

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM
Természettudományi és Informatikai Kar
Mikrobiológiai Tanszék

37 OTDK Biológia Szekció

Transzkripciós faktorok szerepének tisztázása a *Mucor lusitanicus* azokkal
szembeni rezisztenciájában

Péter Áron

Molekuláris biológia mester képzés

I. évfolyam

Témavezető:

Dr. Nagy Gábor, tudományos munkatárs



2024

Szeged

1 Tartalomjegyzék

1	Tartalomjegyzék.....	2
2	Bevezetés	4
2.1	A járomspórás gombák általános jellemzése	4
2.2	A klinikumban alkalmazott antifungális szerek.....	5
2.3	Azol rezisztencia kialakulásának háttere	6
2.4	Gomba specifikus transzkripciós faktorok	6
2.5	Transzkripciós faktorok szerepe a „pdr hálózat” kialakításában	9
3	Célkitűzések.....	11
4	Anyagok és módszerek	12
4.1	A kutatás során felhasznált törzsek.....	12
4.2	Alkalmazott táptalajok, tápoldatok.....	12
4.2.1	Minimál táptalaj (YNB; Yeast Nitrogene Base) (pH4,5)	12
4.2.2	Élesztő-glükóz táptalaj (YEG; Yeast Extract Glucose).....	12
4.2.3	MEA (<i>Malt extract agar</i>) Maláta kivonatos táptalaj.....	12
4.2.4	RPMI (<i>Roswell Park Memorial Institute</i>) tápoldat (pH 7).....	13
4.3	Tenyésztési körülmények	13
4.4	Alkalmazott oldatok, pufferek és reagensek.....	13
4.4.1	DNS gélelektroforézishez használt anyagok.....	13
4.4.2	Protoplasztképzéshez és PEG-mediált transzformációhoz használt oldatok	13
4.5	Indítószekvenciák	13
4.6	Vizsgálati módszerek.....	13
4.6.1	Genomi DNS kivonása <i>M. lusitanicus</i> -ból és a mutáns törzsekből	13
4.6.2	DNS/RNS gélelektroforézis	14
4.6.3	DNS visszaizolálása agaróz gélből	14
4.6.4	Alkalmazott PCR technikák és reakciókörülmények.....	14

4.6.5	A transzkripció faktor gének kiütéséhez felhasznált deléciós kazetták elkészítésének körülményei.....	14
4.6.6	A <i>tf106</i> és <i>tf821</i> gének amplifikálásához használt reakció és körülményei	15
4.6.7	Génamplifikálási körülményei <i>tf106</i> , és <i>tf821</i> esetén	15
4.6.8	A <i>tf106</i> és <i>tf821</i> gének deléciójára szolgáló gRNS szekvenciák elkészítése	15
4.6.9	PEG-mediált protoplaszt transzformálás.....	15
4.6.10	RNS izolálás <i>M. lusitanicus</i> -ból és a létrehozott mutáns törzsekből	16
4.6.11	Valós idejű kvantitatív PCR a transzkripció szintek meghatározásához	16
4.6.12	Deléciós törzsek növekedési intenzitásának vizsgálata	17
4.6.13	Antifungális érzékenységi tesztek.....	17
4.7	Statisztikai módszerek	17
4.8	<i>in silico</i> elemzés	18
5	Eredmények és értékelésük.....	19
5.1	Feltételezett transzkripció faktor kódoló gének azonosítása <i>M. lusitanicus</i> -ban.....	19
5.1.1	A TF106, illetve TF821 fehérjék <i>in silico</i> jellemzése	22
5.2	<i>Mucor lusitanicus</i> <i>tf106</i> és <i>tf821</i> génjeinek kiütése homológ rekombináció segítségével	23
5.3	Deléciós törzsek növekedési intenzitásának vizsgálata.....	24
5.4	Mutáns törzsek <i>pdr</i> génjeiben tapasztalt transzkripció változások.....	25
5.5	A mutáns törzsek ergoszterin génjeiben tapasztalt transzkripció változások.....	26
5.6	A létrehozott deléciós mutáns izolátumok antifungális érzékenysége	28
6	Diszkuszió.....	30
7	Szakirodalmi jegyzék.....	32
8	Köszönetnyilvánítás	36
9	Mellékletek	37

2 Bevezetés

2.1 A járomspórás gombák általános jellemzése

A Mucoromycota, vagyis a járomspórás gombák az egyik legősibb szárazföldön élő gomba törzs (Tsuboi és mtsai. 2022). A Mucoromycotába tartozó fajok többsége növényi szerves anyagot lebontó szaprofita életmódot folytat. Bizonyos rendbe tartozó fajok lehetnek endofiták, vagy mikorrhiza képzők, azonban találhatók növényi kártevő (Tsuboi 2022), valamint élősködő fajok is (Walther és mtsai.2019). Egyes fajokat alkalmaznak a biotechnológiában makromolekulák termeltetésére (tejsav, fumársav (Zhan 2007), illetve az élelmiszeriparban is, ahol fermentációs folyamatokban vesznek részt (Hachmeister és mtsai. 1993; Tsuboi és mtsai. 2022).

A Mucorales rend a Mucoromycotina egyik ága melybe 55 nemzetség és 261 faj tartozik (Walther és mtsai.2019). A rend általánosan kozmopolita elterjedésű, a nedves meleg élő helyet kedveli, ezért legtöbb faja a trópusi, szubtrópusi övezetekben található. Életmódjuk tekintetében a szaprofita korhadékevő fajok a legjellemzőbbek, azonban megtalálhatóak köztük opportunistáknak is (pl.: *Rizophus*, *Lichtheimia*, *Mucor*), amelyek súlyos megbetegedéseket, úgynevezett mucormikózisokat okoznak (Walther és mtsai.2019).

A *Mucor lusitanicus* a Mucorales rend egyik legfontosabb modell organizmusa, mivel modern genetikai eszközökkel könnyen és jól manipulálható. Ilyen módszer lehet az RNS-alapú géncsendesítés, valamint auxotrof mutánsok létrehozása (Ruiz-Vázquez és mtsai. 2015). Ezen felül fontos biotechnológiai szerepet is betölt, mint kiváló zsírsav termelőorganizmus (Fazili és mtsai. 2022).

A Mucorales rend tagjai által okozott mucormikózisok olyan életveszélyes fertőzések, melyek mortalitási rátája elérheti akár a 90%-ot is a betegség súlyosságától függően (Reid és mtsai 2020; Vaezi és mtsai 2021). A megbetegedések száma világszinten viszonylag alacsonynak tekinthető (jórészt a *Rizophus*, *Lichtheimia* és *Mucor* által okozottak), azonban az utóbbi évek során erősen növekvő tendenciát mutat, mivel előregedő társadalmakban növekszik a hajlamosító tényezők száma (Reid és mtsai 2020; Hernández és mtsai 2023; Vaezi és mtsai 2021). A vérdaganatos, neuropátiás vagy szervátültetés, illetve más traumák miatt immunszuppresszált betegek jelentik az egyik legveszélyeztetettebb csoportot (Hernández és mtsai. 2023). A kezeletlen kettes típusú cukorbetegségnek, illetve a Covid-19 fertőzésnek is gyakori szövődménye (Hernández és mtsai. 2023; Vaezi és mtsai. 2021). Ezt jól tükrözi az is, hogy a mucormikozisos megbetegedést okozó gombák a WHO listáján a kritikus csoportba sorolta,

olyan erősen patogén fajok közé, mint a *Candida auris* vagy az *Aspergillus fumigatus* (Fisher és Denning, 2023)

A fertőzés spórákon keresztül történik melyek a levegőből kerülnek be a szervezetbe a száj és orrüregén keresztül, ezen felül a nyílt sebek is fertőzési pontot jelenthetnek (Hernández és mtsai. 2023). A mucormikózisok legjellemzőbb megjelenési formája a rinocerebrális mikózis, amely a megbetegedések 25-39%-át okozza, de a szervezet más területeit is támadhatja. Előfordulhat a tüdőben (24-30%), a bélrendszerben (2-11%), valamint a bőrfelületen (19-26%-ban, kután és szubkután formában) (Reid és mtsai 2020). A betegség lefolyása ennek megfelelően jelentősen eltérhet. A diagnózis felállítását megnehezíti, hogy a fertőzés kezdeti állapotában csak aspecifikus tünetek (pl.: láz, fejfájás) jelentkeznek. A terápia hatékonyságát pedig jelentősen csökkenti, hogy a Mucorales rend tagjai magas rezisztenciát mutatnak a klinikumban általánosan alkalmazott antifungális szerekkel, például az azolokkal szemben.

2.2 A klinikumban alkalmazott antifungális szerek

A betegellátásban jelenleg számos gombaellenes szer van használatban melyeknek közül a leggyakrabban alkalmazottak, a poliének, azolok, echniokandinok és a flucitozinek (Lee és mtsai. 2021;McKeny és mtsai. 2023).

A poliének (pl. amfotericin B) a gombafalak sejtfalában található ergoszterinhez kötődnek és a sejtfal szerkezetét roncsolják pórusokat létrehozva, melynek következtében a gombasejt tartalma szivárogni kezd, ami a sejt halálához vezet. Az amfotericin B az egyik leggyakrabban használt gombaellenes szer, azonban klinikai alkalmazása nehézkes, mivel szájon keresztül nem bevihető. Az amfotericin B terápiának olyan veszélyes mellékhatásai is kialakulhatnak, mint a neuropátia, vagy az elektrolit egyensúly felborulása, melynek okán a dózis adagolásra is fokozott figyelmet kell fordítani (Van Daele és mtsai. 2019; Lee és mtsai. 2021).

Az azolok (pl. flukonazol, vorikonazol, posakonazol, itraconazol) hatásukat az ergoszterin bioszintézis útvonalban elhelyezkedő *erg11/cyp51* gén által kódolt 14- α -demetiláz enzim gátlásával fejtik ki, melynek következtében a lanoszterin képtelen ergoszterinné átalakulni (Van Daele és mtsai. 2019). Ennek következtében toxikus szterinek halmozódnak fel a gombasejt membránjában. Bár az azolok a klinikumban jól alkalmazhatók, mivel mind orálisan, mint pedig intravénás úton adagolhatóak, illetve nagy hatásspektrummal rendelkeznek, azonban a járomspórás gombák nagyfokú rezisztenciát mutatnak az azolokkal szemben, mivel genomjukban több kópiában is megtalálható az *erg11/cyp51* gén. Mindemellett az utóbbi évek kutatásai rámutattak, hogy az azol rezisztens gombatörzsek száma is növekszik (Lee és mtsai. 2021). Az azolok alkalmazása okozhat veszélyes gyógyszerinterakciókat is a citokrom P450-es

enzimrendszeren keresztül. Elnyúló használat esetén kialakulhatnak kardiotoxikus, neuropátiás, vagy akár bőrrákos mellékhatások is (McKeny és mtsai. 2023).

Az echinokandinok (pl. caspofungin, anidulafungin, micafungin) a sejtfal bioszintézisét akadályozzák az 1,3- β -glükán képződésének inhibíciójával, melynek következtében a sejt lízise következik be. A jelenleg alkalmazott antifungális szerek közül az echionokandinoknak van a legkevesebb gyógyszer kölcsönhatása, illetve a toxikológiai hatásuk is kisebb, mint más szereknek (Lee és mtsai. 2021).

A flucitozinek a nukleinsavak szintézisét gátolják, általában poliénnel társítva alkalmazzák őket, mert könnyen rezisztencia alakulhat ki ellenük (Lee és mtsai. 2021).

2.3 Azol rezisztencia kialakulásának háttere

Az azolokkal szembeni rezisztencia hátterében több molekuláris mechanizmus állhat. Gyakori, hogy az *erg11/cyp15* génben létrejövő mutáció miatt 1,4 α -dimetiláz enzimben aminosav csere történik, melynek következtében csökken a gyógyszer enzim kötő képessége, így az adott dózisu azol kevésbé lesz effektív. Az *erg11/cyp15* gén túlműködése, esetleges duplikációja is a rezisztencia erősödéséhez vezethet, mivel a megnövekedett géntermék mennyisége már elég ahhoz, hogy kompenzálja a bevitt gyógyszer hatását (Lee és mtsai. 2021). Az azol rezisztencia kialakulásában ezen felül fontos szerepet játszanak egyrészt az efflux pumpák is, mint pl. az ABC és MFS transzporterek, melyek a multi drog rezisztencia jelenség kialakulásáért felelősek. Az első ilyen azonosított fehérje a *Sacharomyces cerevisiae* PDR5 pleiotrópikus drog rezisztencia pumpája. Másrészt, a génexpressziót szabályzó fehérjék, transzkripciós faktorok, mivel befolyásolják a fentebb említett fehérjék és enzimek termelődését, így hozzájárulva az azolokkal szembeni rezisztencia folyamatok kialakulásához (Czajka és mtsai. 2023).

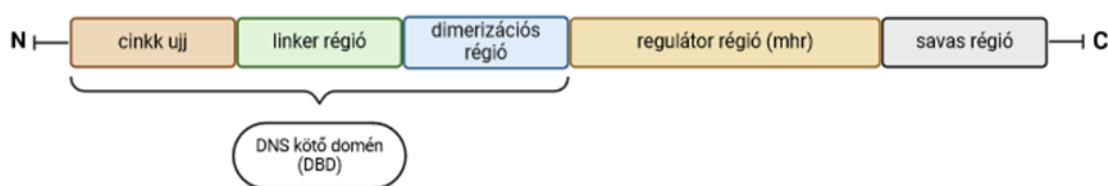
2.4 Gomba specifikus transzkripciós faktorok

A transzkripciós faktorok olyan fehérjék, melyek specifikus DNS szekvenciákkal képesek kötést létrehozni a szabályozni kívánt gén promóter régiójában és ennek hatására befolyásolni a gén kifejeződését. A legtöbb transzkripciós faktor az úgynevezett transzkripciós faktor kötő helyhez csatlakozik (transcription factor binding site-TFBS) és ezen keresztül fejti ki hatását (Eshani és mtsai. 2016).

