson, J. K., Lynch, S. V., & Knight, R. (2018). Current understanding of the human microbiome. *Nature Medicine*, 24(4). <https://doi.org/10.1038/nm.4517>
- Gow, N. A. R., & Netea, M. G. (2016). Medical mycology and fungal immunology: New research perspectives addressing a major world health challenge. In *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* (Köt. 371, Szám 1709). <https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0462>
- Guinea, J. (2014). Global trends in the distribution of *Candida* species causing candidemia. In *Clinical Microbiology and Infection* (Köt. 20, Szám 6). <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12539>
- Guinea, J., Zaragoza, Ó., Escribano, P., Martín-Mazuelos, E., Pemán, J., Sánchez-Reus, F., & Cuenca-Estrella, M. (2014). Molecular identification and antifungal susceptibility of yeast isolates causing fungemia collected in a population-based study in Spain in 2010 and 2011. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(3). <https://doi.org/10.1128/AAC.02155-13>
- Gunisova, S., Elboher, E., Nosek, J., Gorkovoy, V., Brown, Y., Lucier, J. F., Laterreur, N., Wellinger, R. J., Tzfati, Y., & Tomaska, L. (2009). Identification and comparative analysis of telomerase RNAs from *Candida* species reveal conservation of functional elements. *RNA*, 15(4). <https://doi.org/10.1261/rna.1194009>
- Harrington, R., Kindermann, S. L., Hou, Q., Taylor, R. J., Azie, N., & Horn, D. L. (2017). Candidemia and invasive candidiasis among hospitalized neonates and pediatric patients. *Current Medical Research and Opinion*, 33(10). <https://doi.org/10.1080/03007995.2017.1354824>
- Heymann, P., Gerads, M., Schaller, M., Dromer, F., Winkelmann, G., & Ernst, J. F. (2002). The siderophore iron transporter of *Candida albicans* (Sit1p/Arn1p) mediates uptake of ferrichrome-type siderophores and is required for epithelial invasion. *Infection and Immunity*, 70(9), 5246–5255. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.9.5246-5255.2002>
- Holland, L. M., Schröder, M. S., Turner, S. A., Taff, H., Andes, D., Grózer, Z., Gácsér, A., Ames, L., Haynes, K., Higgins, D. G., & Butler, G. (2014). Comparative Phenotypic Analysis of the Major Fungal Pathogens *Candida parapsilosis* and *Candida albicans*. *PLoS Pathogens*, 10(9). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004365>

- Hood, M. I., & Skaar, E. P. (2012). Nutritional immunity: Transition metals at the pathogen-host interface. In *Nature Reviews Microbiology* (Köt. 10, Szám 8, o. 525–537).
<https://doi.org/10.1038/nrmicro2836>
- Horváth, P., Nosanchuk, J. D., Hamari, Z., Vágvolgyi, C., & Gácsér, A. (2012). The identification of gene duplication and the role of secreted aspartyl proteinase 1 in *Candida parapsilosis* virulence. *Journal of Infectious Diseases*, 205(6), 923–933. <https://doi.org/10.1093/infdis/jir873>
- Howard, D. H. (1999). Acquisition, transport, and storage of iron by pathogenic fungi. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(3), 394–404.
- Huang, X., Li, Y., Fu, M., & Xin, H. B. (2018). Polarizing macrophages in vitro. *Methods in Molecular Biology*, 1784(May), 119–126. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7837-3_12
- Ivashkiv, L. B. (2018). IFN γ : signalling, epigenetics and roles in immunity, metabolism, disease and cancer immunotherapy. In *Nature Reviews Immunology* (Köt. 18, Szám 9).
<https://doi.org/10.1038/s41577-018-0029-z>
- Jacobi, M. S., Gershan, W. M., & Thach, B. T. (1991). Effect of pentobarbital on spontaneous recovery from hypoxic apnoea in mice. *Respiration Physiology*, 84(3). [https://doi.org/10.1016/0034-5687\(91\)90128-6](https://doi.org/10.1016/0034-5687(91)90128-6)
- Jakeya, H., Yamada, K., Kaneko, Y., Yanagihara, K., Tateda, K., Maesaki, S., Takesue, Y., Tomono, K., Kadota, J. I., Kaku, M., Miyazaki, Y., Kamei, K., Shibuya, K., Niki, Y., Yoshida, M., & Sei, Y. (2018). National trends in the distribution of candida species causing candidemia in Japan from 2003 to 2014: A report by the epidemiological investigation committee for human mycoses in Japan. *Medical Mycology Journal*, 59(1). <https://doi.org/10.3314/mmj.17-00014>
- Kambe, T., Taylor, K. M., & Fu, D. (2021). Zinc transporters and their functional integration in mammalian cells. In *Journal of Biological Chemistry* (Köt. 296).
<https://doi.org/10.1016/J.JBC.2021.100320>
- Katragkou, A., Chatzimoschou, A., Simitopoulou, M., Dalakiouridou, M., Diza-Mataftsi, E., Tsantali, C., & Roilides, E. (2008). Differential activities of newer antifungal agents against *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(1).
<https://doi.org/10.1128/AAC.00856-07>
- Kecskem, A., & Nosanchuk, J. D. (2015). *Candida parapsilosis* produces prostaglandins from exogenous arachidonic acid and OLE2 is not required for their synthesis. *January*, 85–92.
- Knight, S. A. B., Vilaire, G., Lesuisse, E., & Dancis, A. (2005). Iron acquisition from transferrin by *Candida albicans* depends on the reductive pathway. *Infection and Immunity*, 73(9).
<https://doi.org/10.1128/IAI.73.9.5482-5492.2005>
- Kolaczowska, E., & Kubes, P. (2013). Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. In *Nature Reviews Immunology* (Köt. 13, Szám 3). <https://doi.org/10.1038/nri3399>
- Kosman, D. J. (2003). Molecular mechanisms of iron uptake in fungi. In *Molecular Microbiology* (Köt. 47, Szám 5). <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03368.x>
- Köhler, J. R., Hube, B., Puccia, R., Casadevall, A., & Perfect, J. R. (2017). Fungi that Infect Humans. *Microbiology Spectrum*, 5(3). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.funk-0014-2016>
- Krust, B., El Khoury, D., Nondier, I., Soundaramourty, C., & Hovanessian, A. G. (2011). Targeting surface nucleolin with multivalent HB-19 and related Nucant pseudopeptides results in distinct inhibitory mechanisms depending on the malignant tumor cell type. *BMC Cancer*, 11.
<https://doi.org/10.1186/1471-2407-11-333>

- Kuhn, D. M., Chandra, J., Mukherjee, P. K., & Ghannoum, M. A. (2002). Comparison of biofilms formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic surfaces. *Infection and Immunity*, 70(2). <https://doi.org/10.1128/IAI.70.2.878-888.2002>
- Kuznets, G., Vigonsky, E., Weissman, Z., Lalli, D., Gildor, T., Kauffman, S. J., Turano, P., Becker, J., Lewinson, O., & Kornitzer, D. (2014). A Relay Network of Extracellular Heme-Binding Proteins Drives *C. albicans* Iron Acquisition from Hemoglobin. *PLoS Pathogens*, 10(10). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004407>
- Laffey, S. F., & Butler, G. (2005). Phenotype switching affects biofilm formation by *Candida parapsilosis*. *Microbiology*, 151(4). <https://doi.org/10.1099/mic.0.27739-0>
- Lan, C. Y., Rodarte, G., Murillo, L. A., Jones, T., Davis, R. W., Dungan, J., Newport, G., & Agabian, N. (2004). Regulatory networks affected by iron availability in *Candida albicans*. *Molecular Microbiology*, 53(5). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04214.x>
- Lesuisse, E., Blaiseau, P. L., Dancis, A., & Camadro, J. M. (2001). Siderophore uptake and use by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*, 147(2). <https://doi.org/10.1099/00221287-147-2-289>
- Lesuisse, E., Knight, S. A. B., Camadro, J. M., & Dancis, A. (2002). Siderophore uptake by *Candida albicans*: Effect of serum treatment and comparison with *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 19(4), 329–340. <https://doi.org/10.1002/yea.840>
- Lesuisse, E., Simon-Casteras, M., & Labbe, P. (1998). Siderophore-mediated iron uptake in *Saccharomyces cerevisiae*: The SIT1 gene encodes a ferrioxamine B permease that belongs to the major facilitator superfamily. *Microbiology*, 144(12). <https://doi.org/10.1099/00221287-144-12-3455>
- Levin, A. S., Costa, S. F., Mussi, N. S., Basso, M., Sinto, S. I., MacHado, C., Geiger, D. C., Villares, M. C. B., Schreiber, A. Z., Barone, A. A., & Branchini, M. L. M. (1998). *Candida parapsilosis* fungemia associated with implantable and semi-implantable central venous catheters and the hands of healthcare workers. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 30(4). [https://doi.org/10.1016/S0732-8893\(98\)00006-6](https://doi.org/10.1016/S0732-8893(98)00006-6)
- Łoboda, D., & Rowińska-Zyrek, M. (2017). Zinc binding sites in Pra1, a zincophore from: *Candida albicans*. *Dalton Transactions*, 46(40), 13695–13703. <https://doi.org/10.1039/c7dt01675a>
- Lockhart, S. R., Etienne, K. A., Vallabhaneni, S., Farooqi, J., Chowdhary, A., Govender, N. P., Colombo, A. L., Calvo, B., Cuomo, C. A., Desjardins, C. A., Berkow, E. L., Castanheira, M., Magobo, R. E., Jabeen, K., Asghar, R. J., Meis, J. F., Jackson, B., Chiller, T., & Litvintseva, A. P. (2017). Simultaneous emergence of multidrug-resistant *Candida auris* on 3 continents confirmed by whole-genome sequencing and epidemiological analyses. *Clinical Infectious Diseases*, 64(2). <https://doi.org/10.1093/cid/ciw691>
- Logue, M. E., Wong, S., Wolfe, K. H., & Butler, G. (2005). A genome sequence survey shows that the pathogenic yeast *Candida parapsilosis* has a defective MTL1 allele at its mating type locus. In *Eukaryotic Cell* (Köt. 4, Szám 6). <https://doi.org/10.1128/EC.4.6.1009-1017.2005>
- Lombardi, L., Salzberg, L. I., Cinnéide, E. Ó., O'Brien, C., & Butler, G. (2019). Large-scale generation of mutant strains in *Candida parapsilosis* using CRISPR-Cas9. *Access Microbiology*, 1(1A). <https://doi.org/10.1099/acmi.ac2019.po0436>
- Lopes, J. P., & Lionakis, M. S. (2022). Pathogenesis and virulence of *Candida albicans*. In *Virulence* (Köt. 13, Szám 1). <https://doi.org/10.1080/21505594.2021.2019950>

