

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM
TERMÉSZETTUDOMÁNYI ÉS INFORMATIKAI KAR
MIKROBIOLÓGIAI TANSZÉK



36. OTDK Biológia Szekció

SPÓRAFELSZÍNI FEHÉRJÉK SZEREPE *MUCOR*
***LUSITANICUS* FONALAS GOMBA SPÓRÁZÁSI**
FOLYAMATAIBAN

KISS KARINA

Biológus Msc, II. évfolyam

TÉMAVEZETŐK:
PROF. DR. PAPP TAMÁS
DR. SZEBENYI CSILLA

Szeged, 2023

Tartalomjegyzék

1	Rövidítések jegyzéke	4
2	Bevezetés	5
2.1	A Mucorales rend jelentősége	5
2.2	A mucormikózis patomechanizmusa	6
2.3	A CotH fehérje család	8
3	Célkitűzések	12
4	Anyagok és módszerek	13
4.1	A kutatás során felhasznált törzsek és sejtvonalak	13
4.2	Alkalmazott táptalajok, tápoldatok és tenyésztési körülmények	13
4.2.1	A tenyésztés során alkalmazott táptalajok/tápoldatok	13
4.2.2	Malátás táptalaj/tápoldat (MEA)	13
4.2.3	Minimál táptalaj/tápoldat (YNBM)	13
4.2.4	Élesztő-glükóz táptalaj (YEG)	14
4.3	A kísérletek során felhasznált oldatok és pufferek	14
4.3.1	10x PBS oldat (foszfát pufferelt sóoldat)	14
4.3.2	PEG-mediált transzformációhoz és protoplasztképzéshez felhasznált oldatok	14
4.3.3	<i>Galleria mellonella</i> in vivo fertőzéshez használt oldat	14
4.4	A vizsgálat módszerei és körülményei	14
4.4.1	Genomi DNS kinyerése	14
4.4.2	Agaróz gélelektroforézis	15
4.4.3	DNS visszanyerése agaróz gélből	15
4.4.4	RNS tisztítás gombasejtekből és cDNS szintézis (reverz transzkripció)	15
4.4.5	Kísérletek során alkalmazott indítószekvenciák tervezése és PCR technika	15
4.4.6	Fúziós konstrukciók kialakítása	16
4.4.7	qRT-PCR reakciók a transzkripciós szintek meghatározásához	17

4.5	Gombasejtek transzformálása és fenntartása.....	17
4.5.1	Gombasejt protoplaszt transzformáció CRISPR-Cas9 rendszer segítségével	17
4.6	Transzformáns törzsek karakterizálása	18
4.6.1	Növekedési képesség vizsgálata	18
4.6.2	Spórázási kapacitás vizsgálata	19
4.6.3	<i>Mucor lusitanicus</i> sporangiumok fénymikroszkópos vizsgálata	19
4.6.4	<i>Mucor lusitanicus</i> sporangiospóráinak életképesség vizsgálata	19
4.6.5	SEM mintapreparáló lépések	19
4.7	<i>In vivo</i> vizsgálatok.....	20
4.7.1	<i>Galleria mellonella</i> <i>in vivo</i> fertőzési modell	20
4.8	Statisztikai analízis	20
5	Eredmények	21
5.1	A CotH12 protein <i>in silico</i> analízise	21
5.2	Diszrupciós kazetták létrehozása fúziós PCR segítségével.....	22
5.3	Az MS12- <i>ΔcotH12</i> + <i>pyrG</i> törzs növekedésének vizsgálata.....	24
5.4	A <i>cotH</i> diszrupciós törzsek mikroaerofil növekedési vizsgálata	26
5.5	A <i>cotH</i> diszrupciós törzsek spórázási kapacitásának vizsgálata	27
5.6	<i>Mucor lusitanicus</i> sporangiumainak vizsgálata fénymikroszkóppal	28
5.7	CotH mutáns törzsek vizsgálata SEM segítségével	29
5.8	A mutáns törzsek spóráinak életképesség vizsgálata	30
5.9	Az MS12- <i>ΔcotH12</i> + <i>pyrG</i> mutáns csírázási képessége	31
5.10	Diszrupciós törzsek vizsgálata <i>Galleria mellonella</i> modellben	32
6	Összefoglalás	33
7	Irodalomjegyzék	34
8	Köszönetnyilvánítás.....	40

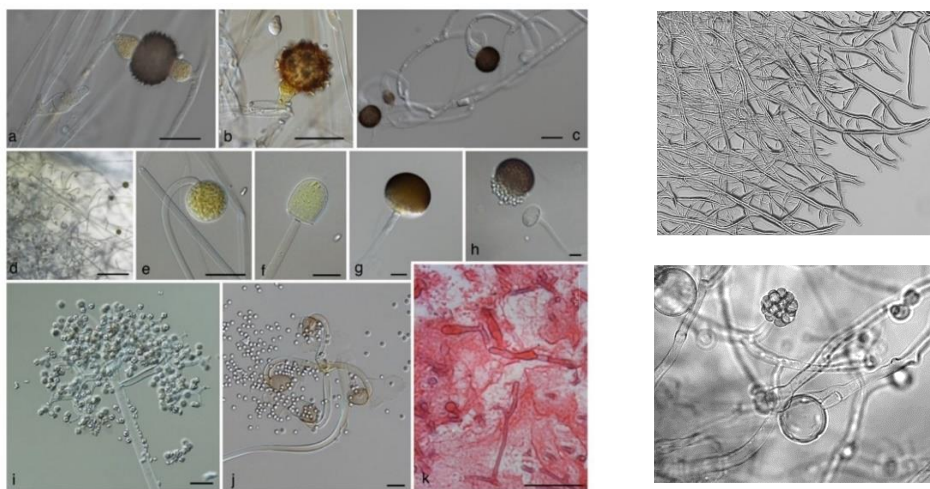
1 Rövidítések jegyzéke

Cas9	CRISPR kapcsolt fehérje 9 Cas9 (<i>CRISPR Associated 9 Protein</i>)
CBS	<i>Centraalbureau voor Schimmelcultures</i> , Utrecht, Hollandia
CotH	Spóra burok fehérje (<i>Spore Coat Protein H</i>)
crRNS	CRISPR-RNS
CRISPR	Halmozottan előforduló, szabályos közökkel elválasztott palindromikus ismétlődések (<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>)
DKA	diabéteszes ketoacidózis (<i>Diabetic Ketoacidosis</i>)
gRNS	Vezető RNS (<i>guide RNA</i>)
GPI	Glikozil-foszfatidil-inozitol (<i>Glycosylphosphatidylinositol</i>)
GRP78	Glükóz által szabályozott receptor 78 (<i>Glucose Regulated Protein 78</i>)
J774.2	Egér makrofág sejtvonal neve (<i>Mouse Macrophage Cell Line</i>)
JGI	<i>Joint Genome Institute</i>
MEA	Malátás táptalaj (<i>Malt Extract Agar</i>)
MOI	Fertőzési arány (<i>Multiplicity Of Infection</i>)
MOPS	3-N-morfolin-propánszulfonsav
NCBI	Nemzetközi biológiai adatbázis (<i>National Center for Biotechnology Information</i>)
PAM	Protospacer melletti motívum (<i>Protospacer Adjacent Motif</i>)
PBS	Foszfát-pufferelt sóoldat (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PEG	Polietilén-glikol (<i>Polyethylene Glycol</i>)
PMC	PEG - szorbitol - MOPS - kalcium-klorid (<i>PEG-sorbitol-MOPS-Calcium-chloride</i>)
qRT-PCR	Valós idejű kvantitatív PCR (<i>Quantitative Real-Time PCR</i>)
SEM	Pásztázó elektronmikroszkópia (<i>Scanning electron microscopy</i>)
SZMC	Szeged Microbial Collection, SZTE TTIK Mikrobiológiai Tanszék
TAE	Tris - ecetsav - dinátrium - EDTA (<i>Tris Base-Acetic acid-EDTA</i>)
tracrRNS	Transzaktiváló crRNS (<i>trans-activating crispr RNA</i>)
YNB	Élesztő nitrogénforrás (<i>Yeast Nitrogen Base</i>)
YNBM	Minimál táptalaj (<i>Yeast Nitrogen Base Medium</i>)

2 Bevezetés

2.1 A Mucorales rend jelentősége

A *Mucor lusitanicus* (korábban *Mucor circinelloides*) a Mucorales nemzetségbe tartozó járomspórás gomba. Gombafonalai cönocitikusak, tehát a hifáiban nem vagy csak ritkán figyelhetők meg szeptumok (Field és mtsi. 2015) (**1. ábra**). A gomba micéliumaiban felhalmozódó β -karotin lehetővé teszi, hogy az iparban karotintermelő szervezetként alkalmazzák (Naz és mtsi. 2020), továbbá a karotin bioszintézis tanulmányozása során is kedvelt modellorganizmusnak tekinthető (Iturriaga és mtsi. 2000, 2001, 2005; Papp és mtsi. 2006). A *M. lusitanicus* fonalas gombát sikeresen alkalmazták már a járomspórás gombák számos biológiai folyamatának és anyagcsere útvonalának hátterében álló genetikai és molekuláris folyamatok feltárására, úgy mint a fényérzékelés (Corrochano és Garre, 2010; Vellanki és mtsi., 2018; Yu és Fischer, 2019; Navarro és mtsi., 2020), molekuláris szabályozás és jelátviteli útvonalak (Lee és mtsi., 2015; Ruiz-Vázquez és mtsi., 2015; Calo és mtsi., 2017; Lax és mtsi., 2020), morfológiai dimorfizmus (Lee és mtsi. 2015; Moriwaki-Takano és mtsi. 2021; Vellanki és mtsi. 2020), karotin bioszintézis (Zhang és mtsi. 2016; Alcalde és mtsi. 2019), patogenitás (López-Fernández és mtsi. 2018; Patiño-Medina és mtsi. 2019) és azol rezisztencia (Nagy és mtsi. 2021; Logan és mtsi. 2022).



1. ábra. A Mucorales fajok morfológiája. (a) a *Mucor endophyticus* CBS 385.95 zigospórája (b) a *Mucor bainie* CBS 293.63 zigospórája; (c) *Mucor multiplex* CBS 110662 sporangiospórái; d) fiatal micélium felülnézetbe átmenetileg visszahajló sporangiospórákkal; e-f) a *Backusella recurva* CBS sporangiofórjai és kolumellája; g-h) *Pilaira anomla* CBS 699.71 sporangiumai i) a *Thamnidium elegans* CBS 341.5 sporangifórjai; j) a *Circinella umbellata* sporangifórjai; k) a *Rhizopus microsporus* hifái emberi tüdőszövetben. Méretsávok = 50 μ m, kivéve d = 500 μ m (Walther és mtsi. 2019). Saját készítésű fénymikroszkópos képek a *M. lusitanicus* hifáiról, sporangiumairól, valamint csírázó aszexuális spóráiról 20x, valamint 40x nagyításban.

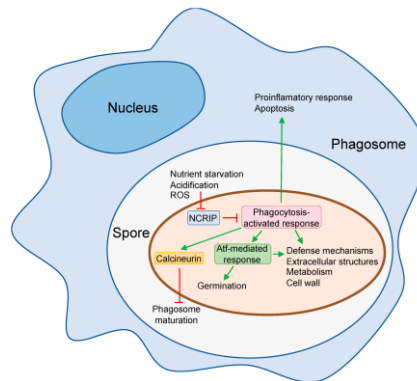
A Mucorales csoport tagjai változatos tulajdonságaik miatt jelentőséggel bírnak az ipar és az alap kutatás területén, úgy, mint karotin- (Alcalde és mtsi. 2019) és lipidtermelő (Fazili és mtsi. 2022) szervezetek, azonban fontos megemlíteni, hogy néhány fajuk (pl. a *Lichtheimia*, *Mucor*, *Rhizomucor* és *Rhizopus* nemzetségek fajtái) ritka, ugyanakkor növekvő incidenciát mutató humán megbetegedések, ún. mucormikózisok kiváltására képesek (Wang és mtsi. 2011; Doggett és Wong 2014; Jeong és mtsi. 2019; Vaezi és mtsi. 2021; Mudgal és mtsi. 2022). Az, hogy mely fajok kerülnek leggyakrabban izolálásra a klinikumban a mucormikózis kapcsán, erősen függ a földrajzi elhelyezkedéstől. Lanternier és munkatársai által végzett epidemiológiai tanulmány szerint a *Lichtheimia* spp. előfordulása a mucormikózisok kapcsán izolált minták között Európában 18-24% közötti, míg hasonló ázsiai és amerikai tanulmányokban a *Lichtheimia* spp. gyakorisága kevesebb, mint 10% volt (Lanternier és mtsi. 2012). India területéről származó epidemiológiai adatok alapján a második leggyakrabban izolált kórokozók az *Apophysomyces* fajok (Chakrabarti és mtsi. 2014; Skiada és mtsi. 2022). Az *Apophysomyces* és a *Saksenaea* fajok nem csak a legyengült immunrendszerrel rendelkező egyéneket képesek megbetegíteni, hanem igen nagy gyakorisággal felelősek az egészséges immunrendszerrel bíró páciensek bőrnyálkahártyagyulladásáért Ázsiában (Chakrabarti és mtsi. 2014; Prakash és mtsi. 2016). Globális tekintetben a *Rhizopus arrhizus* (korábban *Rhizopus oryzae*) a leggyakoribb mucormikózist kiváltó faj, de jelentősnek tekinthetők a *Apophysomyces*, *Actinomucor*, *Cunninghamella*, *Cokeromyces*, *Lichtheimia*, *Mucor*, *Rhizomucor*, *Saksenaea*, *Cokeromyces* és *Syncephalastrum* nemzetségek képviselői is (Cornely és mtsi. 2019; Mansoor és mtsi. 2022). Mindezek mellett új fajok megjelenése is megfigyelhető, úgy, mint a *Rhizopus homothallicus* (Chakrabarti és mtsi. 2014), a *Thamnostylum lucknowense* (Xess és mtsi. 2012), a *Mucor irregularis* (Lu X.-L. és mtsi. 2013) és a *Saksenaea erythrospora* (Chander és mtsi. 2017).

2.2 A mucormikózis patomechanizmusa

A környezetünkben előforduló gombaspórák az enyhe és kezelhető allergiás megbetegedésektől kezdve a halálos fertőzéseken át sokféle kórképet okoznak. A gombák mind a beltéri, mind a kültéri környezetet kolonizálják, így a patogén gombafajok és az emberi gazdaszervezetek közötti kölcsönhatás gyakorlatilag elkerülhetetlennek tekinthető (Casadevall 2012). Az emberi immunrendszer azonban rendelkezik olyan molekuláris mechanizmusokkal, amelyek egyszerre támadják a gombakórokozókat és védik a gazdaszervezet barrierfelületeit (Nicolás és mtsi. 2020), s ennek következtében a bőr, tüdőhám és nyálkahártya felszínén a

veleszületett immunsejtek toborzása rendkívül hatékony védelmet nyújt több ezer gombafajjal szemben (Nicolás és mtsi. 2020). A Mucorales fajok által kiváltani képes megbetegedést mucormikózisnak nevezzük, melyre jellemző a gyors szöveti invázió és nekrózis, valamint az angioinvázió és a disszemináció folyamatai (Laderas és mtsi. 2015; Prakash és Chakrabarti 2019). A mucormikózis megnyilvánulhat kután/szubkután (bőr), rhino-orbito-cerebrális mucormikózis (orr- és szájüreg, szem, agy), pulmonáris (tüdő), gasztrointesztinális (gyomor, béltraktus), és disszeminált (Prakash és Chakrabarti 2019) formában, mely a fertőzést kiváltó fajjal és a fertőzés útvonalával áll összefüggésben (Walther és mtsi. 2019).

