

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM

Természettudományi és Informatikai Kar

Biotechnológiai és Mikrobiológiai tanszék

37. OTDK Biológia Szekció

TUDOMÁNYOS DIÁKKÖRI DOLGOZAT

A Candida parapsilosis CPAR2_702260 deléciós mutáns jellemzése a hőmérséklet
tolerancia vonatkozásában

Készítette:

Selmeci Mátyás, II. éves, molekuláris biológia MSc szakos hallgató

Témavezetők:

Prof. Dr. Gácsér Attila

egyetemi tanár

Dr. Németh Tibor

tudományos munkatárs

Szeged

2024

Tartalomjegyzék

1. Irodalmi áttekintés	2
1.1. A gombák jelentősége	2
1.2. <i>Candida albicans</i> jelentősége és virulencia faktori	3
1.3. <i>Candida parapsilosis</i> és a hőstressz	6
1.4. A <i>Candida parapsilosis</i> 702260-gén rokonsági viszonya	8
2. Célkitűzés	10
3. Rövidítések jegyzéke	11
4. Anyagok és módszerek	12
4.1. Felhasznált törzsek és genotípusaik	12
4.2. Tápoldatok, táptalajok	12
4.3. Növekedési teszt szilárd táptalajon	13
4.4. Növekedési teszt folyadék tenyészetben	14
4.5. Alkalmazott programok	15
5. Eredmények és értékelésük	16
5.1. A péklesztő <i>met28</i> deléciós mutáns jellemzése szilárd táptalajon	16
5.2. <i>C. parapsilosis</i> CPAR2_702260 Δ/Δ mutánsok és a <i>S. cerevisiae</i> <i>met28</i> Δ életképességének összevetése szilárd táptalajon	17
5.3. A szorbitol hatása a <i>C. parapsilosis</i> törzsek növekedésére 37 °C-on, szilárd táptalajon	18
5.4. A <i>C. parapsilosis</i> CPAR2_702260 Δ/Δ mutánsok növekedésének vizsgálata folyadéktenyészetben	19
6. Diskusszió	21
7. Köszönetnyilvánítás	23
8. Hivatkozások jegyzéke	24

1. Irodalmi áttekintés

1.1. A gombák jelentősége

A gomba, mint kifejezés több évszázada megtalálható a lexikonokban, de sokáig mégsem volt általános és elfogadott definíció az ide sorolt organizmusokról. Több, mint 200 évig tartó tudományos viták után kialakult konszenzus szerint a gombákat a növényektől és állatoktól különálló organizmusnak kell tekinteni. Definíció szerint a gombák olyan eukarióta heterotróf élőlények, amelyek sejtfaala nem cellulózt, hanem kitint tartalmaz. Kozmopoliták, vagyis a Föld szinte bármely élőhelyén megtalálhatóak. Rendkívül fajgazdag csoport. A napjainkig leírt gombafajok száma megközelítőleg 150.000, de becslések szerint további 5 millió gombafaj vár felfedezésre (Phukhamsakda et al. 2022), (Blackwell 2011). Ez a folyamat az elmúlt évtizedekben végbemenő technológiai fejlődésnek, úgymint a polimeráz láncreakció (PCR) széles körű elterjedésének és a teljes genom szekvenálásnak, köszönhetően nagymértékben felgyorsult. A PCR az 1990-es évek elején vált elérhetővé, amelynek alkalmazásával egy adott gombafaj jelenléte gyorsan kimutathatóvá vált egy környezeti vagy klinikai mintában (pl. élesztőgombák) (Tsui et al. 2011), (Wagner et al. 2018). A metagenomikus újgenerációs szekvenálás (mNGS) nagyban hozzájárult az új gombafajok azonosításához, többek között több genom egyidejű vizsgálatának köszönhetően (Diao et al. 2022) A gombák változatos megjelenésűek, morfológiájuk a szabad szemmel nem látható élesztőgombáktól kezdve a penészgombákon át a bonyolultabb termőtesttel rendelkező gombákig terjed, szaporodásuk történhet ivartalan módon, vegetatív hifasejtekkel vagy genetikailag megegyező spórákkal, illetve ivaroson, meiózis révén új genetikai kombináció létrehozására is képesek (Blackwell 2011), (Xu 2020), (Nagy et al. 2017).

A gombák nagyon fontos szerepet játszanak lebontó szervezetekként a szerves anyagok körforgásában, és élelmiszeripari, biotechnológiai jelentőségük is nyilvánvaló. Bizonyos képviselőik növényi, állati és humán kórokozóként is ismertek. Egyes fajok parazita életmódot folytatnak, mint például az *Entomophthora* fajok, amelyek levéltetvekkel és legyekkel asszociáltak. Mások szimbiózisban élnek más élőlényekkel, ilyenek például a nagy mezőgazdasági jelentőséggel bíró mikorrhiza gombák. A jelenség folyamán fizikai kapcsolat létesül az adott növény gyökere és a gomba között. Ez egyfajta szimbióta kapcsolat, és megtalálható mindenhol a természetes környezetben. A mikorrhiza gombák kulcsfontosságú mikroorganizmusok, amelyek segítenek a növényeknek szembenézni a környezeti stresszel és javítják vagy akár helyre is állíthatják a leromlott ökoszisztémákat (Hodge 2000). A mikorrhiza együttélés számos más hatással is jár, pl.: a citoplazmában a vakólum fragmentációját okozhatja, növelheti a citoplazma és a sejtszervecskék térfogatát, és akár fitohormonok is átjuthatnak egyik élőlényből a másikba. A

növények kb. 80%-ánál jelenik meg gombával való szimbióta együttélés, bizonyos gomba fajok esetében akár állattal való szimbiózis is előfordulhat. (Hodge 2000) (Strack et al. 2003)

Számtalan felhasználási módja ismert a gombáknak az élelmiszeriparban fajtától és törzstől függően. Az ehető gombák mellett vannak, amelyeket különböző erjesztési folyamatok során használnak pl. sörfőzésnél vagy kelesztett pékáruk előállításánál. Legfontosabb felhasználási területeik közé tartozik a gyógyszeripar és a biotechnológiai ipar.. A modern orvoslás egyik fontos törekvése a rák elleni küzdelem, ahol terápiás célból a biológiai eredetű termékek is szerepet kaphatnak. Ezek elsősorban a mikroorganizmusok, gyógynövények, illetve tengeri élőlények, vagy a belőlük kinyert esetleg az általuk előállított vegyületek. A mikroorganizmusok esetében a gomba eredetű termékek a klinikai gyógyszerek kb. 50%-át adják (Shamsaei et al. 2021), (Bennett 1998). A biotechnológiában szintén fontos szerepet töltenek be enzimek, vitaminok, poliszacharidok előállításában. Kiváló exoenzim termelésük okán a gombák jó lebontók, így a környezetvédelmi biotechnológiában, szennyvíztisztításban és hulladékkezelésben kiemelt jelentőséggel bírnak a baktériumok mellett. A gombák emellett fontos modellszervezetek, a célzott genetikai módosításokat lehetővé tevő módszerek és a genomszekvenálási eljárások rohamos fejlődésének köszönhetően számtalan alapvető citológiai - vagy, fehérje-fehérje kölcsönhatással, szignáltranszdukciós hálózattal kapcsolatos ismeretünk fűződik gombákon végzett kutatásokhoz. (Buratti et al. 2022), (Adrio and Demain 2003), (Jiang et al. 2013). A gazdasági, ipari és alapkutatásban betöltött szerepük mellett bizonyos fajok kiemelt egészségügyi jelentőséggel bírnak. Évente körülbelül 1 milliárd embert érint valamilyen gombás fertőzés, és emellett megközelítőleg másfélmillió haláleset okozói. (J.-Y. Kim 2016) Földünkön körülbelül 600 olyan gombafajt írtak le, amely fertőzés kiváltására képes emberben, és igen változatos kórképeket alakítanak ki. Elsősorban a bőrt, körmöt, nyálkahártyát érintő fertőzésekkel kapcsolatosan izolálhatók, súlyosabb esetben azonban életveszélyes szisztémás fertőzéseket is okozhatnak. (Mayer, Wilson, and Hube 2013). Ez utóbbiak háttérében leggyakrabban *Candida*, *Aspergillus* és *Cryptococcus* fajok állnak.

1.2. *Candida albicans* jelentősége és virulencia faktorai

Az invazív gombás fertőzések leginkább kritikus állapotú felnőtt- és gyerekbetegeknél jelentkeznek, súlyosságuk nagyon változatos, egyes esetekben akár halálos kimenetelűek is lehetnek. A *Candida* fajok által okozott invazív fertőzéseknek kb. 90%-a hat *Candida* fajnak tudható be, amelyek a *Candida albicans*, a *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida tropicalis* és az utóbbi időben a *Candida auris* is szintén veszélyes humán patogénként került a listára (Giri and Kindo 2012). A *Candida* nemzetségre jellemző, hogy kommenzalisták, de

egy részük opportunistá patogénné válhat, azaz abban az esetben képesek súlyosabb betegséget kiváltani, ha az egyén immunhiányos állapotba kerül, immunrendszere legyengül. A *Candida* gombafajok által okozott megbetegedéseket általánosan „candidiasis”-nak nevezzük (R and Rafiq 2024).

A *Candida albicans* a candidiasis-ból leggyakrabban izolált kórokozó. Egészséges egyénekben elsősorban a tápcsatornát kolonizálja, de a húgyivarszervek mikrobiotájának is része. Az immunrendszer elégtelensége esetén a körmök alatt és a szájüregben okozhat fertőzést, nők esetében a vulvovaginális candidiázis leggyakoribb okozójaként ismert. Az immunrendszer súlyosabb alulműködése esetén a gomba akár a véráramba is bekerülhet, ezzel elérhetővé válhatnak a perifériális szervek is, így súlyos és életveszélyes állapot, szisztémás candidiasis alakulhat ki (J. Kim and Sudbery 2011), (Reda et al. 2023).