- Lupetti, A., Tavanti, A., Davini, P., Ghelardi, E., Corsini, V., Merusi, I., Boldrini, A., Campa, M., & Senesi, S. (2002). Horizontal transmission of *Candida parapsilosis* candidemia in a neonatal intensive care unit. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(7). <https://doi.org/10.1128/JCM.40.7.2363-2369.2002>
- MacDiarmid, C. W. (2000). Zinc transporters that regulate vacuolar zinc storage in *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO Journal*, 19(12), 2845–2855. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.12.2845>
- MacDiarmid, C. W., Milanick, M. A., & Eide, D. J. (2003). Induction of the ZRC1 metal tolerance gene in zinc-limited yeast confers resistance to zinc shock. *Journal of Biological Chemistry*, 278(17). <https://doi.org/10.1074/jbc.M300568200>
- Maguire, S. L., ÓhÉigeartaigh, S. S., Byrne, K. P., Schröder, M. S., O’Gaora, P., Wolfe, K. H., & Butler, G. (2013). Comparative genome analysis and gene finding in *Candida* species using CGOB. *Molecular Biology and Evolution*, 30(6). <https://doi.org/10.1093/molbev/mst042>
- Mamouei, Z., Zeng, G., Wang, Y. M., & Wang, Y. (2017). *Candida albicans* possess a highly versatile and dynamic high-affinity iron transport system important for its commensal-pathogenic lifestyle. *Molecular Microbiology*, 106(6). <https://doi.org/10.1111/mmi.13864>
- Marnach, M. L., Wygant, J. N., & Casey, P. M. (2022). Evaluation and Management of Vaginitis. In *Mayo Clinic Proceedings* (Köt. 97, Szám 2). <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2021.09.022>
- Martins, N., Ferreira, I. C. F. R., Barros, L., Silva, S., & Henriques, M. (2014). Candidiasis: Predisposing Factors, Prevention, Diagnosis and Alternative Treatment. In *Mycopathologia* (Köt. 177, Szám 5–6). <https://doi.org/10.1007/s11046-014-9749-1>
- Matzinger, P. (2002). The danger model: A renewed sense of self. In *Science* (Köt. 296, Szám 5566, o. 301–305). <https://doi.org/10.1126/science.1071059>
- Mitchell, K. F., Zarnowski, R., & Andes, D. R. (2016). Fungal Super Glue: The Biofilm Matrix and Its Composition, Assembly, and Functions. In *PLoS Pathogens* (Köt. 12, Szám 9). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005828>
- Mitchell, K. F., Zarnowski, R., Sanchez, H., Edward, J. A., Reinicke, E. L., Nett, J. E., Mitchell, A. P., & Andes, D. R. (2015). Community participation in biofilm matrix assembly and function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(13). <https://doi.org/10.1073/pnas.1421437112>
- Miyabe, S., Izawa, S., & Inoue, Y. (2001). The Zrc1 is involved in zinc transport system between vacuole and cytosol in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 282(1), 79–83. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.4522>
- Mukherjee, P. K., Chandra, J., Kuhn, D. M., & Ghannoum, M. A. (2003). Mechanism of fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilms: Phase-specific role of efflux pumps and membrane sterols. *Infection and Immunity*, 71(8). <https://doi.org/10.1128/IAI.71.8.4333-4340.2003>
- Mukherjee, P. K., Chandra, J., Retuerto, M., Sikaroodi, M., Brown, R. E., Jurevic, R., Salata, R. A., Lederman, M. M., Gillevet, P. M., & Ghannoum, M. A. (2014). Oral Mycobiome Analysis of HIV-Infected Patients: Identification of *Pichia* as an Antagonist of Opportunistic Fungi. *PLoS Pathogens*, 10(3). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003996>
- Murray, P. J., & Wynn, T. A. (2011). Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. In *Nature Reviews Immunology* (Köt. 11, Szám 11). <https://doi.org/10.1038/nri3073>
- Muskett, H., Shahin, J., Eyres, G., Harvey, S., Rowan, K., & Harrison, D. (2011). Risk factors for invasive fungal disease in critically ill adult patients: A systematic review. *Critical Care*, 15(6). <https://doi.org/10.1186/cc10574>

- Nasser, L., Weissman, Z., Pinsky, M., Amartely, H., Dvir, H., & Kornitzer, D. (2016). Structural basis of haem-iron acquisition by fungal pathogens. *Nature Microbiology*, 1. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.156>
- Nathan, C., & Cunningham-Bussel, A. (2013). Beyond oxidative stress: An immunologist's guide to reactive oxygen species. In *Nature Reviews Immunology* (Köt. 13, Szám 5). <https://doi.org/10.1038/nri3423>
- Navalkele, B. D., Revankar, S., & Chandrasekar, P. (2017). *Candida auris*: a worrisome, globally emerging pathogen. In *Expert Review of Anti-Infective Therapy* (Köt. 15, Szám 9). <https://doi.org/10.1080/14787210.2017.1364992>
- Németh, T., D. Nosanchuk, J., Vagvolgyi, C., & Gacser, A. (2021). Enhancing the chemical transformation of *Candida parapsilosis*. *Virulence*, 12(1), 937–950. <https://doi.org/10.1080/21505594.2021.1893008>
- Nemeth, T., Papp, C., Vagvolgyi, C., Chakraborty, T., & Gacser, A. (2020). Identification and Characterization of a Neutral Locus for Knock-in Purposes in *C. parapsilosis*. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01194>
- Németh, T., Tóth, A., Szenzenstein, J., Horváth, P., Nosanchuk, J. D., Grózer, Z., Tóth, R., Papp, C., Hamari, Z., Vágvolgyi, C., & Gácser, A. (2013). Characterization of Virulence Properties in the *C. parapsilosis* Sensus Lato Species. *PLoS ONE*, 8(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068704>
- Netea, M. G., Brown, G. D., Kullberg, B. J., & Gow, N. A. R. (2008). An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system. In *Nature Reviews Microbiology* (Köt. 6, Szám 1). <https://doi.org/10.1038/nrmicro1815>
- Netea, M. G., Joosten, L. A. B., Van Der Meer, J. W. M., Kullberg, B. J., & Van De Veerdonk, F. L. (2015). Immune defence against *Candida* fungal infections. In *Nature Reviews Immunology* (Köt. 15, Szám 10). <https://doi.org/10.1038/nri3897>
- Neyrolles, O. (2021). Antimicrobial zinc toxicity in Mφs: ZnT1 pays the toll. In *Journal of Leukocyte Biology* (Köt. 109, Szám 2). <https://doi.org/10.1002/JLB.4CE0520-256R>
- Nguyen, L. N., Hamari, Z., Kadereit, B., Trofa, D., Agovino, M., Martinez, L. R., Gacser, A., Silver, D. L., & Nosanchuk, J. D. (2011). *Candida parapsilosis* fat storage-inducing transmembrane (FIT) protein 2 regulates lipid droplet formation and impacts virulence. *Microbes and Infection*, 13(7). <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2011.02.009>
- Nguyen, L. N., & Nosanchuk, J. D. (2011). Lipid droplet formation protects against gluco/lipotoxicity in *Candida parapsilosis*: An essential role of fatty acid desaturase Ole1. *Cell Cycle*, 10(18). <https://doi.org/10.4161/cc.10.18.16932>
- Nguyen, L. N., Trofa, D., & Nosanchuk, J. D. (2009). Fatty acid synthase impacts the pathobiology of *Candida parapsilosis* in vitro and during mammalian infection. *PLoS ONE*, 4(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008421>
- Noble, S. M., & Johnson, A. D. (2005). Strains and strategies for large-scale gene deletion studies of the diploid human fungal pathogen *Candida albicans*. *Eukaryotic Cell*, 4(2), 298–309. <https://doi.org/10.1128/EC.4.2.298-309.2005>
- Noverr, M. C., Phare, S. M., Toews, G. B., Coffey, M. J., & Huffnagle, G. B. (2001). *albicans* Produce Immunomodulatory Prostaglandins. 69(5), 2957–2963. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.5.2957>
- Noverr, M. C., Toews, G. B., & Huffnagle, G. B. (2002). Production of Prostaglandins and Leukotrienes by Pathogenic Fungi. 70(1), 400–402. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.1.400>