A *Rhizopus* és a *Rhizomucor* fajok spórái elsősorban belégzés útján, míg a *Mucor* és a *Lichtheimia* fajok főként a bőrt ért sérüléseken keresztül, talajjal vagy szennyezett felületekkel való érintkezésekor kerülnek az emberi szervezetbe (Walther és mtsi. 2019). A *Mucor* fajok esetében a fertőzési útvonalnak az ilyen jellegű preferenciája a fent említett nemzetségek sporangiumainak különbségével magyarázható (Nicolás és mtsi. 2020). A Mucorales rend egy másik fontos jellemzője, amely közvetlenül kapcsolódik a mucormikózis kiváltására való képességükhöz, a differenciált termotolerancia, valamint a gomba dimorf természete. Míg a *Rhizopus* és a *Lichtheimia* fajok termotoleránsak és 37 °C-on is képesek növekedni (Hoffman és mtsi. 2007; Cheng és mtsi. 2009), addig a *Rhizomucor* fajok főképp termofilek, a *Mucor* fajok pedig általában mezofilek (Schipper és mtsi. 1978). Az mucormikózist okozó valamennyi járomspórás gombának alkalmazkodnia kell a magasabb hőmérsékleti viszonyokon való növekedéshez (Cheng és mtsi. 2009). Ez azt is jelenti, hogy a nem *Rhizopus* és *Lichtheimia* nemzetségbe tartozó fajoknak további molekuláris adaptáció szükséges ahhoz, hogy a gazdaszervezet fagocitikus sejtjeiben a csírázás megvalósulhasson (Nicolás és mtsi. 2020). A makrofágok és a neutrofilek a korai immunválasz részeként a mucormikózis elleni védekezés alapját képezik. A tüdőt érintő fertőzés során a neutrofilek jelentős beáramlása figyelhető meg, azonban a spórák nagy részét az alveoláris makrofágok fagocitálják (Andrianaki és mtsi. 2018). Az alveoláris makrofágok nem képesek elpusztítani a nyugvó állapotú *Rhizopus* spórákat, viszont képesek meggátolni a csírázásukat az L-arginin oxidációjából származó nitrogén-oxid termelése által (Jorens és mtsi. 1995). A *Mucor* fajok azonban képesek kikerülni ezt a védekezési mechanizmust és a makrofágon belül csírázni *in vitro* (Li és mtsi. 2011; Lee és mtsi. 2015; Trieu és mtsi. 2017) (2. ábra).



2. ábra. A makrofágok gombaellenes aktivitása ellen alkalmazott menekülési útvonalak *M. lusitanicus*-ban (Nicolás és mtsi. 2020).

A neutrofilek fontos szerepet játszanak a gazdaszervezet védekezésében, tekintve, hogy a neutropénia a mucormikózis kockázati tényezője (Waldorf és mtsi. 1985). A neutrofil sejtek spórákkal való kapcsolódását követően a toll-like receptorok kifejeződése, valamint a nekrozisfaktor (TNF)- α , interferon (IFN)- γ és IL-1 β fokozott termelődése figyelhető meg (Nicolás és mtsi. 2020). A természetes ölüsejtek is szerepet játszanak a védekezésben, méghozzá a hifák károsítása révén (Schmidt és mtsi. 2013), míg a vérlemezkék antimikrobiális és gombaellenes tulajdonságuk révén gyulladáscsökkentő citokinek és kemokinek granuláris szekrécióján keresztül képesek gátolni a spórák csírázását (Speth és mtsi. 2014). A *M. lusitanicus* spórák fagocitózisát követően egy olyan komplex génválasz aktiválódik, mely az extracelluláris struktúrákban, az anyagcserében és a sejtfalban részt vevő gének differenciált expresszióját foglalja magában (Pérez-Arques és mtsi. 2019). Ez a válasz az Atf1 és Atf2 transzkripciós faktorokat is szabályozza, amely elősegíti a gomba számára az alacsony pH-n történő csírázást, valamint a calcineurin útvonal által gátolja a fagoszóma érési folyamatait (Pérez-Arques és mtsi. 2019).

2.3 A CotH fehérje család

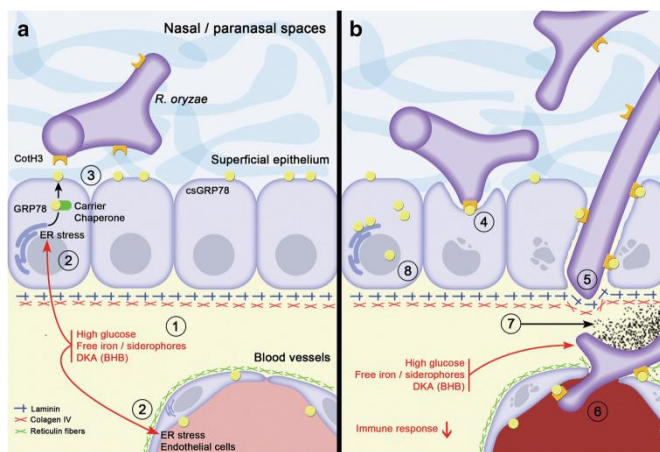
A CotH (*spore coat protein H*) fehérje családot a *Bacillus* fajok endospóráképzésének folyamatát vizsgálva fedezték fel (Naclerio és mtsi. 1996). A CotH proteinek olyan atipikus protein kinázok, melyek a spóraburok kialakítását foszforilációs kaszkádfolyamatok indukálásával mediálják, valamint egyes esetekben strukturális elemként is funkcionálnak a spórafalban (Nguyen és mtsi. 2016; Lax és mtsi. 2020). Homológjaik számos baktérium- és eukarióta fajban jelen vannak, azonban leginkább az endospóráképző *Bacillus* és a *Clostridium* baktériumcsoportra, valamint a gombák országának, Mucorales rendjére jellemzőek. A CotH proteinek jelenléte a

spóráképzésre képes, valamint humán patogén vagy opportunistá patogén fajokra jellemző (Nguyen és mtsi. 2016).

Az endosóra felépítésének paradigmáját a *Bacillus subtilis* alapozta meg, melynek összeszereléséhez több, mint 70 különböző fehérje szükséges. Ennek a folyamatnak egy fontos szabályozó eleme a CotE, melynek szerepe van a külső burokréteg összeszerelésében, az endospóra lizozimmal szembeni ellenállásában, valamint az endospóra csírázási mechanizmusában. A *Bacillus* CotH, a sporuláció folyamata során halmozódik fel az érett endospórában, ahol a spóraburok kialakítása mellett a csírázási folyamatot mediálja (Isticato és mtsi. 2013). A mucormikózis kialakításért felelős *R. delemar* genomja több CotH fehérjét, köztük a CotH1 (RO3G_05018), CotH2 (RO3G_08029), CotH3 (RO3G_11882), CotH4 (RO3G_09277), CotH5 (RO3G_01139), CotH6 (IGS-990-880_03186), CotH7 (IGS-990-880_09445) és CotH8 (IGS-990-880_11474) fehérjéket kódolja (Chibucos és mtsi. 2016). A gombaspórák felszínén kifejeződő *Rhizopus* CotH2 és a CotH3 proteinek a patogén és az endotélsejtek felszínén expresszálandó glükóz által szabályozott receptorfehérje (GRP78) kölcsönhatását biztosítják (Gebremariam és mtsi. 2014), míg a CotH7 az integrin $\alpha 3 \beta 1$ proteinnel való kölcsönhatáson keresztül közvetíti az alveoláris epitélsejtek invázióját (Alqarihi és mtsi. 2020). Diabéteszes ketoacidózis (DKA) során a GRP78 molekulák szintje jelentősen megemelkedik a sinusokban és a tüdőben, ami sebezhetővé teszi a szervezetet a gombafertőzéssel szemben (Liu és mtsi. 2010).

A cukorbetegség hatására kialakuló mikrokörnyezet, vagyis a magas glükóz, szabad vas és a ketontestek által kiváltott ER stressz válaszaként a GRP78 kifejezett reprezentációja figyelhető meg az endotél sejtek felszínén (3. ábra). Amint a GRP78 a sejt felszínén exponálódik (csGRP78), a CotH3 fehérjén keresztül létrejön a *Rhizopus delemar* hifaival való receptor-ligand kölcsönhatás. A gombaspórák csírázását követően a *R. delemar* hifáknak a bazális membránban lévő lamininhez és IV. típusú kollagénhez való kapcsolódása lehetővé teszi az adhéziót, valamint az inváziót az interstitiumba, mely angiogén folyamatokat generál. A mikrokörnyezeti egyensúlyhiány kedvező feltételeket biztosít a gomba növekedéséhez: energiát (magas glükóz), szabad vasat a metabolikus szükségleteihez, valamint a ketontestek által létrehozott kedvező savas környezetet. Eközben a folyamatos GRP78 kifejeződés az endotélsejtek felszínén lehetővé teszi a hifák számára, hogy lehorgonyozzanak, majd kölcsönhatásba lépjenek az endotélsejtek lumenális felszínén expresszálandó GRP78 receptorral. A hifák internalizálódása az erek lumenébe az extrinsic koagulációs útvonal aktiválódását indukálja, mely sejtkárosodást, majd a trombus

kialakulását váltja ki. Ez iszkémiát és tartós hipoxiát eredményez, ami a szövetek infarktuszát és az azt követő nekrozist generálja. Végül, a megváltozott mikrokörnyezet ezen betegek különböző szöveti kompartmentumaiban GRP78 túltermelést generál, ami lehetővé teszi a *Rhizopus* fajok számára, hogy bármilyen típusú epiteliális vagy endoteliális sejten hozzáférjenek a CotH proteinhez, további invazív folyamatokat generálva (Morales-Franco és mtsi. 2021).

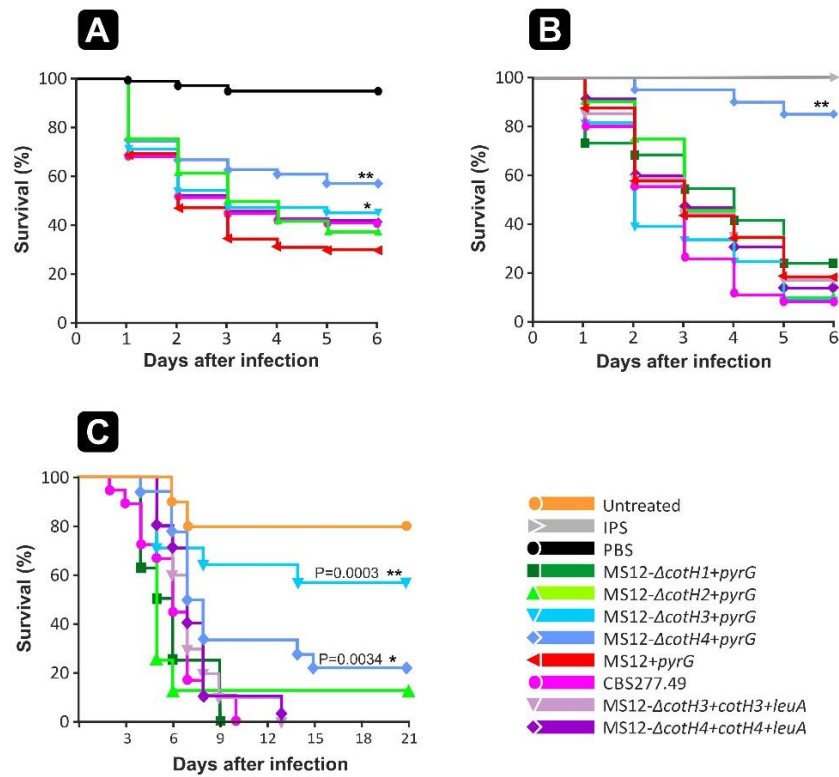


3. ábra. A cukorbetegség és a CotH protein által közvetített mucormikózis kapcsolata (Morales-Franco és mtsi, 2021).

A SARS-CoV2 fertőzést jellemző magas GRP78 kifejeződés, valamint a kortikoszteroidok rendszeres használata két olyan egyedi tényező volt a koronavírus járvány második hulláma során, mely erős hatással volt a Covid asszociált mucormikózisos esetszámokra (Gumashta és Gumashta 2021; Dogra és mtsi. 2022).

A *Rhizopus* CotH3 fehérje ellen termelt IgG antitestek védelmet biztosítottak a DKA-ban és neutropeniában szenvedő egerek számára a mucormikózis kialakulása ellen (Gebremariam és mtsi. 2014). Mindezek tudatában elmondhatjuk, hogy az anti-CotH3 antitestek ígéretes jelölteknek tekinthetők a mucormikózis immunterápiás kezelésében (Gebremariam és mtsi. 2020). A *cotH* gének univerzális jelenléte a Mucorales rendben, valamint jelenlétük hiánya a nem patogén fajokban potenciális biomarkerként azonosítja e fehérjecsaládot a mucormikózis diagnózisának felállításához (Baldin és mtsi. 2018). Fennáll a lehetősége annak, hogy a CotH proteinek elleni immunterápia nem csak kizárólag az adott faj, hanem egy szélesebb gombacsoport ellen is védelmet biztosít. Ez különösen fontos abból a szempontból, hogy a fajok közti morfológiai hasonlóság, valamint a betegség gyors lefolyása gyakran kizárja a fajazonosítás lehetőségét (Gebremariam és mtsi. 2014).

A *M. lusitanicus* gyakran használt modellorganizmus a mucormikózis morfogenezisének és patogenezisének tanulmányozásában (Li és mtsi. 2011; Vellanki és mtsi. 2020). E gomba genomjában 17 lehetséges *cotH* gént azonosítottunk, amelyek szerepe a patogenitásban, valamint a gomba élettani folyamatiban korábban nem volt tisztázott. Kutatócsoportunk korábban feltárta egyes CotH proteinek szerepét a virulenciában, az eltérő hőmérsékletekhez való adaptációban, a sejtfal és spórafal szerkezetének, továbbá a sporangiumok falának, valamint a spórák méretének kialakításában *M. lusitanicus* fonalas gombában. A *cotH3* és a *cotH4* gének diszrupciója kevésbé virulens törzseket eredményezett *Drosophila* fertőzési modellben, míg a CotH4 protein hiányában a mutáns törzs avirulensnek mutatkozott DKA egér modellben (4. ábra).



4. ábra. Virulencia-vizsgálatok a *cotH* mutánsokkal. (A) A *cotH* mutánsokkal és a kontroll *M. lusitanicus* MS12+*pyrG* és CBS277.49 törzsekkel fertőzött *Drosophila melanogaster* (n=60) túlélése. (B) A *cotH* mutánsokkal és a kontroll *M. lusitanicus* MS12+*pyrG* és CBS277.49 törzsekkel fertőzött *Galleria mellonella* (n=20) lárvák túlélése. (C) A *cotH* mutánsok virulenciája DKA egérmodellben intratracheális fertőzést követően (Szebenyi és mtsi. 2023).

A *Galleria mellonella* nagy viaszmosy lárva szintén széles körben használt nem gerinces modellorganizmus a különböző fonalas gombák, például a Mucorales fajok patogenitásának vizsgálatára (Li és mtsi. 2011; Vellanki és mtsi. 2020; Maurer és mtsi. 2019). E modellorganizmuson végzett vizsgálataink szintén megerősítették a CotH4 fehérje virulenciában

betöltött szerepét. Fontos megemlíteni azonban, hogy a *cotH3* mutáns nem mutatott csökkent virulenciát *Galleria mellonella* modellben, viszont emelkedett GRP78 expressziót mutató DKA egérmodellben igen. Annak ellenére, hogy a korábbi szakirodalmi adatok kizárólag az olyan CotH proteinek teszik felelőssé a gombafertőzés mediáliséért, melyek rendelkeznek a CotH-motívumként elnevezett "MGQTNDGAYRDPTDNN" aminosav szekvenciával. A *Mucor* CotH3 protein viszont egy olyan spóra felszíni fehérje, mely nem motívum hordozó, valamint filogenetikai analízisünk alapján nem áll közeli rokonságban a korábban említett *Rhizopus* CotH3 proteinnel. A *Mucor* patomechanizmusa kapcsán felmerül tehát egy olyan mechanizmusnak is a jelenléte, mely nem kizárólag a GRP78-CotH által valósul meg.

3 Célkitűzések

Az elmúlt két évtizedben a mucormikózis a harmadik leggyakoribb invazív gombafertőzéssé vált a vérképzőszervi daganatokban szenvedő és szervátültetett betegek körében, valamint az esetszámok jelentős növekedését figyelhattunk meg a SARS-CoV-2 pandémia ideje alatt. A CotH fehérjecsalád egyes tagjai elengedhetetlenek a *Rhizopus* fajok által kiváltott mucormikózis patomechanizmusában, azonban a szintén számos spóra felszíni fehérjét kódoló *Mucor* fajokban szerepük tisztázatlan. Korábbi eredményeink alapján a CotH3 és CotH4 proteinek virulencia faktorai a *M. lusitanicus* fonalas gombának, és potenciális terápiás célpontnak tekinthetők a mucormikózisos megbetegedések ellen. A CotH3 fehérje kapcsán szerzett tudásunk alapján azonban fennáll a lehetősége annak is, hogy nem csak a CotH-motívum hordozó proteinek játszanak szerepet a járomspórás gombák patomechanizmusában.