Egy kórokozó számára nélkülözhetetlen, hogy képes legyen fennmaradni a gazdaszervezetben, és ki tudja játszani annak patogén eliminációs folyamatait. Ebben a folyamatban nélkülözhetetlenek az ún. virulencia faktorok, amelyek a kórokozók olyan molekulái, enzimei, struktúrái, amelyek hiányában az életképesség megváltozása nélkül a fertőzőképesség, vagy az immunrendszerrel szembeni ellenállóképesség csökken. *C. albicans* esetében ilyen tulajdonság a biofilm képzés a hidrolitikus enzimek szekretálása és a gazdában kötött formában lévő cink ionok felvételének képessége. A sikeres fertőzés kiváltásának első lépéseként meg kell tapadnia a gombának a gazdasejtek felszínén. Ebben a gomba különböző adhezin fehérjéi játszanak szerepet, amelyek három nagy családba sorolhatók: Agglutinin-like sequences (Als), Iff/Hyr és Hwp1 (de Groot et al. 2013). Ezek közül a legalaposabban kutatott az Als fehérjék családja, amely nyolc tagot számlál. A gének expressziós mintázata, csakúgy mint a fehérjék szerkezete, adhézións képessége különböző biotikus és abiotikus szubsztrátokon eltérést mutat (Phan et al. 2007), (Hoyer and Cota 2016), (Lopes and Lionakis 2022). A megtapadást követően a gomba sejtek a felszínhez kötötten osztódhatnak, és ahogyan az ínyen/fogfelszínen a baktériumok teszik, úgy a *C. albicans* esetében is megfigyelhető a biofilm képzés (Fanning and Mitchell 2012). Ez a képesség szintén egy virulencia faktor, ami létrejöhet abiotikus és biotikus felületeken egyaránt. A biofilm egy összetett struktúra, megtalálhatók benne élesztő és hifa sejtek egyaránt. Ebben a formában a gomba sejtek ellenállóképessége mind antimikrobiális szerekkel, mind a gazdaszervezet immunfolyamataival szemben magasabb, mint planktonikus növekedés esetén. A megnövekedett rezisztenciáért felelős tényezők a biofilm mátrixa, architektúrája, a metabolikus plaszticitás és az alkalmazott antifungális szer sejtől való eltávolításáért felelős transzportfehérjék működése (Finkel and Mitchell 2011), (Fanning and Mitchell 2012). A patogén mikroorganizmusoknál, így a gombák esetében is fontos képesség a gazdából való alapvető tápanyagok asszimilálása. A *C. albicans* esetében is fontosak a

mikroelemek, így az esszenciális fémek, mint a cink felvétele elengedhetetlen. Erre a célra a gomba egy speciális cinkkötő fehérjét, a pH-szabályozott antigént (pH Regulated Antigen - Pra1) alkalmaz. A *PRA1* hiányában elégtelen a cinkfelvétel, és a gomba kevésbé ellenálló a gazda szervezet védekező mechanizmusaival szemben (Citiulo et al. 2012).

A *C. albicans* fertőzőképességét a számos virulencia faktor mellett a gazda által jelentett stresszre adott megfelelő válaszreakció is segíti, hiszen a változó pH, a hőmérséklet, az ozmotikus nyomás és egyéb paraméterekben jelentkező szélsőségekhez való gyors alkalmazkodás a gomba gazdában való túlélésének előfeltétele. Ahhoz, hogy a gomba megfelelően tudjon védekezni ezekkel szemben, képesnek kell lennie azokat érzékelni, a szignált továbbítani, végül reagálni. Ezen folyamatokra igen konzervált jelátviteli útvonalak alakultak ki, amelyek többsége MAP (mitogén-aktivált protein) kinázokat alkalmaznak. *C. albicans*-ban három ilyen útvonalat különböztet meg a szakirodalom, ezek a Mkc1, Hog1 és Cek1 MAP kináz útvonalak. Az emberi szervezet pH-ja testtájanként változó, például a tápcsatorna kémhatása a nagyon savas (pH=2) és az enyhén lúgos (pH=8) között változik, a vér és a szövetek pH-ja szintén 7 feletti (pH=7,4), így a patogénnek adaptálódnia kell ezekhez a paraméterekhez. A pH értéke befolyással van a gomba morfológiájára és ezáltal a patogenitására is. Míg az alacsony pH gátolja az élesztő-hifa átmenetet, addig a semleges vagy lúgos kémhatás elősegíti azt (Davis 2003), (Biswas, Van Dijck, and Datta 2007). Sok esetben a gomba ozmotikus vagy szabadgyökök által okozott stressznek is ki lehet téve. Az ozmotikus stressz során az adott sejt vizet veszít az alacsony vízáktivitású környezetben, ami a sejt pusztulásához is vezethet. A megváltozott ozmotikus viszonyok hatására a Hog1 MAP kináz aktivációja következik be, amely végül a glicerín bioszintézisében közreműködő enzimek génjeinek átírásához vezet. A sejtekben felhalmozódó glicerín ozmotikumként viselkedik, így megakadályozva a további vízkiáramlást (Kühn and Klipp 2012), (Enjalbert et al. 2006).

A szabadgyökök a gomba esetében sejtkárosító ágensként hatnak, akárcsak a magasabb rendűek szervezetében. A reaktív oxigénfajták (ROS) semlegesítése a már említett Hog1-től függő és attól független úton is végbemehet, utóbbi esetben a Cap1 transzkripciós faktor halmozódik fel a sejtmagban (Znaidi et al. 2009). Ezek hatására tipikusan a Cta1 kataláz vagy a Sod1, Sod5 (szuperoxid-diszmutázok) expressziója emelkedik meg (Zhang et al. 2000). Virulenciában betöltött szerepüket bizonyítja, hogy hiányukban csökkent fertőzőképesség tapasztalható egér fertőzési modellben (Wysong et al. 1998), (Hwang et al. 2002).

Kitüntetett figyelem övezi a megemelkedett hőmérsékletre való alkalmazkodás képességének vizsgálatát. Az oxidatív - és a hő stressz olyan hatások, amelyek a gomba fehérjeinek degradációját okozhatják, ezáltal a sejt pusztulásához vezethetnek. A válaszreakció során van egy központi szabályozó molekula, a Hsf1 transzkripciós faktor, amely a hőmérséklet megemelkedésének

hatására foszforilálódik, majd speciális fehérjék, hősokk-fehérjék (Heat-shock protein Hsp) expresszióját idézi elő (Nicholls et al. 2011). Ezek a fehérjék chaperonként működnek, és feladatuk a többi fehérje stabilizálása. A hőmérséklet emelkedését követően megakadályozzák a konformációváltozást és ezáltal a fehérjék denaturációját. Több ilyen speciális fehérje van jelen a gombákban, ezek közül hat fő Hsp-t azonosítottak *C. albicans*-ban: Hsp104, Hsp90, Hsp78, Hsp60 és két darab Hsp70 fehérjét (Ssa1 és Ssa2). A legjobban vizsgált Hsp a Hsp90 a megemelkedett hőmérsékletre adott válaszreakció negatív visszacsatolásában vesz részt, de ezen kívül antibiotikum rezisztenciával, morfogenezissel és biofilm képzéssel is összefüggésbe hozható (Nicholls et al. 2011), (Robbins et al. 2011).

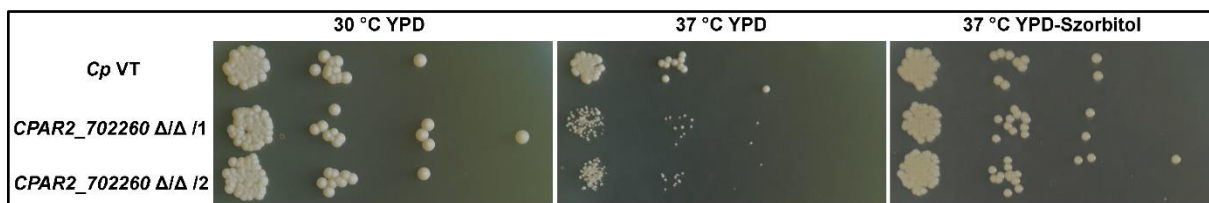
1.3. *Candida parapsilosis* és a hőstressz

A *C. albicans* mellett egyre gyakrabban hozható összefüggésbe humán megbetegedéssel a *C. parapsilosis*, amelyet először 1928-ban izoláltak Puerto Rico-területén emberi székletmintából. A faj felfedezésekor a *Monilia parapsilosis* nevet kapta a korábban felfedezett *Monilia psilosis*-szal, avagy a manapság *C. albicans* néven ismert fajjal, mutatott nagyfokú hasonlóság miatt, és csak később, az új nevezéktan bevezetésekor kapta a *C. parapsilosis* nevet (Jain, Guan, and D'Souza 2018). A *C. albicans*-szal ellentétben a *C. parapsilosis* előfordul a természetben is, ugyanis míg a *C. albicans* és a *C. tropicalis* obligát humán patogén, addig a *C. parapsilosis* izolálható egyéb forrásokból is például rovarokról, háziállatokról vagy akár talajból és tengeri környezetből is. (Zupančič, Novak Babič, and Gunde-Cimerman 2019)

A *C. parapsilosis* is egy opportunista humán patogén, amely alapvetően kommenzalista, de egy immunhiányos vagy gyenge immunrendszerű egyénben komoly megbetegedés kiváltására képes. Fertőzési gócpont lehet a kórházi környezet, és kifejezetten veszélyes az alacsony születési súlyú kisgyermekekre (Benjamin et al. 2000). A terjedési jellemzők alapján szintén eltér a *C. parapsilosis* a *C. albicans*-tól és *C. tropicalis*-tól. *C. albicans* esetében az úgynevezett vertikális terjedés valósul meg, azaz általában anyáról gyermekre terjed a születéskor, majd a gomba kolonizálja az újszülöttet, és később ez okozhat megbetegedést. Ezzel szemben *C. parapsilosis* fertőzés alkalmával a horizontális terjedés a jellemző, vagyis az invazív fertőzés okozója rendszerint nem egy korábbi kolonizáló -, hanem egy újonnan megjelenő törzs, amelyek forrása sokszor maga az egészségügyi intézmény, orvosi eszközök vagy akár folyadékok esetleg az egészségügyi dolgozók keze (Waggoner-Fountain et al. 1996). A *C. parapsilosis* által okozott nozokomiális fertőzésnek legfrekvenciáltabb célcsoportja az alacsony és nagyon alacsony születési súllyal világrajött csecsemők (Baley et al. 1986).