- Nucci, M., Queiroz-Telles, F., Alvarado-Matute, T., Tiraboschi, I. N., Cortes, J., Zurita, J., Guzman-Blanco, M., Santolaya, M. E., Thompson, L., Sifuentes-Osornio, J., Echevarria, J. I., & Colombo, A. L. (2013). Epidemiology of Candidemia in Latin America: A Laboratory-Based Survey. *PLoS ONE*, 8(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059373>
- Núñez-Beltrán, A., López-Romero, E., & Cuéllar-Cruz, M. (2017). Identification of proteins involved in the adhesion of *Candida* species to different medical devices. *Microbial Pathogenesis*, 107. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.04.009>
- Pal, R., Chakraborty, B., Nath, A., Singh, L. M., Ali, M., Rahman, D. S., Ghosh, S. K., Basu, A., Bhattacharya, S., Baral, R., & Sengupta, M. (2016). Noble metal nanoparticle-induced oxidative stress modulates tumor associated macrophages (TAMs) from an M2 to M1 phenotype: An in vitro approach. *International Immunopharmacology*, 38. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2016.06.006>
- Pammi, M., Holland, L., Butler, G., Gacser, A., & Bliss, J. M. (2013). *Candida parapsilosis* is a significant neonatal pathogen: a systematic review and meta-analysis. *Pediatric Infectious Disease Journal*, 32(5). <https://doi.org/10.1097/INF.0b013e3182863a1c>
- Pappas, P. G., Kauffman, C. A., Andes, D., Benjamin, D. K., Calandra, T. F., Edwards, J. E., Filler, S. G., Fisher, J. F., Kullberg, B. J., Ostrosky-Zeichner, L., Reboli, A. C., Rex, J. H., Walsh, T. J., & Sobel, J. D. (2009). Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 Update by the Infectious Diseases Society of America. In *Clinical Infectious Diseases* (Köt. 48, Szám 5). <https://doi.org/10.1086/596757>
- Park, B. J., Wannemuehler, K. A., Marston, B. J., Govender, N., Pappas, P. G., & Chiller, T. M. (2009). Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. *AIDS*, 23(4). <https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e328322ffac>
- Patel, K., Butala, S., Khan, T., Suvarna, V., Sherje, A., & Dravyakar, B. (2018). Mycobacterial siderophore: A review on chemistry and biology of siderophore and its potential as a target for tuberculosis. In *European Journal of Medicinal Chemistry* (Köt. 157). <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.08.030>
- Pathakumari, B., Liang, G., & Liu, W. (2020). Immune defence to invasive fungal infections: A comprehensive review. In *Biomedicine and Pharmacotherapy* (Köt. 130). <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110550>
- Pfaller, M. A., Andes, D. R., Diekema, D. J., Horn, D. L., Reboli, A. C., Rotstein, C., Franks, B., & Azie, N. E. (2014). Epidemiology and outcomes of invasive candidiasis due to non-albicans species of *Candida* in 2,496 patients: Data from the Prospective Antifungal Therapy (PATH) registry 2004-2008. *PLoS ONE*, 9(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0101510>
- Pfaller, M. A., & Diekema, D. J. (2007). Epidemiology of invasive candidiasis: A persistent public health problem. In *Clinical Microbiology Reviews* (Köt. 20, Szám 1, o. 133–163). <https://doi.org/10.1128/CMR.00029-06>
- Pfaller, M. A., Diekema, D. J., Turnidge, J. D., Castanheira, M., & Jones, R. N. (2019). Twenty years of the SENTRY Antifungal Surveillance Program: Results for *Candida* species from 1997-2016. *Open Forum Infectious Diseases*, 6. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofy358>
- Pfaller, M. A., Moet, G. J., Messer, S. A., Jones, R. N., & Castanheira, M. (2011). Geographic variations in species distribution and echinocandin and azole antifungal resistance rates among *Candida* bloodstream infection isolates: Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2008 to 2009). *Journal of Clinical Microbiology*, 49(1). <https://doi.org/10.1128/JCM.01398-10>

- Pittman, K., & Kubes, P. (2013). Damage-associated molecular patterns control neutrophil recruitment. In *Journal of Innate Immunity* (Köt. 5, Szám 4). <https://doi.org/10.1159/000347132>
- Pryszcz, L. P., Németh, T., Gácsér, A., & Gabaldón, T. (2013). Unexpected genomic variability in clinical and environmental strains of the pathogenic yeast *Candida parapsilosis*. *Genome Biology and Evolution*, 5(12). <https://doi.org/10.1093/gbe/evt185>
- Qian, Q., Jutila, M. A., Van Rooijen, N., & Cutler, J. E. (1994). Elimination of mouse splenic macrophages correlates with increased susceptibility to experimental disseminated candidiasis. *The Journal of Immunology*, 152(10). <https://doi.org/10.4049/jimmunol.152.10.5000>
- Quintin, J., Voigt, J., van der Voort, R., Jacobsen, I. D., Verschueren, I., Hube, B., Giamarellos-Bourboulis, E. J., van der Meer, J. W. M., Joosten, L. A. B., Kurzai, O., & Netea, M. G. (2014). Differential role of NK cells against *Candida albicans* infection in immunocompetent or immunocompromised mice. *European Journal of Immunology*, 44(8). <https://doi.org/10.1002/eji.201343828>
- Rajni, E., Chaudhary, P., Garg, V. K., Sharma, R., & Malik, M. (2022). A complete clinico-epidemiological and microbiological profile of candidemia cases in a tertiary-care hospital in Western India. *Antimicrobial Stewardship and Healthcare Epidemiology*, 2(1). <https://doi.org/10.1017/ash.2021.235>
- Ramage, G., Martínez, J. P., & López-Ribot, J. L. (2006). *Candida* biofilms on implanted biomaterials: A clinically significant problem. *FEMS Yeast Research*, 6(7). <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2006.00117.x>
- Ramírez-Zavala, B., Krüger, I., Dunker, C., Jacobsen, I. D., & Morschhäuser, J. (2022). The protein kinase Ire1 has a Hac1-independent essential role in iron uptake and virulence of *Candida albicans*. *PLoS Pathogens*, 18(2). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010283>
- Ratledge, C., & Dover, L. G. (2000). Iron metabolism in pathogenic bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 54, 881–941. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.54.1.881>
- Reales-Calderón, J. A., Aguilera-Montilla, N., Corbí, Á. L., Molero, G., & Gil, C. (2014). Proteomic characterization of human proinflammatory M1 and anti-inflammatory M2 macrophages and their response to *Candida albicans*. *Proteomics*, 14(12). <https://doi.org/10.1002/pmic.201300508>
- Ricciotti, E., & Fitzgerald, G. A. (2011). Prostaglandins and inflammation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 31(5). <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.110.207449>
- Riedelberger, M., Penninger, P., Tscherner, M., Hadriga, B., Brunnhofer, C., Jenull, S., Stoiber, A., Bourgeois, C., Petryshyn, A., Glaser, W., Limbeck, A., Lynes, M. A., Schabbauer, G., Weiss, G., & Kuchler, K. (2020). Type I Interferons Ameliorate Zinc Intoxication of *Candida glabrata* by Macrophages and Promote Fungal Immune Evasion. *iScience*, 23(5), 101121. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.101121>
- Rodriguez, L., Bustamante, B., Huaroto, L., Agurto, C., Illescas, R., Ramirez, R., Diaz, A., & Hidalgo, J. (2017). A multi-centric study of *Candida* bloodstream infection in Lima-Callao, Peru: Species distribution, antifungal resistance and clinical outcomes. *PLoS ONE*, 12(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175172>
- Romani, L. (2004). Immunity to fungal infections. In *Nature Reviews Immunology* (Köt. 4, Szám 1). <https://doi.org/10.1038/nri1255>
- Romani, L., Mencacci, A., Cenci, E., Spaccapelo, R., Schiaffella, E., Tonnetti, L., Puccetti, P., & Bistoni, F. (1993). Natural killer cells do not play a dominant role in CD4⁺ subset differentiation in

Candida albicans-infected mice. *Infection and Immunity*, 61(9). <https://doi.org/10.1128/iai.61.9.3769-3774.1993>

Rosati, D., Bruno, M., Jaeger, M., Ten Oever, J., & Netea, M. G. (2020). Recurrent vulvovaginal candidiasis: An immunological perspective. In *Microorganisms* (Köt. 8, Szám 2). <https://doi.org/10.3390/microorganisms8020144>