Mindezek alapján célul tűztük ki:

- a) egy olyan CotH proteint kódoló gén eltávolítását a *M. lusitanicus* genomból CRISPR rendszer segítségével, mely nem tipikusan CotH-motívum hordozó, de mégis spóra felszíni proteinnek tekinthető,
- b) a létrehozott mutáns átfogó genetikai és fiziológiai jellemzését,
- c) a CotH fehérjék patogenitásban betöltött szerepének vizsgálatát *in vivo* *Galleria mellonella* modellben,
- d) a *cotH* mutáns törzsek sporulációs folyamatainak vizsgálatát.

4 Anyagok és módszerek

4.1 A kutatás során felhasznált törzsek és sejtvonalak

A transzformációs kísérletekhez a *M. lusitanicus* CBS277.49 izolátum *leuA* és *pyrG* kétszeres auxotróf mutáns MS12 törzsét alkalmaztuk (Benito és mtsi. 1992, Szeged Microbial Collection, University of Szeged, Hungary (SZMC) 12082). Kísérleteinkhez a továbbiakban felhasználtuk a *M. lusitanicus* CBS277.49 MS12 törzsének *leuA* és *pyrG* kétszeres auxotróf mutáns *pyrG* komplementált (MS12+*pyrG*) törzsét, amelyet kutatócsoportunk hozott létre CRISPR-Cas9 génszerkesztéssel. Kísérleteinkbe bevontuk továbbá a kutatócsoportunk által létrehozott MS12-*ΔcotH1*+*pyrG*, MS12-*ΔcotH2*+*pyrG* és MS12-*ΔcotH3*+*pyrG*, MS12-*ΔcotH4*+*pyrG*, MS12-*ΔcotH6*+*pyrG*, MS12-*ΔcotH9*+*pyrG*, MS12-*ΔcotH12*+*pyrG*, MS12-*ΔcotH13*+*pyrG* és MS12-*ΔcotH16*+*pyrG* törzseket. Az *in vivo* patogenitási vizsgálatokat viaszmolymoly (*Galleria mellonella*) lárvák (BioSystems Technology, TruLarv) bevonásával végeztük.

4.2 Alkalmazott táptalajok, tápoldatok és tenyésztési körülmények

4.2.1 A tenyésztés során alkalmazott táptalajok/tápoldatok

A kísérletek során felhasznált vegyületek a VWR Chemicals gyártótól származtak, ettől eltérő esetben a gyártót külön feltüntettük.

4.2.2 Malátás táptalaj/tápoldat (MEA)

1% (m/V) malátakivonat; 0,5% (m/V) élesztőkivonat; 1% (m/V) D-glükóz; desztillált víz 500 ml-ig kiegészítve; a szilárd táptalaj előállítása során 2% (m/V) agart adunk a tápoldathoz.

4.2.3 Minimál táptalaj/tápoldat (YNBM)

0,15% (m/V) Na-L-glutamát; 0,15% (m/V) ammónium-szulfát; 1% (m/V) D-glükóz; 0,05% (m/V) élesztő nitrogénforrás (YNB) (Sigma-Aldrich); desztillált víz 500 ml-ig kiegészítve;

Szükség esetén a táptalajt 0,05% (m/V) uracillal (Sigma-Aldrich) és/vagy 0,05% (m/V) leucinnal (Sigma-Aldrich) egészítettük ki. A szilárd táptalaj előállítása során 2% (m/V) agart adunk a tápoldathoz. A polietilén-glikol (PEG)-mediált protoplaszt transzformálás alkalmával a szelekciós táptalajként 1% (m/V) agart és 0,8% (m/V) szorbitolt tartalmazó YNBM, illetve 2% (m/V) agart és 0,8% (m/V) szorbitolt tartalmazó YNBM táptalajokat alkalmaztuk.

4.2.4 Élesztő-glükóz táptalaj (YEG)

0,5% (m/V) élesztőkivonat; 1% (m/V) D-glükóz; desztillált víz 500 ml-ig kiegészítve; a szilárd táptalaj előállítása során 2% (m/V) agart adunk a tápoldathoz.

4.3 A kísérletek során felhasznált oldatok és pufferek

4.3.1 10x PBS oldat (foszfát pufferelt sóoldat)

0,2% (m/V) KCl; 0,24% (m/V) KH_2PO_4 (pH=7,4); 1,44% (m/V) NaHPO_4 ; 8% (m/V) NaCl; desztillált víz 500 ml-ig kiegészítve.

4.3.2 PEG-mediált transzformációhoz és protoplasztképzéshez felhasznált oldatok

- **CaCl₂ (1 M):** 14,0702 g CaCl_2 ; 100 ml-ig desztillált vízzel kiegészítve.
- **PEG 4000 (60%-os):** 60 g PEG 4000; 100 ml-ig desztillált vízzel kiegészítve.
- **Szorbitol (2,4 M):** 43,72 g szorbitol; 100 ml-ig desztillált vízzel kiegészítve.
- **MOPS (3-N-morfolin-propánszulfonsav) (0,5 M):** puffer, 5,231 g MOPS, 50 ml-ig desztillált vízzel kiegészítve.
- **Nátrium-foszfát puffer:** 3,725 g (75 mM) NaH_2PO_4 és 1,275 g (25 mM) Na_2HPO_4 100 ml desztillált vízben feloldva.
- **Protoplasztáló oldat:** (30 ml végtérfogatban) 10 ml 2,4 M szorbitol; 17 ml desztillált víz; 3 ml 100 mM Nátrium-foszfát puffer, 0,45 g (1,5%(m/V)) csigaenzim por.
- **PEG 4000-szorbitol-MOPS-kalcium-klorid (PMC):** (21,3 ml végtérfogatban) 13,33 ml 60%-os PEG 4000; 6,6 ml 2,4 M szorbitol; 400 µl 0,5 M MOPS; 1 ml 1 M CaCl_2 .
- **Szorbitol-MOPS-kalcium klorid (SMC):** (50 ml végtérfogatban) 6,6 ml 2,4 M szorbitol; 1 ml 0,5 M MOPS; 2,5 ml 1 M CaCl_2 ; desztillált vízzel kiegészítve 50 ml-ig.

4.3.3 *Galleria mellonella* in vivo fertőzéshez használt oldat

- **IPS (Insect Physiological Saline):** 150 mM NaCl; 5 mM KCl; 10 mM EDTA és 30 mM nátrium-citrát 0,1 M Tris-HCl-ban (pH=6,9).

4.4 A vizsgálat módszerei és körülményei

4.4.1 Genomi DNS kinyerése

Az *M. lusitanicus* törzsek genomi DNS-ének kinyeréséhez a kísérlet során a ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep™ (Zymo Research) kit-et alkalmaztuk, a gyártó utasításának megfelelően. A genomi DNS kivonásának sikerességét 0,8%-os agaróz gélen ellenőriztük.

4.4.2 Agaróz gélelektroforézis

DNS fragmentek szeparálását agaróz gélelektroforézis segítségével végeztük el. Az agaróz gélek elkészítéséhez, továbbá futtató pufferként Tris-ecetsav-dinátrium-EDTA puffert (TAE; 40 mM Tris-ecetsavat (pH=7,6); 1 mM Na₂EDTA oldatban) használtunk fel. A fragmentumok láthatóvá tételéhez etídium-bromidos festést alkalmaztunk (etídium-bromid 10 mg/ml, desztillált vízben oldva; (Sigma-Aldrich)). A DNS mintához mintafelvivő puffert adtunk (6x LD puffer (Thermo Scientific), majd a genomi DNS-ek futtatását 0,8-1% (m/V)-os gélen végeztük, 80-100 V-os feszültségen 1 órán át, kísérlettől függően. Az 1 kb-os molekulasúly markernek (Thermo Scientific) 4:1:1 arányú keverékét használtuk fel (steril desztillált víz- molekulasúly marker- 6x DNS mintapuffer) a DNS fragmentumok méretének meghatározásához. A DNS detektálását UV fény segítségével végeztük el.

4.4.3 DNS visszanyerése agaróz gélből

A DNS-t tartalmazó gél sávokat UV fény alatt figyeltük meg, majd steril szike segítségével izoláltuk vissza a 0,8-1%-os agaróz gélből. A kivágás után Zymoclean Large Fragment DNA Recovery Kit (Zymo Research) használatával nyertük vissza a DNS-t az agaróz gélből, a gyártó utasításainak megfelelően.

4.4.4 RNS tisztítás gombasejtekből és cDNS szintézis (reverz transzkripció)

Gombasejtekből történő RNS tisztításhoz Quick-RNA MiniPrep kitet (Zymo Research) használtunk a gyártó utasításainak megfelelően. Az izolált RNS mennyiségét NanoDrop spektrofotométer (ND-1000 Spectrophotometer, Thermo Scientific™) segítségével határoztuk meg. Az RNS minták integritását 2%-os, RNáz mentesített agaróz gélen ellenőriztük. DNáz kezelt RNS mintákból a reverz transzkripciót Maxima H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific™) segítségével végeztük el. Egy reakcióhoz 0,25 µl oligo_(dT)₁₈ és 0,25 µl random hexamer (10 µM) indítószekvenciákat használtunk fel (**1. táblázat**). A cDNS szintézist a gyártó utasításainak megfelelően végeztük el.

4.4.5 Kísérletek során alkalmazott indítószekvenciák tervezése és PCR technika

A PCR reakcióhoz szükséges oligonukleotid szekvenciák tervezéséhez a PerlPrimer v1.1.5 számítógépes programot alkalmaztunk (Marshall 2004). Az általunk tervezett indítószekvenciákat az **1. számú táblázatban** mutatjuk be. Kísérleteink során különböző PCR technikákat alkalmaztunk. A reakciókat T3 Thermocycler (Biometra) készülékben végeztük.

1. számú táblázat. A kísérletek során felhasznált indítószekvenciák listája.

A dolgozatban szereplő géndiszruptiók megvalósításához használt indítószekvenciák		
A <i>cotH12</i> gén elrontására tervezett primerek		
<i>MccotH12/1</i>	TCGCTATCTGTTGTGATGGAC	Promóter és kódoló régió (protospacer-től upstream irányban)
<i>MccotH12/2</i>	AAGATGTTGGGATATTCAGTGG	
<i>MccotH12/3</i>	GTATGGGTGTCGCTGAATGG	A <i>cotH12</i> gént kódoló szekvencia (protospacer-től downstream irányban)
<i>MccotH12/4</i>	TGTGTCGATCAACAATGCTACTC	
<i>MccotH12/5</i>	TTAACCAGATCCACTGGATATCCCAAC ATCTTTGCCTCAGCATTGGTACTTG	A <i>pyrG</i> saját promóterével és terminátor szekvenciájával
<i>MccotH12/6</i>	TCTAGCATTGACCCATTGAGCGACACC CATACGTACACTGGCCATGCTATCG	
<i>MccotH12/7</i>	AATGCTTTCGTGTCAGAAGG	Fúziós PCR termék
<i>MccotH12/8</i>	TACACAACAAATCTCGACTCCTG	
A <i>cotH12</i> gén diszruptiójának ellenőrzésére használt indítószekvenciák		
<i>MccotH12/RTfw</i>	GATGCTGTTATCAAGTCTCCC	A <i>cotH12</i> gén egy szakasza
<i>MccotH12/RTrev</i>	AGTTCCAAAGAGTCCATTGAG	
qRT-PCR során alkalmazott referenciagénre tervezett indítószekvenciák		
<i>McAktin1</i>	CACTCCTTCACTACCACCGCTGA	Az aktin (<i>ACT1</i>) gén egy szakasza
<i>McAktin2</i>	GAGAGCAGAGGATTGAGCAGCAG	

4.4.6 Fúziós konstrukciók kialakítása

A *cotH12* mutáns létrehozása céljából „Fúziós PCR” segítségével (Szewczyk és mtsi. 2006) diszruptiók kazettákat állítottunk elő. A módszerhez a Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix (Thermo Scientific) kit-et alkalmaztuk, a gyártó utasításainak megfelelően. A munkafolyamat során felhasznált indítószekvenciákat, melyeket 10 µM-os koncentrációban alkalmaztuk, az **1. számú táblázatban** foglaltuk össze. A célgénünkkel homológ régiók felszaporításának körülményei a következők voltak: A kezdeti denaturáció 98 °C-on 10 másodpercig; 30 cikluson át 1 másodperces denaturáció 98 °C-on; hibridizáció 58 °C-on 5 másodpercig, majd elongáció 72 °C-

on 35 másodpercig; utópolimerizáció 72 °C-on 1 percig. Szelekciós markerként az orotidin-5-foszfát-dekarboxilázt kódoló és az uracil auxotrófiát komplementálni képes *pyrG* (Benito és mtsi. 1992) gén volt (5-10 ng), melyet korábban CloneJet PCR cloning Kit-ben található pJET1.2 (Thermo Scientific) klónozó vektorba építettük a gyártó utasításait követve és a felhasználásig *Escherichia coli* kompetens sejtekben tartottunk fenn. A reakciókörülmények a *pyrG* gén felszaporításához a következők voltak: kezdeti denaturáció 98 °C-on 10 másodpercig; 30 cikluson keresztül denaturáció 98 °C-on 1 másodpercig; hibridizáció 63 °C-on 5 másodpercig; polimerizáció 72 °C-on 45 másodpercig, valamint 72 °C-on 1 másodpercig utópolimerizáció. A fúziós termékek létrehozásához 1:1:1 arányban használtuk a fragmentumokat, majd a fúziós PCR termékeket 0.8%-os agaróz gélen ellenőriztük és a Zymoclean Large Fragment DNA Recovery Kit (Zymo Research) használatával nyertük vissza, a gyártó utasításainak megfelelően. A kapott PCR termékeket a Zymoclean DNA Clean & Concentrator^{TM-5} (Zymo Research) kit által tisztítottuk, a gyártó utasításainak megfelelően.

4.4.7 qRT-PCR reakciók a transzkripció szintek meghatározásához

A méréseket monosporangialis telepekből izolált RNS-ről reverz transzkripcióval előállított cDNS-ből végeztük el CFX96 Real Time System (Bio-rad) berendezés és 2x Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (Thermo ScientificTM) segítségével. A reakció első lépése egy 95 °C-os, 3 perces elődenaturáció, majd ezt követi 40 ciklus az alábbi paraméterekkel: 95 °C, 1 perc; 60 °C, 30 s; 72 °C, 30 s. Az így kapott eredményeket a $2^{-\Delta\Delta C_t}$ módszer segítségével értékeltük ki (Livak és Schmittgen 2001). Belső kontrollként a *M. lusitanicus* aktin (*ACT*) génjét használtuk (Nagy és mtsi. 2014, Dankai és mtsi. 2015). Minden mérés legalább 3 technikai párhuzamossal történt. A reakciókban használt indítószekvenciák listáját az **1. számú táblázat** tartalmazza.

