

37. OTDK Biológia Szekció

Járomspórás gombák extracelluláris vezikuláinak jellemzése

Frankó Boglárka

Biológia MSc

2. évfolyam

Szegedi Tudományegyetem

Biológiai Intézet

Természettudományi és Informatikai Kar

Biotechnológiai és Mikrobiológiai Tanszék

Témavezető: Dr. Nagy Gábor



2024

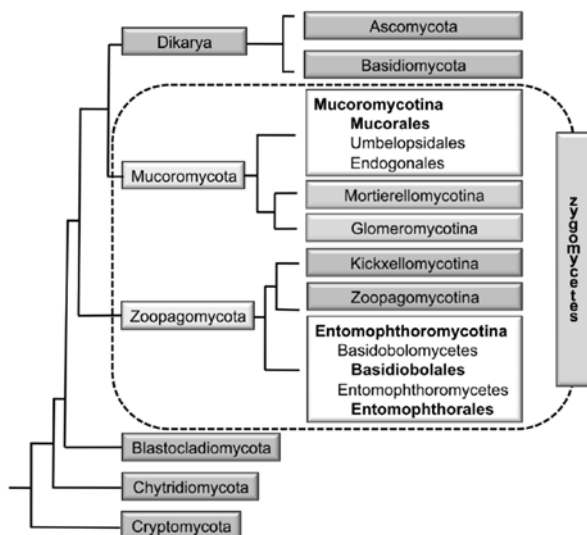
Tartalom

1. Irodalmi bevezetés	3
1.1 . Járomspórás gombákról általában	3
1.2. Járomspórás gombák (mucormikózisok) virulenciája	4
1.3. Antifungális szerek csoportjai és azok hatásmechanizmusa	4
1.4. Az antifungális szerekkel szembeni rezisztencia kialakulásának a háttere	5
1.5. Extracelluláris vezikulák	6
1.6. Szeptinek szerepe	8
2. Célkitűzések	11
3. Anyagok és módszerek.....	12
3.1. A kutatás során felhasznált törzsek	12
3.2. Alkalmazott táptalajok, tápoldatok.....	12
3.3. Tenyésztési körülmények	13
3.4. Alkalmazott oldatok, pufferek és reagensek	13
3.5. Indítószekvenciák.....	13
3.6. Vizsgálati módszerek	14
3.6.1. RNS kivonás <i>M. lusitanicus</i> -ból.....	14
3.6.2. RNS gélelektroforézis	14
3.6.3. cDNS szintézis -reverz transzkripció	14
3.6.4. Valós idejű PCR a transzkripciós szintek meghatározásához	15
3.6.5. Az extracelluláris vezikulák tisztítása	15
3.6.6. Az EV-k jelenlétének és méretének a meghatározása transzmissziós elektron mikroszkóp segítségével	16
3.6.7. Az EV-k fehérje tartalmának meghatározása	16
3.5.8. Statisztikai módszerek.....	17
3.5.9. <i>in silico</i> elemzések.....	17
4. Eredmények és értékelésük	18
4.1. A <i>Mucor lusitanicus</i> extracelluláris vezikuláinak a tisztítása.	18
4.2. A szterin bioszintézisben mutáns <i>Mucor</i> izolátumok EV termelésének a vizsgálata.....	19
4.3. A <i>M. lusitanicus</i> CBS277.49 által termelt EV-k fehérje tartalmának vizsgálata	20
4.4. A szeptin fehérjék jellemzése	22
5. Diskusszió.....	24
6. Irodalomjegyzék.....	26
7. Köszönetnyilvánítás	34
8. Melléklet	35

1. Irodalmi bevezetés

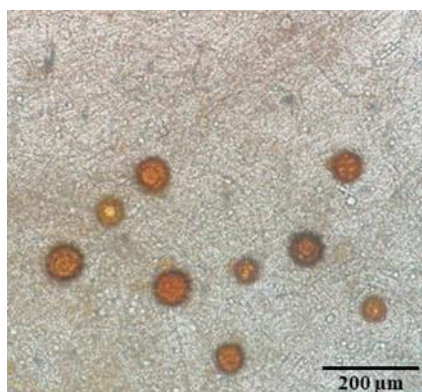
1.1. Járomspórás gombákról általában

A járomspórás gombák törzse (Mucoromycota) magába foglalja a szárazföldi gombák első nagy csoportját, mely a Mucoromycotina, a Mortierellomycotina és Glomeromycotina altörzsekre oszlik (Spatafora és mtsai. 2016) (1. ábra).



1. ábra A gombák főbb rendszertani csoportjai (Walther és mtsai., 2019).

A járomspórás gombák nevüket jellegzetes, ivaros szaporító képletükről, a járomspóráról kapták (2. ábra). A Mucorales rend a járomspórás gombák legjelentősebb és legnagyobb fajszámmal rendelkező rendje, emiatt sokszor az egész osztályt a Mucorales ismertetőjegyei alapján jellemzik. A Mucorales rend tagjai nagymértékű, intenzív, cönocitikus hifaképzésre képesek.



2. ábra. A *M. lusitanicus* zigospóráinak fénymikroszkópos képe. Méretskála: 200 μm.

A csoportba sorolható fajok túlnyomórészt heterotallikusak és életciklusuk során nem igénylik a víz jelenlétét. A Mucorales rendről emellett elmondható, hogy fajok nagyrésze

szaprofita, illetve kozmopolita. A magas ozmotikus nyomást jól tűrik, továbbá hőmérsékleti optimumuk is széles határok között mozog. Termofil és pszichrofil életmódú fajok is tartoznak közéjük. A rendbe tartozó fajokat gyakran felhasználgják az ipar különböző területein, azonban megtalálhatóak közöttük állat és humán patogének fajok is.

1.2. Járomspórás gombák virulenciája

A Mucorales rendbe tartozó fajok között opportunistá humánpatogén fajok is előfordulnak (*Hibbett és mtsai. 2007; Arnesen és mtsai. 2018; Walther és mtsai. 2019; Naranjo-Ortiz és Gabaldón 2019; Wagner és mtsai. 2020*), melyek az úgynevezett mucormikózist („fekete gomba fertőzés”) képesek kiváltani az arra fogékony betegekben. A mucormikózis ritka betegségnek számít, azonban az elmúlt években az esetek száma szignifikánsan megemelkedett. A candidiázis és az aspergillózis után a mucormikózis a harmadik leggyakoribb invazív mikózis (*Tahiri és mtsai 2023*). 2022-ben a WHO a Mucorales rendbe tartozó gombákat kiemelt fontosságú kórokozócsoporttá nyilvánította, és szorgalmazza ezen gombacsoport kutatását és a közegészségügyi intézkedések javítását (*Fisher és Denning 2023*). Manapság már a világ minden tájáról jelentenek eseteket, mindazonáltal epidemiológiai különbségek fedezhetőek fel a fejlett és fejlődő országok között. A fejlett országokban a betegség főként hematológiai rosszindulatú daganatokban szenvedőknél gyakori, míg fejlődő országokban, például Indiában, jellemzőbb a mucormikózis elsősorban kezelt *diabetes mellitus*-al rendelkező betegnél (*Wagner és mtsai. 2019; Baberwal és mtsai. 2022*)

1.3. Antifungális szerek csoportjai és azok hatásmechanizmusa

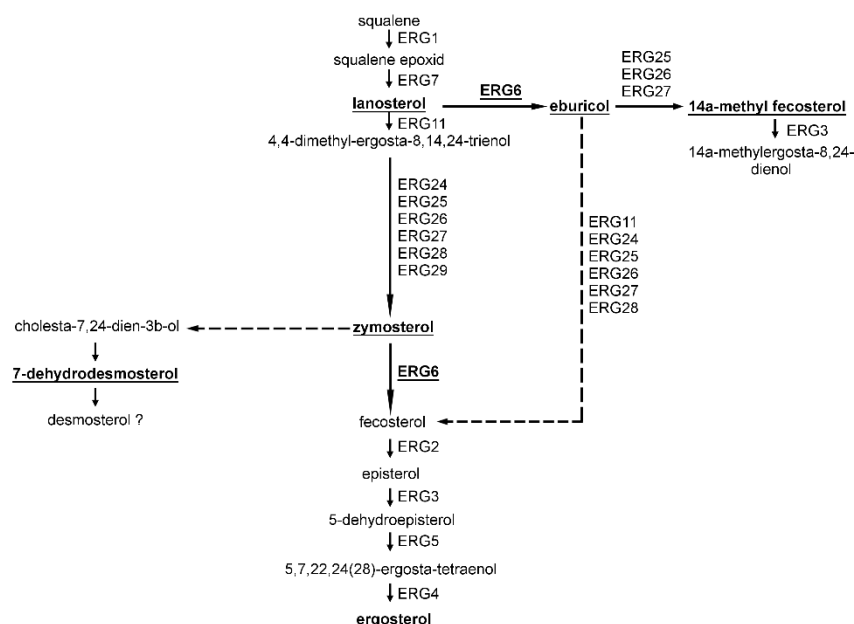
A fő gombaellenes gyógyszerek jelenleg öt különböző hatóanyagra épülnek: echinocandinok, azolok, poliének, allilaminok és pirimidin analógok (*Cowen és mtsai. 2015*). Az echinocandinok, mint például a caspofungin, mikafungin és anidulafungin, a gomba sejtfalának egyik meghatározó komponensének szintézisét gátolják, az 1,3- β -D-glükánét. Az azolok - flukonazol, izavukonazol, vorikonazol és pozakonazol - a lanoszterol 14 alfa-demetiláz inhibitoraként használhatóak fel. A poliének, melyek közül az amfotericin B a legelterjedtebb, a sejtmembrán alkotórészét, az ergoszterolt kötik meg. Az allilaminok közül csak a terbinafint használják gombafertőzés ellen, mint szkvalén-monooxigenáz gátló. A pirimidin analógok timidilát-szintáz inhibitoraként alkalmazhatóak, ilyen fő gombaellenes szer a flucitozin (*Muszevska és mtsai 2014*).

A mucormycosis kezelésére az amphotericin B lipid formuláit használják, míg kisegítő vagy másnéven mentőterápiaként két triazolt, a posakonazolt és az izavukonazolt alkalmazzák.

Azonban a járomspórás gombák eredendően rezisztensek a legtöbb gombaellenes szerrel szemben, beleértve az azolókat is.

1.4. Az antifungális szerekkel szembeni rezisztencia kialakulásának a háttere

Az azolok hatása az ergoszterol bioszintézis gátlásán alapul. Az ergoszterin a gombák sejtmembránjának a legfontosabb szterin összetevője. Az azolok hatásukat a lanoszterol 14 alfa-demetiláz (Erg11) gátlásán keresztül fejtik ki. Az Erg11 gátlásának hatására 14 α -metilergoszta-8,24-dienol képződik, mely a sejt számára toxikus. Az azolokkal szembeni rezisztencia hátterében gyakran az *erg11* génben történt pontmutációk a felelősek, melyek az enzim csökkent affinitását okozzák az azolokkal szemben (Caramalho és mtsai. 2017). Továbbá az *erg11* gén túlműködése is az azolokkal szembeni rezisztencia kialakulását eredményezi (Marichal és Bossche 1995; Morschhauser 2009). Ugyanakkor alternatív szterin bioszintetikus útvonalak megléte is elősegítheti az egyes gombaellenes szerekkel szembeni rezisztencia kialakulását. Bauer és munkatársai kimutatták (2023), hogy a *Mucor lusitanicus* esetében az *erg6b* gén fontos szerepet tölt be az azolokkal szembeni rezisztenciában. A gomba genomja 3 *erg6* gént kódol, azonban az *erg6b* kiütését követően alternatív szterin bioszintézis útvonalak nyílnak, melyek végén olyan szterin származékok képződnek, melyek stabilan képesek beépülni a gomba sejtmembránjába (3. ábra).



3. ábra. A *M. lusitanicus* ergoszterin bioszintézis útvonala. A folytonos vonalak mutatják a fő bioszintézis útvonalat, míg a szaggatott vonalak mutatják az alternatív útvonalakat az azol kezelés és/vagy *erg6b* gén kiütését követően (Bauer és mtsai. 2023).

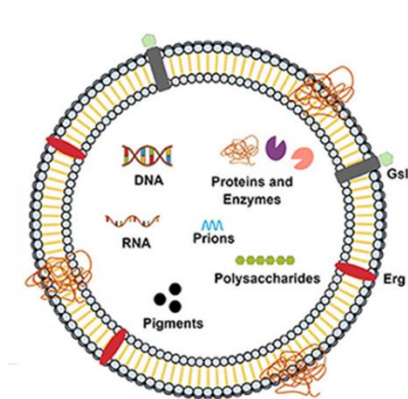
Az eredmények továbbá azt mutatták, hogy az azolok az Erg11 mellett az Erg6 működését is gátolják. A rezisztenciát befolyásolják továbbá a sejtmembrána integrálódott aktív efflux pumpák is, melyek a sejt számára toxikus anyagokat az extracelluláris térbe juttatják (Cowen és mtsai. 2015; Perlin és mtsai. 2017; Rybak és mtsai. 2019; Nywening és mtsai. 2020). Az efflux pumpáknak két csoportját különböztethetjük meg, az ABC transzportereket és az MFS transzportereket. Az ABC transzporterek az elsődleges szállítók, az ATP nagy energiájú foszfátkötésének hasításából nyerik az energiát. Az MFS transzporterek ezzel szemben másodlagos transzportereknek számítanak, melyek az elektrokémiai proton grádienszt használják ki a plazmamembránon keresztüli anyagmozgatáshoz (Cannon és mtsai. 2009).