A transzkripciós faktorok osztályozása a DNS kötő doménjük szerkezete szerint történik, így megkülönböztethetünk hélix-kanyar-hélix, hélix-hurok-hélix, leucin-cipzár és cink ujj fehérjéket is (García-Estrada mtsai. 2018).

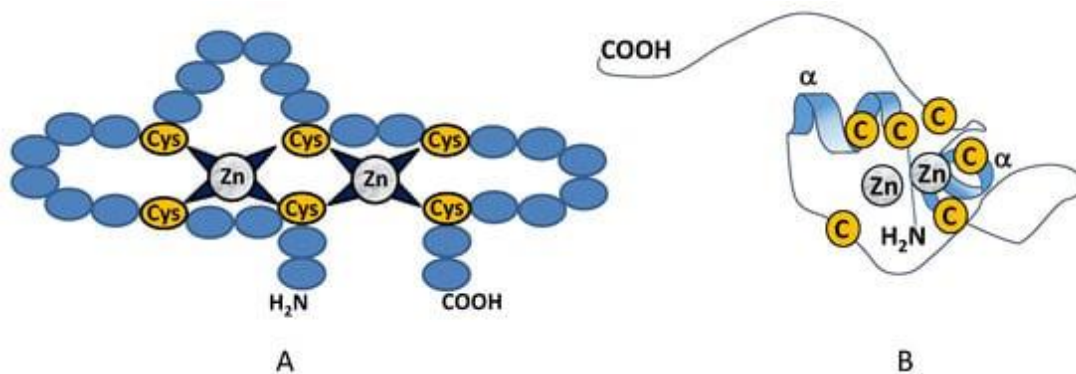
A cink ujj fehérjék egy kis molekulaméretű fehérjecsalád, melynek jellegzetes strukturális formája a cink ujj, ami egy vagy több cink iont tartalmaz (Li és mtsai. 2020). Ezen fehérjecsaládba tartozó fehérjék legfőbb funkciója a DNS, illetve RNS megkötése, de részt vehetnek fehérje-fehérje kölcsönhatásban, chaperon fehérjeként, lipid kötő fehérjeként, valamint a kromatin átrendezésében is (Li és mtsai. 2020). Legismertebb kategorizálásuk alapján kilenc alcsoportot különböztetünk meg: a C_2H_2 , C_2HC , C_3H , C_4 , C_6 , C_3HC_4 , C_2HC_5 , C_4HC_3 , és a C_8 alcsoportot, ahol a C, a cink ujjban található cisztein, míg a H, a hisztidin aminosavakra utal (Li és mtsai. 2020).

A fent említett csoportok közül a C_6 , vagyis a $Zn(II)_2Cys_6$ fehérjék, más néven binukleáris cink-cisztein ujjak csak gombákban fordulnak elő [1. ábra]. Képesek monomerekként, homodimerekként illetve heterodimerekként is funkcionálni. Jellegzetesen CGG tripletet ismernek fel a célgének promóter régiójában, ugyanakkor előfordulnak olyan C_6 fehérjék is, melyek ezen szekvencia fordítottját (GGC) ismerik fel (MacPherson és mtsai. 2006).



1.ábra. A binukleáris cink cisztein fehérje általános felépítése. Szerkezetileg 3 különböző elem építi fel. A DBD (DNS binding domain) a DNS megkötő szekvencia, a regulátor régió és a végső savas régió. A DBD további három alegységből áll, mint a cink ujj, a linker régió és a dimerizációs alegység. A DBD domén általánosan az N terminális végen található, de előfordulnak olyan fehérjék is, melyeken ez a domén a C terminális végen található meg (MacPherson és mtsai. 2006).

A binukleáris cink-cisztein ujjak jellegzetesége, hogy egy szekvenciában két Zn^{+2} ion is megtalálható, melyet 6 cisztein aminosav koordinál [2. ábra]. 3D-s szerkezeti felépítésüket tekintve a hat cisztein csoport két 3-3 ciszteinekből álló alegységet alkot, melyeket egy más aminosavakból álló hurok-egység köt össze, egy kis méretű alfa-helix struktúrát létrehozva (MacPherson és mtsai. 2006; Schjerling és mtsai. 1996). A cink ujj fehérjék aminosav sorrendje: $CysX_2CysX_6CysX_{5-12}CysX_2CysX_{6-8}Cys$ (MacPherson és mtsai. 2006), ahol a ciszteineken kívül több más aminosav is erősen konzervált a doménben, mint például a prolin a hurok régióban, melynek szerepe, hogy megakadályozza a fehérje összehurkolódást (Schjerling és mtsai. 1996).



2. ábra. Zn(II)₂C₆ domén elsődleges (A) és másodlagos (B) szerkezete (García-Estrada mtsai. 2018)

A linker régió aminosavai sokkal kevésbé konzerváltak, mind aminosav sorrendjük, mind pedig másodlagos szerkezetük is változatos lehet (pl. Gal4 protein esetén az egyik DNS szál mellett hosszan elnyúlik, míg a Pdr-1-ben antiparallel β -lemezek alkotják). Ezen régió legfontosabb szerepe, hogy meghatározza a dimerizáció során a két CGG triplet távolságát, így módon biztosítva a fehérje kötési specificitását (MacPherson és mtsai. 2006).

A dimerizációs domén ismétlődő heptád struktúrákból áll, ami tekercsekbe rendeződik. Ezen szerkezeti elemekben történik a fehérjék dimerizálódása tekercs-tekercs kölcsönhatásokon keresztül. Léteznek olyan cink ujj fehérjék is, amelyekből ez a domén hiányzik, így csak monomerként képesek funkcionálni (García-Estrada és mtsai. 2018).

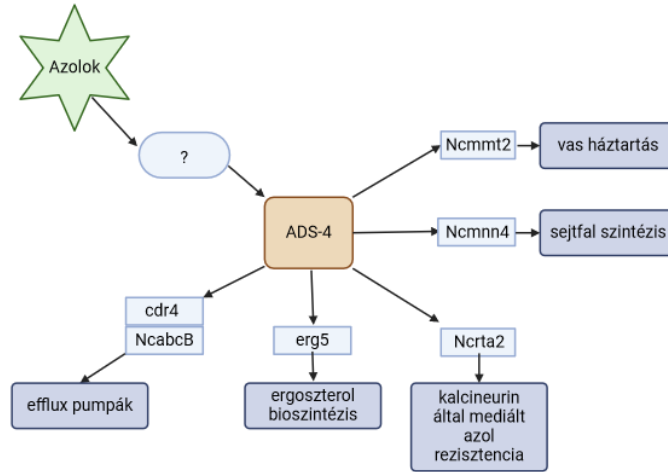
Az N terminális közel elhelyezkedő DNS kötő doménen kívül találjuk még a regulátor régiót, amelyet középső homológ régióknak is neveznek. Általánosan 80 aminosav hosszúságú - de nem feltétlen jelenik meg a C₆ család összes fehérjéjénél - az itt lévő aminosav szekvenciák azonban sokkal kevésbé konzerváltak, mint a cink ujj régióban lévők. A régió a transzkripció faktor DNS kötésének regulációjában játszik szerepet, melynek során csökkenti a transzkripció faktor affinitását a nem megfelelő DNS szekvenciához (MacPherson és mtsai. 2006). Ebben a szakaszban található még meg az úgy nevezett „gomba specifikus transzkripció faktor domén” is melyet több transzkripció faktorban is azonosítottak, de pontos szerepe a mai napig nem tisztázott.

A végső - C terminális felé eső - savas régióban egyáltalán nem találunk konzervált szekvencia elemeket, így ezen régió a C₆ család egyes fehérjéi esetén, különböző speciális feladatot tölthet be. Fontos szerepet játszhat a transzkripció faktor aktivációjában, illetve lehetséges, hogy egyes esetekben tartalmaz membrán kötő szekvenciát is (García-Estrada és mtsai. 2018).

A $\text{Zn(II)}_2\text{Cys}_6$ fehérjék a gombák életciklusának szinte minden területét befolyásolják. Részt vesznek a cukor és aminosav lebontás folyamataiban (Gal4 *S. cerevisiae*, PRNA *Aspergillus nidulans*), a glükoneogenezisben, a légzésben, a vitaminok előállításában, a nitrogénháztartásban (NIRA *A. nidulans*, NIT4 *Neurospora crassa*) és a stresszre, vagy gyógyszerekre adott válaszreakciókban (PDR1 *Candida glabrata*, CRG1 *Cercospora nicotianae*) (MacPherson és mtsai. 2006).

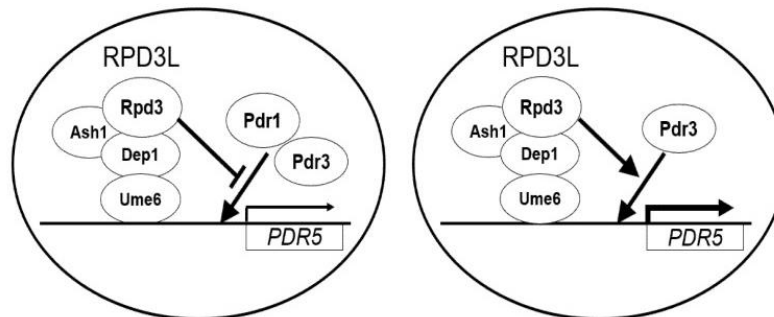
2.5 Transzkripciós faktorok szerepe a „pdr hálózat” kialakításában

Azol rezisztencia kialakulásában részt vevő cink cisztein binukleáris klaszter transzkripciós faktorokat először *S. cerevisiae*-ben azonosították melyben bizonyították, hogy a PDR1 és PDR3-as transzkripciós faktorok befolyásolják a PDR5-ös PDR efflux pumpa kifejeződését (Katzmann mtsai. 1996). Hagiwara és munkatársai (2017) *A. fumigatus*-ban igazolták, hogy az AtrR cink klaszter transzkripciós faktor befolyásolja a gomba azollokkal szembeni rezisztenciáját, mivel közvetlen szabályozója mind a *cdr1B* ABC efflux pumpának és *cyp51/erg11* ergoszterin bioszintézis génnek is. Ezen közös szabályozás felismerése vezetett a feltételezéshez, hogy az ergoszterin bioszintézis útvonal enzimeit, az ABC típusú efflux pumpa fehérjék, illetve az ezeket szabályzó transzkripciós faktorok egy közös rendszert alkotnak, az úgynevezett „pdr (pleiotropikus drog rezisztencia) hálózatot”. A rendszer komplex összetételére kiváló példa a *N. crassa* ADS-4 transzkripciós faktora, mely 6 különböző gén aktivitását szabályozza [3. ábra]. Ezen gének mind részt vesznek a gomba azollokkal szemben mutatott rezisztenciájának kialakításában: az *erg5* az ergoszterin bioszintézis egyik génje. A *cdr4* egy PDR típusú efflux pumpát, míg az *NcabCB* gén egy multidrog transzportert kódol. A *Ncmmt2* a gomba sejtek mitokondriumai vas felvételét szabályozó fehérje termelődéséért felelős. A *Ncrt2* pedig a kalcineurin által mediált azol rezisztenciában részt vevő lipidtranszportert kódoló gén (Wang és mtsai. 2015).



3.ábra A *N. crassa* ADS-4 es transzkripciós faktora, illetve az általa befolyásolt gének melyek részt vesznek az azol elleni rezisztencia kialakulásában (Wang és mtsai. 2015).

A „pdr hálózat” szabályozását több transzkripciós faktor közösen végzi, melynek egymással való interakcióikon keresztül képesek kifejteni, módosítani hatásukat. A PDR1-es és PDR3-as a legrégebben ismert ilyen transzkripciós faktorok (Katzmann mtsai. 1996), de újabb kutatások rámutattak, hogy ezen két fehérje hatása is további fehérjékhez kötött [4. ábra]. Ilyen az Ume6 mely a PDR3-al alkot komplexet így ρ^+ *S. cerevisiae* sejtekben represzorként de ρ^0 sejtekben aktivátorként hat a PDR5 efflux pumpa kifejeződésére (Yamada 2021, 2022).



4. ábra *S. cerevisiae*-ben található transzkripciós faktorok és azok hatása a PDR5 efflux pumpa transzkripciójára ρ^+ sejt (balra) ρ^0 sejt (jobbra) (Yamada 2022)

Fonolas gombáknál, *A. fumigatus*-ban, megfigyelték, hogy a FfmA (C_2H_2) illetve AtrR (C_6) transzkripciós faktorok szerepet játszanak az azolokkal szembeni rezisztenciában (Paul és mtsai. 2022; Haigwara és mtsai. 2017). A két fehérje regulációja alatt álló gének csoportjai nagy mértékben átfednek így lehetséges, hogy egy túltermeltetett AtrR képes elfedni a FfmA hiányában fellépő növekedés csökkenést is. Azonban a két faktor egymást képes gátolni mivel az egyik gén csendesítése a másik gén túlműködéséhez vezet (Paul és mtsai. 2023).

3 Célkitűzések

Mucormikózisos fertőzések esetén az antifungális terápiát nehezíti a Mucorales rendre jellemző nagyfokú rezisztencia a klinikumban használt antifungális szerekkel szemben, köztük azol vegyületekkel szemben is.

Kutatócsoportunk célja, hogy rávilágítson a járomspórás gombák antifungális szerekkel szembeni nagymértékű rezisztenciájának hátterére, ezen keresztül pedig - a folyamat kulcselemeinek azonosítását követően - elősegítse a mucormikózisban szenvedő betegek lehetséges kezelését.