Ruchel, R., Boning, B., & Borg, M. (1986). Characterization of a secretory proteinase of *Candida parapsilosis* and evidence for the absence of the enzyme during infection in vitro. *Infection and Immunity*, 53(2). <https://doi.org/10.1128/iai.53.2.411-419.1986>

Ruiz-Gaitán, A., Martínez, H., Moret, A. M., Calabuig, E., Tasias, M., Alastruey-Izquierdo, A., Zaragoza, Ó., Mollar, J., Frassetto, J., Salavert-Lletí, M., Ramírez, P., López-Hontangas, J. L., & Pemán, J. (2019). Detection and treatment of *Candida auris* in an outbreak situation: risk factors for developing colonization and candidemia by this new species in critically ill patients. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 17(4). <https://doi.org/10.1080/14787210.2019.1592675>

Ruiz-Gaitán, A., Moret, A. M., Tasias-Pitarch, M., Aleixandre-López, A. I., Martínez-Morel, H., Calabuig, E., Salavert-Lletí, M., Ramírez, P., López-Hontangas, J. L., Hagen, F., Meis, J. F., Mollar-Maseras, J., & Pemán, J. (2018). An outbreak due to *Candida auris* with prolonged colonisation and candidaemia in a tertiary care European hospital. *Mycoses*, 61(7). <https://doi.org/10.1111/myc.12781>

Sahu, S. R., Bose, S., Singh, M., Kumari, P., Dutta, A., Utkalaja, B. G., Patel, S. K., & Acharya, N. (2022). Vaccines against candidiasis: Status, challenges and emerging opportunity. In *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* (Köt. 12). <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.1002406>

Sai, S., Holland, L. M., Mcgee, C. F., Lynch, D. B., & Butler, G. (2011). Evolution of mating within the *Candida parapsilosis* species group. *Eukaryotic Cell*, 10(4). <https://doi.org/10.1128/EC.00276-10>

Sandini, S., La Valle, R., Deaglio, S., Malavasi, F., Cassone, A., & De Bernardis, F. (2011). A highly immunogenic recombinant and truncated protein of the secreted aspartic proteases family (rSap2t) of *Candida albicans* as a mucosal anticandidal vaccine. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 62(2). <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2011.00802.x>

Schelenz, S., Hagen, F., Rhodes, J. L., Abdolrasouli, A., Chowdhary, A., Hall, A., Ryan, L., Shackleton, J., Trimlett, R., Meis, J. F., Armstrong-James, D., & Fisher, M. C. (2016). First hospital outbreak of the globally emerging *Candida auris* in a European hospital. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, 5(1). <https://doi.org/10.1186/s13756-016-0132-5>

Shapouri-Moghaddam, A., Mohammadian, S., Vazini, H., Taghadosi, M., Esmaeili, S. A., Mardani, F., Seifi, B., Mohammadi, A., Afshari, J. T., & Sahebkar, A. (2018). Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. In *Journal of Cellular Physiology* (Köt. 233, Szám 9). <https://doi.org/10.1002/jcp.26429>

Sica, A., & Mantovani, A. (2012). Macrophage plasticity and polarization: In vivo veritas. In *Journal of Clinical Investigation* (Köt. 122, Szám 3). <https://doi.org/10.1172/JCI59643>

Silva, S., Henriques, M., Martins, A., Oliveira, R., Williams, D., & Azeredo, J. (2009). Biofilms of non-*Candida albicans* *Candida* species: Quantification, structure and matrix composition. *Medical Mycology*, 47(7). <https://doi.org/10.3109/13693780802549594>

Silva, S., Rodrigues, C. F., Araújo, D., Rodrigues, M. E., & Henriques, M. (2017). *Candida* species biofilms' antifungal resistance. In *Journal of Fungi* (Köt. 3, Szám 1). <https://doi.org/10.3390/jof3010008>

- Silva-Dias, A., Miranda, I. M., Branco, J., Monteiro-Soares, M., Pina-Vaz, C., & Rodrigues, A. G. (2015). Adhesion, biofilm formation, cell surface hydrophobicity, and antifungal planktonic susceptibility: Relationship among *Candida* spp. *Frontiers in Microbiology*, 6(MAR). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00205>
- Simm, C., Lahner, B., Salt, D., LeFurgey, A., Ingram, P., Yandell, B., & Eide, D. J. (2007). *Saccharomyces cerevisiae* vacuole in zinc storage and intracellular zinc distribution. *Eukaryotic Cell*, 6(7), 1166–1177. <https://doi.org/10.1128/EC.00077-07>
- Singh, D. K., Németh, T., Papp, A., Tóth, R., Lukácsi, S., Heidingsfeld, O., Dostal, J., Vágvölgyi, C., Bajtay, Z., Józsi, M., & Gácsér, A. (2019). Functional Characterization of Secreted Aspartyl Proteases in *Candida parapsilosis*. *mSphere*, 4(4). <https://doi.org/10.1128/msphere.00484-19>
- Singh, R., & Parija, S. C. (2012). *Candida parapsilosis*: An emerging fungal pathogen. In *Indian Journal of Medical Research* (Köt. 136, Szám 4, o. 671–673). <https://doi.org/10.1128/CMR.00013-08>
- Skaar, E. P. (2010). The battle for iron between bacterial pathogens and their vertebrate hosts. *PLoS Pathogens*, 6(8), 1–2. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000949>
- Skrzypek, M. S., Binkley, J., Binkley, G., Miyasato, S. R., Simison, M., & Sherlock, G. (2017). The *Candida* Genome Database (CGD): Incorporation of Assembly 22, systematic identifiers and visualization of high throughput sequencing data. *Nucleic Acids Research*, 45(D1). <https://doi.org/10.1093/nar/gkw924>
- Solomon, S. L., Khabbaz, R. F., Parker, R. H., Anderson, R. L., Geraghty, M. A., Furman, R. M., & Martone, W. J. (1984). An outbreak of *Candida parapsilosis* bloodstream infections in patients receiving parenteral nutrition. *Journal of Infectious Diseases*, 149(1). <https://doi.org/10.1093/infdis/149.1.98>
- Southall, P. J., Boxer, G. M., Bagshawe, K. D., Hole, N., Bromley, M., & Stern, P. L. (1990). Immunohistological distribution of 5T4 antigen in normal and malignant tissues. *British Journal of Cancer*, 61(1). <https://doi.org/10.1038/bjc.1990.20>
- Spellberg, B. (2011). Vaccines for invasive fungal infections. *F1000 Medicine Reports*, 3(1). <https://doi.org/10.3410/M3-13>
- Sridharan, R., Cavanagh, B., Cameron, A. R., Kelly, D. J., & O'Brien, F. J. (2019). Material stiffness influences the polarization state, function and migration mode of macrophages. *Acta Biomaterialia*, 89. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.02.048>
- Stocks, C. J., von Pein, J. B., Curson, J. E. B., Rae, J., Phan, M. D., Foo, D., Bokil, N. J., Kambe, T., Peters, K. M., Parton, R. G., Schembri, M. A., Kapetanovic, R., & Sweet, M. J. (2021). Frontline Science: LPS-inducible SLC30A1 drives human macrophage-mediated zinc toxicity against intracellular *Escherichia coli*. *Journal of Leukocyte Biology*, 109(2). <https://doi.org/10.1002/JLB.2HI0420-160R>
- Strollo, S., Lionakis, M. S., Adjemian, J., Steiner, C. A., & Prevots, D. R. (2017). Epidemiology of hospitalizations associated with invasive candidiasis, United States, 2002-2012. *Emerging Infectious Diseases*, 23(1). <https://doi.org/10.3201/eid2301.161198>
- Subramanian Vignesh, K., & Deepe, G. S. (2016). Immunological orchestration of zinc homeostasis: The battle between host mechanisms and pathogen defenses. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 611. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2016.02.020>

