

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM

36. OTDK Biológia Szekció

A CRISPR/Cas9 genomszerkesztési eljárás jellemzése
Candida parapsilosis modellszervezetben

Készítette: Flaisz Dominika

Biológus MSc, II. évfolyam

Témavezetők: Prof. Dr. Gácsér Attila

Egyetemi tanár

Dr. Németh Tibor

Tudományos munkatárs

Szeged

2023

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	2
1.1. A gombák főbb sajátosságai	2
1.2. A <i>Candida</i> fajok, mint jelentős opportunistáknak	3
1.3. Génmódosítási módszerek és fejlődésük	5
1.3.1. A <i>Candida parapsilosis</i> jelentősége	9
2. Célkitűzés	12
3. Anyagok és módszerek	13
3.1. Táptalajok, táptalajok	13
3.2. A használt oligonukleotidok és szekvenciái	13
3.3. A Cas9 plazmid előállítása	14
3.4. A donor DNS-ek előállítása	15
3.5. Gélelektroforézis	15
3.6. <i>Candida parapsilosis</i> CLIB214 törzs transzformálása	16
3.7. Fragment amplifikálása és tisztítása Sanger szekvenáláshoz	16
3.8. Alkalmazott programok	16
4. Eredmények és kiértékelésük	17
4.1. A donor DNS-ek megtervezése	17
4.2. pCptRNA Ade2 Domi3 plazmid	19
4.3. A transzformánsok létrehozása és az eredmények kiértékelése	20
5. Összefoglalás	25
6. Köszönetnyilvánítás	27
7. Irodalomjegyzék	28

1. Bevezetés

1.1. A gombák főbb sajátosságai

Földünkön a gombák nagy diverzitású, fajgazdag csoportot alkotnak. Egy 1991-ben megjelent cikk adatai alapján az eddig azonosított és a még le nem írt fajok száma körülbelül 1,5 millióra becsülhető [1]. Ez az érték az egyre újszerűbb fajazonosítást elősegítő molekuláris biológiai módszerek megjelenésének köszönhetően másfél évtized alatt közel négyszeresére emelkedett [2]–[4].

A gombák kozmopoliták. Leggyakrabban szárazföldi környezetben fordulnak elő, de fellelhetők természetes vizekben, és mély óceáni üledékekben is [2]. Ezenkívül számos faj izolálható emberi környezetből (például bélmikrobiomból, nyálkahártyáról, bőrfelszínről) is [5]. A gombák nagyon jól képesek a különböző környezeti feltételekhez alkalmazkodni, ellenállnak a szélsőséges hőmérsékleti-, vízaktivitásbeli viszonyoknak és a legkülönbélebb szénforrásokat is képesek hasznosítani. Bár magas diverzitást figyeltek meg a trópusi régiókban, ahol főként növényekkel kialakított endofitikus kapcsolatban fordulnak elő nagy számban [6], a legnagyobb változatosságot a mérsékelt éghajlati területeken élő gombafajok mutatják [2]. Meglepően sok gombafaj előfordulását figyelték meg száraz, sivatagos területeken (főként Sonoran-Sivatagban az élő és elhalt növényeken, kaktuszokon) [7], [8], de kis számban bizonyos fajok még akár extrém alacsony hőmérsékleten is képesek fennmaradni (az Északi-Sarkvidéki és Antarktiszi területeken) [9]–[11]. A különböző gomba fajok nagyon változatos szerepet töltenek be a természetben. A fajok többsége szaprotróf, azaz képesek az összetett szerves anyagok lebontására, mint például a cellulóz és lignin. Számos olyan gombafaj ismert, amelyek szimbiotaként fontosak és az élőlények minden nagyobb csoportjával, baktériumokkal, növényekkel és zöld algákkal, valamint állatokkal is kapcsolatban állnak. Az állatokkal asszociált gombák sokfélesége kevésbé ismert, mint azon fajoké, amelyek növényekkel alakítanak ki szoros szimbiotikus kapcsolatot. Ilyenek a mikorrhiza gombák, amelyek a növények gyökerével asszociáltak és ezzel a növény hatékonyabb tápanyagfelvételét (víz, nitrogén, foszfor és egyéb értékes ásványi anyagok) segítik [2], [12]. Ebből adódóan mezőgazdasági és erdészeti munkák során, például az arbuszkuláris mikorrhiza fajok nagyszerűen alkalmazhatók a talaj minőségének javítására, és a haszonnövényeknél, mint biokontroll ágensek játszhatnak kiemelt szerepet. Egyes fajok (pl.: *Candida tropicalis*) a környezetvédelemben is felhasználhatók a szennyvíz és az olajszennyezések bioremediációjában valamint a kőolaj biodegradációjában. Egyszerű kezelhetőségüknek és rövid generációs idejüknek köszönhetően a gombák számos

alapkutatásban töltenek be kiemelt szerepet, mint modellszervezetek. Élelmiszeripari szempontból is jelentősek, hiszen azon kívül, hogy megannyi emberi fogyasztásra alkalmas gomba létezik, kelesztett/erjesztett élelmiszerek gyártásánál is elengedhetetlenek. [13], [14]. Egészségügyi szempontból kiemelt jelentőségűek azok a gombafajok, amelyek különféle humán megbetegedéseknek és fertőzéseknek fő okozói [15].

1.2. A *Candida* fajok, mint jelentős opportunistá humán patogének

A gombák által okozott humán megbetegedések az elmúlt évtizedekben egyre komolyabb kihívást jelentenek, ugyanis világszerte több mint egymilliárd megbetegedésért tehető felelőssé. A jelenlegi becslések szerint évente közel 1,6 millió ember hal meg különböző gombafajok (főleg *Cryptococcus*-, *Candida*-, *Aspergillus*- és *Pneumocystis* fajok) által okozott invazív betegségekben. További aggodalomra ad okot, hogy számos patogén faj (például *Aspergillus fumigatus*, *Candida auris*) rezisztenciát mutat a különféle gombaellenes szerekkel szemben [15].

A kórokozó gombák jelentős hányada opportunistá patogén, vagyis csak legyengült immunrendszerrel rendelkező vagy immunhiányos egyéneket képesek megfertőzni. Az idetartozó fajok között számos olyan ismert, amelyek az emberi szervezetben fellelhető, és amíg a megfelelő immunválasz kontroll alatt tartja a számukat, addig nem okoznak megbetegedést. Viszont a gazda immunválaszáának akár mesterséges (pl. szervátültetés miatti immunszuppresszió vagy kemoterápia) akár betegség (HIV fertőzés, neutropénia) miatti megváltozása vagy elégtelen működése esetén ezek a gombák elszaporodhatnak és kiterjedt, akár az egész szervezetet érintő ún. szisztémás fertőzést okozhatnak [16]. A humán patogén gombák között megkülönböztetünk enyhe (pl.: *Dermatofiták* és *Malassezia* fajok) vagy súlyos bőrfertőzést okozó (pl.: *Sporotrix schenckii*) és életveszélyes szisztémás fertőzésekért felelős (pl.: *Aspergillus fumigatus*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum* és *Candida spp.*) fajokat [17].

A jelenlegi adatok alapján több mint 300 *Candida* faj került azonosításra. E nemzetség tagjai az *Ascomycetes* törzs, *Saccharomycetales* családjába tartoznak. A legtöbb jól tanulmányozott *Candida* faj a monofiletikus CUG kládba tartozik, amelyek a CUG kodont elsősorban szerinnek fordítják le, nem pedig az univerzális kodonhasználat szerint leucinnak. A csoport jellemző képviselői a fő humán kórokozó *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* és *Candida tropicalis* [18]. A *Candida* fajok által okozott fertőzéseket összefoglaló néven candidiasis-nak nevezzük. Opportunistá patogének, tehát egészséges egyénben nem okoznak problémát, sőt jelenlétük az egészséges bőrfelszínen, tápcsatornában és genitáliákkal

asszociáltan is kimutatható. Egyes becslések alapján a felnőtt emberek 70%-a hordoz valamilyen élesztőgomba fajt a gyomor-bél traktusban, és ezek gyakran *Candida* fajok [19]. Hajlamosító tényezők hatására azonban a bőrt, nyálkahártyát és a mélyen ülő szerveket érintő fertőzéseket válthatnak ki, amelyek bármelyik életkorban előfordulhatnak. A kórokozó véráramba kerülésekor a fertőzés invazív válnak, a vérbe jutott gomba sejtek számára bármely belső szerv elérhető. A teljes testre kiterjedő *Candida* fertőzést szisztémás candidiasis-nak (candidaemia) nevezzük [20]–[22].

A candidiasis-os esetek túlnyomó többségéért a *Candida albicans* tehető felelőssé, a legtöbb egyénnél tünetmentesen, ártalmatlan kommenzalista partnerként van jelen a szervezetben akár az egész életén át, de bizonyos körülmények között (pl.: immunhiányos állapotban) súlyos fertőzéseket okozhat a gazda szervezetében. A kutatások során számos faktort és tulajdonságot azonosítottak, amelyek hozzájárulnak a faj virulenciájához. Ezek közül az egyik fontos képessége az ún. morfológiai váltás, amely egy reverzibilis folyamat, és a környezeti faktorok megváltozásának hatására játszódik le. A *C. albicans* esetében legalább hat különböző sejt morfológiát dokumentáltak a közelmúltban (élesztő, pszeudohifa, hifa, chlamydospóra, GUT-típusú, az átlátszatlan és a szürke sejtek) [23], [24]. A *C. albicans* fontos virulencia faktorai közé tartoznak a különböző extracelluláris enzimek: proteázok, lipázok, és foszfolipázok [25], [26]. A szekretált savas proteinázok (SAP) candidiasis-os betegek esetében magas aktivitást mutatnak. Közülük a Sap2 széles szubsztrátspecifitással rendelkezik, és képes a gazda fehérjéinek, a mucin és az immunglobulin A bontására is [26]. A Sap1 és Sap3 enzimek pedig a gazda immunrendszerének védekező mechanizmusával szemben nyújtanak védelmet [27]. Ezenkívül fontos faktorai még az adhezinek (agglutininszerű szekvencia (Als) fehérjék) is. Kiemelt jelentőségűek az Als3 és Hwp1 hifa asszociált fehérjék, amelyek a gazdasejten való megtapadáshoz és a biofilm képződéshez járulnak hozzá [28]–[30]. A *C. albicans* fontos képessége, hogy nem csak biotikus (pl.: nyálkahártya), hanem abiotikus (pl.: katéterek, műfogsor) felszíneken is képes biofilmet képezni. A biofilmre jellemző, hogy lényegesen ellenállóbb az antimikrobiális terápiával szemben, mint a planktonikus sejtek. A *C. albicans* a virulencia faktorok, és a megváltozott körülményekhez való gyors és hatékony alkalmazkodás képességének köszönhetően képes biztosítani saját túlélését és a kórfolyamat kiváltását egy fogékony gazda szervezetében [31]–[33].

1.3. Génmódosítási módszerek és fejlődésük

Az egyes *Candida* fajok által okozott fertőzésekről készült adatok alapján jól látható, hogy a *C. albicans* a candidiasis leggyakoribb okozója, amely az egyes régiókban akár az esetek több mint 70%-áért is felelős lehet [19]. A patogén alapvető molekuláris folyamatainak, virulencia faktorainak és az antibiotikum rezisztencia háttérmechanizmusainak megismerése nagymértékben támaszkodik mutánsok létrehozására, legyen az pontmutációt hordozó -, gendelációs - vagy géntúltermeltetési mutáns. A genetikai módosításra tett kezdeti kísérleteket nagyban hátráltatta a *C. albicans* genom diploid mivolta, az univerzális kódonhasználat valamint a hatékony és célzott módosításokat biztosító molekuláris eszköztár hiánya [15].

