

## 36. OTDK Biológia Szekció

# CRISPR/Cas9 eljárás alkalmazása fluoreszcensen jelölt *Candida* *parapsilosis* törzsek létrehozására

Készítette: Zarnócki Andrea, Biológia MSc. 2021/2022. évfolyam

Szegedi Tudományegyetem

Témavezetők: Prof. Dr. Gácsér Attila

Egyetemi tanár

Dr. Németh Tibor

Tudományos munkatárs

Szeged

2022/2023

# TARTALOMJEGYZÉK

|                                                                                   |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. BEVEZETŐ .....</b>                                                          | <b>3</b>  |
| 1.1. A patogén <i>Candida</i> fajok jelentősége .....                             | 3         |
| 1.2. A <i>C. albicans</i> és a <i>C. parapsilosis</i> virulencia faktorai .....   | 4         |
| 1.3. A <i>Candida</i> fajok genetikai vizsgálata .....                            | 6         |
| 1.4. Fluoreszcens jelölés alkalmazása <i>Candida albicans</i> -ban .....          | 9         |
| <b>2. CÉLKITŰZÉS .....</b>                                                        | <b>11</b> |
| <b>3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK .....</b>                                              | <b>12</b> |
| 3.1. Felhasznált törzsek és alkalmazott oligonukleotidok .....                    | 12        |
| 3.2. Tápoldatok, táptalajok .....                                                 | 14        |
| 3.3. Fragmentek amplifikálása, és vizualizálása .....                             | 14        |
| 3.4. Plazmidkészlet létrehozása .....                                             | 14        |
| 3.4.1. Plazmid gerinc .....                                                       | 14        |
| 3.4.2. Fluoreszcens fehérjék génjeinek amplifikálása PCR-el és izolálása .....    | 15        |
| 3.4.3. Fluoreszcens fehérjék génjeinek emésztése .....                            | 16        |
| 3.4.4. Ligálás .....                                                              | 16        |
| 3.4.5. <i>E. coli</i> elektroporálás és plazmidok izolálása .....                 | 16        |
| 3.5. dDNS-ek létrehozása .....                                                    | 17        |
| 3.6. A, B és C fragmentek amplifikálása és izolálása .....                        | 17        |
| 3.6.1.1. A és B fragmentek amplifikálása .....                                    | 17        |
| 3.6.1.2. C fragment létrehozása .....                                             | 17        |
| 3.7. Cas9 plazmid emésztése .....                                                 | 17        |
| 3.8. Kémiai transzformálás .....                                                  | 18        |
| 3.9. Kolónia PCR .....                                                            | 18        |
| 3.10. A transzformációs kazetta eltávolítása .....                                | 18        |
| 3.11. Genomi DNS izolálás .....                                                   | 19        |
| 3.12. A dDNS célzott beépülésének validálása .....                                | 19        |
| 3.12.1. DNS izolátumok up-, downstream, illetve a teljes szakasz validálása ..... | 19        |
| 3.12.2. Southern blot .....                                                       | 19        |
| 3.13. Növekedési kinetika .....                                                   | 19        |
| 3.14. Mikroszkópos vizsgálatok és makrofágokkal való asszociáció .....            | 20        |
| <b>4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK .....</b>                                         | <b>21</b> |
| 4.1. A donor DNS-ek és az azokat hordozó plazmidok létrehozása .....              | 22        |

|      |                                                                  |           |
|------|------------------------------------------------------------------|-----------|
| 4.2. | A CRISPR/Cas9 komponenseinek előállítása transzformáláshoz ..... | 24        |
| 4.3. | Fluoreszcensen jelölt gombák létrehozása és ellenőrzése .....    | 26        |
| 4.4. | Fluoreszcens fehérjéket expresszáló gombák vizsgálata .....      | 29        |
| 4.5. | Kompetíciós kísérlet .....                                       | 30        |
| 5.   | <b>ÖSSZEFOGLALÁS .....</b>                                       | <b>32</b> |
| 6.   | <b>KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....</b>                                  | <b>33</b> |
| 7.   | <b>IRODALOMJEGYZÉK.....</b>                                      | <b>34</b> |

# 1. BEVEZETŐ

## 1.1. A patogén *Candida* fajok jelentősége

A gombák eukarióta, heterotróf szervezetek, amelyek a Föld minden pontján jelen vannak, levegőben, talajokban, vizekben, élő és elhalt szervezetekben, nélkülözhetetlen elemei a természet körforgásának azzal, hogy számos ökoszisztémában elsődleges lebontó szervezetekként működnek közre <sup>1</sup>. Míg 1991-ben a hozzávetőlegesen 70 000 ismert faj alapján 1,5 millióra tették a Földünkön élő gombafajok számát, addig napjainkra a 120 000 leírt gomba faj mellett, jóval többre, 5,1 millióra becsülik az ország fajszámát <sup>23</sup>. Felfedezésükhöz az elmúlt években végbemenő tudományos fejlődés, úgymint a gombák kimutatását és azonosítását megkönnyítő különböző PCR technológiák és szekvenálási módszerek, valamint új filogenetikai algoritmusok használata nagyban hozzájárult <sup>4-6</sup>.

A *Glomeromycota* törzs tagjai növényekkel kialakított szimbióta kapcsolataik, arbuszkuláris mikorrhizát kialakító képességük révén jelentősek <sup>7</sup>. Más fajok az élelmiszeriparban betöltött szerepük miatt fontosak, mint a sajtgyártásban használatos *Ascomycota* törzsbe tartozó *Penicillium roqueforti* vagy *P. camemberti*. Az *Ascomycota*-k törzse rendelkezik a legnagyobb fajszámmal, az eddig ismert fajok közel kétharmada, köztük számos modellorganizmus (*Saccharomyces cerevisiae*, *Neurospora crassa*, *Schizosaccharomyces pombe*) ebbe a csoportba sorolható <sup>8</sup>. Bizonyos gombafajok a normál humán flóra részét képezik, ezeket kommenzalistának nevezzük. Az *Aspergillus* nemzetség bizonyos tagjai, a *Candida*, *Malassezia*, *Penicillium*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces* fajok, habár csak nagyon kevés, 0,1 %-át alkotják a humán mikrobiomnak, szerepük mégsem elhanyagolható, ugyanis részt vehetnek az immunválasz kialakításában, és bizonyos körülmények között betegségeket is kiválthatnak <sup>9</sup>.

A Földön előforduló gombafajok közül csupán pár száz képes súlyos betegségeket okozni emberben, ugyanakkor ezek a fertőzések évente több mint 1 milliárd embert érintenek, és 1,5 millió halálos esetért felelősek <sup>10</sup>. Az okozott fertőzés tekintetében megkülönböztetünk enyhébb, bőrfelszín, illetve nyálkahártyát érintő betegségeket, és súlyosabb, szervi megbetegedéseket okozó fertőzéseket <sup>11</sup>.

Klinikai szempontból az *Ascomycota* és *Basidiomycota* törzs tagjai a legjelentősebbek. Az *Aspergillus* fajok, elsősorban az *Aspergillus fumigatus*, felelősek az aspergillosis kialakulásáért, ami főleg légzőszervi betegségeket jelent <sup>12</sup>. A szintén *Ascomycota* törzsbe tartozó *Saccharomycotina* altörzs számos faja extrém környezethez adaptálódott, mint pl. a magas ozmotikus nyomás vagy a magas hőmérséklet <sup>13</sup>. Ebbe az altörzsbe sorolhatók a candidiasis-t

okozó *Candida* fajok is, amelyek első helyen állnak az invazív gomba fertőzések tekintetében<sup>14</sup>. Az általuk okozott fertőzések esetszáma világszerte megnövekedett, mortalitási rátájuk akár 70 % is lehet bizonyos populációkban<sup>15,16</sup>. Eddig több mint 17 *Candida* fajt azonosítottak humán megbetegedés kiváltójaként, általánosságban elmondható, hogy a *Candida albicans* felelős a legtöbb esetért<sup>14</sup>. Ez a faj az orális candidiasis legfőbb okozója (a regisztrált esetek több mint 95%-áért felelős), valamint a legtöbbet izolált faj vulvovaginalis fertőzésekben, amely a nők 75%-át érinti életük során legalább egyszer<sup>17,18</sup>. Fontos azonban hangsúlyozni, hogy a *Candida* fajok opportunistáknak, a normál humán flóra tagjai, megtalálhatók a tápcsatornában, szájüregben, bőrfelszínen és a nemi szervek környékén, egészséges emberben nem váltanak ki megbetegedést, de legyengült szervezetben kóros folyamatokat idézhetnek elő<sup>14</sup>. Különösen veszélyeztetettek a HIV fertőzöttek, neutropéniában szenvedők, de kockázati tényezőt jelentenek a hosszas antibiotikum terápia, a transzplantációs műtétek és más, a szervezet fizikai védelmi vonalait megsértő eljárások, mint például a katéterek használata<sup>19</sup>. Ezek a fajok a negyedik leggyakoribb okozói a nosokomiális szisztémás fertőzéseknek, amelyeknek közel 10%-áért felelősek<sup>20</sup>. Az elmúlt évtizedekben történt vizsgálatok alapján a *C. albicans* mellett nőtt a nem-*albicans* fajok, úgymint a *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei* és *C. auris* okozta fertőzések előfordulási gyakorisága. Ez az öt faj a *C. albicans*-al együtt a *Candida* fertőzések mintegy 90%-áért felelős<sup>14</sup>. Közülük a *C. parapsilosis* által kiváltott invazív candidiasis epidemiológiája szembeötlő, ugyanis ez a faj gyakrabban fordul elő gyermekek, mint a felnőttek körében, közülük is elsősorban az alacsony születési súllyal világra jött csecsemőkre különösen veszélyes<sup>21</sup>. Esetükben a candidemia 30 %-ért a *C. parapsilosis* felelős, míg ez az arány felnőttek esetében 10-15%<sup>14</sup>. Mindez a 13 év alatti gyermekek körében 15%-os halálozási aránnyal párosul. A *C. parapsilosis* nemcsak a természetben fordul elő, hanem izolálható egészséges emberi bőrfelszínről, sőt klinikai eszközökön, különböző implantátumokon, katétereken is nagy hatékonysággal tapad meg, és képez biofilmet<sup>22,23</sup>. A faj virulenciájának és sejtszintű folyamatainak további vizsgálatát azonban nehezíti, hogy nem áll rendelkezésünkre a törzsek, illetve a fehérjék fluoreszcens jelölését lehetővé tevő konstrukciók, mivel a *C. albicans*-ban alkalmazott fluoreszcens proteinek (FP) génjeinek *C. parapsilosis*-szal kompatibilis rendszerbe integrálása még nem történt meg.

## 1.2. A *C. albicans* és a *C. parapsilosis* virulencia faktorai

A virulencia a kórokozó betegséget okozó képessége, amely függ a gazda szervezet állapotától. A mikroorganizmusok azon tulajdonságait, amelyek alkalmassá teszik őket más

szervezetek megtámadására és azokban betegségek kiváltására, virulencia faktoroknak nevezünk. A *C. albicans* számos virulencia faktorral rendelkezik, amelyek közül a morfológia átmenetre való képességét tartjuk az egyik legfontosabbnak. Ennek az eseménynek a hátterében a sejt expressziós mintázatának finoman szabályozott, sok célgén kifejeződését érintő megváltozása áll, amelyben az Efg1 transzkripció faktor játszik központi szerepet <sup>24,25</sup>. Bizonyos környezeti tényezők hatására az élesztő sejtek sejtfaelemeinek szerveződése megváltozik, ennek következtében hifa vagy pszeudohifa alakul ki <sup>26</sup>. A hifák ellenállóbbak a makrofágok ölési mechanizmusainak, míg az élesztő sejtek feltételezhetően az invázió alatti terjedésben játszanak fontos szerepet <sup>27,28</sup>. Ezzel szemben jelenlegi ismereteink szerint a *C. parapsilosis* kizárólag élesztő vagy pszeudohifa alakban fordul elő, valódi hifa képzésére nem képes <sup>29,30</sup>. A gazdában való kolonizáció feltétele az adhézió, vagyis a mikróbák megtapadása, amely biotikus (orális-, vaginális-, gasztrointesztinális mukóza) felszíneken kívül érinthet orvosi eszközöket is (katéterek, implantátumok) <sup>31,32</sup>. A megtapadást speciális proteinek (adhezinek) biztosítják <sup>33</sup>. Az adhezinek legtöbbet vizsgált csoportja az Als (agglutinin-like sequence - agglutinin szerű szekvenciák) fehérjék, amelyek *C. albicans*-ban nyolctagú családot alkotnak (*ALS1-ALS7* és *ALS9*) <sup>34</sup>. Ezek sejtfelszíni glikoproteineket kódolnak, és glikozilfoszfatidil-inozitol horgonnyal kapcsolódnak a gomba sejtmembránjához <sup>35</sup>. Míg az *ALS1-ALS4* által kódolt adhezinek a csíratömlő és hifa képzésben fontosak, emellett közreműködnek humán hámszöveti sejtekhez való adhézióban (*Als2-4*), addig az *Als5-7* és *Als9* az élesztő sejtek felszínén is megtalálhatóak <sup>36,37</sup>. *C. parapsilosis*-ban is megtalálhatók az *ALS* szekvenciák, ugyanakkor számuk úgy tűnik izolátumonként változik. A referencia CDC317 törzs genomjában öt, a laboratóriumban gyakran használt CLIB214 és GA1 törzsekben pedig rendre négy, illetve egy *ALS* gén lelhető fel <sup>38,39</sup>. Ezek közül a *CaALS7* ortológja *C. parapsilosis*-ban kulcsfontosságú a gazda epithéliális sejtjeihez való adhézióban, a gén eltávolítása a szájüregi hámszövet tekintetében csökkent adhéziós képességet és csökkent virulenciát eredményezett *in vivo* egér modellben <sup>40</sup>.

A megtapadást követően a *C. albicans* sejtek osztódásnak indulhatnak (kolonizáció) vagy behatolhatnak a gazda sejtjeibe, szöveteibe (invázió). A kolonizáló gombák egyik megjelenési formája a mikrobiális biofilm, amely egyedi niche-t teremt az azt alkotó elemeknek <sup>41</sup>. A gomba sejtek osztódásával a biofilm vastagsága megnő, benne jelen vannak az élesztő, hifa, és pszeudohifa struktúrák is, melyek komplexéből élesztősejtek szabadulhatnak ki, elősegítve ezzel a patogén terjedését <sup>42</sup>. Lényeges különbség a *C. albicans* és *C. parapsilosis* között, hogy előbbi vastagabb, kompaktabb biofilmet képez, mint utóbbi, ugyanakkor egy közelmúltbeli tanulmány szerint a *C. parapsilosis* izolátumok nagyobb hányada (két harmada) képes biofilmet

képezni szemben a *C. albicans* izolátumokkal, amelyek közül csak minden ötödik volt erre képes <sup>43,44</sup>. Ezek alapján tehát úgy tűnik, hogy ez a tulajdonság is inkább izolátum, mintsem fajfüggő sajátság. Az invázió alatt a patogén gomba különböző hidrolitikus enzimeket szekretál, amelyek segítségével nem csak egyszerűbben felvehető szén- és nitrogénforrásra tehet szert lipidek vagy fehérjék bontásával, de a gazdába való bejutást is megkönnyíthetik. Ezek ugyanis megbonthatják a sejtmembrán integritását, lebonthatják extracelluláris mátrix elemeit, károsíthatják a gazda szöveteit, valamint elősegíthetik a további adhéziót, biofilm képzést és az intracelluláris túlélést. Szekretált enzimek szempontjából a *C. albicans* virulencia faktorai számban és diverzitásban is jelentősen meghaladják a *C. parapsilosis*-ét. A Sap-ok, (secreted aspartyl proteinase - szekretált savas proteináz) virulenciában betöltött szerepére az a felismerés világos, miszerint ezeket az enzimeket a gazda felszíni rétegeiről (bőr, vaginális hám) származó izolátumok nagyobb valószínűséggel termelik és szekretálják, mint azok az izolátumok, amelyeknek forrásai szisztémás megbetegedések vagy környezeti minták <sup>45</sup>. Egyes Sap-ok képesek bizonyos immunfehérjék (IgE), szerkezeti fehérjék (keratin, kollagén), illetve a nyálban található fehérjék bontására, ezzel hozzájárulva a gazdában való sikeres túléléshez és a gombaellenes folyamatok modulálásához <sup>46</sup>. Míg *C. albicans*-ban a SAP géncsaládot tíz (SAP1-SAP10) gén alkotja, *C. parapsilosis*-ban összesen három gén került leírásra, amelyek közül az egyik duplikáción esett át <sup>47</sup>. Ezek szerepe az adhézióban, a fagociták károsításában, a fagocitózis általi ölés elkerülésében és a komplement rendszer komponenseinek bontásában került tisztázásra <sup>48</sup>. A lipázok egy másik fontos csoportot képviselnek a *Candida* fajok patogenitásának befolyásolása tekintetében. *C. albicans*-ban tíz, *C. parapsilosis*-ban eddig két ilyen gént azonosítottak (*CpLIP1* és *CpLIP2*), amelyek közül egyedül a *CpLIP2* terméke aktív és virulenciában betöltött szerepét bizonyítja, hogy blokkolása csökkent szövetkárosodást okozott rekonstituált humán epitel modellben, valamint csökkent a gomba biofilm formáló képessége is <sup>49,50,51</sup>.