Hasonlóan más szisztémás fertőzésekhez, a candidaemia legáltalánosabb tünetei közé tartozik a láz, amely az alapvető gyulladásos immunválasz velejárója. Az átmenetileg megemelkedett testhőmérséklet csökkentheti a kórokozók osztódásának ütemét vagy akár el is pusztíthatja azokat. A sikeres humán patogén mikrobák képesek tolerálni a fiziológiás - vagy akár a lázas állapot jelentette megemelkedett testhőmérsékletet is (R and Rafiq 2024). A magasabb hőmérséklethez való alkalmazkodás a *Candida* fajok esetében is megfigyelhető. A *C. albicans* akár 42-48 °C-ot is elvisel, bár az életképességre utaló fiziológiai paraméter (hifa képződése) optimuma 37 °-ra tehető (Saëz, Traore, and Therizol 1975). A *Candida auris* esetében a növekedési optimum 37-40 °C közé esik, de 42 °C-on is tartósan megőrzi életképességét (Saëz, Traore, and Therizol 1975). *C. parapsilosis* helyzetében ugyanakkor megfigyelhető, hogy már a 40 °C is letális (Pál et al. 2021). A gazdaszervezet szempontjából tehát a testhőmérséklet megemelése sok esetben egy univerzálisan alkalmazható stratégia, viszont a gazda – patogén koevolúció során bizonyos mikrobákban olyan változások történtek, amelyek segítségével el tudják kerülni a magasabb hőmérséklet káros hatásait. Ennek hátterében a megemelkedett hőmérsékletet érzékelni, továbbítani képes jelátviteli utak és az általuk szabályozott downstream elemek állnak. Ezek vizsgálatának kézenfekvő eszközei a különböző deléciós és egyéb mutánsok létrehozása és a mutánsok jellemzése.

Laboratóriumunk a gazda-patogén kölcsönhatás vizsgálatával foglalkozik. Modellünkben a *C. parapsilosis* humán patogén élesztőt alkalmazzuk, és a gombában a humán fagocitákkal történő interakció hatására végbemenő génexpressziós változásokat vizsgáljuk. Korábban megállapításra került, hogy a gazda sejtek jelenlétében számos gén expressziója megváltozik a gazda sejtek nélküli kontroll állapothoz képest. A megemelkedett expressziót mutató gének eltávolításra kerültek a genomból, és a létrehozott deléciós mutánsok előzetes jellemzése is megtörtént. Ennek során sikerült azonosítani egy mutánst, amely komplett táptalajon 37 °C-on erőteljes növekedési defektust mutatott a szülői törzshöz képest, ugyanakkor 30 °C-on nem volt különbség az életképességükben. A hőszensitív fenotípust a CPAR2_702260 gén és az általa kódolt fehérje hiánya okozta. A 37 °C-on komplett táptalajon megfigyelt növekedési defektus komplementálható volt szorbitol hozzáadásával (1. ábra).



1. ábra. A CPAR2_702260 deléciós mutánsok életképessége 30 és 37 °C-on szorbitol nélkül és 37 °C-on szorbitol jelenlétében. Cp VT: *C. parapsilosis* vad

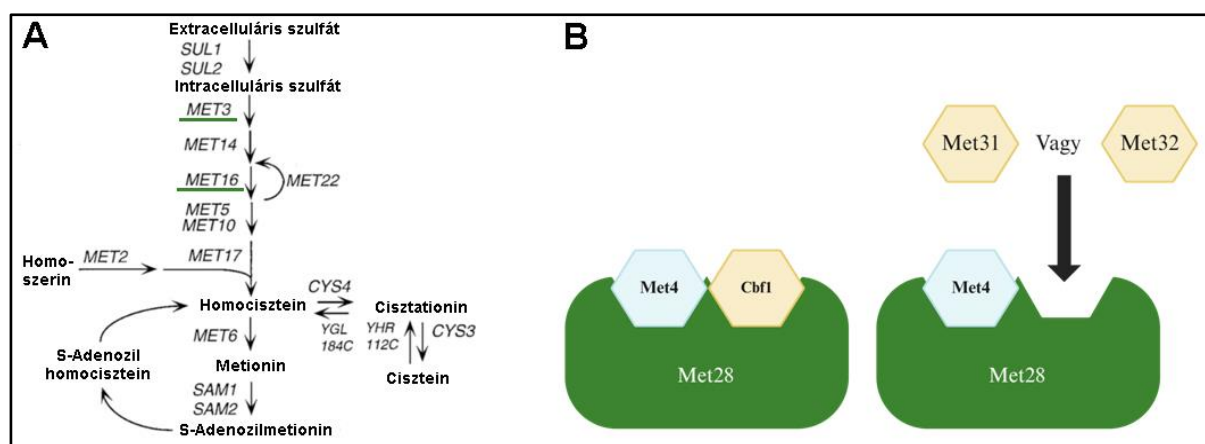
típus. A szuszpenziókból 10^4 , 10^3 , 10^2 és 10^1 sejtet tartalmazó cseppeket pipettáztunk a táptalajok felszínére.

In silico analízisünk szerint a fehérje DNS-kötő bZIP doménnel rendelkezik, és a *Saccharomyces cerevisiae* MET28 génjével ortológ (Skrzypek et al. 2017), (Gasteiger et al. 2003) (Tóth et al. 2018).

1.4. A *Candida parapsilosis* 702260-gén rokonsági viszonya

A *S. cerevisiae* a legszélesebb körben tanulmányozott eukarióta organizmus, amely a számos sejtbiológiai és biotechnológiai kutatásban kap központi szerepet, de mikrobiológiai és gyakorlati jelentősége is kiemelkedő. A *S. cerevisiae* könnyen tenyészthető, gyorsan növekszik, és jól ismert a fermentációs képességeiről, ami különösen fontos az élelmiszeriparban, a biotechnológiában és a molekuláris biológiában (Parapouli et al. 2020).

A pékélesztőben feltárt folyamatok résztvevői sokszor egyéb gombákban vagy akár magasabb rendű szövetes organizmusok esetén és megfigyelhetők. Az említett MET28 gén által kódolt fehérje egy transzkripciósi regulátor, a szulfát ionok szerves molekulára kapcsolásában és átalakításában szerepet játszó enzimek génjeinek átírásában működik közre. A bioszintézis útvonalba lépett kén atomok számos köztterméken keresztül végül cisztein és metionin aminosavak szintézisében kerülnek felhasználásra. Jelenlegi ismereteink szerint a Met28 fehérje két komplexnek lehet része, ezek a Cbf1-Met4-Met28 és a Met4-Met28-Met31 (L Kuras, Barbey, and Thomas 1997), (Blaiseau and Thomas 1998). Ez utóbbiban a Met31-et a paralóg Met32 helyettesítheti (2. ábra).



útvonal fontosabb enzimeit, kinaszt, köz- és végtermékeit tüntettük fel. Zölddel azon enzimeket jelöltük, amelyek génjeinek átírása a Met28 fehérje szabályozása alatt állnak (A panel). A Met28 fehérje a Met4-gyel alkot komplexet, amelyhez a Cbf1 vagy a Met31 (vagy ennek paralógja a Met32) kapcsolódik (B panel). Az ábra Reeves és munkatársainak publikációja alapján készült (Reeves et al. 2018).

Az említett komplexekben a Met28 kofaktorként működik közre, és a komplexek stabilizálásában játszik szerepet. A *MET28* gén hiányában a sejtek képtelenek hasznosítani a SO_4^{2-} vagy SO_3^{2-} ionokat, ugyanakkor a bioszintetikus út későbbi, szerves komponenseivel a fenotípus menekíthető (Laurent Kuras et al. 2002).

C. albicans-ban a *MET28* ortológja orf19.7046 néven ismert, a pontos funkciója ismeretlen, ugyanis deléciós mutánst soha nem sikerült előállítani, ami a géntermék esszenciális mivoltára enged következtetni (Shrivastava et al. 2021).

S. cerevisiae-ben tehát a kén anyagcseréért felel a géntermék, *C. albicans*-ban esszenciálisnak tűnik, míg korábbi munkánk során a *C. parapsilosis*-ban hőtoleranciáért felelős a fehérje ortológja. A pékélesztő alapvetően környezeti izolátum a *C. parapsilosis* és a *C. albicans* opportunistáknak, amelyeknek alkalmazkodniuk kell az emberi fiziológiás testhőmérséklet által jelentette stresszhez. A fentiek ismeretében tehát kérdésként merülhet fel, hogy a patogénné válás evolúciója során a gazdához való adaptálódás jegyében hogyan kellett megváltoznia egy élesztőnek, és hogy ebben a folyamatban vajon a Met28 fehérjére milyen szerepet tölt be (L Kuras, Barbey, and Thomas 1997), (Blaiseau and Thomas 1998).

2. Célkitűzés

Célunk a CPAR2_702260 gén által kódolt fehérje funkciójának jellemzése, különös tekintettel a hőmérséklet toleranciában és a kén anyagcserében betöltött szerepére.

3. Rövidítések jegyzéke

Als:	Agglutinin-like sequences – Agglutinin szerű szekvenciák
Cap1:	Adenylate cyclase-associated protein 1 – Adenilát ciklázsal asszociált fehérje
Cek1:	<i>Candida</i> Erk-like kinase – <i>Candida</i> Erk-szerű fehérje
Cta1:	Catalase 1 – Kataláz
Hog1:	High osmolarity glycerol 1 – Magas ozmolaritású glicerol 1 (fehérje)
Hsp:	Heat shock protein – Hő sokk fehérje
MAP kinase:	Mitogen-activated protein kinase – Mitogén aktivált protein kináz
MET28:	Metionin 28-as gén
Met28:	Metionin 28-as fehérje
Mkc1:	MAP kinase in <i>Candida</i> - MAP kináz <i>Candida</i> -ban
mNGS:	Metagenomic next-generation sequencing - Újgenerációs metagenomikai szekvenálás
PBS:	Phosphate buffered saline - Foszfáttal pufferelt sóoldat
PCR:	Polymerase chain reaction - Polimeráz láncreakció
Pra1:	pH regulated antigen 1 – pH szabályozott antigén 1
ROS:	Reactive oxygen species - Reaktív oxigén gyökök
Sod1:	Superoxide dismutase 1 - Szuperoxid-dizmutáz 1
Sod5:	Superoxide dismutase 5 – Szuperoxid-dizmutáz 5
VT:	vad típus
YPD:	Yeast-pepton-glucose – Élesztő-pepton-glükóz tápoldat
YNB:	Yeast-nitrogen.base – Élesztő-nitrogén-bázisu tápoldat
DO:	Dropout solution – Aminósav törzsoldat

4. Anyagok és módszerek

4.1. Felhasznált törzsek és genotípusaik

Candida parapsilosis CLIB214 (Butler et al. 2009)

Candida parapsilosis CPAR2_702260 KO: *cpar2_702260Δ/cpar2_702260Δ*

his1::FRT/HIS1

Saccharomyces cerevisiae Y262 (szülői törzs): *MATalpha his3-Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0*

Saccharomyces cerevisiae Y199 (izotípus kontroll): *MATalpha his3-Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0*

ura3Δ0 his3::KanMX

Saccharomyces cerevisiae Y656 (*met28* deléció törzs): *MATalpha his3-Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0*

ura3Δ0 met28::KanMX

4.2. Tápoldatok, táptalajok

YPD tápoldat (Yeast-Peptone-Glucose):

1% (m/V) pepton

1% (m/V) glükóz

0,5% (m/V) élesztő kivonat

YPD táptalaj (Yeast-Peptone-Glucose):

2% (m/V) agarral kiegészített YPD tápoldat

YPD-Szorbitol médium

YPD, 1M Szorbitollal kiegészítve

YNB táptalaj (Yeast Nitrogen Base):

0,19% (m/V) YNB

2% (m/V) glükóz

1,8% (m/V) agar

sterilizést követően 10% (V/V) 10x Dropout oldattal kiegészítve

A táptalajokat/tápoldatokat Penicillin-sztreptomicin oldattal egészítettük ki

100 unit/ml végkoncentrációban a sterilizést követően.