A korai tanulmányok a génfunkciókat vizsgálva az UV-expozícióra és a kémiai mutagenézisre támaszkodtak, amelyek alapja az volt, hogy véletlenszerű mutációkat váltottak ki az organizmusban. A technológia folyamatos fejlődésének köszönhetően ezeket mára teljes egészében kiszorították a célzott génmódosítási eljárások, így az elmúlt évtizedekben a *C. albicans* genetikai módosítására is számos rendszer került kidolgozásra [19], [34].

A legkorábbi ilyen rendszer az URA Blaster volt, amelynek az alapja egy uracil auxotróf törzs (CAI4) alkalmazása [35]. A célzott génkiütés során alkalmazott kazetta a *C. albicans* *URA3* génjét tartalmazza, amit a *Salmonella enterica* Typhimurium-ból származó *hisG* szekvenciák és a target géntől up- és downstream irányba elhelyezkedő homológ régiók szegélyeznek. A fragmenttel való transzformálást követően homológ rekombináció mehet végbe, amely során az auxotrófiát komplementáló szekvencia a célgén egyik alléljának helyére épül be. A heterozigóta deléciós transzformánsok minimál táptalajon szelektálhatók. A szelekciós markert határoló *hisG* szekvenciák képesek spontán rekombinálódni, így eltávolítva a szelekciós markert. Az újra uracil auxotróffá vált sejteket 5-fluoro orotsavat (5-FOA) tartalmazó komplett táptalajon lehet detektálni (negatív szelekciós módszer), mert az 5-FOA az *URA3* gén által kódolt enzim szubsztrátja, amely egy toxikus metabolitá alakítja azt. Ezzel az 5-FOA jelenlétében csak azok a sejtek képesek telepet formálni, amelyek elvesztették a szelekciós markert. Az így létrehozott célgénre nézve heterozigóta deléciós törzs ismét uracil auxotróf, így a fenti folyamat megismétlésével a második allél eltávolítására is lehetőség van. Az eljárás segítségével akár további gének deléciója is kivitelezhető. Bár ez a módszer a *C. albicans* genetikai elemzésének a fejlesztésének fontos részét képezte, mégis számos hátránnyal rendelkezett. Problémát jelentett, hogy a marker kivágása nem irányított folyamat, és a hatékonysága alacsony (0,01%). A sikeres kivágás során pedig egy-egy *hisG*-szekvencia marad fenn a célgén helyén, amely felhalmozódva (több gén eltávolításának

következményeként) nem kívánt génátrendeződést is okozhat. Emellett az *ura3^{-/-}* törzs virulenciája és életképessége eltérést mutat a prototróf *C. albicans* törzshöz képest így előfordult, hogy a deléciós mutánsokban megfigyelt fenotípus, az auxotrófia következménye és nem a vizsgálni kívánt gén termékéhez rendelhető. Emiatt az így előállított törzsekben minden esetben szükséges az uracil auxotrófia komplementálása. Továbbá nem használható klinikai izolátumokban, emellett a folyamat idő- és munkaigényes [34], [36].

Az URA Blaster módszert később felváltotta annak továbbfejlesztett változata, amelyet URA Flipper rendszernek neveztek el. Az elsődleges cél itt az integrálódott kazetta eltávolításának hatékonyságának növelése, és a folyamat irányíthatóságának biztosítása volt [37]. A rendszerben az *URA3* gént a helyspecifikus flipáz (Flp) rekombináz kodon-optimalizált változatával illesztették egy transzformációs kazettára. A *FLP* gén expressziója indukálható, mivel a *C. albicans* szekretált savas proteináz (*SAP*) 2 génjének promótere után helyezkedik el. A transzformációs kazetta a *hisG* szekvenciák helyett a 34 nukleotid hosszúságú ún. FRT (Flipase Recognition Target – Flipáz felismerési célszekvencia) szekvenciákat tartalmaz. Ha a kazetta beilleszkedik a célhelyre, akkor utána hatékonyan kivágható az FLP rekombináz expressziójának indukálásával, amely katalizálja az FRT szekvenciák közötti rekombinációt. Ennek eredményeként egy rövid FRT szekvencia marad a célhelyen és az *URA3* marker újra felhasználhatóvá válik. A rendszer több nagyságrenddel emelte a markergén eltávolításának valószínűségét (8-40%). A halmozott mutációk előállítása viszont továbbra is problémát jelentett, és továbbra sem volt lehetőség a klinikai izolátumok módosítására [38], [39].

Az utóbbi problémára a domináns szelekciós markerek alkalmazása jelentett megoldást. Az *URA3* markert először a mikofenolsav (MPA) rezisztencia marker gén alkalmazása követte, viszont nehézséget jelentett, hogy a mikofenolsav rezisztens (MPA^R) transzformánsok lassú növekedést mutattak, és a használt gén (*IMK3*) hajlamos volt a célszekvencia helyett a natív *IMK3* lokusszal rekombinálódni [40], [41]. Ezt később a Tn1825 bakteriális transzpozonon kódolt streptothricin-acetil-transzferáz (*Sat1*) vagy a *Streptomyces noursei*-ből származó nourseothricin-acetil-transzferáz (*Nat1*) váltotta le, amelyek a nourseothricin (NTC) antibiotikum elleni rezisztenciát biztosították [42]. Ezen markerek kombinálása a FLP-FRT rendszerrel lehetővé tette a prototróf klinikai izolátumok célzott genetikai módosítását. Ebben az esetben a rekombináz expresszióját a *MAL2* gén (a *C. albicans*-nak a maltóz monoszacharidokra bontásáért felelős enzimet kódoló génje) promótere szabályozta. A Flp kifejeződése maltóz tartalmú tápközegben indukálható, amely a két FRT régió mentén a transzformációs kazetta eltávolítását viszi véghez. Alacsony (permisszív)

koncentrációban a NTC csak akadályozza a sejtek osztódását, (nem sztatikus) így a NTC szenzitív sejtek kisebb méretű telepeket képesek formálni, mint a rezisztens sejtek, ezáltal könnyen azonosíthatók. Ezekben a klónokban a transzformációs kazetta újra használható a második allél eltávolítására, a homozigóta mutánsok előállítására. Ez a rendszer tehát alkalmas (NTC szenzitív) klinikai *C. albicans* izolátumok genetikai módosítására. A továbbiakban a nourseothricin rezisztencia markereket egyéb *Candida* fajokban is alkalmazták, mint például *Candida parapsilosis*, *Candida lusitanae*, *Candida glabrata* és *Candida kefyr* [41]. A rendszer nagy előrelépést jelentett, mégis a használat után továbbra is a genomban maradó és felhalmozódó FRT szekvenciák a kromoszómák és akár a teljes genom stabilitását is befolyásolhatták. Emellett a deléciós mutánsok előállítása továbbra is időigényes folyamat maradt, ugyanis a két allél továbbra is csak egymás után volt módosítható, a transzformálási lépések után mindig szükség volt a marker gént eltávolítására, és a transzformációs kazetták létrehozása klónozást igényelt [36].

Ez utóbbi két problémát az auxotróf komplementáción alapuló módszer kifejlesztésével sikerült megoldani. Ehhez a módszerhez olyan *C. albicans* törzs alkalmazása volt szükséges, amelyek hisztidin, leucin, és arginin auxotrófok (*his*^{-/-}, *leu*^{-/-}, *arg*^{-/-}). Így kettő auxotrófia felhasználható egy adott célgén minden alléljának eltávolítására, a harmadik auxotrófia pedig a gén egy kópiában történő visszahelyezésére, vagy egyéb genetikai módosítások elvégzésére lehet alkalmas. Ennél a rendszernél a deléciós kazetták összeállítása nem igényel klónozást, mivel az auxotrófia markergének külön-külön plazmidokról sokszorozhatók fel egyedi up- és downstream fúziós szekvenciákkal. A kész fúziós termék közvetlenül felhasználható az auxotróf törzs transzformálására. A transzformánsokra (megfelelő aminosavval kiegészített) minimál táptalajon lehet szelektálni. A rendszer hátránya, hogy egy gén két alléljának eltávolításához még ennél a módszernél is kettő transzformációs kör szükséges, valamint a rendszer alkalmazásához auxotróf törzset kell alkalmazni [19], [36], [43].

A fentebb említett technikák fontos szerepet játszottak a *Candida* genetikai elemzésében, tanulmányozásában. Viszont halmozott homozigóta mutációk gyors, egyszerű létrehozására bármilyen (akár prototróf törzsben) nem voltak alkalmasak. Ezekre a problémákra a CRISPR (Clustered regular interspaced short palindromic repeats) rendszer kifejlesztése jelentett megoldást [15], [34]. A rendszert 1987-ben fedezték fel baktériumokban, ahol rövid palindrom ismétlődő szekvenciákat figyeltek meg. 2005-ben megállapították, hogy a CRISPR rendszer a baktériumok, valamint az archeák számára, mint adaptív immunvédelem játszik kiemelten fontos szerepet az intakt genom fenntartásában [44], [45]. A felfedezés után a CRISPR alapú rendszer kifejlesztése vezetett egy hatékonyabb, gyorsabb genomszerkesztés

irányába. Elsőként a *Candida* fajok közül szintén *C. albicans*-ra fejlesztették ki, és egy nagyon hatékony rendszernek bizonyult, amely gyors, pontos genomszerkesztést tesz lehetővé, egyetlen transzformálással homozigóta mutánsok állíthatók elő és deléción kívül pontmutációk, integrációk is végrehajthatók, bizonyos változataik alkalmazásával nem maradnak járulékos szekvenciák a genomban, és korlátlan számú mutáció létrehozása is kivitelezhető a genom stabilitásának akaratlan megváltoztatása nélkül [45].

A funkcionális CRISPR/Cas9 komplex egy ribonukleoprotein, működéséhez egy a katalitikus aktivitásért felelős endonukleáz (Cas9) és a specificitásért felelős RNS szükséges. Baktériumokban az endonukleázhoz két különböző RNS (tracrRNS és crisperRNS) kapcsolódik, ugyanakkor a két RNS molekula mesterségesen egyesíthető, ami tovább egyszerűsíti a rendszer használatát. Ezt az RNS-t single guide RNS-nek (sgRNS) nevezzük. Az sgRNS feladata a Cas9 irányítása a módosítani kívánt célszekvenciához. A sgRNS 5' végének utolsó 20 nukleotidja jelöli a hasítás helyét, ami a genom bármely pontja lehet, ha a target szekvenciától downstream irányban egy rövid, ún. PAM-szekvencia (protospacer adjacent motif) található, ami eltérő lehet, az alapján, hogy mely baktériumfajból származik a Cas9. Sok esetben a *Streptococcus pyogenes* által kódolt Cas9 használatos, ugyanis ez az enzim az „NGG” PAM szekvenciát ismeri fel, ezért a lehetséges target szekvenciák száma igen magas. Az sgRNS a target szekvenciájával komplementer szálhoz irányítja az enzimet, amely, a PAM szekvenciától upstream 3. és 4. nukleotid között képes a kettős szálú DNS hasítására. A kettős szálú DNS törés akár végzetes is lehet a sejt számára, így ennek elhárítására különböző hibajavító mechanizmusok alakultak ki az evolúció során. Az egyik mechanizmus a nem homológ végek egyesítése (NHEJ - non-homologous end joining), ami akkor következik be, ha nincsen jelen az érintett DNS szakasszal homológ szekvencia. Ebben az esetben a sejt képes a végeket a törés mentén összeépíteni. Mivel ennek során a keletkező DNS végekről nukleotidok kerülnek eltávolításra és visszaillesztésre, az esetek egy részében véletlenszerű (általában frameshift, vagy non-sense) mutációk alakulhatnak ki. A másik mechanizmus a homológ rekombináció (HDR – homology directed repair), ahol az elsővel ellentétben jelen van a sérült régióval homológ szekvencia (target régióval homológ DNS fragment: donor DNS (dDNS)), ami biztosítja, hogy a hibajavítás a rekombináció irányába tolódjon el. Ugyanakkor teljes mértékben még így sem lehet háttérbe szorítani a NHEJ eseményt, ami akkor is bekövetkezhet, ha van dDNS a sejtben, de mindenképpen egy irányítottabb genommodosítást eredményez [45].