4.5 Gombasejtek transzformálása és fenntartása

4.5.1 Gombasejt protoplaszt transzformáció CRISPR-Cas9 rendszer segítségével

A transzformálási kísérleteket a van Heewijck és Roncero (1984) által feljegyzett PEG-mediált transzformációt alkalmazva végeztük el. Az MS12 törzset minimál táptalajon, 4 napig, állandó megvilágítás mellett tenyésztettük, majd steril desztillált vízzel történő mosást követően a spóraszuspenzióból oltótű segítségével celofánkoronggal lefedett YEG táptalajra oltottunk. A tenyészeteket 28 °C-on 16 órán keresztül neveltük, majd a micéliumkorongokat protoplasztáló oldatba helyeztük és 2 órán át, szobahőmérsékleten rázatva inkubáltuk (50 RPM). A gombasejtfal

emésztéséhez a Mikrobiológiai Tanszék munkatársai által készített, éticsiga (*Helix pomatia*) gyomorból preparált lítikus emésztőenzimet használtunk fel. A protoplasztokat tölcserbe helyezett steril gézen szűrtük át az SMC oldattal való mosás során. A centrifugálással (2162 x g, 10 perc, 4 °C) összegyűjtött protoplasztokat 5 ml SMC pufferrel mostuk át, amit újabb centrifugálás után 250 µl SMC pufferben vettünk fel. A protospacer szekvenciákkal kölcsönható Alt-R CRISPR crRNS és Alt-R CRISPR-Cas9 tracrRNS molekulákat az IDT-től (Integrated DNA Technologies) szereztük be. A crRNS:tracrRNS duplexek (gRNS) létrehozásához a Nuclease-Free Duplex Buffer-t (IDT) használtuk. A *cotH12* gén elrontása céljából 250 µl SMC pufferbe felvett protoplasztokhoz 10 µg fúziós PCR terméket, a génekre specifikus 100 µM gRNS-t (IDT), 10 µM Cas9 endonukleázt (IDT) és 20 µl PMC puffert adtunk. További 2,5 ml PMC puffer hozzáadása után a mintákat 25 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk, majd azokat 25 ml SMC pufferrel hígítva centrifugáltuk (2162 x g, 10 perc, 4 °C). 20 ml SMC pufferrel mostuk a sejteket, majd az ezt követő centrifugálási lépést (2162 x g, 10 perc, 4 °C) után a kiülepített sejteket, 200 µl SMC-ben vettük fel, és szorbitollal kiegészített YNBM fedőagarba (1% (m/V) agar) helyezve (0,05% (m/V)) leucint tartalmazó YNBM csészékre öntöttük (2% (m/V) agar). A csészéket két napig, fénytől elzárva, majd egy napon át állandó megvilágítás mellett, 28 °C-on inkubáltuk.

4.6 Transzformáns törzsek karakterizálása

4.6.1 Növekedési képesség vizsgálata

A gombasejteket 7 napos, 25 °C-on történő inkubáció és állandó megvilágítás mellett előneveltük. A spórák növekedési képességének meghatározásához a telepekről steril desztillált vízzel gyűjtöttük le a spórákat, majd a spóraszuszpenzió koncentrációját 10^6 /ml-re állítottuk be. 30 ml mennyiségű minimál táptalajra egy pontban történő leoltást végeztünk el, 20 µl végtérfogatban, majd a csészéket steril fülke alatt beszárítottunk. A leoltástól számítva 4 napon keresztül vizsgáltuk a növekvő telepek átmérőjét. A növekedés vizsgálatokat különböző hőmérsékleteken (20, 25, 35 °C) végeztük el. Az anaerob (mikroaerofil) tenyésztéseket BBL GasPak Anaerobic System (Beckton Dickinson) segítségével végeztük, 25 °C-on. 10^6 /ml-re állítottuk be a spórakoncentrációt, majd leoltást követő 2. napon a telepek szélein látható növekvő hifákat, a telepek átmérőjét, valamint az esetleges citoplazmakiáramlásokat fénymikroszkóppal vizsgáltuk. A törzsek abszolút növekedését mikroaerofil és aerofil tenyésztésben a telepátmérő adatok alapján a következőképpen számoltuk ki: [a mutánsok növekedése az adott körülmények

között] / [a kontroll növekedése az adott körülmények között] $\times$ 100. A 100%-ot a kontroll adott körülmények közötti növekedésének tekintettük.

4.6.2 Spórázási kapacitás vizsgálata

A 7 napig, 25 °C-on nevelt *M. lusitanicus* tenyészetekről 50 ml steril desztillált víz felhasználásával a telepekről összegyűjtöttük a gombaspórákat, majd meghatároztuk a minták spórakoncentrációját. A vizsgálat során 3 technikai párhuzamossal dolgoztunk.

4.6.3 *Mucor lusitanicus* sporangiumok fénymikroszkópos vizsgálata

7 napos, 25 °C-on nevelt tenyészetekből steril csipesszel a tenyészetek széléből mintát vettünk, majd azokat tárgylemezre helyezve rögzítettük. Az így előkészített preparátumokat fénymikroszkóp (Zeiss) alatt vizsgáltuk különböző (tíz, húsz, valamint negyvenszeres) nagyítással.

4.6.4 *Mucor lusitanicus* sporangiospóráinak életképesség vizsgálata

A 4 napos tenyészetekről 10x PBS oldatban legyűjtöttük a spórákat. Ezt követően a spórák csíráztatását 10 ml DMEM tápoldatban, 2×10^5 sporangiospóra/ml koncentrációban, 37 °C-on, 100 RPM rázatás mellett indukáltuk. Az inkubációs idő elteltével (4 h) centrifugáltuk a sejteket (2162 x g, 10 perc), majd azokat 500 μ l DMEM tápoldatba vettük fel és 2,5 μ l FUN1 festék hozzáadásával 37 °C-on 30 percig inkubáltuk. PBS oldattal történő mosást követően a mintákat tárgylemezre helyeztük, majd fény- és fluoreszcens Zeiss Axioscope 40 mikroszkóppal és AxioCam Mrc kamerával vizsgáltuk. Az alkalmazott fluoreszcens csatornák a DY-590 (581 nm-598 nm), valamint a Sodium Green voltak (507 nm-532 nm).

4.6.5 SEM mintapreparáló lépések

7 napos, 25 °C-on nevelt tenyészetekből dugófúróval 20-20 db mintát készítettünk. A mintákat 2,5%-os (V/V) glutáraldehidet tartalmazó 0,05 M-os cacodylate pufferben (pH=7,5) 2 órán át inkubáltuk 25 °C-on. Ezt követően a micéliumokat 50%, 70%, 80%, 90% és 98%-os etanollal 2x15 perces időtartamokban víztelenítettük. A mintákat ezután terc-butil-alkohol: abszolút etanol 1:2, 1:1, 2:1 arányú keverékébe, majd 100%-os terc-butil alkoholban inkubáltuk 2x1 órán át 25 °C-on. A mintákat tömény terc-butil alkoholban 4 °C-on tároltuk, majd 4 órán át liofilizálóban fagyasztva szárítottuk. Az így előkezelt micéliumokat a mintatartó korongra rögzítettük, majd a szükséges aranyréteg felvitelét követően (Quorum Technologies SC 7620 'Mini') a Hitachi S4700 SEM segítségével vizsgáltuk Petkovits Tamás segítségével.

4.7 In vivo vizsgálatok

4.7.1 *Galleria mellonella* in vivo fertőzési modell

A kísérlet megkezdése előtti éjszaka a 0,18-0,35 g tömegű *G. mellonella* lárvákat (BioSystems Technology, TruLarv) 28 °C-on, sötétben inkubáltuk a fertőzés megkezdéséig. A fertőzés előtt etanollal sterilizáltuk a lárvák hasi oldalát, ezt követően az utolsó lábkezdemenyen keresztül fertőztük a lárvákat 20 µl IPS-ben szuszpendált 5×10^6 gombaspórával U-100 ((29G) x 12,7 mm) steril inzulinos tű segítségével (BD Micro-Fine™). Törzsenként 20 lárvát injektáltunk, kontrollként 20-20 µl IPS oldattal fertőztünk. A fertőzést követően a lárvákat 28 °C-on, sötétben tartottuk, túlélésüket napi rendszerességgel ellenőriztük.

4.8 Statisztikai analízis

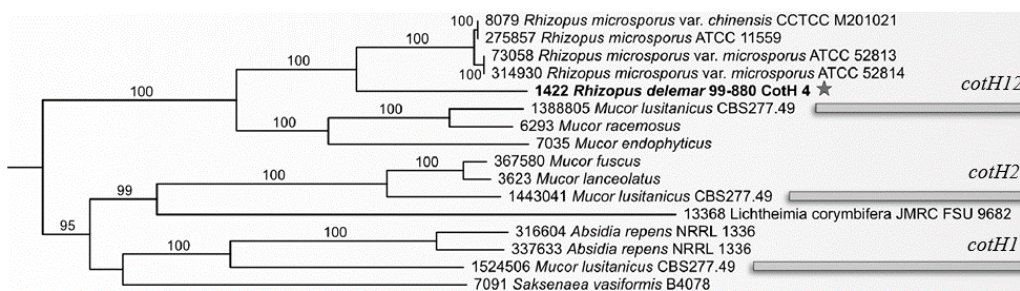
A statisztikai analíziseket a GraphPad Prism v 6.0 szoftverrel, parametrikus t-teszt használatával készítettük. Statisztikailag szignifikáns eltérést abban az esetben állapítottunk meg, ha $p < 0,05$ volt. A *G. mellonella* kísérletek során a lárvák túlélését GraphPad Prism v 7.0 szoftver, Survival Curve beállításával szemléltettük, a szignifikanciaszinteket nem-parametrikus Gehan-Breslow-Wilcoxon, illetve Log-rank (Mantel-Cox) statisztikai számolással határoztuk meg.

5 Eredmények

Kutatócsoportunk egyik irányvonala a spóra felszíni proteinek szerepének tisztázása *M. lusitanicus* fonalas gombában, mely során diszrupciós mutánsok létrehozásával ismeretlen szereppel bíró *cotH* géneket vizsgálunk. Céljaink között szerepelt a *cotH* diszrupciós könyvtár bővítése, így megkezdtem egy új mutáns törzs létrehozását CRISPR-Cas9 rendszer segítségével.

5.1 A CotH12 protein *in silico* analízise

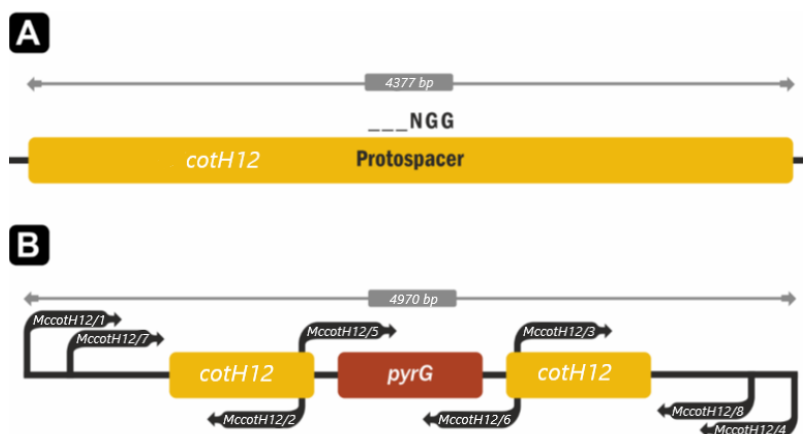
A CotH-domén (Pfam: PF08757) a CotH fehérjecsaládra jellemző egyedi fehérje alegység (Nguyen és mtsi. 2016). Ezen alegység egyes aminosavainak pozíciója konzervált, azonban a domén egésze nagy változatosságot mutat a CotH-szerű proteinek körében. A *M. lusitanicus* opportunista humán patogén fonalas gomba teljes genomja 2010 óta elérhető (<https://mycocosm.jgi.doe.gov/Mucci2/Mucci3.home.html>) (Corrochano és mtsi. 2016), így első lépésben az adatbázisból kigyűjtöttük a vizsgálni kívánt gén nukleotid szekvenciáját a JGI (Joint Genome Institute) adatbázisból, majd a nukleotid szekvenciát aminosav sorrendé alakítottuk az ExPASy Translate Tool segítségével és megkezdjük a protein bioinformatikai elemzését. Eredményeink alapján a CotH12 egy 607 aminosav hosszúságú, 67,92 kDa nagyságú protein, mely rendelkezik szignál peptiddel, valamint glikozil-foszfatidil-inozitol (GPI)-horgonnyal. A szakirodalomból ismert CotH-motívum nem található meg aminosav szekvenciájában. A szignál szekvencia jelenléte, valamint a PSORT WWW Server WoLF PSORT: Protein Localization Predictor program (Horton és mtsi. 2007) által kapott eredményeink alapján feltehetőleg extracelluláris természetű protein. Szekvenciahasonlóságot vizsgálva más CotH proteinekkel megállapítottuk, hogy a *R. delemar* CotH4, valamint a *M. lusitanicus* két másik, a CotH1 és CotH2 fehérjéivel alkot közös kládot.



5. ábra. A *cotH12* gént hordozó kládot bemutató Maximum Likelihood fa egy része. Az ágak felett csak a maximális valószínűségű elemzésekből származó >95 %-os bootstrap-értékek szerepelnek.

5.2 Diszrupciós kazetták létrehozása fúziós PCR segítségével

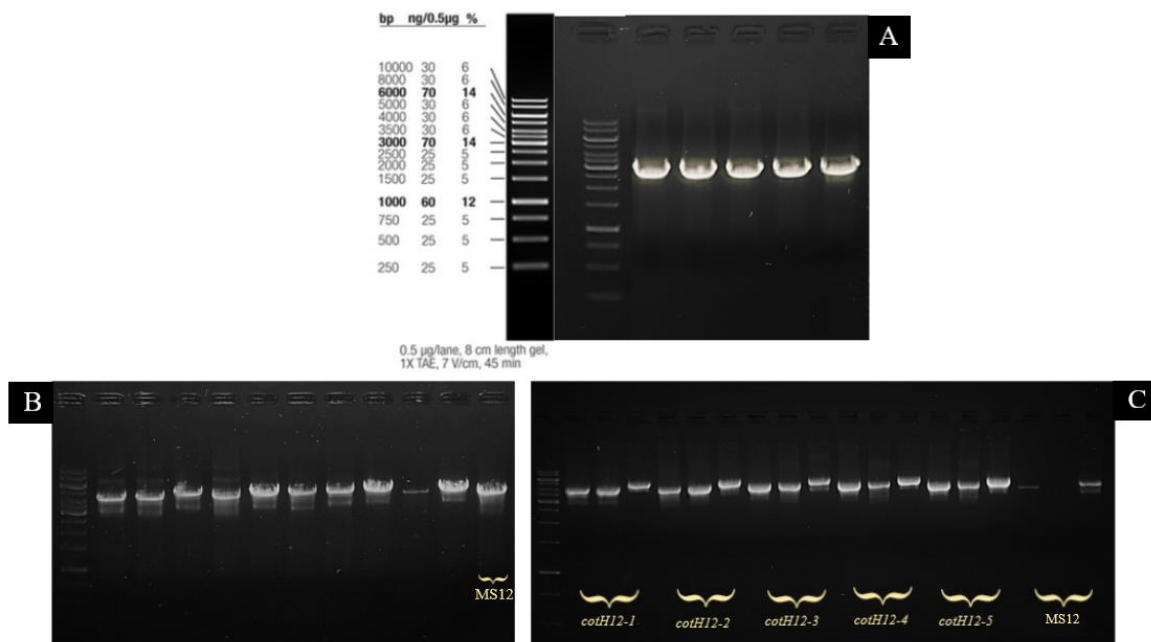
A *cotH12* gén elrontásának homológ rekombináción alapuló megvalósítása céljából olyan diszrupciós kazettát hoztunk létre, amely hordozza a *cotH12* génnel homológ szekvenciákat, valamint az uracil auxotrófiát komplementálni képes *pyrG* gént. Abban az esetben, ha a genomszerkesztés sikeressé válik, a célgénbe ékelődő szelektációs gén hatására a *cotH12* működésképtelenné válik és az így előállított mutáns törzs képes lesz uracil mentes, leucinnal kiegészített szelektív táptalajon növekedni (6. ábra).



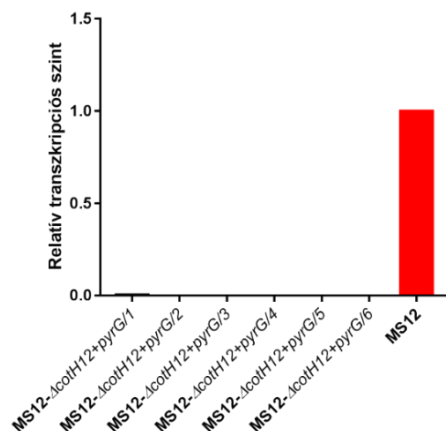
6. ábra. A *cotH12* gén elrontására tervezett kazetta sematikus képe. A) A *cotH12* gén eredeti, genomi elrendeződése. B) HDR javító mechanizmus során donor DNS-ként szolgáló diszrupciós kazetta felépítése. Bal oldali sárga téglalap (5' UTR régió): a deletálni kívánt géntől 5' irányba található szekvencia: felszaporítása az „*MccotH12/1*” és „*MccotH12/2*” indítószekvenciája párokkal történt meg (fekete nyilak). Jobb oldali sárga téglalap (3' UTR régió): az elrontani kívánt géntől 3' irányba található szekvencia, amelyet az „*MccotH12/3*” és „*MccotH12/4*” indítószekvencia párok segítségével szaporítottunk fel (fekete nyilak). Piros téglalap: szelekciót biztosító auxotróf marker gén szekvenciája: elkészüléséhez az „*MccotH12/5*” és „*MccotH12/6*” indítószekvenciákat használtuk fel (fekete nyilak). A három komponens összeépítéséhez az „*MccotH12/7*” és az „*MccotH12/8*” indítószekvenciákat alkalmaztuk.