### 1.3. A *Candida* fajok genetikai vizsgálata

A *Candida* fajok által okozott fertőzések hatékony kezelése továbbra is nagy kihívás, ezért számos kutatás a patogenitásban szerepet játszó molekuláris mechanizmusok megértésére irányult, kiemelkedő figyelmet fordítva a fertőzések legnagyobb hányadát kiváltó *C. albicans* fajra. A péklesztő genetikai és molekuláris vizsgálatára alkalmas módszerek jelentős része nem alkalmazható közvetlenül *C. albicans*-ban (és egyéb humán patogén *Candida* fajokon) egyrészt az ivaros folyamatok kis gyakorisága -, másrészt az univerzálisától eltérő kodonhasználat miatt.

Ettől függetlenül a köztük lévő hasonlóság mégis lehetővé tette, hogy a *S. cerevisiae*-re kidolgozott technikák közül néhány adaptálható legyen *C. albicans*-ra is <sup>52</sup>. A *C. albicans* diploid organizmus, egy gén funkcionális vizsgálatához homozigóta deléciós mutáns létrehozása szükséges, mivel a vizsgálandó gén egy kópiában való megléte általában képes az adott funkciót ellátni és nem okoz fenotípusos eltérést a vad típushoz képest. Az ura-blaster konstrukció, amelyet eredetileg *S. cerevisiae* gének eltávolítására fejlesztettek ki, az első eljárás, amellyel célzott genetikai módosítást lehetett végrehajtani *C. albicans*-ban <sup>53</sup>. Ez a technika azonban számos hátránnyal rendelkezett, mint az időigényes, allélonként egy-egy transzformálás és a marker eliminálása, az auxotróf törzs meglétének feltétele (ezzel klinikai izolátumokban nem alkalmazható jellege), valamint az *ura3<sup>-</sup>* auxotróf törzs csökkent virulenciával járó fenotípusa, ami rámutatott egyéb géndeléciós módszerek kifejlesztésének fontosságára <sup>54,55</sup>. Az auxotróf törzs szükségességének problémáját az FLP-FRT alapú rendszer küszöbölte ki, amely mind *C. albicans*-ban, mind *C. parapsilosis*-ban alkalmazásra került, azonban a két allél külön transzformálási lépéssel való eltávolításának problémáját nem oldotta meg, így az eljárás továbbra is időigényes maradt <sup>56,57</sup>. A harmadik jelentős, genetikai módosításra alkalmas módszer a többszörös auxotrófia komplementáción alapuló technika. Alkalmazásának nagy hátránya, hogy szükség van olyan auxotróf törzsrre, amely több bioszintézis útra nézve is hibás, azonban nagy előrelépést jelentett, hogy már nincs szükség klónozási lépésekre, ugyanis fúziós PCR-el létrehozhatók a felhasznált transzformációs kazetták, de továbbra is két transzformációs körre volt szükség a két allél eltávolításához <sup>58</sup>.

Nagy áttörést jelentett a genetikai analízisben a CRISPR/Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) módszer, amelynek felfedezése baktériumok és archeák immunrendszerének vizsgálatához köthető <sup>59</sup>. A rendszer működéséhez szükség van egy PAM (Protospacer adjacent motif) szekvenciára a genomi DNS-en, amelynek nukleotidsorrendje a Cas9 típusától függően különböző lehet. Általában a *Streptococcus pyogenes* Cas9 fehérjéje használatos, amelynek mindössze két G nukleotidra van szüksége, az azok előtt lévő nukleotid bármi lehet (NGG), ezért nagyon sok potenciális target szekvencia rendelhető hozzá. Szükség van továbbá az ún. single guide RNS-re (sgRNS), amelynek része egy 20 nukleotid hosszúságú szekvencia, amely az ezzel komplementer régióhoz irányítja a Cas9 endonukleáz enzimet, és az egy meghatározott ponton kettős szálú törést hoz létre a DNS-en. Ennek eredményeként különböző hibajavító mechanizmusok aktiválódnak a sejtben. A DNS javítása történhet nem homológ végek összekapcsolódásával, amely bizonyos gyakorisággal helyesen is összeillesztheti a két DNS véget, de gyakoribb a pontmutációk vagy kisebb inszerciók/deléciók létrejötte, amelyek frame shift (kereteltolódási) mutációt, és/vagy korai stop kodon(ok)

létrejöttét idézhetik elő. A másik lehetőség, ha a hiba kijavítása homológ rekombinációval (HDR - homology-directed repair) történik. Ehhez szükség van egy ún. donor DNS (dDNS) jelenlétére, aminek fontos tulajdonsága, hogy a törést övező szakaszokkal homológiát mutasson, valamint tartalmazzon egy meghatározott mutációt. Így bekövetkezhet a homológ rekombináció az adott szakaszok között, és létrehozható a kívánt genetikai módosítás. Számos megközelítés született az elmúlt években a Cas9 *Candida* fajokban történő expresszióját illetően. Az első, Vyas és mtsi. által kidolgozott rendszer, azon alapul, hogy a Cas9 és a sgRNS egy az *ENO1* lókuszbba integrálódott konstrukcióról konstitutívan expresszálódik így létrejöhet a célzott DNS hasítás, és dDNS jelenlétében az irányított hibajavítás <sup>60</sup>. A Min és mtsi. által bemutatott megközelítés tranziens Cas9 és sgRNS expressziót alkalmaz, mivel ezek a komponensek külön-külön egy-egy lineáris DNS fragmenten kódoltak, amelyek rövid idő alatt lebomlanak a sejtben. A szelekciós marker ebben az esetben a dDNS-en kódolt <sup>61</sup>. Lombardi és mtsi. egy plazmid alapú CRISPR módszert dolgoztak ki, amely *C. parapsilosis* vizsgálatára alkalmas, illetve nagy előnye, hogy irányított és halmozott mutációk létrehozására is alkalmas, ellentétben az előző próbálkozásokkal, hiszen ebben az esetben a szelekciós nyomás hiányában elveszhet a konstrukció elemeit hordozó plazmid, így az újra szenzitívvé válik az alkalmazott antibiotikumra <sup>62</sup>. Egy újabb módszer alapját a fúziós PCR technika adta, amely univerzális és specifikus fragmentek fúzióján és *in vivo* rekombinációján alapul. Ebben az esetben a Cas9-t és a maltóz promóter szabályozása alatt álló *FLP* gént, valamint a szelekciós marker egyik felét tartalmazó Cas9 fragment plazmid emésztés segítségével hozható létre, amely mindig változatlan. Szintén konstans az ún. „A” fragment, amely a szelekciós marker másik felét, valamint egy promótert hordoz. Az univerzális „B” fragment kódolja az sgRNS szerkezeti részét és a terminátort. Az sgRNS target szekvencia az amplifikáláshoz szükséges primer-rel illeszthető az amplikonra. Az „A” és „B” fragment PCR segítségével fuzionáltatható, amelynek eredménye a „C” fragment. A transzformálás a dDNS, a „C” fragment és a Cas9 fragment alkalmazásával valósul meg, amely utóbbi kettő *in vivo* rekombinálódhat, és létrejöhet a funkcionális szelekciós marker. A létrejött fragment két végét FRT (Flipase recognition target - Flipáz felismerési célszekvencia régiók) és a target lókuszt up- és downstream szekvenciái határolják, amelyek a *HIS1* gént célozzák. A kazetta eltávolítása maltóz indukciót követően valósulhat meg, ugyanis a Flp fehérje egy helyspecifikus rekombináz, ami az FRT régiók közötti rekombinációt katalizálja <sup>63</sup>. A rendszert kutatócsoportunk adaptálta *C. parapsilosis*-ra a target régiók és szabályozó szekvenciák cseréjével (publikáció alatt).

#### 1.4. Fluoreszcens jelölés alkalmazása *Candida albicans*-ban

A fluoreszcencia egy fizikai jelenség, amelynek során egy magasabb frekvenciájú fénnyel történő megvilágítás hatására a célmolekula elektronja egy magasabb energiájú ún. gerjesztett állapotba kerül. Az elektron ebből az állapotból rövid idő alatt visszajut az alapállapotába, miközben a két energiaszint közötti különbséget egy (a gerjesztő fénynél) rövidebb frekvenciájú fény (és hő) formájában bocsátja ki <sup>64</sup>. Napjainkban számos fluoreszcens molekulát alkalmaznak bizonyos biológiai folyamatok vizsgálatakor, pl. sejtek életképességének meghatározásához, vagy sejtalkotók láthatóvá tételéhez <sup>65-68</sup>. Ezek közé a molekulák közé tartoznak a FP-k is, amelyek felfedezése és alkalmazása nagyban hozzájárult a sejt szintű folyamatok megfigyeléséhez és megértéséhez. Az első fluoreszcens fehérjét Shimomura és munkatársai izolálták 1962-ben az *Aequorea victoria* nevű medúzából <sup>69</sup>. A gént harminc évvel később sikerült megklónozni, amely megnyitotta az utat a széleskörű molekuláris biológiai felhasználása előtt <sup>70</sup>. Felhasználásuk nem csak molekuláris szinten pl. fehérje-fehérje interakciók vizsgálatát, hanem sejten belüli és sejtek közötti kölcsönhatások nyomon követését is lehetővé teszi. Fehérjék vizsgálatakor elengedhetetlen a sejtben való lokalizációjuk pontos ismerete, amely a vizsgált fehérje fluoreszcens jelölésével meghatározható. Gének expressziójának időfüggése vagy valamilyen faktor hatására bekövetkező változása FP-ket alkalmazó riporter konstrukciók alkalmazásával vizsgálható, és a fluoreszcencia intenzitásának mértéke az expresszió intenzitásáról is információval szolgálhat <sup>71,72</sup>.

Bizonyos *Candida* fajok univerzálístól eltérő kodonhasználat miatt gyakran a más fajokból származó fehérjék génjeinek kodon optimalizációjára van szükség. Az első fluoreszcens fehérje, amelyet *C. albicans*-ban alkalmazásra került a GFP (Green fluorescent protein – zöld fluoreszcens fehérje) volt, amelyet a, szekvencia kismértékű megváltoztatásával létrehozott, sárga és kék fényt emittáló YFP (Yellow FP) és CFP (Cyan FP) fehérjék követtek <sup>73,74</sup>. Ez a technika különböző fehérjék megjelölését tette lehetővé, amelyeknek sejtben való elhelyezkedése fluoreszcens mikroszkóppal meghatározható volt. Ezen PCR-alapú génjelölési módszer hatékonyabbnak és gyorsabbnak bizonyult fúziós proteinek létrehozásában, mint a hagyományos klónozási technika, valamint ezzel elérhetővé vált a kifejeződés időfüggésének nyomon követése is <sup>75</sup>. További módosításokkal piros színváltozatú fluoreszcens fehérjét is létrehoztak, amely az mCherry nevet kapta. A GFP, YFP és mCherry felhasználásával végzett kísérlet szintén a PCR-alapú technika felhasználásával történtek. A megfelelő plazmidről PCR segítségével amplifikálható az FP-t és szelekciós markert kódoló DNS szakasz, amely gombába való transzformálás után homológ rekombinációval beépül a kiválasztott lókuszbba. Egy fehérje

lokalizációjának vizsgálata ilyen jellegű megközelítéssel nem csak *C. albicans*-ban, de *C. parapsilosis*-ban is alkalmazásra került <sup>76</sup>. Egy-egy fehérje fluoreszcens jelölésén kívül lehetőség van az adott gomba fluoreszcens jelölésére, ebben az esetben a FP-t kódoló gén egy konstitutív promóter után való illesztése, és egy megfelelő lókuszbba történő integrálása szükséges. Ezt *C. albicans*-ban Morschhäuser és munkatársai valósították meg először, kodon optimalizált GFP felhasználásával, amellyel lehetővé vált a patogén fluoreszcens mikroszkóppal való nyomonkövetése <sup>77</sup>. A gomba törzs FP-vel való jelölésének óriási előnye a hagyományos fluoreszcens sejtalfestékekkel szemben, hogy míg a sejtalfestett élesztők csak rövid ideig követhetők nyomon (hiszen a festést követően lefűződő leánysejtek jelöletlenek maradnak), a FP-t expresszáló sejtek genetikailag stabilan hordozzák és expresszálják a fluorofórt, így korlátlan számú sejtosztódást követően is vizsgálhatók. Később további FP-k kerültek bemutatásra *C. albicans*-ban, lefedve szinte a színskála minden spektrumát, és lehetővé téve több fehérjekompenens egyidejű nyomon követhetőségét <sup>78</sup>.

A fluoreszcensen jelölt *C. albicans* sejtek alkalmazása emlős fagocitákkal történő interakcióban hozzájárult a gazda - patogén kölcsönhatás alaposabb megértéséhez, időbeli lefolyásának jellemzéséhez, a folyamat kvantifikálásához <sup>79,80,81</sup>. *C. parapsilosis* esetén értékes adatokat szolgáltatott a fagocitózis mértékéről, intenzitásáról, és részben alkalmazásukkal nyert igazolást a CpLip2 enzim virulenciában betöltött szerepe is <sup>82,83</sup>. Tekintettel arra, hogy egy faj különböző izolátumai között lényeges fiziológiai és/vagy virulenciabeli eltérések adódhatnak, értelmet nyer a kompetíciós megközelítés, vagyis több különböző izolátum alkalmazása ugyanazon kísérleti elrendezésen belül. Ennek relevanciája különösen az adhézióban és a makrofágokkal való kölcsönhatás vizsgálatában nyilvánvaló, ahol több különböző törzs teljesen megegyező körülmények között lehet kitéve fagocitáknak vagy versenghet egy adott felületen való minél hatékonyabb megtapadásért. Ez az elrendezés akár közelebb is állhat a valósághoz, különösen egy olyan, a szabadban is előforduló, faj esetén, mint a *C. parapsilosis*, hiszen kórházi körülmények között egy páciens ugyanazon faj több különböző forrásból származó törzsével is fertőződhet. Annak ellenére, hogy a jelöléshez szükséges eszközrendszer elérhető, az ilyen jellegű kísérletek ezidáig vártak magukra.

## 2. CÉLKITŰZÉS

Munkánk célja egy bármely *C. parapsilosis* izolátum fluoreszcens jelölését lehetővé tevő CRISPR/Cas9 alapú genommódosítási rendszer kidolgozása és alkalmazása, a kapcsolódó plazmidkészlet létrehozása, valamint a jelölt izolátumok fagocitózis kísérletekben való vizsgálata *in vitro*, az izolátumok közötti esetleges különbségek feltárására.