- Tancrède, C. (1992). Role of human microflora in health and disease. In *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* (Köt. 11, Szám 11, o. 1012–1015).
<https://doi.org/10.1007/BF01967791>
- Taraszevska, A. (1988). Ultrastructure of axons in disturbed CNS myelination in pt rabbit. *Neuropatologia Polska*, 26(3).
- Tavanti, A., Davidson, A. D., Gow, N. A. R., Maiden, M. C. J., & Odds, F. C. (2005). *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* groups II and III. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(1). <https://doi.org/10.1128/JCM.43.1.284-292.2005>
- Tedeschi, S., Tumietto, F., Giannella, M., Bartoletti, M., Cristini, F., Cioni, G., Ambretti, S., Carretto, E., Sambri, V., Sarti, M., & Viale, P. (2016). Epidemiology and outcome of candidemia in internal medicine wards: A regional study in Italy. *European Journal of Internal Medicine*, 34.
<https://doi.org/10.1016/j.ejim.2016.08.020>
- Ting, J. Y., Roberts, A., Synnes, A., Canning, R., Bodani, J., Monterossa, L., & Shah, P. S. (2018). Invasive Fungal Infections in Neonates in Canada: Epidemiology and Outcomes. *Pediatric Infectious Disease Journal*, 37(11). <https://doi.org/10.1097/INF.0000000000001968>
- Toda, M., Williams, S. R., Berkow, E. L., Farley, M. M., Harrison, L. H., Bonner, L., Marceaux, K. M., Hollick, R., Zhang, A. Y., Schaffner, W., Lockhart, S. R., Jackson, B. R., & Vallabhaneni, S. (2019). Population-Based Active Surveillance for Culture-Confirmed Candidemia — Four Sites, United States, 2012–2016. *MMWR Surveillance Summaries*, 68(8).
<https://doi.org/10.15585/mmwr.ss6808a1>
- Tosun, I., Akyuz, Z., Guler, N. C., Gulmez, D., Bayramoglu, G., Kaklikkaya, N., Arikan-Akdagli, S., & Aydin, F. (2013). Distribution, virulence attributes and antifungal susceptibility patterns of *Candida parapsilosis* complex strains isolated from clinical samples. *Medical Mycology*, 51(5).
<https://doi.org/10.3109/13693786.2012.745953>
- Tóth, R., Cabral, V., Thuer, E., Böhner, F., Németh, T., Papp, C., Nimrichter, L., Molnár, G., Vágvolgyi, C., Gabaldón, T., Nosanchuk, J. D., & Gácsér, A. (2018). Investigation of *Candida parapsilosis* virulence regulatory factors during host-pathogen interaction. *Scientific Reports*, 8(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19453-4>
- Tóth, R., Nosek, J., Mora-Montes, H. M., Gabaldon, T., Bliss, J. M., Nosanchuk, J. D., Turner, S. A., Butler, G., Vágvolgyi, C., & Gácsér, A. (2019). *Candida parapsilosis*: From genes to the bedside. *Clinical Microbiology Reviews*, 32(2), 1–38. <https://doi.org/10.1128/CMR.00111-18>
- Trevijano-Contador, N., & Zaragoza, O. (2019). Immune response of *Galleria mellonella* against human fungal pathogens. In *Journal of Fungi* (Köt. 5, Szám 1). <https://doi.org/10.3390/jof5010003>
- Trofa, D., Agovino, M., Stehr, F., Schäfer, W., Rykunov, D., Fiser, A., Hamari, Z., Nosanchuk, J. D., & Gácsér, A. (2009). Acetylsalicylic acid (aspirin) reduces damage to reconstituted human tissues infected with *Candida* species by inhibiting extracellular fungal lipases. *Microbes and Infection*, 11(14–15). <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2009.08.007>
- Tsay, S. V., Mu, Y., Williams, S., Epton, E., Nadle, J., Bamberg, W. M., Barter, D. M., Johnston, H. L., Farley, M. M., Harb, S., Thomas, S., Bonner, L. A., Harrison, L. H., Hollick, R., Marceaux, K., Mody, R. K., Pattee, B., Shrum Davis, S., Phipps, E. C., ... Vallabhaneni, S. (2020). Burden of Candidemia in the United States, 2017. *Clinical Infectious Diseases*, 71(9).
<https://doi.org/10.1093/cid/ciaa193>

- Urban, C. F., Reichard, U., Brinkmann, V., & Zychlinsky, A. (2006). Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* and hyphal forms. *Cellular Microbiology*, 8(4). <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2005.00659.x>
- Van Asbeck, E. C., Clemons, K. V., & Stevens, D. A. (2009). *Candida parapsilosis*: A review of its epidemiology, pathogenesis, clinical aspects, typing and antimicrobial susceptibility *Candida parapsilosis*: A review van Asbeck et al. In *Critical Reviews in Microbiology* (Köt. 35, Szám 4). <https://doi.org/10.3109/10408410903213393>
- Van Asbeck, E. C., Huang, Y. C., Markham, A. N., Clemons, K. V., & Stevens, D. A. (2007). *Candida parapsilosis* fungemia in neonates: Genotyping results suggest healthcare workers hands as source, and review of published studies. *Mycopathologia*, 164(6). <https://doi.org/10.1007/s11046-007-9054-3>
- Vengatesan, K., Mahajan, S. B., Sanjeevikumar, P., Mangrulkar, R., Kala, V., & Pragadeeswaran. (2018). Performance Analysis of Gene Expression Data Using Mann–Whitney U Test. *Lecture Notes in Electrical Engineering*, 442. https://doi.org/10.1007/978-981-10-4762-6_67
- Viola, A., Munari, F., Sánchez-Rodríguez, R., Scolaro, T., & Castegna, A. (2019). The metabolic signature of macrophage responses. In *Frontiers in Immunology* (Köt. 10, Szám JULY). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01462>
- Waldron, K. J., Rutherford, J. C., Ford, D., & Robinson, N. J. (2009). Metalloproteins and metal sensing. In *Nature* (Köt. 460, Szám 7257). <https://doi.org/10.1038/nature08300>
- Wang, G. (2014). Human antimicrobial peptides and proteins. In *Pharmaceuticals* (Köt. 7, Szám 5). <https://doi.org/10.3390/ph7050545>
- Wang, L. xun, Zhang, S. xi, Wu, H. juan, Rong, X. lu, & Guo, J. (2019). M2b macrophage polarization and its roles in diseases. In *Journal of Leukocyte Biology* (Köt. 106, Szám 2). <https://doi.org/10.1002/JLB.3RU1018-378RR>
- Wang, N., Liang, H., & Zen, K. (2014). Molecular mechanisms that influence the macrophage M1-M2 polarization balance. In *Frontiers in Immunology* (Köt. 5, Szám NOV). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00614>
- Wang, X., van de Veerdonk, F. L., & Netea, M. G. (2016). Basic Genetics and Immunology of *Candida* Infections. In *Infectious Disease Clinics of North America* (Köt. 30, Szám 1). <https://doi.org/10.1016/j.idc.2015.10.010>
- Wang, Y. (2015). Looking into *Candida albicans* infection, host response, and antifungal strategies. In *Virulence* (Köt. 6, Szám 4). <https://doi.org/10.1080/21505594.2014.1000752>
- Wehmeier, S., Morrison, E., Plato, A., Raab, A., Feldmann, J., Bedekovic, T., Wilson, D., & Brand, A. C. (2020). Multi trace element profiling in pathogenic and non-pathogenic fungi. *Fungal Biology*, 124(5). <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2020.03.001>
- Weissman, Z., & Kornitzer, D. (2004). A family of *Candida* cell surface haem-binding proteins involved in haemin and haemoglobin-iron utilization. *Molecular Microbiology*, 53(4). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04199.x>
- Weissman, Z., Shemer, R., Conibear, E., & Kornitzer, D. (2008). An endocytic mechanism for haemoglobin-iron acquisition in *Candida albicans*. *Molecular Microbiology*, 69(1). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06277.x>
- Weissman, Z., Shemer, R., & Kornitzer, D. (2002). Deletion of the copper transporter CaCCC2 reveals two distinct pathways for iron acquisition in *Candida albicans*. *Molecular Microbiology*, 44(6). <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02976.x>