A rezisztencia hátterében az úgynevezett „pdr hálózat” áll, amely magában foglalja a PDR transzport fehérjéket és az ergoszterin bioszintézis génjeit is. A rendszer mechanizmusait transzkripciós faktorok hangolják össze és koordinálják. Ezen fehérjéket már különböző fajokban azonosították, de *M. lusitanicus* azol rezisztenciájában szerepet játszó transzkripciós faktorokat ezidáig még nem vizsgálták

Mindezek alapján a kutatásaink során a következő célokat tűztük ki magunk elé:

Lehetséges transzkripciós faktorok azonosítását a *Mucor lusitanicus* genomjából:

in silico analízis és homológ keresés alapján olyan transzkripciós faktorok azonosítása a *M. lusitanicus*-ban, amelyek részt vehetnek az azol rezisztencia kialakításában.

Deléciós mutáns készítése:

Feltételezett transzkripciós faktor gének kiütése CRISPR-Cas9 rendszer felhasználásával.

A létrehozott mutánsok jellemzése:

Mutáns törzsekkel folytatott funkcionális vizsgálatok.

4 Anyagok és módszerek

4.1 A kutatás során felhasznált törzsek

Kísérleteink során *M. lusitanicus* (CBS 277.49 izolátum) *leuA* és *pyrG* kétszeres uracil, leucin auxotróf mutáns MS12 (SZMC12082) törzsét alkalmaztuk. Növekedési tesztek elvégzéséhez az MS12 (SZMC12082) *pyrG* -vel komplementált törzsét (MS12+*pyrG*) használtuk kontrol törzsként, mivel a *pyrG* komplementálja a növekedést befolyás uracil auxotrófiát. Az azol érzékenységi teszthez *Candida krusei* ATCC 6258 törzsét alkalmaztunk referencia törzsként.

4.2 Alkalmazott táptalajok, tápoldatok

4.2.1 Minimál táptalaj (YNB; Yeast Nitrogene Base) (pH4,5)

- 1% (m/V) D-glükóz
- 0,15% (m/V) (NH₄)₂SO₄
- 0,15% (m/V) Na-L-glutamát
- 0,05% (m/V) leucin és/vagy 0,05% (m/V) uracil
- 0,05% (m/V) YNB (Difco)
- szilárd táptalaj esetén: 2% (m/V) agar

PEG-mediált protoplaszt transzformáció során a protoplasztokat 0,8 M szorbitollal kiegészített és 1% agart tartalmazó YNB táptalajjal összekeverve (pH 4,2) öntöttük 0,8 M szorbitollal kiegészített és 2% agart tartalmazó YNB táptalajra.

4.2.2 Élesztő-glükóz táptalaj (YEG; Yeast Extract Glucose)

- 0,5% (m/V) élesztőkivonat
- 1% (m/V) glükóz
- 2% (m/V) agar

4.2.3 MEA (Malt extract agar) Maláta kivonatos táptalaj

- 1% (m/V) glükóz
- 0,5% (m/V) élesztő kivonat
- 2% (m/V) agar
- 1% (m/V) maláta kivonat

4.2.4 RPMI (Roswell Park Memorial Institute) tápoldat (pH 7)

1 L végtérfogatra vonatkoztatva: 3,4532 g MOPS (3-morfolino-propánszulfonsav); 1,04 g RPMI (Sigma Aldrich); 0,05% (m/V) uracil; 0,05% (m/V) leucin. A tápoldatot sterilizálás után 100ml-ként 1 ml L-glutaminnal (30mg/ml) egészítettük ki.

4.3 Tenyésztési körülmények

A kísérleteinkhez használt törzseket 25 °C-on neveltük 4 napig folyamatos megvilágítás mellett MEA és YNB táptalajokon.

4.4 Alkalmazott oldatok, pufferek és reagensek

4.4.1 DNS gélelektroforézishez használt anyagok

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

Agaróz gél: a fragmentum mérettől függően 0,8-2% agaróz TAE pufferben oldva

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

Mintapuffer: 6x DNS mintapuffer (Thermo Scientific)

Molekulasúly marker: 1 kb DNS marker (Thermo Scientific): steril desztillált víz

molekulasúly marker – 6x DNS mintapuffer 4:1:1 arányú keveréke

4.4.2 Protoplasztképzéshez 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

4.5 Indítószekvenciák

A PCR reakciókhoz több indítószekvenciát is terveztünk. Az indítószekvenciákat felhasználtuk a *tf106* és *tf821* gének kiütéséhez, teljes gének felszaporításához, transzformánsok ellenőrzéséhez, valamint a valós idejű PCR reakcióknál [Melléklet 1. táblázat].

4.6 Vizsgálati módszerek

4.6.1 Genomi DNS kivonása *M. lusitanicus*-ból és a mutáns törzsekből

A genomi DNS tisztításához ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep™ (Zymo

Research) kit-et használtuk fel, a gyártó utasításainak megfelelően.

4.6.2 DNS/RNS gélelektroforézis

A mintapuffer hozzáadása után anukleinsav minták elválasztását, DNS esetén 0,8%, RNS esetén pedig 2,0% agarózt tartalmazó gélen végeztük 80-100 V mellett 1-4 óráig.

Az agaróz gél készítéséhez, és futtatópuffernek is TAE puffert használtunk. A nukleinsavakat etídiüm-bromidos festéssel (0,5 µg/ml), UV fény alatt detektáltuk. A fragmentumok méretének meghatározásához 1 kb-os molekulasúly markert használtunk (Thermo Scientific).

4.6.3 DNS visszaizolálása agaróz gélből

A visszaizolálni kívánt DNS fragmentumokat tartalmazó gél részletet steril szikével UV lámpa alatt vágtuk ki a 0,8% agarózt tartalmazó gélből. A DNS-t a DNA Extraction Kit (Thermo Scientific) vagy a Zymoclean Large fragment DNA Recovery Kit (ZymoResearch) segítségével nyertük ki a gyártó utasításainak megfelelően.

4.6.4 Alkalmazott PCR technikák és reakciókörülmények

Kísérleteink során különböző PCR technikákat alkalmaztunk. A PCR reakciókat T3 Thermocycler (Biometra) készülékben végeztük a Melléklet 1. táblázatában bemutatott indítószekvenciák felhasználásával. A valós idejű qPCR kísérleteket CFX96 PCR detektálórendszerben (Bio-Rad) hajtottuk végre. A mérés elvégzésére a Maxima SYBR Green qPCR Master Mix-et (ThermoScientific) és a Melléklet 1. táblázatában bemutatott indítószekvenciákat használtuk fel.

4.6.5 A transzkripció faktor gének kiütéséhez felhasznált deléciós kazetták elkészítésének körülményei

A deléciós kazettákat PCR reakció során hoztuk létre. Ehhez a Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix-et (Thermo Scientific) használtuk, a gyártó utasításainak megfelelően. A kísérlet megkezdésekor elsőként felszaporítottuk a cél gének promóter és terminális szekvenciáit, valamint a szelekciós markerként szolgáló *pyrG* géneket azok saját promóter és terminális szekvenciáival együtt, génspecifikus indítószekvenciapárok segítségével [Melléklet 1. táblázat]. A *M. lusitanicus pyrG* génje az orotidin-5-foszfát-dekarboxilázt kódoló és az uracil auxotrófiát komplementáló gén (Iturriaga és mtsi. 1992). Az amplifikált fragmenteket 1:1:1 arányban vittük újabb PCR reakcióba és fuzionáltuk nested indítószekvenciákat felhasználva [Melléklet 1. táblázat]. Az így kapott fúziós termékeket használtuk fel a *tf106*, *tf821*-es gének kiütésére, és a gének HDR (Homology-Directed Repair: homológ rekombináción alapuló hibajavítás) általi genomba integrálására (Ran és mtsi. 2013).

4.6.6 A *tf106* és *tf821* gének amplifikálásához használt reakció és körülményei

A gének genomi DNS-ből történő és cDNS amplifikálásához Phusion High Fidelity DNS Polimerázt (Thermo Scientific) használtunk a gyártó ajánlásai szerint. A reakciókat 20 µl végtérfogatban mértük össze a következők szerint:

20-50 ng genomi DNS

0,5-0,5 µM specifikus primer (Melléklet 1. táblázat)

0,2 mM dNTP mix

1x Phusion HF puffer (1,5 mM MgCl₂-vel kiegészítve) 1 U Phusion DNA Polymerase Mix

4.6.7 Génamplifikálási körülményei *tf106*, és *tf821* esetén

98°C	10 sec	1 ciklus	elődenaturálás
98°C	1 sec	30 ciklus	denaturálás
60°C	5 min		primer kötődése
72°C	1 min		láncszintézis
72°C	1 min	1 ciklus	végző láncszintézis

4.6.8 A *tf106* és *tf821* gének deléciójára szolgáló gRNS szekvenciák elkészítése

A *tf 106* és *821*-es génekre specifikus gRNS szekvenciákat terveztünk. A protospacer szekvencia *tf106* esetén 5' AGCTGCTGTTGCCACGCATT 3', *tf821* esetén pedig 5' GAAACAGAGCACTACGACAA 3'. A génekre specifikus crRNS molekulákat és az tracrRNS molekulákat az Integrated DNA Technologies (IDT) cégtől vásároltuk meg. A crRNS - tracrRNS duplexek (gRNS-ek) kialakításához a gyártó utasításainak megfelelően a nukleázmentes duplex puffert (IDT) használtuk.

4.6.9 PEG-mediált protoplaszt transzformálás

4.6.9.1 Protoplasztképzés

Az MS12 törzs YNB táptalajon, 4-5 napon keresztül, fényben nevelt tenyészetéről steril desztillált vízzel lemostuk a sporangiospórákat, majd a tömény spórasuszpenzióból oltótűvel friss, celofánkoronggal fedett YEG táptalajra oltottunk. A tenyészetek nevelése 25 °C-on, 16 órán keresztül történt. A fiatal telepeket 16 óra elteltével protoplasztáló oldatba helyeztük, majd 3 órán át, szobahőmérsékleten, 50 rpm rázatással elősegítettük a képződő protoplasztok leválását. Protoplasztoló oldatként saját készítésű, éticsiga (*Helix pomatia*) gyomorból preparált lítikus emésztőenzimet használtunk. Az ezt követő lépésben a keletkezett protoplasztokat steril gézlapon keresztül szűrtük le, hogy eltávolítsuk a sejtfalmaradványokat

ezen a lépéshez a protoplasztokat SMC pufferben hígítottuk. A centrifugálással (2162 x g, 10 perc, 4 °C) összegyűjtött protoplasztokat 5 ml SMC pufferrel mostuk, majd újabb centrifugálás után 250 µl SMC pufferbe vettük fel.

4.6.9.2 A protoplasztok transzformációja

Az általunk alkalmazott módszer a van Heeswijk és Roncero (1984) által leírt PEG- mediált transzformáció módosítása. A 250 µl SMC pufferbe felvett protoplasztokhoz 5 µg fúziós PCR termékeket, a *tf106* és *tf821* génekre specifikus 10 µM gRNS-t (IDT), 10 µM Cas9 endonukleáz (IDT) és 20 µl PMC puffert adtunk, a protoplasztok és a transzformáló DNS összezapásával elősegítve a transzformációt. Ezután a mintákat fél órán keresztül jégen inkubáltuk. További 2,5 ml PMC puffer hozzáadása után mintákat 20 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk. A mintákat 20 ml SMC pufferrel hígítva centrifugáltuk. A protoplasztok regenerációjának elősegítéséhez a kiüledett sejtekhez szorbitolt tartalmazó YPG tápoldatot adtunk, majd fél órán át 25 °C-on inkubáltuk őket. Centrifugálás után SMC pufferrel mostuk a sejteket, majd a kiülepített sejteket kis mennyiségű (100-200 µl) SMC-ben szuszpendáltuk és szorbitollal kiegészített YNB fedőagarral összekeverve szorbitolt tartalmazó YNB csészékre öntöttük. A *Δtf106* és *Δtf821* mutánsokat *pyrG* szelekciós markerre szelektáltuk, ezért a táptalajokat leucinnal egészítettük ki. A csészéket 3 napig, a transzformáns telepek megjelenéséig fénytől elzárva szobahőmérsékleten inkubáltuk.

4.6.10 RNS izolálás *M. lusitanicus*-ból és a létrehozott mutáns törzsekből

RNS kivonást megelőzően a törzseket 25°C-on neveltük 4 napig, folyamatos megvilágítás mellett YNB táptalajon.

Az RNS izoláláshoz Direct-zol RNA Miniprep kitet (Zymo Research) használtunk a gyártó utasításainak megfelelően. Az RNS mintákat -80 °C-on tároltuk a felhasználásig.

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.

4.6.11 Valós idejű kvantitatív 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 végtérfogatban történt 96 lyukú lemezeken:

20-50 ng 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 min	1 ciklus	denaturálás
95°C	1 min	} 40 ciklus	denaturálás
60°C	0.5 min		primerkötődés
72°C	0.5 min		láncszintézis

4.6.12 Deléciós törzsek növekedési intenzitásának vizsgálata

10⁶ spóra/ml koncentrációjú spóra szuszpenzióból minimál táptalaj közepére cseppentettünk 10 µl-t (10⁴ spóra), és beszáradás után 25 °C-on inkubáltuk a csészéket. 4 napon keresztül naponta lemértük a telepátmérőket. Az eredményekhez 3 biológiai és minden esetben 2 technikai párhuzamos eredményeit használtuk fel.