### 3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

#### 3.1. Felhasznált törzsek és alkalmazott oligonukleotidok

##### Felhasznált törzsek és genotípusaik

*Escherichia coli* 2T1

***Candida parapsilosis* CLIB214 vad típus**

***Candida parapsilosis* CDC317 vad típus**

***Candida parapsilosis* GA1 vad típus**

***Candida parapsilosis* CLIB214<sup>GFP</sup>**

cpneut5l::P<sub>CaTDH3</sub>-GFP/cpneut5l::P<sub>CaTDH3</sub>-GFP *HIS1/his1*::FRT

***Candida parapsilosis* CLIB214<sup>mTurquoise2</sup>**

cpneut5l::P<sub>CaTDH3</sub>-mTurquoise2/cpneut5l::P<sub>CaTDH3</sub>-mTurquoise2 *HIS1/his1*::FRT

***Candida parapsilosis* CLIB214<sup>CFP</sup>**

cpneut5l::P<sub>CaTDH3</sub>-CFP/cpneut5l::P<sub>CaTDH3</sub>-CFP *HIS1/his1*::FRT

***Candida parapsilosis* CLIB214<sup>ffDronpa</sup>**

cpneut5l::P<sub>CaTDH3</sub>-ffDronpa/cpneut5l::P<sub>CaTDH3</sub>-ffDronpa *HIS1/his1*::FRT

***Candida parapsilosis* CLIB214<sup>mCherry</sup>**

cpneut5l::P<sub>CaTDH3</sub>-mCherry/cpneut5l::P<sub>CaTDH3</sub>-mCherry *HIS1/his1*::FRT

***Candida parapsilosis* CLIB214<sup>mScarlet</sup>**

cpneut5l::P<sub>CaTDH3</sub>-mScarlet/cpneut5l::P<sub>CaTDH3</sub>-mScarlet *HIS1/his1*::FRT

***Candida parapsilosis* CLIB214<sup>RFP</sup>**

cpneut5l::P<sub>CaTDH3</sub>-RFP/cpneut5l::P<sub>CaTDH3</sub>-RFP *HIS1/his1*::FRT

***Candida parapsilosis* CLIB214<sup>YFP</sup>**

cpneut5l::P<sub>CaTDH3</sub>-YFP/cpneut5l::P<sub>CaTDH3</sub>-YFP *HIS1/his1*::FRT

***Candida parapsilosis* CDC317<sup>mTurquoise2</sup>**

cpneut5l::P<sub>CaTDH3</sub>-mTurquoise2/cpneut5l::P<sub>CaTDH3</sub>-mTurquoise2 *HIS1/his1*::FRT

***Candida parapsilosis* CDC317<sup>mScarlet</sup>**

cpneut5l::P<sub>CaTDH3</sub>-mScarlet/cpneut5l::P<sub>CaTDH3</sub>-mScarlet *HIS1/his1*::FRT

***Candida parapsilosis* CDC317<sup>YFP</sup>**

cpneut5l::P<sub>CaTDH3</sub>-YFP/cpneut5l::P<sub>CaTDH3</sub>-YFP *HIS1/his1*::FRT

***Candida parapsilosis* GA1<sup>mTurquoise2</sup>**

cpneut5l::P<sub>CaTDH3</sub>-mTurquoise2/cpneut5l::P<sub>CaTDH3</sub>-mTurquoise2 *HIS1/his1*::FRT

***Candida parapsilosis* GA1<sup>mScarlet</sup>**

cpneut5l::P<sub>CaTDH3</sub>-mScarlet/cpneut5l::P<sub>CaTDH3</sub>-mScarlet *HIS1/his1*::FRT

***Candida parapsilosis* GA1<sup>YFP</sup>**

cpneut5l::P<sub>CaTDH3</sub>-YFP /cpneut5l::P<sub>CaTDH3</sub>-YFP *HIS1/his1*::FRT

| <u>Oligonukleotid neve</u> | <u>Oligonukleotid szekvenciája (5' -&gt; 3')</u>                  |
|----------------------------|-------------------------------------------------------------------|
| AHO1096                    | gacggcacggccacgcgtttaaaccgcc                                      |
| AHO1097                    | cccgccaggcgctgggggttaaaccacg                                      |
| AHO1232                    | agaatgcctattgacttcaaagggtg                                        |
| AHO1237                    | aggtgatgctgaagctattgaag                                           |
| CaTDH3_Do_Chk_FOR          | tttcggaattgaaccacgcg                                              |
| CpN5L_Do_Chk_REV           | tgtaccaatcagggttagtgacc                                           |
| CpN5L_Up_Chk_FOR           | cctatttcgcatcattgcagttc                                           |
| ffDronpa_ClaI_FOR          | ttttatcgatatgtcagttattaaaccagatatgaaaattaaattaag                  |
| ffDronpa_NheI_REV          | ttttttgctagcctatttagcttgtcttgtaattctgaatg                         |
| gRNA_CpN5L_120             | gagttcgattcttctcgtccactctcgctccacttcgggtccgttttagagctagaaatagcaag |
| mCherry_ClaI_FOR           | ttttatcgatatgggttcaaaagggtgaagatgataatatggc                       |
| mCherry_NheI_REV           | ttttttgctagcctatttatataattcatcaccaccagttgaatg                     |
| mScarlet_ClaI_FOR          | ttttatcgatatgggtcagtaaagggaagc                                    |
| mScarlet_NheI_REV          | ttttttgctagccttacttatataactcatccattcctccag                        |
| mTurquoise2_ClaI_FOR       | ttttatcgatatgtctaaagggtgaagaattattcac                             |
| mTurquoise2_NheI_REV       | ttttttgctagcctatttgtacaattcatccatacctaagg                         |
| pTB120 UNIVRev             | tggacgagataagaatcgaactcatg                                        |
| RFP_ClaI_FOR               | ttttatcgatatggataacactgaagatgttattaaagaattc                       |
| RFP_NheI_REV               | ttttttgctagcctatttgagaaccagagtgctagcttc                           |
| ScURA3_Ter_Chk_REV         | acccgggaatctcggtcg                                                |
| FP_CpN5L_dDNA_F            | aacctcatctcaaggcgc                                                |
| FP_CpN5L_dDNA_R            | acacaaaaatacatgattgcgtc                                           |
| CpN5L_Up_FOR               | cctaacctcatctcaaggcgc                                             |
| CpN5L_Up_REV               | ggtcgacgacagatatccgaagtgagcgagagaaaaggc                           |

A félkövérrel szedett szekvenciák restriktációs endonukleázok felismerési helyeit, az aláhúzott szekvencia a sgRNS célszekvenciáját jelöli.

### 3.2. Tápoldatok, táptalajok

A médiumokat desztillált vízzel készítettük.

DMEM tápoldat: 10% (V/V) FBS (hőinaktivált borjú szérum), 100 unit/ml penicillin-sztreptomicin

LB tápoldat: 1% (m/V) NaCl, 1% (m/V) tripton, 0,5% (m/V) élesztő kivonat.

Szelekciós LB médiumoknál 50 µg/ml végkoncentrációban kanamicint, illetve ampicillint használtunk.

YPD tápoldat: 1% (m/V) glükóz, 1% (m/V) pepton, 0,5% (m/V) élesztő kivonat

YPD és DMEM médiumoknál 100 egység/ml végkoncentrációban penicillin-sztreptomycin antibiotikum törzsoldatot adtunk.

Szelekciós YPD táptalajhoz 100 vagy 2 µg/ml koncentrációjú nourseothricint (NTC) adtunk

YNB - maltóz tápoldat: 0.19% (m/V) YNB (Yeast Nitrogen Base – minimál nitrogén bázis), 2% (m/V) maltóz

Táptalajok esetén a tápoldatot 2% (m/V) agarral egészítettük ki

### 3.3. Fragmentek amplifikálása, és vizualizálása

A klónozáshoz Phusion Hot Start II DNS polimerázt (Thermo Fisher Scientific) használtunk, az ellenőrző PCR-ekben DreamTaq DNS polimerázt (Thermo Fisher Scientific) alkalmaztunk a gyártó utasításainak megfelelően. A molekuláris munkákhoz (PCR, emésztés, plazmid izolálás, fragment feloldása) steril Lonza ACCUGENE vizet használtunk. A termékeket minőségük és koncentrációjuk meghatározásához (m/V) agaróz gélen futtattuk meg, amely 0,8% m/V agarózt tartalmazott 1x-es TAE puffer-ben (40 mM TRIS, 20 mM ecetsav, 1mM EDTA pH=8) oldva. A gélhez 10 µl/100 ml végkoncentrációban etídium-bromidot adtunk. 1 µl amplikonhoz 1 µl brómfenolkék festéket és 4 µl ACCUGENE vizet adtunk. A mintákat 1X-es TAE pufferben, ismert koncentrációjú 1kbp-os DNS marker (Thermo Fisher Scientific #SM0311) mellett 35-40 percig futtattuk 90V-os egyenáramú elektromos térben. Az agaróz gél UV-fénnyel megvilágítva (Cleaver Scientific Clear View UV transilluminator) tettük láthatóvá a fragmentumokat és Canon EOS1300D digitális fényképezőgéppel dokumentáltuk.

### 3.4. Plazmidkészlet létrehozása

#### 3.4.1. Plazmid gerinc

A korábban csoportunk által létrehozott pNRVL-N5L plazmidot *EcoRV* (Thermo Fisher Scientific) és *SalI* (Thermo Fisher Scientific) restrikciós enzimekkel emésztettük. Az elegyet egész éjszakán át 37 °C-on inkubáltuk, és 1/10 térfogatrészt 3M Na-acetát, majd 1 térfogatrészt

μl izopropanol hozzáadása után 30 percre -20 °C-ra helyeztük. Ezt követően a DNS-t üleptítettük (17.000 x g, 10 perc), majd 700 μl 70%-os (V/V) etanollal mostuk és 20 μl steril ACCUGENE desztillált vízben vettük fel. A fragmentet gélről Viogen Gel Advanced kit segítségével izoláltuk a gyártó utasításainak megfelelően. A DNS-t 30 μl steril ACCUGENE desztillált vízzel eluáltuk. A mintából négy lépcsős kétszeres hígítási sort készítettünk, és koncentrációját a 3.4. fejezetben leírtak alapján gélelektroforézis segítségével határoztuk meg.

Csoportunk egy korábban publikált plazmidjának (pCpOE-GFP-NAT-N5L) *XhoI* (Thermo Fisher Scientific) és *EcoRV* emésztéséből származó promóter-GFP-terminátor fragmentet a fentebb említetteknek megfelelően izoláltunk és határoztuk meg a koncentrációját, majd a pNRVL-N5L plazmidba ligáltuk a 3.4.4. pontban leírtakkal megegyező módon (A *SalI* és *XhoI* hasítások kompatibilis végeket adnak.)<sup>84</sup>. Az így létrejött pNRVL-N5L-GFP plazmidot *ClaI* (Thermo Fisher Scientific) és *NheI* (Thermo Fisher Scientific) restriktációs endonukleázokkal emésztettük a korábban leírt eljárással megegyező módon, ezzel eltávolítva a GFP ORF-et.

### 3.4.2. Fluoreszcens fehérjék génjeinek amplifikálása PCR-el és izolálása

A fluoreszcens fehérjék kódoló szakaszok amplifikálásához az adott FP-hez tartozó *ClaI* forward és *NheI* reverse primereket használtunk. A reakció beállításait és a keletkezett fragmentek koncentrációinak meghatározását a 3.3. pontban leírtakkal azonos módon végeztük, az annealing hőmérsékletet 63 °C-ra, polimerizáció időtartamát 25 s értékekre állítottuk. Az egyes fluoreszcens fehérjék amplifikálásának templátjául szolgáló plazmidok neveit az 1. táblázat tünteti fel.

**1. táblázat.** A fluoreszcens fehérjék génjeinek amplifikálásához szolgáló templátok

| Fluoreszcens fehérjék | Templátul szolgáló plazmid |
|-----------------------|----------------------------|
| CFP                   | pMG1683                    |
| ffDronpa              | Clp-10-NAT-ffDronpa        |
| GFP                   | pMG2120                    |
| mCherry               | pMG2343                    |
| mScarlet              | Clp-10-NAT-mScarlet        |
| mTurquoise2           | Clp-10-NAT-mTurquoise2     |
| RFP                   | pMG2162                    |
| YFP                   | pMG1416                    |

Az amplikonokat 1x-es TE oldattal (10 mM TRIS, 1mM EDTA, pH=7,5) négyszeresére hígítottuk, fél térfogatnyi 30% (m/V) PEG<sub>3350</sub>/30 mM MgCl<sub>2</sub> oldatot adtunk, 1 percig alaposan vortex-eltük, majd 15 percig centrifugáltuk (17.000 x g). A felülúszót óvatosan eltávolítottuk, majd a kiülepedett DNS-t 30 μl steril vízben vettük fel.

### 3.4.3. Fluoreszcens fehérjék génjeinek emésztése

A fluoreszcens fehérjék génjeit *ClaI* és *NheI* restrikciós endonukleázokkal emésztettük. A fragmenteket a 3.4.1. pontban leírtakkal megegyezően gélen való futtatás után Viogen Gel Advanced kit segítségével izoláltuk a gyártó utasításainak megfelelően, amelyekből hígítási sort készítettünk és gélelektroforézissel meghatároztuk azok koncentrációját.

### 3.4.4. Ligálás

A ligálás összeállításánál figyelembe vettük, hogy a plazmid gerinc:inszert arány 1 : 3 legyen. A reakciókban Thermo Fisher Scientific T4 DNS ligáz enzimet, illetve T4 DNS ligáz puffert használtuk a gyártó utasításainak megfelelően, vagyis az első lépésben csak a plazmid gerincet (~20 fmol) és az inszertet (~ 60 fmol) mértük össze a vízzel, a puffert és az enzimet később adtuk az oldathoz.

A mintákban lévő só dialízis membrán segítségével távolítottuk el. Desztillált víz felületére helyeztük a membránt, amire a ligálási elegyet vittük fel, majd 20 perc letelte után a sóalanított oldatot átmértük egy mikrocentrifuga csőbe.

### 3.4.5. *E. coli* elektroporálás és plazmidok izolálása

LB tápoldatban egész éjszakán át 37 °C-on növesztett *E. coli* tenyészetből 50x hígítást készítettünk 50 ml végtérfogatú LB oldatban, amelyet 37 °C-on növesztettünk 3,5 órán keresztül. Ezután a sejteket háromszor mostuk jéghideg steril desztillált vízzel (10.000 x g, 10 perc), majd 500 µl jéghideg steril desztillált vízben vettük fel őket. 100-100 µl desztillált vízben felvett baktérium sejthez hozzáadtuk a ligálási elegyet és 5 percre jégre helyeztük. Ezt követően jégbe hűtött elektroporátor küvetta mértük a szuszpenziót, amelyet fém felszínének szárazra törölése után a sínes tartóba helyeztünk, hogy az elektroporátor rugós fémlapjai érintkezzenek a küvetta fém oldalaival. Az elektroporálás után 950 µl LB tápoldatot mértünk a sejtekre, majd 1 óra 37°C-on való rázatás után a sejteket kanamicinnel kiegészített LB táptalajra szélesztettük.

Kis mennyiségű plazmid izolálásához (miniprep) "High-Speed Plasmid Mini Kit"-et, nagy mennyiségű plazmid izolálásához Geneaid Midi Kit-et használtunk a gyártó utasításainak megfelelően. A DNS-t rendre 30, illetve 120 µl steril vízzel eluáltuk. Miniprep esetén a tömény plazmidból, midiprepek esetében a kétszeres hígítási sor 2.-5. eleméből 1-1 µl-t emésztettünk meg *PvuII* enzimmal 37°C-on 2 órán át. Az emésztett minták minőségét és mennyiségét 0,8 % (m/V) agaróz gélen történő futtatással határoztuk meg 3.3. fejezetben leírtak alapján.

### **3.5. dDNS-ek létrehozása**

A PCR-ek során templátként a pNRVL-FP plazmidok midiprep izolátumainak 300-500x-ös hígításait használtuk FP\_CpN5L\_dDNA forward és reverse primerekkel. A reakció beállításait a 3.3. pontban leírtakkal azonos módon végeztük, az annealing hőmérsékletet 60 °C-ra, polimerizáció időtartamát 1:30 percre állítottuk.

A termékek izolálását és koncentrációjának meghatározását a 3.4.2. fejezetben leírtak szerint végeztük.