Az antifungális rezisztencia hátterében állhat még különböző transzkripció faktorok aktivitása is (PDREs, Zn2Cys6, AtrR), melyek képesek az efflux pumpák és/vagy az ergoszterin bioszintézisben szerepet játszó géneket szabályozni (Hagiwara és mtsai. 2017; Cavaleiro és mtsai. 2018; Vu és mtsai. 2019; Rybak és mtsai. 2019).

1.5. Extracelluláris vezikulák

Az extracelluláris vezikulák (EV-k) lipid kettős réteggel körülhatárolt részecskék, amelyeket minden biológiai organizmus termel (Deatherage és mtsai 2012., Witwer és mtsai 2019.) Az első gomba által termelt EV-t 2005-ben írták le (Rodrigues és mtsai 2007), és azóta számos különböző fajban, akár patogén, akár nem patogén fajokban, megtalálták őket (Rizzo és mtsai 2020). Az emlősök esetében az EV-k részt vesznek az intracelluláris jelátvitelben, illetve a szervezeten belüli kommunikációban (Shopova és mtsai 2020, Xu és mtsai 2018), ezért valószínűsítették, hogy a gomba EV-k is különféle biológiai folyamatban vesznek részt (Rodrigues és mtsai 2008). A gombákban az EV-knek szerepe van a gombák patofiziológiai folyamataiban, mint például a biofilm képződés vagy az antifungális szerekkel szembeni rezisztencia (Leone és mtsai 2018, Zarnowski és mtsai 2018).

A gombák által termelt EV-k különböző komponenseket tartalmaznak, például fehérjéket, pigmenteket, lipideket, poliszacharidokat és nukleinsavakat (Eisenman és mtsai 2009, Da Silva és mtsai 2015, Rodrigues és mtsai 2008, Rodrigues és mtsai 2007, Nimrichter és mtsai 2016, Vallejo és mtsai 2011, Vargas és mtsai. 2015, Rizzo és mtsai. 2020), melyek közül némelyik fajspecifikus, de vannak fajok között konzerváltak is (Nimrichter és mtsai 2016) (4. ábra).



4. ábra. Egy extracelluláris vezikula szerkezetének és a főbb alkotóinak sematikus ábrája (Rizzo és mtsai. 2020).

A gomba EV-k biogenezisééről viszonylag még mindig keveset tudunk, de az biztos, hogy a folyamat során fontos szerepe van az ESCRT (endosomal sorting complex required for transport) komplexnek. Ez egy öt alegységből álló komplex, melynek komponensei egymással szoros összefüggésben és munkamegosztásban dolgoznak. Az ESCRT komplex több folyamatban is részt vesz, például a MVB-k (multivezikuláris test) által generált vezikulumok felszabadításában, vagy a citokinézis végén a leánysejtek szétválasztásában (Schmidt és mtsai 2012). Az ESCRT funkcióját biztosító gének deléciója esetén csökkent az EV termelés (Zarnowski és mtsai 2018), illetve az ESCRT útvonalhoz tartozó egyéb gének deléciója is hibákat okozott az EV-k virulencia faktorainak szállításában (Park és mtsai 2020, Godinho és mtsai 2014, Hu és mtsai 2013, Hu és mtsai 2015). A GRASP (Golgi reassembly and stacking protein) egy szekréció szabályozó fehérje, amely szintén hozzájárul a vezikulák termeléséhez. *Cryptococcus neoformans*-ban vizsgálva a *graspA* mutáns törzs például méretbeli különbségeket mutatott, a vad típushoz képest kisebb EV-ket termelt, továbbá az extracelluláris vezikulák eltérő RNS-összetétellel rendelkeztek és gyengébb virulenciát is mutattak (da Silva és mtsai 2018).

A gombákból izolált EV-k virulencia faktorokat, erősen immunogén alkotóelemeket tartalmaznak, amelyek közvetlenül elősegítik a kóros folyamatok kialakulását a fertőzött egyedekben. *In vitro* vizsgálatokban az EV-k képesek voltak a makrofágokat és a dendritikus sejteket is aktiválni (Da Silva és mtsai 2016, Vargas és mtsai 2015, Zamith-Miranda és mtsai 2018). Ennél fogva a legújabb tanulmányokban arra utalnak, hogy az extracelluláris vezikulák új alternatívát jelenthetnek a gombás megbetegedések kezelésében, például a vakcina fejlesztés

által (Colombo és mtsai 2019, Joffe és mtsai 2016, Nimrichter és mtsai 2016, Rizzo és mtsai 2017, Rodrigues és mtsai 2014).

Az extracelluláris vezikulákból eredő gyógyszerrezisztencia egyre kutatottabb terület, de patogén gombákkal kapcsolatban még kevés információval rendelkezünk (Chan és mtsai 2022). Egyelőre csak néhány tanulmányban írtak le gomba EV-k által közvetített antifungális rezisztenciát, amelyekben feltárták, hogy a *Candida albicans* és a *Saccharomyces cerevisiae* által termelt EV-k védelmet nyújtottak a sejteknek a flukonazol és a caspofungin hatásai ellen (Zarnowski és mtsai 2018, Zhao és mtsai 2019). Kimutatták, hogy az *S. cerevisiae* extracelluláris vezikulái különböző sejtfal módosító enzimeket tartalmaztak, amely által a sejtek kompenzálni tudták az (1,3)- β -D-glükán szintáz gátlását a caspofungin kezelés során (Zhao és mtsai 2019). Továbbá az EV-knek hatása van a poliénnel szembeni rezisztenciában is. *Candida auris* esetén, a polién rezisztens törzsből származó EV-k képesek voltak növelni az érzékeny törzs amfotericin B-vel szembeni minimális gátló koncentrációt (Chan és mtsai. 2022).

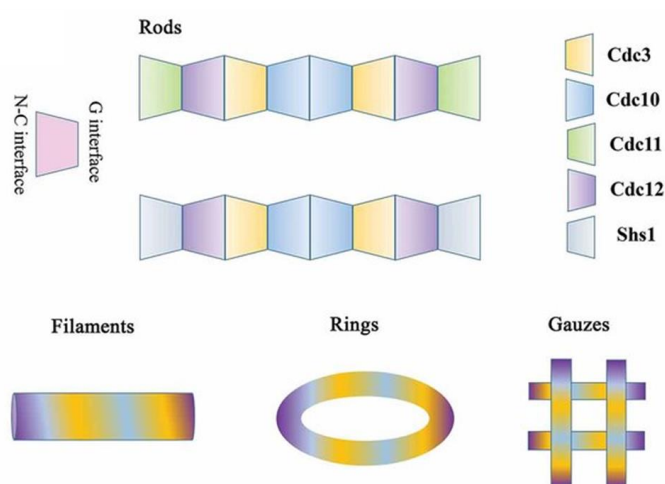
1.6. Szeptinek szerepe

A szeptinek a GTP-kötő fehérjék családjába tartoznak, amelyekről először *S. cerevisiae*-ben írták le, hogy részt vesznek a sejt citokinézisében (Hartwell 1971). Továbbá számtalan eukarióta sejtben működnek és létfontosságú feladatokat látnak el (Hartwell 1971, Chao és mtsai 2014, Marquardt és mtsai 2019). A citokinézisben való szerepükön túl, a legújabb kutatásokban, új funkciójukat is felfedezték, mint például a sejtciklus szabályozás, exocitózis, térbeli kompartmentalizáció, és diffúziós gát (Fung és mtsai 2014, Momany és mtsai 2017). Azonban a patogén gombákban való megjelenésük és feladatuk továbbra sem teljesen tisztázott, de egyre több kutatás mutatta ki, hogy nem elhanyagolható szerepük van növény és humán patogén fajokban egyaránt (Bridges és mtsai 2014, Khan és mtsai 2015).

Azok a szeptinek, melyekről kimutatták, hogy hetero-oligomer komplexet alkotnak, gyakran core szeptinnek is nevezik és a *S. cerevisiae*-ben azonosított Cdc3, Cdc10, Cdc11 és Cdc12 ortológjai (Hartwell 1971). A core szeptineken kívül néhány fonalas gomba és protista „nem core” szeptinnekkel is rendelkezik.

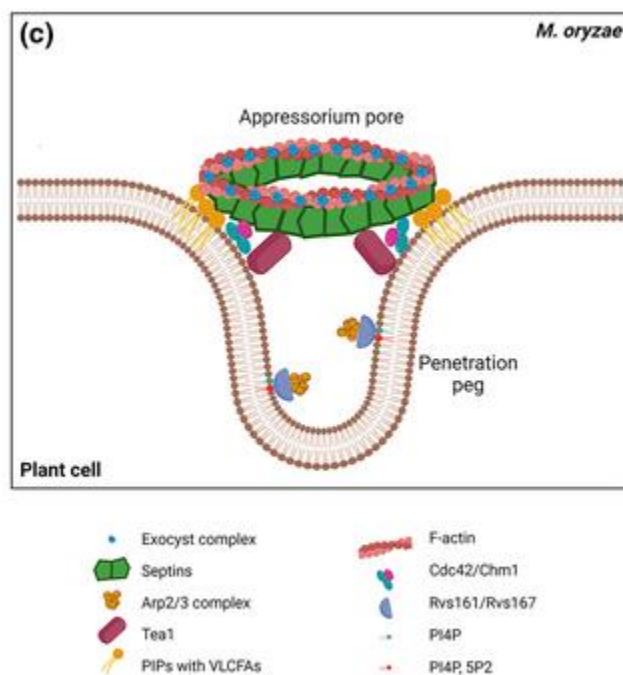
A szeptinek tartalmaznak egy N-terminális polibázikus domént, amely a foszfinozítidokhoz kötődik a plazmamembránban (Casamayor és Snyder 2003; Leipe és mtsai. 2002), amelyet egy GTP-kötő domén és egy a szeptinre jellemző egyedi domén követ, amely megkülönbözteti a szeptineket más P-hurkot tartalmazó GTPázoktól (Pan és mtsai. 2007;

Versele és Thorner 2004). A szeptinek C-terminálisán egy „coiled-coil” domén található (Casamayor & Snyder, 2003; Pan et al., 2007), mely lehetővé teszi, hogy a szeptinek magasabb rendű struktúrákat, például rudakat/filamentumokat, gégeket, korongokat és gyűrűket képezzenek (Bridges és Gladfelter 2015). Ezek a magasabb rendű struktúrák vesznek részt, például a sejtek szűkülésének, a növekedési tengely átirányításának, a fonalas sejtek elágazásának és a kérgi merevségnek a kialakításában (DeMay és mtsai 2011; Dulal és mtsai 2020).



5. ábra. A szeptinek által kialakított hetero-oktamer komplexet különböző megjelenési formái (Li és mtsai. 2021).

A *Magnaporthe oryzae* egy növénypatogén faj, melyben öt különböző szeptin fehérje található, amelyek közül négy (Sep3, Sep4, Sep5 és Sep6) homológ az *S. cerevisiae* szeptineivel (Cdc3, Cdc10, Cdc11 and Cdc12) (Dagdas és mtsai 2012). Az appresszórium a gombák gazdanövényen való megtapadását szolgáló képlet, mely a csíratömlő kiöblösödő része. Érése során, ha a turgornyomás eléri a küszöbértéket, akkor egy heterológ szeptingyűrű képződik az appresszórium alsó részén (6. ábra). A szeptingyűrű diffúziós gátat képez, amely biztosítja a Rsv116 és a Wiskott-Aldrich szindróma fehérjét, a Las17-et a penetráció helyén. Ezáltal a szeptinek biztosítani tudják a membrángörbületét és a kéreg megfelelő merevségét ahhoz, hogy az appresszórium átszakíthassa a levél kutikuláját. Az *M. oryzae* szeptin mutánsok patogenitása csökkent, mivel a fertőzés nem tudott behatolni a levelekbe (Dagdas és mtsai 2012).



6. ábra. Az *M. oryzae* apresszóriumnak a kialakulása, a szeptin gyűrű segítségével (zöld gyűrű alakú struktúra) (Eiserman és mtsai. 2023).

A *Candida albicans* humánpatogén faj, a $\Delta cdc10$ és $\Delta cdc11$ szeptin mutáns törzsek virulenciája gyengébbnek bizonyult a vad törzsekhez képest, illetve az invazív növekedésre sem voltak képesek az egereken végzett kísérletek során (Warenda és mtsai 2003). Továbbá a *Cryptococcus neoformans* szeptin mutánsai, $\Delta cdc3$ és $\Delta cdc12$, szintén gyengébb virulenciát mutattak a *Galleria mellona*-ban (Kozubowski és mtsai 2010).

2. Célkitűzések

Járomspórás gombák esetében az extracelluláris vezikulák termelődését, azok összetételét és a gomba virulenciájában, antifungális szerekkel szembeni rezisztenciájában betöltött szerepét ezidáig nem vizsgálták.