Az utóbbi években több CRISPR alapú rendszer is kidolgozásra került. [44], [45]. *C. albicans*-ban a legelső Vyas és munkatársai fejlesztették ki, amelynek során létrehozták a

Cas9 kodon optimalizált verzióját, és ellátták az SV40 fág nukleáris lokalizációs szignáljával, ezzel biztosítva, hogy a Cas9 bejusson a sejtmagba. Az sgRNS átírását az RNS polimeráz III végzi. A konstrukciót az *ENO1* lokuszba illesztették be, ahol a Cas9 konstitutívan fejeződik ki. A megcélzott *ADE2* gén módosításának hatásfoka elérte a 60-80%-ot. A rendszer hátránya a Cas9 és sgRNS folyamatos expressziója, ami nem kívánt hasításokat eredményezhet, a célszekvenciával hasonló régiókban (off-target hatás), ahol NHEJ játszódhat le, amely véletlenszerű pontmutációkat, kis méretű inszerciákat és deléciókat okozhat [46].

Egy másik CRISPR alapú rendszert (tranzien CRISPR rendszer) Min és munkatársai dolgozták ki. Ez a Cas9 és sgRNS tranzien expresszióra támaszkodik két független DNS-fragmentről, amelyek nem integrálódnak a genomba. Munkájuk bizonyította, hogy géndeléció létrehozó rekombinációs folyamatokhoz elég a komponensek átmeneti expressziója is, és az alkalmazott fragmentek (endogén DN-ázoknak köszönhetően) rövid időn belül eliminálódnak a sejtéből. Ezzel sikerült csökkenteni a járulékos mutációk kialakulásának lehetőségét [47].

A CRISPR/Cas9 eljárással elméletileg korlátlan számú genetikai módosítás elvégezhető, azonban ezt nehezítheti a szelekciós markerek alacsony száma. A gyakorlatban a domináns szelekciós markerek közül a NTC alkalmazása terjedt el [46], [47]. Fontos ugyanakkor, hogy lehetőség legyen a szelekciós marker eltávolítására a genomból, hogy az az ismételt NTC szenzitív törzsben újra használható legyen. Ezt a problémát oldja meg a Nguyen és munkatársai által bemutatott módszer [45]. A rendszer emellett moduláris, klónozást nem igényel, mert az sgRNS target szekvencia PCR segítségével illeszthető a promóter után. A transzformálást követően a Cas9 és az sgRNS expressziós konstrukciót hordozó fragmentek *in vivo* rekombinálódnak, és a funkcionális kazetta a *HIS1* lokuszba épül be. A rendszer elemei kifejeződhetnek, majd a kívánt módosítást hordozó mutánsok validálását követően a kazetta, az általa hordozott maltóz promóter után illesztett FLP gén kifejeztetésével a konstrukciót övező FRT régiók mentén, eltávolítható a genomból. A szerzők ezzel a rendszerrel több mint 70%-os hatékonysággal voltak képesek módosítani a megcélzott *ADE2* gént. [45].

1.3.1. A *Candida parapsilosis* jelentősége

A *C. albicans* mellett, az utóbbi évtizedekben egyre erőteljesebb az egyéb *Candida* fajok térnyerése. Ezek közül különösen az alacsony születési súllyal világra jött csecsemők körében a *C. parapsilosis* előfordulásának gyakorisága növekedett meg [48], [49]. Ebben a korcsoportban (a *C. albicans* után) a második leggyakrabban izolált *Candida* faj véráramfertőzésekben, bár a vizsgált periódus függvényében akár meg is előzheti azt, amit az

egyes európai, ázsiai és dél-amerikai kórházakban elvégzett tanulmányok támasztanak alá [50]–[52]. A *C. parapsilosis*-ra az ovális, kerek vagy henger alakú sejtek jellemzők. A telepek lehetnek fehér, krémes, fényes, sima vagy ráncos felszínűek. A *C. albicans*-tól eltérően a *C. parapsilosis* nem képez valódi hifákat, csak élesztő és pszeudohifa formában figyelhető meg [53]. A gomba alakja és a pszeudohifa jelenléte befolyásolhatja a telepek morfológiáját: az élesztő forma telepei sima vagy kráter, míg a pszeudohifa forma telepei krepp vagy koncentrikus fenotípust mutatnak [53]. A *C. parapsilosis* (hasonlóan a *C. albicans*-hoz), egy opportunistá patogén, humán kommenzalista gomba [54]. A faj izolálható emberi testtájokról, leggyakrabban a kézről, és köröm alól. Megtalálható ezenkívül még különböző háziállatok, rovarok szervezetében/testfelszínén, illetve talajban és tengeri környezetben is [55]. Előfordulási gyakorisága világszerte növekvő tendenciát mutat. A 2003-as Antimikrobiális Megfigyelési Program adatai alapján a véráramfertőzésekben és a steril testtájokról izolált minták 15,5%-át (Észak-Amerikában), 16,3%-át (Európában) és 23,4%-át (Latin-Amerikában) a *C. parapsilosis* tette ki (ez *C. albicans* esetében rendre 51,5%, 47,8% és 36,5% volt) [56]. Figyelemre méltó különbség a *C. albicans* és a *C. parapsilosis* között, hogy míg előbbire a vertikális, addig utóbbira a horizontális terjedés jellemző. Ebben szerepet játszik a *C. parapsilosis* azon képessége is, hogy kórházi környezetben tartósan fennmarad, amit a jó adhézión tulajdonságainak köszönhető. Kimutatható a különböző orvosi eszközök felszínéről, katétereken és egyéb orvosi eszközökön, de izolálható kórházi dolgozók kezéről is, ami nagy szerepet játszik a horizontális (betegről-betegre való) terjedésében [57], [58].

A *C. parapsilosis* tanulmányozására több olyan hatékony génmodosítási módszer is alkalmazásra került, amelyek eredetileg *C. albicans* modellben kerültek kidolgozásra. Az első célzott géndelégiós mutáns létrehozásához a korábban említett SAT1 Flipper rendszer került alkalmazásra, majd ezt követte a többszörös auxotrófia komplementáción alapuló rendszer, ami felgyorsította a delégiós mutánsok előállítását, viszont klinikai izolátumoknál nem volt alkalmazható [21], [43], [46], [68]. Ezeknek a módszereknek a hátrányait kiküszöbölve 2017-ben került kidolgozásra *C. parapsilosis*-ban a CRISPR/Cas9 rendszer, ami ligálás segítségével illeszti a sgRNS célszekvenciát a sgRNS scaffold 5' végéhez. A rendszer egy több mint 11 kb-os plazmidot (pCptRNA) alkalmaz, amely tartalmazza a Cas9 kodon-optimalizált változatát, amit a CpTEF1 promóter és terminátor szabályoz. A plazmid a baktériumokban történő szelekciót (Amp^R) és replikációt (ORI) biztosító szekvenciákon kívül gomba szelekciós markert (nourseothricin rezisztenciáért felelős gént), és a fennmaradást biztosító autonóm módon replikálódó szekvenciát (ARS7), és egy centromert tartalmaz. A stabilitás érdekében az sgRNS-t 5' végén a tRNS^{ALA}, 3' végén hepatitisz delta vírus (HDV) ribozim

védi. A magas kópiaszám érdekében pedig az említett konstrukció expresszióját a *CpGAPDH3* gén regulátoros szekvenciái szabályozzák. Ebben a megközelítésben a plazmid elvesztése random módon valósul meg, szelekció nélküli tápközegben történő inkubálással, amelyet követően a törzs alkalmassá válik újabb genetikai módosításra. A magas hatékonyság mellett nagy előnye a rendszernek, hogy bármely NTC érzékeny izolátum génjeinek szerkesztésére alkalmazható, egy transzformálás után is homozigóta mutánsokat eredményez, és a konstrukció viszonylag gyors eltávolítása minimalizálja a nem kívánt mutációk megjelenését a genomban [60].

A CRISPR/Cas9 technikával lehetőségünk van a mutációk széles körének létrehozására (inszerció, delécio vagy pontmutáció) anélkül, hogy a genomban más, nem tervezett változtatást is létrehoznánk. Emiatt ez az eljárás egy rendkívül hasznos eszköz célzott genetikai módosítások végrehajtásához, és korábban nehezen vagy egyáltalán nem vizsgálható folyamatok alapos tanulmányozását teszi lehetővé. Egyszerűsége és hatékonysága mellett hatalmas előnye, hogy egyetlen izolátumban elméletileg korlátlan számú mutáció hozható létre. A rendszer használhatóságát ugyanakkor korlátozhatja, hogy a működése minden esetben PAM szekvenciák meglétét igényli. Abban az esetben, ha a módosítani kívánt régió túlságosan távol esik a legközelebbi PAM szekvenciától, a módosítás hatékonysága csökkenhet. Ennek a csökkenésnek a mértékéről azonban nincsen semmilyen információnk *C. parapsilosis*-ban, amely megnehezíti a rendszer hosszú távú használhatóságát.

2. Célkitűzés

A célunk a *Streptococcus pyogenes* Cas9 enzim *C. parapsilosis*-ban használt kodon optimalizált változatának jellemzése volt, annak tükrében, hogy a módosítani kívánt nukleotidoknak a kettős szálú törésponttól való távolsága, milyen módon befolyásolja a módosítás hatékonyságát.

3. Anyagok és módszerek

3.1. Tápoldatok, táptalajok

LB tápoldat (Luria-Bertani tápoldat):

1% (m/V) nátrium-klorid

1% (m/V) tripton

0,5% (m/V) élesztő kivonat

LB táptalaj (Luria-Bertani táptalaj):

LB tápoldat 2% (m/V) agarral kiegészítve

YPD tápoldat (Élesztő-pepton-glükóz tápoldat):

1% (m/V) glükóz

1% (m/V) pepton

0,5% (m/V) élesztő kivonat

YPD táptalaj (Élesztő-pepton-glükóz táptalaj):

YPD tápoldat 2% (m/V) agarral kiegészítve

A tápoldatokhoz és táptalajokhoz használt antibiotikumok és végkoncentrációik:

Penicillin-sztreptomycin oldat 100 unit/ml

Nourseothricin oldat 100 µg/ml

Ampicillin oldat 100 µg/ml

3.2. A használt oligonukleotidok és szekvenciái

<u>Oligonukleotid neve</u>	<u>Oligonukleotid szekvenciája (5' → 3')</u>
gRNA_ADE2_Domi3_TOP	ccaATCAAGGGCATTGATTTGCT
gRNA_ADE2_Domi3_BOT	aacAGCAAATCAATGCCCTTGAT
M13_FOR	GTAAAACGACGGCCAGT
dDNA_empty_TOP	ACTTAATATCTAAACTGTCATCTTAGATGCTccgcaat caccagcaaagcaaatc
dDNA_BP+40_TOP	ACTTAATATCT <u>TAA</u> ACTGTCATCTTAGATGCTccgcaat caccagcaaagcaaatc
dDNA_BP+27_TOP	ACTTAATATCAAAACTGTCATCT <u>TA</u> AGATGCTccgcaa tcaccagcaaagcaaatc

dDNA_BP+16_TOP	ACTTAATATCAAAACTGTCATCTTAGATGCTccg <u>ta</u> at caccagcaaagcaaatc
dDNA_BP+1_TOP	ACTTAATATCAAAACTGTCATCTTAGATGCTCcgcaa tcaccagcaaag <u>ta</u> aatc
dDNA_empty_BOT	CAATAGATTCATAATCAGTGAAGGATCCATCAAC ATGTTTCATCAAGGGCATTgatttgcttgctggtgattgcgg
dDNA_BP+16_BOT	CAATAGATTCATAATCAGTGAAGGATCCATCAAC ATGTTTCATCAAGGGCATTgatttgcttgctggtgatt <u>ac</u> gg
dDNA_BP+1_BOT	CAATAGATTCATAATCAGTGAAGGATCCATCAAC ATGTTTCATCAAGGGCATTgatt <u>ta</u> cttgctggtgattgcgg
dDNA_BP-18_BOT	CAATAGATTCATAATCAGTGAAGGATCCATCAAC ATG <u>TTA</u> ATCAAGGGCATTgatttgcttgctggtgattgcgg
dDNA_BP-30_BOT	CAATAGATTCATAATCAGTGAAGGAT <u>CA</u> ATCAAC ATGTTTCATCAAGGGCATTgatttgcttgctggtgattgcgg
dDNA_BP-47_BOT	CAATAGATTC <u>TTA</u> ATCAGTGAAGGATCCATCAAC ATGTTTCATCAAGGGCATTgatttgcttgctggtgattgcgg
ADE2_check_FOR	GAGCTCTAAGAGAATCACCTTGC
ADE2_stop_check_REV	CGTCATATGCCAATGTTCTCG

A grNS oligonukleotidoknál kis betű jelöli a ragadós (sticky) végeket, ezen keresztül ligálható össze a plazmid gerinc vele komplementer szakaszaival, az oligonukleotidok fennmaradó szekvenciája pedig egymás komplementerei. A dDNS-eknél szintén kis betű jelöli a komplementer szekvenciákat, míg a dőlt betűk az egy nukleotidban módosított PAM szekvenciát jelölik, a félkövér betűkkel jelölt nukleotidok a pontmutációkat jelölik, és aláhúzva az így létrehozott korai STOP kodonok elhelyezkedése látható.

3.3. A Cas9 plazmid előállítása

A transzformáláshoz használt, sgRNS-t és Cas9-t hordozó pCptRNAde2Domi3 plazmid létrehozását Lombardi és mtsai. által kidolgozott protokoll szerint végeztük. A transzformáláshoz szükséges mennyiségű plazmid előállításához Geneaid Midiprep kit-et használtunk a gyártó utasításainak megfelelően. A plazmid koncentrációját és integritását *EcoRI* enzimmel történő emésztéssel ellenőriztük. A sgRNS felismerési szekvencia

beépüléséről PCR segítségével győződünk meg M13 forward és gRNA_ADE2_Domi3_BOT oligonukleotidok felhasználásával Lombardi és mtsai. alapján [60].

3.4. A donor DNS-ek előállítása

A donor DNS-ek előállítása 'primer extension' módszer segítségével történt Phusion (Thermo Fisher Scientific) DNS polimeráz segítségével a gyártó utasításainak megfelelően. A nyolc dDNS összeállítására használt felső (TOP – T) és alsó (BOTTOM – B) oligonukleotidok a következők voltak:

dDNS	Oligonukleotid T	Oligonukleotid B
Empty	EMPTY T	EMPTY B
+40	BP + 40 T	EMPTY B
+27	BP + 27 T	EMPTY B
+16	BP + 16 T	BP + 16 B
+1	BP + 1 T	BP + 1 B
-18	EMPTY T	BP - 18 B
-30	EMPTY T	BP - 30 B
-47	EMPTY T	BP - 47 B

PCR elegy:

10 µl HF puffer
 10 µl dNTP (1-1 mM)
 1 µl T-primer (100 µM)
 1 µl B-primer (100 µM)
 0,5 µl Phusion enzim
 27,5 µl Desztillált víz

PCR reakció:

1. Elődenaturáció: 98°C, 30 s
 2. Denaturáció: 98°C, 10 s
 3. Annealing: 62°C, 30 s
 4. Polimerizáció: 72°C, 5 s
 5. Utópolimerizáció: 72°C, 5 s
 6. 12°C ∞

} 35x

3.5. Gélelektroforézis

A PCR termékeket és az *EcoRI* emésztett pCptRNA Ade2Domi3 plazmidot gélelektroforézis segítségével ellenőriztük. A dDNS-ek megfuttatása során 2% (m/V) a plazmid ellenőrzéséhez (egyéb PCR termékek és az emésztés tekintetében) 0,8% (m/V) agaróz gél használtunk. Futtatópufferként 1x-es TAE (1 mM EDTA, 40 mM TRIS, 20 mM ecetsav, pH=8) oldatot alkalmaztunk. A gélhez etídium-bromidot adtunk (0.5 µg/ml végkoncentrációban). A futtatás során 90-100 V-os feszültséget alkalmaztunk. A mintákat UV-fény megvilágítása alatt detektáltuk és dokumentáltuk.

3.6. *Candida parapsilosis* CLIB214 törzs transzformálása

A transzformálást Németh és mtsai. által publikált protokoll alapján végeztük el [61].

Transzformálási elegy tartalma: 50 fmol pCptRNA_{Ade2}Domi3 plazmid

10 µl dDNS-t (a 3.4. fejezetben leírt termékből)

10 µl (10 mg/ml) egyszálúsított hordozó DNS

A sejteket 100 µg/ml nourseothricin tartalmú YPD táptalajra szélesztettük, és 3 napig 30 °C-on, majd 4-5 napig – 8 °C-on inkubáltuk.

3.7. Fragment amplifikálása és tisztítása Sanger szekvenáláshoz

A megjelölt gombatelepekből Horváth és mtsai. alapján genomi DNS-t izoláltunk [62], majd ezeket templátként használva a mutációt övező régiót ADE2_check_FOR és ADE2_stop_check_REV primerekkel amplifikáltuk. A reakcióban Phusion (Thermo Fisher Scientific) enzimet alkalmaztunk a gyártó utasításainak megfelelően.

PCR elegy:

PCR reakció:

4 µl HF puffer

1. Elődenaturáció: 98°C 30 s

4 µl dNTP (1-1 mM)

2. Denaturáció: 98 °C, 10 s

2 µl For-primer (5 µM)

3. Annealing: 62 °C, 30 s

2 µl Rev-primer (5 µM)

4. Polimerizáció: 72 °C, 25 s

1 µl templát.

5. Utópolimerizáció: 72 °C, 25 s

0,2 µl Phusion enzim

6. 12 °C, ∞

6,8 µl Desztillált víz

35x

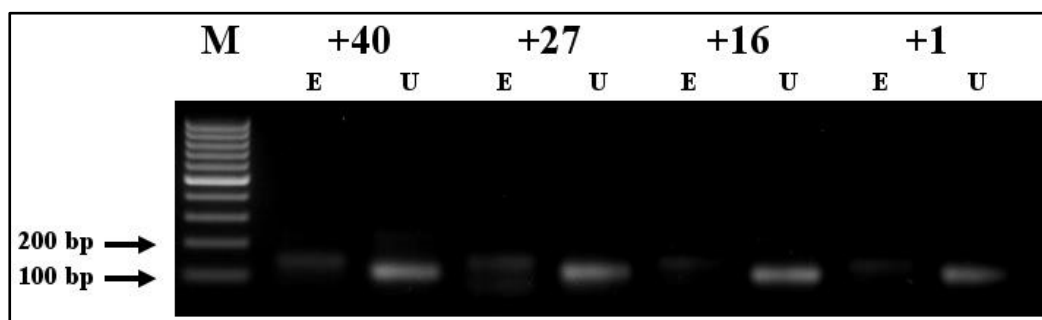
A reakcióelegyből 1 µl-t agaróz gélen ellenőriztünk a korábban ismertetett módon. A reakcióelegy fennmaradó részét Viogene PCR Advanced clean-up kit PCR tisztító kit segítségével izoláltuk a gyártó utasításainak megfelelően. Az eluáláshoz 20 µl puffert használtunk. Az izolált termékek mennyiségét és minőségét agaróz gélen ellenőriztük.

3.8. Alkalmazott programok

Az adatok kiértékeléséhez és a statisztikai analízishez GraphPad Prism 6.01-es verzióját használtuk. A plazmidterképeket SnapGene Viewer 6.0.2-es verziójával, az összes többi kép szerkesztését GIMP 2.8.18-as verziójával végeztük. A szekvenciákat A plasmid editor (ApE) program 2.0.51-es verziójával kezeltük, az illesztésekhez és a kromatogramok megjelenítéséhez a BioEdit 7.2.5-ös verzióját használtuk.

A munkánk során a korai STOP kodonnal az volt a célunk, hogy az *ADE2* gén által kódolt enzim működésképtelen legyen, így a célzottan bevitt mutációk piros telepeket eredményezzenek. A piros színű telepek számának a transzformánsok teljes számára vonatkoztatott arányával meghatározható a módosítás hatékonysága. A különböző dDNS-ek alkalmazásával megadható, hogy hogyan változik a célzott pontmutációk létrejöttének valószínűsége a törésponttól való távolság függvényében.

A dDNS-ek a felsorolt nukleotidcseréket biztosító mutációkon kívül a három nukleotidos (TGG, vagy reverz komplementje: CCA) PAM szekvenciát is módosítják (**1. ábra**), amelyre azért volt szükség, hogy megelőzzük a Cas9 folyamatos hasítását, amely nem kívánt mutációk kialakulását okozhatja, mivel a folyamat során a dDNS jelenléte átmeneti. Így, ha a dDNS nem módosítja a PAM szekvenciát, és a kifejeződő Cas9 folyamatosan kettős szálú törést idéz elő a sgRNS által meghatározott célhelyen, akkor dDNS hiányában csak a NHEJ mehet végbe, ami akár frameshift vagy non-sense mutációt is előidézhet véletlenszerűen, amely az Ade2 fehérje funkcióvesztésével jár, így a telepek pirosak lesznek. Ezzel eredményeink torzulhatnak, hiszen a célzott STOP kodont előidéző pontmutáción kívül a NHEJ miatti véletlenszerű események elfedhetik a fenotípus valódi okát. A PAM szekvencia módosítása során a PAM szekvenciánál található alanint kódoló tripletet (GCC) úgy módosítottuk egyetlen nukleotid cseréjével, hogy az továbbra is alanint kódoljon (GCA), viszont ezzel a módosítással eltüntettük a PAM szekvenciát, így kizártuk a folyamatos hasítások lehetőségét is. A kontrollként használt Empty dDNS csak ezt a mutációt tartalmazza.