### **3.6. A, B és C fragmentek amplifikálása és izolálása**

#### **3.6.1.1. A és B fragmentek amplifikálása**

Az A és B fragmentek amplifikálásához rendre a pTB120 és pTB121 plazmidokat alkalmaztuk templátként. Előbbihez az AHO1096 - pTB120 UNIVREV utóbbihoz gRNA\_CpN5L\_120 forward - AHO1097 primer párokat használtuk a PCR során. A reakció beállításait a 3.3. pontban leírtakkal azonos módon végeztük a gyártó utasításainak megfelelően, az annealing és a polimerizáció paramétereiben volt különbség. Az A fragment esetében ezek rendre 62 °C, 30 sec, illetve 72 °C, 45 sec voltak. A B fragment esetén a reakció első 5 ismétlésében az annealing 60 °C, 20 sec, a polimerizáció 72 °C, 25 sec, míg a fennmaradó 30 ismétlésben a két lépést összevontuk és 72°C, 50 sec-ra állítottuk be az adott értékeket.

A PCR reakció után valamennyi fragmentet a 3.4.2. fejezetben leírtak szerint PEG-es eljárással izoláltuk, majd az 50 µl vízben vettük fel. A mintákból 2x-es hígítási sort készítettünk és a koncentrációjukat a 3.3. fejezetben ismertetett módszerrel határoztuk meg.

#### **3.6.1.2. C fragment létrehozása**

Az A és B fragment 20-20 fmol/µl koncentrációjú oldatait használtuk fel templátként a C fragment létrehozásához, amelyekből 1-1 µl-t alkalmaztunk reakciónként. A reakció beállításait a 3.3. pontban leírtakkal azonos módon végeztük. A reakció két lépésben zajlott, az első 5 ismétlés (annealing 61 °C) a primerek hozzáadása nélkül ment végbe, míg a fennmaradó 30 ismétlés az AHO1232 és AHO1237 primerek felhasználásával zajlott (annealing 62 °C, polimerizáció 1:15 perc).

A termék izolálása és koncentrációjának meghatározása a 3.4.2. fejezetben leírtak szerint történt.

### **3.7. Cas9 plazmid emésztése**

A Cas9 enzimet hordozó pTB101-es plazmid ellenőrző emésztését *EcoRI* (Thermo Fisher Scientific) enzimmal, míg transzformáláshoz való előkészítését, a Cas9 fragment kivágását a

plazmidból *PmeI* (Thermo Fisher Scientific) 37 °C-on történő egész éjszakán tartó emésztéssel végeztük. Az emésztett minták ellenőrzése agaróz gélen, a korábban ismertetett módon történt. Az emésztések összetétele az alábbi volt:

Ellenőrző emésztés:

1 µl pTB101 plazmid  
2 µl *EcoRI* puffer  
0,2 µl *EcoRI*  
17 µl víz

Cas9 fragment linearizálása:

50 µl 10x-es kék puffer  
4 µl *PmeI*  
15 µl pTB101 plazmid (~10 µg)  
431 µl ACCUGENE desztillált víz

A minta kicsapása a pNRVL-N5L plazmid emésztésénél leírtak szerint történt. Kétszeres hígítási sort készítettünk (2x, 4x, 8x) és ismert koncentrációjú 1kbp-os DNS marker mellett futtatva meghatároztuk a koncentrációját. A Cas9 fragment koncentrációját 100 fmol/µl-re állítottuk be steril ACCUGENE desztillált vízzel.

### 3.8. Kémiai transzformálás

A kémiai transzformálást Németh és mtsi. által kidolgozott eljárás szerint végeztük <sup>85</sup>. Az egyes transzformálásokhoz 2000 fmol C fragment izolátumot, 500 fmol emésztett Cas9 fragmentet, 10 µl egyszálú hordozó DNS-t és 2000 fmol izolált donor DNS-t használtunk. A sejteket 100 µg/ml NTC tartalmú YPD csészére szélesztettük, és 3 napig 30°C-on inkubáltuk.

### 3.9. Kolónia PCR

A szelekciós táptalajon megjelent telepek ellenőrzését PCR-rel végeztük el Holland és mtsi. által leírtak szerint <sup>86</sup>. Az upstream validálás során a CpN5L\_Up\_Chk\_FOR - ScURA3\_Ter\_Chk\_REV, a downstream validálás során a CaTDH3\_Do\_Chk\_FOR - CpN5L\_Do\_Chk\_REV primerpárokat alkalmaztuk. A reakció paramétereit a 3.3. pontban leírtakkal megegyező módon végeztük, a gyártó utasításainak megfelelően. Az annealing hőmérséklet 58 °C, polimerizáció időtartama 1 perc volt. A reakció lejárta után a termékeket a 3.3. pontban feltüntetett módon 0,8%-os (m/V) agaróz gélen futtattuk meg.

### 3.10. A transzformációs kazetta eltávolítása

A kazetta eltávolításához a korábban 100 µg/µl végkoncentrációjú NTC-vel kiegészített YPD csészéken felnőtt telepekből leoltottunk 200 µl 2% (m/v) maltóz tartalmú YNB oldatba, amelyeket egész éjszakán át rázattunk 30 °C-on. Másnap a sejtkoncentrációt Bürker-kamra

segítségével határoztuk meg, majd 2000 sejt/ml-es hígítást készítettünk steril desztillált vízben, amelyből 100 µl-t 2 µg/µl koncentrációjú NTC-vel kiegészített YPD csészékre szélesztettünk.

### **3.11. Genomi DNS izolálás**

A kazettát már nem tartalmazó telepek genomi DNS izolálását Horváth és mtsi. által leírtak szerint végeztük <sup>87</sup>. A koncentráció és az integritás ellenőrzésére a mintákból 1 µl-t futtatunk meg a 3.3. pontban leírtakkal megegyező módon.

### **3.12. A dDNS célzott beépülésének validálása**

#### **3.12.1. DNS izolátumok up-, downstream, illetve a teljes szakasz validálása**

A módosítás upstream és downstream végeinek validálása a 3.9. fejezetben leírtak szerint történt. A teljes szakasz validációjához a CpN5L\_Up\_Chk\_FOR - CpN5L\_Do\_Chk\_REV primerpárt alkalmaztuk a reakció során az annealing hőmérséklet 60 °C-ra, a polimerizáció időtartamát 3 percre állítottuk.

#### **3.12.2. Southern blot**

A dDNS célzott beépülését Southern blot eljárással is alátámasztottuk, amit Horváth és mtsi. által leírtak szerint végeztünk el <sup>87</sup>. Az eljárásban mindhárom vad típusú (*C. parapsilosis* CLIB214, CDC317 és GAI) törzset, illetve a törzsek fluoreszcensen jelölt mutánsait vizsgáltuk, specifikus DIG-jelölt próbával. A beépülés helyéül szolgáló NEUT5L upstream régiójára specifikus próba létrehozásához Digoxigenin 11-dUTP-t használtunk gyártó utasításainak megfelelően, valamint a CpN5L\_Up\_FOR és CpN5L\_Up\_REV primereket. Az emésztési reakció során ~30 µg genomi DNS-t emésztettünk *XhoI* restrikciós endonukleázzal. A DNS-t másnap reggel csaptuk ki a pNRVL-N5L emésztésnél leírtak szerint. A mintáinkat Roche DIG-labeled Molecular weight marker VII mellett futtattuk.

### **3.13. Növekedési kinetika**

A vad típusú és mutáns törzseket steril YPD-be oltottuk le, és 30 °C-on rázattuk őket egy napig, majd a sejtszuszpenzióból 1 µl-t adtunk 2 ml friss YPD tápoldathoz és azonos körülmények között másnap reggelig neveltük a sejteket. A sejteket összegyűjtöttük, majd kétszer mostuk steril desztillált vízzel (2400 x g, 5 perc) A sejtszuszpenziókból steril desztillált vízzel 100x hígítást készítettünk és 600nm-en optikai denzitást mértünk, ami alapján OD<sub>600</sub>=0,015 koncentrációt állítottunk be egy 96 mintahelyes sejtenyésztő edényben. Minden mintát 3-3 párhuzamosban mértünk le. Kontrollként steril YPD és DMEM tápoldatot használtunk. 30 percenként mértük a minták optikai denzitását 600nm-en 48 órán keresztül BioTek Synergy HTX multi-mode reader mikrotiterlap olvasóval.

### 3.14. Mikroszkópos vizsgálatok és makrofágokkal való asszociáció

A validált transzformánsokat a 3.13. Növekedési kinetika pontban leírtak szerint növesztettük fel és mostuk, végül 100 µl steril desztillált vízben vettük fel. A felvételeket Leica Stellaris konfokális mikroszkóp segítségével készítettünk.

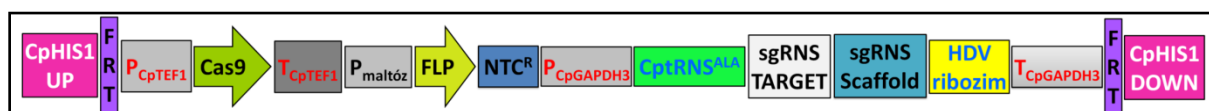
A fertőzőses kísérletekhez a tenyésztőedényhez letapadó egér J774.2 makrofág sejtvonal sejtjeit használtuk. A folyékony nitrogénben tárolt sejteket 37 °C -os vízfürdőben olvasztottuk ki, majd ülepítettük (30 x g, 5 perc). A felülúszó eltávolítása után a kiülepedett sejteket a makrofágok fenntartásához és a kísérletekhez is használt DMEM tápoldat 1 ml-ében szuszpendáltuk fel, majd pipettáztuk 7 ml friss tápoldathoz. A kísérletig a sejteket sejttenyésztő csészékben tartottuk fenn és 37 °C hőmérsékleten, 100%-os relatív páratartalom, valamint 5%-os (V/V) CO<sub>2</sub> mennyiség jelenlétében. A sejtek frissítését 2 naponta végeztük el. A fertőzőses kísérlet során IBIDI µ-Slide 8 Well ibiTreat 8 mintahelyes sejttenyésztő tárgylemezt használtunk. A makrofágokat összegyűjtöttük, és számukat Bürker-kamra segítségével határoztuk meg. A tárgylemez mintahelyébe  $1,5 \times 10^5$  J774.2 makrofág sejtet pipettáztunk 200 µl DMEM tápoldattal. A fluoreszcens fehérjéket expresszáló gomba sejtek koncentrációjának meghatározásához szintén Bürker-kamrát használtunk, a megfelelő koncentrációkat DMEM oldattal állítottuk be. A gomba sejteket a J774-ek kimérését követően hat órával később, törzsenként 3x-os mennyiségben adtuk a makrofágokhoz ( $4,5 \times 10^5$ ), így a kísérletben 1:9 arányban alkalmaztuk a makrofág és gomba sejteket. Másfél óra inkubációt követően a felülúszót eltávolítottuk, és a sejteket óvatosan mostuk 1x-es PBS-sel ötször, majd a mintákat Leica Stellaris konfokális mikroszkóp segítségével vizsgáltuk. Az eredmények két független fertőzőses kísérlet két statisztikai párhuzamosából származnak.

A felvételeken kijelöltünk 10 darab 250 µm x 250 µm-es négyzetet, ezekben a négyzetekben megszámoltuk a makrofágok, illetve a makrofágokkal asszociált gombák számát. Asszociációs indexet számoltunk külön-külön az egyes *C. parapsilosis* törzsekre az alábbi képlet alapján:

$$\text{Asszociációs index} = \frac{\text{makrofágokkal asszociált gombák száma}}{\text{gombával asszociált makrofágok száma}}$$

#### 4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

Munkánkkal szeretnénk volna kiaknázni a CRISPR/Cas9 eljárásban rejlő lehetőségeket, és kidolgozni egy olyan eszközrendszert, amelynek segítségével bármilyen *C. parapsilosis* izolátum gyorsan és hatékonyan jelölhető többféle fluoreszcens fehérjével. Ennek megfelelően a Cas9 az integráció helyéül szolgáló *C. parapsilosis* NEUT5L (CpN5L) régióban hoz létre kettősszalú törést. Erről a régióról laboratóriumunk korábbi vizsgálatai megállapították, hogy módosítása nem változtatja meg a gomba alapvető fiziológiai sajátosságait, ezért ideális expressziós konstrukciók elhelyezésére<sup>84</sup>. Másrészt létrehoztunk egy plazmid szettet, amely a *C. parapsilosis*-szal kompatibilis regulátor szekvenciákat tartalmazza. Ezek a tetszőleges (zöld, kék, piros, sárga) fluoreszcens fényt emittáló fehérjék géneinek expresszióját szabályozzák. Erről a plazmidról PCR segítségével amplifikálható az expressziós konstrukció, amely célzottan a *C. parapsilosis* CpN5L lokuszába épülhet be. A laboratóriumunkban alkalmazott rendszer egyesíti a Nguyen és munkatársai által *C. albicans*-ra kidolgozott moduláris CRISPR/Cas9 eljárás egyszerűségét, a Lombardi és kollégái által *C. parapsilosis*-ra kifejlesztett rendszer által alkalmazott expressziós komponensekkel és az sgRNS-t védő szekvenciákkal (1. ábra).

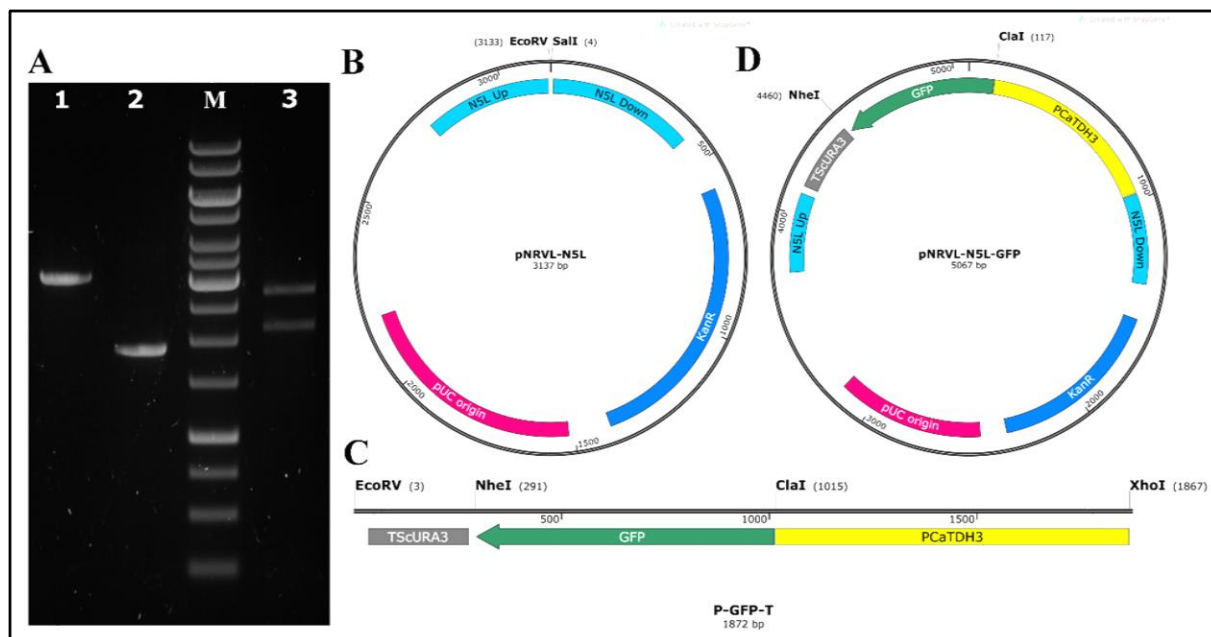


**1. Ábra: Az általunk alkalmazott *C. parapsilosis*-szal kompatibilis moduláris CRISPR/Cas9 rendszer integratív kazettájának sematikus képe.** A target szekvencián kívül (*C. albicans* *HIS1* helyett *C. parapsilosis* *HIS1*, fehér feliratok) a regulátor elemek (piros feliratok) is módosításon estek át és sgRNS védő szekvenciák is alkalmazásra kerültek (kék feliratok).