Az alkalmazott Dropout oldat összetétele 100 ml végtérfogatra:

Arginin	20 mg
Izoleucin	30 mg
Fenilalanin	50 mg
Tirozin	30 mg
Treonin	200 mg
Uracil	20 mg
Valin	150 mg
Adenin	200 mg
Triptofán	200 mg
Hisztidin	200 mg
Leucin	1000 mg
Lizin	30 mg
Metionin	---
Cisztein	---

1 liter végtérfogatban készítettünk Dropout oldatot, amit külön autoklávoztunk (Németh et al. 2021).

Alkalmazott törzsoldatok és koncentrációik szilárd táptalaj készítésénél:

Körülmény	Alkalmazott végkoncentrációk	Törzsoldatok koncentrációi
Szorbitol	1 M	---
Nátrium-szulfát	5 mM	0,5 M
Nátrium-szulfid	5 mM	0,5 M
Metionin	20 mg/l	200 mg/l
Cisztein	17 mg/l	170 mg/l

4.3. Növekedési teszt szilárd táptalajon

A mutánsok életképességét különböző körülmények között vizsgáltuk táptalajon 30 és 37 °C-on. A kísérletben a CPAR2_702260 KO törzsek mellett a szülői CLIB 214 törzset alkalmaztuk kontrollnak. A törzseket 1 ml YPD tápoldatban ráztuk egy éjszakán át 30 °C-on, majd ebből fél µl-t oltottunk át 2 ml friss YPD tápoldatba, és szintén egy éjszakán át ráztuk 30 °C-on. A kísérlet napján a sejteket összegyűjtöttük (2.500x g, 5 perc), majd kétszer mostuk steril desztillált vízzel,

azonos körülmények között. A kiülepedett sejteket steril desztillált vízben vettük fel, majd három lépcsős 10x-es hígítási sort készítettünk, és Bürker-kamra segítségével meghatároztuk a szuszpenziók koncentrációját. A kísérlethez 10^4 , 10^3 , 10^2 és 10^1 sejt/4 μ l-es koncentrációt állítottunk be, és 4-4 μ l-eket cseppentettünk a táptalajok felszínére. A csészéket 2 napon keresztül inkubáltuk 30 és 37 °C-on, majd fényképezőgéppel dokumentáltuk az eredményeket. A kiértékelés során a növekedés mértéket vizuálisan hasonlítottuk a vad típuséhoz.

Az alkalmazott körülményekkel ellátott táptalajok 30 és 37 °C-on:

Táptalaj típusok	Rövidítések magyarázata
YPD	Yeast Peptone Glucose
YPD-SZ	Yeast Peptone Glucose-szorbitol
YNB-DO	Yeast Nitrogen Base-Dropout oldat
YNB-DO-SZ	Yeast Nitrogen Base-Dropout oldat-szorbitol
YNB-DO-C	Yeast Nitrogen Base-Dropout oldat-cisztein
YNB-DO-C-SZ	Yeast Nitrogen Base-Dropout oldat-cisztein-szorbitol
YNB-DO-M	Yeast Nitrogen Base-Dropout oldat-metionin
YNB-DO-M-SZ	Yeast Nitrogen Base-Dropout oldat-metionin-szorbitol
YNB-DO-C-M	Yeast Nitrogen Base-Dropout oldat-cisztein-metionin
YNB-DO-C-M-SZ	Yeast Nitrogen Base-Dropout oldat-cisztein-metionin-szorbitol
YNB-DO- Na_2SO_3	Yeast Nitrogen Base-Dropout oldat- Nátrium-Szulfít
YNB-DO- Na_2SO_4	Yeast Nitrogen Base-Dropout oldat- Nátrium-Szulfát

4.4. Növekedési teszt folyadék tenyészetben

A törzsek felnevelését és a szuszpenzió koncentrációjának meghatározását a 4.3 pontban ismertetettek szerint végeztük. A sejtkoncentrációt $8,333 \times 10^6$ /ml-re állítottuk be 1x-es PBS-el. 96 mintahelyes tenyésztőedénybe 2x-es töménységű, 140 μ l tápoldatot pipettáztunk, majd ehhez pipettáztunk 60-60 μ l-t a sejtszuszenziókból. A sejtmentes kontroll esetén 60 μ l steril PBS-t pipettáztunk a mintahelyekbe. Az alkalmazott tápoldatok közötti különbséget a cisztein, metionin, valamint a szorbitol megléte illetve hiánya jelentette. A mintahelyek optikai denzitását, 48 órán keresztül követtük nyomon Synergy HTX mikrotiterlap olvasóval. A mérések fél óránként történtek 600 nm-en. Az inkubációs hőmérséklet 30 és 37 °C volt.

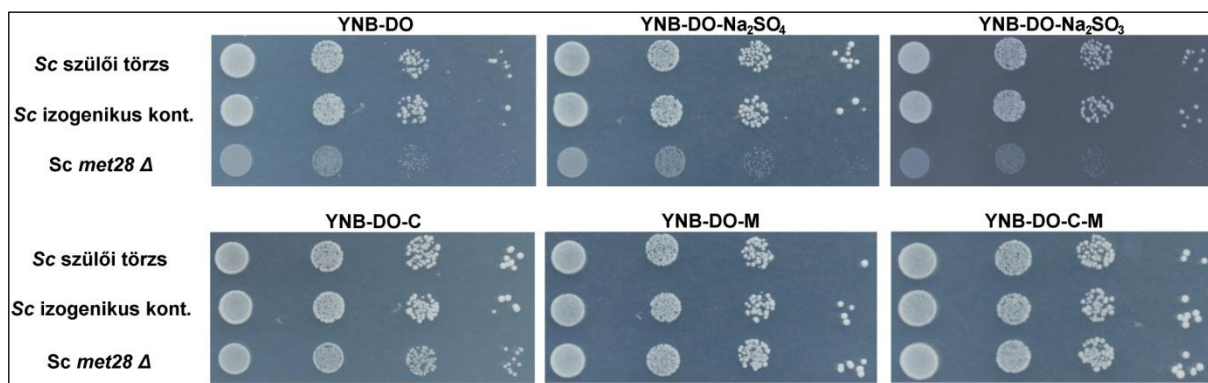
4.5. Alkalmazott programok

A nukleotid szekvenciák megjelenítéséhez az A plasmid editor (ApE) v2.0.51 verzióját, a képek szerkesztéséhez a GIMP 2.1.18 verzióját, a növekedési görbék ábrázolásához GraphPad Prism8 szoftvert használtunk. A növekedési görbe adatok exportálása BioTek Gen5 v3.14 szoftverrel történt.

5. Eredmények és értékelésük

5.1. A pékélesztő *met28* deléciós mutáns jellemzése szilárd táptalajon

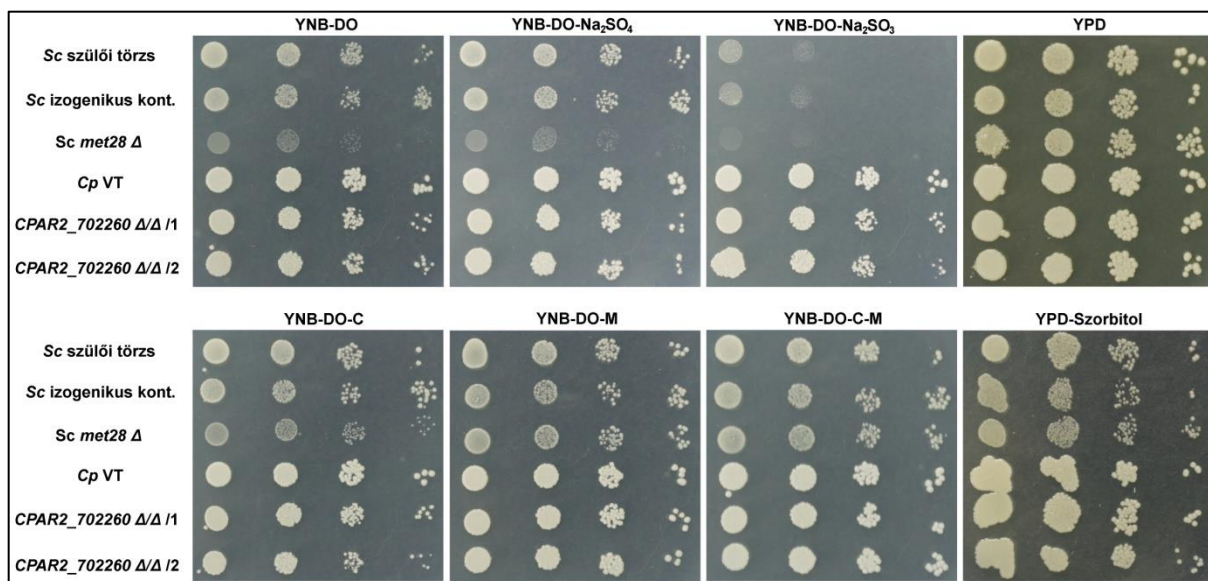
Első lépésként a pékélesztő *met28* deléciós törzsének fenotípusát ellenőriztük le az izotípus kontroll és a szülői törzzsel való összevetésben YNB-DO táptalajon, amelyet szerves (cisztein és/vagy metionin) kénforrással egészítettünk ki. A tenyésztést 30 °C-on végeztük (3. ábra). A szülői törzs és az izogenikus kontroll között egyetlen vizsgált körülmény között sem volt különbség. A *met28* deléciós mutáns esetében YNB-DO minimál táptalajon, komolyabb növekedési defektus figyelhető meg a kontroll törzsekhez képest, amely szerves kénforrással nem volt komplementálható. A pékélesztő törzsek Na₂SO₃ tartalmú táptalajon nagyon rosszul nőttek, ezért ilyen körülmények között 4 napig inkubáltuk a sejteket. Ezzel szemben mindkét szerves kénforrás képes volt a fenotípus menekítésére. Eredményeink szerint a metionin jelenlétében a *met28* Δ törzs és a két kontroll törzs telepmeretei között nem volt megfigyelhető különbség, ami a fenotípus teljes komplementálására utal. A YNB-DO táptalajt kizárólag ciszteinrel kiegészítve azonban csak részleges komplementációt állapítottunk meg. Mikor a ciszteint és a metionint egyszerre alkalmaztuk a növekedés teljes mértékben komplementálható volt. Eredményeink megegyeztek a szakirodalomban foglaltakkal (Thomas and Surdin-Kerjan 1997).