Az extracelluláris vezikulák biogenezésében az ESCRT komplexnek igen nagy szerepe van, valamint részt vesz a citokinézisben is, ugyan akkor a szeptin fehérjék is részt vesznek a citokinézisben, a különböző membránok fúziójának irányításában. A szakirodalmi adatok azt mutatják, hogy az ESCRT rendszer és a szeptinek is hasonló folyamatokban játszanak szerepet, azonban, az, hogy a két komplex működése egymástól függ-e vagy sem, még nem tisztázott. A hipotézisünk az, hogy a szeptinek is részt vehetnek az extracelluláris vezikulák bioszintézisében, ezért jelen kutatómunkánk során a következő célokat tűztük ki magunk elé:

1. A *Mucor lusitanicus* EV termelésének és tisztításának optimalizálása
2. A megtisztított EV-k mikroszkópos vizsgálata
3. A kutatólaborunkban korábban létrehozott szterin bioszintézisben mutáns gombatörzsek EV-inek vizsgálata
4. A tisztított EV-k fehérjéinek vizsgálata
5. Feltételezett szeptin fehérjék vizsgálata és jellemzése

3. Anyagok és módszerek

3.1. A kutatás során felhasznált törzsek

Kísérleteink során az 1. táblázatban feltüntetett törzseket használtuk.

1. táblázat. A kutatómunkánk során felhasznált törzsek és azok jellemzői

Törzs	Genotípus	Deléció
CBS 277.49	vad típus	
MS12	leucin, uracil duplamutáns	szülői törzs
MS12+ <i>pyrG</i>	leucin auxotróf	uracil komplementáltatott törzs
MS12- Δ <i>erg6a</i>	leucin auxotróf	<i>erg6a</i> deléciós mutáns törzs
<i>erg6b</i>	leucin auxotróf	<i>erg6b</i> deléciós mutáns törzs
<i>erg6c</i>	uracil auxotróf	<i>erg6c</i> deléciós mutáns törzs
<i>erg6a-c</i>	leucin auxotróf	<i>erg6a-c</i> deléciós duplamutáns törzs
<i>erg3</i>	leucin auxotróf	<i>erg3</i> deléciós mutáns törzs
<i>erg24a</i>	leucin auxotróf	<i>erg24a</i> deléciós mutáns törzs
<i>erg24b</i>	leucin auxotróf	<i>erg24b</i> deléciós mutáns törzs

3.2. Alkalmazott táptalajok, tápoldatok

Minimál táptalaj (YNB; Yeast Nucleotide Base)

1% (m/V) D-glükóz, 0,15% (m/V) (NH₄)₂SO₄, 0,15% (m/V) Na-L-glutamát, 0,05% (m/V) YNB (Difco), szükség esetén 0,05% (m/V) uracillal vagy 0,05% (m/V) leucinnal kiegészítve (pH 4,5). Szilárd táptalaj előállításához 2% (m/V) agart adtunk a tápoldathoz. PEG-közvetített protoplaszt transzformáció során a protoplasztokat 0,8 M szorbitolt és 1% (m/V) agart tartalmazó YNB fedőagarral összekeverve (pH 3,2) öntöttük 0,8 M szorbitollal kiegészített, 2% (m/V) agart tartalmazó YNB táptalajra.

Élesztő-glükóz táptalaj (YEG; Yeast Extract Glucose)

1% (m/V) D-glükóz, 0,5% (m/V) élesztőkivonat, szilárd táptalaj előállításához 2% (m/V) agar.

Maláta kivonatos táptalaj (MEA; Malt Extract Agar)

1% (m/V) D-glükóz, 0,5% (m/V) élesztőkivonat, 1% (m/V) maláta-kivonat, szilárd táptalaj előállításához 2% (m/V) agar.

3.3. Tenyésztési körülmények

A kísérleteinkhez használt törzseket négy napon keresztül neveltük, folyamatos megvilágítás mellett, 25 °C -on. A kísérlettől függően változtattuk a táptalajokat.

3.4. Alkalmazott oldatok, pufferek és reagensek

DNS gélelektroforézishez használt anyagok

TAE puffer: 40 mM Tris-ecetsav (pH 7,6); 1 mM Na₂EDTA

Agaróz gél: 0,8% agaróz TAE pufferben oldva

Etidium-bromid törzsoldat (Sigma): 10 mg/ml desztillált vízben oldva

Mintapuffer: 6x DNS mintapuffer (Thermo Fisher)

Molekulasúly marker: 1 kb DNS marker (Thermo Fisher): steril desztillált víz molekulasúly marker – 6x DNS mintapuffer 4:1:1 arányú keveréke

Protoplasztikához és PEG-mediált transzformációhoz használt oldatok

Protoplasztáló oldat: 100 mM nátrium-foszfát puffer; 0,8 M szorbitol; 1,5% csigaenzim

Nátrium-foszfát puffer (100 mM): 25 mM Na₂HPO₄; 75 mM NaH₂PO₄

SMC puffer: 50 mM CaCl₂; 10 mM MOPS; 0,8 M szorbitol

PMC puffer: 40% PEG 4000; 10 mM MOPS; 0,6 M szorbitol; 50 mM CaCl₂

Foszfát puffer (PBS) 1X (pH: 7,4): 0,137 M NaCl; 0,0027 M KCl; 0,01 M Na₂HPO₄; 0,0018 KH₂PO₄

3.5. Indítószekvenciák

A gének kifejeződésének vizsgálatához különböző indítószekvenciákat terveztünk, melyeket az 2. táblázatban tüntettünk fel.

2. táblázat. A dolgozat során használt indítószekvenciák

Indítószekvencia	szekvencia 5'-3'	termék
MlsepA1rtfw	AGACCTCAAAGAAATCACCCA	1390768 gén egy szakasza
MlsepA1rtrev	GCTCTTCCTTCAATCTGACAC	
MlsepA2rtfwd	GCACTACCTTTGTGAATACGCT	1598245 gén egy szakasza
MlsepA2rtrev	GCTTGATCGTGATGCCTTCC	
MlsepB1rtfw	TTGTCTCTACTTTATCGCTCCTACT	

MlsepB1rtrev	TTCCTCCTCTGTCAAGGTATCA	1472258 gén egy szakasza
MlsepB2rtfw	TACCACCAGATCCAAATCTACCAG	1474387 gén egy szakasza
MlsepB2rtrev	ACAATGATCCTCGTTATCCACC	
MIsepC1fwd	CTCATTTGCCTAATCAGCGA	1466549 gén egy szakasza
MIsepC1rev	CTGCTTCTCATGTCTCTTGG	
MIsepC2fwd	GACCATCATTGATACGCCTG	1343381 gén egy szakasza
MIsepC2rev	CACGCATATCAATAGCACCC	
MIsepC3fwd	TTCGCAATTTGTTGATTTCGCAC	1455798 gén egy szakasza
MIsepC3rev	TCACCAAATTTACGAGTTGCCA	
MIsepC4fwd	GACAGTGAAGATGAGGAAGTGAC	1334600 gén egy szakasza
MIsepC4rev	CGAGTATTCTCTGCCCTTGAC	
MIsepD1fwd	CATTAAAGACCAACATTCAGCC	1494442 gén egy szakasza
MIsepD1rev	GCCAATAAAGAACAACAGCAG	
MIsepD2fwd	GAGCCCATCATCAAATACGTC	1364104 gén egy szakasza
MIsepD2rev	CCAGAAGGTGCAATAAAGTAGAG	
MIsepD3fwd	CGAAAGTGAGGAAGATGAGG	1533021 gén egy szakasza
MIsepD3rev	TTGCGAAGATGGATGAAGTC	
MCactinF	CACTCCTTCACTACCACCGCTGA	Az aktin egy szakasza
MCactinR	GAGAGCAGAGGATTGAGCAGCAG	

3.6. Vizsgálati módszerek

3.6.1. RNS kivonás *M. lusitanicus*-ból

Az RNS izoláláshoz Direct-zol RNA Miniprep kitet (Zymo Research) használtunk a gyártó utasításainak megfelelően. Az RNS mintákat -80 °C-on tároltuk a felhasználásig. RNS kivonásokhoz használt törzseket 25 °C-on neveltük 4 napig folyamatos megvilágítás mellett YNB táptalajon.

3.6.2. RNS gélelektroforézis

Az RNS integritásának vizsgálatához, az RNS mintákhoz mintapuffert adtunk, majd 2% agaróz gélben, 80-110 V feszültséggel, 1-2 órán keresztül végeztük az elválasztást. Mind az agaróz gél készítéséhez, mind futtatópuffernek TAE puffert használtunk. A nukleinsavakat etídium-bromidos festéssel (0,5 µg/ml), UV fény alatt detektáltuk.

3.6.3. cDNS szintézis -reverz transzkripció

A RNS mintákból a reverz transzkripciót Maxima H Minus First Strand cDNASynthesis Kit (Thermo Scientific) segítségével végeztük el. A reakcióhoz oligo(dT)18 és random hexamer primereket használtunk a gyártó utasítása szerint

3.6.4. Valós idejű PCR a transzkripció szintek meghatározásához

A méréseket RNS-ből reverz transzkripcióval előállított cDNS-ből végeztük el. A reakciókat Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (Thermo Scientific) segítségével mértük össze. A nyert eredményeket a $2^{-\Delta\Delta C_t}$ módszer segítségével értékeltük ki (Livak és Schmittgen 2001)

A reakciók összemérése

20 µl végtérfogóban történt 96 lyukú lemezekben:

20-50 ng DNS vagy cDNS

0,4 µM - 0,4 µM specifikus primer (Melléklet 1. táblázat)

1x Maxima SYBR Green qPCR Master Mix

A reakciók körülményei valós idejű qPCR esetében

95 °C 3 perc elődenaturálás, majd 40 cikluson keresztül 95 °C 30 másodperc denaturálás; 60 °C 30 másodperc primer bekötődés; 72 °C 30 másodperc láncszintézis

Ezután *melting curve* analízis

65 °C - 95 °C fél °C-os folyamatos emelkedés mellett.

3.6.5. Az extracelluláris vezikulák tisztítása

Az EV-k izolálásához többféle protokolt is találtunk a szakirodalomban, melyek a centrifugális lépések hosszában, vagy a minták szűrésében tértek csak el egymástól, így mi a következő protokolt használtuk.

Az extracelluláris vezikulák tisztításához a gombatörzsek spóráit celofánnal borított YNB vagy MEA táptalajra/tápoldatra oltottuk. Minden egyes csészére 100 µl 10^6 spóra/ml koncentrációjú spóraszuszpenziót szélesztettünk. Tápoldat esetében 100 ml tápoldatot használtunk, melyben a spóra koncentrációja 10^4 spóra/ml volt. Egy-egy törzs esetében 10-40 csészét használtunk a kísérletnek megfelelően. A szélesztés után 1-4 napig inkubáltuk a tenyészeteket 25 °C-on. Az inkubációs idő leteltével a celofánokat 30 ml PBS-be mostuk, majd a lemosott micéliumokat 50 ml-s falcon csőbe helyeztük. A csöveket ezután 3380 g sebességgel centrifugáltuk 4 °C-on 20 percig. Ezután a felülúszót áthelyeztük egy SS34-s csőbe és 10000 g sebességgel 4 °C-on 20 percig centrifugáltuk. A 20 perc letelte után a felülúszót 0,45 µm-os szűrőn sterilre szűrtük, majd ultracentrifugáltuk 100.000 g sebességgel 4 °C-on 1 órán keresztül. Az üledéket ezután hideg PBS-sel mostuk, majd ismét ultracentrifugáltuk 100.000 g sebességgel 4 °C-on 1 órán keresztül. A mosás után a pelletet 50-100 µl PBS-be felvettük.

3.6.6. Az EV-k jelenlétének és méretének a meghatározása transzmissziós elektron mikroszkóp segítségével

Az EV-ket JEM-1400 Flash transzmissziós elektronmikroszkóppal (JEOL) elemeztük. A negatívan festett EV mintákat formvarral bevont 150 rácspontból álló rézrácsra (Electron Microscopy Sciences) helyeztük.

A mintatartóra 10 µl EV mintát pipettáztunk, majd a mintákat 10 µl 50% metanolban oldott 2% uranil acetáttal (Electron Microscopy Sciences) festettük két alkalommal. A festék eltávolítását követően a mintákat két órán keresztül Petri csészében szárítottuk a mikroszkópos analízis előtt. Az így negatívan festett mintákat szisztematikusan 5-20000-szeres nagyítással pásztáztuk az EV-k jelenlétének az igazolásához, majd 30000-80000-szoros nagyítással rögzítettük a felvételeket egy 16 MP-es Matataki flash sCMOS kamerával.

Az EV-k méretének a meghatározásához 20-20 db látómezőben található összes EV méretét mértük meg 30000-szeres nagyítás mellett. A 20 látómezőben az EV-k száma megközelítette a 100-at. A méret meghatározásakor a lement EV-k méretének az átlagát tüntettük fel.