Az *in vivo* összeépülő kazetta így a *C. parapsilosis* *HIS1* lokuszba épül be, ahol a Cas9 expresszióját a *CpTEF1* gén endogén promótere és terminátora szabályozza, míg a sgRNS kifejeződéséért a *C. parapsilosis* *GAPDH3* promótere és terminátora felelős. A sgRNS stabilitásának növelése céljából a naszcens sgRNS 5' végét a *C. parapsilosis* alanin szállításáért felelős tRNS-e, 3' végét pedig a hepatitisz delta vírus ribozim szekvenciája védi. A tRNS<sup>ALA</sup> endogén RN-ázok, a ribozim saját katalitikus aktivitásának következményeként hasad le a szintézist követően. A kazetta eltávolítását az FRT régiók mentén a maltóz promóter szabályozása alatt álló flipáz katalizálja.

#### 4.1. A donor DNS-ek és az azokat hordozó plazmidok létrehozása

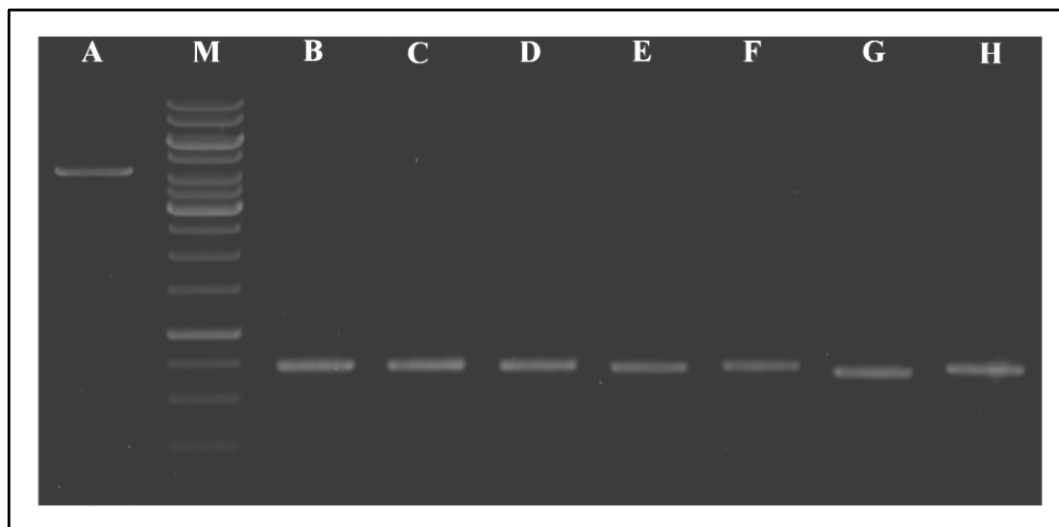
Laboratóriumunk által korábban létrehozott két plazmidot (pN-N5L és pCpOE-GFP-NAT-N5L) rendre *EcoRV/SalI* és *EcoRV/XhoI* restikciós endonukleázokkal emésztettük. Ezzel linearizáltuk a fogadó pN-N5L plazmidot, amely kompatibilis a pCpOE-GFP-NAT-N5L plazmidról kihasított *EcoRV/XhoI* végekkel rendelkező Promoter-GFP-Terminator inszerttel. A plazmid gerinc és az inszert összeépítésével hoztuk létre a pNRVL-N5L-GFP plazmidot (2.ábra).



**2. Ábra: A dDNS-eket kódoló plazmid, és a léterhozásához szükséges szekvencia elemek.** Az „A” panel az *EcoRV/SalI* emésztett pNRVL-N5L plazmid (1) és az *EcoRV/XhoI* emésztett promóter-GFP-terminátor fragment (2) valamint az ezek ligálásával létrejött pNRVL-N5L-GFP plazmid emésztési képe (3) látható. A további paneleken a pNRVL-N5L („B”) a P-GFP-T fragment („C”) és a pNRVL-N5L-GFP („D”) plazmid sematikus ábrája látható. M: marker 250. 500, 750, **1000**, 1500, 2000, 2500, **3000**, 3500, 4000, 5000, **6000**, 8000, 10000 bp.

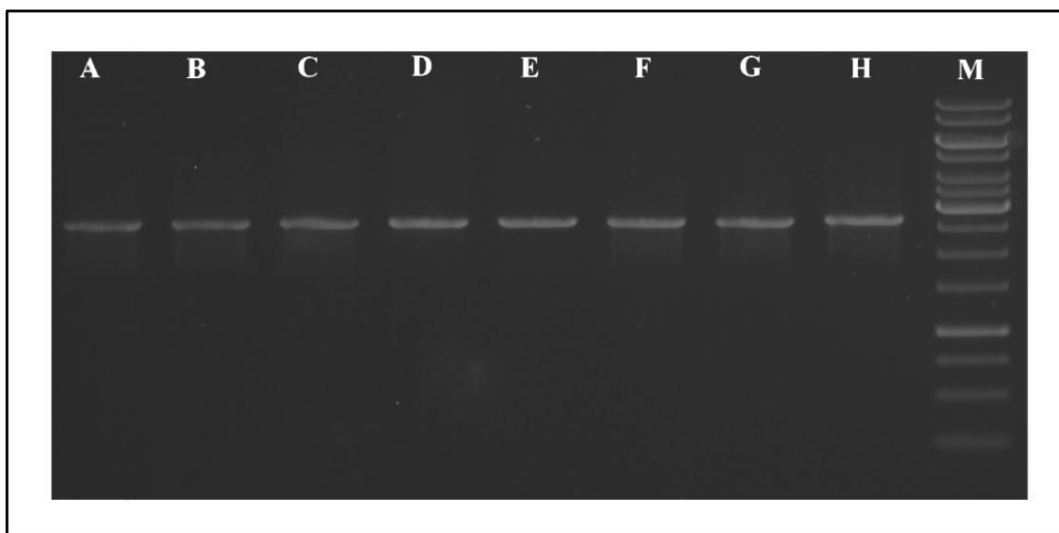
Ez a plazmid a homológ rekombinációhoz szükséges up- és downstream szekvenciák között hordozza a *C. albicans* TDH3 promótere és a *Saccharomyces cerevisiae* URA3 terminátora közé illesztett GFP ORF-et. A fluoreszcens fehérjék génjeit kódoló plazmidokhoz külföldi laboratóriumok jóvoltából jutottunk <sup>88,89,90</sup>. A kodon optimalizált géneket hordozó plazmidokat *E. coli*-ba transzformáltuk, majd izoláltuk. Ezeket a plazmidokat használtuk templátként, hogy a fluoreszcens fehérjéket kódoló géneket a *C. parapsilosis*-szal kompatibilis expressziós konstrukcióba klónozzuk. Az amplifikáció során a termékek 5' és 3' végére rendre egy-egy *ClaI* és *NheI* hely épült. A termékeket és a pNRVL-N5L-GFP plazmidot (amely ezen

enzimek hasítóhelyét a GFP ORF 5' és 3' végén hordozza) az említett enzimekkel emésztettük, majd gélről izoláltuk vissza (3.ábra).



**3. Ábra:** A *ClaI/NheI* emésztett pNRVL-N5L-GFP plazmid gerinc (A) és az említett enzimekkel emésztett fluoreszcens fehérjék génjének gélképe. B: mTurquoise2, C: mScarlet, D: YFP, E: CFP, F: mCherry, G: CFP, H: RFP, M: marker 250, 500, 750, **1000**, 1500, 2000, 2500, **3000**, 3500, 4000, 5000, **6000**, 8000, 10000 bp.

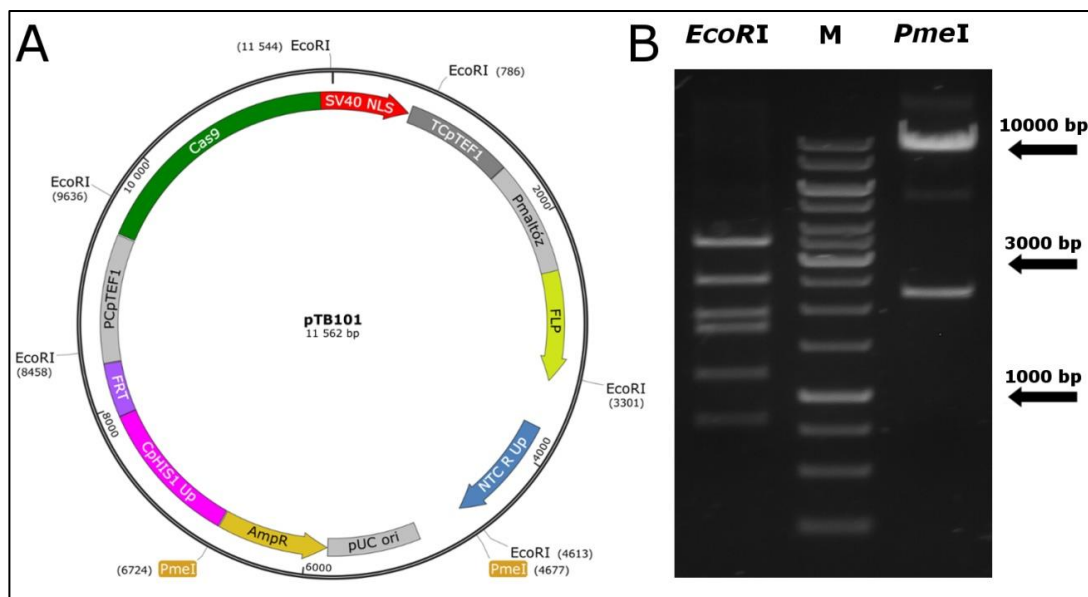
A fluoreszcens fehérjéket kódoló géneket ligálással illesztettük az expressziót szabályozó elemek közé. A létrehozott plazmidokon a gének expresszióját így a *C. albicans* *TDH3* génjének promótere és a pékélesztő *URA3* génjének terminátora szabályozza. A továbbiakban ezen plazmidokat használtuk templátként a donor DNS-ek létrehozásához. A PCR eredményeként létrejövő amplitonok a Cas9 által a cél lókuszból létrehozott törésponttól up- és downstream lévő homológ szekvenciákat (N5L up és down) hordozzák, lehetővé téve a HDR mediálta beépülést. Az amplifikációt követően a termékeket PEG-es eljárással izoláltuk, hogy a primer dimereket eltávolítsuk. Erre azért volt szükség, mert ezek ugyanúgy hordozzák a rekombinációhoz szükséges homológ szakaszok egy rövid szekvenciáját. Emiatt a kettős szálú törés után a HDR alapú hibajavítás során akár ezek is működhetnek templátként, és ugyanúgy beépülhetnek, mint az expressziós konstrukciót hordozó donor DNS. Ennek valószínűsége az izolálással jelentősen csökkenhet. A kémiai transzformáláshoz az izolált PCR termékeket használtuk. Ezek integritását és mennyiségét gélelektroforézis segítségével határoztuk meg (4. ábra).



**4. Ábra: A fluoreszcens fehérjéket kódoló géneket hordozó donor DNS-ek gélképe.** Az amplikonok a fluoreszcens fehérjéket kódoló géneket tartalmazzák a megfelelő regulátoros szekvenciák szabályozása alá helyezve. A konstrukció a két végén a rekombinációhoz szükséges homológ karokat hordozza. A: CFP, B: ffDronpa, C: GFP, D: mCherry, E: mScarlet, F: mTurquoise2, G: RFP, H: YFP, M: marker 250, 500, 750, **1000**, 1500, 2000, 2500, **3000**, 3500, 4000, 5000, **6000**, 8000, 10000 bp.

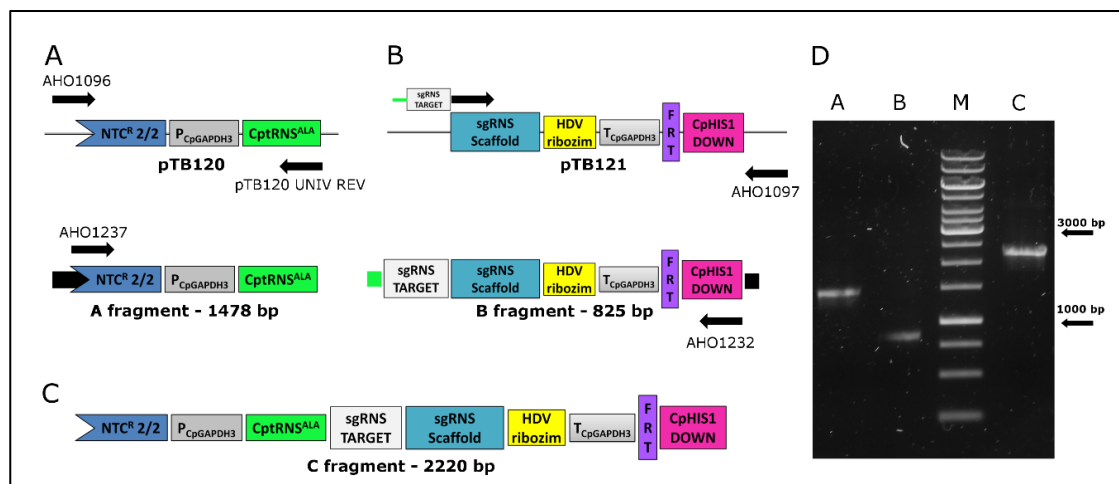
#### 4.2. A CRISPR/Cas9 komponenseinek előállítása transzformáláshoz

Az általunk alkalmazott rendszerben a transzformálást (a donor DNS-en kívül) további két fragmenttel kell elvégezni. Ezek egyike a plazmid emésztéssel előállítható Cas9 fragment, valamint az „A” és „B” fragment felhasználásával fúziós PCR segítségével létrehozható „C” fragment, amelyek a sejtben egymással rekombinálódva épülnek össze. Előbbi az univerzális pTB101 plazmid *PmeI* enzimmal történő emésztésével hozható létre. A keletkező két fragment közül az egyik a (gomba transzformálás szempontjából lényegtelen) bakteriális szelekciós markert és a replikációs origót hordozza, a másik pedig a CRISPR/Cas9 rendszer működéséhez szükséges elemeket. Hogy rendelkezésünkre álljon a munkánkhoz szükséges mennyiségű fragment a pTB101 plazmidot hordozó *E. coli* törzsből nagy mennyiségű plazmidot izoláltunk, és elvégeztük annak *PmeI* emésztését. A pTB101 ellenőrző emésztésének és a Cas9 fragment kiemésztésének eredményét a 5. ábra mutatja be.