3. ábra. A *S. cerevisiae* *met28* deléciós mutáns fenotípezálása különböző kénforrások jelenlétében szilárd táptalajon. Valamennyi táptalaj alapját YNB-DO jelentette, ezt egészítettük ki Na₂SO₄-tal, Na₂SO₃-tal, ciszteinrel (C), metioninnal (M) és ezek kombinációjával (C-M). A szuszpenziókból 10⁴, 10³, 10² és 10¹ sejtet tartalmazó cseppeket pipettáztunk a táptalajok felszínére. A törzseket 30 °C-on inkubáltuk.

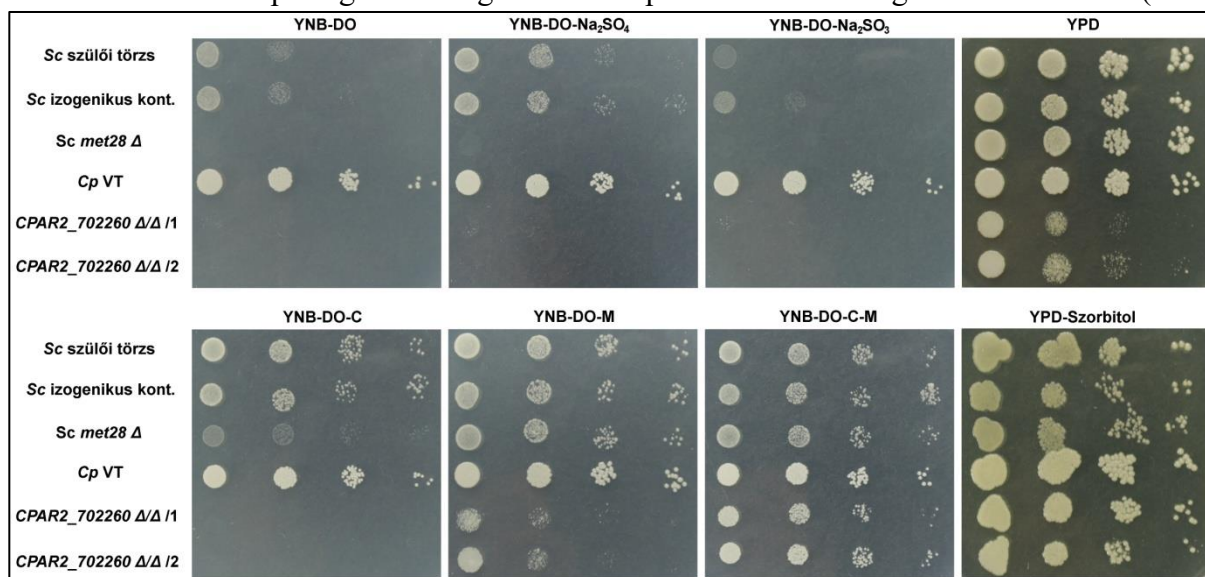
5.2. *Candida parapsilosis* CPAR2_702260 Δ/Δ mutánsok és a *S. cerevisiae* met28 Δ életképességének összevetése szilárd táptalajon

A továbbiakban megvizsgáltuk a csoportunk által korábban létrehozott CPAR2_702260 deléciós mutáns törzsek növekedését a *S. cerevisiae* met28 Δ mutáns törzzsel való összehasonlításban. Kontrollként YPD és szorbitollal kiegészített YPD táptalajon is nyomon követtük az életképességüket. A két *C. parapsilosis* mutáns azonos genotípusú, egymás biológiai párhuzamosainak tekinthetők. A csészéket 2 napig 30 °C-on inkubáltuk (4. ábra). A met28 Δ törzshöz hasonlóan a CPAR2_702260 Δ/Δ mutánsok is kisebb méretű egyedi telepeket voltak csak képesek formálni minimál táptalajon hozzáadott kénforrás nélkül, bár ez a gyengébb növekedés korántsem volt olyan szembetűnő, mint pékélesztő esetében. Ugyanakkor ez a növekedési defektus sem volt komplementálható szervesetlen kénforrásokkal. Aminosavakkal kiegészítve a minimál táptalajt azt tapasztaltuk, hogy amennyiben metionin jelen van (akár cisztein mellett, akár anélkül), a deléciós mutáns *C. parapsilosis* törzsek növekedési életképessége megközelíti a vad típusét. Kizárólag ciszteinnel kiegészítve a YNB-DO táptalajt nem volt megfigyelhető különbség a YNB-DO körülményhez képest.



4.ábra. *S. cerevisiae* és *C. parapsilosis* törzsek növekedése különböző kénforrások jelenlétében 30 °C-on. A YNB-DO táptalajt az alábbi kénforrásokkal egészítettük ki: Na₂SO₄, Na₂SO₃, cisztein (C), metionin (M) és ezek kombinációjával (C-M). Kontrollként YPD és YPD-Szorbitol körülményeket alkalmaztunk. A szuszpenziókból 10⁴, 10³, 10² és 10¹ sejtet tartalmazó cseppeket pipettáztunk a táptalajok felszínére. A törzseket két napig inkubáltuk.

A törzsek életképességének vizsgálatát ezzel párhuzamosan elvégeztük 37 °C-on is (5. ábra).

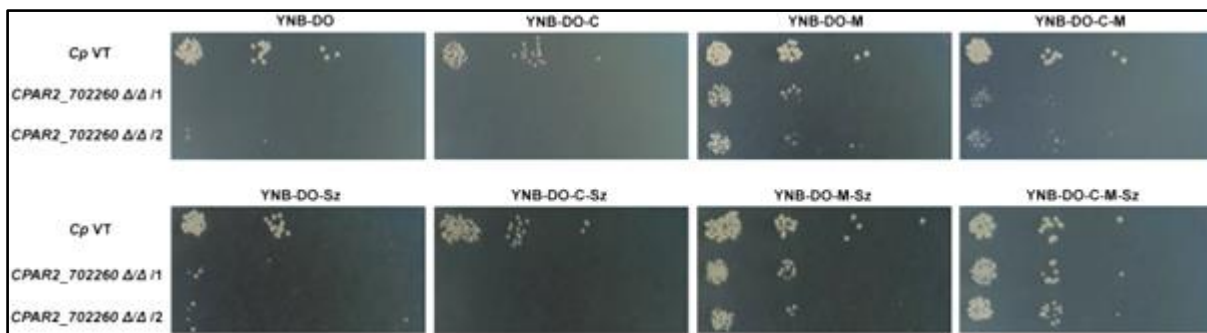


5. ábra. *S. cerevisiae* és *C. parapsilosis* törzsek növekedése különböző kénforrások jelenlétében 37 °C-on. A YNB-DO táptalajt az alábbi kénforrásokkal egészítettük ki: Na₂SO₄, Na₂SO₃, cisztein (C), metionin (M) és ezek kombinációjával (C-M). Kontrollként YPD és YPD-Szorbitol köztülményeket alkalmaztunk. A szuszpenziókból 10⁴, 10³, 10² és 10¹ sejtet tartalmazó cseppeket pipettáztunk a táptalajok felszínére. A törzseket 37 °C-on két napig inkubáltuk.

Eredményeink szerint a *met28 Δ* törzs növekedése nem tér el a szülői törzsétől komplett táptalajon, ugyanakkor, mint ahogy azt laboratóriumunk korábbi vizsgálatai kimutatták, ortológjának hiánya *C. parapsilosis*-ban erőteljes defektust eredményez, amely 1M szorbitol jelenlétével komplementálható. A 30 °C-on YNB-DO, YNB-DO-Na₂SO₃, YNB-DO-Na₂SO₄ és YNB-DO-C táptalajokon enyhe növekedési defektust mutató *CPAR2_702260 Δ/Δ* törzsek 37 °C-on egyáltalán nem mutatnak növekedést két nap tenyésztést követően. Mindezek ismeretében érdekes, hogy a metionin önmagában képes volt kismértékben komplementálni a növekedési defektust, és ez a hatás még kifejezettebb volt, ha a metionin mellett cisztein is jelen volt.

5.3. A szorbitol hatása a *C. parapsilosis* törzsek növekedésére 37 °C-on, szilárd táptalajon.

A fenti kísérletek eredményének ismeretében megvizsgáltuk, hogy a szorbitolnak milyen hatása van, ha a sejteket 37 °C-on neveljük minimál táptalajon, illetve különböző szerves kénforrások jelenlétében (6. ábra).