3.6.7. Az EV-k fehérje tartalmának meghatározása

Emésztési protokoll

A minta teljes fehérje tartalmát BCA kittel határoztuk meg, majd 10 µg fehérjét tartalmazó mintarészt készítettünk elő centrifuga szűrőn történő emésztési protokoll (FASP) alapján. A mintához nátrium-dodecil-szulfátot (SDS, végső koncentráció: 2 m/V %) és ditiotreitolt (DTT, végső koncentráció: 20 mM) adtunk, 5 percig ultrahangos vízfürdőben szonikáltuk, majd 5 percig 100 °C-on inkubáltuk. A mintát Ultracel 30 kDa centrifuga szűrőre mértük, majd több lépésben a minta pufferét 8 M karbamidra cseréltük. Minden centrifugálási lépést 20°C-on, 10 percig, 10000 x g-vel végeztünk. A denaturált fehérjék alkilálásához 50 mM jóacetamidot használtunk, amivel a mintát sötétben, szobahőn, 20 percig inkubáltuk. Ezután a mintát kétszer mostuk 100 µl karbamiddal, majd kétszer 100 µl Tris-HCl-val (pH:8.5, 100 mM). Az emésztést 250 ng tripszinnel végeztük, amihez 1 m/V% nátrium-deoxikolátot adtunk. A 18 órás emésztés elteltével a képződött peptideket új csőbe centrifugáltuk, a nátrium-deoxikolátot pedig 15 µL tömény hangyasav hozzáadásával csaptuk ki. A felülúszót bepároltuk, majd a kezdeti eluensben visszaoldottuk és 2 µL-t injektáltunk az LC-MS rendszerbe.

Folyadékkromatográffal kapcsolt tömegspektrometriás analízis

A mérésekhez egy Waters ACQUITY UPLC M-Class folyadékkromatográfhoz kapcsolt Thermo Orbitrap Exporis™ 240 tömegspektrométert használtunk. Eluensként 0,1% hangyasavat tartalmazó vizet és acetonitrilt használtunk. A peptideket 85 perces nanoflow folyadékkromatográfiás gradiensben választottuk szét, és adatfüggő (DDA) adatgyűjtési módban elemeztük. A peptidek azonosításához és relatív mennyiségük meghatározásához Fragpipe szoftvert használtunk.

3.5.8. Statisztikai módszerek

A kísérletek statisztikai analízisét a GraphPad Prism v 6.0 szoftverrel, parametrikus t-teszt használatával végeztük. Statisztikailag szignifikáns eltérést abban az esetben állapítottunk meg, ha $P < 0,05$ volt. A kísérlet típusától függően bizonyos esetekben a kiértékelést, az átlagok és szórások, valamint a különbségek szignifikanciájának kiszámítását Microsoft Excel program segítségével végeztük, utóbbi esetben párosított vagy párosítatlan t-próbát alkalmaztunk.

3.5.9. *in silico* elemzések

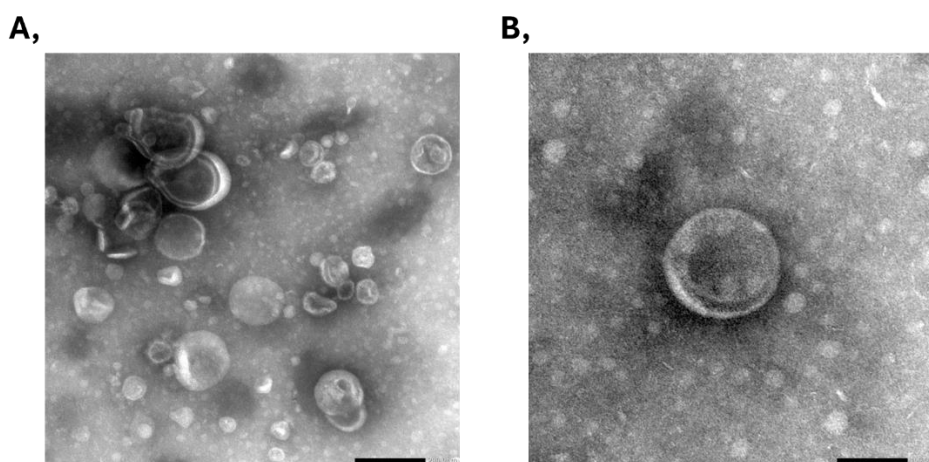
A homológ kereséseket az NCBI BLAST programmal végeztük aminosav szekvencia alapján, illetve felhasználtuk a *Mucor lusitanicus* teljes genomadatbázisát (<https://mycocosm.jgi.doe.gov/Mucci3/Mucci3.home.html>)

4. Eredmények és értékelésük

4.1. A *Mucor lusitanicus* extracelluláris vezikulumjainak a tisztítása

A járomspórás gombák extracelluláris vezikulumairól és azok termelődéséről jelenleg nem áll rendelkezésünkre szakirodalmi adat, így a kutatásunk elején optimalizálni kellett azokat a körülményeket, melyekkel nagy mennyiségben tudunk extracelluláris vezikulát izolálni. Ehhez először is a *M. lusitanicus* CBS277.49, valamint a belőle származó MS12 (leucin, uracil auxotróf mutáns) jelű törzset használtuk. A törzseket tápoldatba és celofánnal fedett szilárd táptalajra szélesztettük. A leoltástól számított 1, 2, 3 és 4. napon is megpróbáltuk izolálni az extracelluláris vezikulumokat.

Az izolálás eredményességét TEM mikroszkóp segítségével vizsgáltuk. Az eredményeink azt mutatták, hogy tápoldatban mind a két törzs igen kisszámú EV-t termelt függetlenül az inkubálási időtől. A vizsgált, tápoldatból származó minták esetében gyakran csak sejttörmeléket találtunk. Ennek ellenére a celofánon nevelt tenyészet esetében az idő előrehaladtával igen nagyszámú EV-t izoláltunk, melyeket már fel tudtunk használni a további kísérleteinkhez (6. ábra).



6. ábra. Celofánnal fedett szilárd táptalajon nevelt *M. lusitanicus* CBS277.49 törzs EV-inek TEM képe. A, a minta 30000-szeres nagyításban látható, a méretskála 200 nm; B, a EV 60000-szeres nagyításban látható, a méretskála 100 nm.

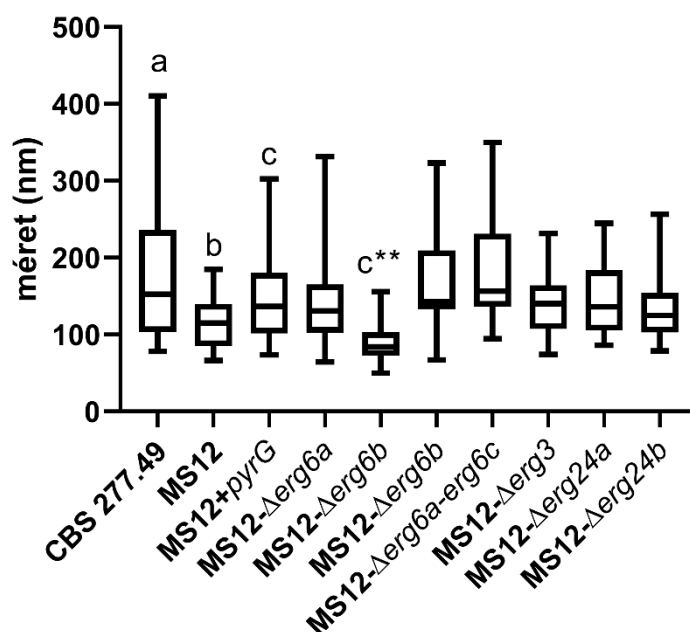
Összehasonlítva a CBS277.49 törzs EV termelését az MS12 jelű törzs EV termelésével azt tapasztaltuk, hogy annak ellenére, hogy a szilárd táptalajon nevelve a törzseket, már kellő mennyiségű EV-t tudtunk izolálni mind a két törzsből, az MS12 törzs EV termelése alul maradt a CBS277.49 törzs EV termeléséhez képest. Mivel az MS12 törzs leucin és uracil auxotróf mutáns, ezért feltételezzük, hogy az auxotrófia befolyásolhatja az EV termelődést, kiváltképp

az uracil auxotrófia, melyről már korábban is bebizonyosodott, hogy kihat a gomba fitnessére és virulenciájára (Ibragimova és mtsai. 2020; Bauer és mtsai. 2023; Szebenyi és mtsai. 2023).

4.2. A szterin bioszintézisben mutáns *Mucor* izolátumok EV termelésének a vizsgálata

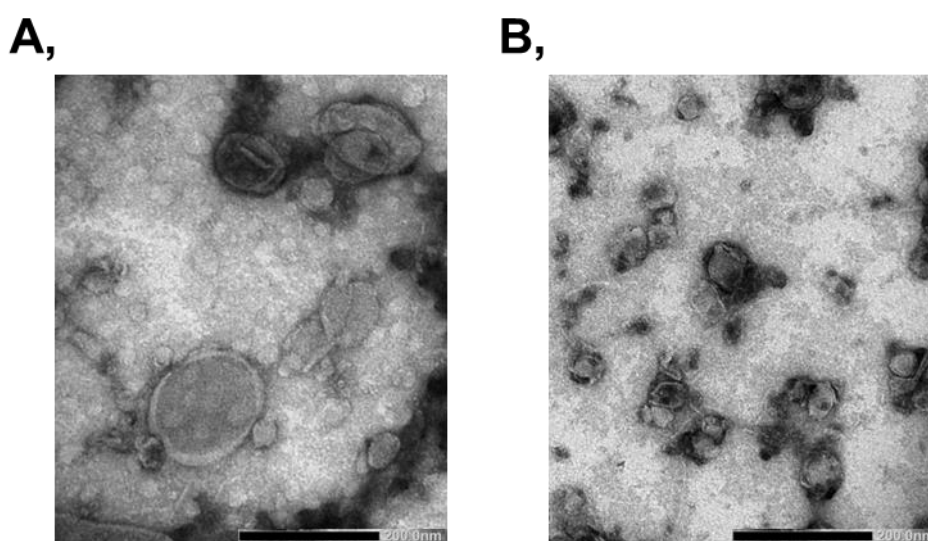
A gomba sejtek által termelt EV-k membránjának fő szterin összetétele az ergoszterin és a lanoszterin (Liebana-Jordan és mtsai. 2021). A kutatócsoportunk egyik kutatási területe a *M. lusitanicus* szterin bioszintézisének a tanulmányozása és hatása a gomba azokkal szembeni rezisztenciájára (Bauer és mtsai. 2023). A laborunkban korábban létrehoztak különböző, az ergoszterin bioszintézisben mutáns törzseket, melyek extracelluláris vezikula termelését megvizsgáltuk kitérve az extracelluláris vezikulák alakjában és méretében megjelenő változásokra.

A 7. ábrán látható, hogy az *erg6b* mutáns törzs esetében a vizsgált EV-k mérete szignifikánsan kisebbnek bizonyult, mint a kontrollként használt MS12+pyrG törzs által termelt EV-k mérete.



7. ábra. A kutatólaborunkban korábban létrehozott ergoszterin bioszintézisben mutáns izolátumok extracelluláris vezikuláinak a mérete. A mérés során közel 100 EV méretét mértük le, az eredményeket átlagoltuk. A statisztikai analízist párosítatlan t-próbát alkalmaztunk, ** $p < 0,01$.

Ahogy korábban fentebb említettem az uracil auxotrófia kihat a gomba fitnessére. Mivel az egyes mutáns izolátumok esetében a homológ rekombináció során szelekciós markerként a *pyrG* gént alkalmaztuk, ezért kontroll törzsnek az MS12+*pyrG* törzset használtuk, melyben komplementálva lett az uracil auxotrófia. Az *erg6b* mutáns izolátum esetében az ergoszterin szint szignifikánsan csökkent, míg a lanoszterin szint szignifikánsan megemelkedett a kontroll törzshöz képest (Bauer és mtsai. 2023). Továbbá a kutatócsoportunk ebben a mutáns izolátumban olyan alternatív szterin bioszintézis útvonalakat azonosítottak, melyek segítik a gomba túlélését azol kezelést követően (2. ábra). A többi mutáns törzs esetében nem tapasztaltunk eltérést a gombatörzsek által termelt EV-k méretében.



8. ábra. Reprezentatív minta az (A) MS12+*pyrG* és az (B) *erg6b* deléziós mutáns törzs által termelt EV-kről. A méretskála 200 nm-nek felel meg.

Cryptococcus neoformans esetében az *erg6* gén kiütését követően a mutáns izolátum EV-inek lanoszterin tartalma megnőtt, mellyel feltehetően a sejt kompenzálni próbálta az ergoszterin hiányát, valamint az EV-k protein tartalma is szignifikánsan megemelkedett (Oliveira és mtsai. 2020). Továbbá azt tapasztalták, hogy a vad típusú és a rekonstitutív *erg6* mutáns izolátum, a méretet tekintve, homológ EV populációt termelt, ezzel szemben az *erg6* deléziós mutáns törzs esetében egy heterológ EV populáció jelent meg.

4.3. A *M. lusitanicus* CBS277.49 által termelt EV-k fehérje tartalmának vizsgálata

Mivel *C. neoformans* esetében megváltozott az *erg6* mutáns által termelt EV-k protein tartalma (Oliveira és mtsai. 2020), ezért a következő lépésben meg szeretnénk vizsgálni a *M. lusitanicus* által termelt EV-k fehérje tartalmát. A vizsgálathoz minimum 5 µg fehérjére volt

szükségünk. A fehérje analízishez először a *M. lusitanicus* CBS277.49 jelű törzset használtuk. Az extracelluláris vezikulák tisztításához ebben az esetben 40 Petri csészéről gyűjtöttük össze a mintát. Az ultracentrifugálást követően a pelletet 100 µl PBS-be szuszpendáltuk fel, majd Qubit fluorometer-rel elemeztük a fehérje tartalmát. Az össz fehérje tartalom 13 µg-nak bizonyult, így megkezdtük a kooperációs partnereink segítségével (Dr. Kele Zoltán és Dr. Kecskeméti Gábor, SZTE Orvosi Vegytani Intézet) az EV-k fehérje tartalmának analízisét.