- Whitney, P. G., Bär, E., Osorio, F., Rogers, N. C., Schraml, B. U., Deddouche, S., LeibundGut-Landmann, S., & Reis e Sousa, C. (2014). Syk Signaling in Dendritic Cells Orchestrates Innate Resistance to Systemic Fungal Infection. *PLoS Pathogens*, 10(7). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004276>
- Wijnants, S., Vreys, J., & Van Dijck, P. (2022). Interesting antifungal drug targets in the central metabolism of *Candida albicans*. In *Trends in Pharmacological Sciences* (Köt. 43, Szám 1). <https://doi.org/10.1016/j.tips.2021.10.003>
- Wilson, D. (2015). An evolutionary perspective on zinc uptake by human fungal pathogens. *Metallomics*, 7(6), 979–985. <https://doi.org/10.1039/c4mt00331d>
- Wu, J., Gao, W., Tang, Q., Yu, Y., You, W., Wu, Z., Fan, Y., Zhang, L., Wu, C., Han, G., Zuo, X., Zhang, Y., Chen, Z., Ding, W., Li, X., Lin, F., Shen, H., Tang, J., Zhang, Y., & Wang, X. (2021). M2 Macrophage-Derived Exosomes Facilitate HCC Metastasis by Transferring α M β 2 Integrin to Tumor Cells. In *Hepatology* (Köt. 73, Szám 4). <https://doi.org/10.1002/hep.31432>
- Wu, Y., & Hirschi, K. K. (2021). Tissue-Resident Macrophage Development and Function. In *Frontiers in Cell and Developmental Biology* (Köt. 8). <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.617879>
- Wynn, T. A., Chawla, A., & Pollard, J. W. (2013). Macrophage biology in development, homeostasis and disease. In *Nature* (Köt. 496, Szám 7446). <https://doi.org/10.1038/nature12034>
- Xiao, M., Chen, S. C. A., Kong, F., Xu, X. L., Yan, L., Kong, H. S., Fan, X., Hou, X., Cheng, J. W., Zhou, M. L., Li, Y., Yu, S. Y., Huang, J. J., Zhang, G., Yang, Y., Zhang, J. J., Duan, S. M., Kang, W., Wang, H., & Xu, Y. C. (2020). Distribution and antifungal susceptibility of candida species causing candidemia in China: An update from the CHIF-NET Study. *Journal of Infectious Diseases*, 221. <https://doi.org/10.1093/INFDIS/JIZ573>
- Xiao, M., Sun, Z. Y., Kang, M., Guo, D. W., Liao, K., Chen, S. C. A., Kong, F., Fan, X., Cheng, J. W., Hou, X., Zhou, M. L., Li, Y., Yu, S. Y., Huang, J. J., Wang, H., Xu, Y. C., Xiao, Y. L., Chen, Z. J., Guo, P. H., ... Guo, Y. Y. (2018). Five-year national surveillance of invasive candidiasis: Species distribution and azole susceptibility from the China hospital invasive fungal surveillance net (CHIF-NET) study. *Journal of Clinical Microbiology*, 56(7). <https://doi.org/10.1128/JCM.00577-18>
- Xu, D., & Lu, W. (2020). Defensins: A Double-Edged Sword in Host Immunity. In *Frontiers in Immunology* (Köt. 11). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00764>
- Yatim, K. M., & Lakkis, F. G. (2015). A brief journey through the immune system. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 10(7), 1274–1281. <https://doi.org/10.2215/CJN.10031014>
- Yun, C. W., Tiedeman, J. S., Moore, R. E., & Philpott, C. C. (2000). Siderophore-iron uptake in *Saccharomyces cerevisiae*: Identification of ferrichrome and fusarinine transporters. *Journal of Biological Chemistry*, 275(21), 16354–16359. <https://doi.org/10.1074/jbc.M001456200>
- Zhang, Q., Liu, F., Zeng, M., Mao, Y., & Song, Z. (2021). Drug repurposing strategies in the development of potential antifungal agents. In *Applied Microbiology and Biotechnology* (Köt. 105, Szám 13). <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11407-7>
- Zhang, Y., & Zheng, J. (2020). Bioinformatics of metalloproteins and metalloproteomes. In *Molecules* (Köt. 25, Szám 15). <https://doi.org/10.3390/molecules25153366>
- Zhao, H., & Eide, D. (1996). The yeast ZRT1 gene encodes the zinc transporter protein of a high-affinity uptake system induced by zinc limitation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(6), 2454–2458. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.6.2454>

Ziegler, L., Terzulli, A., Gaur, R., McCarthy, R., & Kosman, D. J. (2011). Functional characterization of the ferroxidase, permease high-affinity iron transport complex from *Candida albicans*. *Molecular Microbiology*, 81(2). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07704.x>

Zizzo, G., Hilliard, B. A., Monestier, M., & Cohen, P. L. (2012). Efficient Clearance of Early Apoptotic Cells by Human Macrophages Requires M2c Polarization and MerTK Induction. *The Journal of Immunology*, 189(7). <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1200662>

XI. Köszönetnyilvánítás

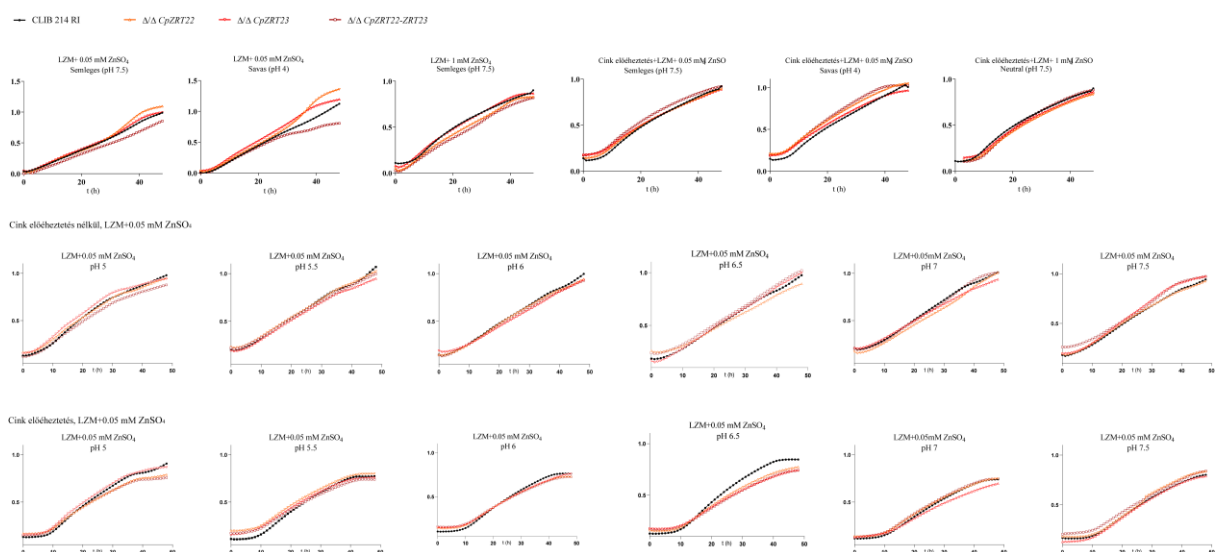
Legelső helyen szeretném megköszönni a családomnak: szüleimnek, nagyszüleimnek, húgomnak és páromnak a sok év alatt tanúsított feltétel nélküli szeretet, türelmet és mindennemű támogatást. Nagy erőt kaptam tőletek, amit igyekeztem nagy felelősséggel használni.

Szeretnék köszönetet mondani Prof. Dr. Vágvölgyi Csaba egyetemi tanárnak, a SZTE TTIK Mikrobiológiai Tanszék vezetőjének, hogy helyet biztosított számomra és lehetővé tette, hogy a Mikrobiológiai Tanszéken dolgozhassak nem csak a PhD munkám, de már a szakdolgozatom és a diplomamunkám elkészítése során is. Hálával tartozom Dr. Duncan Wilson-nak, az exeteri „Medical Research Council Centre for Medical Mycology” vezető kutatójának, aki a dolgozat alapjául szolgáló tudományos kérdéssel kapcsolatosan kutatócsoportunkkal kezdeményezett kollaborációt és a munka során értékes tanácsokkal látott el. Köszönettel tartozok témavezetőmnek és mentoromnak, Prof. Dr. Gácsér Attila egyetemi tanárnak. Hálás vagyok a bizalomért, a rengeteg szakmai tanácsért és feltétel nélküli támogatásért, hogy lehetővé tette számos konferencia szereplésem és megismerkedhettem a szakterületünk közösségével. De legfőképpen azért, mert létrehozott egy olyan értékes szakmai (és baráti) közeget a kutatócsoportban az évek során, ami lehetővé tette a folyamatos, magas szintű szakmai fejlődést, valamint ahova öröm bejárni dolgozni, ez hatalmas kincs. Természetesen köszönettel tartozok Dr. Németh Tibornak, akinek a témavezetése mellett volt szerencsém dolgozni a kezdetektől. Egy kiváló ember és munktárs, akinek köszönöm a szakmai tanácsait, türelmét és idejét, amit rám fordított, illetve a tudást, amit átadott. Nem túlzok azzal, hogy tőle tanultam a legtöbbet valaha. Bohner Flórának is köszönöm. A barátságát: az együtt töltött értékes időt, a poénokat, hogy ott voltunk egymásnak miközben felnőttünk a laborban. Hálás vagyok, hogy ennyit együtt dolgoztunk és szinte bármilyen problémát megoldottunk. Köszönöm a közös munkát Dr. Papp Csabának is, akitől a mikroszkópia és áramlási citometria széleskörű tudását sajátíthattam el, illetve az általános, mindennapi kedvességét és jókedvét! Köszönöm az évek során a segítségét Dr. Jankovics Ferencnek, aki szaktudásával és tanácsaival segítette a konfokális mikroszkópos képet elkészítését.

Odaadó munkáját, segítségét és a mindennapi barátságos és támogató légkört köszönöm a Mikrobiológiai Tanszék és a 301-es számú labor minden jelenlegi és egyes

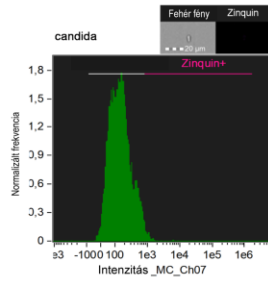
egykori dolgozójának: Dr. Tóth Renátának, Szenzenstein Juditnak, Veres Évának, Novák Ádámnak, Szilovics Zórának, Csikós Máténak, Tasi Zsoltnak, Horváth Mártonnak, Balogh Éva Noéminek, Florabelle Ruano Cabarrubias-nak, valamint Kocsis Katicának, Drabbant Gergőnek, Balla Benediktának, Halmos Emesének, Dr. Csonka Katalinnak, Dr. Tóth Adélnak, Dr. Zajta Eriknek, Dr. Pál Sárának, Dr. Vadovics Máténak, Dr. Tanmoy Chakraborty-nak, és Dr. Dhirend Singh-nek. Szerencsésnek érzem magam, hogy tagja lehettem ennek a labornak csaknem 10 éven át, mindig meleg szívvel fogok emlékezni az együtt töltött időre.