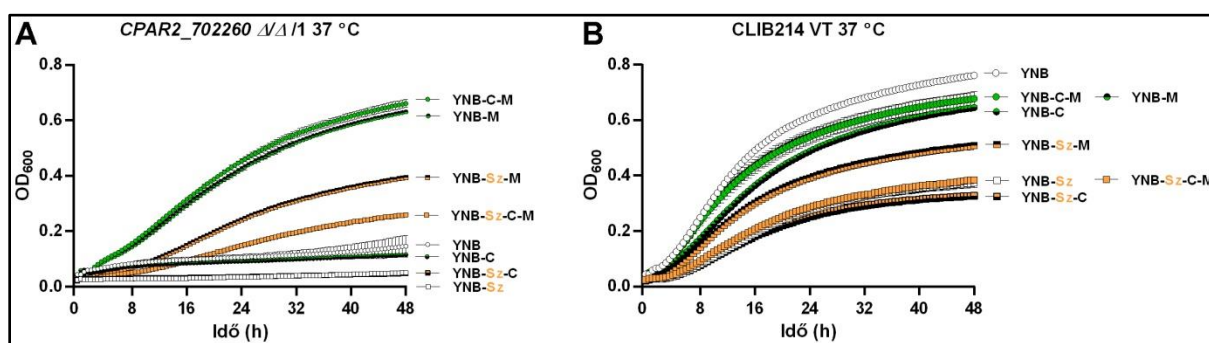


6. ábra. Szorbitol hatása a *C. parapsilosis* törzsek növekedésére különböző kénforrások jelenlétében 37 °C-on. A szorbitolt tartalmazó vagy nem tartalmazó YNB-DO táptalajt az alábbi kénforrásokkal egészítettük ki: cisztein (C), metionin (M) és ezek kombinációjával (C-M). A szuszpenziókból 10^4 , 10^3 , 10^2 és 10^1 sejtet tartalmazó cseppeket pipettáztunk a táptalajok felszínére. A törzseket 37 °C-on inkubáltuk két napig.

Megfigyelésünk szerint a szorbitol minden esetben segítette a deléciós törzsek növekedését, kivéve, ha a szorbitol mellett a táptalajt kizárólag ciszteinnel egészítettük ki. A sejtek növekedésére a metionin, cisztein és szorbitol együttes jelenléte gyakorolta a legelőnyösebb hatást.

5.4. *Candida parapsilosis* CPAR2_702260 Δ/Δ mutánsok növekedésének vizsgálata folyadéktenyésztésben

A növekedés táptalajon történő vizsgálata látványos, de nehezen kvantifikálható eredményekkel szolgál. A növekedési különbségek pontosabb és objektívebb meghatározásához a törzseket YNB-DO, YNB-DO-C, YNB-DO-M és YNB-DO-C-M és ezek szorbitollal kiegészített tápoldataiban neveltük 37 °C-on, és felvettük a növekedésük görbéjét (7. ábra).



7. ábra. *C. parapsilosis* CLIB214 vad típusú izolátum és CPAR2_702260 Δ/Δ 1 mutáns növekedési görbéi különböző tápoldatokban. A sejteket 48 órán át inkubáltuk 37 °C-on.

Érdekes módon folyadék tenyésztésben a deléciós mutáns valamennyi körülmény között rosszabbul nőtt akkor, ha szorbitol is jelen volt, mint szorbitol hiányában (7. ábra A). Megállapítottuk azonban, hogy ez nem a deléciós mutánsra jellemző sajátság, hanem igaz a vad

típusú szülői törzsre is (7. ábra B). A deléciós mutáns esetén igazoltuk, hogy a cisztein nem képes komplementálni a növekedési defektust 37 °C-on akár jelen van szorbitol akár nem, amely egybevág a szilárd táptalajon végzett kísérletek eredményével. Szintén a táptalajon való tenyésztéssel egybevágóan a metioninnal vagy ciszteinnel és metioninnal együttesen kiegészített minimál táptalajon a *CPAR2_702260 Δ/Δ* mutáns növekedési defektusa komplementálható. Érdekes azonban, hogy míg szorbitol hiányában a (metionin, valamint a cisztein és metionin) növekedési görbék lefutása nagyon hasonló volt, addig szorbitol jelenlétében a kizárólag metioninnal kiegészített YNB-DO médiumban hatékonyabb volt a komplementáció, mint akkor, ha metionin mellett cisztein is jelen volt a tápoldatban, amely ellentétes a táptalajon való tenyésztés eredményeivel.

6. Diskusszió

A már korábban létrehozott *C. parapsilosis* CPAR2_702260 Δ/Δ hőszenzitív törzset munkánk során részletesen fenotípezáltuk. Megállapítottuk, hogy ortológja a *S. cerevisiae* MET28 génje, amely gén által kódolt fehérje fontos szerepet játszik a szervetlen kén felvételében és átalakításában közreműködő fehérjék génjének expressziójának szabályozásában (Thomas and Surdin-Kerjan 1997) (L Kuras, Barbey, and Thomas 1997) (Blaiseau and Thomas 1998). Valószínűsíthető, hogy a MET28 ortológja *C. albicans*-ban (orf19.7046) esszenciális, mivel két különböző módszer alkalmazásával sem sikerült deléciós mutáns előállítani (Shrivastava et al. 2021). Érdekesnek találtuk azon felismerést, hogy egy emberre minimálisan ártalmas élesztőben egy gén a kénanyagcsere regulátorát, egy az emberi fiziológiához szélsőségesen alkalmazkodott patogén élesztőben (*C. albicans*) egy feltételezhetően esszenciális gént, míg a kettő szélsőség közé sorolható, elsősorban az alacsony születési súllyal világra jött csecsemőkre nézve veszélyt jelentő, *C. parapsilosis*-ban a hőmérséklet toleranciában szerepet játszó fehérjét kódol. Ez a patoevolúciós vetület tette indokolttá a *C. parapsilosis* CPAR2_702260 Δ/Δ mutáns alaposabb fenotípezálását különös tekintettel a pékélesztő *met28* Δ mutánsal való összevetésben.

Megállapítottuk, hogy a CPAR2_702260 Δ/Δ mutáns, hasonlóan a *met28* Δ mutánshoz, csökkent növekedést mutat szerves kénforrás hiányában minimál táptalajon, amely azonban kevésbé kifejezett, mint a pékélesztő deléciós mutáns esetében. A komplett táptalajon elvégzett növekedési tesztek alapján a Met28 fehérje nem vesz részt a pékélesztő hőmérséklet toleranciájának kialakításában, ellentétben a *C. parapsilosis*-ban előforduló ortológjával. 30 °C-on szilárd táptalajon mindkét faj esetében a metioninnal és ciszteinnel kiegészített táptalaj eredményezte a leghatékonyabb komplementációt, ennél gyengébb komplementáció volt elérhető metionin kizárólagos alkalmazásával, míg a cisztein egyedül alkalmazása csak pékélesztő esetében komplementálta az auxotrófiát, *C. parapsilosis* esetében nem figyeltünk meg ilyen hatást. A CPAR2_702260 Δ/Δ sejtek életképessége erőteljesen lecsökkent, amikor a kén tartalmú aminosavak hiánya magasabb tenyésztési hőmérséklettel párosult. Érdekes módon a cisztein önmagában történő alkalmazása egyáltalán nem segítette a CPAR2_702260 Δ/Δ deléciós mutánsok növekedését, ugyanakkor metioninnal együtt alkalmazva nagyobb átmérőjű telepeket eredményezett, mint a metionin egyedüli adagolása. Bár a szorbitol alkalmazása minimálisan javította a *C. parapsilosis* deléciós mutánsok életképességét, a cisztein negatív hatását ez sem volt képes kompenzálni.

Érdekes módon folyadék tenyészetben, 37 °C-on a szorbitol valamennyi vizsgált tápoldatban hátrányos hatást gyakorolt a sejtek növekedésére, de ez a jelenség nem csak a deléciós mutánsokra, hanem a szülői CLIB214 izolátumra is igaz volt. Amennyiben szorbitol is jelen volt a kizárólag

metioninnal kiegészített tápoldatban gyorsabb osztódást regisztráltunk a *CPAR2_702260 Δ/Δ* törzs esetében, mint ha a metionin mellett cisztein is jelen lett volna, ami ellentétes a szilárd táptalajon megfigyelt jelenséggel.

Munkánk ezen szakaszában, jelenlegi ismereteink birtokában az alábbi módon tudjuk értelmezni a megfigyelteket. Eredményeink alapján kétségtelen, hogy a *CPAR2_702260* fehérje funkcióját több környezeti paraméter is befolyásolja, amelyek egy hipotézisbe illesztése nehézkes, és számos további vizsgálatot tesz szükségessé. Ilyen nyilvánvaló paraméter a hőmérséklet és a kén anyagcsere defektusa. Ehhez hozzájárul az a felismerés is, miszerint a cisztein negatív hatása szilárd táptalajon csak akkor jut érvényre, ha metionin nincsen jelen. A szorbitol szerepe ugyanakkor nehezen értelmezhető a tápoldatban és a táptalaj felszínén elvégzett tenyésztések ellentmondásos eredményeinek ismeretében. A fentiekhezkapcsolódóan megjegyzendő, hogy laboratóriumunkban több kutatás is zajlik a *CPAR2_702260* fehérjével kapcsolatosan, és bár azok hangsúlyozottan nem jelen dolgozat részei, de segíthetnek megérteni a fehérje funkcióját. Az egyik projekt a kérdéses *CPAR2_702260* fehérje lokalizációjának megfigyelése volt, amelynek eredményei a fehérje mitokondriális lokalizációjára engednek következtetni. A hőmérsékleti stressz a membrán stabilitásának megbomlásával jár (Niu and Xiang 2018). Ezek alapján feltételezhető, hogy a szorbitol, vagy közvetlenül, mint ozmotikus stabilizátor, segíthet megőrizni a membrán integritását magasabb hőmérsékleten, vagy közvetve egy olyan szignáltranszdukciós útvonalat (feltételezhetően a Hog1-et) indíthat be, amely a *CPAR2_702260* fehérje hiányában is képes biztosítani a túlélést 37 °C-on. Arra hogy ez miért csak szilárd táptalajon jut érvényre, az adhat magyarázatot, hogy míg szilárd táptalajon az élesztők aerob körülmények között vannak, addig folyadék tenyészetben egy erősen oxigén limitált környezet alakul ki, ahol a szorbitol ezen hatása már nem érvényesül, vagy egy másik, erősebb hatás írja azt felül, ami társulhat a megváltozott oxigén ellátottsághoz és alternatív anyagcsere útvonalak aktiválódásához. Ez utóbbi egybecseng a fehérje feltételezhetően mitokondriális lokalizációjával, és az anyagcserében bekövetkező esetleges változással. Feltételezhető, hogy ehhez a megváltozott anyagcseréhez kapcsolható a cisztein által kiváltott növekedésre káros hatás, amit azonban a metionin jelenléte képes felülmúlni.