A fehérje tartalom analízisét követően 1622 fehérjét találtunk, melyeket minimum két peptiddel lehetett azonosítani. *Aspergillus fumigatus* esetében vizsgálták a protoplasztok és a regenerálódó protoplasztok által termelt EV-k fehérje tartalmát. A protoplasztok által termelt EV-kben összesen 142 fehérjét azonosítottak, szemben a regenerálódó protoplasztok által termelt EV-vel, melyekben összesen 2056 fehérjét azonosítottak (Rizzo és mtsai. 2020).

A nagy terjedelem miatt csak azokat a találatokat szeretnénk bemutatni, melyeket korábban már azonosítottak más opportunistá humán patogén gombák (*Candida albicans*, *Histoplasma capsulatum*, *Cryptococcus neoformans* és *Aspergillus fumigatus*) által termelt EV-ben (1. számú melléklet). A táblázatból látható, hogy a *Mucor* által termelt EV-kben is megjelennek a chaperonok (Hsp70, Hsp60), a sejtfal kialakításában szerepet játszó fehérjék, (béta-glükózidáz, béta-1,3-glükanoziltranszferáz, kitin szintáz, mannozidáz), a lipid- (pl. farnezil pirofoszfát szintáz, acetil-koenzim A szintáz), cukor- (pl. foszfo-glükomutáz, izocitrát liáz, glicerinaldehid-3-foszfát dehidrogenáz) és fehérjebioszintézisben (ubikvitin) szerepet játszó fehérjék, valamint riboszómális és sejtmagi fehérjék is (pl. hiszton H2A, hiszton H2B).

A fehérje analízis során olyan fehérjéket is tudtunk azonosítani, melyek sejt felszíni fehérjeként vannak prediktálva. Ilyenek a spóra felszíni fehérjék (CotH), illetve a hidrofób sejt felszíni fehérje (HsbA). Azonosítottunk továbbá SNARE fehérjéket is (t-SNARE és v-SNARE). A t-SNARE proteinek a sejtmembránon, míg a v-SNARE fehérjék a vezikulán találhatóak. Az eredmények értékelése során azonosítottunk egy gomba specifikus transzkripciós faktor domént hordozó transzkripciós faktort is (Tf106). A laborunkban ennek a transzkripciós faktornak a jellemzése is folyamatban van és az eddigi eredmények azt mutatják, hogy részt vesz a gomba antifungális szerekekkel, leginkább az azolokkal, szembeni rezisztencia kialakításában.

Az eredmények értékelése során szeptin fehérjéket is azonosítottunk. Összesen 6 szeptin fehérjét sikerült azonosítanunk, melyek protein azonosítója a következő volt; 1390768, 1598245, 1472258, 1474387, 1494442 és 1466549 volt.

4.4. A szeptin fehérjék jellemzése

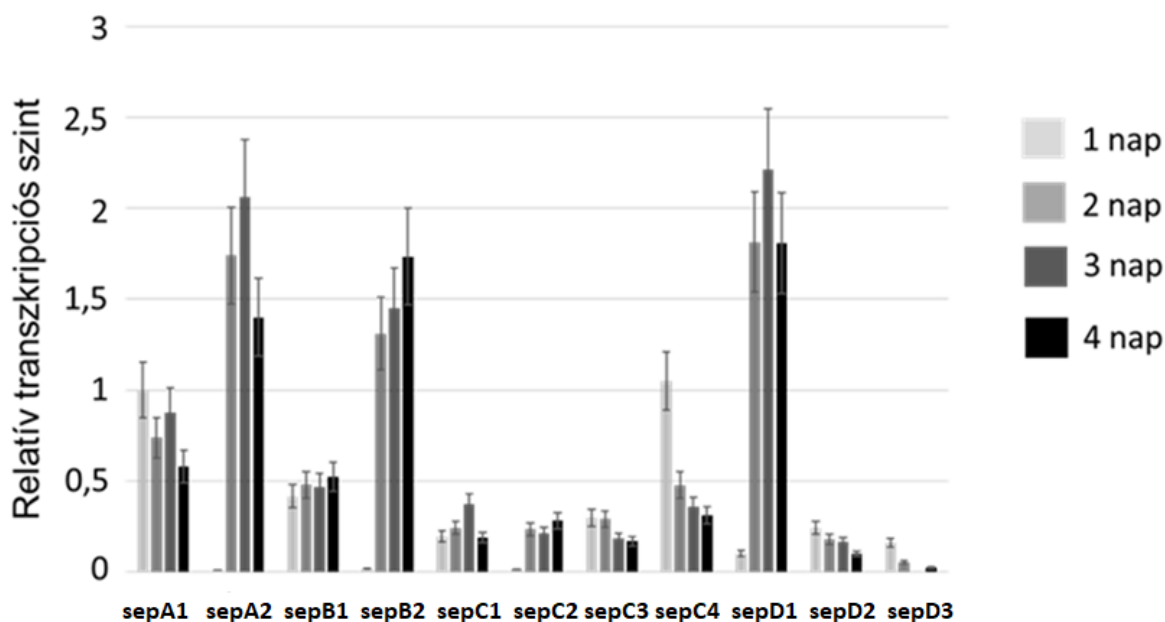
Az azonosított szeptin fehérjék aminosav szekvenciáinak felhasználásával, illetve az *Aspergillus nidulans* AspA (AAK21867.1), AspB (AAB41233.1), AspC (XP_050467270.1) és AspD (AAK21868.2) fehérjeivel a *Mucor* genom adatbázisban homológia keresést végeztünk. A homológia szekvencia eredményeként további feltételezett szeptin fehérjéket azonosítottunk, melyeket a 3. táblázatban tüntettünk fel.

3. táblázat. A *Mucor* genomban azonosított szeptin fehérjék.

azonosító	elnevezés	<i>Aspergillus</i> homológ
1390768	sepA1	SepA
1598245	sepA2	
1472258	sepB1	SepB
1474387	sepB2	
1466549	sepC1	SepC
1343381	sepC2	
1455798	sepC3	
1334600	sepC4	
1494442	sepD1	SepD
1364104	sepD2	
1533021	sepD3	

Ahogy fentebb említettem az extracelluláris vezikulák fehérje analízise során hat szeptin fehérjét azonosítottunk, melyek a sepA1, sepA2, sepB1, sepB2, sepC4 és sepD1 voltak. A szeptin fehérjék hetero-oktamer komplexet képeznek, mely az *Aspergillus* esetében a sepA-sepB-SepC-SepD fehérjékből áll. Azonban *Mucor* vonatkozásában mind a sepA, mind pedig a sepB fehérje mind a két izoformáját azonosítani tudtuk az EV-kben. Felmerül a kérdés, hogy *Mucor* esetében a szeptin fehérjék nem csak egy féle komplexet képesek kialakítani, hanem az egyes szeptin fehérje izoformák által kialakított különböző variációit a hetero-oktamer komplexnek.

Annak a megállapítására, hogy az egyes szeptin fehérjéket kódoló gének hogyan fejeződnek ki, megvizsgáltuk a gének relatív transzkripció szintjét valós idejű-kvantitatív PCR segítségével. A 9. ábrán látható a gének kifejeződésének eredménye.



9. ábra. A szeptin gének kifejeződése a tenyésztési időszak alatt. Kontrollként a *sepA1* gén első napon mért értékét vettük egynek. A diagrammon 2 független mérés átlagát tüntettük fel.

Az ábrán látható, hogy az *sepA2*, *sepB2*, illetve a *sepD1* igen magas relatív transzkripció szintet mutat a tenyésztési időszak alatt, míg a *sepC* gének közül a legmagasabb értéket a *sepC4* mutatja, azonban ennek a génnek a kifejeződése alul marad a többi génhez képest. Tisztán látható az ábrán, hogy az egyes szeptin gének közül, mindegyik specifikus szeptin csoportban van egy, amely domináns kifejeződést mutat a többi izoformához képest. Az ábrán továbbá látható, hogy a *sepD4* gén mutatja a legkisebb génkifejeződést a többi génhez képest.

Felmerül a kérdés, hogy akkor ezek a domináns gének-e a core szeptinek? – azonban az EV-k fehérje tartalmának analízise rámutatott, hogy mind a *SepA1*, *SepA2*, mind pedig a *SepB1*, *SepB2* jelen van az extracelluláris vezikulákban. A további terveink között szerepel az egyes szeptin fehérjék kiütése CRISPR-Cas9 rendszer segítségével, majd a mutáns izolátumok jellemzése, valamint extracelluláris vezikula termelékük vizsgálata.

5. Diskusszió

A munkánk során arra kerestük a választ, hogy milyen szerepet töltenek be a járomspórás gombák extracelluláris vezikulái az antifugális rezisztenciában. Mivel a járomspórás gombák extracelluláris vezikulumairól és azok termelődéséről jelenleg nem áll rendelkezésünkre szakirodalmi adat, így kutatásunk első lépéseként tökéletesítenünk kellett az EV tisztítás folyamatát, melyet sikeresen optimalizáltunk és ennek köszönhetően már lehetőség nyílt azok jellemzésére. Az EV-k mennyiségének tanulmányozása során, összehasonlítottuk a *Mucor lusitanicus* CBS277.49 prototróf és az MS12 leucin/uracil dupla auxotróf törzs EV termelését és azt tapasztaltuk, hogy az CBS277.49 törzs EV termelése felül múlta az MS12 törzs által termelt EV mennyiségét, ennek hátterében az uracil auxotrófia állhat. Korábban már leírták, hogy az uracil auxotrófia kihat a gomba növekedésére, virulenciájára és általánosságba véve a fitneszére (Ibragimova és mtsai 2020; Bauer és mtsai 2023; Szebenyi és mtsai 2023). Továbbá megvizsgáltuk azt is, hogy folyadék vagy szilárd fázison képes-e a gomba több EV-t termelni és az eredményeink azt mutatják, hogy nagyobb mennyiségben tudunk a szilárd táptalajon nevelt tenyészetből EV-t tisztítani, mint folyadék kultúrából.

Az EV-k lipid kettős réteggel körülhatárolt részecskék, melyek számos biológiailag aktív anyagot képesek hordozni (Deatherage és mtsai 2012., Witwer és mtsai 2019.) Laborunkban korábban előállítottak különböző, az ergoszterin bioszintézisben mutáns, gombatörzset, melyek virulenciája, illetve antifungális szerekekkel szembeni rezisztenciája megváltozott (Bauer és mtsai 2023). Mivel az EV-k részt vehetnek az opportunistá humán patogén gombák virulenciájában, illetve antifungális szerekekkel szembeni rezisztencia kialakításában (Hu és mtsai 2013, Godinho és mtsai 2014, Vargas és mtsai 2015, Hu és mtsai 2015, Da Silva és mtsai 2016, Zamith-Miranda és mtsai 2018, Zarnowski és mtsai 2018, Zhao és mtsai 2019, Park és mtsai 2020), ezért megvizsgáltuk a laborunkban létrehozott mutáns izolátumok EV termelését. Az eredményeink azt mutatták, hogy az *erg6b* mutáns izolátum extracelluláris vezikuláinak mérete szignifikánsan alul marad a többi törzshöz képest. Bauer és munkatársai (2023) kimutatták, hogy az *erg6b* gén az egyik legfontosabb gén az ergoszterin bioszintézisben, hiánya drasztikusan csökkenti az ergoszterin tartalmat és új alternatív szterin bioszintézis útvonalakat nyit meg. Oliveira és mtsai (2020) *Cryptococcus neoformans*-ban kimutatták, hogy az *erg6* gén hiánya kihat a gomba virulenciájára és membrán szerkezetére, valamint az *erg6* deléciós mutáns törzs szignifikánsan kisebb méretű EV-ket volt képes kiválasztani, mint a szülői törzs.

Mindezek után az EV-k fehérje tartalmát is elemeztük, ugyanis *Cryptococcus neoformans* esetében az *erg6* gén kiütését (Oliveira és mtsai 2020) követően a mutáns izolátum EV-inek protein tartalma is szignifikánsan megemelkedett és az analízis eredményeként több olyan fehérjét is megtaláltunk, amelyeket más opportunistá humán patogén fajokban is sikerült azonosítani (pl. *Candida albicans*, *Histoplasma capsulatum*, *Cryptococcus neoformans* és *Aspergillus fumigatus*) (Nimrichter és mtsai 2016, Rizzo és mtsai 2020, Dawson és mtsai 2020). Mindezek mellett, olyan fehérjéket is azonosítottunk, melyekről korábban azt gondolták, hogy csak a járomspórás gombákban fordulnak elő. Ilyenek a cotH fehérjék, melyeknek a járomspórás gombák virulenciájában és a gazda szervezetben belüli invázióban igen nagy szerepük van (Gebremariam és mtsai 2014, Szebenyi és mtsai 2023). Mivel ezen fehérjék receptor-ligand kölcsönhatásba lépnek az endotél sejteken található Grp78 fehérjével, az a tény, hogy a *Mucor* EV-kben megtalálható, felveti a kérdést, hogy a sejten belüli inváziót és a lokális mucormikózis szisztémássá válását nem az EV-k készítik-e elő a gomba számára. Ennek a hipotézisnek a vizsgálatához további kísérletek szükségesek.