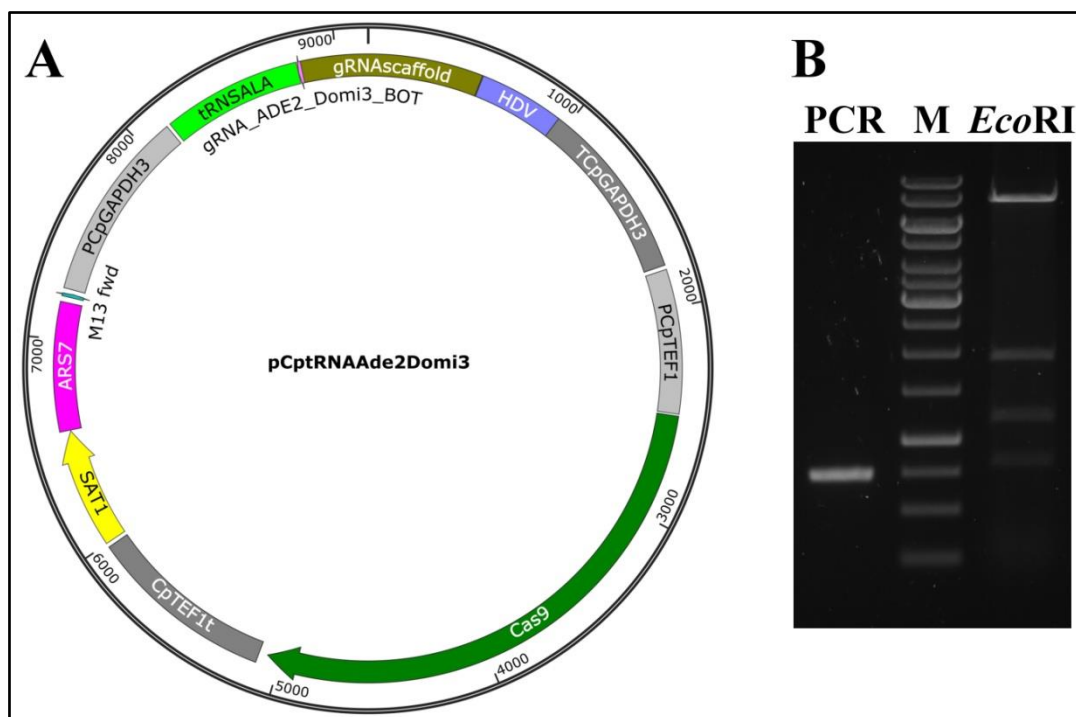
2. ábra: A dDNS-ek reprezentatív gélképe. A dDNS-eket 2%-os agaróz gélen futtatuk meg. A dDNS-eket primer extension módszerrel hoztuk létre. A reakció előtti (E) és a reakció utáni (U) reakcióelegyet is ellenőriztük agaróz gélen. Valamennyi termék 120 bp méretű. M: marker, mérettartománya 100 bp-tól 1000 bp-ig terjed.

A dDNS-ek előállítását 'primer extension' módszerrel végeztük el PCR segítségével (3.Anyagok és módszerek – 3.4.dDNS-ek előállítása). Ennek során a két primernek a 3' végükön található egy kölcsönösen átfedő, komplementer szakasza, amely mentén a PCR

során a két primer kapcsolódik egymáshoz és a komplementer szálát kölcsönösen templátként használva létrejöhet a 120 bp hosszú kettősszálú lineáris DNS, amelyeket agaróz gélen ellenőriztünk. Minden mintából futtattunk a reakción át nem esett reakcióelegyből is a reakción átesett elegy mellett, hogy meggyőződhessünk a reakció eredményességéről (2. ábra). Nyolc donor DNS-t állítottunk elő ezzel a technikával, amelyekből mindegyik hordozza a PAM szekvenciát módosító szekvenciát. Ezen kívül a módosításon kívül hét dDNS a különböző pozíciókban STOP kodont előidéző pontmutációkat is, míg egy dDNS pedig kontrollként szolgált (Empty kontroll), ez csak a PAM szekvencia módosítását tartalmazza. A kontroll dDNS alkalmazásával ellenőrizhettük azt, hogy milyen mértékben idézhet elő a rendszer háttér mutációt.

4.2. pCptRNAAde2Domi3 plazmid

A transzformációhoz szükséges a Cas9 és az sgRNS, amelyeket egy 11.6 kb-os plazmid (3. ábra A) részeként jutatható be a *C. parapsilosis* sejtekbe.



3. ábra: A pCptRNAAde2Domi3 plazmid. A plazmid sematikus képe (A) és gélképe, ahol a PCR terméke (M13 Forward és gRNA_ADE2_Domi3_BOT primereket alkalmazva) és az *EcoRI* enzimmel történő hasítás terméke látható (B). A PCR során 752 bp-os, az *EcoRI* enzimmel végzett emésztés során 7769, 1908, 1178, 804 bp-os fragmentek keletkeztek. M: marker: 750, **1000**, 1500, 2000, 2500, **3000**, 3500, 4000, 5000, **6000**, 8000, 10000 bp

Ezen a plazmidon a Cas9-t kódoló régiót *CpTEF1* regulátor (promóter és terminátor) szekvenciák határolják. Ezen kívül a plazmidon található egy ún. autonóm módon replikálódó

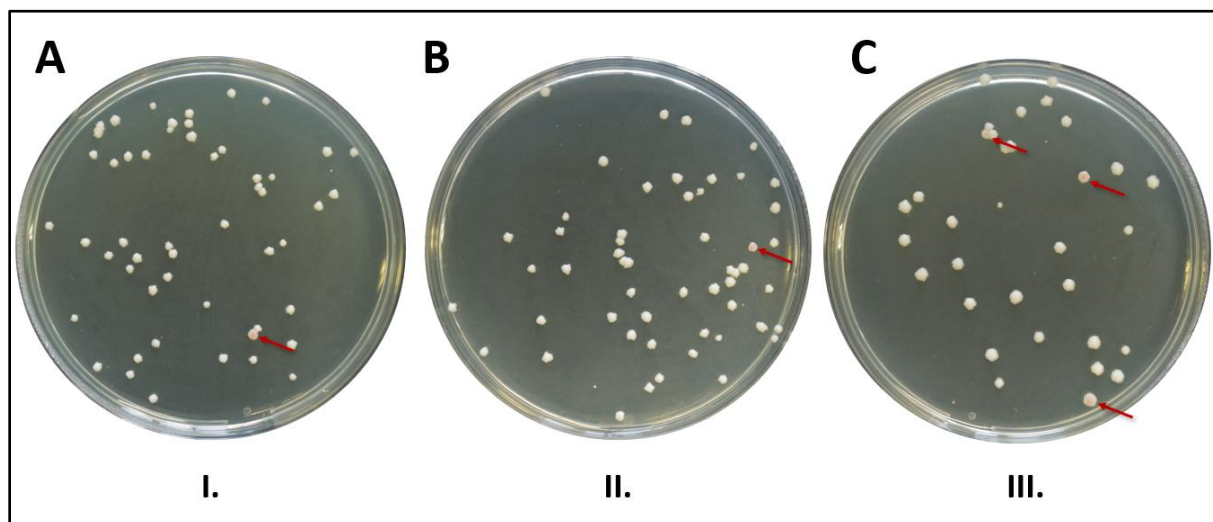
szekvencia is, az ARS7, amely a gombáknál, mint replikációs origó játszik szerepet, ugyanis ennek a segítségével tud önállóan megkezdődni a DNS megkettőződés a sejtosztódás folyamata során. A plazmid utdósejtekbe való kerülését egy *C. parapsilosis* centromer szekvencia biztosítja. A plazmidon két különböző szelekciós marker jelenléte szükséges. Az egyik egy bakteriális szelekciós marker az ampicilin rezisztencia (Amp^R) gén, a másik pedig egy nourseothricin antibiotikum elleni rezisztenciát biztosító szekvencia, ez a streptothricin-acetil-transzferáz (Sat1) kódoló gén. A képződő sgRNS 5' végét a *C. parapsilosis* alanin tRNS-e 3' végén a HDV ribozim védi. A tRNS^{ALA} és a gRNS scaffold régiók közé építettük be az sgRNS felismerési szekvenciáját, amelyhez a *SapI* IIS-es típusú restriktációs endonukleáz alkalmaztuk. A IIS endonukleázok felismerési helye nem palindrom, és azon kívül hasítanak. A *SapI* enzim a felismerési helyétől downstream hasít három nukleotidnyi 3' túlnyúló véggel. A hasítás során olyan ragadós végeket kapunk a gRNS scaffold és a tRNS^{ALA} régiókban, hogy egy megfelelően összehibridizált oligonukleotid párral a ligálás elvégezhető anélkül, hogy bármilyen más módosítást szenvedne el az adott régió. A ligálási eleggyel *E. coli*-t transzformáltunk, majd ampicillin tartalmú csészére szélesztettük a baktériumokat. A telepekből plazmidot izoláltunk, amelyeket *EcoRI* enzimmel történő hasítással és PCR segítségével ellenőriztünk (**3. ábra B**). Ez utóbbira az adott lehetőséget, hogy a ligáláshoz használt ADE2Domi3 BOT oligonukleotid szembe állítható a plazmidon található M13 FOR szekvenáló primerrel. A validált plazmidot nagy mennyiségben felszaporítottuk, és kísérleteink során ezt használtuk.

Az így ellenőrzött plazmidnak a gélfotó alapján meghatároztuk a koncentrációját. A transzformáláshoz 50 fmol plazmidot alkalmaztunk egy reakcióban, ami 385 ng-nak felel meg. Amennyiben a gomba sejtek felveszik a plazmidot, akkor a plazmidról kifejeződik a Cas9 és az sgRNS, majd az sgRNS a célhelyre vezeti a Cas9 enzimet, ahol ezt követően megtörténik a kettős szálú hasítás, és dDNS jelenlétében a folyamat a homológ rekombinációs hibajavító mechanizmus irányába tolódik el.

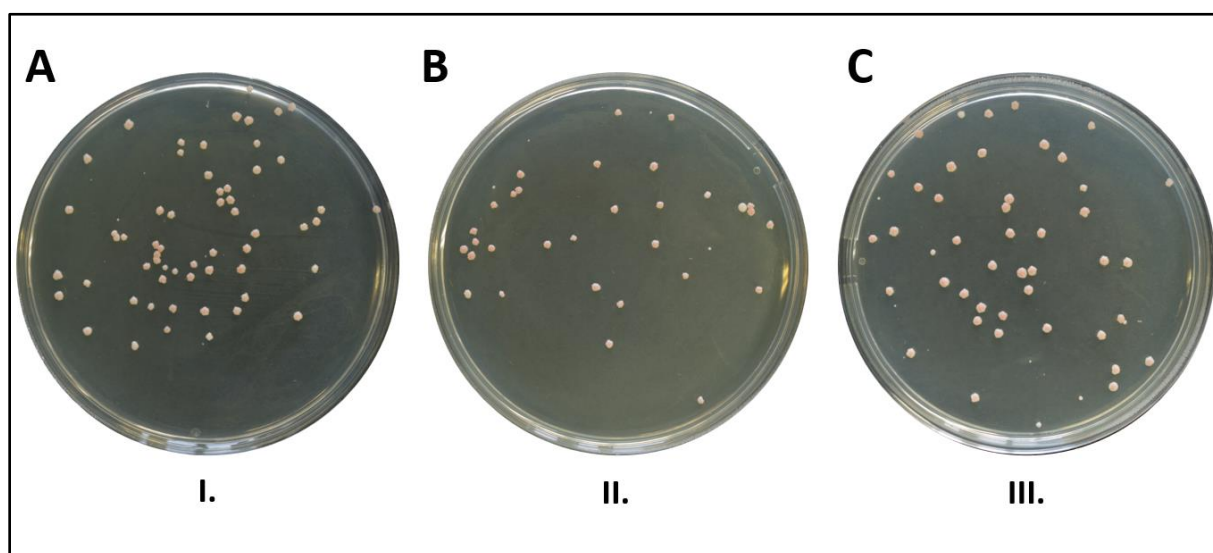
4.3. Transzformánsok létrehozása és az eredmények kiértékelése

A transzformálásokat három független párhuzamosban (felnövesztéssel) végeztük el. Az eredmények adekvát kiértékeléséhez két kontrollt alkalmaztunk. Az egyik kontrollnál nem adtunk semmilyen DNS-t a transzformációs elegyhez. Ezzel a kontrollal spontán kialakuló NTC rezisztencia gyakoriságáról kívántunk meggyőződni. Ebben az esetben nem jelentek meg telepek. A másik (Empty) kontroll tartalmazta a kontroll dDNS-t, amely csak a PAM szekvenciát módosító nukleotidcserét hordozza. Abban az esetben, ha a javítás HDR révén

valósul meg, akkor ez a dDNS nem változtatja meg a telep színét, mivel a PAM szekvencia módosítása nem befolyásolja az érintett kodon által meghatározott aminosavat. Ezzel vizsgáltuk meg, hogy milyen mértékben idéz elő a rendszer háttér mutációt, vagyis, hogy a donor DNS jelenléte ellenére, milyen gyakorisággal jelennek meg mégis piros telepek. Érdekes módon ez az elrendezés a három párhuzamos transzformációs körben összesen 5 piros telepet eredményezett, ami az összes Empty dDNS alkalmazásakor megjelenő telepek 3,6%-át jelentette (4. ábra).