XII. Függelék

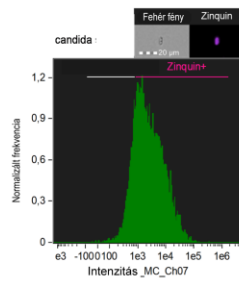


Függelék 1. ábra. A *CpZRT22* és *CpZRT23* deléciós mutánsok növekedésének jellemzése különböző mennyiségű cink-szulfáttal kiegészített tápközegekben.

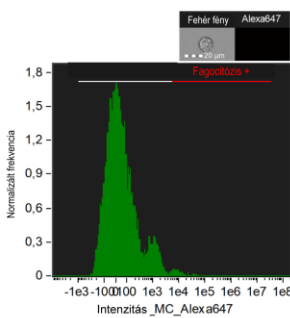
A 6. ábrával megegyező kísérleti összeállítás: (A) a törzsek növekedési kinetikája savas (pH 4) és semleges (pH 7,5) kémhatású környezetben, különböző koncentrációjú cink-szulfáttal (0,05 mM, 1 mM) kiegészítve, cink előéheztetéssel vagy anélkül. (B) A panelek a növekedés kinetikáját mutatják cink előéheztetés nélkül. (C) Cink-előéheztetést követően alacsony koncentrációjú cink-szulfáttal (0,05 mM) kiegészített LZW tápközegben, pH 5 és pH 7,5 közötti kémhatás mellett felvett növekedési görbék. A kísérleteket három biológiai és három technikai párhuzamosban végeztük.



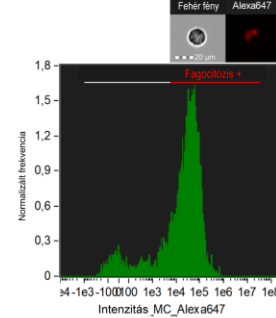
Populáció	Sejtszám	Kapuzott %	Medián
Candida	9995	100	137,65
Zinquin +	102	1,02	994,39
Autofluoreszcencia	9889	98,9	136,31



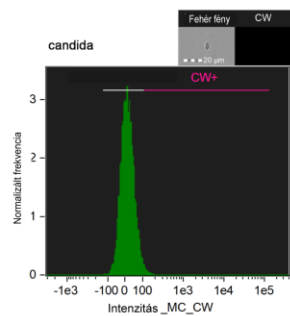
Populáció	Sejtszám	Kapuzott %	Medián
Candida	9987	100	2127,69
Zinquin +	8120	81,3	2984,21
Autofluoreszcencia	1817	18,2	574,87



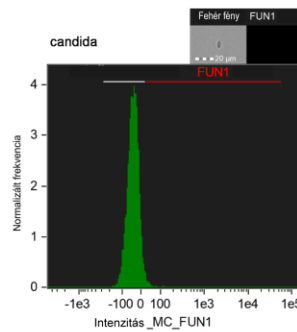
Populáció	Sejtszám	Kapuzott %
Candida	9970	100
Makrofág	103	1,03
Autofluoreszcencia	9866	99



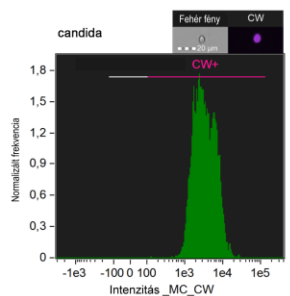
Populáció	Sejtszám	Kapuzott %
Candida	4867	100
Makrofág	3857	79,2
Autofluoreszcencia	995	20,4



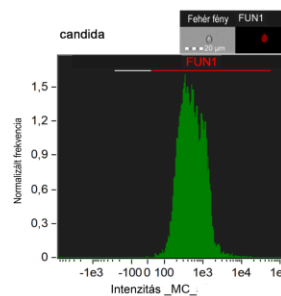
Populáció	Sejtszám	Kapuzott %	Medián
Candida	9993	100	14,42
CW + és Candida	1	1	128,61
Autofluoreszcencia	9882	98,9	13,16



Populáció	Sejtszám	Kapuzott %
Candida	9993	100
FUN1 + és Candida	99	0,99
Autofluoreszcencia	9862	98,7



Populáció	Sejtszám	Kapuzott %	Medián
Candida	9989	100	4100,65
CW + és Candida	9989	100	4100,65
Autofluoreszcencia	0	0	NaN



Populáció	Sejtszám	Kapuzott %
Candida	9989	100
FUN1 + és Candida	9987	100
Autofluoreszcencia	2	0,02

Függelék 2. ábra. Az áramlási citometriás elemzéshez használt kapuzási stratégiák. (A) Zinquin-pozitív, (B) fagocitózis+, (C) kalkofluor fehér+ és FUN1+ populáció meghatározása egyetlen sejtet tartalmazó populációban. Adatelemzéshez IDEAS szoftvert használtunk.

Függelék 1. táblázat. A tanulmányban használt oligonukleotidok. A specifikus régiók nagybetűvel, a fúziós szekvenciák kisbetűvel, a génspecifikus BAR kódok félkövérrel, az attB 1/2 dőlt betűvel vannak feltüntetve, az aláhúzott régiók pedig restrikciós endonukleáz felismerő helyeket jelölnek.

Primerek géndeléciohoz	Szekvencia (5'-->3')	Referencia
Primer 2	ccgctgctaggcgccgctgACCAGTGTGATGGATATCTGC	Holland és mtsai., (2014.)
CPAR2_210740 1	CGTCTAGGATGTAATGTGTTTGC	Jelen munka
CPAR2_210740 3	cacggcgcgcttagcagcggGGTAGTATAATTTTGGATATTGAAGTGCTG	Jelen munka
CPAR2_210740 4	gtcagcgccgcctatccctgcGATTATGTAACAATAGAATTCAATCACGG	Jelen munka
CPAR2_210740 5	gcagggatgcggccgctgac ATGTTGCGACTACGCGCCTT AGCTCGGATCCACTAGTAACG	Jelen munka
CPAR2_210740 6	GTGTCGTGATTAGTCGAGCC	Jelen munka
CPAR2_210740 5' check	TGGCCTTTTATATAGCGACATACC	Jelen munka
CPAR2_210740 3' check	GTAGAGAAGGGTAGAAATCACAGC	Jelen munka
CPAR2_212080 1	AGTCATTGAAAAAGAAAAAGTTTGCC	Jelen munka
CPAR2_212080 3	cacggcgcgcttagcagcggGTTGCGTATGAAATAGTGAGC	Jelen munka
CPAR2_212080 4	gtcagcgccgcctatccctgcTAAGAAATGTATATAGTAGTCCTATCTATATGTCGC	Jelen munka
CPAR2_212080 5	gcagggatgcggccgctgac AAGCGTCTGTCATT CGCCTTAGCTCGGATCCACTAGTAACG	Jelen munka
CPAR2_212080 6	CTGGTTTATTCTTGGCTGAACC	Jelen munka
CPAR2_212080 5' check	TGACAGACTCGATAGTGGTGG	Jelen munka
CPAR2_212080 3' check	ATCTTCTTTCAAACTACCGCAAC	Jelen munka
CPAR2_212100 1	TGTATACAACGCTAATTCGACAAATC	Jelen munka
CPAR2_212100 3	cacggcgcgcttagcagcggGATTCCAAAATTTTATTGATTGTAATCGTG	Jelen munka
CPAR2_212100 4	gtcagcgccgcctatccctgcAGAGAAGATGAAGTTGTAAGGGAAAAG	Jelen munka
CPAR2_212100 5	gcagggatgcggccgctgac AGGGATATGATACGTGCCTT AGCTCGGATCCACTAGTAACG	Jelen munka
CPAR2_212100 6	CCACAACCATCTGCACCAG	Jelen munka
CPAR2_212100 5' check	AGGCAACAATTTGTCGTTGC	Jelen munka
CPAR2_212100 3' check	GAAAGCTACCCAGGTCCAAC	Jelen munka
CPAR2_500170 1	GCTGTCCTATGCAAGTGCC	Jelen munka
CPAR2_500170 3	cacggcgcgcttagcagcggCCTATGAGCTGTGAATCTTGTGTTG	Jelen munka
CPAR2_500170 4	gtcagcgccgcctatccctgcGCGCCTTCATTATGTAGGAGTAC	Jelen munka
CPAR2_500170 5	gcagggatgcggccgctgac ACGGCTACTATGATCTCCTT AGCTCGGATCCACTAGTAACG	Jelen munka
CPAR2_500170 6	CCCCTGAACAGTACTCCATG	Jelen munka