A gomba EV-k biogeneziséről viszonylag még mindig keveset tudunk, de az biztos, hogy a folyamat során fontos szerepe van ESCRT komplexnek. Az ESCRT komplex több folyamatban is részt vesz, például a MVB-k (multivezikuláris test) által generált vezikulumok felszabadításában, vagy a citokinézis végén a leánysejtek szétválasztásában (Schmidt és mtsai 2012). A szeptinek, a G-proteinek közé tartozó fehérjék, melyek részt vesznek a sejtek citokinézisében (Hartwell 1971), a sejtciklus szabályozásában, exocitózisban, a térbeli kompartmentalizációban (Fung és mtsai 2014, Momany és mtsai 2017). Az eddigi eredmények azt mutatják, hogy a szeptinek és az ESCRT rendszer funkciója részben átfed. Azonban az, hogy a két rendszer egymástól függetlenül vagy egymással összhangban dolgozik-e, még nem tisztázott. 2019-ben Karasmanis és mtsai írták le, hogy *S. cerevisiae* esetén a szeptin fehérjék irányítják az ESCRT rendszer elemeit a citokinezis során, azonban az, hogy az extracelluláris vezikulák termelődését összhangban szabályozzák-e, még nem vizsgálták. A *Mucor* EV-inek fehérje tartalmának analízise során hat feltételezett szeptin fehérjét azonosítottunk. Az *Aspergillus nidulans* szeptin fehérjével már végeztünk homológia keresést a *Mucor* adatbázisban, és megfigyeltük, hogy *Mucor* törzsek esetében az extracelluláris vezikulákban a SepA, mind pedig a SepB fehérje mindkét izoformáját azonosítani tudtuk. Homológia keresést végezve a *Mucor* genom adatbázisban, összesen 11 feltételezett szeptin fehérjét kódoló gént azonosítottunk, melyek kifejeződését megvizsgáltuk a tenyésztési idő alatt. A gének és az általuk kódolt fehérjék részletes jellemzése folyamatban van.

6. Irodalomjegyzék

Arnesenm J. A. , J. Małagocka, A. Gryganskyi, I. V. Grigoriev, K. Voigt, J. E. Stajich és H. H. De Fine Licht, „Early Diverging Insect-Pathogenic Fungi of the Order Entomophthorales Possess Diverse and Unique Subtilisin-Like Serine Proteases”, *G3 Genes|Genomes|Genetics*, köt. 8, sz. 10, o. 3311–3319, okt. 2018, doi: [10.1534/g3.118.200656](https://doi.org/10.1534/g3.118.200656).

Baberwal P., A. Singh, A. Adarsh és Y. Kumar, „Key molecules of Mucorales for COVID-19-associated mucormycosis: a narrative review” *Journal of Bio-X Research*, köt. 5, sz. 3, aug. 2022, doi: [10.1097/JBR.0000000000000131](https://doi.org/10.1097/JBR.0000000000000131).

Bauer K. , B. Rafael, B. Vágó, S. Kiss-Vetráb, A. Molnár, Cs. Szebenyi, M. Varga, A. Szekeres, Cs. Vágvölgyi, T. Papp és G. Nagy, „Characterization of the Sterol 24-C-Methyltransferase Genes Reveals a Network of Alternative Sterol Biosynthetic Pathways in *Mucor lusitanicus*”, *Microbiology Spectrum*, köt. 0, sz. 0, o. e00315-23, ápr. 2023, doi: [10.1128/spectrum.00315-23](https://doi.org/10.1128/spectrum.00315-23).

Bridges A. A. és A. S. Gladfelter, „Fungal pathogens are platforms for discovering novel and conserved septin properties”, *Current Opinion in Microbiology*, köt. 20, o. 42–48, aug. 2014, doi:[10.1016/j.mib.2014.04.004](https://doi.org/10.1016/j.mib.2014.04.004).

Bridges A. A. és A. S. Gladfelter, „Septin Form and Function at the Cell Cortex^{*}”, *Journal of Biological Chemistry*, köt. 290, sz. 28, o. 17173–17180, júl. 2015, doi: [10.1074/jbc.R114.634444](https://doi.org/10.1074/jbc.R114.634444).

Cannon R. D., E. Lamping, A. R. Holmes, K. Niimi, P. V. Baret, M. V. Keniya, K. Tanabe, M. Niimi, A. Goffeau és C. Monk, „Efflux-Mediated Antifungal Drug Resistance”, *Clinical Microbiology Reviews*, köt. 22, sz. 2, o. 291–321, ápr. 2009, doi: [10.1128/CMR.00051-08](https://doi.org/10.1128/CMR.00051-08).

Caramalho R., J. D. A. Tyndall, B. C. Monk, T. Larentis, C. Lass-Flörl, és M. Lackner, „Intrinsic short-tailed azole resistance in mucormycetes is due to an evolutionary conserved aminoacid substitution of the lanosterol 14 α -demethylase”, *Sci Rep*, köt. 7, sz. 1, o. 15898, nov. 2017, doi: [10.1038/s41598-017-16123-9](https://doi.org/10.1038/s41598-017-16123-9).

Casamayor A. és M. Snyder, „Molecular Dissection of a Yeast Septin: Distinct Domains Are Required for Septin Interaction, Localization, and Function”, *Molecular and Cellular Biology*, köt. 23, sz. 8, o. 2762-2777, márc. 2023, doi: [10.1128/MCB.23.8.2762-2777.2003](https://doi.org/10.1128/MCB.23.8.2762-2777.2003).

Cavalheiro M., P. Pais, M. Galocha és M. C. Teixeira, „Host-Pathogen Interactions Mediated by MDR Transporters in Fungi: As Pleiotropic as it Gets!”, *genes*, köt. 9, sz. 332, júl. 2018, doi: [10.3390/genes9070332](https://doi.org/10.3390/genes9070332).

Chao J. T. , A. K. O. Wong, S. Tavassoli, B. P. Young, A. Chruscicki, N. N. Fang, L.J. Howe, T. Mayor, L. J. Foster és C. J. R. Loewen, „Polarization of the Endoplasmic Reticulum by ER-Septin Tethering”, *Cell*, köt. 158, o. 620-632, júl. 2014, doi:[10.1016/j.cell.2014.06.033](https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.06.033)

Chan W., F. W.-N. Chow, C. Tsang, X. Liu, W. Yao, T. T.-Y. Chan, G. K-H. Siu, A. Y.-M. Ho, K. S. Luk, S. K.-P. Lau és P. C.-Y. Woo, „Induction of amphotericin B resistance in susceptible *Candida auris* by extracellular vesicles”, *Emerging Microbes & Infections*, köt. 11, sz. 1, o. 1900–1909, dec. 2022, doi: [10.1080/22221751.2022.2098058](https://doi.org/10.1080/22221751.2022.2098058).

Colombo A. C., A. Rella, T. Normile, L. S. Joffe, P. M. Tavares, G. R. de S. Araújo, S. Frases, E. P. Orner, A. M. Farnoud, B. C. Fries, B. Sheridan, L. Nimrichter, M. L. Rodrigues és M. Del Poeta „Cryptococcus neoformans Glucuronoxylomannan and Sterylglucoside Are Required for Host Protection in an Animal Vaccination Model”, *mBio*, köt. 10, sz. 2, ápr. 2019, doi: [10.1128/mbio.02909-18](https://doi.org/10.1128/mbio.02909-18).

Cowen L. E. , D. Sanglard, S. J. Howard, P. D. Rogers, és D. S. Perlin, „Mechanisms of Antifungal Drug Resistance”, *Cold Spring Harb Perspect Med*, köt. 5, sz. 7, o. a019752, jan. 2015, doi: [10.1101/cshperspect.a019752](https://doi.org/10.1101/cshperspect.a019752).

Cowen L. E. , D. Sanglard, S. J. Howard, P. D. Rogers, és D. S. Perlin, „Mechanisms of Antifungal Drug Resistance”, *Cold Spring Harb Perspect Med*, köt. 5, sz. 7, o. a019752, jan. 2015, doi: [10.1101/cshperspect.a019752](https://doi.org/10.1101/cshperspect.a019752).

Dagdas Y. F., K. Yoshino, G. Dagdas, L. S. Ryder, E. Bielska, G. Steinberg és N. J. Talbot, „Septin-Mediated Plant Cell Invasion by the Rice Blast Fungus, *Magnaporthe oryzae*”, *Science*, köt. 336, sz. 6088, o. 1590–1595, jún. 2012, doi: [10.1126/science.1222934](https://doi.org/10.1126/science.1222934).

Deatherage B. L. és B. T. Cookson, „Membrane Vesicle Release in Bacteria, Eukaryotes, and Archaea: a Conserved yet Underappreciated Aspect of Microbial Life”, *Infection and Immunity*, köt. 80, sz. 6, máj. 2020, doi: [10.1128/iai.06014-11](https://doi.org/10.1128/iai.06014-11).

DeMay B. S. , X. Bai, L. Howard, P. Occhipinti, R. A. Meseroll, E. T. Spiliotis, R. Oldenbourg és A. S. Gladfelter, „Septin filaments exhibit a dynamic, paired organization that is conserved from yeast to mammals”, *Journal of Cell Biology*, köt. 193, o. 1065-1081, jún. 2011, doi: [10.1083/jcb.201012143](https://doi.org/10.1083/jcb.201012143).

de Oliveira H. C. , R. F. Castelli, F. C. G. Reis, J. Rizzo, és M. L. Rodrigues, „Pathogenic Delivery: The Biological Roles of Cryptococcal Extracellular Vesicles”, *Pathogens*, köt. 9, sz. 9, Art. sz. 9, szept. 2020, doi: [10.3390/pathogens9090754](https://doi.org/10.3390/pathogens9090754).

Dulal N., A. Rogers, Y. Wang, és M. Egan, „Dynamic assembly of a higher-order septin structure during appressorium morphogenesis by the rice blast fungus”, *Fungal Genetics and Biology*, köt. 140, o. 103385, júl. 2020, doi: [10.1016/j.fgb.2020.103385](https://doi.org/10.1016/j.fgb.2020.103385).

Eisenman H. C. , S. Frases, A. M. Nicola, M. L. Rodrigues, és A. Casadevall, „Vesicle-associated melanization in *Cryptococcus neoformans*”, *Microbiology*, köt. 155, sz. 12, o. 3860–3867, 2009, doi: [10.1099/mic.0.032854-0](https://doi.org/10.1099/mic.0.032854-0).

Fisher M. C. és D. W. Denning, „The WHO fungal priority pathogens list as a game-changer”, *Nat Rev Microbiol*, köt. 21, sz. 4, o. 211–212, ápr. 2023, doi: [10.1038/s41579-023-00861-x](https://doi.org/10.1038/s41579-023-00861-x).

Fung K. Y. Y., L. Dai, és W. S. Trimble, „Chapter Seven - Cell and Molecular Biology of Septins”, in *International Review of Cell and Molecular Biology*, köt. 310, K. W. Jeon, Szerk., Academic Press, 2014, o. 289–339. doi: [10.1016/B978-0-12-800180-6.00007-4](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800180-6.00007-4).

Hagiwara D., D. Miura, K. Shimizu, S. Paul, A. Ohba, T. Gono, A. Watanabe, K. Kamei, T. Shintani, W. S. Moye-Rowley, S. Kawamoto és K. Gomi, „A Novel Zn²-Cys₆ Transcription

Factor AtrR Plays a Key Role in an Azole Resistance Mechanism of *Aspergillus fumigatus* by Co-regulating cyp51A and cdr1B Expressions” *PLOS Pathogens*, köt. 13, e1006096, jan. 2017, doi: [10.1371/journal.ppat.1006096](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006096).

Hartwell L. H., „Genetic control of the cell division cycle in yeast: IV. Genes controlling bud emergence and cytokinesis”, *Experimental Cell Research*, köt. 69, sz. 2, o. 265–276, dec. 1971, doi: [10.1016/0014-4827\(71\)90223-0](https://doi.org/10.1016/0014-4827(71)90223-0).

Hibbett D. S., M. Binder, J. F. Bischoff, M. Blackwell, P. F. Cannon, O. E. Eriksson, S. Huhndorf, T. James, P. M. Kirk, R. Lücking, H. T. Lumbsch, F. Lutzoni, P. B. Mathony, D.J. McLaughlin, M. J. Powell, S. Redhead, C.L. Schoch, J. W. Spatafora, J. A. Stalpers, R. Vilgalys, N. Zhang, „A higher-level phylogenetic classification of the *Fungi*”, *Mycological Research*, köt. 111, sz. 5, o. 509–547, máj. 2007, doi: [10.1016/j.mycres.2007.03.004](https://doi.org/10.1016/j.mycres.2007.03.004).

Hotchi M., M. Okada, és T. Nasu, „Present state of fungal infections in autopsy cases in Japan”, *Am J Clin Pathol*, köt. 74, sz. 4, o. 410–416, okt. 1980, doi: [10.1093/ajcp/74.4.410](https://doi.org/10.1093/ajcp/74.4.410).

Hu G., M. Caza, B. Cadieux, V. Chan, V. Liu, és J. Kronstad, „Cryptococcus neoformans Requires the ESCRT Protein Vps23 for Iron Acquisition from Heme, for Capsule Formation, and for Virulence”, *Infection and Immunity*, köt. 81, sz. 1, o. 292–302, dec. 2013, doi: [10.1128/iai.01037-12](https://doi.org/10.1128/iai.01037-12).