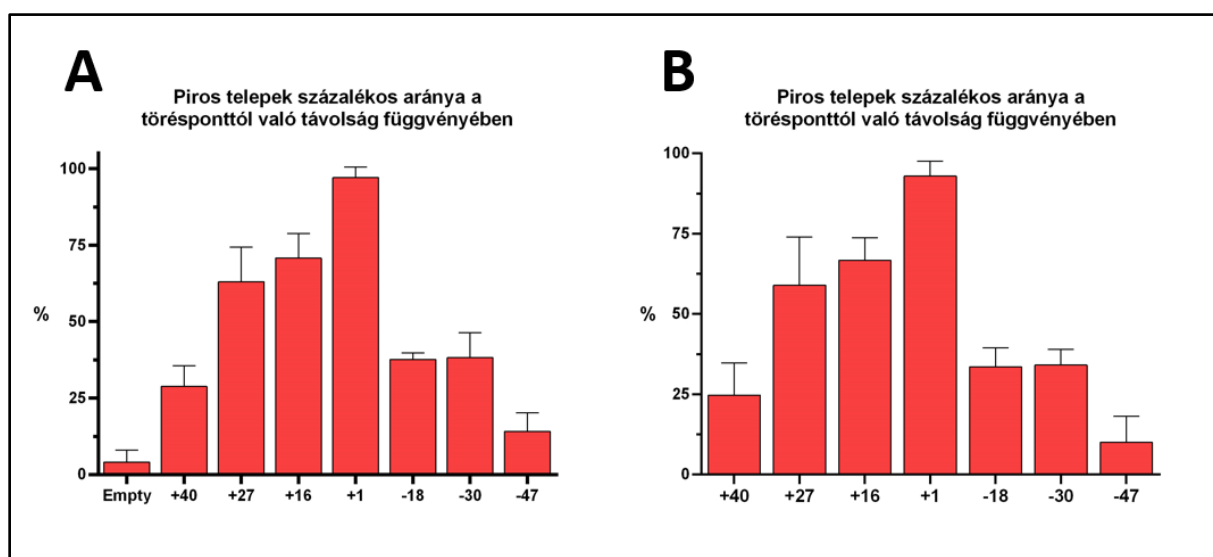


4. ábra: Az Empty dDNS alkalmazásával megjelenő transzformánsok. Az Empty dDNS ellenére minden transzformációs körben megjelent legalább egy piros színű telep. Ezeket piros nyilak jelölik.

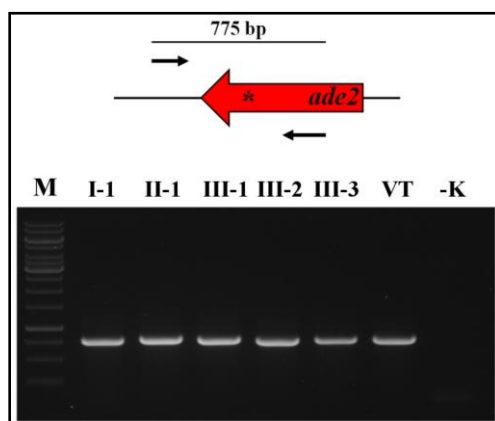


5. ábra: A +1 dDNS alkalmazásával létrehozott transzformánsok. A +1-es dDNS alkalmazásával 90% feletti volt a piros telepek összes megjelenő telepre vonatkoztatott aránya.

A piros színű telepekben bekövetkezett mutációt háttér mutációnak tekintettük, és figyelembe vettük az eredményeink kiértékelése során. A Cas9 általi kettősszálú hasításhoz legközelebb eső (+1) mutációt hordozó dDNS alkalmazása eredményezte a legnagyobb arányban piros színű telepek megjelenését ($92,9 \pm 2,7 \%$) (**5. ábra**). A módosítás helyének a törésponttól való távolságának növelésével a módosítás hatékonysága folyamatosan csökkent, minimumát a két legtávolabbi SNP helyén érte el $10 \pm 4,7 \%$ -ot (-47-es pozícióban) és $24,7 \pm 5,8 \%$ -ot (+40-es pozícióban). A törésponttól való távolság növekedésének függvényében a piros telepek összes telepszámhoz viszonyított aránya egy haranggörbére hasonlító lefutást eredményezett (**6. ábra**).

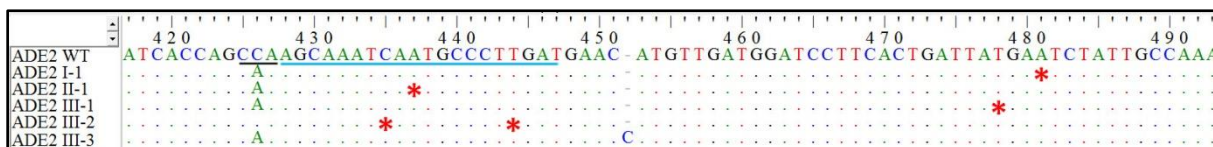


6. ábra: A módosítás hatékonyságának törésponttól számított távolságtól való függése. A különböző pozícióban elhelyezkedő pontmutációkat hordozó dDNS alkalmazásával megjelent piros telepek abszolút aránya %-ban (A) és az Empty dDNS alkalmazásakor megfigyelt háttérmutációk levonásával (B).



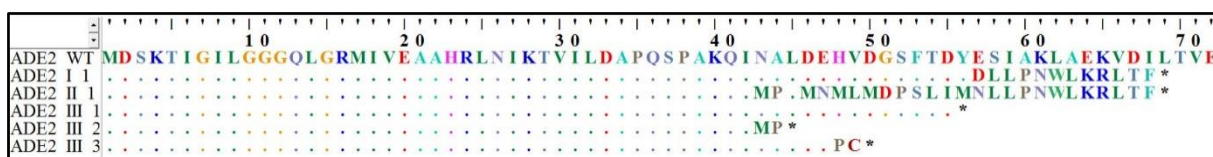
7. ábra: Az Empty dDNS alkalmazásával keletkezett piros színű telepek Sanger szekvenálásra szánt amplifikonjai. VT: vad típus, -K: negatív kontroll. M: marker: 250, 500, 750, **1000**, 1500, 2000, 2500, **3000**, 3500, 4000, 5000, **6000**, 8000, 10000 bp.

A továbbiakban megvizsgáltuk azt az öt piros telepet, amelyek az Empty dDNS alkalmazásakor jöttek létre. A klónokat felnövesztettük, és genomi DNS-t izoláltunk, majd a mutációt övező primerpárral amplifikáltuk a régiót (7. ábra). Az amplikonokat Sanger eljárással szekvenáltattuk, és a mutánsok nukleotid sorrendjét a vad típusú ADE2 gén szekvenciájára illesztettük (8. ábra).



8. ábra: Az Empty kontroll dDNS alkalmazásával létrejött piros telepek nukleotid szekvencia analízise. A vad típusú DNS szekvencián a feketével aláhúzott triplet (CCA) a PAM szekvencia reverz komplementere, amelytől jobbra világoskék színnel aláhúzva 20 nukleotid hosszúságú sgRNS target szekvencia található. A további szekvenciák a piros színű telepek szekvenálásából nyert eredmények. A megnevezésnél a római számok jelölik a párhuzamosok számát (I. II. III), mellette az arab számok pedig a telepek számát jelölik (1, 2, 3). A piros csillagok hiányzó nukleotidokat szimbolizálnak.

Azt tapasztaltuk, hogy a nem tervezett módosítások kizárólag a törésponttól downstream régiót érintették. Az öt telep közül egyben (III-2) nem történt meg a PAM szekvenciát módosító nukleotid cseréje. Valószínűsítjük, hogy ez azért történt így, mert a hibajavítás nem a dDNS-ről történt, annak, hogy arról történt, de később valami miatt mégis megváltozott pont ez a nukleotid, kisebb az esélye. Ezen kívül ebben a törzsben hiányzik a 435. és a 444. nukleotid. A további négy esetben a hibajavítás a dDNS-ről történhetett, hiszen mindegyik hordozza a módosított PAM szekvenciát. Jól látható azonban, hogy emellett ezek a klónok egyéb mutációval is rendelkeznek. Az I-1-esben a 481., a II-1-esben a 437., a III-1-esben a 478. pozícióban hiányzik egy-egy nukleotid, míg a III-3-asban a 451. és 452. nukleotid közé egy extra citozin épült be. Két esetben a felismerési szekvenciában történt nukleotid kiesés, a II-1 mutáns esetében egy, a III-2 esetében pedig kettő ilyen hiba található. Különösen érdekes az I-1 és III-1 mutáns esete, ahol igen messze a törésponttól 50, illetve 47 nukleotidra jelentek meg ezek az eltérések. Ennek az öt mutánsnak fehérje szinten is megvizsgáltuk a szekvenciáit, ugyanis azáltal, hogy egy vagy több nukleotid elveszett, vagy beépült kereteltolódás jött létre, amely elemzésünk szerint korai STOP kodonok megjelenését okozta (9. ábra).



9. ábra: Az Empty kontroll dDNS alkalmazásával létrejött öt piros telep fehérje szekvenciájának analízise. Az első sorban a vad típusú fehérje szekvencia látható. A többi szekvencia a mutánsokban feltárt változásokat mutatja, ahol a csillagok a korai STOP kodonok kialakulásának helyét jelölik.

A vad típusú fehérje szekvenciához képest az I-1 esetben az 57. pozícióban történt az első aminosav eltérés, amely a 69. pozícióban STOP kodon kialakulását eredményezte. II-1 esetben már az 43. pozícióban eltérést tapasztalunk, ami szintén a 69. pozícióban eredményezett STOP kodont. Az III-1-nél az 56. pozícióban bekövetkező változás azonnal STOP kodont okozott. Az III-2 a 43. pozícióban már eltér a referencia szekvenciától és a 45. pozícióban alakult ki a STOP kodon. Az III-3 esetben pedig az 48. pozícióban kezdődik az eltérés és a STOP kodon az 50. pozícióban jön létre (**9. ábra**). Eredményeink, alapján tehát megállapítható, hogy míg a törésponthoz közelebb eső módosítások hatékonysága kiemelkedően magas, a törésponttól való távolság növelésével a kívánt módosítás hatékonysága jelentősen csökken, bár hatékonysága még a vizsgált legnagyobb távolság esetén is kielégítő. Munkánk érdeme mindemellett nem merül ki eme összefüggésnek a számszerűsítésében, de felhívja a figyelmet arra, hogy egy ilyen újszerű technikának is megvannak a maga korlátai, amit minden esetben figyelembe kell vennünk. Adataink kiértékelésénél figyelembe vettük az Empty dDNS alkalmazásakor tapasztalt háttérmutáció százalékos arányát, és feltételeztük, hogy a törésponttól való távolság növelésével ennek mértéke nem változik (bár erre vonatkozó méréseket nem végeztünk). Fontos kiemelni, hogy bármennyire hatékony eljárás is a CRISPR/Cas9 rendszer, és nagyban leegyszerűsíti a mutánsok létrehozását, sőt olyan mutánsok hozhatók létre, amelyek semmilyen más módosítást nem hordoznak a kívánt mutáción kívül, mégis fontos fenntartásokkal kezelni egy ilyen szofisztikált rendszert. Munkánk rávilágít arra, hogy különösen pontmutációk létrehozása esetén, mindig érdemes Sanger szekvenálással (is) ellenőrizni a létrehozott mutánsokat, hogy kiszűrhetők legyenek a nem kívánt, járulékos mutációkat hordozó törzsek.