CPAR2_500170 5' check	TGTTGGGATCTACATTCAGACC	Jelen munka
CPAR2_500170 3' check	CTTTGCCAATCCGAAATCACC	Jelen munka
CPAR2_806710 1	GCAGTGGATAACTATTTTGATAGAGG	Jelen munka
CPAR2_806710 3	cacggcgcgcctagcagcggGTTGATGATTGATATAGTAGGCC	Jelen munka
CPAR2_806710 4	gtcagcggccgcctcctgcATTGGAAGAAGAGATATGAAAAGTCC	Jelen munka
CPAR2_806710 5	gcagggatgcggccgctgac ATGAGAGCCGGATCGTCCTTAGCTCGGATCCACTAGTAACG	Jelen munka
CPAR2_806710 6	GATATGATTAATCAATGGAAAAATCCAAGAC	Jelen munka
CPAR2_806710 5' check	TAGCTTGACTACACCACTTGC	Jelen munka
CPAR2_806710 3' check	CCAATCACTTGACAGCCAAG	Jelen munka
CPAR2_806720 1	GCAACCATTTTTCTCCTGCG	Jelen munka
CPAR2_806720 3	cacggcgcgcctagcagcggTGAAGAAGGCTACCAGATG	Jelen munka
CPAR2_806720 4	gtcagcggccgcctcctgcTGGCAGTGGATAACTATTTTGATAG	Jelen munka
CPAR2_806720 5	gcagggatgcggccgctgac AGGCGTCGCTTCATGTCTTAGCTCGGATCCACTAGTAACG	Jelen munka
CPAR2_806720 6	TGGTTGATGATTGATATAGTAGGCC	Jelen munka
CPAR2_806720 5' check	GATGAAACCGATGTGTTTCCAC	Jelen munka
CPAR2_806720 3' check	GGTGGACCTAAACATTTGTTC	Jelen munka
CdHIS1 Southern probe FOR	ACCATGGGATATGCTCAAGA	Holland és mtsai., (2014.)
CdHIS1 Southern probe REV	ATCGGGCAAATGATTGACTA	Holland és mtsai., (2014.)
CmLEU2 Southern probe FOR	GGTACCGAAATTGTCAATGAAG	Holland és mtsai., (2014.)
CmLEU2 Southern probe REV	ATGGTGGGTTATGTTGTAAAGC	Holland és mtsai., (2014.)
Primerek reintegráláshoz	Szekvencia (5'-->3')	
CPAR2_217040_FOR_RI	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTGTCTGTGATGATGTGAGTGG	Jelen munka
CPAR2_217040_REV_RI	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCAACAATGTAAGTCCAGAG	Jelen munka
CPAR2_212100_FOR_RI	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTCACAACCATCTGCACCAG	Jelen munka
CPAR2_212100_REV_RI	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGGACGAGTGTGATTTGACAC	Jelen munka
PrTDH3_XhoI_FOR	AAAAC TCGAG CACACACATACAGACAATTGCG	Jelen munka
PrTDH3-212100fus_R	gattctaactctttgtattcatGATTGTAAAGTTTGTGATGTTAATTGATTG	Jelen munka
212100-PrTDH3fus_F	ctttacaatcATGAATAACAAAGAAGTTAGAATCAGTGC	Jelen munka
212100oeBssHII_R	AAAAA GCGCGCGG ACTTTATCGAATAATCAGTCGTAGG	Jelen munka
CpN5LUpChkF	CCTATTTTCGCATCATTGCAGTTC	Németh és mtsai., (2020.)
CpN5LDoChkR	TGTACCAATCAGGGTTAGTGACC	Németh és mtsai., (2020.)
CpN5LDo1SouF	TACACACAAAATTGGAATCCCATTC	Németh és mtsai., (2020.)
CpN5LDo2SouR	ACACAAAAATACATGATTGCGTC	Németh és mtsai., (2020.)
pNRVLDodofusionF	gcgctacggatctcgAGCGAAGTAGTCCTCACTGAGG	Németh és mtsai., (2020.)
CpNEUT5LDodoStuIEcoRVR	TTTTGATATCAGGCCTGCACTAACACTAACACTGTCACG	Németh és mtsai., (2020.)

Primerek GFP jelöléshez	Szekvencia (5'-->3')	
CpN5LUpChkF	CCTATTTTCGCATCATTGCAGTTC	Németh és mtsai., (2020.)
CpN5LDoChkR	TGTACCAATCAGGGTTAGTGACC	Németh és mtsai., (2020.)
CpN5LDo1SouF	TACACACAAAATTGGAATCCCATTC	Németh és mtsai., (2020.)
CpN5LDo2SouR	ACACAAAAATACATGATTGCGTC	Németh és mtsai., (2020.)
pNRVLDodofusionF	gcgctacggatctcgAGCGAAGTAGTCCTCACTGAGG	Németh és mtsai., (2020.)
CpNEUT5LDodoStuIEcoRVR	TTTTGATATCAGGCCTGCACTAACACTAACACTGTCACG	Németh és mtsai., (2020.)
Primerek Real Time PCR-hez	Szekvencia (5'-->3')	
CPAR2_210740_RT_forward	CCACGAGACAGATAAGCAGGC	Jelen munka
CPAR2_210740_RT_reverse	GACCTCACGGGTATTGTGAACC	Jelen munka
CPAR2_212080_RT_forward	ACGAAAACGAGACAACGCCA	Jelen munka
CPAR2_212080_RT_reverse	CAAGCCGTCTGCACATGGG	Jelen munka
CPAR2_212100_RT_forward	AACCAACGGAAATCTCCAATCCTC	Jelen munka
CPAR2_212100_RT_reverse	GTGGTACTCTCACACTTACTGGC	Jelen munka
CPAR2_500170_RT_forward	GCTCAACGTCAGGTGTATCATGTC	Jelen munka
CPAR2_500170_RT_reverse	GGTAGTCGAGGTACATGCCAC	Jelen munka
CPAR2_806710_RT_forward	CGGAGTGATTATCGCTACAGGC	Jelen munka
CPAR2_806710_RT_reverse	GCCGTTAATTACGATATGGGAGCC	Jelen munka
CPAR2_806720_RT_forward	AGCCAGAGTCTCATCTGTCCC	Jelen munka
CPAR2_806720_RT_reverse	TCGTAGCTTATAGGTAGCGCC	Jelen munka
Primerek Zrc1-GFPtag-hez	Szekvencia (5'-->3')	
CPAR2_212100GFPtag_forward	TGTTTAGTTGATGGATTCACCAATTGTGATACTCAAACATGTC-ATGGTGGGGGCGGTGGATCTAAAGGTGAAGAATTATTCCTGG	Jelen munka
CPAR2_212100GFPtag_reverse	AAGCTCTATTTCTACTATACACACCCTAGCCATGACTTTCCTTA-CAACTTCATCTTCTCTTTATTTGTACAATTCATCCATACCATGGG	Jelen munka
CPAR2_212100GFPtag_Top	CCAAAGAGAAGATGAAGTTGTAA	Jelen munka
CPAR2_212100GFPtag_Bot	AACTTACAACCTTCATCTTCTCTT	Jelen munka

Függelék 2. táblázat. A munkánk során alkalmazott plazmidok.

Plazmid neve	Leírás	Referencia
pDONR221	Gateway® vektor attP1/2 helyekkel	Thermo Fisher Scientific
pSN40	Plazmid, amely <i>C. maltosa</i> LEU2 szelekciós markert tartalmaz	(Noble és Johnson, 2005), (Holland és mtsai., 2014)
pSN52	Plazmid, amely <i>C. dubliniensis</i> HIS1 szelekciós markert tartalmaz	(Noble és Johnson, 2005), (Holland és mtsai., 2014)
pMG2120	Plazmid, amely a GFP és <i>caNAT1</i> szekvenciákat tartalmazza	(Shen és mtsai., 2005), (Gerami-Nejad és mtsai., 2012)
pNRVL-caSAT1	pNRVL plazmid, amely a <i>caSAT1</i> domináns selekciós markert tartalmazza a pSFS2a plazmidból	(Németh és mtsai., 2020.)

Függelék 3. táblázat. A fenotípusos jellemzésre alkalmazott körülmények és koncentrációk¹

Körülmények ²	Használt koncentrációk
pH 4 ³	-
pH 5 ³	-
pH 6 ³	-
pH 7 ³	-
pH 8 ³	-
Glicerín	3 % (V/V)
NaCl	1 M
Szorbitol	1 M
Koffein	10 mM
Kongóvíz	10, 25, 50, 75, 100 µg/ml
Kalkofluor fehér	10, 25, 50 µg/ml
CdSO ₄	50 nM
H ₂ O ₂	0.8 M
CuCl ₂	4 mM
CuSO ₄	4 mM
SDS	0.04 % (m/V)
EDTA	250 nM
YCB + BSA	0.67 % (m/V) YCB + 2 % (m/V) BSA
YNB + glükóz	0.19 % (m/V) YNB + 1 % (m/V) glükóz
Menadion	0.2 mM
BPS	150 µM
BPS + hemin	500 µM/0,2 µM

¹ YPD táptalajt alkalmaztunk kiindulási táptalajként (az YCB és YNB alapú táptalajok kivételével).

²A táptalajokat 2%-os (m/V) agarral egészítettük ki szilárd táptalajhoz.

³A táptalajok megfelelő kémhatását McIlvaine-féle protokoll szerint állítottuk be 0,2 M Na₂HPO₄ és 0,1 M citromsav megfelelő arányú kombinálásával.

Low Zinc Medium
(LZM, Alacsony cink
tartalmú táptalaj)

Crawford és mtsai., (2018.) protokollja szerint

ZnSO₄ 0.05, 1, 5, 10, 12.5, 15, 17.5, 20, 22.5, 25, 50, 100 mM