A diszrupciós kazettákkal, valamint a CRISPR-Cas9 rendszerrel történő (7. ábra A) transzformálást követően tíz gombatelep jelent meg a szelektív táptalajon. Egymás után többször (4-5 átoltás), is elvégeztük a monosporangialis telepek izolálását, majd megkezdtuk a transzformánsok molekuláris ellenőrzését. A szülői MS12 törzs esetében a működőképes *cotH12* gén mérete 4377 bp, az integrációt követően várt géntermék mérete pedig 4970 bp, így tehát molekuláris szinten is szelektálni tudtuk a kapott telepek közül a feltételezett mutáns izolátumokat a nested („*MccotH12/7*” és az „*MccotH12/8*”) indítószekvenciák segítségével (7. ábra B). Ezt

követően az 5' nem transzlálódó régióra tervezett előremutató és a szelekciós markergén felszaporítására használt reverz indítószekvenciák (**1. számú táblázat**), valamint a *pyrG* génre tervezett előremutató, valamint a terminális régióra tervezett reverz indítószekvenciák segítségével felszaporított szakaszok szekvenciájának amplifikálásával igazoltuk a *pyrG* megfelelő helyre történő integrációját (**7. ábra C**). A PCR alapú előszelekciót követően qRT-PCR segítségével vizsgáltuk az elrontani kívánt gének kifejeződését, mely alapján megállapítottuk, hogy a génszerkesztést követően a *cotH12* gén expressziója nem volt detektálható (**8. ábra**). A transzformánsok mitotikus stabilitásának vizsgálatát is elvégeztük. Ennek érdekében néhány transzformáns gombatelepet MEA táptalajon növesztettünk 28 °C-on 4-7 napig, majd a sporangiospórák lemosása után azokat ismét MEA táptalajra szélesztettük. Ezt 15 alkalommal megismételtük, végül a sporangiospórákat szelektív táptalajra oltottuk. További kísérleteinkhez két izolátumot választottunk ki, melyet MS12- Δ *cotH12*+*pyrG*/1, valamint MS12- Δ *cotH12*+*pyrG*/2 névvel láttunk el.



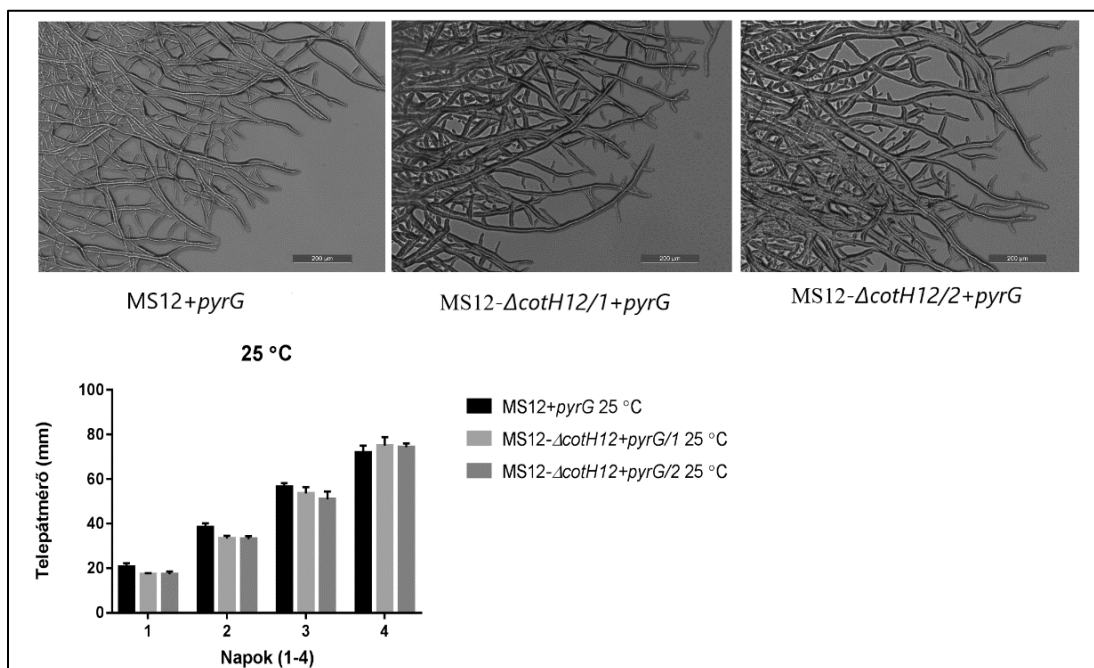
7. ábra. Az MS12- Δ *cotH12*-*pyrG* mutáns molekuláris ellenőrzése. A *cotH12* gén elrontása céljából létrehozott diszrupciós kazetták agaróz gélelektroforézises mintázata (A), valamint a transzformálás során kapott telepek PCR általi ellenőrzése a „*MccotH12/7*” és az „*MccotH12/8*” (nested) indítószekvenciák (B), továbbá az „*MccotH12/1*” (promóter fw) és „*MccotH12/6*” (*pyrG* rev) és a „*MccotH12/5*” (*pyrG* fw) és „*MccotH12/4*” (terminális rev) segítségével. Kontrollként az MS12 genomi DNS-ét alkalmaztuk (C). GeneRuler 1 kb DNS létra (Thermo Scientific™).

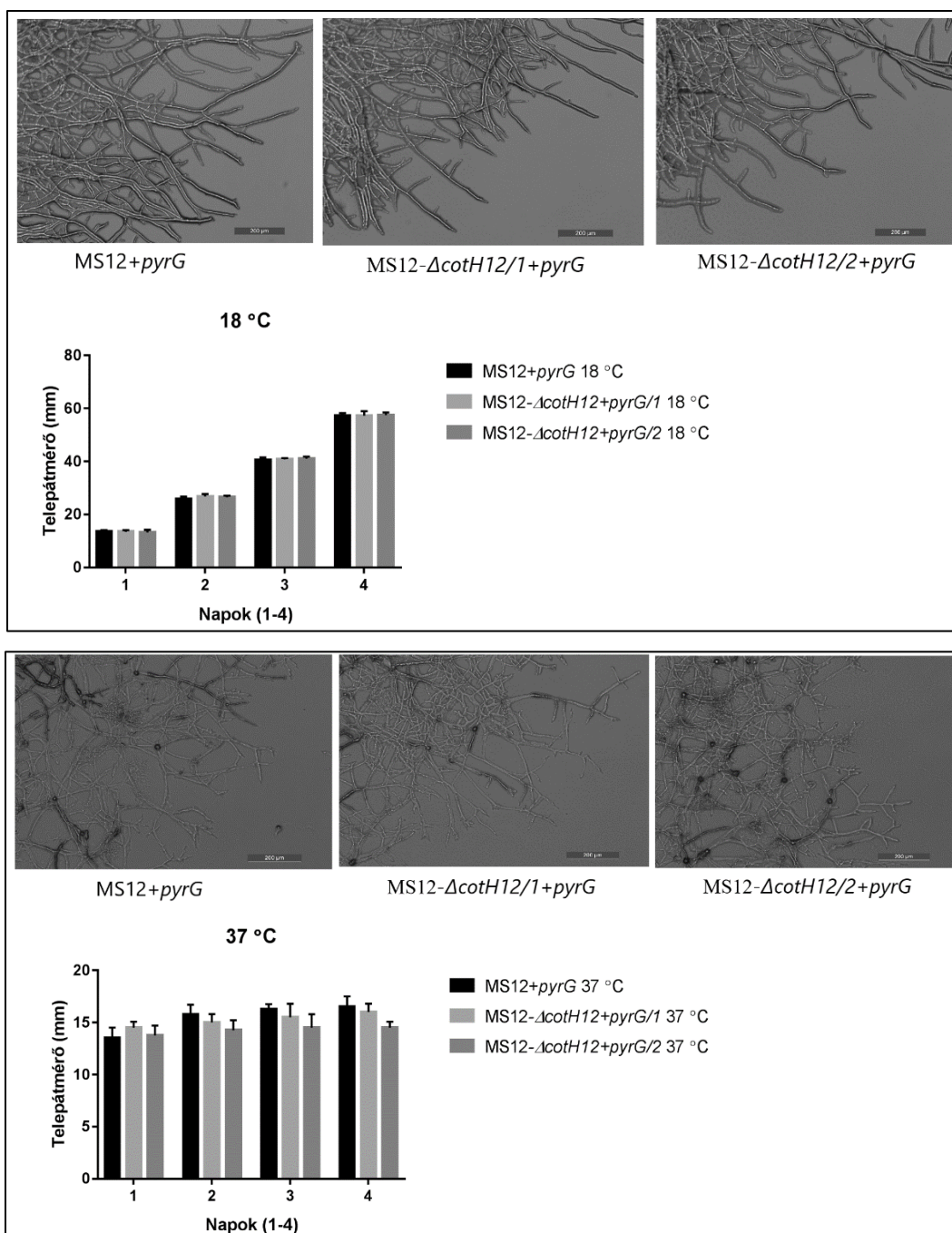


8. ábra. A Mutáns molekuláris ellenőrzése RT-qPCR segítségével. A *cotH12* gén relatív transzkripció szintje az MS12-*ΔcotH12+pyrG* izolátumokban, valamint az MS12 szülői törzsben, a *cotH12* génre tervezett specifikus indítószekvenciákat alkalmazva (1. táblázat).

5.3 Az MS12-*ΔcotH12+pyrG* törzs növekedésének vizsgálata

Egy patogén gombafaj életképességét és szaporodását a gazdaszervezetben nagyban befolyásolja az, hogy a gomba milyen mértékben tud alkalmazkodni a gazdaszervezetben uralkodó környezeti körülményekhez, ezért a mutáns törzs növekedését az optimális növekedési hőmérséklettől (25-28 °C) eltérő hőmérsékleten is megvizsgáltuk (18 °C-on és 37 °C-on). Az eltérő hőmérsékleten tenyésztett gombatelepek fiatal, elágazó hifáit négy nap elteltével fénymikroszkóppal vizsgáltuk a hifákban esetlegesen bekövetkező morfológiai változások nyomon követése érdekében (9. ábra).



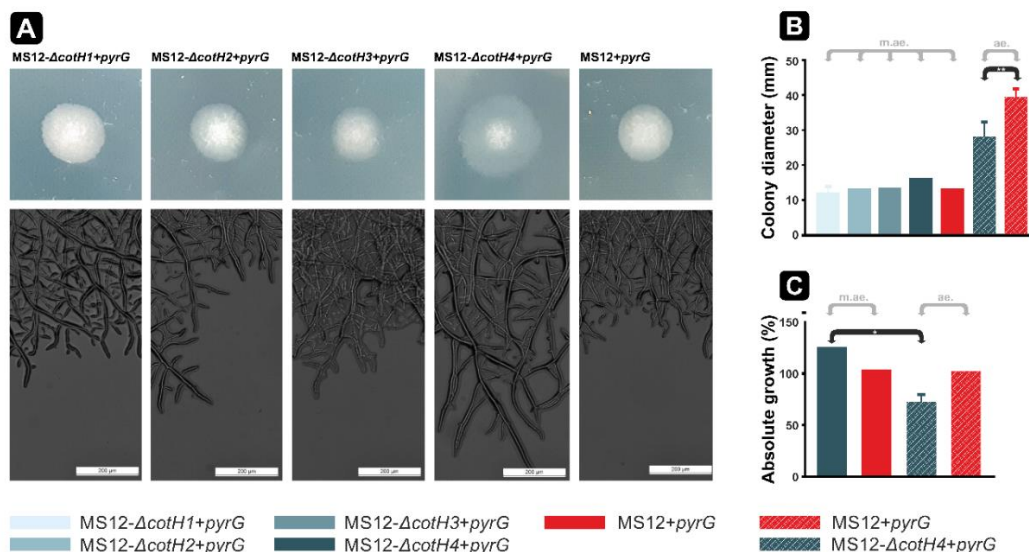


9. ábra. A mutáns törzs növekedése különböző hőmérsékleteken. A telepek átmérőjét 4 napon át, a gomba növekedési hőmérsékleti optimumán (25 °C), valamint attól eltérő hőmérsékleten (18 °C-on és 37 °C-on) 4 napon át jegyeztük fel. A szignifikancia számolást kétmintás, párosított t-próbával végeztük el, az MS12+pyrG törzshöz viszonyítva (ns).

Eredményeink alapján nem tapasztaltunk a hifák morfológiájában eltérést a kontroll törzshöz képest, valamint a mutáns törzs növekedését a környezet változó hőmérséklete nem befolyásolta.

5.4 A *cotH* diszrupciós törzsek mikroaerofil növekedési vizsgálata

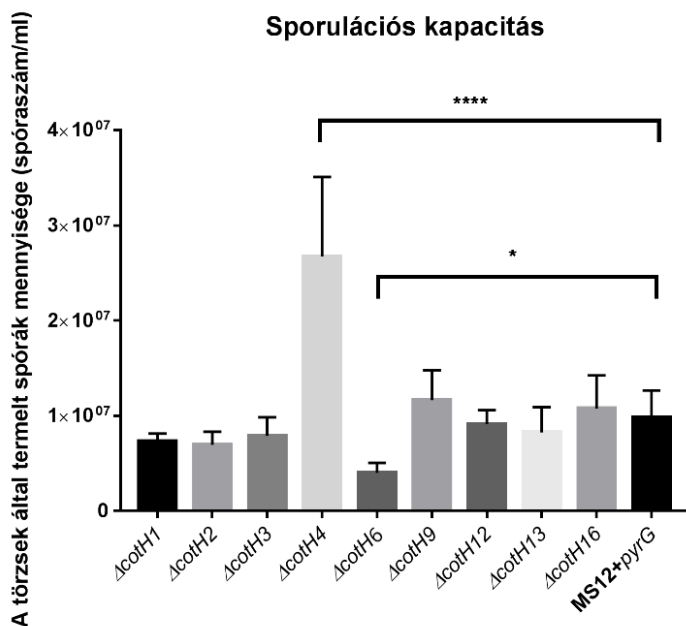
A dimorfizmus képessége sok esetben fontos tulajdonság a patogentitás szempontjából. *M. lusitanicus* esetében az élesztőszerű forma kevésbé virulens, mint a spórák vagy a hifaforma, így Lee és munkatársai felvetették a morfológiai átmenet célzó kezelésének lehetőségét kalcineurin-inhibitorok alkalmazásával (Lee és mtsi, 2013; Chibucos és mtsi. 2016). Az élesztő-hifa átmenet molekuláris mechanizmusának feltárása érdekes lehet mind a lehetséges biotechnológiai alkalmazások, mind a mucormikózis elleni védekezést célzó fejlesztések szempontjából. Korábbiakban kutatócsoportunk teljes transzkriptom analízist végzett el a *M. lusitanicus* fonalas gomba eltérő környezeti feltételek mellett történő tenyésztése során. A *cotH4* gén kifejeződése szignifikánsan magasabb volt anaerob körülmények mellett, mely előrevetítette a CotH4 fehérje jelentőségét az oxigénhiányos környezethez való alkalmazkodásban (Homa és mtsi, 2022). Mivel laboratóriumunk rendelkezik az MS12- Δ *cotH4*+*pyrG* elnevezésű, *cotH4* knock-out törzsszel (Szebenyi, 2021), így szerettük volna megvizsgálni a mutáns törzs növekedését oxigénszegény környezetben is. A telepek átmérője szignifikánsan nagyobbak bizonyult a hosszú, kevésbé elágazó hifák megjelenésének következtében (10. ábra).