**5. Ábra: A pTB101 sematikus képe („A”) és ellenőrző emésztésének gélképe („B”).** A pTB101 plazmid tartalmazza a *CpHIS1* upstream régióját, egy FRT szakaszt, a Cas9 expresszióját biztosító CpTEF1 promótert, a kodon optimalizált Cas9-t kódoló gént, a *C. parapsilosis TEF1* génjének terminátorát, egy maltóz promóter szabályozása alatt álló FLP gént, valamint a szelekciós marker upstream felét (NTC 1/2). M: marker 250. 500, 750, **1000**, 1500, 2000, 2500, **3000**, 3500, 4000, 5000, **6000**, 8000, 10000 bp

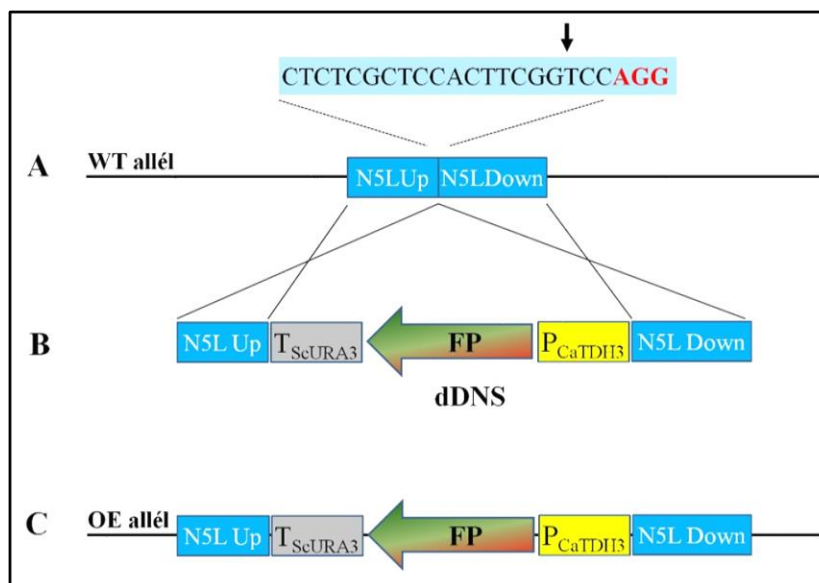
A „C” fragment egy univerzális „A” fragment és egy specifikus „B” fragmentből fűzhető össze. Az „A” fragment tehát mindig változatlan, a szelekciós marker downstream felét hordozza (NTC 2/2), valamint a *CpGAPDH3* promóterét és a *C. parapsilosis* tRNA<sup>ALA</sup> szekvenciáját. A „B” fragmentet kódoló plazmid tartalmazza a sgRNS szerkezeti részét, amelyet egy HDV ribozim követ, majd a *CpGAPDH3* terminátorát egy FRT régiót végül a target lókuszt, azaz a *CpHIS1* gén downstream részét. A „B” fragment létrehozása során alkalmazott forward primer 3’ vége az sgRNS szerkezeti részére specifikus, a primer középső része hordozza a hasítás helyét kijelölő 20 nukleotid hosszúságú target szekvenciát, ezzel tehető specifikussá a gombában kifejeződő sgRNS. A primer 5’ vége pedig az „A” fragment downstream részével (a CptRNA<sup>ALA</sup> 3’ szekvenciájával) megegyező nukleotidsorrendű. A keletkező termék így fuzionáltatható az univerzális „A” fragmenttel, és a létrejövő „C” fragmenten a sgRNS a *C. parapsilosis GAPDH3* promóterének és terminátorának szabályozása alá kerül oly módon, hogy az átíródó sgRNS-t a CptRNA<sup>ALA</sup> és a HDV ribozim szekvenciái védik (6. ábra). E két fragment fúziójával létrehozott „C” fragmentet alkalmaztuk, a kémia transzformálás során a Cas9 fragment és dDNS mellett.



**6. Ábra:** A transzformáláshoz használt „A” és „B” fragmentek felépítése. Az „A” („A” panel), „B” („B” panel) és „C” („C” panel) fragmentek semitikus felépítése valamint a fragmenteket ábrázoló gélfotó („D”). M: marker 250, 500, 750, **1000**, 1500, 2000, 2500 és **3000** bp

#### 4.3. Fluoreszcensen jelölt gombák létrehozása és ellenőrzése

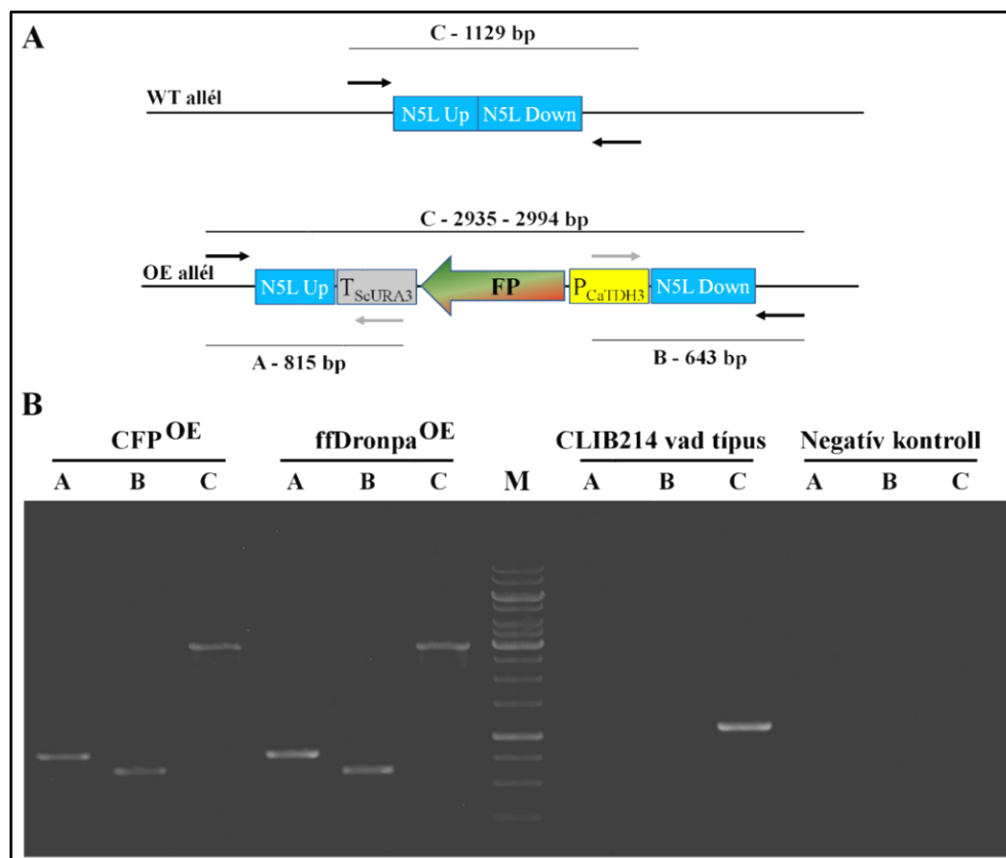
Az általunk alkalmazott eljárás során csak akkor jöhetnek létre rezisztens telepek, ha a Cas9 fragment és a „C” fragment között végbemegy az *in vivo* rekombináció, és előáll a funkcionális rezisztencia gén. Az így létrejött kazetta a *CpHIS1* lokuszba integrálódik, ahonnan kifejeződhetnek a rendszer komponensei.



**7. Ábra:** A dDNS CpNEUT5L régióba történő integrációjának sematikus ábrája. A *C. parapsilosis* NEUT5L lokuszával („A”) megegyező szekvenciák foglalnak helyet a dDNS-ként használt expressziós konstrukció két végén („B”), amely a homológ rekombináció alapja. A kék mezőben a CpNEUT5L cél régióban kiválasztott sgRNS target (fekete) és PAM szekvenciát (piros) tüntettük fel („A”). A fekete nyíl a kettős szálú törés helyét jelzi. A „C” panel a régióba integrálódott konstrukciót ábrázolja.

Ennek módja, hogy a rendszer komponenseinek kifejeződését követően a sgRNS a CpNEUT5L régióba irányítja a Cas9 endonukleázt és a meghatározott ponton (a PAM szekvenciától upstream lévő 3. és 4. nukleotid között) kettős szálú törést hoz létre a DNS-en. A kettős szálú törés következtében és megfelelő homológ szakaszokkal rendelkező dDNS jelenlétében a hiba homológ rekombinációval javítható, így a transzformálás eredményeként a fluoreszcens fehérjét kódoló expressziós kazetta beépülhet a CpNEUT5L régióba. (7.ábra).

A megjelenő rezisztens telepekből DNS-t izoláltunk, és kolónia PCR segítségével ellenőriztük az integrációt. A konstrukció CpNEUT5L régióba való helyes beépülését up- (A) és downstream (B) validálással, illetve a teljes szakasz (C) validálásával végeztük. Ennek sémáját a 8. ábra mutatja be.



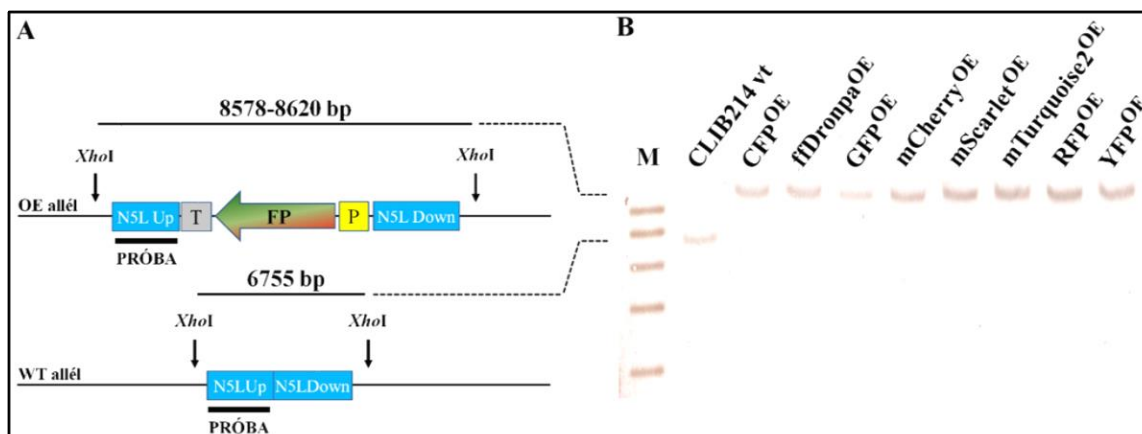
**8. Ábra: A dDNS CpNEUT5L régióba való célzott beépülés validálásának sematikus ábrája ("A") és a termékeket bemutató gélfotó ("B").** Az integráció helyességét up- és downstream régiókat, illetve a teljes lókuszt érintő primerpárokkal ellenőriztük.

Az A és B reakciókban alkalmazott primerpárok egyik tagja csak a genomra, míg másik tagja csak a beépült konstrukcióra specifikusak. Ennek megfelelően terméket csak akkor eredményezhetnek, ha egy templátra képesek kötődni, vagyis a donor DNS beépült a cél lokuszba. Az ellenőrzés során a vad típusú *C. parapsilosis* CLIB214 törzset is felhasználtuk

kontrollként, a reakció negatív kontrolljaként templát mentes kondíciót alkalmaztunk. Mivel a szülői törzs nem rendelkezik az expressziós konstrukcióval, ezért ezek a reakciók nem adnak terméket. A C reakcióban csak a genomra specifikus primereket használtuk, ebben az esetben mind a mutáns, mint a szülői törzs eredményez terméket, ugyanakkor a méretük a homológ szakaszok közötti régióéval megegyező mértékben különbözik, utalva az integrációra. A 8/B. panel reprezentatív ábrája a CFP-t és fDronpa-t hordozó törzs felhasználásával készült. Mivel a mutáns törzsekben ez a reakció csak a nagy méretű (tehát az integrációra utaló) terméket eredményezte (a vad típusra jellemző méretűt nem), ezért a vizsgált törzsek homozigóták, vagyis a konstrukciót két kópiában hordozzák. Tekintettel arra, hogy az alkalmazott primerek nem a FP-ket kódoló génekre, hanem a konstrukció konstans elemeire (promóter és terminátor) specifikusak, ezért ezek a primerek bármilyen expressziós konstrukció validálására alkalmasak. A negatív kontrol mintákban egy esetben sem kaptunk terméket. A PCR validálást követően a kolóniákat maltóz tartalmú tápoldatba oltottuk le, hogy indukáljuk a FLP kifejeződését, majd másnap a szuszpenzióból 2µg/ml NTC tartalmú YPD csészére szélesztettünk, amely lehetővé teszi a szenzitív sejtek növekedését is, így a két nap inkubációt követően megjelenő telepek telepátmérőjük alapján két csoportba voltak elkülöníthetők. A nagy telepek jelentették a rezisztens klónokat, amelyekben nem következett be a kazetta kihasadása, míg a lassabban osztódó, tehát kisebb telepeket formáló sejtek elvesztették a szelekciós markert. A CRISPR/Cas9 rendszer elemeinek elvesztését igazolandó, a potenciális szenzitív telepek közül négyet gyűjtöttünk le, majd ezeket YPD és 100 µg/ml NTC tartalmú YPD csészére is felvittük. A valódi szenzitív sejtek kizárólag NTC mentes táptalajon voltak képesek növekedni. A NTC szenzitivitás utal a kazetta elvesztésére, ezáltal az így létrehozott törzs a fenti rendszerrel ismételtén módosítható.

Ezeket a szenzitív klónokat Southern-blot eljárással is leellenőriztük az esetleges ektopikus integrációk kizárása érdekében (9. ábra). Ezt az ellenőrző lépést azért a kazetta eltávolítása után végeztük el, mert fontosnak tartottuk a Cas9 mielőbbi eltávolítását a genomból, az esetleges off-target hatás minimalizálása érdekében. A hibridizációhoz a NEUT5L upstream homológ kar szekvenciáját jelöltük Digoxigenin-11-dUTP felhasználásával végzett PCR során. Kontrollként minden esetben a szülői törzset használtuk. Az alkalmazott *XhoI* enzimmel történő emésztés a vad típusú törzs esetében egy 6755 bp-os fragmentet eredményez, míg a mutáns törzsekből származó jel esetén a beépült konstrukció méretével nagyobb mérettartományba (8578-8620 bp) eső jelet várunk. A mutánsok esetében azért nem egyféle méretű a várható fragment, mert minimális különbség adódik az alkalmazott ORF-ek mérete között. Minden génre nézve tudtunk azonosítani megfelelően integrálódott törzseket vagyis

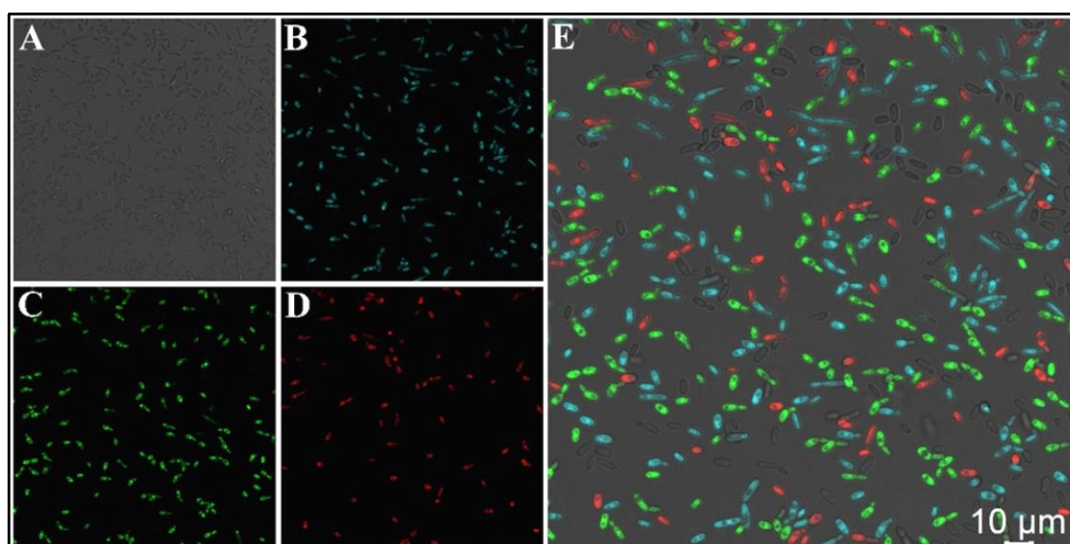
CLIB214 háttéren összesen nyolc (CFP, ffDronpa, GFP, mCherry, mScarlet, mTurquoise2, RFP és YFP) mutánst hoztunk létre.



**9. Ábra.** A CLIB214 háttéren létrehozott törzsek Southern blot stratégiájának vázlata ("A") és eredménye ("B"). DIG-jelölt próbaként a N5L régió upstream régióját alkalmaztuk. M: marker: 8576, 7427, 6016, 4899, 3639 bp

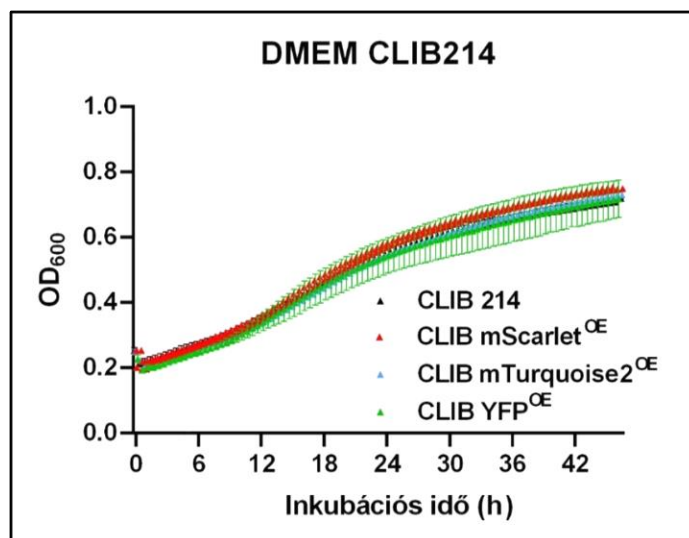
#### 4.4. Fluoreszcens fehérjéket expresszáló gombák vizsgálata

Annak megállapítására, hogy a törzsek valóban ki is fejezik-e a fluoreszcens fehérjéket, a transzformánsokat fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk meg. Megfigyeléseink alapján a RFP és CFP intenzitása igen alacsony, alig volt magasabb, mint a háttér, így ezek további használatát elvetettük. A fennmaradó hat fehérjéből három olyat (mScarlet, mTurquoise2, YFP) tudtunk kiválasztani, amelyek egyszerre is alkalmazhatók, anélkül, hogy az egyes csatornák átfednének (10. ábra).