4.6.13 Antifungális érzékenységi tesztek

A gombatörzsek antifungális szerekkel szembeni érzékenységét mikrodilúciós tesztel végeztük 96 lyukú lemezen, a CLSI ajánlása (CLSI. 2008) szerint három biológiai ismételtsben és kettő technikai párhuzamos alkalmazásával. A vizsgálat során használt ketokonazol (Alfa Aesar), itrakonazol (Across Organics), flukonazol (Alfa Aesar), posakonazol (Sigma Aldrich), izavukonazol (Sigma Aldrich), amfotericin B-t DMSO-ban oldunk. A ketokonazol, itrakonazol, flukonazol, izavukonazol, posakonazol és amfotericin-B végső koncentrációja a lemezen 0,125 és 16 µg/ml között volt. Az azolokat és amfotericin-B-t folyékony RPMI-1640 tápközzeggel hígítottuk. Az érzékenységi tesztben használt törzseket 48 órán át 25 °C -on neveltük. A kísérleteket 10⁵/ml végkoncentrációjú spóra számmal végeztük.

4.7 Statisztikai módszerek

A kísérletek statisztikai analízisét a GraphPad Prism v 8.0 szoftverrel és Microsoft Excel program segítségével végeztük, a kísérlet típusától függően párosított vagy párosítatlan t-tesztet alkalmaztunk. Statisztikailag szignifikáns eltérést abban az esetben állapítottunk meg, ha $p < 0,05$ volt.

4.8 *in silico* elemzés

A fehérjék tömegének megbecsüléséhez (APA AAT Bioquest, Inc. (2023, november 21). Quest Calculate™ Peptide and Protein Molecular Weight Calculator. AAT Bioquest. <https://www.aatbio.com/tools/calculate-peptide-and-protein-molecular-weight-mw.>) vagy BioEdit 7.2.5 programokat használtunk. Aminosav motívumok illesztését BioEdit 7.2.5 programmal végeztük.

A homológ kereséseket BLAST-val végeztük aminosav szekvencia alapján. A BLAST-olást Mucor adatbázisban (<https://mycocosm.jgi.doe.gov/mycocosm/home>) végeztük, amelyhez a templát aminosav szekvenciákat a *Candida* genome database (<http://www.candidagenome.org/>) *Sacharomyces* genome database (<https://www.yeastgenome.org/>) illetve a (<https://fungidb.org/fungidb/app>) adatbázisok szolgáltatták. Az ábrák elkészítéséhez a <https://www.biorender.com> internetes oldalt használtunk.

5 Eredmények és értékelésük

5.1 Feltételezett transzkripciós faktor kódoló gének azonosítása *M. lusitanicus*-ban

Laborunkban korábban posakonazol, flukonazol és vorikonazol kezelést követően, RNAseq analízist hajtottak végre. A transzkriptomikai eredmények azt mutatták, hogy több feltételezhetően transzkripciós faktort kódoló gén aktivitásában is történt változás.

Ezen feltételezett transzkripciós faktor gének közül kiválogattuk azokat, melyek a *Mucor* genom adatbázis (<https://mycocosm.jgi.doe.gov/Mucci2/Mucci2.home.html>) szerint olyan fehérjéket kódolnak, amik tartalmazzák Zn(II)₂Cys₆ és/vagy 'gomba specifikus transzkripciós faktor domén'.

Ezt követően aminosav alapú homológ keresést végeztünk olyan transzkripciós faktorokra más organizmusokban, melyek szerepet játszhatnak a gombák azol-rezisztenciájában. A keresés eredményeiből homológia alapján 9 gént választottunk ki további munkánkhoz (**1. Táblázat**).

[1. Táblázat]. A *M. lusitanicus*-ban azonosított feltételezett transzkripciós faktorokat kódoló gének neve, illetve protein azonosítója

Gén név	Protein ID
<i>tf106</i>	106505
<i>tf107</i>	107112
<i>tf113</i>	113662
<i>tf115</i>	115362
<i>tf124</i>	124727
<i>tf182</i>	182712
<i>tf183</i>	183761
<i>tf821</i>	82118
<i>tf922</i>	92262

A TF106, TF113, TF183, TF922-es faktorban mind a cink cisztein klaszter domén, mind pedig a 'gomba specifikus transzkripciós faktor domén' megtalálható. A *tf107*, *tf182* és *tf821*-es gének csak a Zn(II)₂Cys₆ domént, míg a *tf124* gén csak 'gomba specifikus transzkripciós

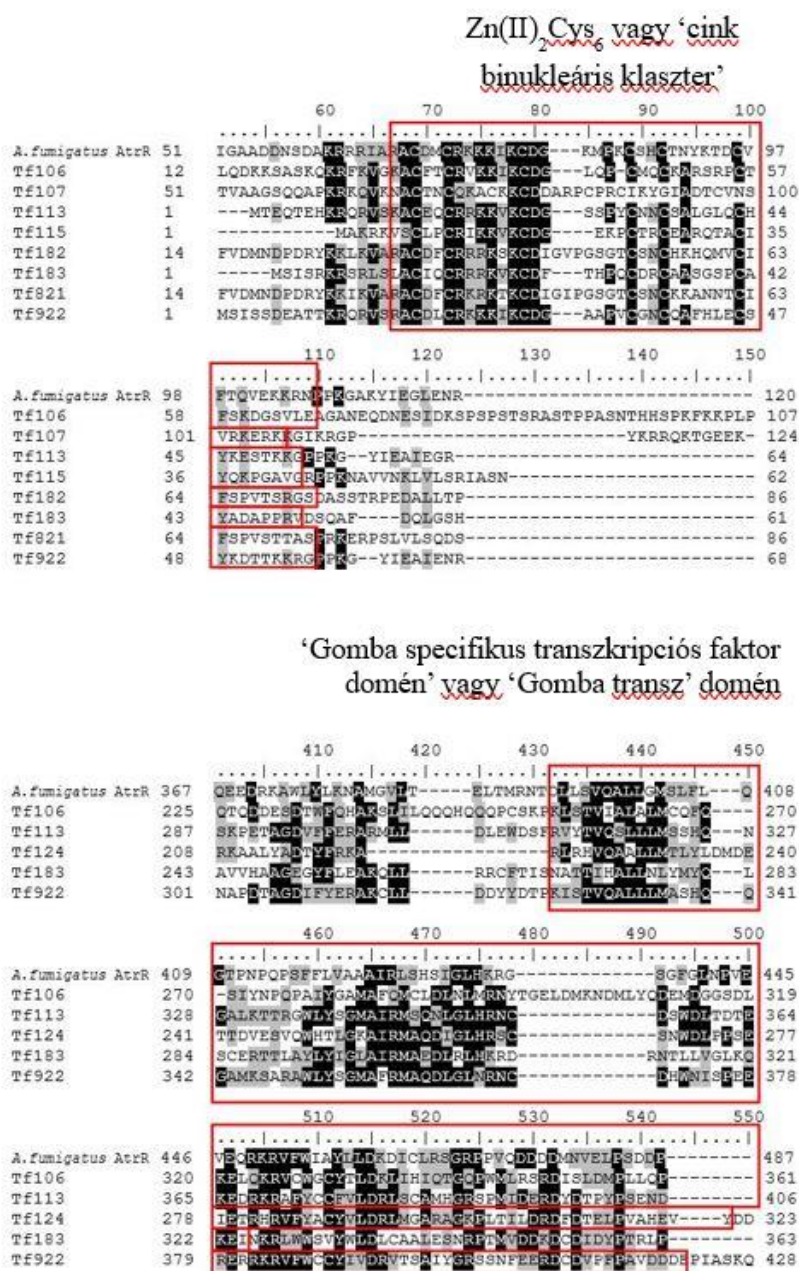
faktor domént' kódolja. Az általunk vizsgálni kívánt gének által kódolt fehérjék közül homológ keresés során a legtöbb hasonlóságot a TF106 faktor mutatott az *A. fumigatus* AtrR-rel (Hagiwara és mtsai. 2017), 40,5%-ot, valamint a *S. cerevisiae* ASG1-gyel (Coste és mtsai. 2008) 52,9%-ot, míg a TF821 faktor az *A. fumigatus* AtrR-rel (Hagiwara és mtsai. 2017) 41,3%-ot és *C. glabrata* Hal9p transzkripciós faktorról (Wu és mtsai. 2015) 56,1% -ot, amely egy *Candida albicans* Tac1 ortológ (Coste és mtsai. 2004) **(2. Táblázat).**

[2. Táblázat]. A *M. lusitanicus*-ban prediktált transzkripciós fehérjék homológiája más organizmusokban azonosított transzkripciós faktorokkal (%). A táblázatba külön mutatjuk be azokat a fehérjéket, melyek a PF04082 – gomba specifikus domént és/vagy csak a PF00172 – cink cisztein binukleáris klaszter domént tartalmazzák. C. – *Candida*, S. – *Saccharomyces*, A. – *Aspergillus*, N. – *Neurospora*, Cr. – *Cryptococcus*

Név		homológia más fajokban (%)				
PF00172 és PF04082 domént is tartalmaz						
TF106	<i>C.albicans</i> Asg1 (52,9%)	<i>A. fumigatus</i> AtrR (40,5%)	<i>S. cerevisiae</i> Asg1 (35%)	<i>C. albicans</i> Ctf1 – 30,1 %	<i>A. fumigatus</i> Mdu2 (30,1%)	<i>A. fumigatus</i> Mdd5 (30,1%)
TF113	<i>C. auris</i> Tac1a (43,6%)	<i>C. albicans</i> Mrr1p (39,7%)	<i>A. fumigatus</i> Mdu1 (40%)	<i>A. oryzae</i> AtrR (35,7%)	<i>A. fumigatus</i> AtrR (35,4%)	
TF124	<i>N. crassa</i> Ads1 (39.2%)	<i>A. fumigatus</i> AtrR (35%)				
TF183	<i>A. fumigatus</i> Mdu1 (31.2%)	<i>S. cerevisiae</i> Asg1 (31,1%)	<i>A. fumigatus</i> AtrR (27,2%)			
TF922	<i>C. albicans</i> Tac1 (42,1%)	<i>C. auris</i> Tac1a (41,6%)	<i>C. dubiniensis</i> Cd36_51710 (42,1%)			
csak PF00172 domént tartalmaz						
TF107	<i>Cr. neoformans</i> Ert1 (55,6%)	<i>C. albicans</i> Mrr1p (46,3%)	<i>C. dubliniensis</i> Mrr1p (35,2%)			
TF115	<i>S. cerevisiae</i> Asg1 (51,5%)					
TF182	<i>A. fumigatus</i> AtrR (39.3%)	<i>C. glabrata</i> Hal9 (31,6%)				
TF821	<i>C. albicans</i> Hal9p (56,1%)	<i>A. fumigatus</i> AtrR (41,3)				

Kiválasztott fehérjéink cink cisztein binukleáris klaszter, illetve 'gomba specifikus transzkripciós faktor domén' szekvenciáit összevetettük az *A. fumigatus* AtrR fehérjéjével [4. ábra], mivel ezen domének aminosav sorrendje igen konzervált, tovább erősítve azt az

elképzelésünket, hogy a proteinek feltételezhetően részt vesznek a „pdr hálózat” génjeinek regulációjában.



[4.ábra] Cink binukleáris klaszter, illetve a ‘gomba specifikus transzkripció faktor’ domének aminosav szekvenciái a feltételezett transzkripció faktorokban *A. fumigatus* AtrR fehérjéjéhez viszonyítva. Piros négyzetben található az adott domén szekvenciája, feketével jelölve azon aminosavak melyek megegyeznek, szürkével pedig amelyek hasonló karakterisztikával rendelkeznek, mint az AtrR azonos helyen álló aminosavai.

Összehasonlítva a transzkripció faktorok aminosav szekvenciáit a legnagyobb hasonlóságot a TF182 és TF821 mutatta, 76.4%-ot. A TF113 54.3%-os hasonlóságot mutatott a TF922-el, 53.7%-os hasonlóságot a TF183-al, valamint 48.6%-os homológiát TF124-el. TF106 50% homológiát mutat a TF115-el, a TF183 47.5%-os TF124 pedig 42,3%-os hasonlóságot mutatott a TF922-vel.

5.1.1 A TF106, illetve TF821 fehérjék *in silico* jellemzése

További munkánkhoz homológiai adatok alapján [2. Táblázat] a *tf106* és *tf821* géneket választottuk ki. A 3. táblázatba találhatóak a két kiválasztott fehérje legfontosabb tulajdonságai.