A fenti hipotézis vizsgálatához a közeljövőben metabolomikai analízist tervezünk elvégezni, és célunk a fehérje lokalizációjának vizsgálata, aerob/anaerob, szorbitol tartalmú/hiányos, valamint a fehérje lokalizációjának vizsgálata ciszteinnel, ciszteinnel és metioninnal, illetve csak metioninnal kiegészített minimál tápoldatban történő nevelést követően. Továbbá szeretnénk információt szerezni a különböző körülmények között bekövetkező transzkripciós változásokról, ezért RNS szekvenálást is tervezünk a közeljövőben, és dolgozunk a *CPAR2_702260* fehérjével kölcsönható fehérjepartnerek azonosításán is.

7. Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani Dr. Papp Tamás egyetemi tanárnak, az SZTE-TTIK Biotechnológiai és Mikrobiológiai Tanszék vezetőjének, hogy munkámhoz helyet biztosított a tanszéken. Nagyon köszönöm Prof. Dr. Gácsér Attila egyetemi tanárnak szakmai támogatását és hogy a dolgozatomat a csoportjában készíthettem el. Köszönöm Flaisz Dominikának, a rengeteg idő ráfordítását és segítségét a dolgozat elkészülése során. Hatalmas hálával tartozom Dr. Németh Tibornak, aki végtelen kitartással és türelemmel volt felém, a hihetetlen sok segítségéért és tanításáért. Köszönöm Dr. Farkas Zoltán segítségét, aki rendelkezésemre bocsájtotta a pékélesztő törzseket. Köszönöm még a 301-es labor minden dolgozójának segítségét, támogatását, amelyet kaptam a OTDK dolgozatom elkészítéséhez.

8. Hivatkozások jegyzéke

- Adrio, Jose L, and Arnold L Demain. 2003. "Fungal Biotechnology." *International Microbiology : The Official Journal of the Spanish Society for Microbiology* 6 (3): 191–99.
<https://doi.org/10.1007/s10123-003-0133-0>.
- Baley, J E, R M Kliegman, B Boxerbaum, and A A Fanaroff. 1986. "Fungal Colonization in the Very Low Birth Weight Infant." *Pediatrics* 78 (2): 225–32.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3526268>.
- Benjamin, D K, K Ross, R E McKinney, D K Benjamin, R Auten, and R G Fisher. 2000. "When to Suspect Fungal Infection in Neonates: A Clinical Comparison of Candida Albicans and Candida Parapsilosis Fungemia with Coagulase-Negative Staphylococcal Bacteremia." *Pediatrics* 106 (4): 712–18. <https://doi.org/10.1542/peds.106.4.712>.
- Bennett, J W. 1998. "Mycotechnology: The Role of Fungi in Biotechnology." *Journal of Biotechnology* 66 (2–3): 101–7. [https://doi.org/10.1016/s0168-1656\(98\)00133-3](https://doi.org/10.1016/s0168-1656(98)00133-3).
- Biswas, Subhrajit, Patrick Van Dijck, and Asis Datta. 2007. "Environmental Sensing and Signal Transduction Pathways Regulating Morphopathogenic Determinants of Candida Albicans." *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR* 71 (2): 348–76.
<https://doi.org/10.1128/MMBR.00009-06>.
- Blackwell, Meredith. 2011. "The Fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 Million Species?" *American Journal of Botany* 98 (3): 426–38. <https://doi.org/10.3732/ajb.1000298>.
- Blaiseau, P L, and D Thomas. 1998. "Multiple Transcriptional Activation Complexes Tether the Yeast Activator Met4 to DNA." *The EMBO Journal* 17 (21): 6327–36.
<https://doi.org/10.1093/emboj/17.21.6327>.
- Buratti, Simone, Carolina Elena Girometta, Rebecca Michela Baiguera, Barbara Barucco, Marco Bernardi, Giuseppe De Girolamo, Maura Malgaretti, Desdemona Oliva, Anna Maria Picco, and Elena Savino. 2022. "Fungal Diversity in Two Wastewater Treatment Plants in North Italy." *Microorganisms* 10 (6). <https://doi.org/10.3390/microorganisms10061096>.
- Butler, Geraldine, Matthew D Rasmussen, Michael F Lin, Manuel A S Santos, Sharadha Sakthikumar, Carol A Munro, Esther Rheinbay, et al. 2009. "Evolution of Pathogenicity and

- Sexual Reproduction in Eight *Candida* Genomes.” *Nature* 459 (7247): 657–62.
<https://doi.org/10.1038/nature08064>.
- Citiulo, Francesco, Ilse D Jacobsen, Pedro Miramón, Lydia Schild, Sascha Brunke, Peter Zipfel, Matthias Brock, Bernhard Hube, and Duncan Wilson. 2012. “*Candida Albicans* Scavenges Host Zinc via Pra1 during Endothelial Invasion.” *PLoS Pathogens* 8 (6): e1002777.
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002777>.
- Davis, Dana. 2003. “Adaptation to Environmental PH in *Candida Albicans* and Its Relation to Pathogenesis.” *Current Genetics* 44 (1): 1–7. <https://doi.org/10.1007/s00294-003-0415-2>.
- Diao, Zhenli, Dongsheng Han, Rui Zhang, and Jinming Li. 2022. “Metagenomics Next-Generation Sequencing Tests Take the Stage in the Diagnosis of Lower Respiratory Tract Infections.” *Journal of Advanced Research* 38 (May): 201–12.
<https://doi.org/10.1016/j.jare.2021.09.012>.
- Enjalbert, Brice, Deborah A Smith, Michael J Cornell, Intikhab Alam, Susan Nicholls, Alistair J P Brown, and Janet Quinn. 2006. “Role of the Hog1 Stress-Activated Protein Kinase in the Global Transcriptional Response to Stress in the Fungal Pathogen *Candida Albicans*.” *Molecular Biology of the Cell* 17 (2): 1018–32. <https://doi.org/10.1091/mbc.e05-06-0501>.
- Fanning, Saranna, and Aaron P Mitchell. 2012. “Fungal Biofilms.” *PLoS Pathogens* 8 (4): e1002585. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002585>.
- Finkel, Jonathan S, and Aaron P Mitchell. 2011. “Genetic Control of *Candida Albicans* Biofilm Development.” *Nature Reviews. Microbiology* 9 (2): 109–18.
<https://doi.org/10.1038/nrmicro2475>.
- Gasteiger, Elisabeth, Alexandre Gattiker, Christine Hoogland, Ivan Ivanyi, Ron D Appel, and Amos Bairoch. 2003. “ExPASy: The Proteomics Server for in-Depth Protein Knowledge and Analysis.” *Nucleic Acids Research* 31 (13): 3784–88. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg563>.
- Giri, S, and A J Kindo. 2012. “A Review of *Candida* Species Causing Blood Stream Infection.” *Indian Journal of Medical Microbiology* 30 (3): 270–78. <https://doi.org/10.4103/0255-0857.99484>.
- Groot, Piet W J de, Oliver Bader, Albert D de Boer, Michael Weig, and Neeraj Chauhan. 2013. “Adhesins in Human Fungal Pathogens: Glue with Plenty of Stick.” *Eukaryotic Cell* 12 (4): 470–81. <https://doi.org/10.1128/EC.00364-12>.

- Hodge, A. 2000. "Microbial Ecology of the Arbuscular Mycorrhiza." *FEMS Microbiology Ecology* 32 (2): 91–96. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2000.tb00702.x>.
- Hoyer, Lois L, and Ernesto Cota. 2016. "Candida Albicans Agglutinin-Like Sequence (Als) Family Vignettes: A Review of Als Protein Structure and Function." *Frontiers in Microbiology* 7: 280. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00280>.
- Hwang, Cheol-Sang, Gi-Eun Rhie, Jang-Hyun Oh, Won-Ki Huh, Hyung-Soon Yim, and Sa-Ouk Kang. 2002. "Copper- and Zinc-Containing Superoxide Dismutase (Cu/ZnSOD) Is Required for the Protection of Candida Albicans against Oxidative Stresses and the Expression of Its Full Virulence." *Microbiology (Reading, England)* 148 (Pt 11): 3705–13. <https://doi.org/10.1099/00221287-148-11-3705>.
- Jain, Akriti G, Jian Guan, and Jason D'Souza. 2018. "Candida Parapsilosis: An Unusual Cause of Infective Endocarditis." *Cureus* 10 (11): e3553. <https://doi.org/10.7759/cureus.3553>.
- Jiang, Dewei, Wei Zhu, Yunchuan Wang, Chang Sun, Ke-Qin Zhang, and Jinkui Yang. 2013. "Molecular Tools for Functional Genomics in Filamentous Fungi: Recent Advances and New Strategies." *Biotechnology Advances* 31 (8): 1562–74. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.08.005>.
- Kim, Jeong-Yoon. 2016. "Human Fungal Pathogens: Why Should We Learn?" *Journal of Microbiology (Seoul, Korea)* 54 (3): 145–48. <https://doi.org/10.1007/s12275-016-0647-8>.
- Kim, Joon, and Peter Sudbery. 2011. "Candida Albicans, a Major Human Fungal Pathogen." *Journal of Microbiology (Seoul, Korea)* 49 (2): 171–77. <https://doi.org/10.1007/s12275-011-1064-7>.
- Kühn, Clemens, and Edda Klipp. 2012. "Zooming in on Yeast Osmoadaptation." *Advances in Experimental Medicine and Biology* 736: 293–310. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-7210-1_17.
- Kuras, L, R Barbey, and D Thomas. 1997. "Assembly of a BZIP-BHLH Transcription Activation Complex: Formation of the Yeast Cbf1-Met4-Met28 Complex Is Regulated through Met28 Stimulation of Cbf1 DNA Binding." *The EMBO Journal* 16 (9): 2441–51. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.9.2441>.
- Kuras, Laurent, Astrid Rouillon, Traci Lee, Regine Barbey, Mike Tyers, and Dominique Thomas. 2002. "Dual Regulation of the Met4 Transcription Factor by Ubiquitin-Dependent