10. ábra. Spóra felszíni mutánsok növekedése mikroaerofil környezetben. (A) A *cotH* mutánsok (MS12- Δ *cotH1*+*pyrG*, MS12- Δ *cotH2*+*pyrG*, MS12- Δ *cotH3*+*pyrG*, MS12- Δ *cotH4*+*pyrG*) és a kontroll MS12+*pyrG* törzs növekedése mikroaerofil (m. ae.) környezetben. (B) A törzsek telepátmérői mm-ben ábrázolva, két nap inkubációt követően, mikroaerofil körülmények között, valamint aerobiózisban (ae.). (C) Az MS12- Δ *cotH4*+*pyrG* abszolút növekedése a kontrollhoz képest mikroaerofil és aerob körülmények között. A csillaggal jelölt értékek szignifikánsan különböznek az MS12+*pyrG* törzs megfelelő értékétől a kétmintás, párosított t-próba szerint, ahol ** $P \leq 0,01$. A hibasávok a szórást (SD) jelzik.

5.5 A *cotH* diszrupciós törzsek spórázási kapacitásának vizsgálata

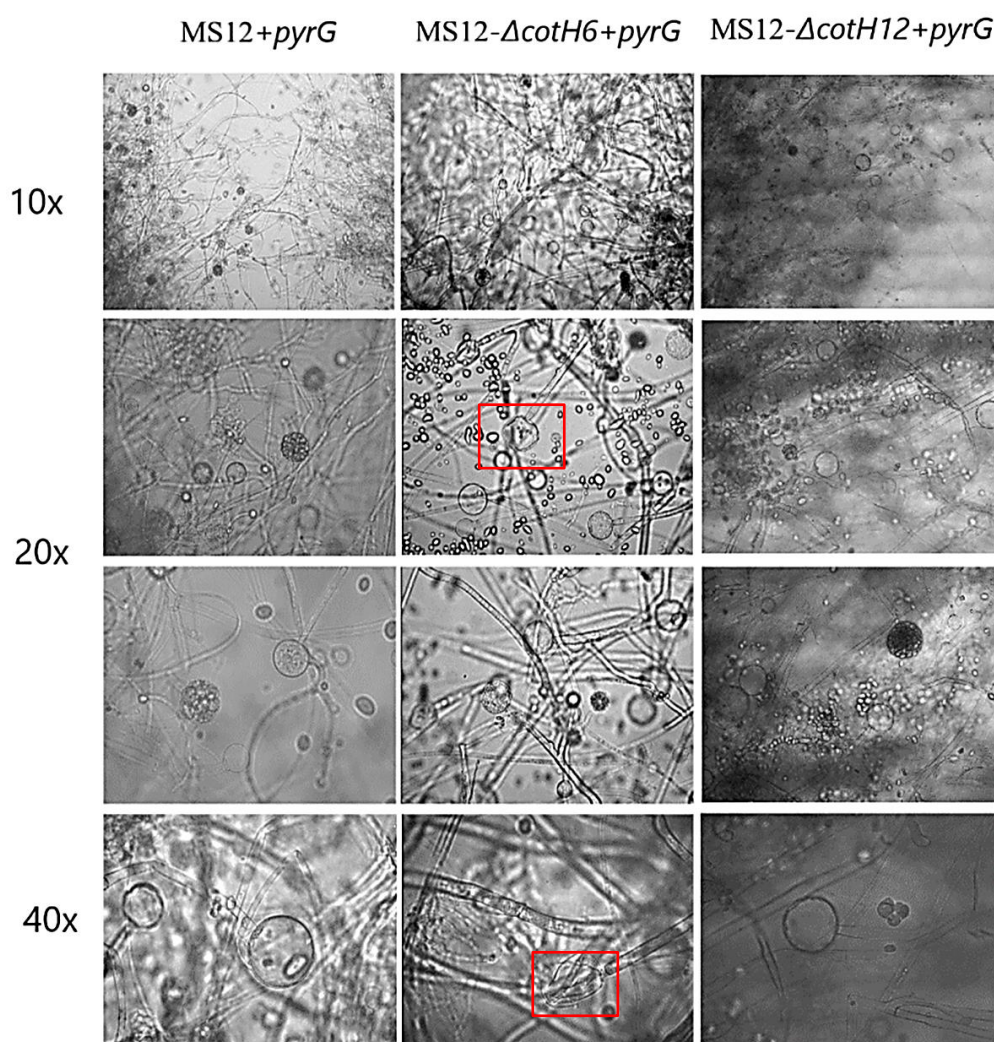
Korábbi eredményeink alapján egyes géneknek (*cotH3*, *cotH4*) jelentős szerepet tulajdonítunk a *M. lusitanicus* gomba fertőzőképessége kapcsán. Mivel szakirodalmi adatok alapján a gombaspórák tulajdonságai szoros összefüggésben állnak a gomba fertőzőképességével (Li és mtsi. 2011; Nicolás és mtsi. 2020), ezért a kísérletünk során a *cotH* mutánsok spórázási kapacitást is megvizsgáltuk a *cotH* diszrupciós könyvtár tagjainak (MS12- $\Delta cotH1$ +*pyrG*, MS12- $\Delta cotH2$ +*pyrG*, MS12- $\Delta cotH3$ +*pyrG*, MS12- $\Delta cotH4$ +*pyrG*, MS12- $\Delta cotH6$ +*pyrG*, MS12- $\Delta cotH19$ +*pyrG*, MS12- $\Delta cotH12$ +*pyrG*, MS12- $\Delta cotH13$ +*pyrG*, MS12- $\Delta cotH16$ +*pyrG*) bevonásával. Kísérletünk során két olyan *cotH* mutánst azonosítottunk, melyek eltérő sporulációs kapacitással bírtak a kontrollhoz képest (**11. ábra**). A 7 napos tenyésztést követően a MS12- $\Delta cotH4$ +*pyrG* szignifikánsan több, a MS12- $\Delta cotH6$ +*pyrG* törzs kevesebb spórát hozott létre. Mindezek alapján úgy gondoljuk a *CotH4*, valamint a *CotH6* géneknek jelentős szerepe van a *M. lusitanicus* fonalas gomba sporulációs folyamataiban.



11. ábra. A *cotH* mutánsok spóráképző képessége. A sporulációs kapacitás vizsgálatát 7 napos tenyészetek spóraszámának meghatározásával végeztük. A szignifikancia számolást kétmintás, párosított t-próbával végeztük el, az MS12+*pyrG* törzshöz viszonyítva, ahol *: $p \leq 0,05$ és ****: $p \leq 0,0001$. A hibasávok a szórást (SD) jelzik.

5.6 *Mucor lusitanicus* sporangiumainak vizsgálata fénymikroszkóppal

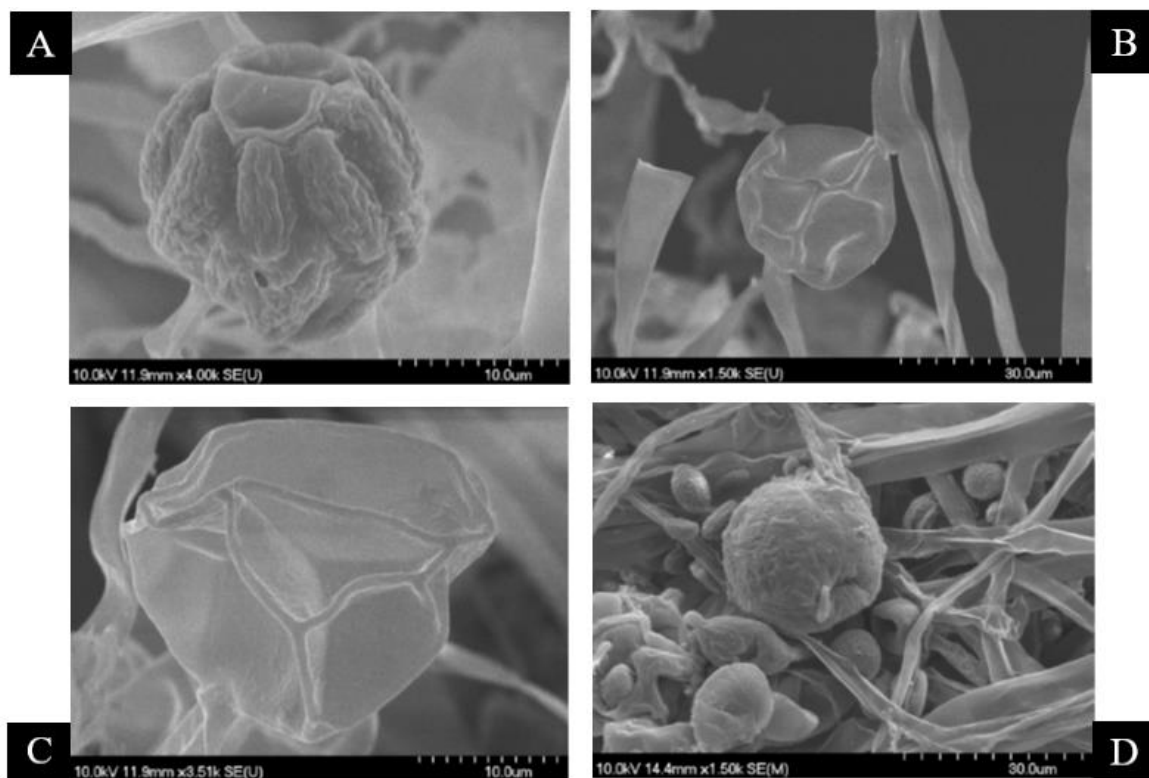
Tekintettel arra, hogy az MS12- Δ *cotH4*+*pyrG*, valamint az MS12- Δ *cotH6*+*pyrG* mutáns spóráképzési kapacitása szignifikánsan eltért a kontrollétól, szeretnénk volna megvizsgálni a spórák képződésének helyét, a sporangiumot. A fénymikroszkópos vizsgálatok eredménye alapján az MS12- Δ *cotH6*+*pyrG* mutáns törzs sporangiumainak cirkularitása, valamint falának integritása eltér a kontroll törzsetől. Az MS12- Δ *cotH4*+*pyrG*, valamint az MS12- Δ *cotH12*+*pyrG* mutáns esetében nem találtunk változásokat a sporangiumok morfológiájában.



12. ábra. *CotH* mutánsok sporangiumainak fénymikroszkópos képe. *Mucor lusitanicus* MS12+*pyrG* és MS12- Δ *cotH6*+*pyrG* és MS12- Δ *cotH12*+*pyrG* sporangiumainak fénymikroszkópos képe, különböző nagyításokban (10x, 20x, 40x).

5.7 *CotH* mutáns törzsek vizsgálata SEM segítségével

Mivel a fénymikroszkópos vizsgálatok alkalmával az MS12-*ΔcotH6+pyrG* mutáns esetében a kontrollhoz (MS12+*pyrG*) képest eltéréseket detektáltunk a sporangiospórák szerkezetében, pásztázó elektronmikroszkóp (SEM-scanning electron microscopy) segítségével igyekeztünk nagyobb felbontásban vizsgálni az ivartalan szaporítóképletek felszínét (**13. ábra**).

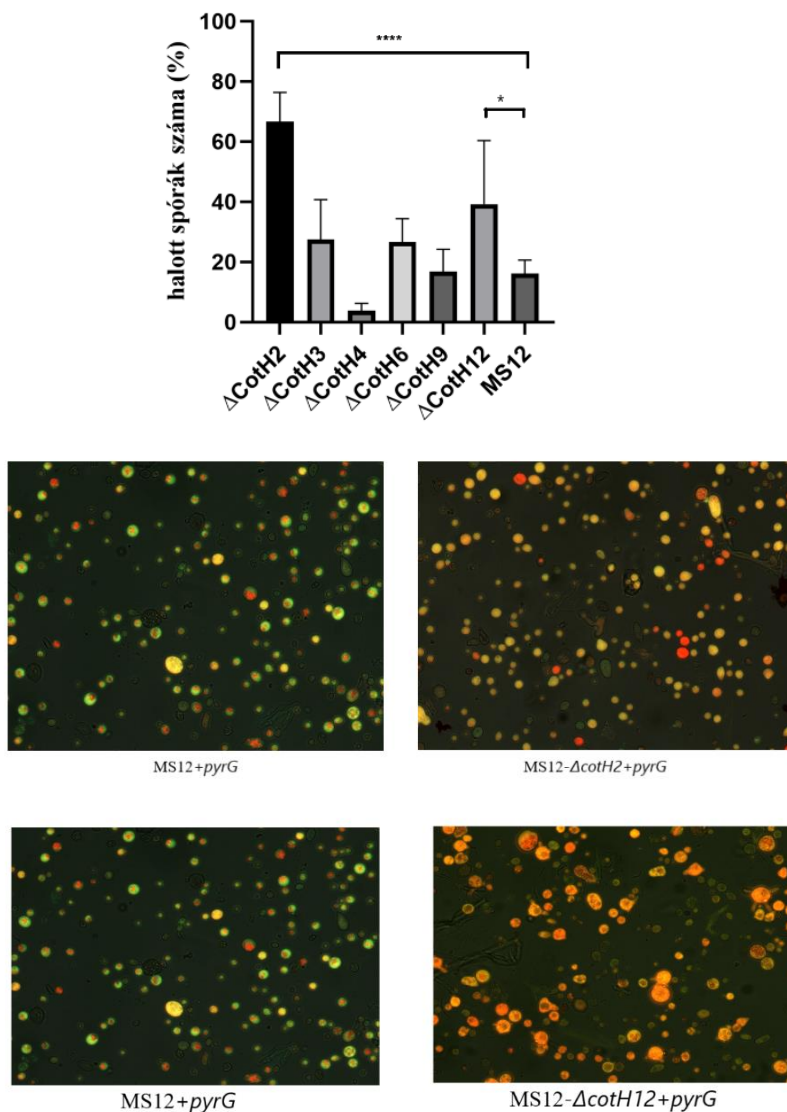


13. ábra. *Mucor lusitanicus* sporangiumainak SEM általi képe. A) és D) ábrán az MS12+*pyrG* sporangiumai láthatóak. Az A) és C) képeken a méretskála 10 µm-nek felel meg. A B) és D) képen a méretskála 30 µm-nek felel meg. C) és B) képen MS12-*ΔcotH6+pyrG* sporangiumai láthatóak.

Amennyiben a CotH6 fehérje hiánya miatt a sporangiumok falának szilárdsága elvész, a meggyengült falú sporangiumok elveszíthetik szférikus alakjukat a felszálló alkoholsorral történő kezelés hatására, ennél fogva pedig kialakulhat a SEM képeken látható fenotípus. A jellegzetes fenotípus egy másik lehetséges magyarázata, hogy CotH6 fehérje hiányában a sporangiumokban kevesebb spóra képződik, így a rendelkezésre álló teret nem töltik ki. Ezt a feltételezést alátámaszthatja a sporulációs vizsgálatok során tett megállapításunk, miszerint az említett mutáns törzs szignifikánsan kevesebb spórát képezett a kontrollhoz képest.