[3. Táblázat] TF106 és TF821-es fehérjék alapvető szerkezeti felépítése, illetve fontosabb régióinak elhelyezkedés

	TF106	TF821
Hossz (aminosav)	923 a.s	793 a.s
Becsült molekulatömeg	103.26079 kDa	89.55675 kDa
prediktált transzmembrán domének száma	0	0
Gal4 régió	25-46 a.s. KVGKACFTCRVKKIKCDGLQ PC	27-65 a.s. KVARACDFCRKRKTKCDIGI PGSGTCSNCKKANNTCIFS
cinkujj szekvencia	21-60 a.s. QKRFKVKGACFTCRVKKIK D GLQPCMQCKARSRPCTFSK	30-72 a.s. RACDFCRKRKTKCDIGIPGS GTC SNCKKANNTCIFSPVSTTAS
Ciszteinek pozíciója	30, 33, 40, 46, 49, 56 C C C C C C	32, 35, 42, 52, 55, 62 C C C C C C
DNS kötő oldal	25, 29, 34...37, 39, 42 K, A, RVKK, K, G	27, 31, 36...39, 41, 44, K, A, RKRK, K, I,
Középső homológ régió	165-568 a.s.	156-479 a.s.
'gomba specifikus transzkripció faktor' domén'	256-361 a.s. KLSTVIALALMCQFQSIYNPQ PAIYGAMAFQMC LDLNLMRNYTGELDMKNDM LYQ DEMDGGSDLKELQKRVCWG CYTLDKLIH IQTGQPWMLRSRDISLDMPLL QP	nincs

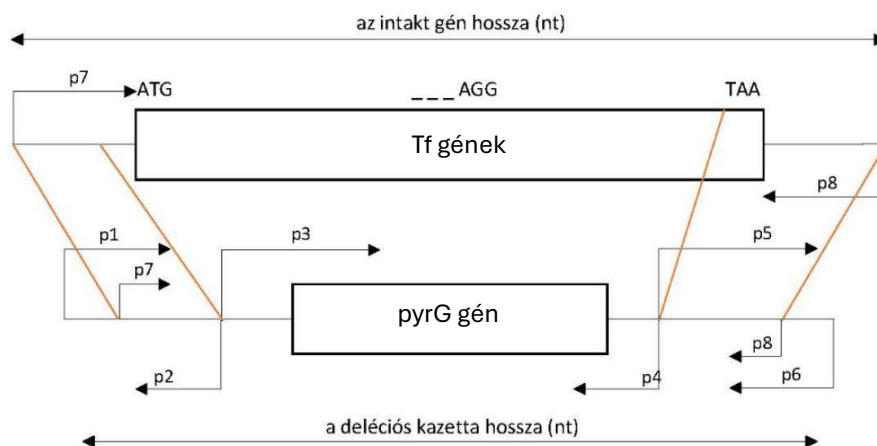
A *tf106* gén által kódolt fehérjében megtalálható mindkét, szakirodalom alapján fontos domén (cink binukleáris klaszter és a 'gomba specifikus transzkripció faktor domén'), illetve homológiát mutat az *A. fumigatus* AtrR és fehérjével. A génben 2 intron helyezkedik el. A *tf821* gén bár nem kódolja a 'gomba specifikus faktor domén'-t, de a prediktált fehérje homológiát mutat az *A. fumigatus* AtrR és a *C. glabrata* Hal9 fehérjével, mely utóbbi ortológja a *C. albicans* Tac1 transzkripció faktorának.

A TF106 protein 923 aminosav hosszúságú. A fehérje családra jellemző Gal4 régió 25-46 as.-ig terjed, mely átfed a fehérje cink ujj szekvenciájával, mely a 21-60 as. között helyezkedik el. Ez megegyezik a szakirodalomban leírtakkal, miszerint a cink ujj szekvencia a fehérje N-terminálison helyezkedik el, illetve a 6 cink kötésért felelős cisztein is az előre feltételezett formációban CysX₂CysX₆CysX₅₋₁₂CysX₂CysX₆₋₈Cys (MacPherson és mtsai. 2006), jelen esetben 30., 33., 40., 46., 49., 56. aminosavak helyén található. A 'középső homológ régió' 165-568 as között található és itt helyezkedik el a 'gomba specifikus transzkripció faktor domén', amelyet a 256-361 a.s.-tól terjedő szakasz alkot.

A TF82 protein kisebb méretű, mint a TF106, 793 aminosav hosszú és becsült molekula tömege 89.55675 kDa. Domének tekintetében a Gal4 régió és a cink ujj szekvencia is az N-terminális közelében helyezkednek el átfedésben, előbbi 27-65 as utóbbi pedig 31-72 as között helyezkedik el. A cink ion kötő cisztein aminosavak az előzetes predikciónknak megfelelően a 32., 35., 42., 52., 55., 62. pozícióban helyezkednek el. A fehérje középső homológ régiója 156-479 aminosavak között található meg [3. Táblázat].

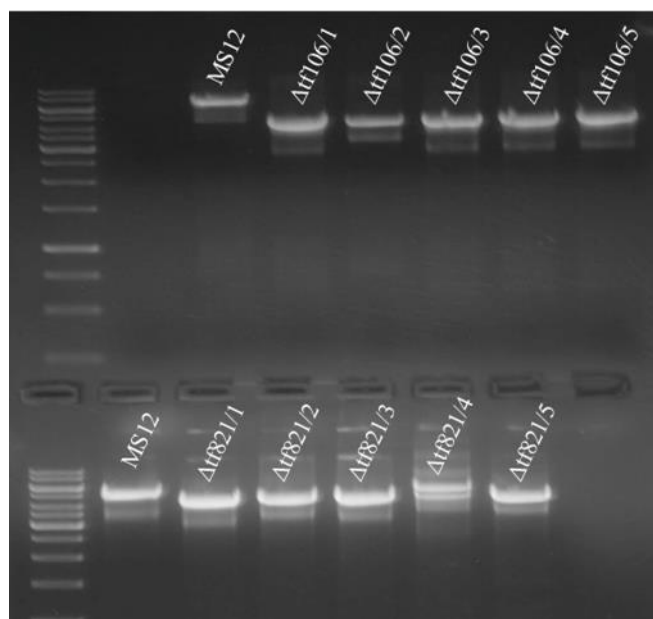
5.2 *Mucor lusitanicus* *tf106* és *tf821* génjeinek kiütése homológ rekombináció segítségével

Kísérleteink során a *M. lusitanicus* MS12 protoplasztjait transzformáltuk a kiválasztott *tf106* és *tf821* génekre specifikus gRNS szekvenciával, templát DNS-el és a Cas9 endonukleázzal. A homológ rekombináció számára templát DNS-ként szolgáló deléciós kazettákat PCR segítségével állítottuk elő [5. ábra]. A transzformáció hatékonysága $\Delta tf106$ deléciós törzs esetén 6 telep/ 10^5 protoplaszt, míg a $\Delta tf821$ mutáns törzs esetén pedig 14 telep/ 10^5 protoplaszt volt. A transzformáció sikerességét PCR-el [6. ábra] valamint RT-qPCR-vel végeztük el. A transzformációs kísérletből két-két izolátumot ($\Delta tf106/2$, illetve $\Delta tf106/4$, míg és $\Delta tf821/2$ és $\Delta tf821/5$) választottunk ki további kísérleteinkhez.



5. ábra. A templatként szolgáló deléciós kazetták sematikus ábrája a cél gének kiütéséhez. A pari szekvenciák kezdetét az AGG jelöli. A nyilak az indítószekvenciák orientációját mutatják. A *tf* gének kiütéséhez a három fragmentumot (promóter, *pyrG*, terminális) nested indítószekvenciák [Melléklet

1.táblázat] segítségével kapcsoltuk össze. Szelekciós markerként a *pyrG* orotidin-5-foszfát-dekarboxilázt kódoló gén szolgált.

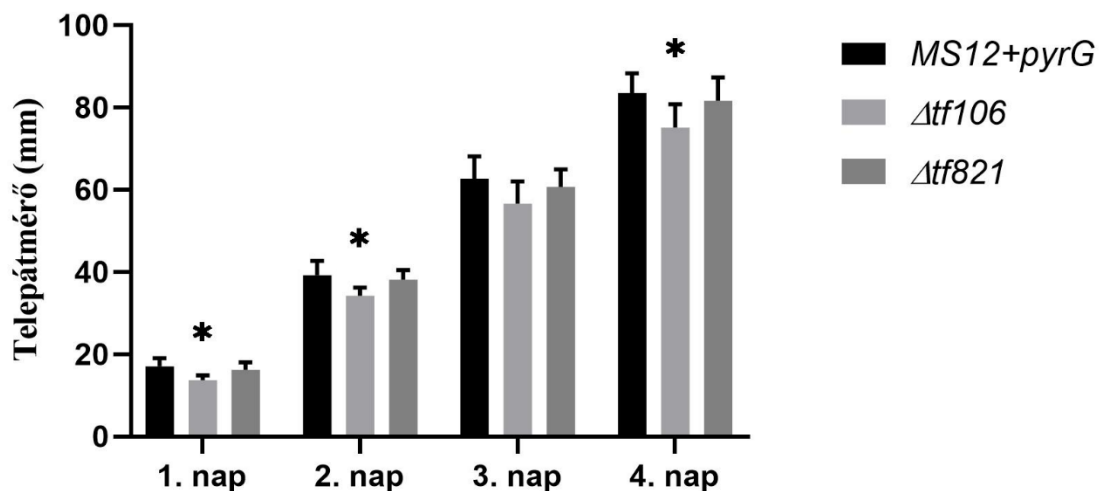


6.ábra Az MS12 szülői törzsben megtalálható eredeti gén és a transzformálás után létrehozott feltételezett mutánsok törzsek gélelektroforézises képe. MS12-ben az eredeti gén hossza *tf106* esetén 7259 bázispár míg a deléciós törzsek esetén a *pyrG* szelekciós markergént hordozó deléciós kazetta beépülése után 4390 bázispár hosszú lett a felszaporított termék. A *tf821* gén és esetében az eredeti gén hossza 5612 bázispár míg a *pyrG* szelekciós markergént hordozó deléciós kazetta beépülése után a mutánsokban felszaporított szakasz 4643 bázispár.

5.3 Deléciós törzsek növekedési intenzitásának vizsgálata

Kísérlet során a deléciós törzseink növekedési intenzitását vetettük össze kontroll MS12+*pyrG* törzséhez képest. A Δ *trf106*-os törzs esetén négy napon keresztül szignifikáns

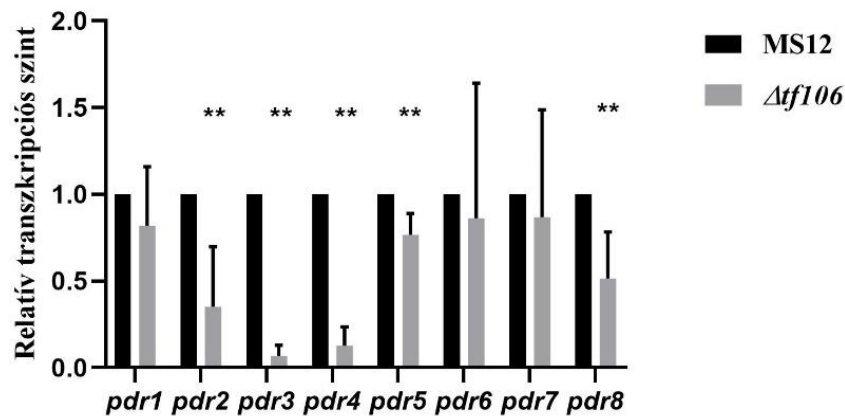
csökkenését tapasztaltuk kontroll törzshöz képest. A *Δtf821*-es törzs nem mutatott szignifikáns változást a növekedés intenzitásában [7. ábra].



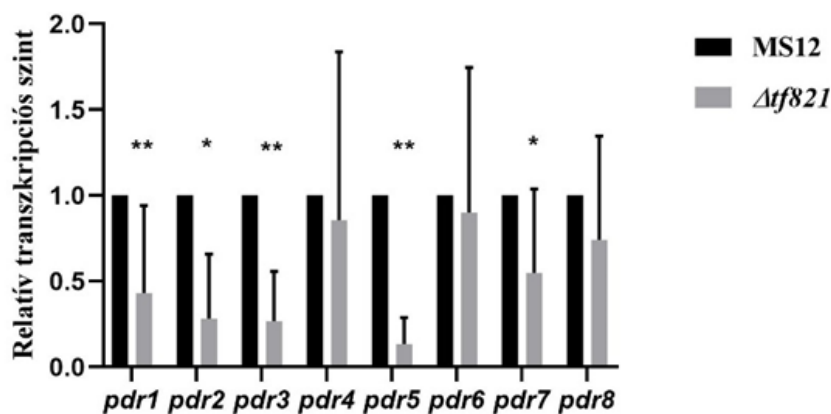
7.ábra *Δtf106* deléciós mutáns növekedési intenzitása YNB tátalajon 25 C°-on. A diagramon három egymástól független mérés eredményeinek átlagértékeit tüntettük fel szórással együtt. Az *-gal és jelölt értékek szignifikánsan eltérnek a kontroll törzs (MS12+ *pyrG*) megfelelő értékétől (* $p < 0.05$)

5.4 Mutáns törzsek *pdr* génjeiben tapasztalt transzkripciós változások

Kísérletünk során rt-qPCR segítségével vizsgáltuk a *pdr* gének transzkripciós szintjének kifejeződését a deléciós törzseinkben. A *Δtf106*-os törzsben a *pdr2*; *pdr3*; *pdr4*; *pdr5* és *pdr8*-as gének transzkripciójában szignifikáns csökkenést tapasztaltunk [9. ábra]. *Δtf821*-es törzs esetén pedig a *pdr1*; *pdr2*; *pdr3*; *pdr5* és *pdr7*-es gének alulműködését tapasztaltuk [10. ábra]. A *pdr2* és *pdr3* és *pdr5* gének kifejeződését mindkét feltételezett transzkripciós faktor hiánya szignifikánsan csökkenti. A *pdr2* gén esetében hasonló mértékű csökkenést tapasztaltunk mindkét mutáns törzsünk esetén. A *pdr3* génről elmondható, hogy TF106-os fehérje hiánya szinte teljesen megszüntette a gén aktivitását. A *pdr5*-nél pedig a *tf821* gén hiánya okoz nagyobb mértékű csökkenést a gén transzkripciós szintjében a *Δtf106*-os törzshöz képest. Mind a TF106 és TF821 esetében feltételezhető, hogy a transzkripciós faktorok pozitív regulátorként vannak jelen, mivel hiányuk az egyes *pdr* gének kifejeződésének csökkenéséhez vezet.