Hu G., M. Caza, B. Cadieux, E. Bakkeren, E. Do, W. H. Jung és J. W. Kronstad, „The endosomal sorting complex required for transport machinery influences haem uptake and capsule elaboration in *Cryptococcus neoformans*”, *molecular microbiology*, köt. 93, sz. 5, o. 973–992, jún. 2015, doi: [10.1111/mmi.12985](https://doi.org/10.1111/mmi.12985).

Ibragimova S., Cs. Szebenyi, R. Sinka, E. I. Alzyoud, M. Homa, Cs. Vágvolgyi, G. Nagy és T. Papp, „CRISPR-Cas9-Based Mutagenesis of the Mucormycosis-Causing Fungus *Lichtheimia corymbifera*”, *International Journal of Molecular Sciences*, köt. 21, sz. 10, Art. sz. 10, jan. 2020, doi: [10.3390/ijms21103727](https://doi.org/10.3390/ijms21103727).

Joffe L. S., L. Nimrichter, M. L. Rodrigues és M. Del Poeta, „Potential Roles of Fungal Extracellular Vesicles during Infection”, *mSphere*, köt. 1, sz. 4, jún. 2016, doi: [10.1128/msphere.00099-16](https://doi.org/10.1128/msphere.00099-16).

Khan A., M. McQuilken, és A. S. Gladfelter, „Septins and Generation of Asymmetries in Fungal Cells”, *Annual Review of Microbiology*, köt. 69, sz. Volume 69, 2015, o. 487–503, okt. 2015, doi: [10.1146/annurev-micro-091014-104250](https://doi.org/10.1146/annurev-micro-091014-104250).

Kozubowski L. és J. Heitman, „Septins enforce morphogenetic events during sexual reproduction and contribute to virulence of *Cryptococcus neoformans*”, *Molecular Microbiology*, köt. 75, sz. 3, o. 658–675, 2010, doi: [10.1111/j.1365-2958.2009.06983.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06983.x).

Leipe D. D., Y. I. Wolf, E. V. Koonin és L. Aravind, „Classification and evolution of P-loop GTPases and related ATPases”, *Journal of Molecular Biology*, köt. 317, sz. 1, o. 41–72. márc. 2002, doi: [10.1006/jmbi.2001.5378](https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.5378).

Leone F. , L. Bellani, S. Muccifora, L. Giorgetti, P. Bongioanni M. Simili, B.Maserti, R.Del Carratore, „Analysis of extracellular vesicles produced in the biofilm by the dimorphic yeast *Pichia fermentans*”, *Journal of Cellular Physiology*, köt. 233, sz. 4, o. 2759–2767, 2018, doi: [10.1002/jcp.25885](https://doi.org/10.1002/jcp.25885)

Li L., X.-M. Zhu, Z.-Z. Su, M. D. Poeta, X.-H. Liu, és F.-C. Lin, „Insights of roles played by septins in pathogenic fungi”, *Virulence*, köt. 12, o. 1550-1562, dec. 2021, doi: [10.1080/21505594.2021.1933370](https://doi.org/10.1080/21505594.2021.1933370).

Li Y., J. L. Steenwyk, Y. Chang, Y. Wang, T. Y. James, J. E. Stajich, J. W. Spatafora, M. Groenewald, C. W. Dunn, C. T. Hittinger, X.-X. Shen és A. Rokas, „A genome-scale phylogeny of the kingdom Fungi”, *Current Biology*, köt. 31, sz. 8, o. 1653-1665, ápr. 2021, doi: [10.1016/j.cub.2021.01.074](https://doi.org/10.1016/j.cub.2021.01.074).

Liebana-Jordan M., B. Brotons, J. M. Falcon-Perez és E. Gonzalez, „Extracellular Vesicles in the Fungi Kingdom”, *Int. J. Mol. Sci.*, köt. 22, sz. 7221, júl. 2021, doi: [10.3390/ijms22137221](https://doi.org/10.3390/ijms22137221).

Martin-Vicente A. , A. C. O. Souza, A. V. Nywening, W. Ge és J R. Fortwendel, „Overexpression of the *Aspergillus fumigatus* Small GTPase, RsrA, Promotes Polarity Establishment during Germination”, *J. Fungi*, köt. 6, o. 285, nov. 2020, doi: [10.3390/jof6040285](https://doi.org/10.3390/jof6040285).

Marquardt J. , X. Chen és E. Bi, „Architecture, remodeling, and functions of the septin cytoskeleton”, *Cytoskeleton*, köt. 76, sz. 1, o. 7-14, jan. 2019, doi: [10.1002/cm.21475](https://doi.org/10.1002/cm.21475).

Morschhäuser J. , „Regulation of multidrug resistance in pathogenic fungi”, *Fungal Genetics and Biology*, köt. 47, sz. 2, o. 94–106, febr. 2010, doi: [10.1016/j.fgb.2009.08.002](https://doi.org/10.1016/j.fgb.2009.08.002).

Muszevska A. , J. Pawłowska, és P. Krzyściak, „Biology, systematics, and clinical manifestations of Zygomycota infections”, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, köt. 33, sz. 8, o. 1273–1287, aug. 2014, doi: [10.1007/s10096-014-2076-0](https://doi.org/10.1007/s10096-014-2076-0).

Naranjo-Ortiz M. A. és T. Gabaldón, „Fungal evolution: diversity, taxonomy and phylogeny of the Fungi”, *Biological Reviews*, köt. 94, sz. 6, o. 2101-2137, dec. 2019, doi: [10.1111/brv.12550](https://doi.org/10.1111/brv.12550).

Nimrichter L., M. M. de Souza, M. Del Poeta, J. D. Nosanchuk, L. Joffe, P. de M. Tavares és M. L. Rodrigues, „Extracellular Vesicle-Associated Transitory Cell Wall Components and Their Impact on the Interaction of Fungi with Host Cells”, *Front. Microbiol.*, köt. 7, júl. 2016, doi: [10.3389/fmicb.2016.01034](https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01034).

Nagy G. , Cs. Szebenyi, Á. Csernetics, A. Grace Vaz, E. J. Tóth, Cs. Vágvolgyi és T. Papp, „Development of a plasmid free CRISPR-Cas9 system for the genetic modification of *Mucor circinelloides*”, *Sci Rep*, köt. 7, sz. 1, o. 16800, dec. 2017, doi: [10.1038/s41598-017-17118-2](https://doi.org/10.1038/s41598-017-17118-2).

Oliveira F. F. M., H. C. Paes, L. D. F. Peconick, F. L. Fonseca, C. L. F. Marina, A. L. Bocca, M. Homem-deMello, M. L. Rodrigues, P. Albuquerque, A. M. Nicola, J. A. Alspaugh, M. S. S. Felipe és L. Fernandes, „Erg6 affects membrane composition and virulence of the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*”, *Fungal Genetics and Biology*, köt. 140, o. 103368, júl. 2020, doi: [10.1016/j.fgb.2020.103368](https://doi.org/10.1016/j.fgb.2020.103368).

Pan F. , R. L. Malmberg, és M. Momany, „Analysis of septins across kingdoms reveals orthology and new motifs”, *BMC Evol Biol*, köt. 7, sz. 1, o. 103, júl. 2007, doi: [10.1186/1471-2148-7-103](https://doi.org/10.1186/1471-2148-7-103).

Park Y.-D., S. H. Chen, E. Camacho, A. Casadevall és P. R. Williamson, „Role of the ESCRT Pathway in Laccase Trafficking and Virulence of *Cryptococcus neoformans*” *Infection and Immunity*, köt. 88, sz. 7, jún. 2020, doi: [10.1128/iai.00954-19](https://doi.org/10.1128/iai.00954-19).

Petrikkos G. , A. Skiada, O. Lortholary, E. Roilides, T. J. Walsh, és D. P. Kontoyiannis, „Epidemiology and Clinical Manifestations of Mucormycosis”, *Clinical Infectious Diseases*, köt. 54, sz. suppl_1, o. S23–S34, febr. 2012, doi: [10.1093/cid/cir866](https://doi.org/10.1093/cid/cir866).

Peres da Silva R. , R. Puccia, M. L. Rodrigues, L. L. Oliveira, L. S. Joffe, G. V. César, L. Nimrichter, S. Goldenberg és L. R. Alves, „Extracellular vesicle-mediated export of fungal RNA”, *Sci Rep*, köt. 5, sz. 1, o. 7763, jan. 2015, doi: [10.1038/srep07763](https://doi.org/10.1038/srep07763).

Peres da Silva R., S. de Toledo Martins, J. Rizzo, F. C. G. dos Reis, L. S. Joffe, M. Vainstein, L. Kmetzsch, D. L. Oliveira, R. Puccia, S. Goldenberg, M. L. Rodrigues és L. R. Alves, „Golgi Reassembly and Stacking Protein (GRASP) Participates in Vesicle-Mediated RNA Export in *Cryptococcus neoformans*”, *Genes*, köt. 9, sz. 8, Art. sz. 8, aug. 2018, doi: [10.3390/genes9080400](https://doi.org/10.3390/genes9080400).

Perlin D. S. és N. P. Wiederhold, „Culture-Independent Molecular Methods for Detection of Antifungal Resistance Mechanisms and Fungal Identification”, *The Journal of Infectious Diseases*, köt. 216, sz. suppl_3, o. S458–S465, aug. 2017, doi: [10.1093/infdis/jix121](https://doi.org/10.1093/infdis/jix121).

Rees J. R. , R. W. Pinner, R. A. Hajjeh, M. E. Brandt, és A. L. Reingold, „The Epidemiological Features of Invasive Mycotic Infections in the San Francisco Bay Area, 1992–1993: Results of Population-Based Laboratory Active Surveillance”, *Clinical Infectious Diseases*, köt. 27, sz. 5, o. 1138–1147, nov. 1998, doi: [10.1093/clinids/27.5.1138](https://doi.org/10.1093/clinids/27.5.1138).

Riley T. T., C. A. Muzny, E. Swiatlo és D.P. Legendre, „Breaking the Mold: A Review of Mucormycosis and Current Pharmacological Treatment”, *Sage Journals*, köt. 50, sz. 9. jún. 2016, doi: [10.1177/1060028016655425](https://doi.org/10.1177/1060028016655425).

Rizzo J. , L. Nimrichter és M. L. Rodrigues, „What Is New? Recent Knowledge on Fungal Extracellular Vesicles” *Current Fungal Infection Reports*, köt. 11, o. 141-147, okt. 2017, doi: [10.1007/s12281-017-0293-6](https://doi.org/10.1007/s12281-017-0293-6).

Rizzo J. , S. S. W. Wong. A. D. Gazi, F. Moyrand, T. Chaze, P.-H. Commere, S. Novault, M. Matondo, G. Péhau-Arnaudet, F. C. G. Reis, M. Vos, L. R. Alves, R. C. May, L. Nimrichter, M. L. Rodrigues, V. Aimanianda és G. Janbon, „*Cryptococcus* extracellular vesicles properties and their use as vaccine platforms”, *Journal of Extracellular Vesicles*, köt. 10, sz. 10, o. e12129, 2021, doi: [10.1002/jev2.12129](https://doi.org/10.1002/jev2.12129).

Rizzo J. , M. L. Rodrigues, és G. Janbon, „Extracellular Vesicles in Fungi: Past, Present, and Future Perspectives”, *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, köt. 10, júl. 2020, doi: [10.3389/fcimb.2020.00346](https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00346).

Rodrigues M. L., E. S. Nakayasu, D. L. Oliveira, L. Nimrichter, J. D. Nosanchuk, I. C. Almeida és A. Casadevall, „Extracellular Vesicles Produced by *Cryptococcus neoformans* Contain Protein Components Associated with Virulence”, *Eukaryotic Cell*, köt. 7, sz. 1, o. 58–67, jan. 2008, doi: [10.1128/ec.00370-07](https://doi.org/10.1128/ec.00370-07).

Rodrigues M. L., E. S. Nakayasu, I. C. Almeida, és L. Nimrichter, „The impact of proteomics on the understanding of functions and biogenesis of fungal extracellular vesicles”, *Journal of Proteomics*, köt. 97, o. 177–186, jan. 2014, doi: [10.1016/j.jprot.2013.04.001](https://doi.org/10.1016/j.jprot.2013.04.001).

Rodrigues M. L., L. Nimrichter, D. L. Oliveira, S. Frases, K. Miranda, O. Zaragova, M. Alvarez, A. Nakouzi, M. Feldmesser és A. Casadevall, „Vesicular Polysaccharide Export in *Cryptococcus neoformans* Is a Eukaryotic Solution to the Problem of Fungal Trans-Cell Wall Transport”, *Eukaryotic Cell*, köt. 6, sz. 1, jan. 2007, doi: [10.1128/ec.00318-06](https://doi.org/10.1128/ec.00318-06).

Rybak J. M., J. R. Fortwendel, és P. D. Rogers, „Emerging threat of triazole-resistant *Aspergillus fumigatus*”, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, köt. 74, sz. 4, o. 835–842, ápr. 2019, doi: [10.1093/jac/dky517](https://doi.org/10.1093/jac/dky517).

Schmidt O. és D. Teis, „The ESCRT machinery”, *Curr Biol*, köt. 22, sz. 4, o. R116–R120, febr. 2012, doi: [10.1016/j.cub.2012.01.028](https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.01.028).