5.8 A mutáns törzsek spóráinak életképesség vizsgálata

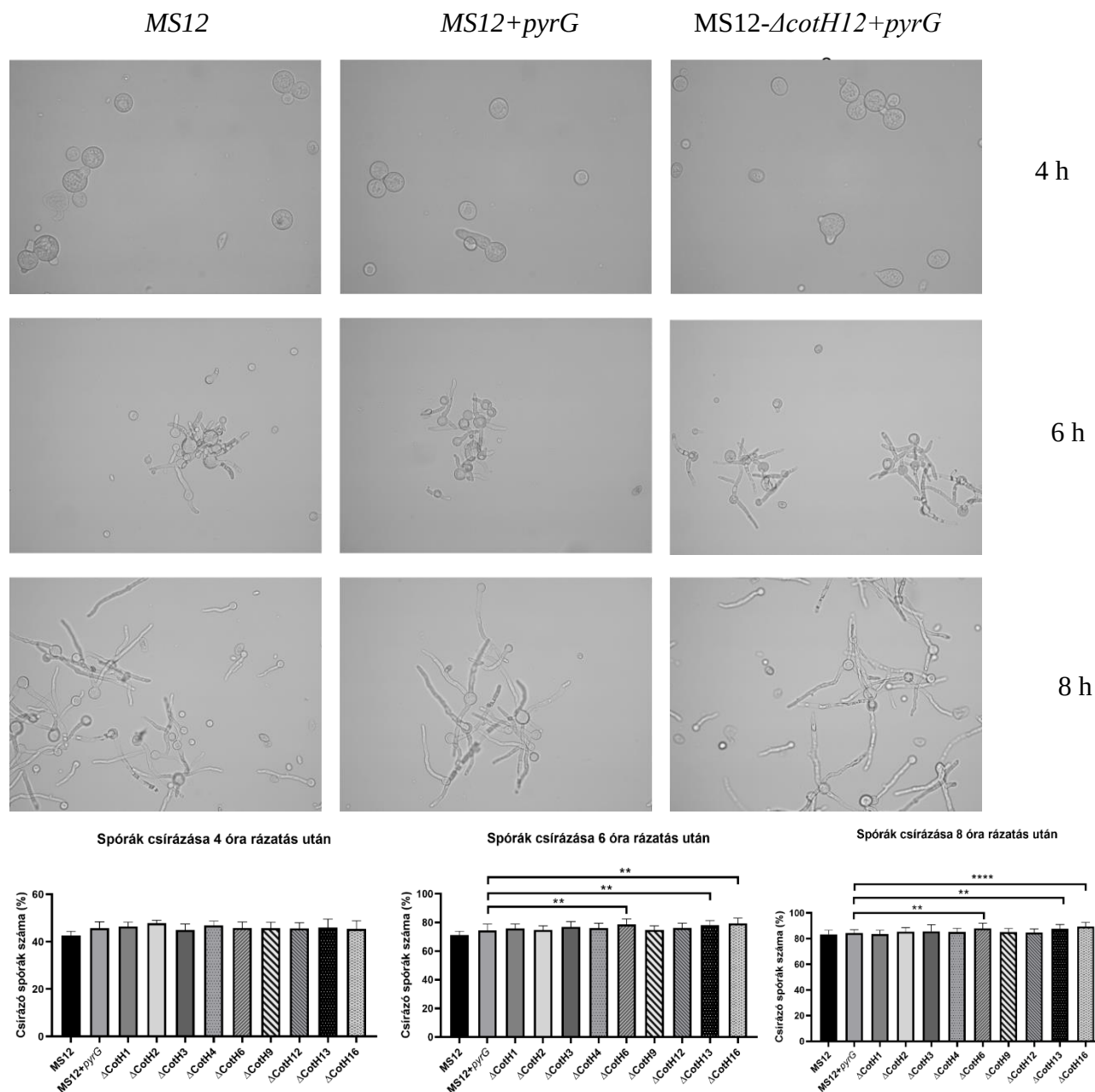
A gombasejtek életképességét FUN1 festékekkel, majd fluoreszcens mikroszkóp segítségével követtük nyomon. Ez a festék passzív diffúzióval képes bejutni a citoplazmába és ott a metabolikusan aktív vakuólumokat pirosra, míg a metabolikusan inaktívakat narancssárgás-zöldre festeni. Két olyan törzset azonosítottunk, melyek esetében a spórák életképessége szignifikánsan eltért a kontrollhoz (MS12+*pyrG*) képest: az MS12- Δ *cotH2*+*pyrG* és az MS12- Δ *cotH12*+*pyrG*. Mindkét törzs esetében szignifikánsan csökkent a gombaspórák életképessége (14. ábra).



14. ábra. *CotH* mutáns törzsek spóráinak életképesség vizsgálata. A gombaspórák fluoreszcens mikroszkópos képe FUN-1 festést követően, 20x nagyításban. Az alkalmazott fluoreszcens csatornák a DY-590 (581 nm-598 nm), valamint a Sodium Green voltak (507 nm-532 nm).

5.9 Az MS12- Δ cotH12+pyrG mutáns csírázási képessége

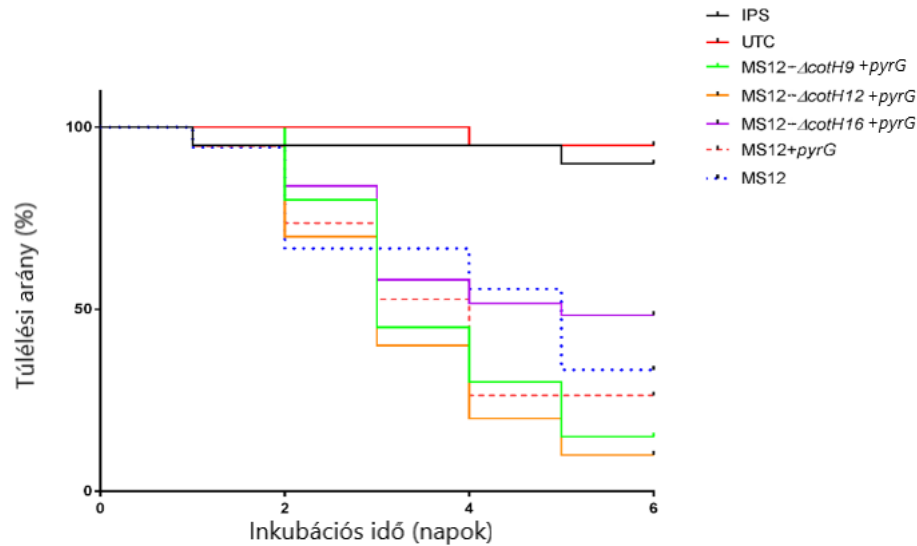
Az MS12- Δ cotH12+pyrG mutáns csírázási képességét megvizsgálva azt tapasztaltuk, hogy bár a spórák életképessége szignifikánsan lecsökkent, ez magát a csírázási folyamatot nem befolyásolta. Sem a csíratömlők morfológiájában, sem pedig a csírázási intenzitásban nem találtunk eltérést a kontrollhoz képest (15. ábra).



15. ábra. Az MS12- Δ cotH12+pyrG mutáns csírázási képessége DMEM tápoldatban. A csírázás intenzitását a 4., 6., és 8. órában vizsgáltuk, 20x nagyításban. Kontrollként az MS12, valamint MS12+pyrG törzseket alkalmaztuk.

5.10 Diszrupciós törzsek vizsgálata *Galleria mellonella* modellben

G. mellonella, nagy viasmoly lárva modell szervezet segítségével vizsgáltuk a *CotH* fehérjék patogenitásában betöltött szerepét. A kísérlet során a lárvákat MS12+*pyrG*, valamint *cotH* mutáns törzsekkel fertőztük meg, majd monitoroztuk azok túlélését. Eredményeink alapján az általunk létrehozott új MS12-*ΔcotH12*+*pyrG* mutáns hasonló virulenciát mutatott, mint a kontroll törzs (16. ábra).



16. ábra. A *cotH* gének patogenitásának vizsgálata *Galleria mellonella* modellben. A különbségek szignifikanciájának kiszámítását Log-rank (Mantel-Cox) teszttel végeztük, az MS12+*pyrG* törzshöz viszonyítva (ns). Kezeletlen kontrollként IPS-t alkalmaztunk (fekete vonal).

6 Összefoglalás

A mucormikózis a Mucorales rend fajai által kiváltott invazív megbetegedés, mely jelentős morbiditással és mortalitással társul. A *Mucorales* fajok a betegség kezdeti szakaszában lokalizált fertőzést váltanak ki, de gyors lefolyással invazív lágyrész-, orr-, orbitális, gasztrointesztinális vagy tüdőfertőzéseké fejlődhetnek (Petrikos és mtsi. 2012; Boroujeni és mtsi. 2021). Mivel a fertőzés leggyakrabban a gombaspórák közvetítésével valósul meg, dolgozatomban a *Mucor lusitanicus* sporangiospóráinak tanulmányozásával kerestem a választ arra, hogy azon CotH proteinek, amelyek nem tipikusan CotH-motívum hordozók, mely módon befolyásolják a gomba élettani folyamatait és részt vesznek-e a gomba patogenitási folyamataiban.

Annak érdekében, hogy a meglévő mutánsparkot bővítsem, létrehoztam egy diszrupciós *cotH* mutáns törzset CRISPR-Cas9 rendszer segítségével, melyet MS12-*ΔcotH12+pyrG* névvel láttunk el. E diszrupciós törzs morfológiai vizsgálatát elvégezve azt tapasztaltuk, hogy a CotH12 protein hiánya nem befolyásolta a gomba növekedését sem az optimális, sem attól eltérő hőmérsékleten való tenyésztés során. A CotH12 protein feltehetőleg nem befolyásolta a gomba növekedését, hifáinak morfológiáját, sem a gombaspórák csírázási, valamint sporulációs képességét. Hiányában azonban a *M. lusitanicus* aszexuális spóráinak életképessége szignifikánsan lecsökkent a kontrollhoz képest. A mutáns törzs patogenitási képességét egyéb más *cotH* mutánsok bevonása mellett, *in vivo* *Galleria mellonella* modellben vizsgáltam, ahol azt tapasztaltuk, hogy az általunk vizsgált spóra felszíni proteinek nem elengedhetetlenek a gombának a fertőzési folyamatok során. Feladataim között szerepelt továbbá a laboratóriumunkban előállított mutáns törzsek további vizsgálata, annak érdekében, hogy a *knock-out* törzsek fenotípusaiban bekövetkező esetleges változásokra fény derüljön. Így tudtam azonosítani két, a spórázási kapacitásban eltérő mutánst (MS12-*ΔcotH4+pyrG* és MS12-*ΔcotH6+pyrG*), valamint feltárni a CotH6 protein sporangiumok kialakításában betöltött szerepét. Bizonyítottuk továbbá, hogy a CotH4 protein szerepet játszik a gomba növekedésében mikroaerofil környezetben. Eredményeim alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy a CotH fehérjecsald széleskörű funkcióval bír, s nem csak a gomba patogenitási folyamataiban, hanem fiziológiai és élettani folyamataiban is jelentős szerepet játszik.

További terveink között szerepel a jelenleg rendelkezésünkre álló *cotH* mutánsok *in vivo* interakcióban való vizsgálata J774.2 makrofágokkal, ugyanis a makrofágok és a neutrofilek a korai immunválasz részeként a mucormikózis elleni védekezés alapját képezik.

7 Irodalomjegyzék

- [1] Alcalde E, Cerdá-Olmedo E, Al-Babili S. Apocarotenoids produced from β -carotene by dioxygenases from *Mucor circinelloides*. *Microbiology (Reading)*. 2019;165(4):433-438. doi:10.1099/mic.0.000762
- [2] Andrianaki AM, Kyrmizi I, Thanopoulou K, et al. Iron restriction inside macrophages regulates pulmonary host defense against *Rhizopus* species [published correction appears in *Nat Commun*. 2018 Nov 22;9(1):5015]. *Nat Commun*. 2018;9(1):3333. Published 2018 Aug 20. doi:10.1038/s41467-018-05820-2
- [3] Baldin C, Soliman SSM, Jeon HH, et al. PCR-Based Approach Targeting Mucorales-Specific Gene Family for Diagnosis of Mucormycosis. *J Clin Microbiol*. 2018;56(10):e00746-18. Published 2018 Sep 25. doi:10.1128/JCM.00746-18
- [4] Benito EP, Díaz-Mínguez JM, Iturriaga EA, Campuzano V, Eslava AP. Cloning and sequence analysis of the *Mucor circinelloides* pyrG gene encoding orotidine-5'-monophosphate decarboxylase: use of pyrG for homologous transformation. *Gene*. 1992;116(1):59-67. doi:10.1016/0378-1119(92)90629-4
- [5] Borjian Boroujeni Z, Shamsaei S, Yarahmadi M, et al. Distribution of invasive fungal infections: Molecular epidemiology, etiology, clinical conditions, diagnosis and risk factors: A 3-year experience with 490 patients under intensive care. *Microb Pathog*. 2021;152:104616. doi:10.1016/j.micpath.2020.104616
- [6] Calo S, Nicolás FE, Lee SC, et al. A non-canonical RNA degradation pathway suppresses RNAi-dependent epimutations in the human fungal pathogen *Mucor circinelloides*. *PLoS Genet*. 2017;13(3):e1006686. Published 2017 Mar 24. doi:10.1371/journal.pgen.1006686
- [7] Casadevall A, Pirofski LA. Immunoglobulins in defense, pathogenesis, and therapy of fungal diseases. *Cell Host Microbe*. 2012;11(5):447-456. doi:10.1016/j.chom.2012.04.004
- [8] Chakrabarti A, Singh R. Mucormycosis in India: unique features. *Mycoses*. 2014;57 Suppl 3:85-90. doi:10.1111/myc.12243
- [9] Chander J, Singla N, Kaur M, et al. *Saksenaea erythrospora*, an emerging mucoralean fungus causing severe necrotizing skin and soft tissue infections - a study from a tertiary care hospital in north India. *Infect Dis (Lond)*. 2017;49(3):170-177. doi:10.1080/23744235.2016.1239027
- [10] Chayakulkeeree M, Ghannoum MA, Perfect JR. Zygomycosis: the re-emerging fungal infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2006;25(4):215-229. doi:10.1007/s10096-006-0107-1
- [11] Cheng VC, Chan JF, Ngan AH, et al. Outbreak of intestinal infection due to *Rhizopus microsporus*. *J Clin Microbiol*. 2009;47(9):2834-2843. doi:10.1128/JCM.00908-09
- [12] Chibucos MC, Soliman S, Gebremariam T, et al. An integrated genomic and transcriptomic survey of mucormycosis-causing fungi. *Nat Commun*. 2016;7:12218. Published 2016 Jul 22. doi:10.1038/ncomms12218
- [13] Cornely OA, Alastruey-Izquierdo A, Arenz D, et al. Global guideline for the diagnosis and management of mucormycosis: an initiative of the European Confederation of Medical Mycology in cooperation with the Mycoses Study Group Education and Research Consortium. *Lancet Infect Dis*. 2019;19(12):e405-e421. doi:10.1016/S1473-3099(19)30312-3
- [14] Corrochano LM, Garre V. Photobiology in the Zygomycota: multiple photoreceptor genes for complex responses to light. *Fungal Genet Biol*. 2010;47(11):893-899. doi:10.1016/j.fgb.2010.04.007

- [15] Dankai W, Pongpom M, Vanittanakom N. Validation of reference genes for real-time quantitative RT-PCR studies in *Talaromyces marneffe*. *J Microbiol Methods*. 2015;118:42-50. doi:10.1016/j.mimet.2015.08.015
- [16] DOGGETT J.S. & WONG B. (2014) Mucormycosis. In: *Endocrine emergencies*. Loriaux L. (ed.), pp. 57–63.
- [17] Dogra S, Arora A, Aggarwal A, et al. Mucormycosis Amid COVID-19 Crisis: Pathogenesis, Diagnosis, and Novel Treatment Strategies to Combat the Spread. *Front Microbiol*. 2022;12:794176. Published 2022 Jan 4. doi:10.3389/fmicb.2021.794176
- [18] Fazili ABA, Shah AM, Zan X, et al. *Mucor circinelloides*: a model organism for oleaginous fungi and its potential applications in bioactive lipid production. *Microb Cell Fact*. 2022;21(1):29. Published 2022 Feb 28. doi:10.1186/s12934-022-01758-9
- [19] Field KJ, Rimington WR, Bidartondo MI, et al. First evidence of mutualism between ancient plant lineages (Haplomitriopsida liverworts) and Mucoromycotina fungi and its response to simulated Palaeozoic changes in atmospheric CO₂. *New Phytol*. 2015;205(2):743-756. doi:10.1111/nph.13024
- [20] Gebremariam T, Alkhazraji S, Soliman SSM, et al. Anti-CotH3 antibodies protect mice from mucormycosis by prevention of invasion and augmenting opsonophagocytosis. *Sci Adv*. 2019;5(6):eaaw1327. Published 2019 Jun 12. doi:10.1126/sciadv.aaw1327
- [21] Gebremariam T, Liu M, Luo G, et al. CotH3 mediates fungal invasion of host cells during mucormycosis. *J Clin Invest*. 2014;124(1):237-250. doi:10.1172/JCI71349
- [22] Gumashta J, Gumashta R. COVID19 associated mucormycosis: Is GRP78 a possible link?. *J Infect Public Health*. 2021;14(10):1351-1357. doi:10.1016/j.jiph.2021.09.004
- [23] Gupta MK, Kumar N, Dhameja N, Sharma A, Tilak R. Laboratory diagnosis of mucormycosis: Present perspective. *J Family Med Prim Care*. 2022;11(5):1664-1671. doi:10.4103/jfmpc.jfmpc_1479_21
- [24] Hoffmann K, Discher S, Voigt K. Revision of the genus *Absidia* (Mucorales, Zygomycetes) based on physiological, phylogenetic, and morphological characters; thermotolerant *Absidia* spp. form a coherent group, Mycocladiaceae fam. nov. *Mycol Res*. 2007;111(Pt 10):1169-1183. doi:10.1016/j.mycres.2007.07.002
- [25] Homa M, Ibragimova S, Szebenyi C, et al. Differential Gene Expression of *Mucor lusitanicus* under Aerobic and Anaerobic Conditions. *J Fungi (Basel)*. 2022;8(4):404. Published 2022 Apr 15. doi:10.3390/jof8040404
- [26] Horton P, Park KJ, Obayashi T, et al. WoLF PSORT: protein localization predictor. *Nucleic Acids Res*. 2007;35(Web Server issue):W585-W587. doi:10.1093/nar/gkm259
- [27] Isticato R, Sirec T, Giglio R, et al. Flexibility of the programme of spore coat formation in *Bacillus subtilis*: bypass of CotE requirement by over-production of CotH. *PLoS One*. 2013;8(9):e74949. Published 2013 Sep 27. doi:10.1371/journal.pone.0074949
- [28] Iturriaga E A, VELAYOS A, ESLAVA AP (2000) Structure and function of genes involved in the biosynthesis of carotenoids in the Mucorales. *Biotechnol. Bioprocess Eng*. 5:263- 274.
- [29] Iturriaga E A, VELAYOS A, ESLAVA AP, ALVAREZ MI (2001) The genetics and molecular biology of carotenoid biosynthesis in *Mucor*. *Recent Res. Dev. Genet*. 1:79-92.
- [30] Iturriaga EA, Díaz-Mínguez JM, Benito EP, Alvarez MI, Eslava AP Heterologous transformation of *Mucor circinelloides* with the *Phycomyces blakeslee* *leu1* gene. *Curr Genet*. 1992;21(3):215-223. doi:10.1007/BF00336844