5. Összefoglalás

A humán patogén gombák és az általuk okozott megbetegedések egyre fokozottabb jelentőséggel bírnak világszerte. Közöttük is kiemelt jelentőséggel bír a *C. albicans*, amely amellet, hogy a normál emberi mikrobiom egyik tagja, képes súlyos, akár halálos kimenetelű megbetegedéseket és fertőzéseket is okozni. A genetikai módosításokhoz kapcsolódó kutatások ezért kezdetben a *C. albicans*-hoz, és annak különböző háttér folyamatainak, különböző faktorainak megismeréséhez kötődtek. Számos módszer került kifejlesztésre, amelyek hozzájárulhattak a gomba molekuláris folyamatainak, a különböző virulencia faktorainak és az antibiotikum rezisztencia háttérmechanizmusainak jobb megismeréséhez. Ezek a módszerek bár jelentős előrelépést jelentettek, mégis számos hátránnyal rendelkeztek (például az alkalmazott szülői törzs kiválasztásában, az időbeli hatékonyságban, vagy a nem kívánt mutációk felhalmozódásában). Ezeknek a problémáknak a megoldására a CRISPR alapú génmódosítási rendszer bizonyult úttörőnek, ugyanis a rendszer egyszerűen alkalmazható, magas hatékonyságú és gyors genomszerkesztést tesz lehetővé. Emellet célzottan vihetünk be mutációt, anélkül, hogy egyéb járulékos változások jelennének meg a genomban.

A *Candida* fajok közül a *C. albicans* mellett a *Candida parapsilosis* is egyre nagyobb figyelmet kapott az utóbbi években, aminek oka, hogy egyre gyakrabban izolálták főleg klinikai környezetből, mint például orvosi eszközökön, katéterek felszínén, műtéten átesett betegeknél, koraszülötteknél, és súlyos állapotú betegeknél. De míg a *C. albicans*-nál számos ismeretet gyűjtöttek már a genetikai módosítás területén is, addig a *C. parapsilosis*-ról kevesebb ismerettel rendelkezhetünk. A CRISPR/Cas9 technikának köszönhetően lehetőségünk van *C. parapsilosis*-ban is a célzott genetikai módosításokra. Munkánk célja az volt, hogy megvizsgáljuk, hogy a pontmutációk létrehozásának hatékonysága hogyan változik a Cas9 által előidézett kettős szálú töréstől való távolság függvényében. Ennek érdekében a könnyen monitorozható fenotípust meghatározó *CpADE2* gént céloztuk, és olyan dDNS-eket terveztünk, amelyek a PAM szekvencia módosításán kívül, még további egy olyan mutációt hordoznak, amelyek egyetlen nukleotid módosításával STOP kodont eredményeznek az említett génben. A dDNS-ek a törésponttól számított +40, +27., +16., +1., -18., -30., -47. pozícióban módosítják a gént, így meglehetősen finom felbontással tudtuk elvégezni a rendszer jellemzését. A funkcionális Ade2 enzim hiányában megjelenő piros színű telepek, az összes telepre vonatkoztatott arányával adható meg a rendszer hatékonysága. A transzformánsok analízise során azt tapasztaltuk, hogy a törésponthoz legközelebb eső

módosítást hordozó dDNS (+1 dDNS) alkalmazásával lettek a legmagasabb arányban ($92,9 \pm 2,7 \%$) piros színű telepek, míg a törésponttól távolodva ez fokozatosan csökken egy közel haranggörbére emlékeztető lefutást mutatva. Érdekes módon az Empty kontroll dDNS (amely csak a PAM szekvenciát módosítja a Cas9 általi folyamatos hasítás kiküszöbölése végett) alkalmazása esetén is megfigyeltünk piros színű telepeket, amelyeknek a Sanger-szekvenálás során kapott eredményei alapján megállapíthattuk, hogy különböző háttérmutációk (nukleotid kiesés, beépülés) játszódtak le. Ezek a változások fehérje szinten aminosav cserét és korai STOP kodonok kialakulását eredményezték.

Eredményeink rámutattak, hogy bár a CRISPR/Cas9 alapú rendszer nagy hatékonysággal és precizitással működik a törésponttól viszonylag nagyobb távolságokban is, mégis érdemes mindig figyelmet fordítani a járulékos mutációk esetleges megjelenésére. Ezek alapján úgy gondoljuk, hogy különösen pontmutációk létrehozása esetén erősen javasolt a jelöltek Sanger-szekvenálása, amely által lehetővé válik a nem kívánatos mutációkat hordozó transzformánsok kizárása.

6. Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni Prof. Dr. Vágvolgyi Csabának egyetemi tanárnak, a Szegedi Tudományegyetem Természettudományi és Informatikai Kar Mikrobiológiai Tanszék vezetőjének, hogy munkámat a Mikrobiológiai tanszéken végezhettem. Továbbá szeretném megköszönni Prof. Dr. Gácsér Attila egyetemi tanárnak, aki lehetőséget biztosított számomra, hogy munkámat az általa vezetett laboratóriumban végezzem és biztosított minden körülményt a dolgozatom elkészítéséhez. Hatalmas köszönettel tartozok Dr. Németh Tibornak a belém vetett bizalmaért, a sok-sok tanításáért és segítségéért, a végtelen türelméért és támogatásáért. Köszönöm továbbá a 301-es számú labor minden ott dolgozójának, hogy segítették a munkámat.

7. Irodalomjegyzék

- [1] D. L. Hawksworth, “The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation,” *Mycol. Res.*, vol. 95, no. 6, pp. 641–655, Jun. 1991, doi: 10.1016/S0953-7562(09)80810-1.
- [2] M. Blackwell, “The fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species?,” *Am. J. Bot.*, vol. 98, no. 3, pp. 426–38, Mar. 2011, doi: 10.3732/ajb.1000298.
- [3] C. Mora, D. P. Tittensor, S. Adl, A. G. B. Simpson, and B. Worm, “How many species are there on Earth and in the ocean?,” *PLoS Biol.*, vol. 9, no. 8, p. e1001127, Aug. 2011, doi: 10.1371/journal.pbio.1001127.
- [4] H. E. O’Brien, J. L. Parrent, J. A. Jackson, J.-M. Moncalvo, and R. Vilgalys, “Fungal community analysis by large-scale sequencing of environmental samples,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 71, no. 9, pp. 5544–50, Sep. 2005, doi: 10.1128/AEM.71.9.5544-5550.2005.
- [5] H. E. Hallen-Adams and M. J. Suhr, “Fungi in the healthy human gastrointestinal tract,” *Virulence*, vol. 8, no. 3, pp. 352–358, Apr. 2017, doi: 10.1080/21505594.2016.1247140.
- [6] A. E. Arnold and F. Lutzoni, “Diversity and host range of foliar fungal endophytes: are tropical leaves biodiversity hotspots?,” *Ecology*, vol. 88, no. 3, pp. 541–9, Mar. 2007, doi: 10.1890/05-1459.
- [7] and L. R. Gilbertson, R. L., “North American polypores. Vol. I. Abortiporus-Lindtneria,” 1986.
- [8] and L. R. Gilbertson, Robert L., “North American Polypores Vol. 2. Megasporoporia-Wrightoporia,” pp. 437-885., 1987.
- [9] B. W. Held, J. A. Jurgens, B. E. Arenz, S. M. Duncan, R. L. Farrell, and R. A. Blanchette, “Environmental factors influencing microbial growth inside the historic expedition huts of Ross Island, Antarctica,” *Int. Biodeterior. Biodegradation*, vol. 55, no. 1, pp. 45–53, Jan. 2005, doi: 10.1016/j.ibiod.2004.06.011.
- [10] H. S. Vishniac, “Yeast Biodiversity in the Antarctic,” in *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts*, Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag, pp. 419–440.
- [11] N. Wirtz, C. Printzen, and H. T. Lumbsch, “The delimitation of Antarctic and bipolar

- species of neuropogonoid *Usnea* (Ascomycota, Lecanorales): a cohesion approach of species recognition for the *Usnea perpusilla* complex.,” *Mycol. Res.*, vol. 112, no. Pt 4, pp. 472–84, Apr. 2008, doi: 10.1016/j.mycres.2007.05.006.
- [12] K. G. Peay, P. G. Kennedy, and J. M. Talbot, “Dimensions of biodiversity in the Earth mycobiome.,” *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 14, no. 7, pp. 434–47, 2016, doi: 10.1038/nrmicro.2016.59.
- [13] W. D. Gray and C. W. Hesseltine, “The use of fungi as food and in food processing,” *C R C Crit. Rev. Food Technol.*, vol. 1, no. 2, pp. 225–329, May 1970, doi: 10.1080/10408397009527104.
- [14] C. W. Hesseltine, “A Millennium of Fungi, Food, and Fermentation,” *Mycologia*, vol. 57, no. 2, pp. 149–197, Mar. 1965, doi: 10.1080/00275514.1965.12018201.
- [15] F. Morio, L. Lombardi, and G. Butler, “The CRISPR toolbox in medical mycology: State of the art and perspectives.,” *PLoS Pathog.*, vol. 16, no. 1, p. e1008201, 2020, doi: 10.1371/journal.ppat.1008201.
- [16] J.-A. H. van Burik and P. T. Magee, “Aspects of Fungal Pathogenesis in Humans,” *Annu. Rev. Microbiol.*, vol. 55, no. 1, pp. 743–772, Oct. 2001, doi: 10.1146/annurev.micro.55.1.743.
- [17] F. L. Mayer, D. Wilson, and B. Hube, “*Candida albicans* pathogenicity mechanisms,” *Virulence*, vol. 4, no. 2, pp. 119–128, Feb. 2013, doi: 10.4161/viru.22913.
- [18] L. M. Holland *et al.*, “Comparative Phenotypic Analysis of the Major Fungal Pathogens *Candida parapsilosis* and *Candida albicans*,” *PLoS Pathog.*, vol. 10, no. 9, p. e1004365, Sep. 2014, doi: 10.1371/journal.ppat.1004365.
- [19] E. Mancera, C. Frazer, A. M. Porman, S. Ruiz-Castro, A. D. Johnson, and R. J. Bennett, “Genetic Modification of Closely Related *Candida* Species.,” *Front. Microbiol.*, vol. 10, p. 357, 2019, doi: 10.3389/fmicb.2019.00357.
- [20] P. G. Pappas, M. S. Lionakis, M. C. Arendrup, L. Ostrosky-Zeichner, and B. J. Kullberg, “Invasive candidiasis.,” *Nat. Rev. Dis. Prim.*, vol. 4, p. 18026, 2018, doi: 10.1038/nrdp.2018.26.
- [21] H. Wisplinghoff, T. Bischoff, S. M. Tallent, H. Seifert, R. P. Wenzel, and M. B. Edmond, “Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases

- from a prospective nationwide surveillance study.,” *Clin. Infect. Dis.*, vol. 39, no. 3, pp. 309–17, Aug. 2004, doi: 10.1086/421946.
- [22] M. A. Pfaller and D. J. Diekema, “Epidemiology of Invasive Candidiasis: a Persistent Public Health Problem,” *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 20, no. 1, pp. 133–163, Jan. 2007, doi: 10.1128/CMR.00029-06.
 - [23] S. M. Noble, B. A. Gianetti, and J. N. Witchley, “*Candida albicans* cell-type switching and functional plasticity in the mammalian host,” *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 15, no. 2, pp. 96–108, Feb. 2017, doi: 10.1038/nrmicro.2016.157.
 - [24] H. Chen, X. Zhou, B. Ren, and L. Cheng, “The regulation of hyphae growth in *Candida albicans*,” *Virulence*, vol. 11, no. 1, pp. 337–348, 2020, doi: 10.1080/21505594.2020.1748930.
 - [25] A. Albrecht *et al.*, “Glycosylphosphatidylinositol-anchored proteases of *Candida albicans* target proteins necessary for both cellular processes and host-pathogen interactions.,” *J. Biol. Chem.*, vol. 281, no. 2, pp. 688–94, Jan. 2006, doi: 10.1074/jbc.M509297200.
 - [26] J. R. Naglik, S. J. Challacombe, and B. Hube, “*Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis.,” *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, vol. 67, no. 3, pp. 400–28, table of contents, Sep. 2003, doi: 10.1128/mmbr.67.3.400-428.2003.
 - [27] K. Gropp, L. Schild, S. Schindler, B. Hube, P. F. Zipfel, and C. Skerka, “The yeast *Candida albicans* evades human complement attack by secretion of aspartic proteases.,” *Mol. Immunol.*, vol. 47, no. 2–3, pp. 465–75, Dec. 2009, doi: 10.1016/j.molimm.2009.08.019.
 - [28] C. Murciano *et al.*, “Evaluation of the role of *Candida albicans* agglutinin-like sequence (Als) proteins in human oral epithelial cell interactions.,” *PLoS One*, vol. 7, no. 3, p. e33362, 2012, doi: 10.1371/journal.pone.0033362.
 - [29] R. Zordan and B. Cormack, “Adhesins in Opportunistic Fungal Pathogens,” in *Candida and Candidiasis*, Washington, DC, USA: ASM Press, 2014, pp. 243-P2.
 - [30] J. F. Staab, S. D. Bradway, P. L. Fidel, and P. Sundstrom, “Adhesive and mammalian transglutaminase substrate properties of *Candida albicans* Hwp1.,” *Science*, vol. 283, no. 5407, pp. 1535–8, Mar. 1999, doi: 10.1126/science.283.5407.1535.

- [31] C. J. Nobile *et al.*, “Complementary adhesin function in *C. albicans* biofilm formation,” *Curr. Biol.*, vol. 18, no. 14, pp. 1017–24, Jul. 2008, doi: 10.1016/j.cub.2008.06.034.
- [32] A. J. P. Brown, K. Haynes, N. A. R. Gow, and J. Quinn, “Stress Responses in *Candida*,” in *Candida and Candidiasis*, Washington, DC, USA: ASM Press, 2014, pp. 225–242.
- [33] S. Fanning and A. P. Mitchell, “Fungal biofilms,” *PLoS Pathog.*, vol. 8, no. 4, p. e1002585, 2012, doi: 10.1371/journal.ppat.1002585.
- [34] D. Uthayakumar, J. Sharma, L. Wensing, and R. S. Shapiro, “CRISPR-Based Genetic Manipulation of *Candida* Species: Historical Perspectives and Current Approaches,” *Front. Genome Ed.*, vol. 2, Jan. 2021, doi: 10.3389/fgeed.2020.606281.
- [35] W. A. Fonzi and M. Y. Irwin, “Isogenic strain construction and gene mapping in *Candida albicans*,” *Genetics*, vol. 134, no. 3, pp. 717–728, Jul. 1993, doi: 10.1093/genetics/134.3.717.
- [36] Q.-R. Xu *et al.*, “Molecular genetic techniques for gene manipulation in *Candida albicans*,” *Virulence*, vol. 5, no. 4, pp. 507–20, May 2014, doi: 10.4161/viru.28893.
- [37] J. Morschhauser, S. Michel, and P. Staib, “Sequential gene disruption in *Candida albicans* by FLP-mediated site-specific recombination,” *Mol. Microbiol.*, vol. 32, no. 3, pp. 547–556, May 1999, doi: 10.1046/j.1365-2958.1999.01393.x.
- [38] R. B. Wilson, D. Davis, and A. P. Mitchell, “Rapid Hypothesis Testing with *Candida albicans* through Gene Disruption with Short Homology Regions,” *J. Bacteriol.*, vol. 181, no. 6, pp. 1868–1874, Mar. 1999, doi: 10.1128/JB.181.6.1868-1874.1999.
- [39] B. Enloe, A. Diamond, and A. P. Mitchell, “A Single-Transformation Gene Function Test in Diploid *Candida albicans*,” *J. Bacteriol.*, vol. 182, no. 20, pp. 5730–5736, Oct. 2000, doi: 10.1128/JB.182.20.5730-5736.2000.
- [40] S. Wirsching, S. Michel, and J. Morschhäuser, “Targeted gene disruption in *Candida albicans* wild-type strains: the role of the MDR1 gene in fluconazole resistance of clinical *Candida albicans* isolates,” *Mol. Microbiol.*, vol. 36, no. 4, pp. 856–65, May 2000, doi: 10.1046/j.1365-2958.2000.01899.x.
- [41] S. Wirsching, G. P. Moran, D. J. Sullivan, D. C. Coleman, and J. Morschhäuser,

- “MDR1-Mediated Drug Resistance in *Candida dubliniensis*,” *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 45, no. 12, pp. 3416–3421, Dec. 2001, doi: 10.1128/AAC.45.12.3416-3421.2001.
- [42] S. Wirsching, S. Michel, G. Köhler, and J. Morschhäuser, “Activation of the Multiple Drug Resistance Gene MDR1 in Fluconazole-Resistant, Clinical *Candida albicans* Strains Is Caused by Mutations in a *trans*-Regulatory Factor,” *J. Bacteriol.*, vol. 182, no. 2, pp. 400–404, Jan. 2000, doi: 10.1128/JB.182.2.400-404.2000.
- [43] S. M. Noble and A. D. Johnson, “Strains and strategies for large-scale gene deletion studies of the diploid human fungal pathogen *Candida albicans*,” *Eukaryot. Cell*, vol. 4, no. 2, pp. 298–309, Feb. 2005, doi: 10.1128/EC.4.2.298-309.2005.
- [44] M. R. Javed *et al.*, “CRISPR-Cas System: History and Prospects as a Genome Editing Tool in Microorganisms,” *Curr. Microbiol.*, vol. 75, no. 12, pp. 1675–1683, Dec. 2018, doi: 10.1007/s00284-018-1547-4.
- [45] N. Nguyen, M. M. F. Quail, and A. D. Hernday, “An Efficient, Rapid, and Recyclable System for CRISPR-Mediated Genome Editing in *Candida albicans*,” *mSphere*, vol. 2, no. 2, doi: 10.1128/mSphereDirect.00149-17.
- [46] V. K. Vyas, M. I. Barrasa, and G. R. Fink, “A *Candida albicans* CRISPR system permits genetic engineering of essential genes and gene families,” *Sci. Adv.*, vol. 1, no. 3, Apr. 2015, doi: 10.1126/sciadv.1500248.
- [47] K. Min, Y. Ichikawa, C. A. Woolford, and A. P. Mitchell, “*Candida albicans* Gene Deletion with a Transient CRISPR-Cas9 System,” *mSphere*, vol. 1, no. 3, Jun. 2016, doi: 10.1128/mSphere.00130-16.
- [48] D. K. Benjamin, E. DeLong, C. M. Cotten, H. P. Garges, W. J. Steinbach, and R. H. Clark, “Mortality following blood culture in premature infants: increased with Gram-negative bacteremia and candidemia, but not Gram-positive bacteremia,” *J. Perinatol.*, vol. 24, no. 3, pp. 175–80, Mar. 2004, doi: 10.1038/sj.jp.7211068.
- [49] L. Clerihew, T. L. Lamagni, P. Brocklehurst, and W. McGuire, “*Candida parapsilosis* infection in very low birthweight infants,” *Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal Ed.*, vol. 92, no. 2, pp. F127-9, Mar. 2007, doi: 10.1136/fnn.2006.097758.
- [50] M. A. Pfaller *et al.*, “International Surveillance of Bloodstream Infections Due to

- Candida Species: Frequency of Occurrence and In Vitro Susceptibilities to Fluconazole, Ravuconazole, and Voriconazole of Isolates Collected from 1997 through 1999 in the SENTRY Antimicrobial Surv,," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 39, no. 9, pp. 3254–3259, Sep. 2001, doi: 10.1128/JCM.39.9.3254-3259.2001.
- [51] T. Nakamura and H. Takahashi, "Epidemiological study of Candida infections in blood: susceptibilities of Candida spp. to antifungal agents, and clinical features associated with the candidemia.," *J. Infect. Chemother.*, vol. 12, no. 3, pp. 132–8, Jun. 2006, doi: 10.1007/s10156-006-0438-y.
- [52] K. P. Ng, T. L. Saw, S. L. Na, and T. S. Soo-Hoo, "Systemic Candida infection in University hospital 1997-1999: the distribution of Candida biotypes and antifungal susceptibility patterns.," *Mycopathologia*, vol. 149, no. 3, pp. 141–6, 2001, doi: 10.1023/a:1007283211220.
- [53] S. F. Laffey and G. Butler, "Phenotype switching affects biofilm formation by Candida parapsilosis.," *Microbiology*, vol. 151, no. Pt 4, pp. 1073–1081, Apr. 2005, doi: 10.1099/mic.0.27739-0.
- [54] A. Tavanti, A. D. Davidson, N. A. R. Gow, M. C. J. Maiden, and F. C. Odds, "Candida orthopsilosis and Candida metapsilosis spp. nov. To Replace Candida parapsilosis Groups II and III," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 43, no. 1, pp. 284–292, Jan. 2005, doi: 10.1128/JCM.43.1.284-292.2005.
- [55] J. W. Fell and S. A. Meyer, "Systematics of yeast species in the Candida parapsilosis group.," *Mycopathol. Mycol. Appl.*, vol. 32, no. 3, pp. 177–93, Aug. 1967, doi: 10.1007/BF02049795.
- [56] S. A. Messer, R. N. Jones, and T. R. Fritsche, "International Surveillance of Candida spp. and Aspergillus spp.: Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2003)," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 44, no. 5, pp. 1782–1787, May 2006, doi: 10.1128/JCM.44.5.1782-1787.2006.
- [57] T. A. Clark *et al.*, "Epidemiologic and molecular characterization of an outbreak of Candida parapsilosis bloodstream infections in a community hospital.," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 42, no. 10, pp. 4468–72, Oct. 2004, doi: 10.1128/JCM.42.10.4468-4472.2004.
- [58] P. Martino *et al.*, "Fungemia in patients with leukemia.," *Am. J. Med. Sci.*, vol. 306, no.

- 4, pp. 225–32, Oct. 1993, doi: 10.1097/00000441-199310000-00004.
- [59] C. Ding and G. Butler, “Development of a gene knockout system in *Candida parapsilosis* reveals a conserved role for BCR1 in biofilm formation.,” *Eukaryot. Cell*, vol. 6, no. 8, pp. 1310–9, Aug. 2007, doi: 10.1128/EC.00136-07.
 - [60] L. Lombardi, S. A. Turner, F. Zhao, and G. Butler, “Gene editing in clinical isolates of *Candida parapsilosis* using CRISPR/Cas9.,” *Sci. Rep.*, vol. 7, no. 1, p. 8051, 2017, doi: 10.1038/s41598-017-08500-1.
 - [61] T. Németh, J. D. Nosanchuk, C. Vagvolgyi, and A. Gacser, “Enhancing the chemical transformation of *Candida parapsilosis*.,” *Virulence*, vol. 12, no. 1, pp. 937–950, 2021, doi: 10.1080/21505594.2021.1893008.
 - [62] P. Horváth, J. D. Nosanchuk, Z. Hamari, C. Vágvolgyi, and A. Gácser, “The identification of gene duplication and the role of secreted aspartyl proteinase 1 in *Candida parapsilosis* virulence.,” *J. Infect. Dis.*, vol. 205, no. 6, pp. 923–33, Mar. 2012, doi: 10.1093/infdis/jir873.