**10. Ábra.** A CLIB214 vad típusú és három, különböző FP-t expresszáló törzsének fluoreszcens mikroszkópos felvétele. Kék: mTurquoise2, zöld: YFP és piros: mScarlet. Az „A” panel a hagyományos fénymikroszkópos -, a „B” az cián, a „C” a zöld, a „D” a piros csatornában készült képeket ábrázolja, az „E” a három felvétel egymásra vetített képét mutatja.

A létrehozott mutáns törzsek osztódási képességének vizsgálatához növekedési tesztet végeztünk, a törzsek növekedését a vad típus növekedésével hasonlítottuk össze 37 °C-on. Vizsgálatunk során a sejtszuszpenziók optikai denzitását mértük 600nm-en 30 percenként 48 órán keresztül. A méréseket egymástól függetlenül háromszor végeztük el. A CLIB214 vad típusú és kiválasztott mutáns törzseinek növekedési ütemét a 11. ábra mutatja be.

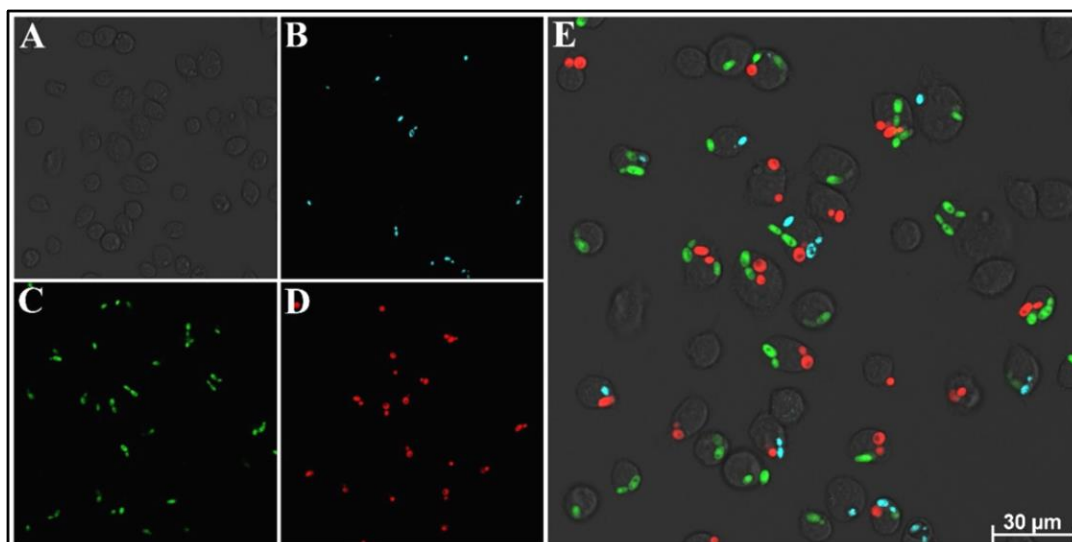


**11. Ábra. CLIB214<sup>mTurquoise2</sup>, CLIB214<sup>mScarlet</sup> és CLIB214<sup>YFP</sup> törzsek növekedési ütemének összehasonlítása a vad típusú CLIB214 szülői törzsével.** A törzseket 10 % (V/V) hőinaktivált borjúsérumot és 100 unt/ml penicillin-sztreptomycin oldattal kiegészített DMEM tápoldatban tenyésztettük 48 órán át 37 °C-on, 30 perces mintavételezéssel.

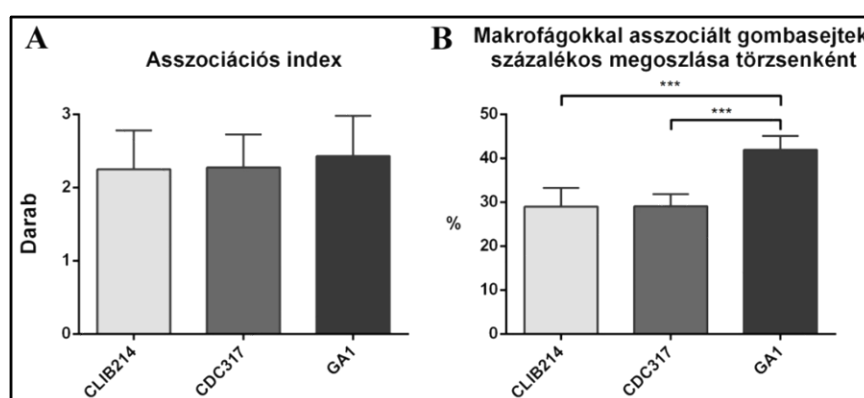
Eredményeink alapján a mutáns törzsek növekedési kinetikája nem tér el szignifikánsan a szülői törzsekétől. Ezt követően további két *C. parapsilosis* izolátumban is létrehoztuk az mScarlet-t, mTurquoise2-t és YFP-t expresszáló törzseket, és a CLIB214 törzsnél ismertetett módon ellenőriztük a mutánsokat, növekedési ütemükben nem tapasztaltunk eltérést a szülői izolátumokhoz képest.

#### 4.5. Kompetíciós kísérlet

Az izolátumok eltérő fluoreszcens fényt emittáló fehérjével való jelölése lehetővé tette kompetíciós fertőzéses kísérletekben való egyidejű alkalmazásukat J774.2 egér makrofág sejtvonal jelenlétében *in vitro*. Kísérletünkben a *C. parapsilosis* CLIB214<sup>mTurquoise2</sup>, CDC317<sup>YFP</sup> és GA1<sup>mScarlet</sup> törzseit vizsgáltuk (12. ábra). A mikroszkópos felvételek elemzésével lehetőségünk nyílt meghatározni, hogy a makrofágok melyik törzsszel milyen mértékben asszociálódtak (felvett és a fagocita felszínéhez tapadt gomba). Eredményeinket a 13. ábra szemlélteti



**12. Ábra. *C. parapsilosis* CLIB214<sup>mTurquoise2</sup>, CDC317<sup>YFP</sup> és GA1<sup>mScarlet</sup> törzseit bemutató mikroszkópos felvétel.** Az „A” panel a hagyományos fénymikroszkópos -, a „B” az cián, a „C” a zöld, a „D” a piros csatornában készült képeket ábrázolja, az „E” a három felvétel egymásra vetített képét mutatja.



**13. Ábra. *C. parapsilosis* törzsek J774.2 makrofágokkal való asszociációja.** Az „A” panel ábrázolja az asszociációs indexet (makrofággal asszociált gombák átlagos száma), a „B” panel a makrofágokkal asszociált gombasejtek százalékos megoszlását törzsenként.

Eredményeink alapján az egyes törzsekre külön-külön kiszámított asszociációs index-ben nem mutatkozott szignifikáns különbség, tehát a makrofágok ugyanolyan arányban asszociáltak mind a CLIB214, mind a CDC317, mind a GA1 jelű törzs sejtjeivel. Ezek értékei rendre  $2,25 \pm 0,2$ ,  $2,27 \pm 0,17$ , és  $2,43 \pm 0,2$ . A makrofágokkal asszociált gomba sejtek százalékos megoszlását vizsgálva törzsenként, ahol az összes makrofággal asszociált gombasejtet vettük 100%-nak, és ezen belül vizsgáltuk az egyes törzsek százalékos arányát, azt tapasztaltuk, hogy a vizsgált gombatörzsek közül a CLIB214 és CDC317 törzsek ezen értékei közel megegyeznek egymással (rendre  $29,01\% \pm 1,59\%$ ,  $29,04\% \pm 1,07\%$ ), addig a GA1 törzs sejtjei szignifikánsan nagyobb mértékben fordulnak elő makrofágokhoz kötötten ( $41,94\% \pm 1,19\%$ ).

## 5. ÖSSZEFOGLALÁS

A *Candida* fajok által okozott fertőzések előfordulási gyakoriságának növekedésével nő az igény a fajok patogenitásában szerepet játszó molekuláris mechanizmusok tanulmányozására. Genetikai és molekuláris vizsgálatokra már számos módszer létezik, mégis a CRISPR/Cas9 rendszer bizonyult a legoptimálisabbnak, kiküszöbölve számos hátrányt, amellyel a korábbi módszerek rendelkeztek. Célunk a CRISPR/Cas9 rendszer nyújtotta lehetőségek felhasználása és egy olyan eszkörendszer kidolgozása volt, amelynek segítségével eltérő *C. parapsilosis* izolátumok hatékonyan jelölhetők különböző fluoreszcens fehérjékkel, valamint a jelölt izolátumok fagocitózis kísérletekben való vizsgálata *in vitro*, az izolátumok közötti esetleges különbségek feltárására. Kísérletünkben sikeresen létrehoztunk zöld (ffDronpa, GFP), kék (mTurquoise2, CFP), piros (mScarlet, mCherry) és sárga/zöld (YFP) fluoreszcens fehérjék génjeit tartalmazó plazmidokat, amelyekről a kívánt gént hordozó expressziós konstrukció amplifikálható és az alkalmazott CRISPR/Cas9 rendszert segítségével a *C. parapsilosis* NEUT5L lokuszába integrálható.

Az expressziós kazetta sikeres beépülését PCR és Southern blot eljárással bizonyítottuk a kazetta célzott beépülését, amelynek során igazolást nyert, hogy az eljárással létrehozott mutánsok a konstrukciót két kópiában hordozzák a megcélzott helyen. Eredményeinket fluoreszcens mikroszkóppal végzett felvételekkel is alátámasztottuk, amelyek bizonyítják, hogy a törzsek valóban kifejezik a fluoreszcens fehérjéket. Meghatároztuk az egymással kompatibilisen alkalmazható FP-eket, és további két klinikai izolátumban további három-három FP-t expresszáló mutánt hoztunk létre. Megállapítottuk, hogy a fenti módosítás nem befolyásolja az izolátumok növekedési rátáját. Laboratóriumunkban a gazda – patogén kölcsönhatás vizsgálatában ezek a törzsek hasznos szolgálatot tesznek, ugyanis az izolátumok eltérő fluoreszcens fényt emitáló fehérjével való jelölése lehetővé tette kompetíciós fertőzéses kísérletekben való egyidejű alkalmazásuk makrofág sejtvonal jelenlétében, ugyanis így a makrofág sejtek egyes törzsekkel való asszociációjának aránya követhető nyomon. Eredményeink alapján elmondható, hogy a CLIB214, CDC317 és GA1 jelű izolátumok közül utóbbi szignifikánsan nagyobb mértékben fordul elő makrofágokkal asszociáltnak. Ezek a megfigyelések információval szolgálnak az izolátumok virulenciájáról és a közöttük lévő különbségekről, amely nagy jelentőséggel rendelkezik a kórokozó patomechanizmusainak tanulmányozásában.

## 6. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretnék köszönetet mondani Prof. Dr. Vágvölgyi Csabának, az SZTE-TTIK Mikrobiológiai Tanszék vezetőjének, hogy támogatta munkámat és helyet biztosított számomra a Mikrobiológiai tanszéken. Köszönettel tartozom Prof. Dr. Gácsér Attila egyetemi tanárnak, az MTA-SZTE „Lendület” Mikrobiom munkacsoport vezetőjének, aki bizalmat szavazott, és biztosított minden körülményt a TDK dolgozatom elkészítéséhez, illetve szaktudásával és építő kritikájával segítette szakmai előremeneteletem. Odaadó munkáját köszönöm a 301-es számú labor minden dolgozójának, végtelen hálával tartozok Dr. Németh Tibornak, aki türelmével, szaktudásával és önzetlen segítségével hozzájárult közös munkánkhoz és a dolgozat létrejöttéhez, köszönettel tartozom Dr. Ferhan Ayaydin-nak a mikroszkópos felvételek elkészítésében nyújtott segítségéért, valamint Prof. Dr. Cheryl Gale, Prof. Dr. Judith Berman és Prof. Dr. Peter Dedecker-nek, hogy rendelkezésünkre bocsájtották a fluoreszcens fehérjék génjeit kódoló plazmidokat, valamint köszönök mindennemű segítséget, amelyet a Mikrobiológiai Tanszék dolgozóitól kaptam TDK dolgozatom elkészítéséhez.

## 7. IRODALOMJEGYZÉK

1. Naranjo-Ortiz, M. A. & Gabaldón, T. Fungal evolution: diversity, taxonomy and phylogeny of the Fungi. *Biol Rev Camb Philos Soc* **94**, 2101–2137 (2019).
2. Blackwell, M. The fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species? *Am J Bot* **98**, 426–38 (2011).
3. Hawksworth, D. L. & Lücking, R. Fungal Diversity Revisited: 2.2 to 3.8 Million Species. *Microbiol Spectr* **5**, (2017).
4. Tsui, C. K. M. *et al.* Molecular techniques for pathogen identification and fungus detection in the environment. *IMA Fungus* **2**, 177–89 (2011).
5. Millon, L., Scherer, E., Rocchi, S. & Bellanger, A.-P. Molecular Strategies to Diagnose Mucormycosis. *J Fungi (Basel)* **5**, (2019).
6. Hawksworth, D. L. & Lücking, R. Fungal Diversity Revisited: 2.2 to 3.8 Million Species. *Microbiol Spectr* **5**, (2017).
7. Parniske, M. Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. *Nat Rev Microbiol* **6**, 763–75 (2008).
8. van der Klei, I. J. & Veenhuis, M. Yeast and filamentous fungi as model organisms in microbody research. *Biochim Biophys Acta* **1763**, 1364–73 (2006).
9. Limon, J. J., Skalski, J. H. & Underhill, D. M. Commensal Fungi in Health and Disease. *Cell Host and Microbe* vol. 22 156–165 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.07.002> (2017).
10. Bongomin, F., Gago, S., Oladele, R. O. & Denning, D. W. Global and Multi-National Prevalence of Fungal Diseases-Estimate Precision. *J Fungi (Basel)* **3**, (2017).
11. Pappas, P. G. *et al.* Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* **48**, 503–35 (2009).
12. Vivek-Ananth, R. P. *et al.* Comparative systems analysis of the secretome of the opportunistic pathogen *Aspergillus fumigatus* and other *Aspergillus* species. *Sci Rep* **8**, 6617 (2018).
13. Naranjo-Ortiz, M. A. & Gabaldón, T. Fungal evolution: diversity, taxonomy and phylogeny of the Fungi. *Biol Rev Camb Philos Soc* **94**, 2101–2137 (2019).
14. Pfaller, M. A. & Diekema, D. J. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev* **20**, 133–63 (2007).
15. Brissaud, O., Guichoux, J., Harambat, J., Tandonnet, O. & Zaoutis, T. Invasive fungal disease in PICU: epidemiology and risk factors. *Ann Intensive Care* **2**, 6 (2012).
16. Paramythiotou, E., Frantzeskaki, F., Flevari, A., Armaganidis, A. & Dimopoulos, G. Invasive fungal infections in the ICU: how to approach, how to treat. *Molecules* **19**, 1085–119 (2014).
17. Vila, T., Sultan, A. S., Montelongo-Jauregui, D. & Jabra-Rizk, M. A. Oral Candidiasis: A Disease of Opportunity. *J Fungi (Basel)* **6**, (2020).
18. Johal, H. S., Garg, T., Rath, G. & Goyal, A. K. Advanced topical drug delivery system for the management of vaginal candidiasis. *Drug Deliv* **23**, 550–63 (2016).
19. Low, C.-Y. & Rotstein, C. Emerging fungal infections in immunocompromised patients. *F1000 Med Rep* **3**, 14 (2011).
20. Wisplinghoff, H. *et al.* Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis* **39**, 309–17 (2004).
21. Roilides, E. Invasive candidiasis in neonates and children. *Early Hum Dev* **87 Suppl 1**, S75-6 (2011).
22. Trofa, D., Gácsér, A. & Nosanchuk, J. D. *Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen. *Clin Microbiol Rev* **21**, 606–25 (2008).
23. Clark, T. A. *et al.* Epidemiologic and molecular characterization of an outbreak of *Candida parapsilosis* bloodstream infections in a community hospital. *J Clin Microbiol* **42**, 4468–72 (2004).
24. Biswas, S., Van Dijck, P. & Datta, A. Environmental sensing and signal transduction pathways regulating morphopathogenic determinants of *Candida albicans*. *Microbiol Mol Biol Rev* **71**, 348–76 (2007).