- [31] Jeong W, Keighley C, Wolfe R, et al. The epidemiology and clinical manifestations of mucormycosis: a systematic review and meta-analysis of case reports. *Clin Microbiol Infect.* 2019;25(1):26-34. doi:10.1016/j.cmi.2018.07.011
- [32] Jorens PG, Boelaert JR, Halloy V, Zamora R, Schneider YJ, Herman AG. Human and rat macrophages mediate fungistatic activity against *Rhizopus* species differently: in vitro and ex vivo studies. *Infect Immun.* 1995;63(11):4489-4494. doi:10.1128/iai.63.11.4489-4494.1995
- [33] LANTERNIER F., SUN H.Y., RIBAUD P., SINGH N., KONTOYIANNIS D.P. és mtsi. (2012) Mucormycosis in organ and stem cell transplant recipients. *Clin. Infect. Dis.* 54(11):1–8.
- [34] Lax C, Pérez-Arques C, Navarro-Mendoza MI, et al. Genes, Pathways, and Mechanisms Involved in the Virulence of Mucorales. *Genes (Basel).* 2020;11(3):317. Published 2020 Mar 16. doi:10.3390/genes11030317
- [35] Lee SC, Li A, Calo S, et al. Calcineurin orchestrates dimorphic transitions, antifungal drug responses and host-pathogen interactions of the pathogenic mucoralean fungus *Mucor circinelloides*. *Mol Microbiol.* 2015;97(5):844-865. doi:10.1111/mmi.13071
- [36] Li CH, Cervantes M, Springer DJ, et al. Sporangiospore size dimorphism is linked to virulence of *Mucor circinelloides*. *PLoS Pathog.* 2011;7(6):e1002086. doi:10.1371/journal.ppat.1002086
- [37] Liu M, Spellberg B, Phan QT, et al. The endothelial cell receptor GRP78 is required for mucormycosis pathogenesis in diabetic mice. *J Clin Invest.* 2010;120(6):1914-1924. doi:10.1172/JCI42164
- [38] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods.* 2001;25(4):402-408. doi:10.1006/meth.2001.1262
- [39] Logan A, Wolfe A, Williamson JC. Antifungal Resistance and the Role of New Therapeutic Agents. *Curr Infect Dis Rep.* 2022;24(9):105-116. doi:10.1007/s11908-022-00782-5
- [40] López-Fernández L, Sanchis M, Navarro-Rodríguez P, et al. Understanding *Mucor circinelloides* pathogenesis by comparative genomics and phenotypical studies. *Virulence.* 2018;9(1):707-720. doi:10.1080/21505594.2018.1435249
- [41] Lu XL, Najafzadeh MJ, Dolatabadi S, et al. Taxonomy and epidemiology of *Mucor irregularis*, agent of chronic cutaneous mucormycosis. *Persoonia.* 2013;30:48-56. doi:10.3767/003158513X665539
- [42] Mansoor S, Ahmed TI, Happa K, Sultan M, Manhas S, Shamas S. Spectrum of Mucormycosis Before and During COVID-19: Epidemiology, Diagnosis, and Current Therapeutic Interventions [published online ahead of print, 2022 Aug 10]. *Curr Fungal Infect Rep.* 2022;1-12. doi:10.1007/s12281-022-00438-w
- [43] Marshall OJ, PerlPrimer: cross-platform, graphical primer design for standard, bisulphite and real-time PCR. *Bioinformatics.* 2004;20(15):2471-2472. doi:10.1093/bioinformatics/bth254
- [44] Maurer E, Hörtnagl C, Lackner M, et al. *Galleria mellonella* as a model system to study virulence potential of mucormycetes and evaluation of antifungal treatment. *Med Mycol.* 2019;57(3):351-362. doi:10.1093/mmy/myy042
- [45] Morales-Franco B, Nava-Villalba M, Medina-Guerrero EO, et al. Host-Pathogen Molecular Factors Contribute to the Pathogenesis of *Rhizopus* spp. in Diabetes Mellitus. *Curr Trop Med Rep.* 2021;8(1):6-17. doi:10.1007/s40475-020-00222-1

- [46] Moriwaki-Takano M, Iwakura R, Hoshino K. Dimorphic Mechanism on cAMP Mediated Signal Pathway in *Mucor circinelloides*. *Appl Biochem Biotechnol*. 2021;193(5):1252-1265. doi:10.1007/s12010-020-03342-6
- [47] Mudgal S, Rao S, Pai MO. Mucormycosis: A comparative update between conventional and molecular diagnosis strategies. *Curr Med Mycol*. 2022;8(1):44-53. doi:10.18502/cmm.8.1.9214
- [48] Naclerio G, Baccigalupi L, Zilhao R, De Felice M, Ricca E. Bacillus subtilis spore coat assembly requires cotH gene expression [published correction appears in J Bacteriol. 1996 Nov;178(21):6407]. *J Bacteriol*. 1996;178(15):4375-4380. doi:10.1128/jb.178.15.4375-4380.1996
- [49] Nagy G, Farkas A, Csérnetics Á, et al. Transcription of the three HMG-CoA reductase genes of *Mucor circinelloides*. *BMC Microbiol*. 2014;14:93. Published 2014 Apr 14. doi:10.1186/1471-2180-14-93
- [50] Nagy G, Kiss S, Varghese R, et al. 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. Published 2021 Apr 14. doi:10.3389/fcimb.2021.660347
- [51] Navarro E, Niemann N, Kock D, et al. The DASH-type Cryptochrome from the Fungus *Mucor circinelloides* Is a Canonical CPD-Photolyase. *Curr Biol*. 2020;30(22):4483-4490.e4. doi:10.1016/j.cub.2020.08.051
- [52] Naz T, Nosheen S, Li S, et al. Comparative Analysis of β -Carotene Production by *Mucor circinelloides* Strains CBS 277.49 and WJ11 under Light and Dark Conditions. *Metabolites*. 2020;10(1):38. Published 2020 Jan 16. doi:10.3390/metabo10010038
- [53] Neofytos D, Horn D, Anaissie E, et al. Epidemiology and outcome of invasive fungal infection in adult hematopoietic stem cell transplant recipients: analysis of Multicenter Prospective Antifungal Therapy (PATH) Alliance registry [published correction appears in Clin Infect Dis. 2009 Mar 1;48(5):690]. *Clin Infect Dis*. 2009;48(3):265-273. doi:10.1086/595846
- [54] Nguyen KB, Sreelatha A, Durrant ES, et al. Phosphorylation of spore coat proteins by a family of atypical protein kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113(25):E3482-E3491. doi:10.1073/pnas.1605917113
- [55] Nicolás FE, Murcia L, Navarro E, Navarro-Mendoza MI, Pérez-Arques C, Garre V. Mucorales Species and Macrophages. *J Fungi (Basel)*. 2020;6(2):94. Published 2020 Jun 26. doi:10.3390/jof6020094
- [56] Papp T, Velayos A, Bartók T, Eslava AP, Vágvölgyi C, Iturriaga EA. Heterologous expression of astaxanthin biosynthesis genes in *Mucor circinelloides*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2006;69(5):526-531. doi:10.1007/s00253-005-0026-6
- [57] Patiño-Medina JA, Reyes-Mares NY, Valle-Maldonado MI, et al. Heterotrimeric G-alpha subunits Gpa11 and Gpa12 define a transduction pathway that control spore size and virulence in *Mucor circinelloides*. *PLoS One*. 2019;14(12):e0226682. Published 2019 Dec 30. doi:10.1371/journal.pone.0226682
- [58] Pérez-Arques C, Navarro-Mendoza MI, Murcia L, et al. *Mucor circinelloides* Thrives inside the Phagosome through an Atf-Mediated Germination Pathway. *mBio*. 2019;10(1):e02765-18. Published 2019 Feb 5. doi:10.1128/mBio.02765-18
- [59] Petrikos G, Skiada A, Lortholary O, Roilides E, Walsh TJ, Kontoyiannis DP. Epidemiology and clinical manifestations of mucormycosis. *Clin Infect Dis*. 2012;54 Suppl 1:S23-S34. doi:10.1093/cid/cir866

- [60] Pozo Laderas JC, Pontes Moreno A, Pozo Salido C, Robles Arista JC, Linares Sicilia MJ. Mucormycosis diseminadas en pacientes sin inmunodeficiencias: una enfermedad que también existe [Disseminated mucormycosis in immunocompetent patients: A disease that also exists]. *Rev Iberoam Micol.* 2015;32(2):63-70. doi:10.1016/j.riam.2014.01.006
- [61] Prakash H, Chakrabarti A. Global Epidemiology of Mucormycosis. *J Fungi (Basel)*. 2019;5(1):26. Published 2019 Mar 21. doi:10.3390/jof5010026
- [62] Prakash H, Ghosh AK, Rudramurthy SM, et al. The environmental source of emerging *Apophysomyces variabilis* infection in India. *Med Mycol.* 2016;54(6):567-575. doi:10.1093/mmy/myw014
- [63] Prasad PA, Vaughan AM, Zaoutis TE. Trends in zygomycosis in children. *Mycoses.* 2012;55(4):352-356. doi:10.1111/j.1439-0507.2011.02124.x
- [64] Roilides E, Zaoutis TE, Walsh TJ. Invasive zygomycosis in neonates and children. *Clin Microbiol Infect.* 2009;15 Suppl 5:50-54. doi:10.1111/j.1469-0691.2009.02981.x
- [65] 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
- [66] Schipper MAA, On certain species of *Mucor* with a key to all accepted species. *Stud. Mycol.* 1978, 17, 1–52
- [67] Schmidt S, Tramsen L, Perkhof S, et al. *Rhizopus oryzae* hyphae are damaged by human natural killer (NK) cells, but suppress NK cell mediated immunity. *Immunobiology.* 2013;218(7):939-944. doi:10.1016/j.imbio.2012.10.013
- [68] Skiada A, Drogari-Apiranthitou M, Pavleas I, Daikou E, Petrikos G. Global Cutaneous Mucormycosis: A Systematic Review. *J Fungi (Basel)*. 2022;8(2):194. Published 2022 Feb 16. doi:10.3390/jof8020194
- [69] Speth C, Rambach G, Lass-Flörl C. Platelet immunology in fungal infections. *Thromb Haemost.* 2014;112(4):632-639. doi:10.1160/TH14-01-0074
- [70] Szebenyi, Csilla Spórafelszíni fehérjéket kódoló gének jellemzése *Mucor circinelloides*-ben [Characterization of genes encoding spore surface proteins in *Mucor circinelloides*] 138 p. Szegedi Tudományegyetem, Biológia Doktori Iskola, Papp Tamás Nagy Gábor Disszertáció benyújtásának éve: 2020, Védés éve: 2021 Megjelenés/Fokozatszerzés éve: 2021
- [71] Szebenyi C, Gu Y, Gebremariam T, et al. *cotH* Genes Are Necessary for Normal Spore Formation and Virulence in *Mucor lusitanicus* [published online ahead of print, 2023 Jan 10]. *mBio.* 2023;e0338622. doi:10.1128/mbio.03386-22
- [72] Szewczyk E, Nayak T, Oakley CE, et al. Fusion PCR and gene targeting in *Aspergillus nidulans* [published correction appears in Nat Protoc. 2006;1(6):following 31120. Oakley, Berl [corrected to Oakley, Berl R]]. *Nat Protoc.* 2006;1(6):3111-3120. doi:10.1038/nprot.2006.405
- [73] Trieu TA, Navarro-Mendoza MI, Pérez-Arques C, et al. RNAi-Based Functional Genomics Identifies New Virulence Determinants in Mucormycosis. *PLoS Pathog.* 2017;13(1):e1006150. Published 2017 Jan 20. doi:10.1371/journal.ppat.1006150
- [74] Vaezi A, Walther G, Kurzai O, et al. 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

- [75] Vellanki S, Garcia AE, Lee SC. Interactions of FK506 and Rapamycin With FK506 Binding Protein 12 in Opportunistic Human Fungal Pathogens. *Front Mol Biosci*. 2020;7:588913. Published 2020 Oct 16. doi:10.3389/fmolb.2020.588913
- [76] Vellanki S, Navarro-Mendoza MI, Garcia A, et al. *Mucor circinelloides*: Growth, Maintenance, and Genetic Manipulation. *Curr Protoc Microbiol*. 2018;49(1):e53. doi:10.1002/cpmc.53
- [77] Waldorf AR, Diamond RD. Neutrophil chemotactic responses induced by fresh and swollen *Rhizopus oryzae* spores and *Aspergillus fumigatus* conidia. *Infect Immun*. 1985;48(2):458-463. doi:10.1128/iai.48.2.458-463.1985
- [78] 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. Published 2019 Nov 14. doi:10.3390/jof5040106
- [79] Wang L, Chen W, Feng Y, et al. Genome characterization of the oleaginous fungus *Mortierella alpina*. *PLoS One*. 2011;6(12):e28319. doi:10.1371/journal.pone.0028319
- [80] Xess I, Mohapatra S, Shivaprakash MR, et al. Evidence implicating *Thamnostylum lucknowense* as an etiological agent of rhino-orbital mucormycosis. *J Clin Microbiol*. 2012;50(4):1491-1494. doi:10.1128/JCM.06611-11
- [81] Yu Z, Fischer R. Light sensing and responses in fungi. *Nat Rev Microbiol*. 2019;17(1):25-36. doi:10.1038/s41579-018-0109-x
- [82] Zhang Y, Navarro E, Cánovas-Márquez JT, et al. A new regulatory mechanism controlling carotenogenesis in the fungus *Mucor circinelloides* as a target to generate β -carotene over-producing strains by genetic engineering. *Microb Cell Fact*. 2016;15:99. Published 2016 Jun 7. doi:10.1186/s12934-016-0493-8

8 Köszönetnyilvánítás

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

Köszönettel tartozom témavezetőmnek Prof. Dr. Papp Tamásnak, hogy lehetőséget adott, hogy részt vegyek ebben a fontos kutatásban, és munkám során hasznos tanácsokkal segített a dolgozat elkészítésében.

Hatalmas köszönettel tartozom Dr. Szebenyi Csillának, témavezetőmnek, hogy munkám során hatalmas kedvességgel végig támogattott, sokat bátorított, szakmai tanácsokat adott, és munkájával segítette dolgozatom elkészülését.

Szintén köszönettel tartozom az SZTE TTIK Mikrobiológiai tanszék 309-es labor összes munkatársának, hogy segítséget nyújtottak, valamint gondoskodtak a jó légkörről a nehéz munkanapokon.

Ezen munka az ÚNKP-22-4 -SZTE-523 kódszámú Új Nemzeti Kiválóság Programjának a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Alapból finanszírozott projekt és a ELKH Gombafertőzések Patomechanizmusai Kutatócsoport (ELKH 2001007) szakmai támogatásával készült.



ELKH
Eötvös Loránd
Kutató Hálózat