- Degradation and Inhibition of Promoter Recruitment.” *Molecular Cell* 10 (1): 69–80.
[https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(02\)00561-0](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(02)00561-0).
- Lopes, José Pedro, and Michail S Lionakis. 2022. “Pathogenesis and Virulence of *Candida Albicans*.” *Virulence* 13 (1): 89–121. <https://doi.org/10.1080/21505594.2021.2019950>.
- Mayer, François L, Duncan Wilson, and Bernhard Hube. 2013. “*Candida Albicans* Pathogenicity Mechanisms.” *Virulence* 4 (2): 119–28. <https://doi.org/10.4161/viru.22913>.
- Nagy, László G, Renáta Tóth, Enikő Kiss, Jason Slot, Attila Gácsér, and Gábor M Kovács. 2017. “Six Key Traits of Fungi: Their Evolutionary Origins and Genetic Bases.” *Microbiology Spectrum* 5 (4). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.FUNK-0036-2016>.
- Németh, Tibor, Joshua D Nosanchuk, Csaba Vagvolgyi, and Attila Gacser. 2021. “Enhancing the Chemical Transformation of *Candida Parapsilosis*.” *Virulence* 12 (1): 937–50.
<https://doi.org/10.1080/21505594.2021.1893008>.
- Nicholls, Susan, Donna M MacCallum, Florian A R Kaffarnik, Laura Selway, Scott C Peck, and Alistair J P Brown. 2011. “Activation of the Heat Shock Transcription Factor Hsf1 Is Essential for the Full Virulence of the Fungal Pathogen *Candida Albicans*.” *Fungal Genetics and Biology : FG & B* 48 (3): 297–305. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2010.08.010>.
- Niu, Yue, and Yun Xiang. 2018. “An Overview of Biomembrane Functions in Plant Responses to High-Temperature Stress.” *Frontiers in Plant Science* 9: 915.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00915>.
- Pál, Sára E, Renáta Tóth, Joshua D Nosanchuk, Csaba Vágvolgyi, Tibor Németh, and Attila Gácsér. 2021. “A *Candida Parapsilosis* Overexpression Collection Reveals Genes Required for Pathogenesis.” *Journal of Fungi (Basel, Switzerland)* 7 (2).
<https://doi.org/10.3390/jof7020097>.
- Parapouli, Maria, Anastasios Vasileiadis, Amalia-Sofia Afendra, and Efstathios Hatziloukas. 2020. “*Saccharomyces Cerevisiae* and Its Industrial Applications.” *AIMS Microbiology* 6 (1): 1–31. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2020001>.
- Phan, Quynh T, Carter L Myers, Yue Fu, Donald C Sheppard, Michael R Yeaman, William H Welch, Ashraf S Ibrahim, John E Edwards, and Scott G Filler. 2007. “Als3 Is a *Candida Albicans* Invasin That Binds to Cadherins and Induces Endocytosis by Host Cells.” *PLoS Biology* 5 (3): e64. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050064>.

- Phukhamsakda, Chayanard, Rolf Henrik Nilsson, Chitrabhanu S. Bhunjun, Antonio Roberto Gomes de Farias, Ya-Ru Sun, Subodini N. Wijesinghe, Mubashar Raza, et al. 2022. “The Numbers of Fungi: Contributions from Traditional Taxonomic Studies and Challenges of Metabarcoding.” *Fungal Diversity* 114 (1): 327–86. <https://doi.org/10.1007/s13225-022-00502-3>.
- R, Arya N., and Naureen B. Rafiq. 2024. *Candidiasis. StatPearls*. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31850394>.
- Reda, Nashwa Mohamed, Reem Mostafa Hassan, Sherifa Tarek Salem, and Reham Hamed A Yousef. 2023. “Prevalence and Species Distribution of Candida Bloodstream Infection in Children and Adults in Two Teaching University Hospitals in Egypt: First Report of Candida Kefyr.” *Infection* 51 (2): 389–95. <https://doi.org/10.1007/s15010-022-01888-7>.
- Reeves, Todd D, Douglas M Warner, Larry H Ludlow, and Clare M O’Connor. 2018. “Pathways over Time: Functional Genomics Research in an Introductory Laboratory Course.” *CBE Life Sciences Education* 17 (1). <https://doi.org/10.1187/cbe.17-01-0012>.
- Robbins, Nicole, Priya Uppuluri, Jeniel Nett, Ranjith Rajendran, Gordon Ramage, Jose L Lopez-Ribot, David Andes, and Leah E Cowen. 2011. “Hsp90 Governs Dispersion and Drug Resistance of Fungal Biofilms.” *PLoS Pathogens* 7 (9): e1002257. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002257>.
- Saëz, H, F Traore, and M Therizol. 1975. “[Thermotolerance of the Candida. Relationships with Ecology, Pathology and Taxonomy (Author’s Transl)].” *Annales de Parasitologie Humaine et Comparee* 50 (6): 821–29. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/776060>.
- Shamsaei, S, M Getso, K Ahmadikia, M Yarahmadi, H E Farahani, R Aslani, A S Mohammadzade, et al. 2021. “Recent Findings on the Role of Fungal Products in the Treatment of Cancer.” *Clinical & Translational Oncology : Official Publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico* 23 (2): 197–204. <https://doi.org/10.1007/s12094-020-02428-1>.
- Shrivastava, Manjari, Jinrong Feng, Mark Coles, Benjamin Clark, Amjad Islam, Vanessa Dumeaux, and Malcolm Whiteway. 2021. “Modulation of the Complex Regulatory Network for Methionine Biosynthesis in Fungi.” *Genetics* 217 (2). <https://doi.org/10.1093/genetics/iyaa049>.
- Skrzypek, Marek S, Jonathan Binkley, Gail Binkley, Stuart R Miyasato, Matt Simison, and Gavin

- Sherlock. 2017. "The Candida Genome Database (CGD): Incorporation of Assembly 22, Systematic Identifiers and Visualization of High Throughput Sequencing Data." *Nucleic Acids Research* 45 (D1): D592–96. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw924>.
- Strack, Dieter, Thomas Fester, Bettina Hause, Willibald Schliemann, and Michael H Walter. 2003. "Arbuscular Mycorrhiza: Biological, Chemical, and Molecular Aspects." *Journal of Chemical Ecology* 29 (9): 1955–79. <https://doi.org/10.1023/a:1025695032113>.
- Thomas, D, and Y Surdin-Kerjan. 1997. "Metabolism of Sulfur Amino Acids in *Saccharomyces Cerevisiae*." *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR* 61 (4): 503–32. <https://doi.org/10.1128/membr.61.4.503-532.1997>.
- Tóth, Renáta, Vitor Cabral, Ernst Thuer, Flóra Bohner, Tibor Németh, Csaba Papp, Leonardo Nimrichter, et al. 2018. "Investigation of Candida Parapsilosis Virulence Regulatory Factors during Host-Pathogen Interaction." *Scientific Reports* 8 (1): 1346. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19453-4>.
- Tsui, Clement K M, James Woodhall, Wen Chen, C André Lévesque, Anna Lau, Cor D Schoen, Christiane Baschien, Mohammad J Najafzadeh, and G Sybren de Hoog. 2011. "Molecular Techniques for Pathogen Identification and Fungus Detection in the Environment." *IMA Fungus* 2 (2): 177–89. <https://doi.org/10.5598/imafungus.2011.02.02.09>.
- Waggoner-Fountain, L A, M W Walker, R J Hollis, M A Pfaller, J E Ferguson, R P Wenzel, and L G Donowitz. 1996. "Vertical and Horizontal Transmission of Unique Candida Species to Premature Newborns." *Clinical Infectious Diseases : An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* 22 (5): 803–8. <https://doi.org/10.1093/clinids/22.5.803>.
- Wagner, K, B Springer, V P Pires, and P M Keller. 2018. "Molecular Detection of Fungal Pathogens in Clinical Specimens by 18S rDNA High-Throughput Screening in Comparison to ITS PCR and Culture." *Scientific Reports* 8 (1): 6964. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25129-w>.
- Wysong, D R, L Christin, A M Sugar, P W Robbins, and R D Diamond. 1998. "Cloning and Sequencing of a Candida Albicans Catalase Gene and Effects of Disruption of This Gene." *Infection and Immunity* 66 (5): 1953–61. <https://doi.org/10.1128/IAI.66.5.1953-1961.1998>.
- Xu, Jianping. 2020. "Fungal Species Concepts in the Genomics Era." *Genome* 63 (9): 459–68. <https://doi.org/10.1139/gen-2020-0022>.

- Zhang, X, M De Micheli, S T Coleman, D Sanglard, and W S Moye-Rowley. 2000. "Analysis of the Oxidative Stress Regulation of the Candida Albicans Transcription Factor, Cap1p." *Molecular Microbiology* 36 (3): 618–29. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.01877.x>.
- Znaidi, Sadri, Katherine S Barker, Sandra Weber, Anne-Marie Alarco, Teresa T Liu, Geneviève Boucher, P David Rogers, and Martine Raymond. 2009. "Identification of the Candida Albicans Cap1p Regulon." *Eukaryotic Cell* 8 (6): 806–20. <https://doi.org/10.1128/EC.00002-09>.
- Zupančič, Jerneja, Monika Novak Babič, and Nina Gunde-Cimerman. 2019. "High Incidence of an Emerging Opportunistic Pathogen Candida Parapsilosis in Water-Related Domestic Environments." In *Fungal Infection*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.81313>.

**A 37. OTDK
BIOLÓGIA SZEKCIÓ FELHÍVÁSÁNAK
2. SZÁMÚ MELLÉKLETE**

TÉTELES SZERZŐI HOZZÁJÁRULÁS

Alulírott **SELMECI MÁTYÁS** nyilatkozom, hogy a 37. OTDK-ra benyújtott **A *Candida parapsilosis* CPAR2_702260 deléciós mutáns jellemzése a hőmérséklet tolerancia vonatkozásában.**

című pályamunkámban leírtak esetében az alábbi munkafolyamatok elvégzésében vettem részt¹:

Részfeladat²	A részvétel mértéke (ötfokozatú skálán[#] jellemezve)
A vizsgálendő gomba törzsek tenyésztése	5
Transzformációs plazmid és a donor DNS létrehozása	5
Deléciós mutáns törzsek létrehozása és ellenőrzése Southern blot hibridizációval és kolónia PCR segítségével	4
A vizsgálendő körülmények létrehozása (szilárd minimál táptalajok/YPD alapú táptalajok, folyadék tenyészetes tápoldatok)	5
A növekedési tesztek elvégzése és kiértékelése	4
...	...

Kelt: Szeged, 2025.01.07.



Pályamunkát benyújtó hallgató Selmei Mátyás
aláírása

A nyilatkozatban foglaltak helyességét megerősítem:



Témavezető (Dr. Németh Tibor, SZTE TTIK Biológiai
intézet, Biotechnológiai és Mikrobiológiai tanszék)
aláírása

¹ A kutatási projekt azon részfadatait, amelyekben egyáltalán nem vett részt, ne tüntesse fel a listában.

² Az alábbi lista mintául szolgál, szabadon módosítható, bővíthető.