Spatafora J. W. , Y. Chang, G. L. Benny, K. Lazarus, M. E. Smith, M. L. Berbee, G. Bonito, N. Corradi, I. Grigoriev, A. Gryganskyi, T. Y. James, K. O'Donnell, R. W. Roberson, T. N. Taylor, J. Uehling, R. Vilgalys, M. M. White és J. E. Stajich, „A phylum-level phylogenetic classification of zygomycete fungi based on genome-scale data”, *Mycologia*, köt. 108, sz. 5, o. 1028–1046, szept. 2016, doi: [10.3852/16-042](https://doi.org/10.3852/16-042).

Spellberg B., J. Edwards, és A. Ibrahim, „Novel Perspectives on Mucormycosis: Pathophysiology, Presentation, and Management”, *Clinical Microbiology Reviews*, köt. 18, sz. 3, o. 556–569, júl. 2005, doi: [10.1128/CMR.18.3.556-569.2005](https://doi.org/10.1128/CMR.18.3.556-569.2005).

Szebenyi Cs. , Y. Gu, T. Gebremariam, S. Kocsubé, S. Kiss-Vetráb, O. Jäger, R. Patai és T. Papp, „cotH Genes Are Necessary for Normal Spore Formation and Virulence in *Mucor lusitanicus*”, *mBio*, köt. 14, sz. 1, jan. 2023, doi: [10.1128/mbio.03386-22](https://doi.org/10.1128/mbio.03386-22).

Tahiri G., C. Lax, J. T. Cánovas-Márquez, P. Carrillo-Marín, M. Sanchis, E. Navarro, V. Garre és F. E. Nicolás, „Mucorales and Mucormycosis: Recent Insights and Future Prospects”, *J. Fungi*, köt. 9, o. 335, jan. 2023, doi: [10.3390/jof9030335](https://doi.org/10.3390/jof9030335).

Torres-Narbona M., J. Guinea, J. Martínez-Alarcón, P. Muñoz, I. Gadea, és and Emilio Bouza as a representative of the MYCOMED Zygomycosis Study Group, „Impact of Zygomycosis on Microbiology Workload: a Survey Study in Spain”, *Journal of Clinical Microbiology*, köt. 45, sz. 6, o. 2051–2053, jún. 2007, doi: [10.1128/JCM.02473-06](https://doi.org/10.1128/JCM.02473-06).

Vallejo M. C., A. L. Matsuo, L. Ganiko, L. C. S. Medeiros, K. Miranda, L. S Silva, E. Freymüller-Haapalainen, R. Sinigaglia-Coimbra, I. C. Almeida és R. Puccia, „The Pathogenic Fungus *Paracoccidioides brasiliensis* Exports Extracellular Vesicles Containing Highly Immunogenic α -Galactosyl Epitopes”, *Eukaryotic Cell*, köt. 10, sz. 3, márc. 2011, doi: [10.1128/ec.00227-10](https://doi.org/10.1128/ec.00227-10).

van Heeswijck R. és M. I. G. Roncero, „High frequency transformation of *Mucor* with recombinant plasmid DNA”, *Carlsberg Res. Commun.*, köt. 49, sz. 7, o. 691–702, jan. 1984, doi: [10.1007/BF02907500](https://doi.org/10.1007/BF02907500).

Vargas G. , J. D. B. Rocha, D. L. Oliveira, P. C. Albuquerque, S. Frases, S. S. Santos, J. D. Nosanchuk, A. M. O. Gomes, L. C. A. S. Medeiros, K. Miranda, T. J. P. Sobreira, E. S. Nakayasu, E. A. Arigi, A. Casadevall, A. J. Guimaraes, M. L. Rodrigues, C. G. Freire-de-Lima, I. C. Almeida és L. Nimrichter, „Compositional and immunobiological analyses of extracellular vesicles released by *Candida albicans*”, *Cellular Microbiology*, köt. 17, sz. 3. o. 389-407, nov. 2014. doi: [10.1111/cmi.12374](https://doi.org/10.1111/cmi.12374).

Vargas G. , L. Honorato, A. J. Guimaraes, M. L. Rodrigues, F. C. G. Reis, A. M. Vale, A. Ray, J. D. Nosanchuk és L. Nimrichter, „Protective effect of fungal extracellular vesicles against murine candidiasis”, *Cellular Microbiology*, köt. 22, sz. 10, o. e13238, jún. 2020, doi: [10.1111/cmi.13238](https://doi.org/10.1111/cmi.13238).

Versele M. és J. Thorner, „Septin collar formation in budding yeast requires GTP binding and direct phosphorylation by the PAK, Cla4”, *Journal of Cell Biology*, köt. 164, o. 701-715, márc. 2004, doi: [10.1083/jcb.200312070](https://doi.org/10.1083/jcb.200312070)

Vu B. G. , G. H. Thomas és W. S. Moye-Rowley, „Evidence that Ergosterol Biosynthesis Modulates Activity of the Pdr1 Transcription Factor in *Candida glabrata*”, *mBio*, köt. 10, sz. 3, jún. 2019, doi: [10.1128/mbio.00934-19](https://doi.org/10.1128/mbio.00934-19).

Wagner L., J. B. Stielow, G. S. de Hoog, K. Bensch, V. U. Schwartze, K. Voigt, A. Alastruey-Izquierdo, O. Kurzai, és G. Walther „A new species concept for the clinically relevant *Mucor circinelloides* complex”. *Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, köt. 44, o. 67 – 93, júl. 2020, doi: [10.3767/persoonia.2020.44.03](https://doi.org/10.3767/persoonia.2020.44.03).

Walther G. , L. Wagner és O. Kurzai, „Updates on the Taxonomy of Mucorales with an Emphasis on Clinically Important Taxa”, *J. Fungi*, köt. 5, o. 106., nov. 2019, doi: [10.3390/jof5040106](https://doi.org/10.3390/jof5040106).

Warena A. J. , S. Kauffman, T. P. Sherrill, J. M. Becker, és J. B. Konopka, „*Candida albicans* Septin Mutants Are Defective for Invasive Growth and Virulence”, *Infection and Immunity*, köt. 71, sz. 7, o. 4045–4051, júl. 2003, doi: [10.1128/iai.71.7.4045-4051.2003](https://doi.org/10.1128/iai.71.7.4045-4051.2003).

Witwer K. W. és C. Théry, „Extracellular vesicles or exosomes? On primacy, precision, and popularity influencing a choice of nomenclature”, *Journal of Extracellular Vesicles*, köt. 8, sz. 1, o. 1648167, dec. 2019, doi: [10.1080/20013078.2019.1648167](https://doi.org/10.1080/20013078.2019.1648167).

Xu R., A. Rai, M. Chen, W. Suwakulsiri, D. W. Greening, és R. J. Simpson, „Extracellular vesicles in cancer — implications for future improvements in cancer care”, *Nat Rev Clin Oncol*, köt. 15, sz. 10, o. 617–638, okt. 2018, doi: [10.1038/s41571-018-0036-9](https://doi.org/10.1038/s41571-018-0036-9).

Zamith-Miranda D. , L. Nimrichter, M. L. Rodrigues, és J. D. Nosanchuk, „Fungal extracellular vesicles: modulating host–pathogen interactions by both the fungus and the host”, *Microbes and Infection*, köt. 20, sz. 9, o. 501–504, okt. 2018, doi: [10.1016/j.micinf.2018.01.011](https://doi.org/10.1016/j.micinf.2018.01.011).

Zarnowski R., H. Sanchez, A. S. Covelli, E. Dominguez, A. Jaromin, J. Bernhardt, K. F. Mitchell, C. Heiss, P. Azadi, A. Mitchell és D. R. Andes, „Candida albicans biofilm–induced vesicles confer drug resistance through matrix biogenesis”, *PLOS Biology*, köt. 16, e2006872, okt. 2018, doi: [10.1371/journal.pbio.2006872](https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2006872).

Zhao K. , M. Bleackley, D. Chisanga, L. Gangoda, P. Fonseka, M. Liem, H. Kalra, H. Al Saffar, S. Keerthikumar, C.-S. Ang, C. G. Adda, L. Jiang, K. Yap, I. K. Poon, P. Lock, V. Bulone, M. Anderson és S. Mathivanan, „Extracellular vesicles secreted by *Saccharomyces cerevisiae* are involved in cell wall remodelling”, *Commun Biol*, köt. 2, sz. 1, o. 1–13, aug. 2019, doi: [10.1038/s42003-019-0538-8](https://doi.org/10.1038/s42003-019-0538-8).

7. Köszönetnyilvánítás

Elsősorban szeretnék köszönetet mondani Prof. Dr. Papp Tamásnak, témavezetőmnek és a Szegedi Tudományegyetem Természettudományi és Informatikai Kar Biotechnológiai és Mikrobiológiai Tanszék vezetőjének, amiért lehetővé tette, hogy a munkámat Tanszékén végezhessem.

Köszönettel tartozom másik témavezetőimnek, Dr. Nagy Gábornak, hogy szakmai segítségével és kitartó támogatásával hozzájárultak a dolgozat elkészüléséhez.

Külön köszönettel tartozom Bauer Kitti PhD hallgatónak a laborban nyújtott segítségét.

Köszönetet szeretnék mondani Polgár Tamás PhD hallgatónak a TEM mikroszkópos képek elkészítéséért. Valamint nagy hálával tartozom Dr. Kele Zoltánnak és Dr. Kecskeméti Gábornak az extracelluláris vezikulák fehérjeanalízisében nyújtott segítségéért.

Szeretnék köszönetet mondani a SZTE TTIK Biotechnológiai és Mikrobiológiai tanszék 309-es labor összes munkatársának, szakdolgozójának a tőlük kapott rengeteg segítségért, tanácsért, és a jó hangulatú munkanapokért.

8. Melléklet

1. számú melléklet. Néhány reprezentatív példa az azonosított fehérjékre. Azok funkciói és, hogy melyik organizmusban azonosították korábban

azonosított fehérje	funkció	<i>Histoplasma capsulatum</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>
Chaperonok					
Hősokk fehérje 60 kDa	Chaperon	+			
Hősokk fehérje 70 kDa	Chaperon	+	+	+	
Sejtfal kialakulása					
Beta-glükozidáz	Sejtfal összeszerelődés	+	+		
Beta-1,3-glükanoziltranszferáz	Sejtfal összeszerelődés	+	+	+	
Kitin szintáz	Sejtfal összeszerelődés	+		+	+
Mannozidáz	Sejtfal összeszerelődés	+			
N-acetil-beta-glükozaminidáz	Kitin oligomerek hidrolízise	+			
Szignalizációs útvonal					
RAB GDP fehérje	Szekréciós útvonal szabályozás	+			
Rho GTPáz	GTP kötés, szabályozás	+			+
Cukor metabolizmus					
Foszfoglükomutáz	Glükóz bontás és szintézis	+			
Izocitrát liáz	Glioxilát ciklus: L-malát szintézis izocitrátból	+			
Glicerinaldehyd-3-foszfát dehidrogenáz	Glikolízis: piruvát képződés	+	+	+	
Transzaldoláz	Pentóz-foszfát ciklus egyensúlyba tartása	+	+	+	
Malát dehidrogenáz	Almasav átalakítás oxaloacetáttá	+		+	
Fumarát hidratáz	Almasav átalakítás fumaráttá	+			
Lipid metabolizmus					
Farnezil pirofoszfát szintáz	Farnezil pirofoszfát szintézis	+			
Acetil-koenzim A szintáz	Acetil-koenzim A szintézis	+			
Acetil-koenzim A acetiltranszferáz	Rövid szénláncú zsírsav metabolizmus	+			
Aminosav és protein metabolizmus					

Ubikvitin	Fehérje poszttranszlációs módosítása	+
Glutamát dehidrogenáz	L-arginin bioszintézis	+
Delta-1-pirrolin-5- karboxilát dehidrogenáz	L-glutamin bioszintézis	+
Enoil-koenzim A hidratáz	Leucin bioszintézis	+
Szerin- hidroximetiltranszferáz	Szerin-glicin átalakulás	+
Transzlációs elongációs faktor	Fehérje bioszintézis	+
Adenozilhomociszteináz	Homocisztein bioszintézis	+
Riboszómális fehérjék		
60S riboszómális fehérje L16	Riboszómális fehérje	
60S riboszómális fehérje L21	Riboszómális fehérje	
60S riboszómális fehérje L27-A	Riboszómális fehérje	+
60S riboszómális fehérje L3	Riboszómális fehérje	+
40S riboszómális fehérje S7	Riboszómális fehérje	+
40S riboszómális fehérje S3	Riboszómális fehérje	+
40S riboszómális fehérje S18	Riboszómális fehérje	+
40S riboszómális fehérje S29	Riboszómális fehérje	
40S riboszómális fehérje S24	Riboszómális fehérje	
Sejtmagi fehérjék		
Hisztón H4	DNS összeszerelődés	+
Hisztón H2A	DNS összeszerelődés	+
Hisztón H2B	DNS összeszerelődés	+
Sejt növekedés/osztódás		
Szeptin	Sejtosztódás	+
Sejtmembrán fehérje		
Sejtmembrán ATPáz	ATPáz aktivitás	+
Aminopeptidáz	Egyirányú membrán transzporter	+
Citoszkeletális fehérje		
Aktin	Citoszkeleton összeszerelődés	+
Antioxidáns hatású fehérjék		
Szuperoxid diszmutáz	Szabadgyök elleni védelem	+