25. Connolly, L. A. *et al.* The APSES transcription factor Efg1 is a global regulator that controls morphogenesis and biofilm formation in *Candida parapsilosis*. *Mol Microbiol* **90**, 36–53 (2013).
26. Berman, J. & Sudbery, P. E. *Candida Albicans*: a molecular revolution built on lessons from budding yeast. *Nat Rev Genet* **3**, 918–30 (2002).
27. Saville, S. P., Lazzell, A. L., Monteagudo, C. & Lopez-Ribot, J. L. Engineered control of cell morphology in vivo reveals distinct roles for yeast and filamentous forms of *Candida albicans* during infection. *Eukaryot Cell* **2**, 1053–60 (2003).
28. Tóth, R. *et al.* Kinetic studies of *Candida parapsilosis* phagocytosis by macrophages and detection of intracellular survival mechanisms. *Front Microbiol* **5**, 633 (2014).
29. Kadosh, D. & Mundodi, V. A Re-Evaluation of the Relationship between Morphology and Pathogenicity in *Candida* Species. *J Fungi (Basel)* **6**, (2020).
30. Kim, S.-K., Bissati, K. El & Mamoun, C. Ben. Amino acids mediate colony and cell differentiation in the fungal pathogen *Candida parapsilosis*. *Microbiology (Reading)* **152**, 2885–2894 (2006).
31. Andes, D. *et al.* Development and characterization of an in vivo central venous catheter *Candida albicans* biofilm model. *Infect Immun* **72**, 6023–31 (2004).
32. Kennedy, M. J. & Volz, P. A. Ecology of *Candida albicans* gut colonization: inhibition of *Candida* adhesion, colonization, and dissemination from the gastrointestinal tract by bacterial antagonism. *Infect Immun* **49**, 654–63 (1985).
33. Chaffin, W. L. *Candida albicans* cell wall proteins. *Microbiol Mol Biol Rev* **72**, 495–544 (2008).
34. Mayer, F. L., Wilson, D. & Hube, B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence* **4**, 119–28 (2013).
35. Sheppard, D. C. *et al.* Functional and structural diversity in the Als protein family of *Candida albicans*. *J Biol Chem* **279**, 30480–9 (2004).
36. Zhao, X. *et al.* ALS3 and ALS8 represent a single locus that encodes a *Candida albicans* adhesin; functional comparisons between Als3p and Als1p. *Microbiology (Reading)* **150**, 2415–2428 (2004).
37. Modrzewska, B. & Kurnatowski, P. Adherence of *Candida* sp. to host tissues and cells as one of its pathogenicity features. *Ann Parasitol* **61**, 3–9 (2015).
38. Pryszcz, L. P., Németh, T., Gácsér, A. & Gabaldón, T. Unexpected genomic variability in clinical and environmental strains of the pathogenic yeast *Candida parapsilosis*. *Genome Biol Evol* **5**, 2382–92 (2013).
39. Butler, G. *et al.* Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight *Candida* genomes. *Nature* **459**, 657–62 (2009).
40. Bertini, A. *et al.* Targeted gene disruption in *Candida parapsilosis* demonstrates a role for CPAR2\_404800 in adhesion to a biotic surface and in a murine model of ascending urinary tract infection. *Virulence* **7**, 85–97 (2016).
41. Andes, D. *et al.* Development and characterization of an in vivo central venous catheter *Candida albicans* biofilm model. *Infect Immun* **72**, 6023–31 (2004).
42. Seneviratne, C. J., Jin, L. & Samaranayake, L. P. Biofilm lifestyle of *Candida*: a mini review. *Oral Dis* **14**, 582–90 (2008).
43. Munusamy, K., Vadivelu, J. & Tay, S. T. A study on *Candida* biofilm growth characteristics and its susceptibility to aureobasidin A. *Rev Iberoam Micol* **35**, 68–72.
44. Kuhn, D. M., Chandra, J., Mukherjee, P. K. & Ghannoum, M. A. Comparison of biofilms formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic surfaces. *Infect Immun* **70**, 878–88 (2002).
45. Tóth, R. *et al.* *Candida parapsilosis*: from Genes to the Bedside. *Clin Microbiol Rev* **32**, (2019).
46. Naglik, J. R., Challacombe, S. J. & Hube, B. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev* **67**, 400–28, table of contents (2003).

47. Horváth, P., Nosanchuk, J. D., Hamari, Z., Vágvolgyi, C. & Gácsér, A. The identification of gene duplication and the role of secreted aspartyl proteinase 1 in *Candida parapsilosis* virulence. *J Infect Dis* **205**, 923–33 (2012).
48. Singh, D. K. *et al.* Functional Characterization of Secreted Aspartyl Proteases in *Candida parapsilosis*. *mSphere* **4**, (2019).
49. Gácsér, A. *et al.* Lipase 8 affects the pathogenesis of *Candida albicans*. *Infect Immun* **75**, 4710–8 (2007).
50. Gácsér, A., Schäfer, W., Nosanchuk, J. S., Salomon, S. & Nosanchuk, J. D. Virulence of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* in reconstituted human tissue models. *Fungal Genet Biol* **44**, 1336–41 (2007).
51. Gácsér, A., Trofa, D., Schäfer, W. & Nosanchuk, J. D. Targeted gene deletion in *Candida parapsilosis* demonstrates the role of secreted lipase in virulence. *J Clin Invest* **117**, 3049–58 (2007).
52. Scherer, S. & Magee, P. T. Genetics of *Candida albicans*. *Microbiol Rev* **54**, 226–41 (1990).
53. Alani, E., Cao, L. & Kleckner, N. A method for gene disruption that allows repeated use of URA3 selection in the construction of multiply disrupted yeast strains. *Genetics* **116**, 541–5 (1987).
54. Lay, J. *et al.* Altered expression of selectable marker URA3 in gene-disrupted *Candida albicans* strains complicates interpretation of virulence studies. *Infect Immun* **66**, 5301–6 (1998).
55. Kirsch, D. R. & Whitney, R. R. Pathogenicity of *Candida albicans* auxotrophic mutants in experimental infections. *Infect Immun* **59**, 3297–300 (1991).
56. Park, Y.-N., Masison, D., Eisenberg, E. & Greene, L. E. Application of the FLP/FRT system for conditional gene deletion in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **28**, 673–81 (2011).
57. Gácsér, A., Trofa, D., Schäfer, W. & Nosanchuk, J. D. Targeted gene deletion in *Candida parapsilosis* demonstrates the role of secreted lipase in virulence. *J Clin Invest* **117**, 3049–58 (2007).
58. Noble, S. M. & Johnson, A. D. Strains and strategies for large-scale gene deletion studies of the diploid human fungal pathogen *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* **4**, 298–309 (2005).
59. Zhang, F., Wen, Y. & Guo, X. CRISPR/Cas9 for genome editing: progress, implications and challenges. *Hum Mol Genet* **23**, R40–6 (2014).
60. Vyas, V. K., Barrasa, M. I. & Fink, G. R. A *Candida albicans* CRISPR system permits genetic engineering of essential genes and gene families. *Sci Adv* **1**, e1500248.
61. Min, K., Ichikawa, Y., Woolford, C. A. & Mitchell, A. P. *Candida albicans* Gene Deletion with a Transient CRISPR-Cas9 System. *mSphere* **1**,.
62. Lombardi, L., Turner, S. A., Zhao, F. & Butler, G. Gene editing in clinical isolates of *Candida parapsilosis* using CRISPR/Cas9. *Sci Rep* **7**, 8051 (2017).
63. Nguyen, N., Quail, M. M. F. & Hernday, A. D. An Efficient, Rapid, and Recyclable System for CRISPR-Mediated Genome Editing in *Candida albicans*. *mSphere* **2**,.
64. Wolf, D. E. Fundamentals of fluorescence and fluorescence microscopy. *Methods Cell Biol* **114**, 69–97 (2013).
65. Citiulo, F. *et al.* *Candida albicans* scavenges host zinc via Pra1 during endothelial invasion. *PLoS Pathog* **8**, e1002777 (2012).
66. Han, R. *et al.* Astragalus polysaccharide ameliorates H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced human umbilical vein endothelial cell injury. *Mol Med Rep* **15**, 4027–4034 (2017).
67. Grózer, Z. *et al.* *Candida parapsilosis* produces prostaglandins from exogenous arachidonic acid and OLE2 is not required for their synthesis. *Virulence* **6**, 85–92 (2015).
68. Tóth, R. *et al.* Different *Candida parapsilosis* clinical isolates and lipase deficient strain trigger an altered cellular immune response. *Front Microbiol* **6**, 1102 (2015).
69. SHIMOMURA, O., JOHNSON, F. H. & SAIGA, Y. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *J Cell Comp Physiol* **59**, 223–39 (1962).

70. Prasher, D. C., Eckenrode, V. K., Ward, W. W., Prendergast, F. G. & Cormier, M. J. Primary structure of the Aequorea victoria green-fluorescent protein. *Gene* **111**, 229–33 (1992).
71. Tran, P. T., Paoletti, A. & Chang, F. Imaging green fluorescent protein fusions in living fission yeast cells. *Methods* **33**, 220–5 (2004).
72. Bialecka-Fornal, M., Makushok, T. & Rafelski, S. M. A Review of Fluorescent Proteins for Use in Yeast. *Methods Mol Biol* **1369**, 309–46 (2016).
73. Gerami-Nejad, M., Berman, J. & Gale, C. A. Cassettes for PCR-mediated construction of green, yellow, and cyan fluorescent protein fusions in *Candida albicans*. *Yeast* **18**, 859–64 (2001).
74. Cormack, B. P. *et al.* Yeast-enhanced green fluorescent protein (yEGFP): a reporter of gene expression in *Candida albicans*. *Microbiology (Reading)* **143** ( Pt 2, 303–311 (1997).
75. Gerami-Nejad, M., Berman, J. & Gale, C. A. Cassettes for PCR-mediated construction of green, yellow, and cyan fluorescent protein fusions in *Candida albicans*. *Yeast* **18**, 859–64 (2001).
76. Gonias, S., Berman, J. & Gale, C. A. Generation of Fluorescent Protein Fusions in *Candida* Species. *J Vis Exp* (2017) doi:10.3791/55333.
77. Morschhäuser, J., Michel, S. & Hacker, J. Expression of a chromosomally integrated, single-copy GFP gene in *Candida albicans*, and its use as a reporter of gene regulation. *Mol Gen Genet* **257**, 412–20 (1998).
78. van Genechten, W., Demuyser, L., Dedeker, P. & van Dijck, P. Presenting a codon-optimized palette of fluorescent proteins for use in *Candida albicans*. *Sci Rep* **10**, 6158 (2020).
79. Rosseau, S., Seeger, W., Pralle, H. & Lohmeyer, J. Phagocytosis of viable *Candida albicans* by alveolar macrophages: flow cytometric quantification. *Am J Physiol* **267**, L211-7 (1994).
80. Dementhon, K., El-Kirat-Chatel, S. & Noël, T. Development of an in vitro model for the multi-parametric quantification of the cellular interactions between *Candida* yeasts and phagocytes. *PLoS One* **7**, e32621 (2012).
81. Saresella, M. *et al.* A rapid evaluation of phagocytosis and killing of *Candida albicans* by CD13+ leukocytes. *J Immunol Methods* **210**, 227–34 (1997).
82. Tóth, A. *et al.* Secreted *Candida parapsilosis* lipase modulates the immune response of primary human macrophages. *Virulence* **5**, 555–62 (2014).
83. Nagy, I. *et al.* In vitro interactions of *Candida parapsilosis* wild type and lipase deficient mutants with human monocyte derived dendritic cells. *BMC Microbiol* **11**, 122 (2011).
84. Németh, T., D Nosanchuk, J., Vagvolgyi, C. & Gacser, A. Enhancing the chemical transformation of *Candida parapsilosis*. *Virulence* **12**, 937–950 (2021).
85. Holland, L. M. *et al.* Comparative phenotypic analysis of the major fungal pathogens *Candida parapsilosis* and *Candida albicans*. *PLoS Pathog* **10**, e1004365 (2014).
86. Horváth, P., Nosanchuk, J. D., Hamari, Z., Vágvolgyi, C. & Gácser, A. The Identification of Gene Duplication and the Role of Secreted Aspartyl Proteinase 1 in *Candida parapsilosis* Virulence. *J Infect Dis* **205**, 923–933 (2012).
87. Németh, T., Papp, C., Vagvolgyi, C., Chakraborty, T. & Gacser, A. Identification and Characterization of a Neutral Locus for Knock-in Purposes in *C. parapsilosis*. *Front Microbiol* **11**, 1194 (2020).
88. Gerami-Nejad, M., Dulmage, K. & Berman, J. Additional cassettes for epitope and fluorescent fusion proteins in *Candida albicans*. *Yeast* **26**, 399–406 (2009).
89. Gonias, S., Berman, J. & Gale, C. A. Generation of Fluorescent Protein Fusions in *Candida* Species. *J Vis Exp* (2017) doi:10.3791/55333.
90. van Genechten, W., Demuyser, L., Dedeker, P. & van Dijck, P. Presenting a codon-optimized palette of fluorescent proteins for use in *Candida albicans*. *Sci Rep* **10**, 6158 (2020).

**A 36. OTDK  
BIOLÓGIA SZEKCIÓ FELHÍVÁSÁNAK  
2. SZÁMÚ MELLÉKLETE**

**TÉTELES SZERZŐI HOZZÁJÁRULÁS**

Alulírott **Zarnócki Andrea** nyilatkozom, hogy a 36. OTDK-ra benyújtott **CRISPR/Cas9 eljárás alkalmazása fluoreszcensen jelölt *Candida parapsilosis* törzsek létrehozására** című pályamunkámban leírtak esetében az alábbi munkafolyamatok elvégzésében vettem részt:

| Részfeladat                                                                         | A részvétel mértéke<br>(ötfokozatú skálán <sup>a</sup> jellemezve) |
|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|
| Primerek tervezése                                                                  | 5                                                                  |
| Plazmidkészlet létrehozása: PCR-reakciók, emésztés, ligálás, fragmentek izolálása   | 5                                                                  |
| Gélelektroforézis                                                                   | 5                                                                  |
| DonorDNS előállítása                                                                | 5                                                                  |
| CRISPR/Cas9 rendszer eleminek létrehozása: PCR, emésztés                            | 5                                                                  |
| <i>Candida parapsilosis</i> törzsek transzformálása                                 | 5                                                                  |
| Genomi DNS izolálás és Southern blot eljárás                                        | 5                                                                  |
| Növekedési kinetika vizsgálata                                                      | 5                                                                  |
| J774.2 makrofág sejtek fenntartása                                                  | 4                                                                  |
| Mikroszkópos vizsgálatok: Kompetíciós fertőzéses kísérlet tervezése és végrehajtása | 3                                                                  |
| Fertőzéses kísérlet eredmények kiértékelése                                         | 4                                                                  |

**Kelt: 2022.11.14.**

  
Pályamunkát benyújtó hallgató (név)  
aláírása

A nyilatkozatban foglaltak helyességét megerősítem:

 (SZÉTTI MUNKASZOCIÁLTÁRSZ.)  
Témavezető (név, munkahely)