9.ábra $\Delta tf106$ deléciós mutáns *pdr* génjeinek kifejeződése. A diagramon három egymástól független mérés eredményeinek átlagértékeit tüntettük fel szórással együtt. A *-gal jelölt értékek szignifikánsan eltérnek a kontrol törzsben (MS12) mért értéktől, melyet 1-nek vettünk (** $p < 0.01$)



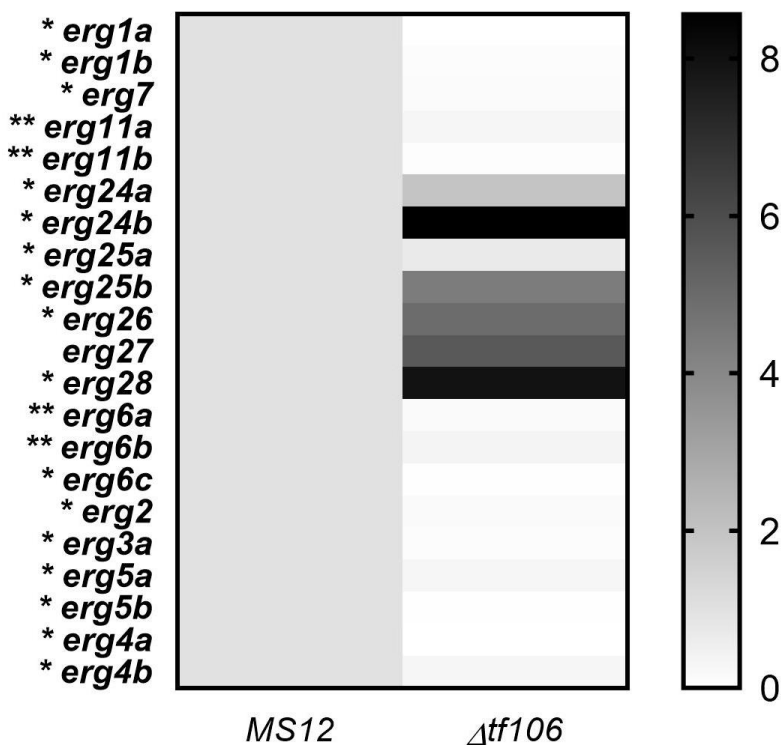
10.ábra $\Delta tf821$ deléciós mutáns *pdr* génjeinek kifejeződése. A diagramon három egymástól független mérés eredményeinek átlagértékeit tüntettük fel szórással együtt. Az *-gal és ** -gal jelölt értékek szignifikánsan eltérnek a kontrol törzsben (MS12) mért értéktől, melyet 1-nek vettünk (* $p < 0.05$) (** $p < 0.01$).

5.5 A mutáns törzsek ergoszterin bioszintézis génjeiben tapasztalt transzkripciós változások

Kísérleteink során szintén vizsgáltuk, hogy a *tf106* és *tf821* gének hiánya hogyan befolyásolja az ergoszterin bioszintézis útvonal génjeinek kifejeződését. Mind a $\Delta tf106$ mind a $\Delta tf821$ törzsben megfigyeltük, hogy a bioszintézis útvonal kezdeti szakaszát képző gének (*erg1a*; *erg1b*; *erg11a*; *erg11b*) transzkripciós szintje szignifikánsan csökkent míg a folyamatban az intermedierek átalakításáért felelős enzimeket kódoló géneké (*erg24a*; *erg24b*; *erg25b*; *erg26*; és az *erg28*) megnövekedett [11. ábra] [12. ábra]. Ezen kettőséget

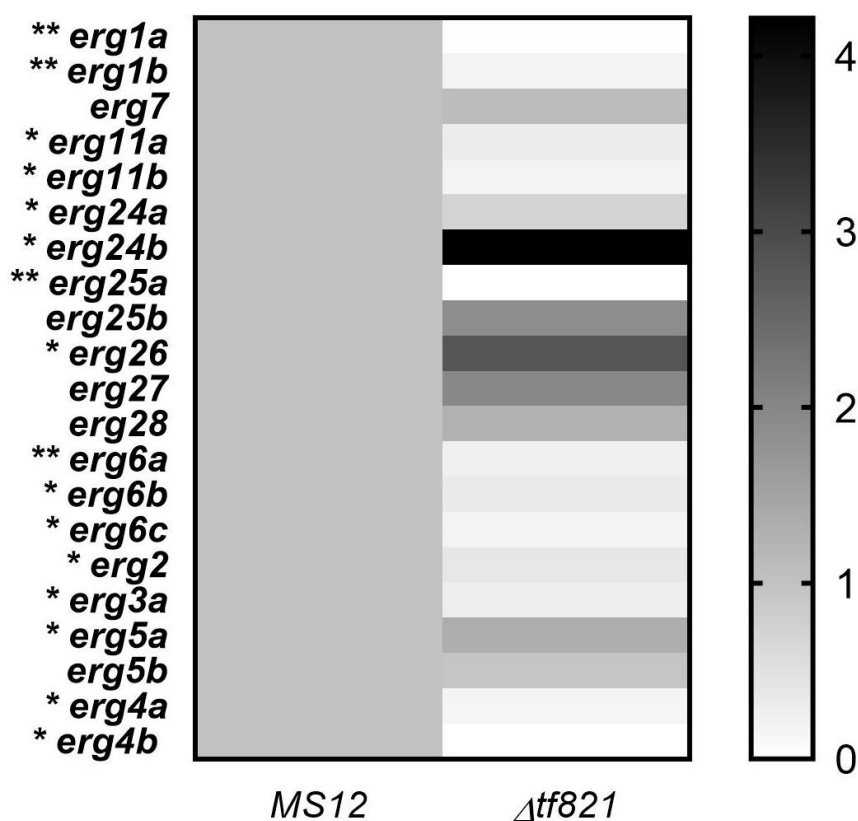
magyarázhatja, hogy a gomba sejt próbálja kompenzálni a folyamat elején fellépő szubsztrát hiányt a folyamat végén található enzimek túltermelésével. A két törzsünk összehasonlításakor megállapítható, hogy a *tf106* gén deléciója nagyobb mértékű negatív hatást gyakorolt az *erg* gének kifejeződésére. A legnagyobb transzkripciós szintbeli változást mindkét mutánsnál az *erg1a*-nál tapasztaltuk, mivel e gén működése szinte teljesen megszűnt.

A *tf106*-os gén hiánya legjobban az *erg11b*, *erg6c*, *erg3a*, és *erg4a* génekre hatott, mivel a mutáns törzsben a vizsgálat során ezen gének transzkripciós szintje csökkent a legnagyobb mértékben, továbbá az *erg1-erg7* gének kifejeződése is alacsonyabb, mint a kontroll törzsnél. Ezzel szemben az *erg24* *erg25a* *erg26* és *erg28* gének transzkripciós szintje szignifikánsan megnövekedett. Fontos megállapítani, hogy a $\Delta tf106$ mutánsban az *erg11a* és *erg6b* gének transzkripciós szintje is relatívan magas maradt a többi vizsgált *erg* génhez viszonyítva, mely jelzi ezen gének fontosságát az azol rezisztenciában, így feltételezhetjük, hogy a *M. lusitanicus* azolokkal szembeni rezisztenciáját több, egyszerre ható transzkripcios faktor fehérje alakítja ki, melyek egy közös regulációs rendszert hoznak létre.



11.ábra Heatmap a $\Delta tf106$ deléciós mutáns ergoszterin bioszintézisben enzimeit kódoló gének (*erg1-erg28*) transzkripciós szintjének változásáról a kontroll MS12 törzshöz viszonyítva. Az eredmények három egymástól független mérés eredményeinek átlagértékeiből lett számolva. Az *-gal és **-gal jelölt értékek szignifikánsan eltérnek a kontroll törzsben (MS12) mért értéktől (* $p < 0.05$) (** $p < 0.01$).

A $\Delta tf821$ törzsekben a *erg11a* és *erg6b* gének kifejeződésének csökkenése hasonló mértékű, mint a $\Delta tf106$ -nél. A TF821 hiányában az *erg1a* és *erg25b* gének aktivitása megszűnik. A *tf821* gén deléciója eltérő hatást gyakorol az ergoszterin bioszintézis útvonal további elemeinek transzkripció szintjére. Az *erg 1-4* gének esetén szignifikáns csökkenést, míg az *erg24* és *erg26* géneknél szignifikáns növekedést figyeltünk meg. Kapott eredményeinkből valószínűsíthető, hogy a TF106 és TF821 fehérje koregulátorként, áttételesen befolyásolja az ergoszterin bioszintézis útvonalat, illetve lehetséges, hogy csak a folyamat egyes szakaszain fejtenek ki szabályozást.



12.ábra Heatmap $\Delta Tf821$ deléciós mutáns ergoszterin bioszintézisben enzimeit kódoló gének (*erg1-erg28*) génjei transzkripció szintjének változásáról a kontroll MS12 törzshöz viszonyítva. Az eredmények három egymástól független mérés eredményeinek átlagértékeiből lett számolva. Az *-gal és **-gal jelölt értékek szignifikánsan eltérnek a kontroll törzsben (MS12) mért értéktől (* $p < 0.05$) (** $p < 0.01$).

5.6 A létrehozott deléciós mutáns izolátumok antifungális érzékenysége

Az érzékenységi teszt során 5 különböző azolra illetve amfotericin-B-re vizsgáltuk a $\Delta tf106$ és $\Delta tf821$ deléciós törzsek érzékenységét. Ketakonazol, flukonazol, itrakonazol esetén nem találtunk változást egyik deléciós mutáns esetében sem a kontroll MS12 törzshöz képest [4. Táblázat].

4. táblázat A létrehozott deléciós mutáns törzsek érzékenységének vizsgálata különböző antifungális szerekkel szemben

	MIC (µg/ml)					
Törzs/Azol	ketokonazol	itrakonaol	flukonazol	posakonazol	izavukonazol	amfotericin B
MS12	>64	>64	>64	4	>16	2
$\Delta tf106/2$	>64	>64	>64	1	8 (MIC90)	0.5
$\Delta tf106/4$	>64	>64	>64	2	4 (MIC50)	0.5
$\Delta tf821/2$	>64	>64	>64	>16	>16	1
$\Delta tf821/5$	>64	>64	>64	>16	>16	1

A $\Delta tf106$ törzsben növekedett a posakonazol és izavukonazol érzékenység, Posakonazol esetében 1 µg/ml míg izavukonazol esetében 4 µg/ml koncentrációnál tapasztaltunk legalább MIC50-es gátlást. Ezen eredményünk összhangban van a qPCR-rel végzett kísérleteinkben tett megfigyelésekkel, miszerint a *tf106* gén kiütésével csökken az *erg11/cyp51* transzkripciója, ami elsődleges célpontja az azolok hatásmechanizmusának, így kisebb koncentráció is elég a gombák növekedésének gátlására. A $\Delta tf106$ deléciós törzsben az amfotericin B esetén az MIC érték 0,5 µg/ml-re csökkent. Ez az eredmény arra utal, hogy bár az ergoszterin bioszintézis gének kifejeződése lecsökken, a *M. lusitanicus* alternatív útvonalakon képes lehet ergoszterinhez hasonló molekulákat előállítani, így biztosítva a célmolekulát az amfotericin B-nek. Jelen megfigyelésünket kutatócsoportunk korábbi eredményei is alátámasztják, miszerint a *M. lusitanicus* több alternatív útvonallal is rendelkezik az ergoszterin bioszintézisben (Bauer és mtsai. 2023).

A $\Delta tf821$ törzsben izavukonazol esetében nem tapasztaltunk változást. Érdekes módon posakonazzal szemben a MIC érték növekedését tapasztaltunk: 4 µg/ml-ről 16 µg/ml fölé nőtt a gátláshoz szükséges koncentráció, ami arra enged következtetni, hogy a TF821 fehérje befolyásolhat általunk még nem vizsgált géneket is melyeknek szerepe lehet az azol rezisztencia kialakításában. A $\Delta tf821$ törzs amfotericin B MIC értéke viszont csökkent 2 µg/ml-ről 1 µg/ml-re melyet - hasonlóan a $\Delta tf106$ -os törzshöz - okozhat a *M. lusitanicus* ergoszterin bioszintézis alternatív útvonalainak működése is (Bauer és mtsai. 2023), habár ebben az esetben az érzékenység növekedése kisebb mértékű.

6 Diszkuszió

A laborunkban korábban elvégzett RNAseq analízis eredményeinek értékelését követően 9 feltételezett transzkripciós faktort kódoló gént azonosítottunk, melyek kifejeződése megváltozott az azol kezelés hatására. Homológia keresést követően két olyan gén választottunk ki a további vizsgálatainkhoz, melyek cink-cisztein domént és/vagy gomba specifikus transzkripciós faktor domént hordoznak, illetve nagyfokú hasonlóságot mutatnak az *Aspergillus* AtrR transzkripciós faktorról. *Aspergillus*-ban az AtrR befolyásolja a gomba azollokkal szembeni rezisztenciáját, mivel közvetlen szabályozója mind a *cdr1B* ABC efflux pumpának és *cyp51/erg11* ergoszterin bioszintézis génnek is, így részt vesz a pleiotropikus drog rezisztencia rendszerben (Haigwara és mtsai. 2017). Így a válassztásunk a *tf106* és *tf821* feltételezett transzkripciós faktort kódoló génekre esett.

Növekedési intenzitás vizsgálat során csak a $\Delta tf106$ törzs esetében kaptunk szignifikáns növekedés csökkenést, a $\Delta tf821$ -es törzsnél nem. Az eltérést a két mutáns között az okozhatja, hogy a TF821 kevésbé befolyásolja az ergoszterin bioszintézis útvonalat mint a TF106-os, ezzel szemben erősebb reguláció figyelhető meg a *pdr3* és *pdr5* gének esetében. Ezen eredményünket támasztja alá kutatócsoportunk korábbi vizsgálatai is, miszerint a *pdr3* és *pdr5* gének deléciója nem befolyásolta a növekedés intenzitását. A $\Delta tf106$ törzs esetében mért adataink is megegyeznek kutatócsoportunk azon megfigyeléseivel, hogy mind *pdr* (MS12- $\Delta pdr1$, MS12- $\Delta pdr2$ és MS12- $\Delta pdr6$) mind *erg* (MS12- $\Delta erg6b$ és MS12- $\Delta erg6c$) gének deléciójával a mutáns törzsek növekedési intenzitása szignifikánsan csökken a kontroll törzsekhez képest, de itt is megfigyelhető, hogy nem minden *erg* és *pdr* gén eltávolításával kaptunk szignifikáns változást (Nagy és mtsai. 2021; Bauer és mtsai. 2023). A két mutáns törzsre kapott eltérő eredmény megegyezik a szakirodalomban leírtakkal. Vannak olyan $Zn(II)_2Cys_6$ transzkripciós faktorok, melyek funkciójának kiesése negatív hatást gyakorol a mutánsok növekedésének ütemére, mint az *A. fumigatus*-ban az AtrR (Yap és mtsai. 2023) és HapB, HapC és HapE (Gsaller és mtsai. 2016). Ezzel szemben megfigyelték, hogy nem minden transzkripciós faktor befolyásolja a növekedési intenzitást ilyen fehérje például a *N. crassa* ADS-1 (Yin és mtsai. 2021), illetve ADS-4-es (Wang és mtsai. 2015).

Eredményeinket összehasonlítva szakirodalmi adatokkal megállapíthatjuk, hogy az általunk vizsgált transzkripciós faktorok, ha eltérő mértékben is, de szerepet játszanak mind a PDR efflux pumpák, mind az ergoszterin bioszintézis enzimek termelődéséért, így részt vesznek az antifungális szerek elleni rezisztencia rendszerben. A C_6 család egyes tagjait melyek részt vesznek az azol rezisztenciában szinte már minden fontos humánpatogén gombában

azonosították, úgymint *C. auris*-ban az Upc2-t, mely az *erg11/cyp51* gén transzkripcióját befolyásolja ezen felül ez a transzkripciós faktor felelős a Mrr1(transzkripciós faktor) /Mdr1(Mfs transzporter) útvonal aktiválódásért. Upc2 túltermelés esetén TAC1 transzkripciós faktorok mennyisége is jelentősen emelkedett, mely a Cdr1 pdr efflux pumpa kifejeződésért felelős, tehát az Upc2 nem csak az ergosterin bioszintézist, hanem a pdr pumpák transzkripcióját is egyszerre kordinálja (Li és mtsai. 2024). A fentebb említett AtrR az *A. fumigatus* legfőbb ilyen szabályzó fehérjéje (Haigwara és mtsai. 2017).

N. crassa CCG8 fehérjéje is pozitívan szabályozza az *erg11*, illetve a *cdr4*-es azol transzporter fehérje kifejeződését így a szabályzó faktor hiánya a cél gének aktivitásának csökkenéséhez vezet, hasonlóan az általunk vizsgált fehérjék esetén. Az *Fvccg-8* gén *Fusarium verticillioides*-ben hasonló szerepet tölt be, mint homológja a *ccg8* (Sun és mtsai.2013).

Fontos megemlíteni, hogy a „pdr hálózat” magába foglal több típusú transzkripciós faktort nem csak a $Zn(II)_2Cys_6$ családba tartozókat, például a FfmA ami egy C_2H_2 faktor melynek hiányában csökken a növekedési intenzitás és nő a vorikonazol érzékenység (Poul és mtsai. 2022). Azonban a felsorolt szakirodalmi adatokból feltételezzük, hogy a $Zn(II)_2Cys_6$ csoport regulációs folyamatai igen magas prioritásúak lehetnek.

Azol érzékenységi teszt során azt tapasztaltuk, hogy a *Δtf106* törzs érzékenysége megnövekedett kontroll *MS12* törzsünkhöz képest posakonazol, izavukonazol és amfotericin B vel szemben. A *Δtf821* törzs csak amfotericin B-vel szemben mutatott csökkent rezisztenciát. Az eredményeink összehasonlítva kutatócsoportunk korábbi vizsgálataival megállapítható, hogy az *erg11a* és *erg6b*, illetve a *pdr1-es* gének delécioja volt a legnagyobb hatással az azol érzékenységre (Bauer és mtsai. 2023; Nagy és mtsai. 2021). Az általunk folytatott kísérletek során e két ergosterin bioszintézis gén transzkripciója csökkent a legkevésbé. Ez arra enged következtetni, hogy ezen gének kifejeződését több transzkripciós faktor is befolyásolhatja. Azol érzékenységi tesztünk eredményétit összevetve a szakirodalommal megállapíthatjuk, hogy *Δtf106* törzsre vonatkozó eredményeink hasonlóak, mint a *C. auris* *TAC1* gén delécio mutánsai esetében, melyek csökkent rezisztenciát mutatnak különböző azolokkal szemben (Li és mtsai. 2021). Továbbá *C. albicans* Upc2p fehérjéjénél leírták, hogy G648D funkciónyeréses mutációjával növekedik a gomba flukonazol rezisztenciája, míg ugyanezen gén deléciojával pedig csökken (Dunkel és mtsai.2008). A *Δtf821* törzsben tapasztalt posakonazollal szembeni rezisztencia növekedés magyarázata hasonló, mint *S. cerevisiae* UME6 fehérjéje esetében, melynek kiütésével a flukonazol és cikloheximid rezisztencia növekedett, mely arra enged következtetni, hogy ezen fehérje negatív regulátorként játszik szerepet az azol érzékenységben résztvevő géneknél p^+ sejtekben. (Yamada 2022).

7 Szakirodalmi jegyzék

1. Bauer K, Rafael B, Vágó B, Kiss-Vetráb S, Molnár A, Szebenyi C, Varga M, Szekeres A, Vágvölgyi C, Papp T, Nagy G. Characterization of the Sterol 24-C-Methyltransferase Genes Reveals a Network of Alternative Sterol Biosynthetic Pathways in *Mucor lusitanicus*. *Microbiol Spectr.* 2023; 11(3): e0031523. doi: 10.1128/spectrum.00315-23.
2. Chang Z, Billmyre RB, Lee SC, Heitman J. Broad antifungal resistance mediated by RNAi-dependent epimutation in the basal human fungal pathogen *Mucor circinelloides*. *PLoS Genet.* 2019; 15(2): e1007957. doi: 10.1371/journal.pgen.1007957.
3. Coste AT, Karababa M, Ischer F, Bille J, Sanglard D. TAC1, transcriptional activator of CDR genes, is a new transcription factor involved in the regulation of *Candida albicans* ABC transporters CDR1 and CDR2. *Eukaryot Cell.* 2004; 3(6):1639-1652. doi:10.1128/EC.3.6.1639-1652.
4. Coste AT, Ramsdale M, Ischer F, Sanglard D. Divergent functions of three *Candida albicans* zinc-cluster transcription factors (CTA4, ASG1 and CTF1) complementing pleiotropic drug resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology (Reading).* 2008; 154(Pt 5):1491-1501. doi:10.1099/mic.0.2007/016063-0.
5. Czajka KM, Venkataraman K, Brabant-Kirwan D, Santi SA, Verschoor C, Appanna VD, Singh R, Saunders DP, Tharmalingam S. Molecular Mechanisms Associated with Antifungal Resistance in Pathogenic *Candida* Species. *Cells.* 2023; 12(22):2655. doi: 10.3390/cells12222655.
6. Dunkel N, Liu TT, Barker KS, Homayouni R, Morschhäuser J, Rogers PD. A gain-of-function mutation in the transcription factor Upc2p causes upregulation of ergosterol biosynthesis genes and increased fluconazole resistance in a clinical *Candida albicans* isolate. *Eukaryot Cell.* 2008; 7(7):1180-1190. doi: 10.1128/EC.00103-08.
7. Ehsani R, Bahrami S, Drabløs F. Feature-based classification of human transcription factors into hypothetical sub-classes related to regulatory function. *BMC Bioinformatics.* 2016; 17(1):459. doi: 10.1186/s12859-016-1349-2.
8. Fazili ABA, Shah AM, Zan X, Naz T, Nosheen S, Nazir Y, Ullah S, Zhang H, Song Y. *Mucor circinelloides*: a model organism for oleaginous fungi and its potential applications in bioactive lipid production. *Microb Cell Fact.* 2022; 21(1):29. doi: 10.1186/s12934-022-01758-9.
9. García-Estrada C, Domínguez-Santos R, Kosalková K, Martín J-F. Transcription Factors Controlling Primary and Secondary Metabolism in Filamentous Fungi: The β -Lactam Paradigm. *Fermentation.* 2018; 4(2):47. <https://doi.org/10.3390/fermentation4020047>
10. Gsaller F, Hortschansky P, Furukawa T, Carr PD, Rash B, Capilla J, Müller C, Bracher F, Bowyer P, Haas H, Brakhage AA, Bromley MJ. Sterol Biosynthesis and Azole Tolerance Is Governed by the Opposing Actions of SrbA and the CCAAT Binding Complex. *PLoS Pathog.* 2016; 12(7): e1005775. doi: 10.1371/journal.ppat.1005775.
11. Fisher, M. C, Denning, D. W. The WHO fungal priority pathogens list as a game-changer. *Nature Reviews Microbiology.* 2023; 21(4): 211–212. <https://doi.org/10.1038/s41579-023-00861-x>

12. Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* (San Diego, Calif.), 2001; 25(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
13. Hachmeister KA, Fung DY. Tempeh: a mold-modified indigenous fermented food made from soybeans and/or cereal grains. *Crit Rev Microbiol.* 1993; 19(3):137-88. doi: 10.3109/10408419309113527.
14. Hagiwara D, Miura D, Shimizu K, Paul S, Ohba A, Gonoi T, Watanabe A, Kamei K, Shintani T, Moye-Rowley WS, Kawamoto S, Gomi K. 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 Pathog.* 2017; 13(1): e1006096. doi: 10.1371/journal.ppat.1006096.
15. Hernández JL, Buckley CJ. Mucormycosis. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023.
16. Iturriaga, E. A., Díaz-Mínguez, J. M., Benito, E. P., Alvarez, M. I., & Eslava, A. P. (1992). Heterologous transformation of *Mucor circinelloides* with the *Phycomyces blakesleeanus* *leu1* gene. *Current genetics*, 1992; 21(3), 215–223. <https://doi.org/10.1007/BF00336844>
17. Katzmann D.J, Hallstrom TC, Mahé Y, Moye-Rowley WS. Multiple Pdr1p/Pdr3p binding sites are essential for normal expression of the ATP binding cassette transporter protein-encoding gene PDR5. *J Biol Chem.* 1996; 271(38):23049-54. doi: 10.1074/jbc.271.38.23049.
18. Laity JH, Lee BM, Wright PE. Zinc finger proteins: new insights into structural and functional diversity. *Curr Opin Struct Biol.* 2001; (1):39-46. doi: 10.1016/s0959-440x(00)00167-6.
19. Lee Y, Puumala E, Robbins N, Cowen LE. Antifungal Drug Resistance: Molecular Mechanisms in *Candida albicans* and Beyond. *Chem Rev.* 2021;121(6):3390-3411. doi: 10.1021/acs.chemrev.0c00199.
20. Li J, Aubry L, Brandalise D, Coste AT, Sanglard D, Lamoth F. Upc2-mediated mechanisms of azole resistance in *Candida auris*. *Microbiol Spectr.* 2024; 12(2): e0352623. doi: 10.1128/spectrum.03526-23.
21. Li J, Coste AT, Liechti M, Bachmann D, Sanglard D, Lamoth F. Novel ERG11 and TAC1b mutations associated with azole resistance in *Candida auris*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2023; 65(5): e02663-20. doi: 10.1128/AAC.02663-20.
22. Li YH, Liu TB. Zinc Finger Proteins in the Human Fungal Pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Int J Mol Sci.* 2020; 21(4):1361. doi: 10.3390/ijms21041361.
23. MacPherson S, Laroche M, Turcotte B. A fungal family of transcriptional regulators: the zinc cluster proteins. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2006;70(3):583-604. doi: 10.1128/MMBR.00015-06.
24. McKenry PT, Nessel TA, Zito PM. Antifungal Antibiotics. [Updated 2023 Mar 7]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK538168/>
25. Nagy G, Kiss S, Varghese R, Bauer K, Szebenyi C, Kocsu S, Homa M, Bodai L, Zsindely N, Nagy G, Vágvolgyi C, Papp T. Characterization of Three Pleiotropic Drug Resistance Transporter Genes and Their Participation in the Azole Resistance of *Mucor circinelloides*. *Front Cell Infect Microbiol.* 2021; 11:660347. doi: 10.3389/fcimb.2021.660347.
26. Paul S, Bowyer P, Bromley M, Moye-Rowley WS. *Aspergillus fumigatus* *ffmA* Encodes a C₂H₂-Containing Transcriptional Regulator That Modulates Azole Resistance and Is Required for Normal Growth. *mSphere.* 2022 Feb 23;7(1):e0093821. doi: 10.1128/msphere.00938-21.

27. Paul S, Stamnes M, Thomas GH, Liu H, Hagiwara D, Gomi K, Filler SG, Moye-Rowley WS. AtrR Is an Essential Determinant of Azole Resistance in *Aspergillus fumigatus*. *mBio*. 2019;10(2): e02563-18. doi: 10.1128/mBio.02563-18.
28. Paul S, Stamnes MA, Moye-Rowley WS. Interactions between the transcription factors FfmA and AtrR are required to properly regulate gene expression in the fungus *Aspergillus fumigatus*. *G3 (Bethesda)*. 2023 Sep 30;13(10):jkad173. doi: 10.1093/g3journal/jkad173.
29. Ran, F. A., Hsu, P. D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D. A., & Zhang, F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature protocols*, 2013; 8(11), 2281–2308. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.143>
30. Reid G, Lynch JP 3rd, Fishbein MC, Clark NM. Mucormycosis. *Semin Respir Crit Care Med*. 2020; 41(1):99-114. doi: 10.1055/s-0039-3401992.
31. CLSI. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Approved Standard M38-A2, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne. 2008.
32. Richardson MD, Rautemaa-Richardson R. Biotic Environments Supporting the Persistence of Clinically Relevant Mucormycetes. *J Fungi (Basel)*. 2019; 6(1):4. doi: 10.3390/jof6010004.
33. Ruiz-Vázquez RM, Nicolás FE, Torres-Martínez S, Garre V. Distinct RNAi Pathways in the Regulation of Physiology and Development in the Fungus *Mucor circinelloides*. *Adv Genet*. 2015; 91:55-102. doi: 10.1016/bs.adgen.2015.07.002.
34. Schjerling P, Holmberg S. Comparative amino acid sequence analysis of the C6 zinc cluster family of transcriptional regulators. *Nucleic Acids Res*. 1996; 24(23):4599-607. doi: 10.1093/nar/24.23.4599.
35. Shafiei M, Peyton L, Hashemzadeh M, Foroumadi A. (2020) History of the development of antifungal azoles: A review on structures, SAR, and mechanism of action. *Bioorg Chem*. 2020; 104:104240. doi: 10.1016/j.bioorg.
36. Sun X, Wang K, Yu X, Liu J, Zhang H, Zhou F, Xie B, Li S. Transcription factor CCG-8 as a new regulator in the adaptation to antifungal azole stress. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014; 58(3):1434-42. doi: 10.1128/AAC.02244-13.
37. Theodoulou FL, Kerr ID. ABC transporter research: going strong 40 years on. *Biochem Soc Trans*. 2015 Oct; 43(5):1033-40. doi: 10.1042/BST20150139.
38. Tsuboi Y, Sakuma T, Yamamoto T, Horiuchi H, Takahashi F, Igarashi K, Hagihara H, Takimura Y. Gene manipulation in the Mucorales fungus *Rhizopus oryzae* using TALENs with exonuclease overexpression. *FEMS Microbiol Lett*. 2022; 369(1): fnac010. doi: 10.1093/femsle/fnac010.
39. Vaezi A, Walther G, Kurzai O, Mahdi D, Dadashzadeh M, Nasri E, Diba K, Badali H, Fakhim H. Frequency of occurrence, seasonal variation and antifungal susceptibility of opportunistic Mucorales isolated from hospital soils in Iran. *Mycoses*. 2021; 64(7):780-787. doi: 10.1111/myc.13283.
40. Van Daele R, Spriet I, Wauters J, Maertens J, Mercier T, Van Hecke S, Brüggemann R. Antifungal drugs: What brings the future? *Med Mycol*. 2019; 57(Supplement_3):S328-S343. doi: 10.1093/mmy/myz012.
41. van Heeswijck R., Roncero M.I.G. High frequency transformation of *Mucor* with recombinant plasmid DNA. *Carlsberg Res. Commun*. 1984;49:691–702. doi: 10.1007/BF02907500.
42. Walther G, Wagner L, Kurzai O. Updates on the Taxonomy of Mucorales with an Emphasis on Clinically Important Taxa. *J Fungi (Basel)*. 2019; 5(4):106. doi: 10.3390/jof5040106.

43. Wang K, Zhang Z, Chen X, Sun X, Jin C, Liu H, Li S. Transcription factor ADS-4 regulates adaptive responses and resistance to antifungal azole stress. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015; 59(9):5396-404. doi: 10.1128/AAC.00542-15.
44. Wu J, Chen X, Cai L, Tang L, Liu L. Transcription factors Asg1p and Hal9p regulate pH homeostasis in *Candida glabrata*. *Front Microbiol*. 2015; 18;6:843. doi: 10.3389/fmicb.2015.00843.
45. Yamada Y. RPD3 and UME6 are involved in the activation of PDR5 transcription and pleiotropic drug resistance in ρ^0 cells of *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Microbiol*. 2021; 21(1):311. doi: 10.1186/s12866-021-02373-1.
46. Yamada Y. UME6 Is Involved in the Suppression of Basal Transcription of ABC Transporters and Drug Resistance in the ρ^+ Cells of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microorganisms*. 2022; 10(3):601. doi: 10.3390/microorganisms10030601.
47. Yap A, Volz R, Paul S, Moye-Rowley WS, Haas H. Regulation of High-Affinity Iron Acquisition, Including Acquisition Mediated by the Iron Permease FtrA, Is Coordinated by AtrR, SrbA, and SreA in *Aspergillus fumigatus*. *mBio*. 2023; 14(3): e0075723. doi: 10.1128/mbio.00757-23.
48. Yin Y, Zhang H, Zhang Y, Hu C, Sun X, Liu W, Li S (2021). Fungal Zn(II)2Cys6 Transcription Factor ADS-1 Regulates Drug Efflux and Ergosterol Metabolism under Antifungal Azole Stress. *Antimicrob Agents Chemother* 2021; 65:10.1128/aac.01316-20. <https://doi.org/10.1128/aac.01316-20>
49. Zhan Ying Zhang, Bo Jin, Joan M. Kelly, Production of lactic acid from renewable materials by *Rhizopus fungi*, *Biochem Eng J*. 2007; 35(3):251-263. ISSN 1369-703X.

8 Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom Prof. Dr. Papp Tamásnak, a Szegedi Tudományegyetem, Természettudományi és Informatikai Kar, Biotechnológiai és Mikrobiológiai Tanszék vezetőjének, hogy a tanszéken lehetőséget adott kutatásom elvégzésére.

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Nagy Gábornak a szakdolgozati munkám során nyújtott mentorálásért és szakmai útmutatásért.

Külön köszönettel tartozom Kiss-Vetráb Sándor PhD hallgatónak, hogy odaadó munkájával és tanácsaival segítette szakdolgozatom elkészülését.

Köszönettel tartozom Dr. Kocsubé Sándornak az *in silico* analízisben nyújtott segítségéért.

Köszönöm továbbá a SZTE TTIK Biotechnológiai és Mikrobiológiai Tanszék 309-es labor összes dolgozójának a munkám során nyújtott gyakorlati segítséget, valamint hasznos szakmai és baráti tanácsaikat.

9 Mellékletek

Indítószekvencia	Szekvencia 5'-3'	Termék
A <i>tf106</i> gén kiütéséhez használt indítószekvenciák		
Ml106505PromFw	CAATACAGGAGGTATCGGCAC	A <i>tf106</i> gén promótere
Ml106505PromRev	AAAGAGCAAGAACAAGAAGAGG	
Ml106505pyrGFw	TTCATTCTTTTTCCCTCTTCTTGTTCTTG CTCTTTTGCCTCAGCATTGGTACTTG	A <i>pyrG</i> gén a saját promóter és terminális szekvenciákkal
Ml106505pyrGRev	CACATCGCCATACGTCTATGTTGATTG GAGGCACAGTACACTGGCCATGCTATCG	
Ml106505TermFw	TGTGCCTCCAATCAACATAGAC	A <i>tf106</i> gén terminálisa
Ml106505TermRev	CATACCGCTACTTCCCACGA	
Ml106505nestedFw	CAAACGGTGGGATAGGAGAC	Végső PCR termék a transzformáláshoz
Ml106505nestedRev	GGAATCATCTGTCATAGTTGATCC	
A <i>tf821</i> gén kiütéséhez használt indítószekvenciák		
Ml82118PromFw	TCTCAAATGCTGTGTTCTCCA	A <i>tf821</i> gén promótere
Ml82118PromRev	GCCGTTCCATTGTCAAACCA	
Ml82118TermFw	AAATTGAGCAAGTGAAACGC	A <i>tf821</i> gén terminálisa
Ml82118TermRev	GTATGGCAAGTACAAGATCAAAGG	
Ml82118pyrGFw	CTGCTGCTACTTTTGTGGTTTGACAATG GAACGGCTGCCTCAGCATTGGTACTTG	A <i>pyrG</i> gén a saját promóter és terminális szekvenciákkal
Ml82118pyrGRev	TATACGTTTATGTTTGCGTTTCACTTGC TCAATTTGTACACTGGCCATGCTATCG	
Ml82118NestedFw	CCTGATTGTTGGTTTAAGGGA	Végső PCR termék a transzformáláshoz
Ml82118NestedRev	CACATAAGCATCCATCAGCA	
A qRT-PCR vizsgálatokhoz használt indítószekvenciák		
Ml106505 RtFw	GACTGATTACACCGCCTACTG	<i>tf106</i> gén egy szakasza
Ml106505 RtRev	CTGCCGTTTGAAATAGATTGTCC	
Ml107112RtFw	GTGAGAAAGGAGCGTAAGAAGG	<i>tf107</i> gén egy szakasza
Ml107112RtRev	GAGCGTATTGAGCAGGTTGG	
Mc48059rtfw	ATCAACCCATTGGTCATTTCC	<i>pdr1</i> gén egy szakasza
Mc48059rtrev	CAAATCGCCTTCATTACACTG	

Indítószekvencia	Szekvencia 5'-3'	Termék
Mc83305fw	GTCAACCTCAAGAAGTGTCCA	<i>pdr2</i> gén egy
Mc83305rev	GATACCGATACCAGCCTCCA	szakasza
Mc141912rtfw	GCTCTGTACCATTCATCAACCC	<i>pdr3</i> gén egy
Mc141912rtrev	GTCTTTGCCAATCTCACCGA	szakasza
Mc142239rtfw	AAGCCTATGCACAATCCTTCTG	<i>pdr4</i> gén egy
Mc142239rtrev	GTAAAGCCAGTAATCAAGCCGA	szakasza
Mc145852rtfw	CTTACACCAACACTGACTACCA	<i>pdr5</i> gén egy
Mc145852rtrev	GAAGATCGACATACTCCATAGCA	szakasza
Mc146716rtfw	CATTTGCTGAACGACATCTCTG	<i>pdr6</i> gén egy
Mc146716rtrev	AGACATTGCCTTCCACTTTACC	szakasza
Mc158611rtfw	CTAATCCTGATGCTGTTCAACCT	<i>pdr7</i> gén egy
Mc158611rtrev	TATCTTCTGCCCTTTCTCTTCCA	szakasza
Mc186086rtfw	TCCTCCTTCAACATTATTCGCT	<i>pdr8</i> gén egy
Mc186086rtrev	ATCCTGACCAATTTACCGT	szakasza
MCactinF	CACTCCTTCACTACCACCGCTGA	Az aktin egy
MCactinR	GAGAGCAGAGGATTGAGCAGCAG	szakasza
Mc74496rtfw	ACCGACAAATACAATGCTGAG	Az <i>Erg6/a</i> gén egy
Mc74496rtrev	ACCCTCCAAAGGATAATACCA	szakasza
Mc155859rtfw	GTCCAAAGAACGCTGATGTCC	Az <i>Erg6/b</i> gén egy
Mc155859rtrev	GTTGTAGTACGAGTTGACGAGAGAG	szakasza
Mc151310rtfw	TGAAGACGAGACATTTGACAG	Az <i>Erg6/c</i> gén egy
Mc151310rtrev	TAGCAAGCGAATTTACCACC	szakasza
Mc157152rtfw	GATGCTCAACACTACAAGATCC	Az <i>Erg2</i> gén egy
Mc157152rtrev	CAATTCACCAACGATAGCCT	szakasza
Erg3afw	GCTCACTCTTCCCTTCTTCAC	Az <i>Erg2</i> gén egy
Erg3arev	CTGATTGTGGTATCTACTGGTTCC	szakasza
McP450/2_fw	GGGTAATTTCTCTGTGCTG	Az <i>Erg11a</i> gén egy
McP450/2_rev	CTACTTCCAGTTGATGAACGG	szakasza
McP450/1_fw	TTCGGTGCTGTTGGTATCTC	Az <i>Erg11/b</i> gén egy
McP450/1_rev	GGAAGTGTAATCAGGCTTAGGA	szakasza
Erg4afw	GCAACAAGACAAACAAGAATGG	Az <i>Erg4/a</i> gén egy
Erg4arev	GGACGAGTTTGGGTGTTAC	szakasza
Erg4bfw	GCAACAAGACAAACAAGAATGG	Az <i>Erg4/b</i> gén egy
Erg4brev	AGGACGAGTTTGGGTGTTAC	szakasza
Erg5afw	GCTTTAGGTGGTGTTCAGAG	Az <i>Erg5/a</i> gén egy
Erg5afw	CCATCCAATCTCGCAAATACA	szakasza

Indítószekvencia	Szekvencia 5'-3'	Termék
Erg5bfw	ATTCATTGTCATCGCATCCA	Az <i>Erg5/b</i> gén egy szakasza
Erg5brev	GGCAAGGAACACAACAATA	
Erg25afw	CTCGCCACTTTATCCCTTTCTG	Az <i>Erg25/a</i> gén egy szakasza
Erg25arev	GAAGGTAATCCCACCAACGG	
Erg25bfw	GTGTTCAAATTAGACGATGCTTGG	Az <i>Erg25/b</i> gén egy szakasza
Erg25brev	AGAAGGGAACCCAGTTACAGAG	
McErg26rtFw	CAAGCCTTCAATTTAACCAACGG	Az <i>Erg26</i> gén egy szakasza
McErg26rtRev	TACTAATAAGAGCAATCACCAGAC	
McErg27rtFw	ATTAGAAGCAGAAGGAGAAGGT	Az <i>Erg27</i> gén egy szakasza
McErg27rtRev	GCAGATGAGAACGACAAGAC	
Erg28rtfw	ACTTATGTGATTGCCTTGACC	Az <i>Erg28</i> gén egy szakasza
Erg28rtrev	TGACTTGAGTGAGCCAAATGAG	